

Aus dem Lehrstuhl
für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
Prof. Dr. Christof Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Einfluss von molekularem Wasserstoff auf die oxidativen Stressparameter in Endothelzellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Marc Bahner

2024

Aus dem Lehrstuhl
für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie
Prof. Dr. Christof Schmid
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Einfluss von molekularem Wasserstoff auf die oxidativen Stressparameter in Endothelzellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Marc Bahner

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Karla Lehle

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Elke Eggenhofer

Tag der mündlichen Prüfung:

27.08.2024

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 6 |
| Abbildungsverzeichnis | 7 |
| Tabellenverzeichnis | 9 |
| 1 Einleitung | 10 |
| 1.1 Oxidativer Stress und chronische Abstoßung nach LTx | 10 |
| 1.2 Endothel assoziierte Lungenschädigung nach LTx..... | 13 |
| 1.3 CsA-induzierter oxidativer Stress und endotheliale Schädigung | 16 |
| 1.4 Molekularer Wasserstoff (H ₂) | 20 |
| 1.5 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe und Zielsetzung für diese Arbeit | 23 |
| 2 Material und Methoden | 24 |
| 2.1 Geräte und Chemikalien..... | 24 |
| 2.2 Herstellung von Verbrauchsmaterialien..... | 26 |
| 2.2.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) | 26 |
| 2.2.2 Gelatine-Lösung 0,25 % | 26 |
| 2.2.3 HUVEC-Nährmedien | 26 |
| 2.3 Zellkultur..... | 26 |
| 2.3.1 Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC)..... | 27 |
| 2.3.2 Gelatinieren von Kulturoberflächen..... | 27 |
| 2.3.3 Auftauen kryokenservierter Zellen..... | 28 |
| 2.3.4 Zellzählung, Passagieren und Aussaat von Zellen | 28 |
| 2.4 Methodik zur Messung der Endothelzell-Vitalität | 29 |
| 2.4.1 Versuchsablauf | 29 |
| 2.4.2 MTS – Zell-Vitalitäts-Test | 30 |
| 2.4.2.1 Prinzip | 30 |
| 2.4.2.2 Vorgehen | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5 Methodik zur ROS-Induktion mittels TNF- α , LPS, H ₂ O ₂ und CsA | 32 |
| 2.5.1 Versuchsablauf | 32 |
| 2.5.1.1 Behandlungsschemata | 33 |
| 2.5.2 Zellfärbung | 34 |
| 2.5.2.1 Prinzip | 34 |
| 2.5.2.2 TBHP als Positivkontrolle..... | 35 |
| 2.5.2.3 Vorgehen | 35 |
| 2.5.3 Fluoreszenzaufnahmen mit dem Mikroskop..... | 36 |
| 2.5.4 Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen mittels ImageJ..... | 36 |
| 2.5.4.1 Prinzip | 36 |
| 2.5.4.2 Verwendete Macro's und Threshold-Methoden | 39 |
| 2.5.4.3 Vorgehen | 41 |
| 2.6 Methodik zur Arbeit mit H ₂ | 43 |
| 2.6.1 Versuchsablauf zur ROS-Reduktion mittels H ₂ | 43 |
| 2.6.2 Prinzipien der Arbeit mit H ₂ | 44 |
| 2.6.3 Anreicherung des Nährmediums mit H ₂ | 45 |
| 2.6.4 H ₂ -Priming/H ₂ -Behandlung der Zellen | 46 |
| 2.6.5 Detektion von gelöstem Wasserstoffgas in Nährmedium..... | 46 |
| 2.6.5.1 Prinzip | 46 |
| 2.6.5.2 Versuchsablauf | 48 |
| 2.6.5.3 Messwerterhebung mittels H ₂ Blue Test Reagenz | 49 |
| 2.7 Statistik..... | 49 |
| 3 Ergebnisse | 50 |
| 3.1 Einfluss von CsA auf die Endothelzell-Vitalität | 50 |
| 3.1.1 Überprüfung der Vergleichbarkeit unterschiedlicher Versuchsparameter..... | 50 |
| 3.1.1.1 Negativkontrollen..... | 50 |
| 3.1.1.2 Zelldichte bei Aussaat | 51 |

| | |
|---|------------|
| 3.1.1.3 Auswirkungen eines zusätzlichen Mediumwechsels | 53 |
| 3.1.1.4 Mögliche Unterschiede der Kulturen | 54 |
| 3.1.2 abschließende Analyse der erhobenen Messwerte | 54 |
| 3.2 ROS-Induktion mittels TNF- α , LPS, H ₂ O ₂ und CsA | 56 |
| 3.2.1 TBHP als Positivkontrolle..... | 56 |
| 3.2.2 ROS-Induktion mittels TNF- α und LPS | 59 |
| 3.2.3 ROS-Induktion mittels H ₂ O ₂ | 60 |
| 3.2.4 ROS-Induktion mittels CsA | 63 |
| 3.3 Untersuchungen zur ROS-Reduktion mittels H ₂ und H ₂ -Stabilität im Nährmedium | 68 |
| 3.3.1 ROS-Reduktion mittels H ₂ | 68 |
| 3.3.1.1 Versuch 1..... | 68 |
| 3.3.1.2 Versuche 2 und 3..... | 70 |
| 3.3.1.3 Versuch 4..... | 73 |
| 3.3.2 H ₂ -Stabilität im Nährmedium..... | 75 |
| 4 Diskussion | 77 |
| 4.1 CsA zeigt nur einen minimalen zytotoxischen Effekt auf HUVEC..... | 77 |
| 4.2 Oxidativer Stress bei HUVEC konnte mit H ₂ O ₂ und CsA ausgelöst werden | 79 |
| 4.3 H ₂ mit großem Potential als nicht-invasive Therapiemöglichkeit..... | 83 |
| 4.4 Limitationen dieser Arbeit..... | 84 |
| 5 Zusammenfassung..... | 86 |
| 6 Literaturverzeichnis..... | 87 |
| Danksagung..... | 108 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------------------|--|
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BOS | <i>bronchiolitis obliterans syndrome</i> |
| CLAD | <i>chronic lung allograft dysfunction</i> |
| CNI | Calcineurin-Inhibitoren |
| CsA | Cyclosporin A |
| DCFDA | Dichlorodihydrofluorescein Diazetat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| FKS | fetales Kälberserum |
| H ₂ | molekularer Wasserstoff |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HLT _x | Herz-Lungen-Transplantation |
| HT _x | Herztransplantation |
| HUVEC | <i>human umbilical vein endothelial cells</i> |
| IRI | <i>ischemia reperfusion injury</i> |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LT _x | Lungentransplantation |
| NFAT | <i>nuclear factor of activated T-lymphocytes</i> |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NW | Nebenwirkungen |
| O ₂ | molekularer Sauerstoff |
| O ₂ • | Superoxidanion |
| OH• | Hydroxylradikal |
| OT | Objektträger |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PGD | <i>primary graft dysfunction</i> |
| RAS | <i>restrictive allograft syndrome</i> |
| RF | Risikofaktoren |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> |
| TBHP | Tert-Butylhydroperoxid |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| T _x | Transplantation |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1. Oxidativer Stress und chronische Abstoßung nach LTx..... | 12 |
| Abbildung 2. Endothel assoziierte Lungenschädigung nach LTx..... | 16 |
| Abbildung 3. Wirkmechanismus von CsA..... | 17 |
| Abbildung 4. Relative Oxidationsaktivität einzelner reaktiver Sauerstoff-/Stickstoffspezies. | 20 |
| Abbildung 5. ROS-Bildung im Mitochondrium und deren Neutralisation durch H ₂ | 21 |
| Abbildung 6. Versuchsablauf des MTS – Zell-Vitalitäts-Tests. | 29 |
| Abbildung 7. Enzymatische Reduktion von MTS zu Formazan..... | 31 |
| Abbildung 8. Versuchsablauf zur ROS-Induktion mittels TNF- α , LPS, H ₂ O ₂ und CsA..... | 32 |
| Abbildung 9. Umwandlung von DCFDA in sein fluoreszierendes Produkt DCF ⁻ | 35 |
| Abbildung 10. Schrittweise Darstellung der Auswertung einer Fluoreszenzaufnahme mittels ImageJ. | 38 |
| Abbildung 11. Macro Threshold Triangle..... | 40 |
| Abbildung 12. Macro Threshold Moments. | 40 |
| Abbildung 13. Macro zur Ausführung der Arbeitsschritte bis zur Zellgrenzenfestlegung..... | 40 |
| Abbildung 14. Macro zur Ausführung der Arbeitsschritte nach Zellgrenzenfestlegung. | 41 |
| Abbildung 15. Macro zur Ausführung der Arbeitsschritte zur Messung der Pixelgrauwerte.. | 41 |
| Abbildung 16. Versuchsablauf zur ROS-Reduktion mittels H ₂ | 43 |
| Abbildung 17. Reduktion von Methyleneblau durch H ₂ zu Leukomethyleneblau..... | 47 |
| Abbildung 18. Einfluss der DMSO-Konzentration im Nährmedium auf die Stoffwechselleistung der Endothelzellen. | 51 |
| Abbildung 19. Stoffwechselleistung der Endothelzellen bei verschieden ausgesäten Zelldichten. | 52 |
| Abbildung 20. Auswirkung eines zusätzlichen Mediumwechsels auf die Endothelzell- Vitalität. | 53 |
| Abbildung 21. Vergleich der Endothelzell-Vitalität der verwendeten HUVEC-Kulturen. | 54 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 22. Einfluss von CsA auf die Endothelzell-Vitalität..... | 55 |
| Abbildung 23. TBHP als Positivkontrolle zur ROS-Induktion in Endothelzellen..... | 58 |
| Abbildung 24. ROS-Induktion mittels TNF- α und LPS. | 60 |
| Abbildung 25. ROS-Induktion mittels H ₂ O ₂ – Fluoreszenzaufnahmen..... | 61 |
| Abbildung 26. ROS-Induktion mittels H ₂ O ₂ – Übersicht der einzelnen Versuche..... | 62 |
| Abbildung 27. ROS-Induktion mittels H ₂ O ₂ – Statistische Auswertung. | 63 |
| Abbildung 28. ROS-Induktion mittels CsA – Fluoreszenzaufnahmen. | 64 |
| Abbildung 29. ROS-Induktion mittels CsA – Übersicht der einzelnen Versuche. | 66 |
| Abbildung 30. ROS-Induktion mittels CsA – Übersicht für 6 und 24 h CsA-Behandlung. | 67 |
| Abbildung 31. ROS-Induktion mittels CsA – Statistische Auswertung. | 68 |
| Abbildung 32. ROS-Reduktion mittels H ₂ im 24-Well – Versuch 1. | 70 |
| Abbildung 33. ROS-Reduktion mittels H ₂ im 24-Well – Versuch 2. | 72 |
| Abbildung 34. ROS-Reduktion mittels H ₂ im Objektträger – Versuch 4. | 74 |
| Abbildung 35. Zeitlicher Verlauf der H ₂ -Stabilität im Nährmedium..... | 76 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1. Verwendete Geräte und Materialien. | 24 |
| Tabelle 2. Auflistung der Zusammensetzung des verwendeten HUVEC-Nährmediums. | 25 |
| Tabelle 3. Verwendete Chemikalien. | 25 |
| Tabelle 4. Verwendete Software. | 25 |
| Tabelle 5. Auflistung der verwendeten Zellzahlen sowie Volumina je Kulturgefäß. | 27 |
| Tabelle 6. Verwendete HUVEC-Kulturen. | 27 |

1 Einleitung

1.1 Oxidativer Stress und chronische Abstoßung nach LTx

Die erste Lungentransplantation (LTx) wurde 1963 von James D. Hardy in Jackson, Mississippi durchgeführt. Der Patient verstarb nach 18 Tagen an Nierenversagen (1). In den folgenden zwei Jahrzehnten wurden weitere etwa 38 Lungen-, Lungenlappen- oder kombinierte Herz-Lungentransplantationen (HLTx) durchgeführt, ohne dass ein langfristiger Erfolg erzielt werden konnte (2). Diese Ära war geprägt von Abstoßungsreaktionen und einem inadäquaten Immunsuppressionsschema auf Basis einer hochdosierten Steroidtherapie (3,4). Erst die Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin A (CsA) und eine verbesserte Operationstechnik führte 1981 zur ersten erfolgreichen HLTx mit einem Langzeitüberlebenden, gefolgt von der ersten erfolgreichen Einzellungen-Tx 1982 und Doppellungen-Tx 1986 (4). Seitdem hat sich die LTx von einem seltenen Verfahren in den 1980er Jahren zum therapeutischen Goldstandard in der heutigen Zeit für ausgewählte Patienten mit nichtmalignen Lungenerkrankungen im Endstadium (wie z.B. idiopathische pulmonale Fibrose, chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD) oder idiopathische pulmonale Hypertonie) entwickelt (3,5). Die Zahl transplantierter Lungen ist von den 1990er Jahren bis zum vergangenen Jahrzehnt ungefähr um das Dreifache gestiegen (5). Die mittlere Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten nach LTx hat sich jedoch in diesem Zeitraum nur unmerklich von 4,3 auf 6,3 Jahre verbessert und liegt damit immer noch weit hinter derer anderer transplantierter Organe (wie z.B. Herz, Leber und Niere) (6–8). Hauptverantwortlich für diese niedrige Überlebenswahrscheinlichkeit ist seit über 35 Jahren die chronische Abstoßungsreaktion (CLAD). Gründe dafür sind noch mangelndes Wissen über die zugrundeliegenden pathologischen Zusammenhänge (9) sowie fehlende wirksame pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten (10).

CLAD wird hauptsächlich in zwei klinische Phänotypen eingeteilt: Bronchiolitis-obliterans-Syndrom (BOS) und Restriktives-Allotransplant-Syndrom (RAS). Zusätzlich wird ein gemischter und ein (bis jetzt) undefinierter Typ unterschieden (10). Bis vor kurzem wurde der Begriff BOS noch synonym für CLAD verwendet (11). Erst seit 2010, nach der über die Jahre wachsenden Zahl an Beweisen für die Existenz einer erheblichen histologischen Heterogenität des BOS, wird in einen obstruktiven (BOS) und einen restriktiven Phänotyp (RAS) unter dem

Oberbegriff CLAD unterschieden (12). Histologisch unterscheiden sich beide Entitäten darin, dass die stattfindende irreversible Fibrose bei BOS vor allem in den kleinen Atemwegen lokalisiert ist und zu deren Lumenverschluss führt (Bronchiolitis obliterans/konstriktive Bronchiolitis, BO), während RAS eine periphere Lungenfibrose mit mehreren betroffenen anatomischen Kompartimenten (Atemwege, Rippenfell, interlobuläre Scheidewand, Alveolen und Gefäßsystem) beschreibt (13,14).

Die der CLAD bzw. der irreversiblen Fibrose zugrundeliegenden Entstehungsmechanismen sind noch nicht vollständig verstanden. Es wird davon ausgegangen, dass komplexe immunvermittelte Mechanismen der Autoimmunität und der angeborenen sowie erworbenen Immunität beteiligt sind und dass vermutlich ein unterschiedliches Ausmaß der Qualität der Immunmechanismen zur unterschiedlichen Verteilung der Fibrose führt (9). Inzwischen anerkannt ist, dass entweder immun oder nicht immun bedingte wiederkehrende Verletzungen von Epithel- und Endothelzellen des Lungentransplantats, zu dieser übermäßigen Fibrosebildung und einem abweichenden Heilungsprozess führen. Nicht immun bedingte Schädigungen werden durch Infektionen, Ischämie-Reperfusionsschäden (IRI), gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) oder inhalative Wirkstoffe verursacht und führen zur Aktivierung des Immunsystems. Es kommt zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren unter anderem aus den geschädigten Zellen und zur Rekrutierung bzw. Aktivierung einer Vielzahl an Entzündungszellen (9,15,16). Darunter produzieren Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (15,17–20), welche zur Gewebeschädigung führen.

ROS sind hochreaktive Sauerstoffmetabolite die im Rahmen des normalen Zell-Energiestoffwechsels als Nebenprodukte anfallen und aus molekularem Sauerstoff (O_2) produziert werden. Die drei wichtigsten sind Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$), Hydroxylradikal (OH^{\bullet}) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). In niedrigen bis mäßigen Konzentrationen wirken sie in physiologischen Zellprozessen, in hohen Konzentrationen jedoch verändern bzw. schädigen sie Zellkomponenten wie Lipide, Proteine und DNA (21–23), was schließlich zur Zellschädigung und Beeinträchtigung der normalen Gewebereparatur führt (16,24). Zudem können ROS mehrere stressinduzierte Transkriptionsfaktoren aktivieren, wodurch es zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen kommt. Diese sorgen für die Migration von z.B. Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten, was die Oxidationsschädigung weiter verstärkt (21,25). Der menschliche Körper ist mit einer Vielzahl von Antioxidantien ausgestattet, die dazu dienen, die negativen Wirkungen von Oxidantien wie ROS

auszugleichen. Zu den wichtigsten enzymatischen Antioxidantien der Lunge zählen unter anderem Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase sowie nichtenzymatische Antioxidantien wie Glutathion, Vitamin C und E (26,27). Die Regulierung des Gleichgewichts zwischen Oxidantien (ROS) und Antioxidantien ist entscheidend für die Lebensfähigkeit, Aktivierung und Proliferation von Zellen und somit der Organfunktion. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichts zugunsten von Oxidantien, aufgrund eines Mangels an Antioxidantien und/oder einer übermäßigen Ansammlung von ROS, wird als „oxidativer Stress“ bezeichnet (21).

Zusammenfassend kommt es möglicherweise im Transplantat durch die stattfindende Immunreaktion zu einer erhöhten Produktion von ROS (durch aktivierte Entzündungszellen) und zu einer zusätzlichen Erschöpfung von Antioxidantien (28,29), was in oxidativem Stress resultiert. Dies sorgt für eine zusätzliche Aktivierung des Immunsystems und führt zusammen mit der unvermindert anhaltenden Zellschädigung zu einer chronischen Abstoßung, einem Umbau der Atemwege und schließlich zum Organversagen (15,28–30) (**Abbildung 1**).

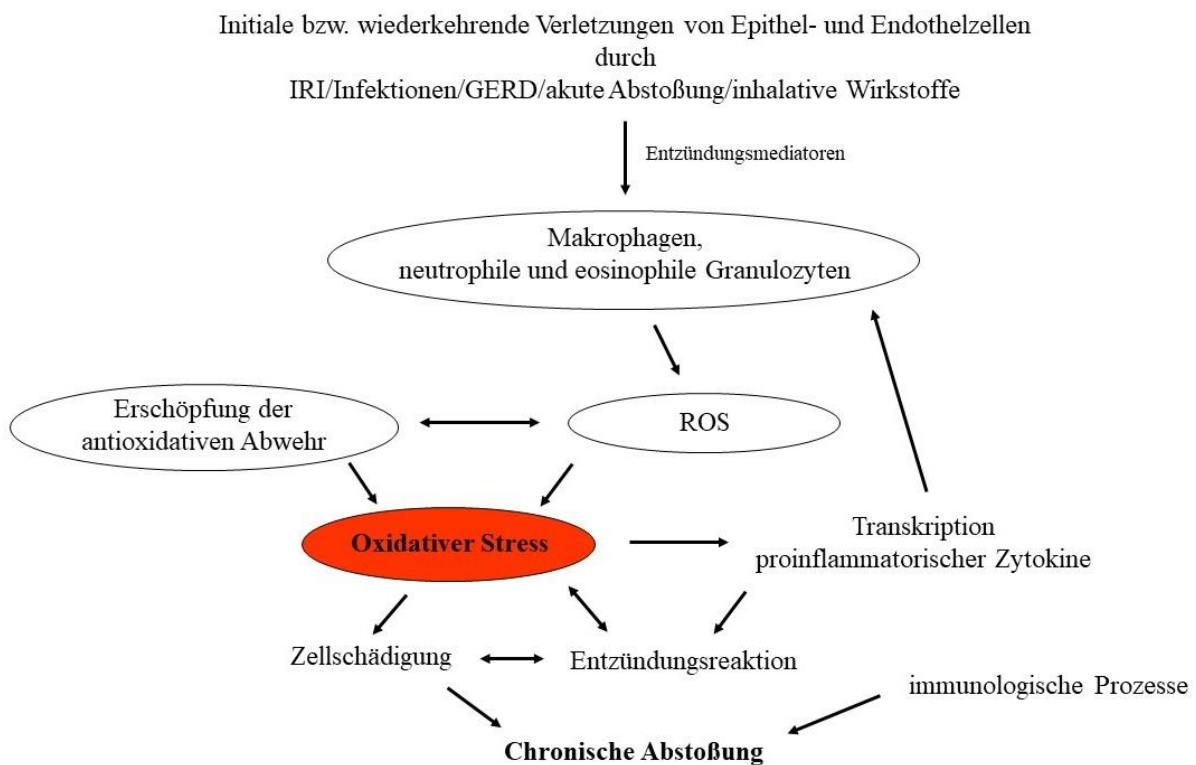


Abbildung 1. Oxidativer Stress und chronische Abstoßung nach LTx. Vereinfachte Darstellung der Rolle von oxidativem Stress innerhalb des Entstehungsmechanismus der chronischen Abstoßungsreaktion in Anlehnung an die in der Literatur (16) verwendete Abbildung (mit Genehmigung der Urheberrechteinhaber [© 2009 Elsevier]). IRI = Ischämie-Reperfusionsschaden, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, GERD = gastroösophageale Refluxkrankheit

Oxidativer Stress ist demnach aktiv am Krankheitsprozess beteiligt (16), was Studien im Tiermodell und am Menschen belegen. So zeigte eine Studie am Tiermodell, dass ein antioxidativer Mechanismus signifikant die chronische Abstoßungsreaktion nach LTx verringerte (31). Zudem konnten Studien am Menschen erhöhte oxidative Stress Parameter sowie einen erniedrigten antioxidativen Status in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit im Rahmen einer chronischen Abstoßung nach LTx nachweisen (29,30,32–35).

Zahlreiche Risikofaktoren (RF), die zu CLAD bzw. den Phänotypen BOS/RAS führen, sind beschrieben. RF des deutlich häufiger vorkommenden (13,20) Phänotyps BOS sind unter anderem das Auftreten von akuter Transplantatabstoßung, Luftverschmutzung und Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* oder *Aspergillus* sowie Infektion durch CMV-Reaktivierung (36–39). Alle aufgeführten RF sind ebenfalls mit oxidativem Stress assoziiert. So wiesen Studien im LTx-Tiermodell einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und akuter Transplantatabstoßung nach (40–42). Luftverschmutzung gilt als exogene Quelle für ROS und ist assoziiert mit chronischen Atemwegserkrankungen (43). Weiterhin induziert *Aspergillus*-Toxin oxidativen Stress in einer Maus-Makrophagen-Zelllinie (44) und in Mäusen (45) sowie ROS und Apoptose in Alveolarzellen *in vitro* (46). *Pseudomonas aeruginosa* ist assoziiert mit oxidativem Stress in den Atemwegen von Patienten mit zystischer Fibrose (47) und mit Lungenschädigung in Nagetieren (47,48) sowie Schädigung von menschlichen Atemwegsepithel- und Endothelzellen *in vitro* (47,49) durch induzierten oxidativen Stress. Zudem ist oxidativer Stress involviert in die CMV-Virusvermehrung (50) und -Reaktivierung (51,52).

1.2 Endothel assoziierte Lungenschädigung nach LTx

Als weiterer RF trägt ein Ischämie-Reperfusionsschaden (IRI), im Rahmen einer akuten Lungenschädigung (während der unmittelbaren postoperativen Phase), welche als primäre Transplantatdysfunktion (PGD) bezeichnet wird (53), erheblich zur Entstehung einer CLAD bei (54). Der primäre Angriffspunkt des IRI ist das Lungenendothel (55,56).

Endothelzellen kleiden als Monolayer die Blutgefäße des gesamten Gefäßbaums aus (57–59). Sie erfüllen mehrere homöostatische Schlüsselfunktionen wie die Kontrolle des vasomotorischen Tonus, den Transport von Leukozyten aus dem Blut in das Gewebe, die Bildung neuer Blutgefäße, regulieren den Makromolekül- und Flüssigkeitsaustausch mit den

Gewebe, dienen der Antigenpräsentation und haben eine Barrierefunktion inne (58,59). Verletzung oder Zelltod beeinträchtigt oder verhindert die Durchführung dieser Aktivitäten, was als endotheliale Dysfunktion bezeichnet wird (58).

Endotheliale Dysfunktion, eine Störung der endothelialen Barriere, die Produktion von ROS und das Entstehen einer Entzündungsreaktion sind Kennzeichen des Lungen-IRI. Beim IRI kommt es zu einer Gewebeschädigung aufgrund der Unterbrechung (Ischämie) und Wiederherstellung (Reperfusion) der Durchblutung des Organs im Rahmen der Entnahme der Spenderlunge und Übertragung auf den Empfänger während der LTx (55,56).

Die Ischämie kann rasch zu einer Kaskade pathologischer Veränderungen in den Zellen führen. Durch die mangelnde arterielle Versorgung entsteht ein schwerwiegendes Ungleichgewicht zwischen Versorgung und Stoffwechselbedarf, was zu einer Hypoxie des Gewebes führt und eine Umstellung von aeroben auf anaeroben Stoffwechsel bewirkt. Die anaerobe Glykolyse beginnt daraufhin Energie zu liefern, ist aber nicht dazu in der Lage, die Energiespeicher in Form von Adenosintriphosphat (ATP) wieder aufzufüllen (60), wodurch es zum Verbrauch der ATP-Speicher kommt (61). ATP-abhängige zelluläre Ionenpumpen versagen, was zu einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und somit zu einer Veränderung der Morphologie des endothelialen Zytoskeletts mit Entstehung von endothelialen Lücken führt (62,63). Durch den anaeroben Stoffwechsel entsteht ein azidotisches Milieu mit Wasserstoff- und Natriumionenverschiebungen innerhalb der Zelle, die zu Zellschwellung und zellulärer Dysfunktion führen (64). Ein Ionenungleichgewicht wirkt sich auch negativ auf die Mitochondrien aus, wodurch es ebenfalls zu Schwellungen und zellulärer Apoptose kommt (60). Diese und weitere zelluläre Veränderungen bzw. Ischämieschäden sind für die Entwicklung einer erhöhten endothelialen Permeabilität verantwortlich (55), und können letzten Endes auch zum Zelltod führen, begleitet von der Freisetzung von schadensassoziierten Molekülen (65).

Weiterhin führt Hypoxie im Endothel neben weiteren Mechanismen auch zu einer verringerten Synthese von vasodilatatorischen und einer hochregulierten Synthese von vasokonstriktorischen Faktoren. Im weiteren Verlauf führt dies in manchen Bereichen der Lunge zu einem „no-reflow“-Phänomen und somit einer langanhaltenden Funktionsstörung der Lunge. In anderen Bereichen ist das Gegenteil der Fall, nämlich eine Umverteilung des Herzzeitvolumens mit kompensatorischer Überzirkulation. Der Hydrostatische Druck steigt im Kapillarbett, was in einem interstitiellen Lungenödem (klinisches Kennzeichen der PGD (54)) mündet und durch die erhöhte Permeabilität des Endothels noch verstärkt wird (55).

Ein weiterer Schlüsselfaktor der pulmonalen IRI ist die bei der Unterbrechung des Blutflusses vom Endothel ausgelöste Signalkaskade, die als "Mechanotransduktion" bezeichnet wird. Der normale Blutfluss wird vom Endothel aufgrund seiner Lage an der Grenzfläche zwischen Blut und Gefäßwand "wahrgenommen" und generiert ein Signal, welches das Membranpotential der Endothelzellen aufrechterhält (66). Die Unterbrechung des Blutflusses führt zur Depolarisation der Endothelzellmembran, zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und somit zur Erzeugung von ROS (66,67).

Während der Reperfusion kommt es, erneut durch den Mechanismus der endothelialen Mechanotransduktion, zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und somit erneut zu einer ROS-Produktion (66), wobei diese um ein Vielfaches größer ist als jene bei Unterbrechung des Blutflusses (66,68). Nach der Reperfusion werden Abfallprodukte, wie Hypoxanthin, die durch den ATP-Mangel während der Ischämie angefallen sind, verstoffwechselt, wodurch zusätzlich ROS erzeugt werden (69). Diese erhöhte ROS-Produktion und der dadurch entstehende Zellschaden löst zusammen mit den frei gewordenen schadensassoziierten Molekülen, welche Alveolarmakrophagen aktivieren, eine nachgeschaltete Produktion von Zytokinen und somit eine sterile Entzündung aus (55,65). Die nachfolgende Rekrutierung und Anheftung von v.a. neutrophilen Granulozyten an der Gefäßwand, gefördert durch exprimierte Zelladhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen (70), scheint dabei hauptsächlich von der entzündeten Endothelschicht der Spenderlungengefäße auszugehen (55). Die Transmigration aktivierter neutrophiler Granulozyten in die extravaskulären und alveolären Räume verursacht weitere mikrovaskuläre Permeabilität und Lungenschädigung durch die toxische Freisetzung von ROS, Proteasen, Elastasen und die Bildung endothelialer Lücken (55,63,71).

Es wird deshalb angenommen, dass eine starke Produktion von ROS nach der Reperfusion, initial hauptsächlich ausgehend vom Lungenendothel (72), die anfängliche Immunreaktion verursacht, die zu einer weiteren ROS-Bildung führt (55) (*siehe 1.1, Abbildung 1*). In diesem Sinne ist die ROS-Bildung bei Lungen-IRI ein sich selbst erhaltender Prozess mit einer konstanten Aufrechterhaltung eines entzündlichen Milieus. Dies wiederum erklärt, warum initiale Ereignisse wie ein IRI zu Beginn einer LTx letztendlich zu einer chronischen Abstoßung beitragen können (15). Das Endothel spielt dabei unter anderem als ROS-Produzent und Barriere für eine Neutrophilenmigration eine zentrale Rolle (**Abbildung 2**).

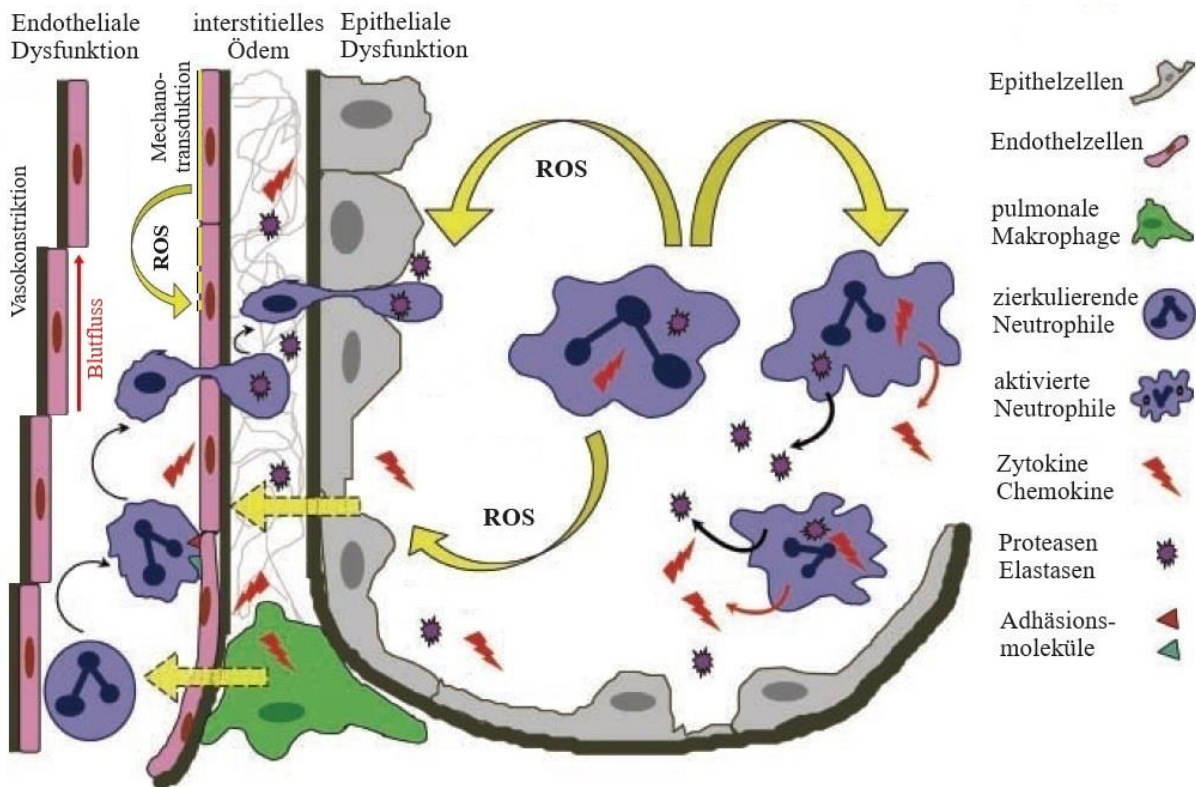


Abbildung 2. Endothel assoziierte Lungenschädigung nach LTx. Bearbeitete Darstellung der in der Literatur (73) verwendeten Abbildung [Bearbeitet mit Genehmigung der American Thoracic Society. Copyright © 2024 American Thoracic Society. Alle Rechte vorbehalten. Das American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine ist eine offizielle Zeitschrift der American Thoracic Society. Den Lesern wird empfohlen, für den richtigen Kontext den gesamten Artikel unter <https://doi.org/10.1165/rcmb.F278> zu lesen. Die Autoren, Herausgeber und die American Thoracic Society haften nicht für Fehler oder Auslassungen in Übersetzungen.]. ROS = reaktive Sauerstoffspezies.

Auch bei der Gabe von Immunsuppressiva hat das Endothelium durch seine anatomische Lage zwischen Blut und darunter liegendem Gewebe eine Schlüsselrolle inne, da systemisch verabreichte Wirkstoffe schnell und bevorzugt mit dieser Zellschicht in Kontakt kommen (59).

1.3 CsA-induzierter oxidativer Stress und endotheliale Schädigung

CsA ist eine lipophile Verbindung und gehört als Immunsuppressivum zur Klasse der Calcineurin-Inhibitoren (CNI) (74). Aktiviertes Calcineurin, dephosphoryliert regulatorische Stellen an mehreren Transkriptionsfaktoren, insbesondere des nukleären Faktors von aktivierten T-Lymphozyten (NFAT) (75). Die Hemmung von Calcineurin durch CsA erfolgt durch Komplexbildung von CsA und intrazellulärem Cyclophilin in T-Lymphozyten. Dieser

Komplex bindet an Calcineurin, verhindert somit die Dephosphorylierung von NFAT und seine anschließende Translokation aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wodurch die Transkription von Interleukin-2 und dadurch die Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von T-Lymphozyten (und anderer Immunzellen) verhindert wird (74–78) (**Abbildung 3**).

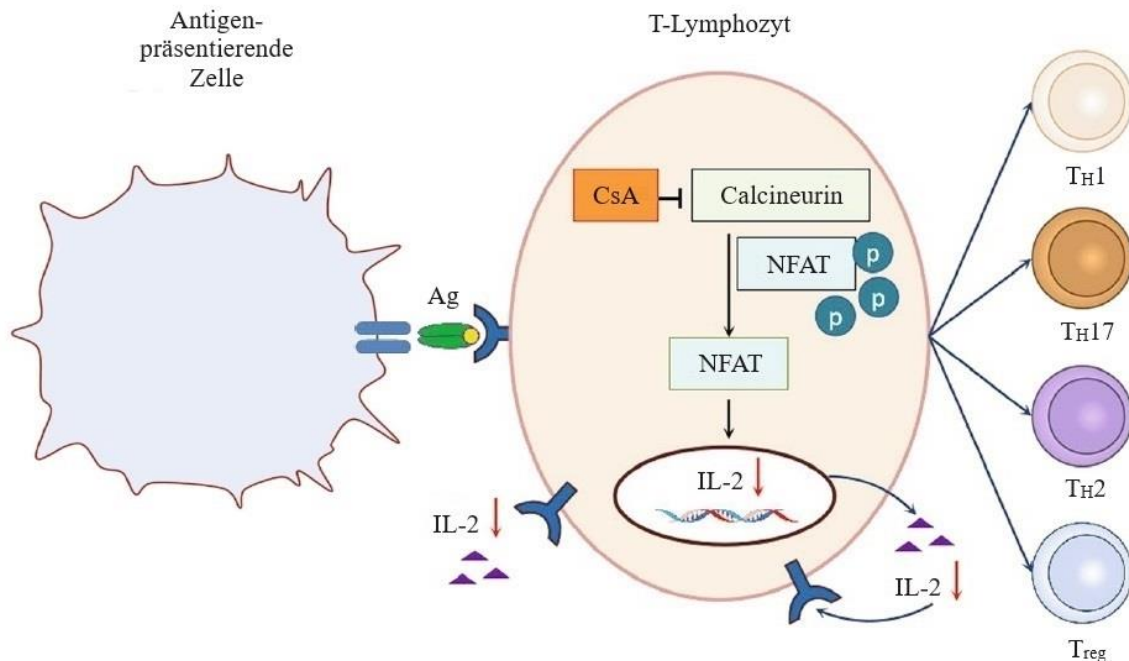


Abbildung 3. Wirkmechanismus von CsA. Bearbeitete Darstellung der in der Literatur (77) verwendeten Abbildung (mit Genehmigung der Urheberrechteinhaber [© 2021 Elsevier]). Ag = Antigen, CsA = Cyclosporin A, IL-2 = Interleukin-2, NFAT = nukleärer Transkriptionsfaktor von aktivierten T-Lymphozyten, TH1 = Typ-1-T-Helferzelle, TH17 = Typ-17-T-Helferzelle, TH2 = Typ-2-T-Helferzelle, T_{reg} = regulatorische T-Zelle.

Wie zu Beginn beschrieben (*siehe 1.1*), revolutionierte CsA Anfang der 1980er Jahre das Outcome von Patienten nach LTx drastisch (4). Seitdem sind CNI wie CsA oder Tacrolimus zum Rückgrat der konventionellen Erhaltungssuppression geworden. Die Erhaltungssuppression ist eine lebenslange immunsuppressive Therapie zur Verhinderung einer akuten und chronischen Abstoßungsreaktion nach LTx. Sie besteht aus einer Dreifachtherapie und umfasst in der Regel einen CNI (Tacrolimus oder CsA), ein antiproliferatives Mittel (Mycophenolat oder Azathioprin) und Kortikosteroide (74,79). Der Einsatz von CsA ist in den letzten Jahren stetig zurück gegangen (80). Dennoch ist CsA weiterhin fester Bestandteil der Therapie-Empfehlung und wird hauptsächlich dann eingesetzt, wenn Patienten Tacrolimus nicht vertragen (79,81).

Ziel der Erhaltungssimmunsuppression ist, eine Balance zu finden zwischen der Verhinderung/Minimierung von immunvermittelter Schädigung des Transplantats und gleichzeitiger Vermeidung von durch Immunsuppressiva-Gabe entstehenden unerwünschten Nebenwirkungen (NW), infektiösen Komplikationen und Risikoerhöhung einer malignen Erkrankung (74,79). Zu den wichtigsten NW von CsA gehören Nephrotoxizität, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Elektrolytanomalien (Hyperkaliämie, Hypomagnesiämie), Neurotoxizität (posteriore reversible Enzephalopathie, Krampfanfälle, Kopfschmerzen, Tremor), thrombotische Mikroangiopathie und Gingivahyperplasie (74,75,82).

Einige dieser systemischen NW, wie Hypertonie, Lipoproteinerhöhungen und Hyperglykämie können indirekt eine endotheliale Dysfunktion induzieren oder verstärken (83–86) oder sind gekennzeichnet durch Endothelschäden (posteriore reversible Enzephalopathie) (87). Zudem kann CsA auch direkt das Endothel schädigen (88), was ebenfalls zu endothelialer Dysfunktion führt, welche wiederum CsA-bedingte NW auslösen kann (86). Direkte CsA-induzierte Auswirkungen auf Endothelzellen sind Zytotoxizität, die Beeinträchtigung von *in-vitro*-Kapillarbildung und die Beeinträchtigung vasoaktiver Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) und Endothelin-1 (86,89). Letzteres führt zu Vasokonstriktion, welche bekanntermaßen die Adhäsion von Immunzellen an endothelialen Adhäsionsmolekülen fördert (90). Die Expression der Adhäsionsmoleküle zusammen mit der Freisetzung von Zytokinen ist zudem ebenfalls direkt CsA-induziert und fördert zusammen mit CsA-bedingter Vasokonstriktion die Vermittlung von Gefäßentzündung (91). Viele dieser direkten Auswirkungen von CsA sind mit oxidativem Stress bzw. mit ROS assoziiert, was zahlreiche Studien belegen:

So konnte gezeigt werden, dass CsA, TLR4-vermittelt, die Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen in kultivierten Endothelzellen und murinen Aorten erhöht, wobei ROS bei der TLR4-abhängigen Signalübertragung eine Rolle spielt (91).

Weiterhin wird berichtet von CsA-induzierten ROS, die in der endothelialen Regulierung von NO eine Rolle spielen. So konnte im Tiermodell indirekt gezeigt werden, dass CsA-induzierte ROS (O_2^{\bullet}) die NO vermittelte Relaxation in Arterien beeinträchtigt und Antioxidantien diesen Effekt aufheben konnten (92). In einer weiteren Studie wurde jedoch *in vitro* an Endothelzellen gezeigt, dass ROS als Vermittler der CsA-induzierten eNOS-mRNA-Hochregulierung fungieren und somit CsA-induziert vermehrt NO produziert wird (93). Wie eine NO-Hochregulierung dennoch zu den bekannten vasokonstriktorischen Eigenschaften von CsA führen kann, erklären Calò et. al. (2000), die ebenfalls eine erhöhte Konzentration

von NO-Metaboliten im Plasma von Nieren- und Herztransplantationspatienten mit CsA-induzierter Hypertonie feststellen konnten. Sie beschreiben einen Mechanismus, in dem CsA-induzierte O_2^\bullet mit NO reagieren (wodurch die NO-Konzentration sinkt), was zur Bildung von Peroxinitrit führt (90), einem noch reaktionsfreudigeren freien Radikal. Somit wird der NO-Verbrauch erhöht, die vorhandene NO-Menge sinkt, die Gefäßerweiterung kann nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zu Vasokonstriktion und Hypertonie (94).

Eine CsA-induzierte konzentrationsabhängige Peroxinitrit-Bildung bestätigen Navarro-Antolín et. al. (2007) *in vitro* in Endothelzellen und im Aortenendothel von Mäusen. Dies führte zu zytotoxischen Wirkungen, was wiederum durch Antioxidantien verhindert werden konnte (95). CsA kann auch durch eine direkte ROS-Induktion im Endothel zur Zytotoxizität führen. Dies konnte im Tiermodell indirekt bestätigt werden, in dem CsA-induzierte Apoptose in Aortenendothelzellen durch ein Antioxidans reduziert werden konnte (96). *In vitro* führte eine CsA-Exposition von Endothelzellen ebenfalls zur ROS-Induktion und anschließender Apoptose (97–99), wobei Trapp et. al. (2005) zeigen konnten dass CsA-induzierter oxidativer Stress und Apoptose korrelieren (99).

Demnach sind CsA-induzierte ROS an endothelialer Aktivierung, Regulierung der NO-Freisetzung und Apoptose beteiligt und spielen somit eine wichtige Rolle in CsA-induzierter endothelialer Dysfunktion.

Ein intaktes Endothel ist Voraussetzung für die normale Regulierung der Gefäßwandfunktion, zu der unter anderem die Hemmung der Leukozytenadhäsion, Thrombusbildung, und die Regulierung der vasomotorischen Funktion gehören. Endothelschädigung bzw. eine endotheliale Dysfunktion führt zur Beeinträchtigung dieser Funktionen und somit zur Lymphozyten- und Makrophagenadhäsion an der Gefäßwand, die in das Transplantat eindringen. Es kommt zur Induktion einer Immunreaktion (100), die das Lungengewebe schädigt, was schließlich zu einer chronischen Abstoßung beiträgt.

Zudem ist oxidativer Stress, generiert von aktivierten Immunzellen oder vom geschädigten Endothel, entscheidend an den lungenschädigenden Mechanismen beteiligt, die zur chronischen Abstoßung beitragen (*siehe 1.1 und 1.2*). Verschlimmernd kommt hinzu, dass immunsuppressive Medikamente wie CsA, die zur Verhinderung/Minimierung von immunvermittelter Schädigung eingesetzt werden, ebenfalls durch die Induktion von oxidativem Stress im Endothel zur endothelialen Schädigung beitragen können.

Eine Kontrolle bzw. Reduktion von oxidativem Stress könnte somit zur Verbesserung der Transplantatfunktion bzw. zur Verhinderung oder Verzögerung der CLAD beitragen.

1.4 Molekularer Wasserstoff (H₂)

Molekularer Wasserstoff (H₂) galt lange Zeit als nicht funktionales und biologisch inertes (reaktionsträges) Gas in Säugetierzellen (101). Ein historischer Artikel, der 2007 in *Nature Medicine* veröffentlicht wurde, hat dieses Konzept umgestoßen, indem er die antioxidative und schützende Wirkung von H₂ beschrieb und das Konzept des selektiven Fängers von Hydroxylradikalen (OH•) als Wirkmechanismus von H₂ demonstrierte (102).

OH• entsteht im Zuge der Bildung von anderen ROS wie H₂O₂ und O₂•⁻ aus O₂. Die meisten O₂•⁻ werden in den Mitochondrien durch Elektronenverluste aus der Elektronentransportkette (103), aber auch durch metabolische Oxidasen wie z.B. die NADPH-Oxidase erzeugt (104). Superoxiddismutase wandelt O₂•⁻ in H₂O₂ um, das durch Glutathionperoxidase oder Katalase zu Wasser (H₂O) neutralisiert wird. In Gegenwart von katalytisch aktiven Eisen- und Kupferionen wird aus H₂O₂ und O₂•⁻ durch die Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion OH• erzeugt (105,106). OH• kann wahllos oxidative Schäden an Nukleinsäuren (wie DNA und RNA), Lipiden und Proteinen verursachen und zählt zusammen mit Peroxinitrit (ONOO⁻) aufgrund seiner hohen Oxidationsaktivität zu den stärksten oxidierenden freien Radikalen (102,107,108) (**Abbildung 4**).

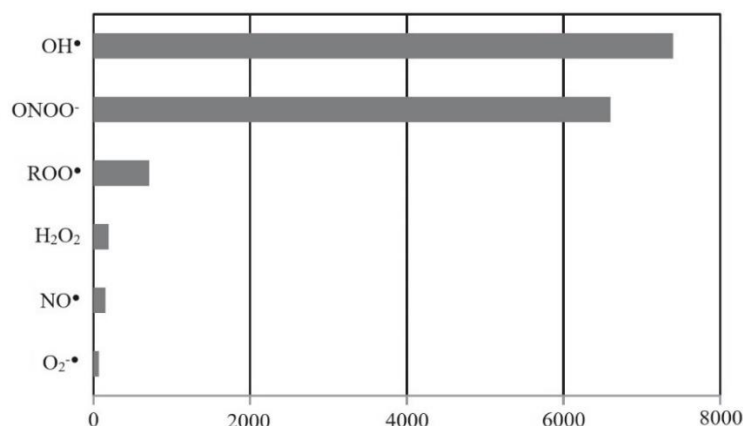


Abbildung 4. Relative Oxidationsaktivität einzelner reaktiver Sauerstoff-/Stickstoffspezies. Bearbeitete Darstellung der in der Literatur (23) verwendeten Abbildung (mit Genehmigung der Urheberrechteinhaber [© 2014 Elsevier]) basierend auf den Daten von Setsukinai et. al. (2003) (108). H₂O₂ = Wasserstoffperoxid, NO• = Stickstoffmonoxidradikal, ONOO⁻ = Peroxinitrit, O₂•⁻ = Superoxidradikal, OH• = Hydroxylradikal, ROO• = Alkylperoxyradikal.

Da H_2 sehr reaktionsträge ist, reagiert es nur mit starken Oxidantien wie OH^\bullet , wohingegen O_2^\bullet , H_2O_2 und NO^\bullet nicht stark genug dafür sind (109). Diese Selektivität von H_2 ist von großer Bedeutung, da O_2^\bullet und H_2O_2 , trotz ihrer zytotoxischen Wirkungen, bei niedrigen Konzentrationen wichtige physiologische Funktionen erfüllen, indem sie als regulierende Signalmoleküle fungieren, die an zahlreichen Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind und biologische Prozesse wie Apoptose, Zellproliferation und -differenzierung regulieren (104). Zudem ist NO^\bullet unter anderem wesentlich für die Erweiterung der Blutgefäße (110). Ein Großteil der NO^\bullet - und O_2^\bullet -abhängigen zytotoxischen Wirkungen beruhen auf der Bildung von Peroxinitrit, das die Funktion der Mitochondrien beeinträchtigt und Zelltod durch Oxidations- und Nitrierungsreaktionen triggert. Gefördert wird die Peroxinitrit-Bildung durch die leichte Diffusion von NO^\bullet aus dem Zytosol in die Mitochondrien, wo es mit dort gebildetem O_2^\bullet reagiert, wodurch Peroxinitrit entsteht (111). Es konnte gezeigt werden, dass H_2 auch in der Lage ist, Peroxinitrit zu eliminieren (auch wenn nicht so effizient wie OH^\bullet). Somit neutralisiert H_2 zytotoxische Radikale wie OH^\bullet und Peroxinitrit (**Abbildung 5**), ohne die wesentlichen biologischen Aktivitäten von anderen, physiologisch nützlichen ROS zu beeinträchtigen (102).

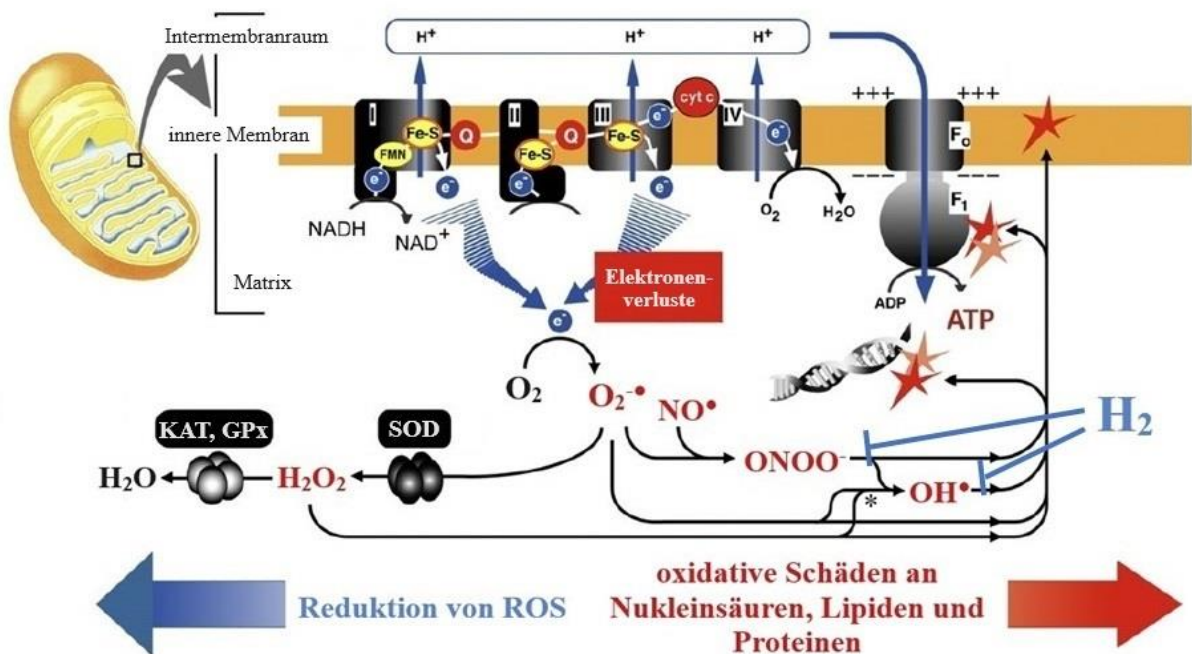


Abbildung 5. ROS-Bildung im Mitochondrium und deren Neutralisation durch H_2 . Bearbeitete Darstellung der in der Literatur (112) verwendeten Abbildung (mit Genehmigung der Urheberrechteinhaber [© 2011 Elsevier]). GPx = Glutathionperoxidase, H_2 = molekularer Wasserstoff, H_2O = Wasser, H_2O_2 = Wasserstoffperoxid, KAT = Katalase, NO^\bullet = Stickstoffmonoxidradikal, $ONOO^\bullet$ = Peroxinitrit, OH^\bullet = Hydroxylradikal, O_2^\bullet = Superoxidradikal, SOD = Superoxiddismutase, * = Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion.

Im Gegensatz dazu eliminieren starke Antioxidantien, wie z. B. Vitamin C, wahllos schädliche und nützliche ROS (113), weshalb die Gabe von Antioxidantien (in hohen Dosen) auch NW verursachen kann (114–116). So z.B. die Erhöhung des Krebsrisikos und der kardiovaskulären Sterblichkeit (117). Für H₂ hingegen ist bisher keine klinische Toxizität bekannt (118), was durchaus erklärbar ist, wenn man berücksichtigt, dass H₂ ein reaktionsträges Gas ist und in unserem Körper keine Funktion hat (23). Weiterhin ist H₂ elektrisch neutral geladen und sogar kleiner als O₂ (118), weshalb es ein ausgezeichnetes Diffusionsvermögen besitzt. So kann es die Zellmembranen ungehindert durchdringen und schnell die Mitochondrien (eine Hauptquelle für ROS und Peroxynitrit (111)) und den Zellkern erreichen, um diese Organellen vor oxidativen Schäden zu schützen (113). Aufgrund dieser Eigenschaften und der Fähigkeit übermäßigen oxidativen Stress abzuschwächen, ohne die Redox-Homöostase zu stören (wie oben beschrieben), könnte H₂ ein ideales Antioxidationsmittel darstellen (23).

Zudem wirkt H₂ nicht nur durch direkte Neutralisation von starken oxidierenden Spezies gegen oxidativen Stress, sondern auch indirekt durch die Hochregulierung der Genexpression von antioxidativen Enzymen unter anderem Superoxiddismutase und Catalase. Auch antiinflammatorische Eigenschaften, wie die Herunterregulierung proinflammatorischer Zytokine, wurden beschrieben. Ebenfalls über die Regulierung der Genexpression wirkt H₂ antiapoptotisch durch die Stimulation antiapoptotischer Faktoren wie Bcl-2 oder durch Suppression proapoptotischer Faktoren wie Caspase 8 und 12. Weiterhin beeinflusst H₂ die Signaltransduktion in Zellen positiv z.B. durch Aktivierung des Nrf2-Signalweges, welcher die Expression von über 200 Genen, die an der Antioxidation und Entgiftung beteiligt sind, reguliert. Jene kleine Auswahl an Wirkmechanismen von H₂ und noch viele weitere wurden eindrucksvoll und ausführlich in verschiedenen Übersichtsarbeiten anhand zahlreicher Studien beschrieben (23,109,118).

Die meisten pharmakologischen Medikamente wirken spezifisch auf ihre Ziele. H₂ scheint sich aufgrund seiner umfassenden und vielfältigen Wirkungen von herkömmlichen Medikamenten zu unterscheiden und stellt somit ein neuartiges Konzept dar (23). Die größten Vorteile von H₂ sind unter anderem die leichte Penetration durch alle biologischen Membranen, die selektive ROS-Reduktion und bisher nicht beschriebene unerwünschte NW. Somit könnte H₂ eine neue therapeutische Strategie zur Abschwächung von oxidativem Stress und dessen pathologischen Folgen darstellen (118).

1.5 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe und Zielsetzung für diese Arbeit

Dieser Arbeit ging eine Studie unserer Arbeitsgruppe voraus, in der unter anderem *in vitro* an Lungenfibroblasten (isoliert aus männlichen Ratten) der Einfluss von CsA auf die Zell-Vitalität sowie auf die Erzeugung von oxidativem Stress untersucht wurden. Die Untersuchungen zur Zell-Vitalität haben gezeigt, dass eine Behandlung mit 1 µg/ml CsA nach 8 h zu signifikanten zytotoxischen Effekten in Fibroblasten führte. Darüber hinaus wurde in den Zellen durch eine 8-stündige Behandlung mit nicht-zytotoxischen CsA-Dosen (0,25-0,5 µg/ml) oxidativer Stress, hervorgerufen durch die Produktion von ROS, erzeugt (119). In Übereinstimmung mit der Studie von Lee et. al. (120), in der in Fibroblasten des menschlichen Zahnfleisches ebenfalls eine ROS-Induktion durch CsA nachgewiesen wurde, konnte dadurch ein Medikamenten-induzierter (CsA) oxidativer Stress in Fibroblasten aufgezeigt werden.

Zudem ist in weiterführender Arbeit innerhalb unserer Arbeitsgruppe an dem erwähnten *in-vitro*-Modell die Fähigkeit von H₂ zur Reduktion von oxidativem Stress untersucht worden (mit bisher unveröffentlichten Ergebnissen).

Da das Endothel, im Gegensatz zu Fibroblasten, anatomisch bedingt in Erstkontakt mit der Blutstrombahn und somit zu systemisch verabreichten Medikamenten wie CsA steht (59), sind für die vorliegende Arbeit Endothelzellen, konkret menschliche Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC), als Zellmodell gewählt worden. HUVEC sind eine weit verbreitete Quelle primärer Endothelzellen für *in-vitro*-Untersuchungen des Gefäßsystems und der Angiogenese (121) und gelten als ein hervorragendes Modell für die Untersuchung der allgemeinen Eigenschaften des Gefäßendothels und der an der Endothelfunktion beteiligten biologischen Signalwege (122).

In Anlehnung an die Studie unserer Arbeitsgruppe, bestand nun das Ziel dieser Arbeit zum einen in der Untersuchung des Einflusses von CsA auf die Zell-Vitalität von Endothelzellen. Zum anderen sollte eine mögliche Induktion von oxidativem Stress bzw. ROS in Endothelzellen durch CsA und durch weitere Reagenzien (TNF- α , LPS, H₂O₂) sowie dessen Reduktion durch Vorbehandlung mit H₂ untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

| Bezeichnung | Hersteller |
|---|---------------------------|
| Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl) | Eppendorf |
| Mehrfachdispenser-Pipette | Eppendorf |
| Pipetboy | Integra Biosciences |
| Einmal-Meßpipetten (5, 10, 25, 50 ml) | Greiner Bio-One |
| Pipetten-Spitzen (10, 20, 200, 1000 µl) | Greiner Bio-One |
| Pasteurpipetten (230 mm, 2 ml) | VWR |
| Reagenzgefäße (0,5, 1,5, 2 ml) | Eppendorf |
| Tube (15 ml) | Greiner Bio-One |
| Tube (50 ml) | Corning CentriStar |
| Glasflasche (100 ml) | Schott Duran |
| Zellkultur-Multischalen (24-, 96-well) | Thermo Scientific Nunc |
| Objektträger 1-Kammer | Thermo Scientific Nunc |
| Zellkulturflaschen (T25, T75) | Thermo Scientific Nunc |
| Sterilfilter (Flaschenaufsatz) – Rapid-Flow | Thermo Scientific Nalgene |
| Aluminiumfolie | Carl Roth |
| Zellzähler CASY | Roche Innovatis |
| Zellzählröhrchen CASY | Roche Innovatis |
| Mikroskop – BZ-8100E | Keyence |
| Mikroskop – Fluovert FU | Leitz |
| Waage – Precisa 310 M | Pesa Waagen |
| Waage – BP 221 S | Sartorius |
| Magnetrührer – MR 2002, MR 3002 | Heidolph |
| Brutschrank – HERAcell | Heraeus Holding |
| Sicherheitswerkbank – LaminAir HB 2472 | Heraeus Holding |
| Sicherheitswerkbank – HERAsafe | Heraeus Holding |
| Zentrifuge – Megafuge 1.0 R | Heraeus Holding |
| ELISA-Reader – Varioskan Flash | Thermo Scientific |

Tabelle 1. Verwendete Geräte und Materialien.

| Bezeichnung | Hersteller | Artikelnummer |
|---------------------------|---------------------|---------------|
| M199/M199 ohne Phenolrot | Sigma-Aldrich/Gibco | M2154/21157 |
| Gentamicin-Lösung | Sigma-Aldrich | G1397 |
| Amphotericin B | Sigma-Aldrich | A2942 |
| EC-SupplementMix | PromoCell | C-39215 |
| L-Glutamin | Sigma-Aldrich | G8415 |
| Fetales Kälberserum (FKS) | Sigma-Aldrich | 12138C |

Tabelle 2. Auflistung der Zusammensetzung des verwendeten HUVEC-Nährmediums.

| Bezeichnung | Hersteller | Artikelnummer |
|--|--|----------------------------------|
| DMSO | Carl Roth | A994.1 |
| Gelatine aus Rinderhaut | Sigma-Aldrich | G9391 – 100G |
| PBS | Laborinterne eigene Herstellung (<i>siehe 2.2.1</i>) | |
| Trypsin-EDTA-Lösung | Sigma-Aldrich | T-4174 |
| CASYton-Pufferlösung | OmniLifeSciences | 5651808 |
| CellTiter 96®Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) | Promega | G3581 |
| Cyclosporin A | Selleck Chemicals | S2286 |
| Wasserstoffperoxid-Lösung (34,5-36,5 %) | Sigma-Aldrich | 18304 |
| LPS | Sigma-Aldrich | L4516 |
| TNF- α | PeptoTech | 300-01A |
| Wasserstoff 5.0 | Linde GmbH | 50l [200 bar] |
| DCFDA | Alexis Biochemicals | ALX-610-022-M050 |
| TBHP | Sigma-Aldrich | 458139-25ML |
| H2Blue Hydrogen Test Reagent | H2Sciencesinc | h2-blue-kit (Aquacentrum Munich) |

Tabelle 3. Verwendete Chemikalien.

| Bezeichnung | Version |
|---|------------------------|
| Microsoft Office 365 Apps | 2008 Build 13127.21348 |
| ImageJ 1.53h | Java 1.8.0_172 |
| GraphPad Prism | 6 – 10.0.0 (153) |
| Citavi | 6.8.0.0 – 6.17 |
| ScanIt RE for Varioskan Flash | 2.4.5 |
| BZ-Observation (Software Keyence Mikroskop) | 3.61.0000.0202.0202 |

Tabelle 4. Verwendete Software.

2.2 Herstellung von Verbrauchsmaterialien

2.2.1 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Zur Herstellung von 10x PBS wird in 1 l destilliertem Wasser 2 g Kaliumchlorid (KCl), 2 g Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4), 80 g Natriumchlorid (NaCl) sowie 15,35 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) gelöst. Der pH wird hierbei exakt auf 6,78 eingestellt. Um 1x PBS als Gebrauchslösung zu erhalten, wird 10x PBS 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt (pH = 7,4) und anschließend autoklaviert.

Wird nachfolgend in der Arbeit von PBS gesprochen ist damit 1x PBS gemeint.

2.2.2 Gelatine-Lösung 0,25 %

Zur Herstellung von 1 l Gelatine-Lösung 0,25 % wird 2,5 g Gelatine in 1000 ml PBS auf dem Rührer bei 50 °C quellen gelassen. Anschließend wird in 250 ml Flaschen portioniert und autoklaviert. Die Lagerung erfolgt bei Raumtemperatur. Vor Verwendung werden 250 µl Gentamycin pro 250 ml Gelatinelösung zugegeben und bei 4 °C gelagert.

2.2.3 HUVEC-Nährmedien

Das verwendete Basalmedium (M199, 500 ml) wird mit 0,1 % Gentamycin (500 µl), 0,2 % Amphotericin B (1 ml), 2 % EC-Supplementmix (10 ml), 200 mM L-Glutamin (5 ml) und 10 % fetalem Kälberserum (FKS, 50 ml) versetzt (*siehe 2.1, Tabelle 2*) und anschließend steril filtriert.

Das ausschließlich zur Zellfärbung (*siehe 2.5.2.3*) verwendete Basalmedium ohne Phenolrot (M199 ohne Phenolrot, 500 ml) enthält bereits L-Glutamin und wird ebenfalls mit 0,1 % Gentamycin (500 µl), 0,2 % Amphotericin B (1 ml) und 2 % EC-Supplementmix (10 ml) versetzt und anschließend steril filtriert.

HUVEC-Nährmedien werden ausschließlich vorgewärmt auf 37 °C verwendet.

2.3 Zellkultur

Für die Arbeit mit lebenden Zellen wird ausschließlich unter sterilen Bedingungen in der Sicherheitswerkbank mit vorhandenem Abzug gearbeitet. Im zur Inkubation verwendeten Brutschrank herrschen stets 37 °C mit einem CO_2 -Gehalt von 5 %. Die in diesem Kapitel

sowie der gesamten Arbeit minimal und maximal verwendeten Zellzahlen sowie Volumina der Verbrauchsmedien je Kulturgefäß sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

| Kulturgefäß | Min. ZZ | Max. ZZ | Gelatine | PBS-Waschen | Medium | Trypsin |
|-------------|-------------------|-------------------|------------|-------------|-------------|------------|
| T25 | 1×10^5 | 1×10^6 | 3 ml | 5 ml | 5 ml | 3 ml |
| T75 | 5×10^5 | 3×10^6 | 6 ml | 15 ml | 15 ml | 6 ml |
| 24-Well | 1×10^4 | | 0,2 ml | 0,5 ml | 0,7 ml | 0,2 ml |
| 96-Well | $1,5 \times 10^3$ | $7,5 \times 10^3$ | 50 μ l | 100 μ l | 150 μ l | 50 μ l |
| OT | 5×10^4 | 4×10^5 | 1 ml | 3 ml | 3 ml | 1,5 ml |

Tabelle 5. Auflistung der verwendeten Zellzahlen sowie Volumina je Kulturgefäß. Min./Max. ZZ = Minimale/Maximale Zellzahl, OT = Objektträger.

2.3.1 Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC)

Die verwendeten Endothelzellen sind nach laborinternem Protokoll aus menschlichen Nabelschnüren isoliert und bei $-170 \text{ }^\circ\text{C}$ in Dimethylsulfoxid (DMSO) kryokonserviert worden. In dieser Arbeit werden 2 Kulturen HUVEC (**Tabelle 6**), wobei jede Kultur aus einer gesonderten Nabelschnur stammt, verwendet.

| Bezeichnung | Hersteller | Interne Nummer |
|----------------|---|----------------|
| HUVEC Kultur 1 | Laborinterne eigene Herstellung (Juli 2015) | R150710a |
| HUVEC Kultur 2 | Laborinterne eigene Herstellung (Juli 2015) | R150630a |

Tabelle 6. Verwendete HUVEC-Kulturen.

2.3.2 Gelatinieren von Kulturoberflächen

Zur besseren Haftung der Endothelzellen auf der Kulturoberfläche wird Gelatine verwendet. Zunächst wird die Gelatine-Lösung 0,25 % (Herstellung *siehe* 2.2.2) für 45 min im Brutschrank auf $37 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmt und anschließend steril filtriert. Im Anschluss wird eine bodenbedeckende Menge der Gelatine-Lösung auf das jeweilig verwendete Kulturgefäß (Zellkulturflaschen (T25/T75), Zellkultur-Multischalen (24-/96-Well), Objektträger) gegeben und durch Schwenken des Gefäßes gleichmäßig verteilt. Nach 30-minütiger Inkubation im Brutschrank hat sich ein dünner Film Gelatine auf dem Boden des Kulturgefäßes gebildet. Der Gelatine-Überstand wird mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Im Anschluss wird HUVEC-

Nährmedium in das Kulturgefäß gegeben, um ein Austrocknen des Gelatine-Films zu verhindern.

Das Gelatinieren der Kulturoberflächen wird stets vor Ausplattieren der HUVEC in die jeweiligen Kulturgefäße durchgeführt und im Folgenden nicht gesondert erwähnt.

2.3.3 Auftauen kryokonservierter Zellen

Kryokonservierte HUVEC werden nach dem Auftauen, für eine möglichst schnelle Neutralisierung des bei Raumtemperatur zelltoxischen DMSO (123), in Nährmedium suspendiert. Eventuell verbliebene Zellen werden durch Waschen des zur Kryokonservierung verwendeten Reagenzgefäßes mit Nährmedium ebenfalls suspendiert. Anschließend werden die Zellen in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 4 h im Brutschrank sind die Zellen adhärent und das Nährmedium kann getauscht werden, um DMSO-Reste und abgestorbene Zellen aus dem Medium zu entfernen. Die Zellen wachsen anschließend im Brutschrank bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70-90 % wobei spätestens nach 48-stündigem Wachstum das Nährmedium erneuert wird.

2.3.4 Zellzählung, Passagieren und Aussaat von Zellen

Zu Beginn wird die Zellkulturflasche mit den 70-90 % konfluenten Zellen aus dem Brutschrank genommen und unter dem Abzug vorsichtig Nährmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Anschließend wird mit PBS gewaschen und durch Absaugen wieder entfernt. Nun wird Trypsin zum Lösen der adhären Zellen in das Kulturgefäß gegeben und auf eine gleichmäßige Verteilung am Boden des Gefäßes geachtet. Nach 2-minütiger Inkubation wird das vollständige Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop überprüft. Daraufhin wird Trypsin durch Zugabe von Nährmedium in doppelt üblicher Menge (*siehe* 2.3, Tabelle 5) neutralisiert. Die Zellen werden zusammen mit dem Nährmedium resuspendiert, in 50 ml Tubes überführt und diese bei 1200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das durch Zentrifugation in den Tubes erhaltene Zellpellet wird von seinem Überstand durch vorsichtiges Absaugen mit einer Pasteurpipette getrennt und in 1 ml Nährmedium aufgenommen. Aus dieser Zellsuspension werden 20 µl in 5 ml CASYton-Pufferlösung gegeben und sorgfältig durch händisches Schwenken vermischt. Im Anschluss kann die Zellzahl pro ml im Zellzähler bestimmt werden.

Je nach Weiterverarbeitung der Zellen (Passagieren in T25/T75-Zellkulturflaschen, Aussaat auf 24-/96-Well-Multischalen bzw. auf Objektträger für Versuch) kann nun die gewünschte

Zellmenge aus den Tubes entnommen, in das jeweilige Kulturgefäß gegeben und mit Nährmedium aufgefüllt werden.

2.4 Methodik zur Messung der Endothelzell-Vitalität

2.4.1 Versuchsablauf

Zur Untersuchung einer möglichen Zytotoxizität von CsA auf Endothelzellen ist der MTS – Zell-Vitalitäts-Test verwendet worden. In nachfolgender **Abbildung 6** ist eine Übersicht über den gesamten Versuchsablauf gegeben.

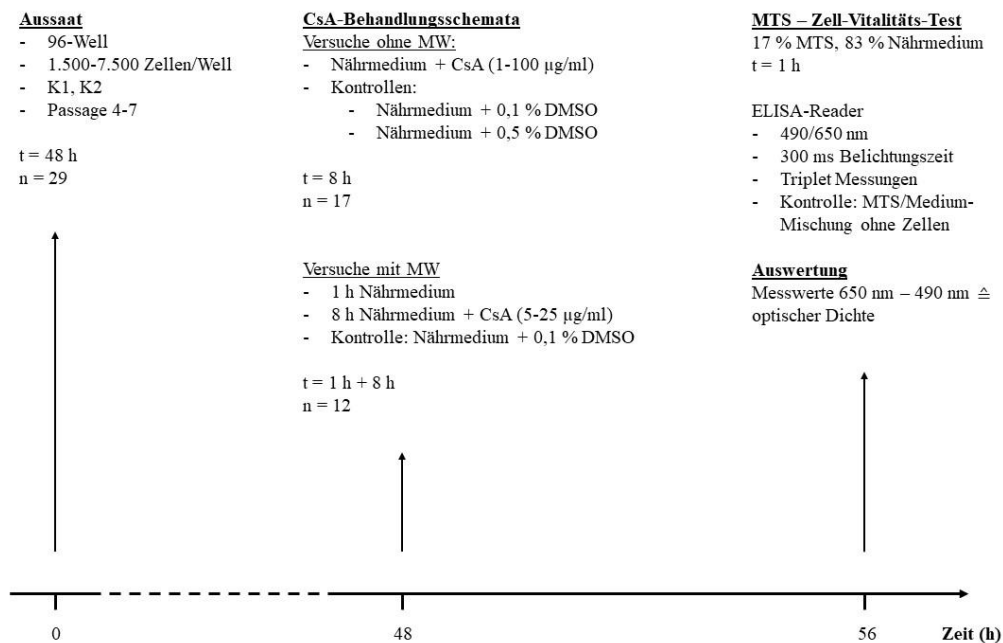


Abbildung 6. Versuchsablauf des MTS – Zell-Vitalitäts-Tests.

Für die insgesamt 29 MTS-Versuche sind beide HUVEC-Kulturen (*siehe 2.3.1*), ausschließlich in Passage 4-7, heterogen (n = 16 für K1, n = 13 für K2) verwendet worden. Deren Aussaat (*siehe 2.3.4*) erfolgte auf 96-Well-Zellkultur-Multischalen in je nach Versuch unterschiedlicher Zelldichte (1500-7500 Zellen/Well). Anschließend wuchsen die Zellen 48 h im Brutschrank bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70-80 %.

Nach der Wachstumsphase wurde in 17 Versuchen das Nährmedium erneuert, mit CsA in verschiedenen Konzentrationen (0-100 µg/ml) gemischt und die Zellen damit für 8 h im Brutschrank behandelt. Dabei wurde die CsA-Dosis kontinuierlich gesteigert, wodurch sich unterschiedlich viele Replikate pro Konzentration ergeben: 1 µg/ml CsA (n = 16), 5 µg/ml CsA (n = 17), 10 µg/ml CsA (n = 17), 25 µg/ml CsA (n = 12), 50 µg/ml CsA (n = 15), 75 µg/ml CsA (n = 4), 100 µg/ml CsA (n = 4). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen in Nährmedium mit 0,1 % DMSO-Zusatz. In den Versuchen in denen 50 µg/ml CsA oder mehr eingesetzt wurde, ist zusätzlich eine zweite Negativkontrolle mit 0,5 % DMSO verwendet worden. Hintergrund für den Einsatz einer zusätzlichen Negativkontrolle ist folgender: CsA steht in Pulverform zur Verfügung und wird gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80 °C gelagert. DMSO fungiert hierbei zum einen als Lösungsmittel und zum anderen als Gefrierschutzmittel, um der Bildung von Eiskristallen vorzubeugen. Wird CsA nun mit Hilfe einer Verdünnungsreihe auf die jeweilig benötigte Konzentration verdünnt, wird auch das enthaltene DMSO entsprechend verdünnt. CsA-Konzentrationen bis 25 µg/ml enthalten 0,1 % DMSO, die Konzentrationen 50, 75 und 100 µg/ml enthalten 0,5 % DMSO. Dementsprechend wurde für die drei zuletzt erwähnten Konzentrationen, mit einer zweiten Negativkontrolle gearbeitet.

In 12 weiteren Versuchen erfolgte eine zusätzliche einstündige Inkubation in Nährmedium mit anschließendem Mediumwechsel vor der 8-stündigen Behandlung mit CsA (CsA-Dosen von 5-25 µg/ml). Als Negativkontrollen dienten die eben beschriebenen Versuche ohne zusätzlichen Mediumwechsel.

Im Anschluss an die CsA-Behandlung wurde die Zell-Vitalität der Endothelzellen mittels des MTS – Zell-Vitalitäts-Tests (*siehe* 2.4.2) bestimmt.

2.4.2 MTS – Zell-Vitalitäts-Test

2.4.2.1 Prinzip

Der MTS – Zell-Vitalitäts-Test dient der Quantifizierung der metabolischen Zell-Aktivität. Es können Rückschlüsse auf die Zell-Vitalität bzw. -Proliferation gezogen werden und damit auch auf die Zytotoxizität definierter Bedingungen bzw. Substanzen, welche auf die Zellen einwirken.

Im MTS-Test werden mitochondriale Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen zur Quantifizierung der Zell-Aktivität genutzt. Diese reduzieren durch die Umsetzung von

NADPH zu NADP⁺ oder NADH zu NAD⁺ das dem Nährmedium zugeführte MTS-Reagenz (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium) zu einem farbigen Tetrazoliumprodukt (Formazan) (**Abbildung 7**) (124,125).

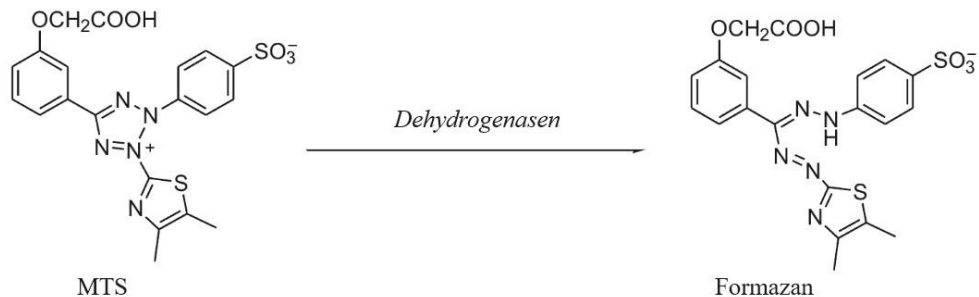


Abbildung 7. Enzymatische Reduktion von MTS zu Formazan. Es handelt sich hierbei um eine bearbeitete Darstellung der in der Literatur (126) verwendeten Abbildung (mit Genehmigung der Urheberrechteinhaber [© 2017 Elsevier]).

Formazan ist im Nährmedium unlöslich, fällt aus und kann vom ELISA-Reader quantitativ mittels photometrischer Absorption bestimmt werden. Die gemessene Absorption verhält sich proportional zur Anzahl metabolisch aktiver Zellen.

2.4.2.2 Vorgehen

Zu Beginn wird das MTS-Reagenz vorbereitet, welches dunkel bei -20 °C gelagert wird. Nach dem Auftauen wird das MTS-Reagenz in ein Tube überführt und in Nährmedium gelöst (17 % MTS, 83 % Nährmedium). Die MTS/Medium-Mischung wird bis zu seiner Verwendung mit Alufolie verdunkelt. Nun werden die 96-Well-Multischalen aus dem Brutschrank genommen und deren CsA-haltiges Nährmedium sowie das Nährmedium der Negativkontrolle mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Im Anschluss werden die Wells mit PBS gewaschen und die MTS/Medium-Mischung auf die Zellen pipettiert (120 µl/Well). Die 96-Well-Multischalen werden für 60 min im Brutschrank inkubiert, bevor sie in einer abgedunkelten Transportbox zum ELISA-Reader gebracht werden.

Im ELISA-Reader wird bei Wellenlängen von 490 und 650 nm mit einer Belichtungszeit von 300 ms die metabolische Zell-Aktivität quantifiziert. Jeder Ansatz wird als Triplet gemessen. Als Negativkontrolle (Blank) dienen 3 Wells, welche keine Zellen, jedoch MTS/Medium-Mischung enthalten. Die erhaltenen Messwerte werden in eine Excel-Tabelle exportiert. Zur Berechnung der optischen Dichte werden die 490 nm-Messwerte von den 650 nm-Messwerten subtrahiert.

2.5 Methodik zur ROS-Induktion mittels TNF- α , LPS, H₂O₂ und CsA

2.5.1 Versuchsablauf

Der Versuchsablauf zur Erzeugung von oxidativem Stress (ROS) in HUVEC ist als Übersichtsgrafik in **Abbildung 8** dargestellt und wird nachfolgend beschrieben.

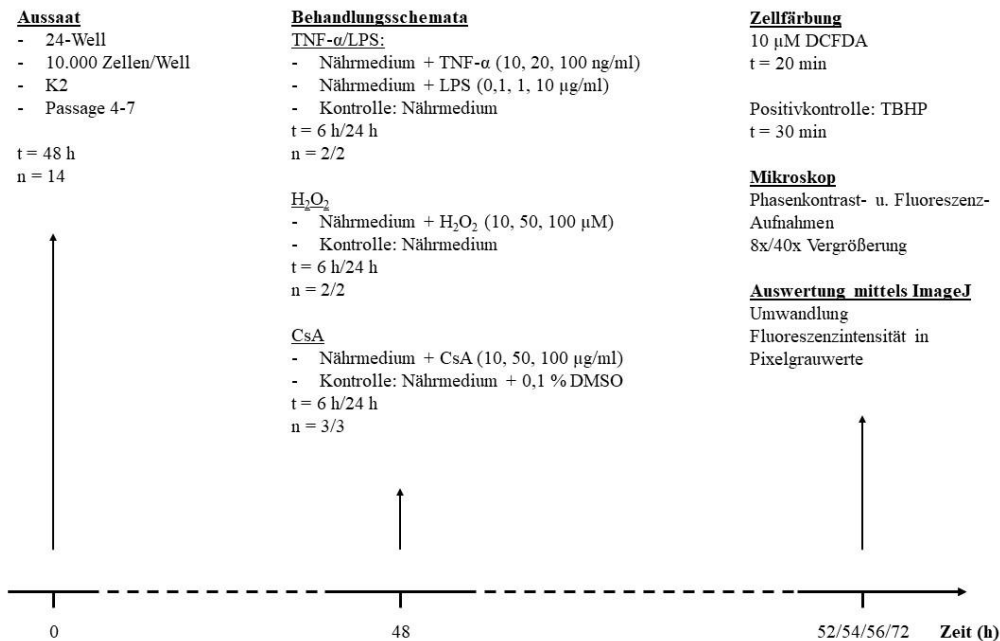


Abbildung 8. Versuchsablauf zur ROS-Induktion mittels TNF- α , LPS, H₂O₂ und CsA.

Die Aussaat (*siehe 2.3.4*) der HUVEC (Kultur 2) in Passage 4-7 erfolgte für die Versuche zur ROS-Induktion (n = 14) auf 24-Well-Zellkultur-Multischalen mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen pro Well. Daraufhin sind die Zellen für 48 h im Brutschrank bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert worden.

Nach 48 h wurde das Nährmedium erneuert und mit den verwendeten Reagenzien in verschiedenen Konzentrationen gemischt. Zellen, welche bei der späteren Zellfärbung als Positivkontrolle dienen, erhielten ausschließlich frisches Nährmedium. Die verwendeten Behandlungsschemata sind nach Literaturrecherche gewählt worden und gesondert in 2.5.1.1 aufgeführt.

Nach Behandlung der Zellen ist mittels Zellfärbung (*siehe* 2.5.2) und anschließender Fluoreszenzaufnahmen mit dem Mikroskop (*siehe* 2.5.3) die ROS-Induktion detektiert worden. Die entstandenen Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ ausgewertet (*siehe* 2.5.4).

2.5.1.1 Behandlungsschemata

Für Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) ist bereits bekannt, dass dieses *in vitro* in Endothelzellen verschiedenster Herkunft (aus Aorta (127), Koronararterien (128), Mikrogefäßen des Herzens (129)) ROS induzieren kann. Dies wurde ebenfalls für die in dieser Arbeit verwendeten HUVEC bereits bei 6-stündiger Behandlung mit 10 ng/ml TNF- α gezeigt (128). Auch für Lipopolysaccharide (LPS) ist eine ROS-Induktion in HUVEC bekannt (130,131). Teilweise ist bereits bei einer Behandlung mit 1 μ g/ml LPS für 6 bzw. 24 h ein Anstieg oxidativen Stresses beobachtet worden (132).

Auf Grundlage dessen sind drei verschiedene Konzentrationen TNF- α (10, 20, 100 ng/ml) sowie drei verschiedenen Konzentrationen LPS (0,1, 1, 10 μ g/ml) für jeweils eine Behandlungsdauer von 6 (n = 2) bzw. 24 h (n = 2) im Brutschrank zur ROS-Induktion in HUVEC verwendet worden. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (0 ng/ml TNF- α ; 0 μ g/ml LPS) in Nährmedium.

Auch für Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist die Erzeugung von oxidativem Stress in HUVEC schon vermehrt nachgewiesen worden (133,134). So konnte unter anderem nach 2-stündiger Behandlung mit 200 μ M H_2O_2 (135) bzw. auch mit 600 μ M nach 24 h (136) eine ROS-Induktion beobachtet werden.

Auf Basis dessen wurden drei verschiedene Konzentrationen H_2O_2 (10, 50, 100 μ M) und als Negativkontrolle unbehandelte Zellen in dieser Arbeit verwendet. Zur allgemeinen Vergleichbarkeit der Versuche ist die Behandlungsdauer von 6 (n = 2) bzw. 24 h (n = 2) aus den Vorversuchen mit TNF- α und LPS beibehalten worden.

Die Eigenschaft von CsA zur ROS-Induktion wurde bereits für verschiedene Zellformen gezeigt. So zum Beispiel im Endothel der Rinderaorta (98), in proximalen Tubuluszellen (98,137) und Mesangiumzellen (138) der Niere sowie in Fibroblasten des Zahnfleisches (120) als auch in HUVEC (97). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte eine ROS-Induktion in Ratten-Lungenfibroblasten bereits gezeigt werden (119).

Orientierend an der CsA-Dosis (0,25-0,5 µg/ml), welche bei Ratten-Lungenfibroblasten in unserer Arbeitsgruppe zur Verwendung kam, ist zunächst eine Höchstdosis von 10 µg/ml CsA für HUVEC gewählt worden. Bei jedoch ausbleibender ROS-Induktion (Ergebnisse in 3.2.4 nicht dargestellt) sind schließlich höhere Konzentrationen (10, 50, 100 µg/ml CsA) zur Verwendung gekommen. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen in Nährmedium mit einem Anteil von 0,1 % DMSO. Wie schon für H₂O₂ wurde auch bei CsA eine Behandlungsdauer von 6 bzw. 24 h zur allgemeinen Vergleichbarkeit der Versuche gewählt.

2.5.2 Zellfärbung

2.5.2.1 Prinzip

Zur Quantifizierung des durch die verwendeten Reagenzien hervorgerufenen oxidativen Stresses werden intrazelluläre ROS-Spiegel mit dem Farbstoff 2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diazetat (DCFDA) sichtbar gemacht. DCFDA ist in seiner reduzierten Form als Diazetat farblos, stabil und Zellmembran-Permeabel. Innerhalb der Zelle wird es von Esterasen deacetyliert und durch ROS oxidiert. In seiner nun oxidierten, instabilen und fluoreszierenden Form 2,7-Dichlorofluorescein (DCF⁺) ist es Zellmembran-Impermeabel innerhalb der Zelle eingeschlossen (139–141) (**Abbildung 9**). Im Mikroskop mit Fluoreszenzfilter können nun intrazelluläre ROS-Spiegel als fluoreszierend detektiert werden.

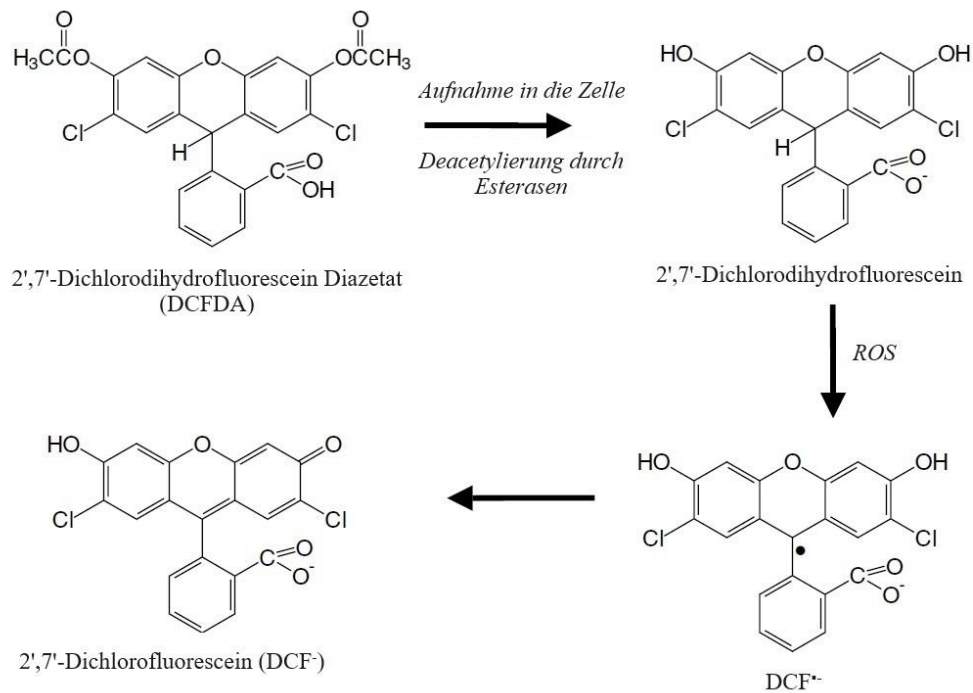


Abbildung 9. Umwandlung von DCFDA in sein fluoreszierendes Produkt DCF⁻. Das farblose DCFDA (2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diazetat) ist Zellmembran-Permeabel und wird innerhalb der Zelle deacetyliert. Durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wird es über ein Zwischenprodukt zu dem Endprodukt DCF⁻ (2,7-Dichlorofluorescein) oxidiert. DCF⁻ ist Zellmembran-Impermeabel sowie fluoreszierend. Es handelt sich hierbei um eine bearbeitete Darstellung der in der Literatur (139) verwendeten Abbildung (mit Genehmigung der Urheberrechteinhaber [© 2004 Nature Publishing Group. Alle Rechte vorbehalten]).

2.5.2.2 TBHP als Positivkontrolle

Tert-Butylhydroperoxid (TBHP) ist bekannt als Modellsubstanz zur Induktion oxidativen Stresses in Zellen und Geweben. TBHP führt zu mitochondrialer Dysfunktion, was wiederum zur Apoptose der Zellen und einem damit einhergehenden massiven ROS-Anstieg innerhalb der Zelle führt (142,143). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte TBHP erfolgreich zur ROS-Induktion in Fibroblasten verwendet werden (119). Auf Grundlage dessen ist in dieser Arbeit mit 5 μ M TBHP als Positivkontrolle gearbeitet worden.

2.5.2.3 Vorgehen

Die Zellfärbung wird in einem abgedunkelten Raum durchgeführt um eine falsch positive Fluoreszenz von DCFDA, hervorgerufen durch UV-Licht-bedingte Oxidation, zu verhindern (144). DCFDA wird in DMSO gelöst verwendet und in serumfreien Nährmedium zu den Zellen gegeben. Grund hierfür sind im Serum enthaltene Esterasen, die zu einer Deacetylierung von DCFDA führen, wodurch dieses seine Zellmembran-Permeabilität verliert und eine intrazelluläre ROS-Detektion dadurch erschwert (139) (siehe 2.5.2.1).

Zudem enthält das für DCFDA verwendete Nährmedium kein Phenolrot und kein FKS (*siehe* 2.2.3), um beim Mikroskopieren einen „Rotstich“ in den Fluoreszenzaufnahmen zu vermeiden.

Aus unserer Arbeitsgruppe ist bereits eine Methodik zur Zellfärbung mit DCFDA zur Detektion intrazellulärer ROS-Spiegel in Fibroblasten bekannt (119). Die Methodik ist für diese Arbeit auf HUVEC angepasst worden und wird nachfolgend beschrieben:

Eine halbe Stunde vor Ende der jeweiligen Behandlungszeit (*siehe* 2.5.1.1) wird das Nährmedium in den Wells der Positivkontrolle erneuert und 5 μM TBHP zugegeben. Nach weiteren 30 min im Brutschrank wird in jedem Well (Negativkontrolle, Positivkontrolle, behandelte Zellen) das Nährmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Wells mit PBS gewaschen. Nun werden alle Zellen mit 10 μM DCFDA in Nährmedium (ohne Phenolrot, ohne FKS) für 20 min im Brutschrank gefärbt. Im Anschluss wird das Nährmedium vorsichtig mit der Pipette entfernt und die Wells mit PBS gewaschen. Zum Mikroskopieren wird 700 μl /Well PBS zugegeben.

2.5.3 Fluoreszenzaufnahmen mit dem Mikroskop

Direkt nach der Zellfärbung werden mit dem Mikroskop Aufnahmen im Phasenkontrast-Bild sowie mit Fluoreszenzfilter angefertigt. Mithilfe des Fluoreszenzfilters kann die Zellfärbung im Mikroskop sichtbar gemacht werden. Die Arbeit am Mikroskop wird wie auch bei der Zellfärbung in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um eine falsch positive Fluoreszenz von DCFDA zu verhindern (*siehe* 2.5.2.3).

In jedem Versuch wird zunächst die Belichtungszeit anhand der Negativkontrolle manuell am Mikroskop eingestellt. Die Belichtungszeit wird nun innerhalb eines Versuches nicht mehr verändert. Von jedem Well werden jeweils im Phasenkontrast und mit Fluoreszenzfilter eine Übersichtsaufnahme (8-fache Vergrößerung) und drei Detailaufnahmen (40-fache Vergrößerung) angefertigt. Die Position im Well, in der Aufnahmen angefertigt werden, wird nach jeder Aufnahme verändert und per Zufall gewählt.

2.5.4 Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen mittels ImageJ

2.5.4.1 Prinzip

Zur Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen wird die Software ImageJ verwendet (145). Ziel ist die Umwandlung der Fluoreszenzintensität der Zellen in messbare Pixelgrauwerte. Hierfür

wird die Fluoreszenzaufnahme (**Abbildung 10 A**) zunächst in ihre Farbkomponenten/RGB-Farben (grün, blau, rot) zerlegt. Entsprechend der drei RGB-Farben erhält man nun drei Fotos, die ihre jeweiligen Farbintensitäten als Grauwerte darstellen. Da es sich bei DCFDA um einen grün fluoreszierenden Farbstoff handelt wird zur Auswertung ausschließlich das grüne RGB-Foto verwendet (**Abbildung 10 B**). Im nächsten Arbeitsschritt wird zunächst durch Anpassung des Kontrastes, der Helligkeit und durch Glätten der Pixel dafür gesorgt, dass sich die Zellen möglichst gut vom Hintergrund, welcher nicht ausgewertet werden soll, abheben. Diese Anpassungen werden für jedes auszuwertende Foto identisch ausgeführt. Im Anschluss wird mit der Funktion „Threshold“ das Foto in zwei Klassen von Pixeln unterteilt. Die Software unterteilt dabei in Pixel welche im Vordergrund (Zellen) und Pixel welche im Hintergrund (Well-Boden) des Fotos stehen. Somit ist es möglich die Zellgrenzen im Foto festzulegen bzw. jene Pixel zu markieren, welche von der Software ausgewertet werden sollen (**Abbildung 10 C**). Die nun festgelegten Zellgrenzen sind innerhalb des Programms im ROI-Manager gespeichert, weshalb das bearbeitete RGB-Foto verworfen werden kann. Anhand der unbearbeiteten Fluoreszenzaufnahme wird die Markierung der Zellen überprüft (**Abbildung 10 D**). In einem letzten Arbeitsschritt wird die unbearbeitete Fluoreszenzaufnahme erneut in ihre Farbkomponenten zerlegt. Im unbearbeiteten grünen RGB-Foto können nun die Pixelgrauwerte innerhalb der gespeicherten Markierungen gemessen werden (**Abbildung 10 E**).

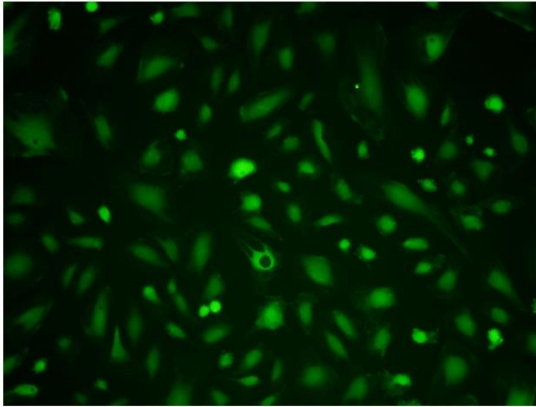
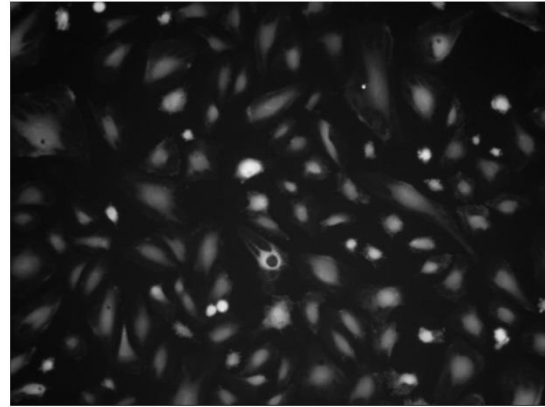
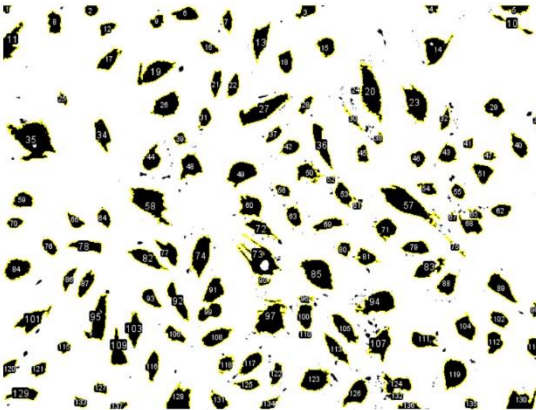
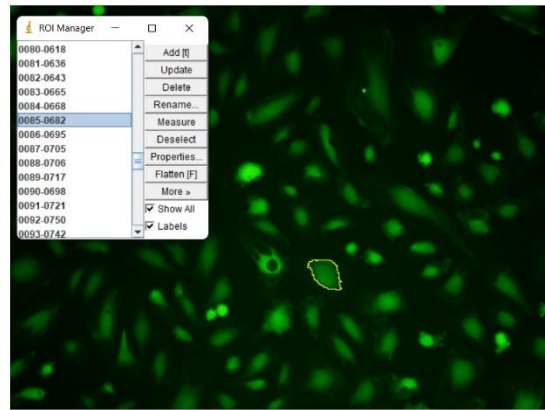
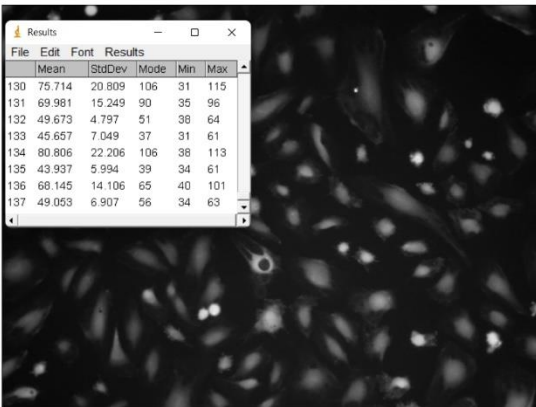
A**B****C****D****E**

Abbildung 10. Schrittweise Darstellung der Auswertung einer Fluoreszenzaufnahme mittels ImageJ. **A** Fluoreszenzaufnahme nach ROS-Induktion und Detektion mittels DCFDA. **B** RGB-Foto (grün) nach Zerlegung der Fluoreszenzaufnahme in seine Farbkomponenten/RGB-Farben (grün, blau, rot). **C** Zellmarkierung durch Festlegung der Zellgrenzen nach Bearbeitung des RGB-Fotos. **D** Überprüfung der im Programm gespeicherten Zellmarkierung anhand der unbearbeiteten Fluoreszenzaufnahme. **E** Messung der Pixelgrauwerte innerhalb der gespeicherten Markierungen im unbearbeiteten RGB-Foto (grün).

2.5.4.2 *Verwendete Macro's und Threshold-Methoden*

Um den Arbeitsablauf zu erleichtern, werden diejenigen Arbeitsschritte, die sich bei jedem auszuwertenden Foto identisch wiederholen mithilfe eines Macro's ausgeführt. Hierfür werden einmalig mit dem Plugin „Record“ die auszuführenden Arbeitsschritte anhand eines Beispielfotos aufgezeichnet und in Form eines Macros's gespeichert. Wird nun das Macro ausgeführt, führt ImageJ die aufgezeichneten Arbeitsschritte automatisch aus. Dadurch müssen die, sich bei jedem neu auszuwertenden Foto immer wieder identisch wiederholenden Arbeitsschritte, nicht manuell eingegeben werden. Die in dieser Arbeit erstellten und verwendeten Macro's sind in den **Abbildungen 11 bis 15** dargestellt.

Wie in 2.5.4.1 beschrieben, erfolgt die Festlegung der Zellgrenzen mit Hilfe der Funktion Threshold. Image-J bietet hierfür verschiedene voreingestellte Threshold-Methoden an. Nach ausführlichem Test verschiedener Methoden anhand mehrerer Fluoreszenzaufnahmen sind für diese Arbeit die Methoden „Triangle“ sowie „Moments“ zur Festlegung der Zellgrenzen gewählt worden. Mit diesen war es möglich die Zellgrenzen im Großteil der auszuwertenden Aufnahmen am genauesten festzulegen. Die Ausführung der erwähnten Methoden ist mit den notwendigen vorherigen und darauffolgenden Arbeitsschritten jeweils in ein Macro übernommen worden (**Abbildung 11** und **Abbildung 12**).

Ist es weder nach der Threshold-Methodik „Triangle“ noch „Moments“ zu einer zufriedenstellenden Markierung der Zellgrenzen gekommen, wurden diese manuell festgelegt. Um auch hierfür den Arbeitsablauf zu erleichtern sind Macro's für die Arbeitsschritte vor (**Abbildung 13**) und nach (**Abbildung 14**) der manuellen Festlegung der Zellgrenzen erstellt worden.

```

Macro Threshold Triangle
File Edit Font Examples Macros Debug
roiManager("Deselect");
roiManager("Delete");
run("Split Channels");
selectWindow("002.TIF (green)");
selectWindow("002.TIF (blue)");
close();
selectWindow("002.TIF (red)");
close();
selectWindow("002.TIF (green)");
//run("Brightness/Contrast...");
setMinAndMax(0, 100);
run("Apply LUT");
run("Unsharp Mask...", "radius=10 mask=0.60");

//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Triangle dark");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=100-Infinity pixel display add");
Table.deleteRows(0, 500);

```

Abbildung 11. Macro Threshold Triangle.

```

Macro Threshold Moments
File Edit Font Examples Macros Debug
roiManager("Deselect");
roiManager("Delete");
run("Split Channels");
selectWindow("002.TIF (green)");
selectWindow("002.TIF (blue)");
close();
selectWindow("002.TIF (red)");
close();
selectWindow("002.TIF (green)");
//run("Brightness/Contrast...");
setMinAndMax(0, 100);
run("Apply LUT");
run("Unsharp Mask...", "radius=10 mask=0.60");

//run("Threshold...");
setAutoThreshold("Moments dark");
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Analyze Particles...", "size=150-Infinity pixel display add");
Table.deleteRows(0, 500);

```

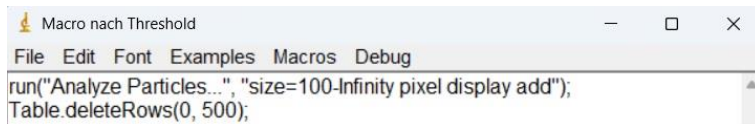
Abbildung 12. Macro Threshold Moments.

```

Macro bis Threshold
File Edit Font Examples Macros Debug
roiManager("Deselect");
roiManager("Delete");
run("Split Channels");
selectWindow("002.TIF (green)");
selectWindow("002.TIF (blue)");
close();
selectWindow("002.TIF (red)");
close();
selectWindow("002.TIF (green)");
//run("Brightness/Contrast...");
setMinAndMax(0, 100);
run("Apply LUT");
run("Unsharp Mask...", "radius=10 mask=0.60");

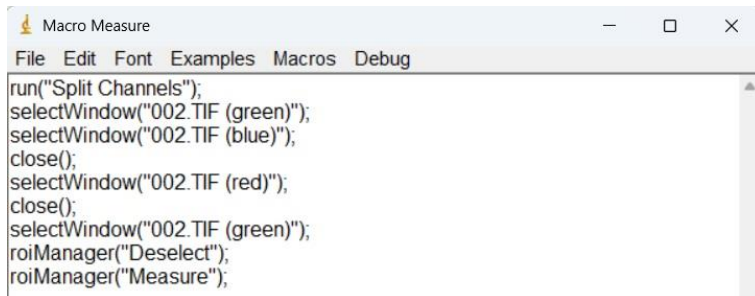
```

Abbildung 13. Macro zur Ausführung der Arbeitsschritte bis zur Zellgrenzenfestlegung.



```
run("Analyze Particles...", "size=100-Infinity pixel display add");
Table.deleteRows(0, 500);
```

Abbildung 14. Macro zur Ausführung der Arbeitsschritte nach Zellgrenzenfestlegung.



```
run("Split Channels");
selectWindow("002.TIF (green)");
selectWindow("002.TIF (blue)");
close();
selectWindow("002.TIF (red)");
close();
selectWindow("002.TIF (green)");
roiManager("Deselect");
roiManager("Measure");
```

Abbildung 15. Macro zur Ausführung der Arbeitsschritte zur Messung der Pixelgrauwerte.

2.5.4.3 Vorgehen

Zu Beginn wird im Programm ImageJ die auszuwertende Fluoreszenzaufnahme sowie die benötigten Macro's (siehe 2.5.4.2) geöffnet (*File/Open*).

Im ersten Arbeitsschritt werden die vom Programm zu messenden Werte festgelegt (*Analyze/Set Measurements/mean gray value, standard deviation, modal gray value, min max gray value/OK*). Diese Einstellung wird vom Programm gespeichert und bleibt für alle im Verlauf auszuwertenden Aufnahmen bestehen. Dieser Arbeitsschritt muss erst wiederholt werden, wenn das Programm zwischenzeitlich geschlossen wurde.

Gleiches gilt für den folgend beschriebenen Arbeitsschritt: Für die erste auszuwertende Aufnahme werden im jeweilig verwendeten Macro („Triangle“, „Moments“, „bis Threshold“; siehe 2.5.4.1, **Abbildung 11, 12 und 13**) die ersten zwei Befehle (*roiManager("Deselect"); roiManager("Delete");*) ausgeschnitten und bei Bearbeitung der zweiten Aufnahme wieder eingefügt. Werden die Befehle zu Beginn nicht ausgeschnitten, kommt es zu einer Fehlermeldung („The ROI Manager is empty.“), da der ROI-Manager zu diesem Zeitpunkt noch keine Daten enthält. Werden die beiden Befehle zur Bearbeitung der zweiten Aufnahme nicht wieder eingefügt, werden die im ROI-Manager gespeicherten Daten der ersten Aufnahme nicht gelöscht, was wiederum zu einer fehlerhaften Fotoanalyse führt.

Vor jeder Ausführung eines Macro's wird die Bezeichnung der auszuwertenden Aufnahme mit der Bezeichnung im Macro abgeglichen und falls nicht übereinstimmend geändert (z.B.: „002.TIF...“ ändern in „004.TIF...“).

Nun wird zur Zerlegung des Fotos in seine Farbkomponenten mit anschließender Bearbeitung und Markierung der Zellgrenzen (*siehe 2.5.4.1*) entweder das Macro „Threshold Triangle“ oder „Threshold Moments“ ausgeführt (*Macros/Run Macro*). Das daraus erhaltene RGB-Foto mit bereits markierten Zellgrenzen wird geschlossen und verworfen (*File/close/Don't Save*). Die unbearbeitete Fluoreszenzaufnahme wird erneut geöffnet (*File/open*) und auf Korrektheit der im ROI-Manager gespeicherten Zellmarkierungen überprüft. Falls zu wenige, falsche oder ungenaue Zellmarkierungen entstanden sind, wird das Foto geschlossen, erneut eine unbearbeitete Fluoreszenzaufnahme geöffnet und mit dem eben nicht verwendeten Macro ausgewertet.

Sollte es weder nach Verwendung der Threshold-Methodik „Triangle“ noch „Moments“ zu einer zufriedenstellenden Zellmarkierung gekommen sein, wird die Festlegung der Zellgrenzen manuell vorgenommen. Hierfür wird zunächst das bearbeitete Foto verworfen und die unbearbeitete Fluoreszenzaufnahme zusammen mit dem auszuführendem Macro „bis Threshold“ geöffnet. Das Threshold-Menü wird geöffnet (*File/Adjust/Threshold*), die Zellgrenzen manuell festgelegt und bestätigt (*Apply*). Zur Übernahme der eingestellten Zellgrenzen in den ROI-Manager wird das Macro „nach Threshold“ (*siehe 2.5.4.1, **Abbildung 14***) geöffnet und ausgeführt. Wie bereits beschrieben wird das RGB-Foto im Anschluss verworfen und die unbearbeitete Fluoreszenzaufnahme auf Korrektheit der gespeicherten Zellmarkierungen überprüft.

Im letzten Arbeitsschritt erfolgt die Messung der Pixelgrauwerte der markierten Zellen. Zusätzlich zur bereits geöffneten unbearbeiteten Fluoreszenzaufnahme wird das Macro „Measure“ (*siehe 2.5.4.1, **Abbildung 15***) geöffnet und ausgeführt. In der Tabelle „Results“ werden nun die Ergebnisse der Messungen wiedergegeben. Diese können in ein beliebiges Programm zur Auswertung überführt werden.

Das eben ausgewertete Foto kann geschlossen und das Nächste zur Auswertung geöffnet werden.

2.6 Methodik zur Arbeit mit H₂

2.6.1 Versuchsablauf zur ROS-Reduktion mittels H₂

In **Abbildung 16** ist der Versuchsablauf zur ROS-Reduktion mittels H₂ als Übersichtsgrafik dargestellt.

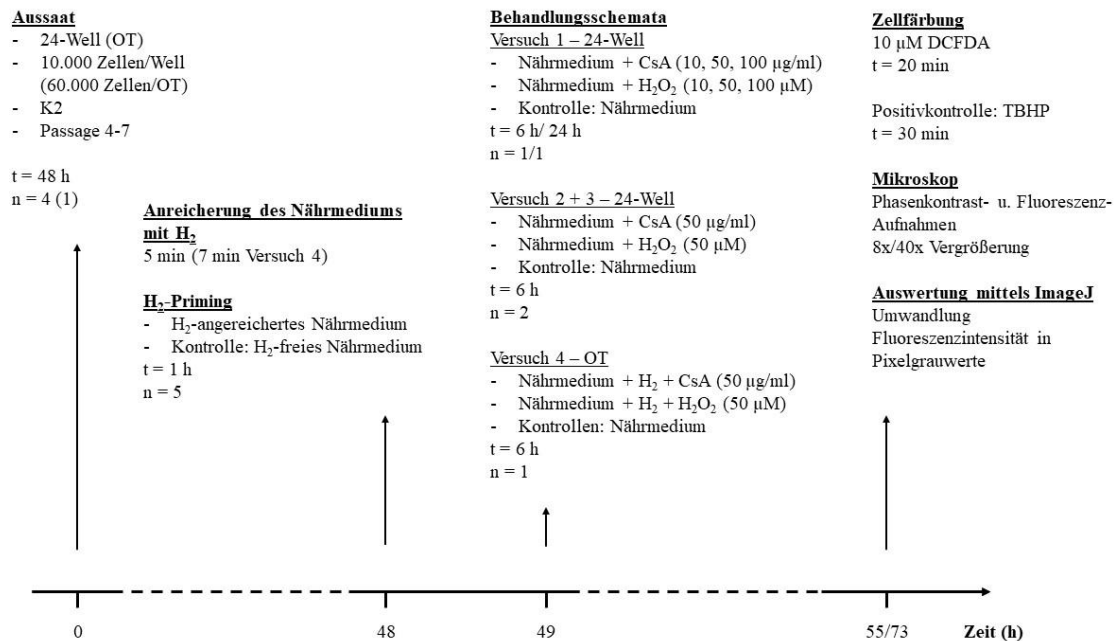


Abbildung 16. Versuchsablauf zur ROS-Reduktion mittels H₂.

Die Aussaat (*siehe 2.3.4*) der HUVEC (Kultur 2) in Passage 4-7 erfolgte für die Versuche zur ROS-Reduktion mittels H₂ (n = 5) auf 24-Well-Zellkultur-Multischalen (Versuche 1-3, n = 4) bzw. auf Objektträger (OT) (Versuch 4, n = 1) mit einer Zelldichte von 10.000 Zellen pro Well bzw. 60.000 Zellen pro OT. Daraufhin sind die Zellen für 48 h im Brutschrank bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert worden.

Nach der 48-stündigen Wachstumsphase ist das Nährmedium zum einstündigen H₂-Priming der Zellen (*siehe 2.6.4*) durch H₂-angereichertes Nährmedium (*siehe 2.6.3*) bzw. für die H₂-Kontrollen durch Nährmedium ohne H₂ ersetzt worden.

Zur CsA/H₂O₂-Behandlung im 24-Well ist in den Versuchen 1 bis 3 das Nährmedium für die Zellen mit und ohne H₂-Priming gleichermaßen erneuert und mit CsA bzw. H₂O₂ gemischt

worden. In Versuch 1 wurden die Zellen jeweils mit drei CsA-Konzentrationen (10, 50, 100 µg/ml) oder drei H₂O₂-Konzentrationen (10, 50, 100 µM) für 6 bzw. 24 h im Brutschrank behandelt. Für die Versuche 2 und 3 ist ein reduzierter Versuchsansatz mit 6-stündiger Behandlung CsA (50 µg/ml) bzw. H₂O₂ (50 µM) verwendet worden.

Zur CsA/H₂O₂-Behandlung im Objektträger ist in Versuch 4 das Nährmedium für die Zellen, welche ein H₂-Priming erhielten, mit H₂-angereichertem Nährmedium erneuert und mit 50 µg/ml CsA bzw. 50 µM H₂O₂ gemischt worden (*siehe 2.6.4*). Für die Zellen, welche kein H₂-Priming erhielten, erfolgte der Mediumwechsel mit CsA bzw. H₂O₂ in H₂-freiem Nährmedium.

Sowohl bei Zellen mit H₂-Priming als auch bei jenen ohne H₂-Priming, dienten in allen Versuchen unbehandelte Zellen in H₂-freiem Nährmedium als Negativkontrolle zur ROS-Induktion. Gleiches gilt für die Zellen der Positivkontrolle zur ROS-Induktion, welchen jedoch zusätzlich 5 µM TBHP (*siehe 2.5.2.2*) eine halbe Stunde vor Ende der Behandlungszeit (*siehe 2.5.2.3*) zugegeben wurde.

Nach Behandlung der Zellen ist mittels Zellfärbung (*siehe 2.5.2*) und anschließender Fluoreszenzaufnahmen mit dem Mikroskop (*siehe 2.5.3*) die ROS-Induktion sowie die ROS-Reduktion mittels H₂ detektiert worden. Die entstandenen Aufnahmen wurden mit der Software ImageJ ausgewertet (*siehe 2.5.4*).

2.6.2 Prinzipien der Arbeit mit H₂

Zur Anreicherung des Nährmediums mit H₂ wird dieses aus einer H₂-Gasflasche mittels eines Silikonschlauches in das HUVEC-Nährmedium geleitet (*siehe 2.6.3*). H₂ wird im Nährmedium gelöst und folgt dabei physikalischen Gesetzmäßigkeiten. Nach dem Henry-Gesetz ist die Konzentration eines Gases im Wasser direkt proportional zum Partialdruck des Gases über dem Wasser (146). In diesem Fall befindet sich über dem H₂-Nährmedium Raumluft. Hier herrschen normale atmosphärische Gase und Drücke mit einem sehr geringen H₂-Partialdruck, welcher einer H₂-Konzentration von $8,67 \times 10^{-7}$ mg/L entspricht. Dementsprechend diffundiert H₂ aus dem Nährmedium in die angrenzende Raumluft bis ein Gleichgewicht der Partialdrücke hergestellt ist (147). Zudem kann H₂ durch Kunststoffbehälter und viele andere Behälter diffundieren (148). Die Diffusion durch dichtere Stoffe wie Glas oder Metall ist jedoch erschwert, so können zum Beispiel Aluminiumbehälter H₂-Gas über einen längeren Zeitraum speichern (149).

Wie eben beschrieben diffundiert H_2 aus dem Nährmedium kontinuierlich in die Luftsäule über dem Medium und aus dieser durch das Kulturgefäß in die umgebende Raumluft. Um die Diffusion aus dem Kulturgefäß zu erschweren, wurde das Nährmedium in einer Glasflasche mit H_2 angereichert und diese mit mehreren Lagen Aluminiumfolie möglichst luftdicht verschlossen (*siehe 2.6.3*). Auch die verwendeten 24-Well-Multischalen, Objektträger (OT) und T25-Zellkulturflaschen, welche aus Kunststoff bestehen, sind mit Aluminiumfolie umwickelt bzw. abgedeckt (*siehe 2.6.4, 2.6.5.2*) und im Falle des Objektträgers ist zusätzlich eine Metallbox verwendet worden. Zusätzlich ist die Füllmenge des verwendeten Kulturgefäßes (2 ml/Well, 18 ml/OT) bei der Arbeit mit H_2 erhöht worden (*siehe 2.6.4*). Dadurch verkleinert sich das Volumen der Luftsäule über dem Medium. Der Partialdruck von H_2 in der Luftsäule steigt somit schneller an, wodurch wiederum die Diffusion von H_2 aus dem Nährmedium verlangsamt wird.

Zudem kommt es bei der Anreicherung des Nährmediums mit H_2 , durch die im Nährmedium enthaltenen Proteine, zu einer starken Schaumbildung. Die Proteine im Nährmedium lagern sich an die bei der Anreicherung entstehenden Gasbläschen an (150), steigen gemeinsam mit diesen zur Oberfläche auf und stabilisieren den dort entstehenden Schaum (151,152). Im Gegensatz dazu bilden proteinarme Flüssigkeiten und Gase wesentlich instabilere Schäume mit deutlich verkürzter Lebensdauer (153).

Die starke Schaumbildung führt bei der Anreicherung zu Volumenverlusten sowie zu einem Proteinverlust innerhalb des Nährmediums. Aus diesem Grund wird zur H_2 -Anreicherung Nährmedium ohne proteinhaltige Komponenten (EC-Supplementmix, FKS) verwendet. Erst nach Anreicherung wird 10 % FKS zugegeben (*siehe 2.6.3*). Demzufolge ist in dieser Arbeit stets mit H_2 -angereichertem Nährmedium ohne EC-Supplementmix gearbeitet worden.

2.6.3 Anreicherung des Nährmediums mit H_2

Die Anreicherung des Nährmediums mit H_2 wird unter sterilen Bedingungen in der Sicherheitswerkbank mit vorhandenem Abzug durchgeführt.

Zu Beginn wird eine 100 ml Glasflasche mit 100 ml Nährmedium (ohne EC-SupplementMix, ohne FKS) befüllt. Die Glasflasche wird mit mehreren Schichten dicker Aluminiumfolie luftdicht verschlossen. Anschließend wird ein kleines Loch in die Aluminiumfolie gestochen und durch dieses ein Silikonschlauch mit Verbindung zum H_2 -Gasbehälter bis zum Boden der Glasflasche eingeführt. Nun wird das Loch inkl. Silikonschlauch erneut mit mehreren

Schichten Aluminiumfolie abgedichtet. Das Ventil des H₂-Gasbehälters kann nun geöffnet und der Strömungsdruck des Gases manuell mit einem stufenlosen Regler eingestellt werden. Hierbei wird der Strömungsdruck des Gases so hoch wie möglich eingestellt. Ist dieser jedoch zu hoch eingestellt, nimmt die Schaumbildung im Nährmedium überhand, was unweigerlich zu Nährmediumsverlusten führt. Die Gaszufuhr wird für 5 min (7 min in Versuch 4) aufrecht gehalten und anschließend gestoppt. Der Silikonschlauch wird entfernt und das noch vorhandene Loch mit Aluminiumfolie verschlossen.

Vor Verwendung des nun mit H₂ angereichertem Nährmediums wird 10 % FKS zugegeben.

2.6.4 H₂-Priming/H₂-Behandlung der Zellen

Die H₂-Behandlung der Zellen zur ROS-Reduktion erfolgte in jedem Versuch in Form einer einstündigen Inkubation in H₂-angereichertem Nährmedium (H₂-Priming).

Zum H₂-Priming wird zunächst Nährmedium mit H₂ angereichert (*siehe 2.6.3*). Anschließend wird nach 48 h im Brutschrank (*siehe 2.6.1*) das Nährmedium vorsichtig abgenommen und durch frisch angereichertes H₂-Nährmedium (2 ml/Well bzw. 18 ml/OT) und für die Negativkontrolle durch Nährmedium ohne H₂ und ohne EC-SupplementMix (2 ml/Well bzw. 18 ml/OT) ersetzt. Die Wellöffnungen der 24-Well-Zellkultur-Multischalen werden nun mit sterilisierter Alufolie und die Multischale mit ihrem Deckel verschlossen. Zusätzlich werden die Multischalen mit sterilisierter Alufolie vollständig umhüllt. Wird ein Objektträger verwendet so wird dieser mit einem Deckel verschlossen, ebenfalls mit sterilisierter Alufolie vollständig umhüllt und in einer Metallbox platziert. Das H₂-Priming erfolgt für eine Stunde im Brutschrank bevor die Zellen mit CsA bzw. H₂O₂ behandelt werden (*siehe 2.6.1*).

Bei Verwendung eines Objektträgers (Versuch 4) erfolgt für die zuvor H₂-geprimten Zellen die CsA/H₂O₂-Behandlung in 7-minütig H₂-angereichertem Nährmedium. Die Objektträger werden hierfür wie schon zum H₂-Priming fast vollständig (18 ml/OT) gefüllt, mit einem Deckel verschlossen, mit sterilisierter Alufolie umhüllt und für die darauffolgende 6-stündige Inkubation in einer Metallbox platziert. Für die zugehörige Negativkontrolle wird auch hier mit Nährmedium ohne H₂ und ohne EC-SupplementMix gearbeitet.

2.6.5 Detektion von gelöstem Wasserstoffgas in Nährmedium

2.6.5.1 Prinzip

Zur Detektion von gelöstem Wasserstoffgas (H₂) im Nährmedium wird eine H₂Blue Test Reagenz (*siehe 2.1*, Tabelle 3) verwendet. Das H₂Blue Test Reagenz enthält Methylenblau.

Dieses fungiert in Gegenwart eines Platinkatalysators als Oxidationsmittel und stellt sich in seiner oxidierten Form in einem blauen Farbton dar. Durch die Reaktion mit H_2 wird es in seine reduzierte und farblose Form (Leukomethylenblau) umgewandelt (**Abbildung 17**) (154).

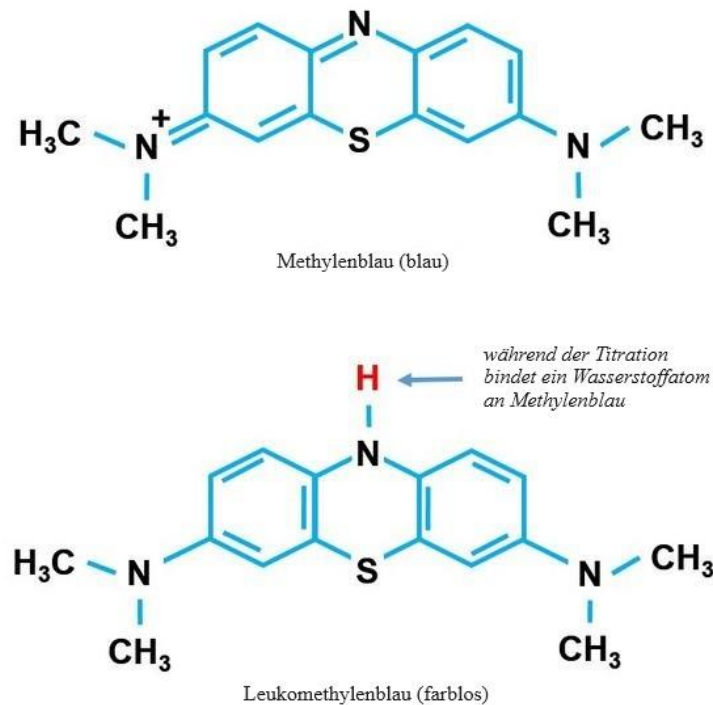


Abbildung 17. Reduktion von Methylenblau durch H_2 zu Leukomethylenblau. Es handelt sich hierbei um eine bearbeitete Darstellung der in der Literatur (154) verwendeten Abbildung (mit Genehmigung des Urheberrechtinhabers).

Die H_2 -Konzentration im Nährmedium wird gemessen, indem das H_2 Blue Reagenz in Tropfenform auf eine festgelegte Menge Nährmedium (6 ml) titriert wird. Mit jedem neu hinzugefügten Tropfen des H_2 Blue Reagenz wird das Nährmedium durch Methylenblau kurzzeitig blau gefärbt. Unter Verbrauch des im Nährmedium gelösten H_2 wird Methylenblau wie oben beschrieben zu dem farblosen Leukomethylenblau reduziert, wodurch das Nährmedium wieder „aufklart“. Diese Reaktion wird während der Titration aufrechterhalten, solange sich mindestens eine Konzentration von 0,1 mg/l gelösten H_2 im Nährmedium befindet. Ist kein gelöstes H_2 mehr bzw. weniger als 0,1 mg/l im Nährmedium vorhanden, bleibt der beschriebene Farbumschlag aus und Methylenblau färbt das Nährmedium blau.

Während der Titration wird die Anzahl der bis zum bleibenden Farbumschlag benötigten Tropfen des H_2 Blue Reagenz gezählt. Mit Hilfe der Tropfenanzahl sowie der bekannten

Konzentration an Methylenblau je Tropfen kann bei bekannter Nährmediumsmenge (6 ml) die Konzentration an gelöstem H₂ berechnet werden (155).

2.6.5.2 Versuchsablauf

Zur Detektion von gelöstem Wasserstoffgas (H₂) im Nährmedium, wird zu Beginn das Nährmedium mit H₂ angereichert (*siehe* 2.6.3). Mit einer 50 ml Pipette werden 36 ml des frisch zubereiteten H₂-Nährmediums aufgenommen und davon 30 ml vorsichtig in eine T25-Zellkulturflasche überführt (*siehe* 3.3.2, **Abbildung 35 B**, „T25 halb gefüllt“). Die in der Pipette verbliebenen 6 ml des frisch zubereiteten H₂-Nährmediums werden direkt auf ihre H₂-Konzentration überprüft (n = 6) und stellen den Ausgangswert der Messreihe (*siehe* 3.3.2, **Abbildung 35 A, a (0 min)**) dar. Die Durchführung dieser Messwerterhebung und der noch folgenden ist in 2.6.5.3 gesondert beschrieben. Das von der H₂-Anreicherung in der Glasflasche verbliebene H₂-Nährmedium wird durch vorsichtiges Eingießen in eine zweite T25-Zellkulturflasche überführt. Die zweite T25-Zellkulturflasche wird dabei maximal gefüllt (ca. 62 ml) und entspricht somit der „T25 vollst. gefüllt“ in **Abbildung 35 B** im Kapitel 3.3.2. Das nach der Überführung in der Glasflasche verbliebene H₂-Nährmedium wird nun ebenfalls auf seinen H₂-Gehalt überprüft (n = 7). Diese Messwerterhebung stellt den zweiten Wert der Messreihe (*siehe* 3.3.2, **Abbildung 35 A, b (2 min)**) dar.

Aus den beiden T25-Zellkulturflaschen („T25 halb gefüllt“, „T25 vollst. gefüllt“) werden jeweils 6 ml zur Messwerterhebung entnommen (n = 6). Dies entspricht dem Ausgangswert des zeitlichen Verlaufs der H₂-Stabilität in der jeweiligen T25 (*siehe* 3.3.2, **Abbildung 35 B**, t = 3 min). Für die Erhebung der restlichen Messwerte (*siehe* 3.3.2, **Abbildung 35 B**, t = 30, 60, 120 min) werden die T25-Zellkulturflaschen, ohne Durchführung der eben beschriebenen Ausgangswerterhebung, mit einem Deckel fest verschlossen, in sterilisierte Alufolie gewickelt und für 30, 60 oder 120 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird die H₂-Konzentration gemessen (n = 3/Messzeitpunkt/T25 halb/vollst. gefüllt).

Für die Messungen der Ausgangswerte (t = 3min) in der jeweiligen T25 sowie für die Werte nach 30, 60 oder 120 min ist jeweils eine separate H₂-Anreicherung erfolgt.

Der Versuch wird möglichst zusammen mit einer weiteren Person durchgeführt, um einen möglichst schnellen und effizienten Versuchsablauf sicher zu stellen.

2.6.5.3 Messwerterhebung mittels H₂Blue Test Reagenz

Die Erhebung der Messwerte ist mittels H₂Blue Test Reagenz nach Herstellerangaben (155) erfolgt und das Prinzip dahinter wurde in 2.6.5.1 bereits beschrieben.

Zur Messwerterhebung werden 6 ml des zu testenden Nährmediums in ein vom Hersteller mitgeliefertes H₂Blue-Teströhrchen überführt. Zur permanenten Vermischung des Nährmediums mit dem tröpfchenweise zugefügten H₂Blue Test Reagenz wird ein Rührfisch sowie ein Magnetrührer verwendet. Vor jeder erneuten Messwerterhebung wird das H₂Blue-Teströhrchen gründlich gereinigt.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung und Darstellung der Graphen erfolgte mit der Software GraphPad Prism. Signifikanzen wurden wie folgt dargestellt: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von CsA auf die Endothelzell-Vitalität

Vor Betrachtung der ROS-Induktion mittels CsA in Endothelzellen (*siehe 3.2.4*) wurde die zytotoxische Wirkung von CsA auf Endothelzellen untersucht. Hierbei wurde dosisabhängig der Einfluss von CsA auf die Vitalität/Stoffwechselleistung mittels des MTS – Zell-Vitalitäts-Tests getestet (*siehe 2.4.2*).

Alle Versuche wurden nach dem gleichen Versuchsschema durchgeführt (*siehe 2.4.1*). Die einzelnen Versuche unterschieden sich jedoch in einigen Parametern. So wurde mit zwei verschiedenen Negativkontrollen (0,1 % und 0,5 % DMSO im Nährmedium) sowie mit zwei HUVEC-Kulturen gearbeitet. Außerdem erfolgte bei einem Teil der Versuche eine zusätzliche einstündige Inkubation in Nährmedium mit anschließendem Mediumwechsel bevor die Zellen mit CsA behandelt wurden. Weiterhin unterschieden sich die Versuche in der verwendeten Zelldichte bei Aussaat der Zellen.

Um eine abschließende Analyse der erhobenen Messwerte (*siehe 3.1.2*) aus allen durchgeführten Versuchen zu ermöglichen, wurde zuerst die Vergleichbarkeit dieser Parameter überprüft.

3.1.1 Überprüfung der Vergleichbarkeit unterschiedlicher Versuchsparameter

3.1.1.1 Negativkontrollen

Da CsA in DMSO gelöst wurde, waren Restmengen von DMSO in den verschiedenen CsA-Lösungen enthalten (bei 50-100 µg/ml CsA waren noch 0,5 % DMSO, bei niedrigeren Konzentrationen 0,1 % DMSO im Nährmedium) (*siehe 2.4.1*). Dementsprechend dienten als Negativkontrolle unbehandelte Zellen in Nährmedium mit entweder 0,1 % oder 0,5 % DMSO-Zusatz.

Stellt man die Stoffwechselleistung der so behandelten Zellen gegenüber (**Abbildung 18**), und geht von einer linearen Abhängigkeit der Werte aus, konnte eine Steigung von 0,998 ermittelt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die Stoffwechselleistung der Negativkontrollen unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht unterschied.

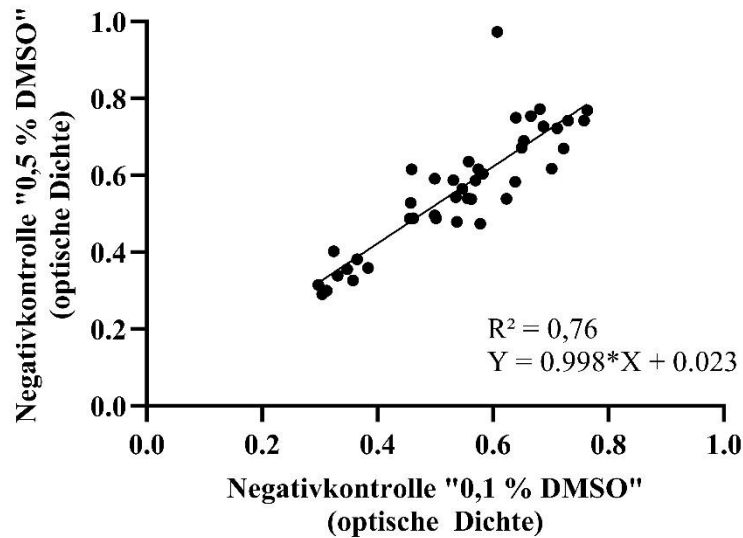


Abbildung 18. Einfluss der DMSO-Konzentration im Nährmedium auf die Stoffwechselleistung der Endothelzellen. Werte je Versuchsreplikate als Triplet-Bestimmungen ermittelt und als berechnete optische Dichte dargestellt. Werte entsprechen den jeweiligen Negativkontrollgruppen (8 h Behandlung in Nährmedium mit 0,1 % DMSO- bzw. 0,5 % DMSO-Zusatz) der Versuche. n = 7 Versuchsreplikate. Statistische Auswertung mittels einfacher linearer Regression mit Darstellung der Regressionsgerade und Geradengleichung.

Im Folgenden wurde keine weitere Unterscheidung bezüglich der Restmengen an DMSO im Nährmedium gemacht. Entweder wurden die Werte der beiden Negativkontrollen gemittelt oder die entsprechende Negativkontrolle als Referenz für unbehandelte Zellen verwendet.

3.1.1.2 Zelldichte bei Aussaat

Die Zelldichte bei Aussaat auf eine 96-Well-Platte variierte innerhalb der Versuche von 1500 bis 7500 Zellen pro Well (*siehe 2.4.1*). **Abbildung 19 A-D** zeigt die Ergebnisse von vier Versuchstagen, an denen voneinander unabhängige Versuche mit variierenden ausgesäten Zelldichten durchgeführt worden sind. Dargestellt sind ausschließlich die Werte der Negativkontrollen.

Mit steigender Zelldichte (zwischen 1500 und 5000 Zellen pro Well) nahm die Stoffwechselleistung der Zellen signifikant zu (**Abbildung 19 A-C**). **Abbildung 19 D** hingegen zeigt eine signifikante Reduktion der Stoffwechselleistung bei höchster Zelldichte (> 6000 Zellen pro Well).

Auffallend war, dass die absoluten Werte der Stoffwechselleistung nicht notwendigerweise mit der ausgesäten Zelldichte einhergehen. So lagen die Absorptionswerte bei niedrig ausgesäten Zelldichten (**Abbildung 19 A und B**) höher als bei hoher Zelldichte (**Abbildung 19**

C und D). Bedingt durch diese Schwankungen ist eine Normalisierung der Messwerte notwendig.

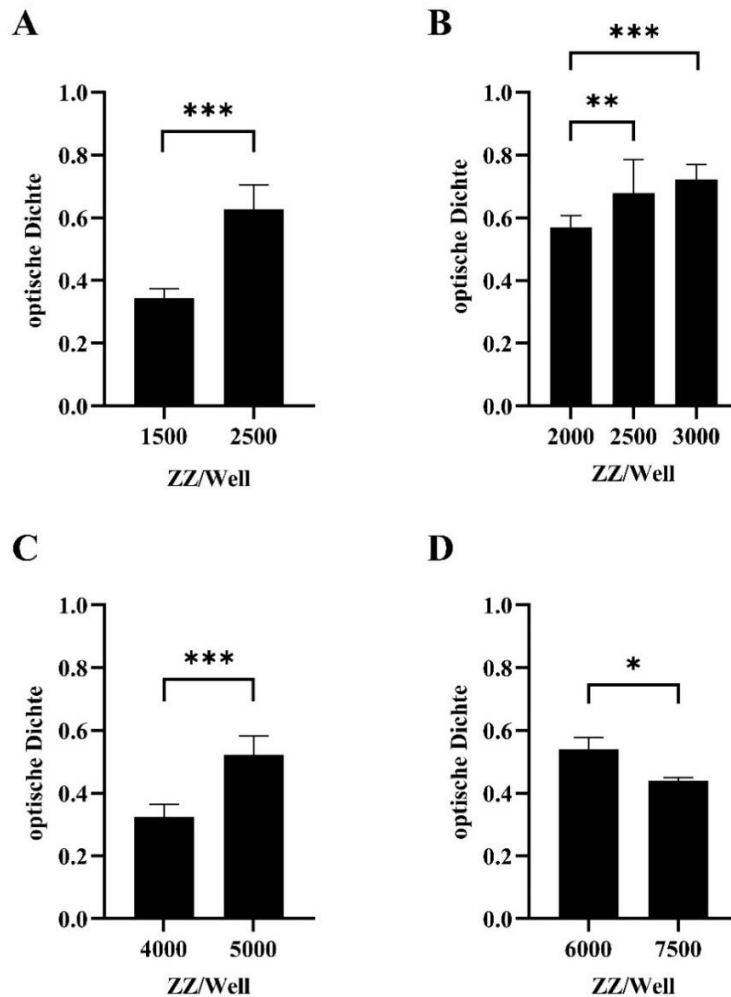


Abbildung 19. Stoffwechselleistung der Endothelzellen bei verschiedenen ausgesäten Zelldichten. Darstellung von 4 Versuchstagen (A-D) mit $n = 8$ Versuchsreplikaten für A, $n = 12$ Versuchsreplikaten für B, $n = 4$ Versuchsreplikaten für C und $n = 2$ Versuchsreplikaten für D. Werte entsprechen der jeweiligen Negativkontrolle der Versuche (8 h unbehandelte Zellen). Werte je Versuchsreplikate als Triplet-Bestimmungen ermittelt und als berechnete optische Dichte dargestellt. Mittelwerte aus den Daten aller Versuchsreplikate erstellt. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels ungepaarter T-Test (A, C, D) und one-way-Anova (B). ZZ/Well = Zellzahl pro Well bei Aussaat.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für alle folgenden statistischen Auswertungen in den Kapiteln 3.1.1.3 bis einschließlich 3.1.2 die ermittelten Werte in Bezug zum Mittelwert der Negativkontrolle des jeweiligen Versuches gesetzt. Dies ermöglicht eine Vergleichbarkeit der Werte unabhängig von den eben genannten Unterschieden zwischen den Versuchen.

3.1.1.3 Auswirkungen eines zusätzlichen Mediumwechsels

Lt. Studienprotokoll war für die H₂-Behandlung ein Mediumwechsel (MW) vorgesehen (siehe 2.6.1 und 2.6.4). Um eine Einflussnahme auf die Stoffwechsellistung der Zellen auszuschließen, wurden Versuche mit und ohne MW durchgeführt (siehe 2.4.1).

Abbildung 20 zeigt die Stoffwechsellistung/Zell-Vitalität der Zellen in Bezug zum Mittelwert der Negativkontrolle jedes einzelnen Versuches.

Die Stoffwechsellistung der Zellen in den Versuchen mit MW ist, verglichen mit den Versuchen ohne MW, jeweils leicht reduziert. Statistisch signifikant ist diese Abweichung lediglich innerhalb der Konzentration von 10 µg/ml CsA ($P = 0,0012$).

Die Zell-Vitalität sank jedoch nie unter 97 %, was einen Einfluss des MW auf die Zell-Vitalität ausschließt.

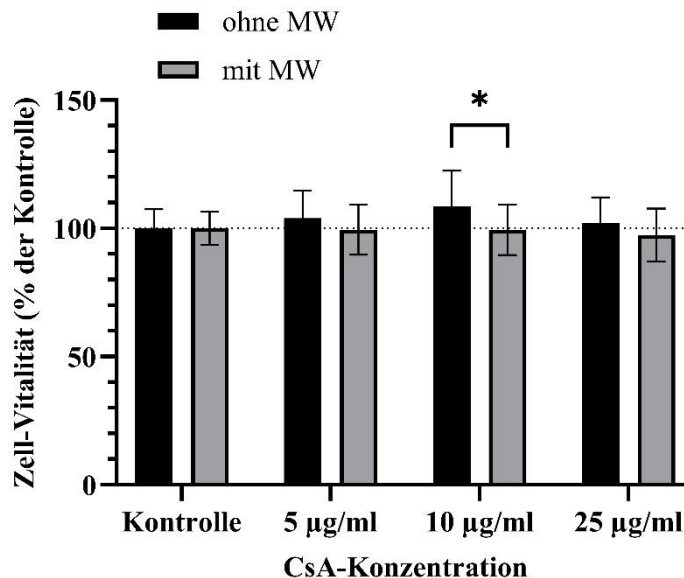


Abbildung 20. Auswirkung eines zusätzlichen Mediumwechsels auf die Endothelzell-Vitalität. Behandlung der Zellen mit 5 µg/ml bis 25 µg/ml CsA für 8 h (unbehandelte Zellen als Kontrolle). $n = 17$ Versuchsreplikate ohne MW, $n = 12$ Versuchsreplikate mit MW. Werte je Versuchsreplikate als Triplet-Bestimmungen ermittelt und bezogen zum Mittelwert der Kontrolle in Prozent dargestellt. Mittelwerte aus den Daten aller Versuchsreplikate erstellt. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels ungepaarter T-Test. ohne MW = Versuche ohne Mediumwechsel, mit MW = Versuche mit Mediumwechsel.

Somit können alle Versuche mit oder ohne MW in die Analyse (siehe 3.1.2) eingeschlossen werden.

3.1.1.4 Mögliche Unterschiede der Kulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen von zwei verschiedenen Spendern verwendet (siehe 2.3.1, Tabelle 6). **Abbildung 21** stellt den Einfluss steigender CsA-Konzentrationen auf die Stoffwechselleistung (relativ zur Negativkontrolle) der beiden HUVEC-Kulturen dar.

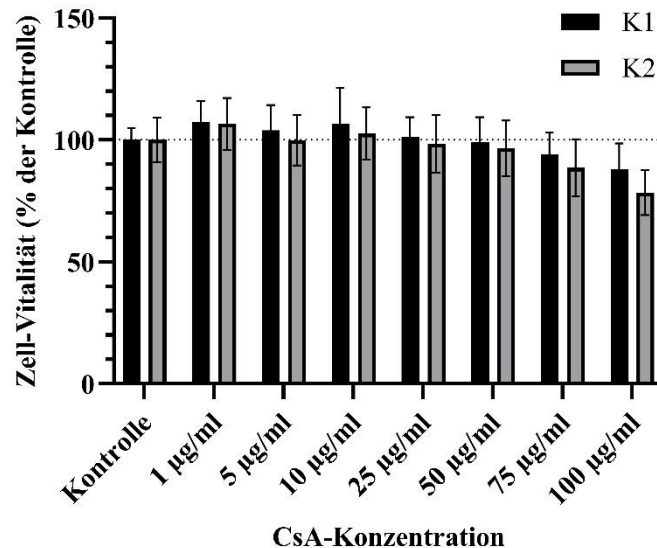


Abbildung 21. Vergleich der Endothelzell-Vitalität der verwendeten HUVEC-Kulturen. Behandlung der Zellen mit 1 µg/ml bis 100 µg/ml CsA für 8 h (unbehandelte Zellen als Kontrolle). n = 16 Versuchsreplikate mit K1, n = 13 Versuchsreplikate mit K2. Werte je Versuchsreplikat als Triplet-Bestimmungen ermittelt und bezogen zum Mittelwert der Kontrolle in Prozent dargestellt. Mittelwerte aus den Daten aller Versuchsreplikate erstellt. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels ungepaarter T-Test. K1 = Kultur 1, K2 = Kultur 2.

Bei keinerlei signifikanten Unterschieden zwischen den HUVEC-Kulturen sind sowohl die Versuche, in denen Kultur 1 als auch jene in denen Kultur 2 verwendet wurde, in die Analyse (siehe 3.1.2) eingeschlossen worden.

3.1.2 abschließende Analyse der erhobenen Messwerte

Wie oben gezeigt, konnten die Daten aller Versuche in die Analyse zur Wirkung von steigenden CsA-Konzentrationen auf die Zell-Vitalität einbezogen werden (**Abbildung 22**).

In **Abbildung 22** fällt auf, dass CsA in Konzentrationen bis 50 µg/ml im Vergleich zur Kontrolle keinen zytotoxischen Effekt auf Endothelzellen besitzt. Eine signifikante Verringerung der Stoffwechselleistung um 9 % im Vergleich zur Kontrolle ist für 75 µg/ml CsA ($P = 0,032$) zu beobachten. Eine ebenfalls signifikante Verringerung um 17 % ist bei

einer CsA-Konzentration von 100 µg/ml ($P < 0,0001$) zu erkennen. Signifikante Erhöhungen der Stoffwechselleistung sind bei 1 µg/ml CsA ($P = 0,0004$) um 7 % und bei 10 µg/ml CsA ($P = 0,0055$) um 5 % im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

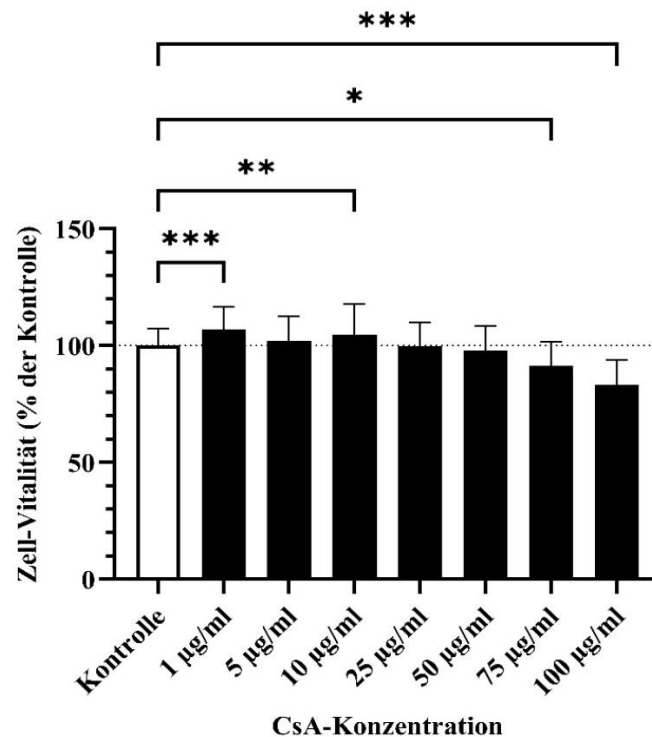


Abbildung 22. Einfluss von CsA auf die Endothelzell-Vitalität. Behandlung der Zellen mit 1 µg/ml bis 100 µg/ml CsA für 8 h (unbehandelte Zellen als Kontrolle). $n = 29$ Versuchsreplikate. Werte je Versuchsreplikate als Triplet-Bestimmungen ermittelt und bezogen zum Mittelwert der Kontrolle in Prozent dargestellt. Mittelwerte aus den Daten aller Versuchsreplikate erstellt. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels One-Way-Anova (Dunnnett-Test für multiple Vergleiche zur Kontrolle).

CsA besitzt demnach unter den gegebenen Kulturbedingungen erst ab einer Konzentration von 75 µg/ml eine zytotoxische Wirkung auf die Endothelzell-Vitalität. Diese fällt selbst bei der höchsten Konzentration von 100 µg/ml mit einer noch erhaltenen Zell-Vitalität von 83 % im Vergleich zur Kontrolle jedoch eher gering aus.

3.2 ROS-Induktion mittels TNF- α , LPS, H₂O₂ und CsA

Als Induktoren von ROS bei Endothelzellen wurden vier verschiedene Reagenzien (TNF- α , LPS, H₂O₂ und CsA) getestet.

Die Darstellung der aus diesen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse erfolgt unter anderem anhand der mit dem Mikroskop erstellten Fluoreszenzaufnahmen. Hierzu werden im Folgenden jeweils ausgewählte repräsentative Beispielaufnahmen der Versuche gezeigt und qualitativ beurteilt. Die in den Beispielaufnahmen zu sehende Fluoreszenzintensität korreliert mit dem Ausmaß an intrazellulärem oxidativem Stress der Endothelzellen (*siehe 2.5.2.1*). Stark fluoreszierende Zellen stellen sich dabei in einem kräftigen Grün dar. Weniger stark fluoreszierende Zellen erscheinen in einem schwächeren Grün bzw. sind teilweise nicht vom schwarzen Hintergrund zu unterscheiden. Zudem stellen sich Zellen im apoptotischen Sterbeprozess mit einer sehr hohen Fluoreszenzintensität dar und erscheinen eher rundlich aufgrund ihrer fehlenden Adhärenz zum Well-Boden. Vitale und adhärenz Zellen hingegen weisen eher eine flächige Struktur auf.

Des Weiteren werden die Ergebnisse in Form quantitativer und statistischer Auswertungen der Fluoreszenzaufnahmen dargestellt. Die aus den Fluoreszenzaufnahmen ermittelten Pixelgrauwerte (*siehe 2.5.4*) stellen hierbei ein relatives Maß für die Fluoreszenzintensität (ROS) dar.

3.2.1 TBHP als Positivkontrolle

Um den Erfolg der folgenden ROS-Induktion mittels der verschieden verwendeten Reagenzien beurteilen zu können, bedarf es zunächst einer Positivkontrolle. Hierfür wurde tert-Butylhydroperoxid (TBHP) gewählt (*siehe 2.5.2.2*).

Abbildung 23 zeigt die Fluoreszenzaufnahmen der Negativkontrolle (Kontrolle) und der Positivkontrolle (TBHP) nach initialer 48-stündiger Wachstumsphase und anschließender 6-stündiger (**Abbildung 23 A**) sowie 24-stündiger Inkubation (**Abbildung 23 B**) der Zellen in Nährmedium. In den letzten 30 min der nun insgesamt 54- bzw. 72-stündigen Wachstumsphase sind die Zellen der Positivkontrolle mit TBHP behandelt worden (*siehe 2.5.2.3*).

In **Abbildung 23 A.1** und **B.1** sind ausgewählte repräsentative Beispiele der Fluoreszenzaufnahmen dargestellt. Bei den mit TBHP behandelten Zellen zeigt sich eine hohe

Fluoreszenzintensität in den apoptotischen und in den vitalen Zellen. In den Fluoreszenzaufnahmen der Negativkontrolle sind bis auf einzelne Ausnahmen in Abbildung 23 A.1 keine apoptotischen Zellen erkennbar. Insgesamt ist sowohl nach 6- als auch nach 24-stündiger Inkubation ein großer Unterschied in der Fluoreszenzintensität zwischen der Positiv- und der Negativkontrolle ersichtlich. Der durch TBHP induzierte oxidative Stress der Endothelzellen ist anhand der qualitativen Beurteilung deutlich sichtbar.

Sowohl nach 6-stündiger (**Abbildung 23 A.2**, $P < 0,0024$) als auch nach 24-stündiger Inkubation (**Abbildung 23 B.2**, $P = 0,0016$) zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenzintensität bei den mit TBHP behandelten Zellen verglichen zur Kontrolle. Demnach konnte unter den gegebenen Kulturbedingungen der ROS-induzierende Effekt von TBHP statistisch nachgewiesen werden.

In allen folgenden ROS- und H₂-Versuchen ist TBHP als Positivkontrolle für die ROS-Induktion verwendet worden, wird jedoch in diesem Kapitel (3.2) aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit in den einzelnen Graphen und Darstellungen der Fluoreszenzaufnahmen nicht dargestellt.

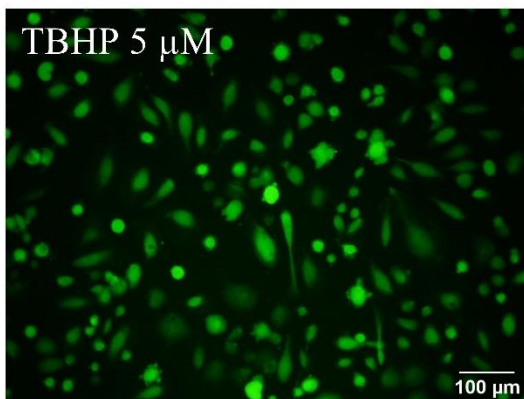
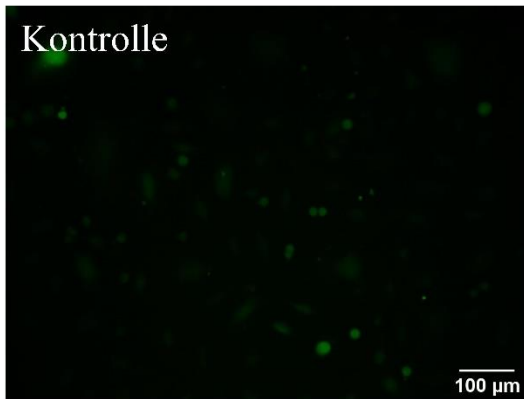
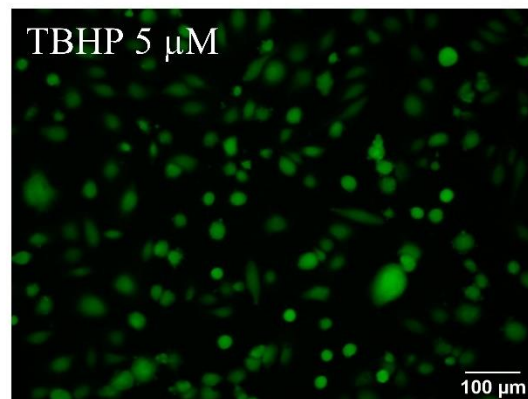
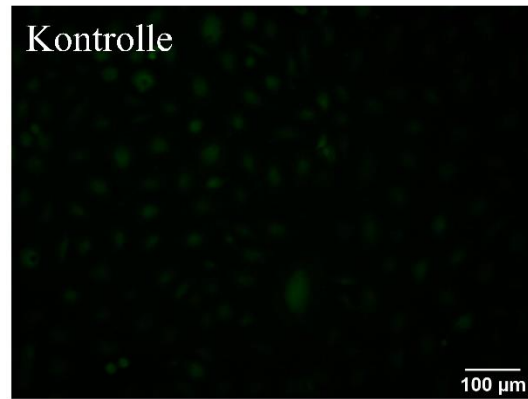
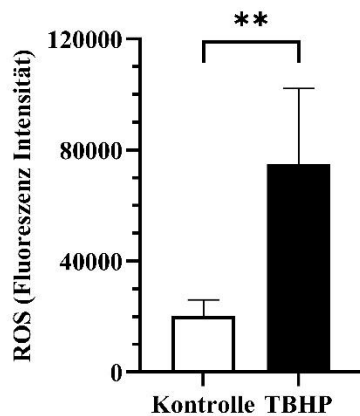
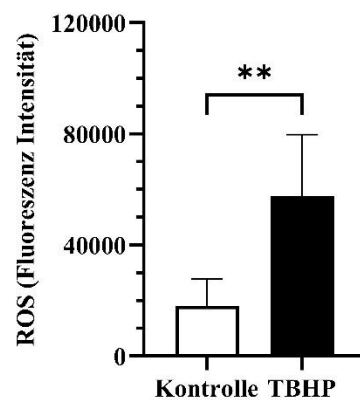
A.1**B.1****A.2****B.2**

Abbildung 23. TBHP als Positivkontrolle zur ROS-Induktion in Endothelzellen. **A.1, B.1** Repräsentative Beispiele der Immunfluoreszenz (ROS-Produktion) detektiert mit DCFDA. Fluoreszenz - Mikroskopie, x40, HUVEC Kultur 2 in Passage 7. **A** Behandlung der zuvor 5,5 h unbehandelten Zellen mit 5 μ M TBHP für 30 min (6 h unbehandelte Zellen als Kontrolle). n = 6 Versuchsreplikate. **B** Behandlung der zuvor 23,5 h unbehandelten Zellen mit 5 μ M TBHP für 30 min (24 h unbehandelte Zellen als Kontrolle). n = 6 Versuchsreplikate. Jedes Versuchsreplikat umfasst n = 3,1 (Mittelwert) Fluoreszenzaufnahmen je Reagenz-Konzentration/Kontrolle mit n = 74 (Mittelwert) Zellen je Fluoreszenzaufnahme. **A.2, B.2** ROS-Produktion gemessen anhand von Pixelgrauwerten als relatives Maß der Fluoreszenzintensität (DCFDA). Mittelwerte erstellt je Fluoreszenzaufnahme sowie innerhalb eines Versuchsreplikates je Reagenz-Konzentration/Kontrolle. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels Two-way-Anova.

3.2.2 ROS-Induktion mittels TNF- α und LPS

Um oxidativen Stress in Endothelzellen zu erzeugen sind zunächst Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Lipopolysaccharid (LPS) verwendet worden (*siehe 2.5.1.1*).

Bei Behandlung der Endothelzellen mit TNF- α war weder nach 6 (**Abbildung 24 A.1**) noch nach 24 h (**Abbildung 24 B.1**) eine ROS-Induktion verglichen zur Kontrolle zu beobachten. Selbst bei der höchsten Konzentration (100 ng/ml) war keine ROS-Induktion erkennbar.

Für die mit LPS behandelten Zellen zeigen die Graphen nahezu identische Ergebnisse wie die Graphen der mit TNF- α behandelten Zellen. Auch hier war weder nach 6- (**Abbildung 24 A.2**) noch nach 24-stündiger Behandlung (**Abbildung 24 B.2**) eine ROS-Induktion zu erkennen.

Lediglich fällt nach 24-stündiger Behandlung sowohl für TNF- α als auch für LPS ein genereller Anstieg der Kontrollwerte um das 1,75-fache im Vergleich zu den Werten nach 6-stündiger Behandlung auf. Bei längerer Standzeit der Zellen innerhalb des Kulturgefäßes, während der 24-stündigen Behandlung, ist dies jedoch durchaus erklärbar.

Die Auswertung der hier nicht dargestellten zugehörigen Fluoreszenzaufnahmen stützt die eben beschriebenen Beobachtungen. Eine statistische Auswertung der hier dargelegten Ergebnisse ist aufgrund einer zu geringen Anzahl an Versuchsreplikaten nicht erfolgt.

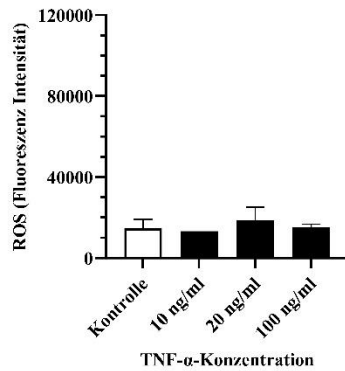
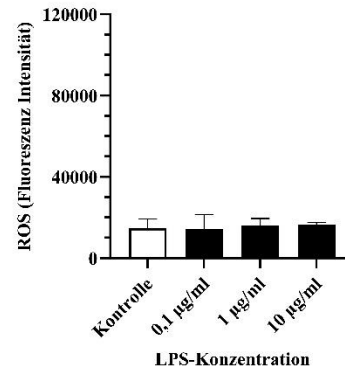
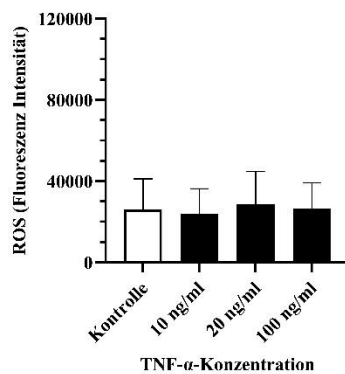
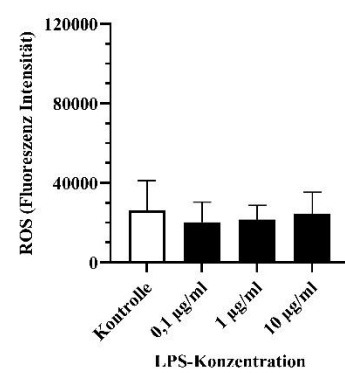
A.1**A.2****B.1****B.2**

Abbildung 24. ROS-Induktion mittels TNF- α und LPS. ROS-Produktion gemessen anhand von Pixelgrauwerten als relatives Maß der Fluoreszenzintensität (DCFDA). Mittelwerte erstellt je Fluoreszenzaufnahme sowie innerhalb eines Versuchsreplikates je Reagenz-Konzentration/Kontrolle. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung. **A.1, B.1** Behandlung der Zellen mit 10 bis 100 ng/ml TNF- α für 6 h (A.1, n = 2* Versuchsreplikate [*n = 1 für 10 ng/ml]) und 24 h (B.1, n = 2 Versuchsreplikate) (unbehandelte Zellen als Kontrolle). **A.2, B.2** Behandlung der Zellen mit 0,1 bis 10 μ g/ml LPS für 6 h (A.2, n = 2 Versuchsreplikate) und 24 h (B.2, n = 2 Versuchsreplikate) (unbehandelte Zellen als Kontrolle). Jedes Versuchsreplikate umfasst n = 3,1 (Mittelwert) Fluoreszenzaufnahmen je Reagenz-Konzentration/Kontrolle mit n = 74 (Mittelwert) Zellen je Fluoreszenzaufnahme.

3.2.3 ROS-Induktion mittels H₂O₂

Neben TNF- α und LPS ist auch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zur Erzeugung von oxidativem Stress in HUVEC verwendet worden (*siehe 2.5.1.1*).

Abbildung 25 zeigt Fluoreszenzaufnahmen eines Versuches mit 6-stündiger H₂O₂-Behandlung als repräsentatives Beispiel.

Es fällt eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität der mit 50 μM und 100 μM H_2O_2 behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf. Dagegen zeigten die mit 10 μM H_2O_2 behandelten Zellen eine ähnlich niedrige Fluoreszenzintensität wie die Zellen der Kontrolle. Zusammenfassend ist anhand der qualitativen Beurteilung der Fluoreszenzaufnahmen oxidativer Stress in HUVEC ab einer Behandlungsdosis von 50 μM H_2O_2 zu erkennen.

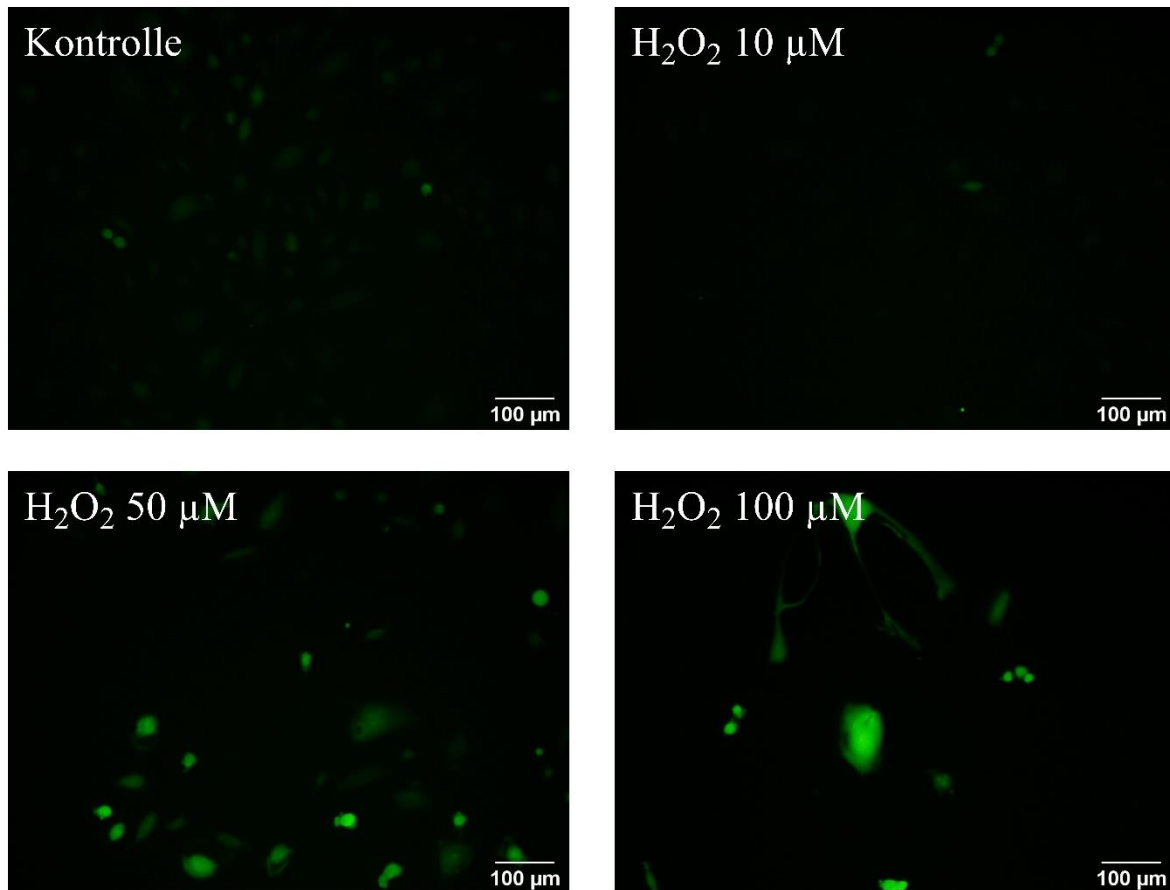


Abbildung 25. ROS-Induktion mittels H_2O_2 – Fluoreszenzaufnahmen. Repräsentatives Beispiel (Behandlung der Zellen mit 10 bis 100 μM H_2O_2 für 6 h) der Immunfluoreszenz (ROS-Produktion) detektiert mit DCFDA. Fluoreszenz - Mikroskopie, x40, HUVEC Kultur 2 in Passage 4.

Abbildung 26 zeigt die graphische Darstellung der aus den Fluoreszenzaufnahmen ermittelten Pixelgrauwerte für alle Einzelversuche mit einer Behandlungsdauer von 6 (**Abbildung 26 A**, n = 2 Versuchsreplikate) bzw. 24 h (**Abbildung 26 B**, n = 2 Versuchsreplikate).

In keinem der durchgeführten Versuche war ein nennenswerter ROS-Anstieg bei 10 μM H_2O_2 im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Die Fluoreszenzintensität der mit 10 μM

behandelten Zellen war in 3 (Abbildung 26 A.1, B.1 und B.2) der 4 Versuche nahezu auf gleichem Niveau wie jene der Kontrolle. Lediglich in Abbildung 26 A.2 war ein Abfall der gemessenen Fluoreszenzintensität zu beobachten.

Im Gegensatz dazu war bei hohen H_2O_2 -Konzentrationen (50 μM , 100 μM) ein ROS-Anstieg im Vergleich zur Kontrolle in jedem der vier Versuche zu erkennen. Bei Betrachtung der einzelnen Versuche zeigte sich in 2 (Abbildung 26 A.1 und B.1) der 4 Versuche für 50 μM H_2O_2 jeweils mindestens eine Verdopplung der Werte. Beim Einsatz von 100 μM H_2O_2 war ebenfalls eine Verdopplung (Abbildung 26 A.2) und in 3 der 4 Versuche sogar mindestens eine Verdreifachung der Fluoreszenzintensität verglichen zur Kontrolle erkennbar.

Zudem war in jedem Versuch der Anstieg der Fluoreszenzintensität als dosisabhängig zu erkennen.

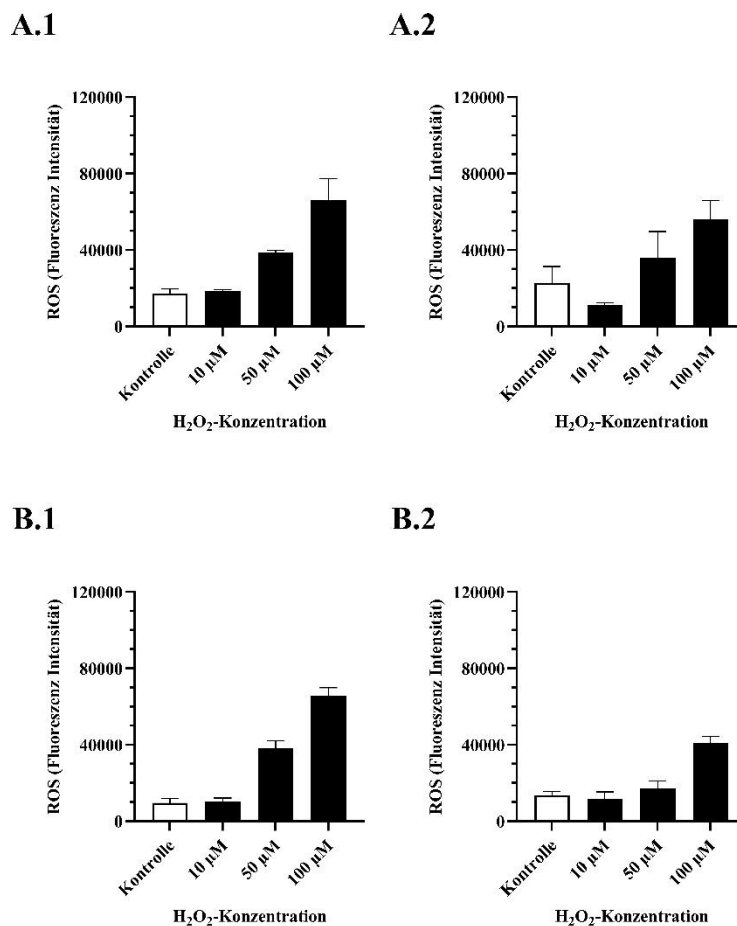


Abbildung 26. ROS-Induktion mittels H_2O_2 – Übersicht der einzelnen Versuche. Behandlung der Zellen mit 10 bis 100 μM H_2O_2 für 6 h (A.1-A.2, n = 2 Versuchsreplikate) und 24 h (B.1-B.2, n = 2 Versuchsreplikate) (unbehandelte Zellen als Kontrolle). Jedes Versuchsreplikat umfasst n = 3,1 (Mittelwert) Fluoreszenzaufnahmen je Reagenz-Konzentration/Kontrolle mit n = 74 (Mittelwert) Zellen je Fluoreszenzaufnahme. ROS-Produktion gemessen anhand von Pixelgrauwerten als relatives Maß der Fluoreszenzintensität (DCFDA). Mittelwerte erstellt je Fluoreszenzaufnahme. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung.

Die Ergebnisse der 4 Versuche wurden zusammengefasst (**Abbildung 27**) und statistisch ausgewertet.

Eine Behandlung der Zellen mit 10 μM H_2O_2 bewirkte einen leichten Abfall der Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle, jedoch ohne statistische Signifikanz. Als statistisch signifikant zeigte sich hingegen der vorherig beschriebene dosisabhängige ROS-Anstieg für 50 μM ($P = 0,0204$) und 100 μM H_2O_2 ($P < 0,0001$).

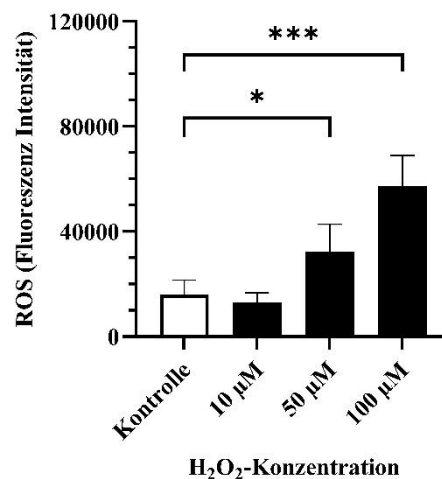


Abbildung 27. ROS-Induktion mittels H_2O_2 – Statistische Auswertung. Graph bestehend aus den zusammengefassten Daten aus der Behandlung der Zellen mit 10 bis 100 μM H_2O_2 für 6 h ($n = 2$ Versuchsreplikate) und 24 h ($n = 2$ Versuchsreplikate) (unbehandelte Zellen als Kontrolle). Jedes Versuchsreplikate umfasst $n = 3,1$ (Mittelwert) Fluoreszenzaufnahmen je Reagenz-Konzentration/Kontrolle mit $n = 74$ (Mittelwert) Zellen je Fluoreszenzaufnahme. ROS-Produktion gemessen anhand von Pixelgrauwerten als relatives Maß der Fluoreszenzintensität (DCFDA). Mittelwerte erstellt je Fluoreszenzaufnahme sowie innerhalb eines Versuchsreplikates je Reagenz-Konzentration/Kontrolle. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels Two-way-Anova.

Zusammenfassend konnte unter den gegebenen Kulturbedingungen eine dosisabhängige ROS-Induktion in HUVEC durch H_2O_2 ab einer Konzentration von 50 μM nachgewiesen werden.

3.2.4 ROS-Induktion mittels CsA

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche zur Erzeugung von oxidativem Stress in HUVEC mittels CsA beschrieben.

Abbildung 28 zeigt Fluoreszenzaufnahmen eines Versuches mit 6-stündiger CsA-Behandlung als repräsentatives Beispiel.

Die mit 10 $\mu\text{g/ml}$ CsA behandelten Zellen zeigten eine ähnlich niedrige Fluoreszenzintensität wie die Zellen der Kontrolle. Für 50 und 100 $\mu\text{g/ml}$ CsA war jedoch eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität und damit eine ROS-Induktion feststellbar.

Nebenbefundlich wurde bei diesen Fluoreszenzaufnahmen eine Abschätzung der toten Zellen (abgekugelte und hell leuchtende Zellen) durchgeführt. Bei höchster CsA-Konzentration (100 $\mu\text{g/ml}$) wurde eine Apoptose-Häufigkeit von 16 % nach 6-stündiger ($n = 10$ ausgewertete Fluoreszenzaufnahmen) und 12 % nach 24-stündiger Behandlungszeit ($n = 10$ ausgewertete Fluoreszenzaufnahmen) ermittelt. Dies entspricht der Stoffwechselleistung bei höchster CsA-Konzentration (*siehe 3.1.2, Abbildung 22*). Beide Ergebnisse bestätigen, dass der beobachtete CsA-induzierte oxidative Stress der Zellen durch CsA hervorgerufen und nicht Apoptose-bedingt ist.

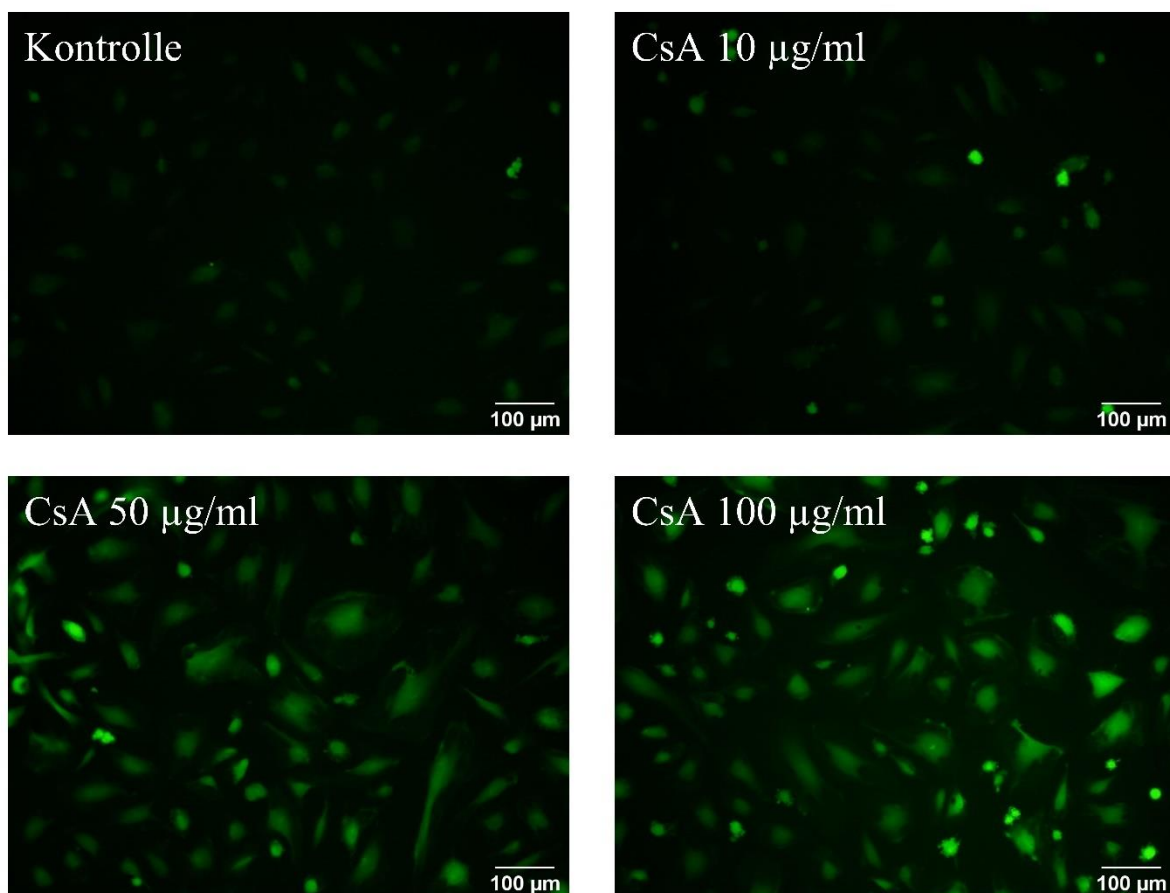


Abbildung 28. ROS-Induktion mittels CsA – Fluoreszenzaufnahmen. Repräsentatives Beispiel (Behandlung der Zellen mit 10 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ CsA für 6 h) der Immunfluoreszenz (ROS-Produktion) detektiert mit DCFDA. Fluoreszenz - Mikroskopie, x40, HUVEC Kultur 2 in Passage 4.

Abbildung 29 zeigt die graphische Darstellung der aus den Fluoreszenzaufnahmen ermittelten Pixelgrauwerte für alle Einzelversuche mit einer Behandlungsdauer von 6 (**Abbildung 29 A**, n = 3 Versuchsreplikate) bzw. 24 h (**Abbildung 29 B**, n = 3 Versuchsreplikate).

Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten bestätigte die Beobachtung, dass mit 10 µg/ml CsA keine ROS-Induktion ausgelöst werden konnte (Abbildung 28).

Im Gegensatz dazu war ein ROS-Anstieg bei hohen CsA-Konzentrationen (50 µg/ml, 100 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle in jedem der 6 Versuche zu erkennen, mit Ausnahme von **Abbildung 29 A.3**, in der für 50 µg/ml nur ein geringer ROS-Anstieg nachweisbar war. Bei Betrachtung der einzelnen Versuche war für 50 µg/ml CsA in 3 (**Abbildung 29 A.2, B.1** und **B.2**) der 6 Versuche ein Anstieg um das 1,4- bis 1,9-fache und in 2 Versuchen (**Abbildung 29 A.1** und **B.3**) eine Verdopplung bis nahezu Verdreifachung der Werte verglichen mit der jeweiligen Kontrolle zu beobachten. Beim Einsatz von 100 µg/ml CsA war ebenfalls ein 1,5- bis 1,9-facher Anstieg in 5 Versuchen und in einem Versuch (**Abbildung 29 A.1**) sogar ein 2,6-facher Anstieg der Fluoreszenzintensität erkennbar.

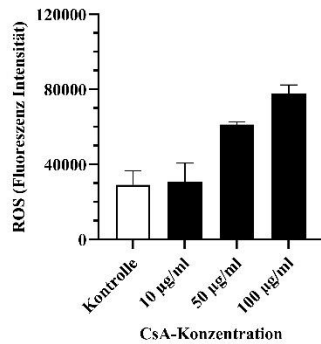
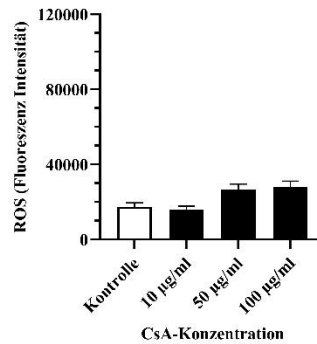
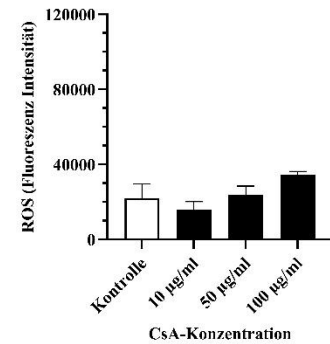
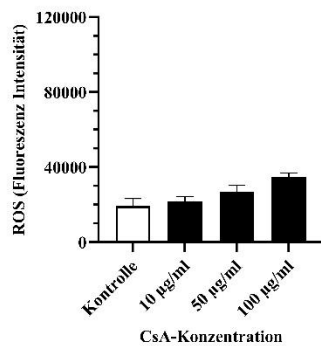
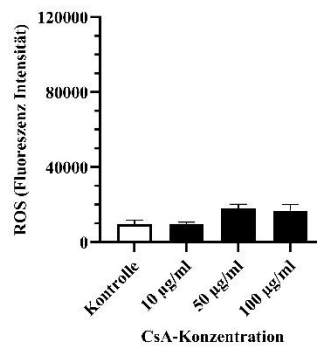
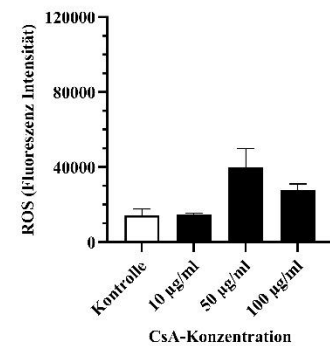
A.1**A.2****A.3****B.1****B.2****B.3**

Abbildung 29. ROS-Induktion mittels CsA – Übersicht der einzelnen Versuche. Behandlung der Zellen mit 10 bis 100 µg/ml CsA für 6 h (A.1-A.3, n = 3 Versuchsreplikate) und 24 h (B.1-B.3, n = 3 Versuchsreplikate) (unbehandelte Zellen als Kontrolle). Jedes Versuchsreplikate umfasst n = 3,1 (Mittelwert) Fluoreszenzaufnahmen je Reagenz-Konzentration/Kontrolle mit n = 74 (Mittelwert) Zellen je Fluoreszenzaufnahme. ROS-Produktion gemessen anhand von Pixelgrauwerten als relatives Maß der Fluoreszenzintensität (DCFDA). Mittelwerte erstellt je Fluoreszenzaufnahme. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung.

Abbildung 30 fasst die Versuche für 6 (**Abbildung 30 A**) und 24 h (**Abbildung 30 B**) zusammen.

Zu beiden Zeiten war ein Anstieg der Fluoreszenzintensität bei 50 µg/ml und 100 µg/ml CsA verglichen zur Kontrolle erkennbar.

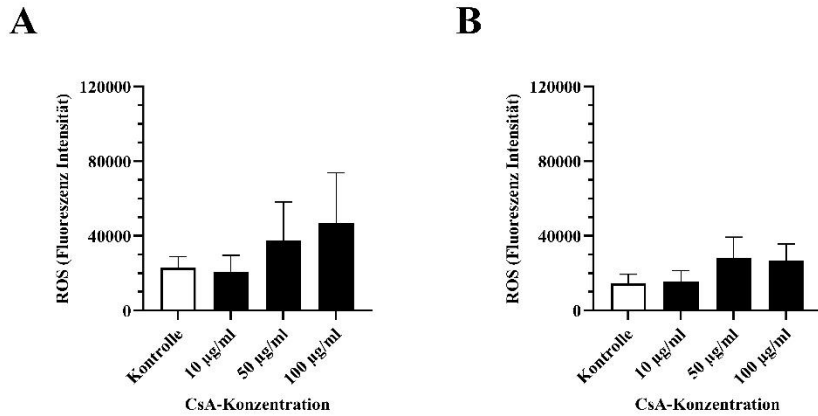


Abbildung 30. ROS-Induktion mittels CsA – Übersicht für 6 und 24 h CsA-Behandlung. Graphen bestehend aus den zusammengefassten Daten aus der Behandlung der Zellen mit 10 bis 100 µg/ml CsA für 6 h (A, n = 3 Versuchsreplikate) und 24 h (B, n = 3 Versuchsreplikate) (unbehandelte Zellen als Kontrolle). Jedes Versuchsreplikate umfasst n = 3,1 (Mittelwert) Fluoreszenzaufnahmen je Reagenz-Konzentration/Kontrolle mit n = 74 (Mittelwert) Zellen je Fluoreszenzaufnahme. ROS-Produktion gemessen anhand von Pixelgrauwerten als relatives Maß der Fluoreszenzintensität (DCFDA). Mittelwerte erstellt je Fluoreszenzaufnahme sowie innerhalb eines Versuchsreplikates je Reagenz-Konzentration/Kontrolle. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung.

Abbildung 31 fasst die Ergebnisse beider Zeitpunkte zusammen. Diese wurden statistisch analysiert.

In Abbildung 31 war kein signifikanter Unterschied zwischen den mit 10 µg/ml CsA behandelten Zellen und der Kontrolle feststellbar. Als statistisch signifikant zeigte sich hingegen der vorherig beschriebene dosisabhängige ROS-Anstieg für 50 ($P = 0,0229$) und 100 µg/ml CsA ($P = 0,0045$).

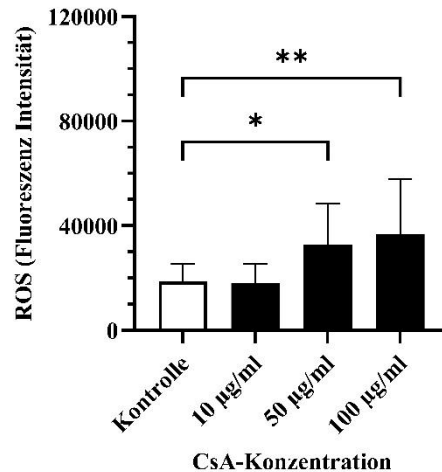


Abbildung 31. ROS-Induktion mittels CsA – Statistische Auswertung. Graph bestehend aus den zusammengefassten Daten aus der Behandlung der Zellen mit 10 bis 100 µg/ml CsA für 6 h (n = 3 Versuchsreplikate) und 24 h (n = 3 Versuchsreplikate) (unbehandelte Zellen als Kontrolle). Jedes Versuchsreplikate umfasst n = 3,1 (Mittelwert) Fluoreszenzaufnahmen je Reagenz-Konzentration/Kontrolle mit n = 74 (Mittelwert) Zellen je Fluoreszenzaufnahme. ROS-Produktion gemessen anhand von Pixelgrauwerten als relatives Maß der Fluoreszenzintensität (DCFDA). Mittelwerte erstellt je Fluoreszenzaufnahme sowie innerhalb eines Versuchsreplikates je Reagenz-Konzentration/Kontrolle. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels Two-way-Anova.

Zusammenfassend konnte unter den gegebenen Kulturbedingungen eine dosisabhängige ROS-Induktion in HUVEC durch CsA ab einer Konzentration von 50 µg/ml nachgewiesen werden.

3.3 Untersuchungen zur ROS-Reduktion mittels H₂ und H₂-Stabilität im Nährmedium

3.3.1 ROS-Reduktion mittels H₂

Im folgenden Kapitel werden die ersten Versuche dargestellt, wo mittels H₂ die ROS-Induktion durch CsA und H₂O₂ in Endothelzellen verhindert werden sollte (gesamter Versuchsablauf, *siehe 2.6.1*).

3.3.1.1 Versuch 1

HUVEC wurden für 6 bzw. 24 h mit jeweils drei Konzentrationen CsA (10, 50, 100 µg/ml) oder H₂O₂ (10, 50, 100 µM) behandelt (unbehandelte Zellen als Referenz). Um die Zellen nun

mit H₂ in Kontakt zu bringen, wurden diese vor der Behandlung mit CsA bzw. H₂O₂ für 1 h in H₂-angereichertem Nährmedium inkubiert („Priming“, *siehe* 2.6.4). Grundlage dieses Vorgehens waren Vorversuche unserer Arbeitsgruppe, in der eine ROS-Reduktion durch H₂-Priming bei Fibroblasten nachgewiesen werden konnte. Im Anschluss wurden die Zellen nach bereits bekannter Methodik (*siehe* 2.5.2) gefärbt und mit Hilfe der ausgewerteten Fluoreszenzaufnahmen (*siehe* 2.5.3 und 2.5.4) hinsichtlich eines H₂-Effektes beurteilt.

Abbildung 32 zeigt repräsentative Beispiele der Fluoreszenzaufnahmen aus Versuch 1, wobei zur besseren Übersichtlichkeit nur jeweils eine Konzentration CsA bzw. H₂O₂ dargestellt wurde.

Beide Substanzen führten (sowohl nach 6 als auch nach 24 h) zwar zu einer Zunahme der ROS-Produktion, jedoch zeigte ein vorangehendes H₂-Priming der Zellen keine reduzierende Wirkung.

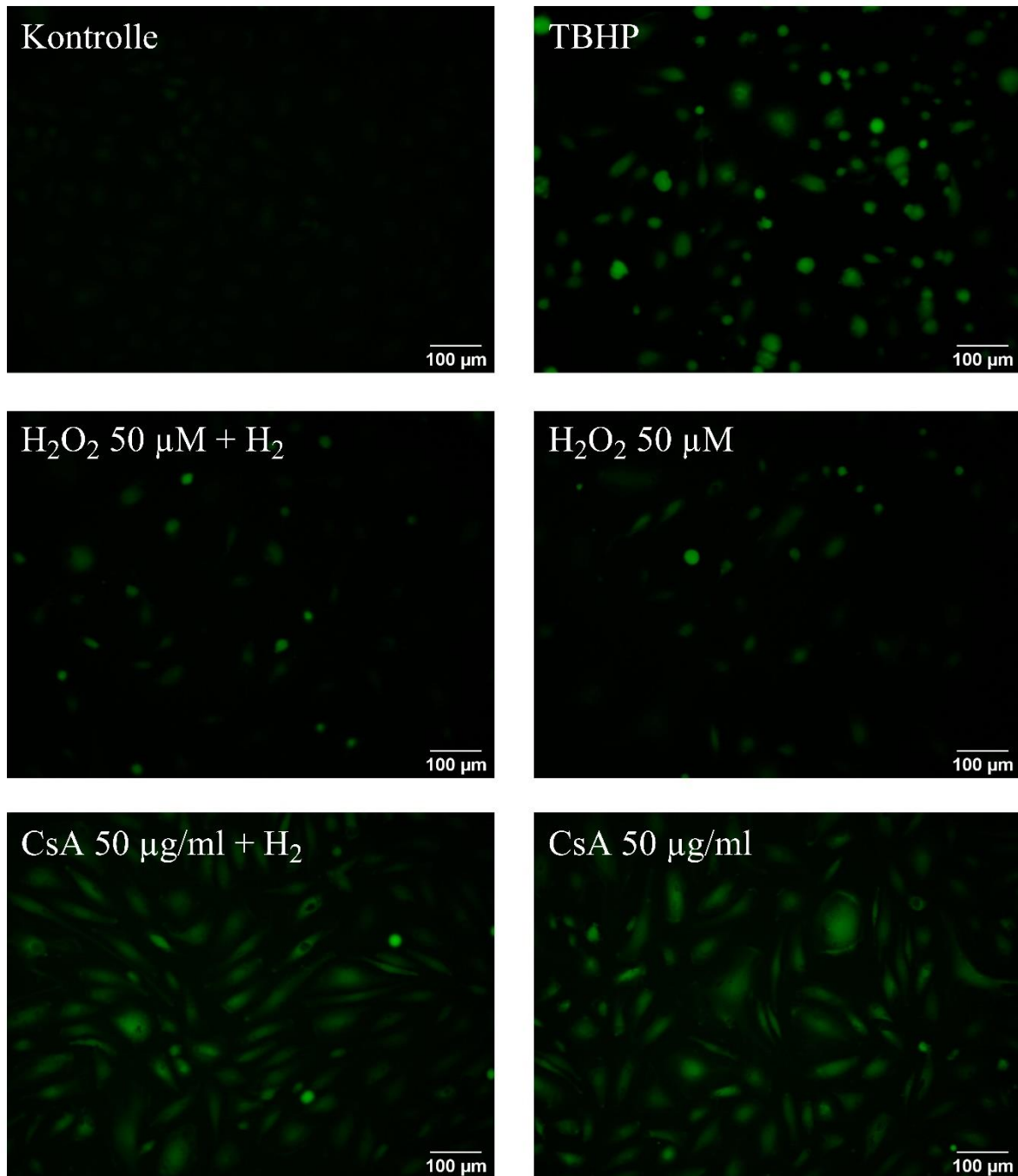


Abbildung 32. ROS-Reduktion mittels H_2 im 24-Well – Versuch 1. Repräsentatives Beispiel der Immunfluoreszenz (ROS-Produktion) detektiert mit DCFDA. Fluoreszenz - Mikroskopie, x40, 24-Well, HUVEC Kultur 2 in Passage 7. Behandlung der zuvor 1 h H_2 -geprimten Zellen mit 10 bis 100 $\mu\text{g/ml}$ CsA bzw. 10 bis 100 μM H_2O_2 (jeweils nur eine Reagenz-Konzentration bei 24 h Behandlung dargestellt) für 6 und 24 h (H_2 - sowie CsA/ H_2O_2 -unbehandelte Zellen als Kontrolle). n = 1 Versuchsreplikat.

3.3.1.2 Versuche 2 und 3

Da H_2 sehr schnell aus dem Nährmedium entweichen kann (147) (siehe 2.6.2), lag der Verdacht nahe, dass in Versuch 1 eine zu geringe H_2 -Konzentration im Nährmedium vorlag.

Das Nährmedium wurde zwar mit H₂-Gas durch einen Luftstein für längere Zeit angereichert (siehe 2.6.3), jedoch kann durch das anschließende Pipettieren und die großen Oberflächen im Kulturgefäß (mit Luftkontakt) H₂ wieder aus dem Nährmedium entweichen (siehe 2.6.2). Dies führt zu einer geringeren H₂-Konzentration im Nährmedium.

Zusätzlich ist die Diffusion des H₂-Gases zeitabhängig. Je mehr Zeit beim Pipettieren benötigt wird, desto mehr H₂-Gas entweicht aus dem Nährmedium, bevor die Zellen damit in Berührung kommen.

Um diese möglichen Fehlerquellen zu minimieren, wurde Versuch 1 mit reduziertem Versuchsaufbau als **Versuch 2** wiederholt. Es wurde nur jeweils eine Konzentration CsA (50 µg/ml) bzw. H₂O₂ (50 µM) mit einer Behandlungsdauer von 6 h berücksichtigt. Dies reduziert die Anzahl der zu pipettierenden Wells und ermöglicht einen schnelleren Versuchsablauf. Bei weniger zu pipettierenden Wells kann zudem verstärkt auf sauberes und langsames Pipettieren geachtet werden, wodurch weniger Verwirbelungen im H₂-angereicherten Nährmedium entstehen. Der Fokus dieses Versuchs lag dementsprechend nun auf einem möglichst schnellen Ablauf, um möglichst wenig H₂ durch Diffusion zu verlieren.

Abbildung 33 zeigt repräsentative Beispiele der Fluoreszenzaufnahmen aus Versuch 2. Die Positivkontrolle (TBHP) für die ROS-Induktion zeigt eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Kontrolle. Gleiches gilt für 50 µg/ml CsA und 50 µM H₂O₂. Die Fluoreszenzintensität der Zellen, die mit TBHP, CsA und H₂O₂ behandelt wurden, war vergleichbar hoch, was für eine erfolgreiche ROS-Induktion spricht.

Vergleicht man nun die Zellen, welche mit 50 µM H₂O₂ und zusätzlichem H₂-Priming behandelt wurden mit jenen ohne H₂-Priming, fällt eine leichte Reduktion der Fluoreszenzintensität auf. Auch die mit 50 µg/ml CsA und zusätzlichem H₂-Priming behandelten Zellen zeigen verglichen mit den H₂-unbehandelten Zellen (50 µg/ml CsA) eine leichte Reduktion der Fluoreszenzintensität, wobei diese jedoch geringer ausfällt im Vergleich zu den mit H₂O₂ behandelten Zellen.

Es wurde keine quantitative Analyse durchgeführt, da pro Bedingung lediglich eine Probe vorlag. Ziel war es, unter gleichen Bedingungen die Anzahl der Versuche zu erhöhen.

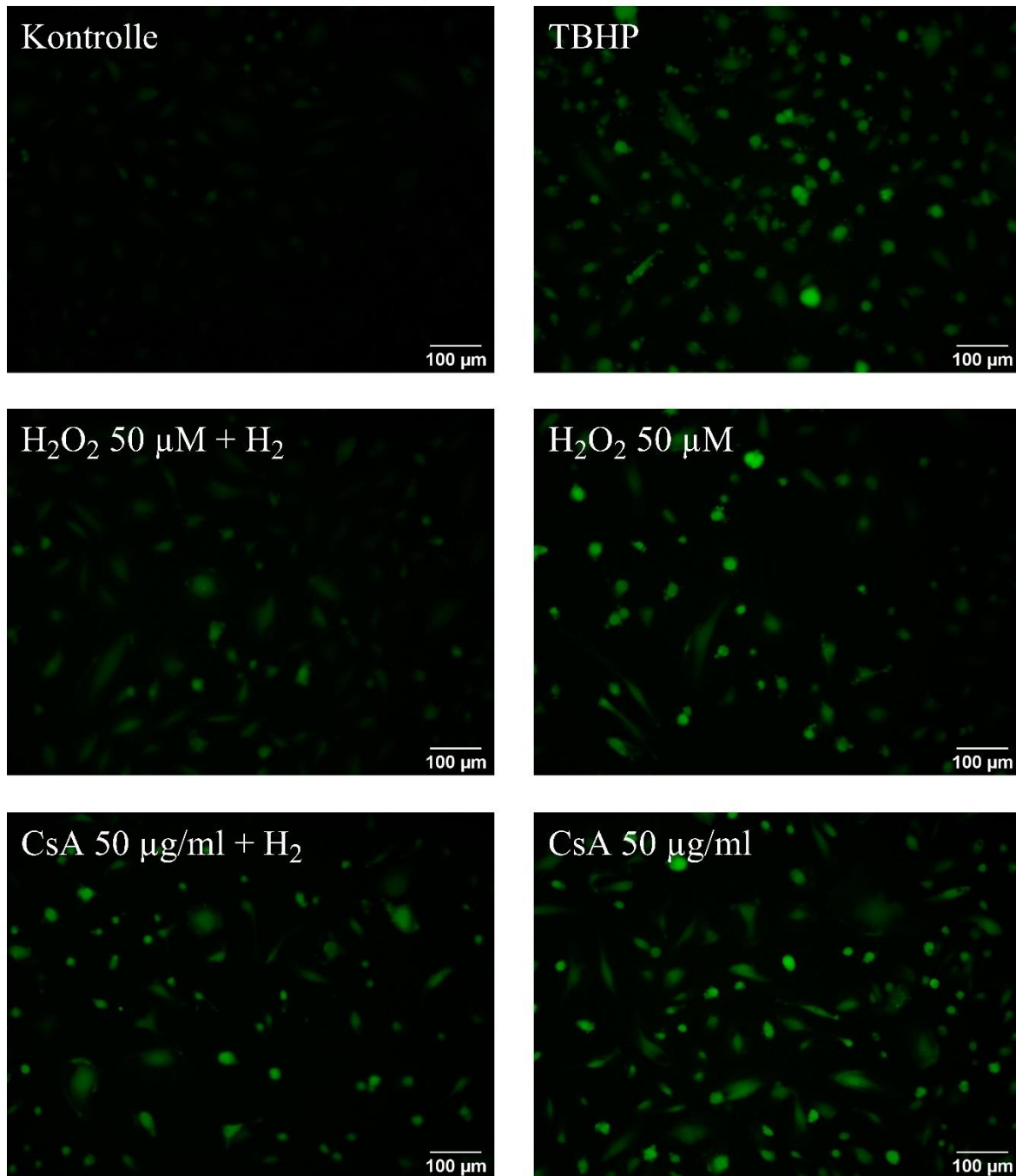


Abbildung 33. ROS-Reduktion mittels H_2 im 24-Well – Versuch 2. Repräsentatives Beispiel der Immunfluoreszenz (ROS-Produktion) detektiert mit DCFDA. Fluoreszenz - Mikroskopie, x40, 24-Well, HUVEC Kultur 2 in Passage 4. Behandlung der zuvor 1 h H_2 -geprägten Zellen mit 50 $\mu\text{g/ml}$ CsA bzw. 50 μM H_2O_2 für 6 h (H_2 - sowie CsA/ H_2O_2 -unbehandelte Zellen als Kontrolle). n = 1 Versuchsreplikat.

Der **Versuch 3** wurde mit identischem Versuchsansatz wiederholt. Weder bei den mit CsA noch bei den mit H_2O_2 behandelten Zellen konnte eine ROS-reduzierende Wirkung durch H_2 festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Demnach waren die Ergebnisse aus Versuch 2 (Abbildung 33) nicht reproduzierbar.

3.3.1.3 Versuch 4

Die Stabilität der H₂-Konzentration im Nährmedium bzw. die ausreichende Kontaktzeit der Zellen mit H₂ war nach wie vor fraglich. Es wurde ein neuer Versuchsansatz gewählt.

Zum Erreichen der höchstmöglichen H₂-Sättigung des Nährmediums wurde die Dauer der Anreicherung des Nährmediums mit H₂ (*siehe 2.6.3*) von bisher 5 auf 7 min erhöht. Um die Kontaktzeit der Zellen mit H₂ zu verlängern, wurde zusätzlich zum H₂-Priming auch das Nährmedium, in dem CsA bzw. H₂O₂ angesetzt wurden, mit H₂ angereichert. Der komplette Versuch war somit durchweg mit H₂-angereichertem Nährmedium durchgeführt worden. Als Negativkontrolle diente erneut ein zusätzlicher Versuchsansatz, indem anstatt H₂-angereichertem Nährmedium lediglich Nährmedium (ohne H₂) verwendet wurde. Des Weiteren wurde dieser Versuch mit Zellen im Zellkultur-Objekträger (OT), anstatt im 24-Well, durchgeführt. Die OT waren mit einem Deckel verschließbar. Durch das vollständige Auffüllen der OT-Kammer (18 ml/OT) mit H₂-Nährmedium sollte gewährleistet werden, dass eine kontinuierliche Diffusion des H₂-Gases aus dem Nährmedium in die Luftsäule über dem Nährmedium verlangsamt wird (*siehe 2.6.2*).

Wie auch in den Versuchen 1 bis 3, in denen die 24-Well-Multischalen für die Dauer der Inkubation im Brutschrank mit Alufolie umwickelt wurden (*siehe 2.6.4*), ist dies auch beim Objekträger erfolgt. Außerdem ist der Objekträger in diesem Versuch zusätzlich in einer Metallbox im Brutschrank platziert worden, mit dem Ziel H₂-Verluste durch Diffusion weiter einzuschränken.

In **Abbildung 34** sind repräsentative Beispiele der Fluoreszenzaufnahmen von Versuch 4 dargestellt. Wie schon in den Versuchen 1 bis 3 und den Versuchen in 3.2.3 bzw. 3.2.4 war die ROS-Induktion mittels CsA bzw. H₂O₂ auch hier erfolgreich. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität bei Behandlung der Zellen mit TBHP, CsA und H₂O₂ im Vergleich zur Kontrolle.

Ein deutlicher H₂-Effekt zeigte sich nur bei 50 µM H₂O₂-Behandlung. Eine H₂-Behandlung, wie oben beschrieben (50 µM H₂O₂ + H₂), führte zu einem deutlichen Rückgang der Fluoreszenzintensität verglichen mit den Zellen ohne H₂-Behandlung (50 µM H₂O₂). Auch für die Zellen, welche mit 50 µg/ml CsA behandelt worden waren, konnte wie schon in Versuch 2 erneut eine leichte ROS-Reduktion mittels H₂ gezeigt werden. Diese fällt jedoch im Vergleich zu H₂O₂ eher gering aus.

Auch hier wurde keine quantitative Analyse durchgeführt.

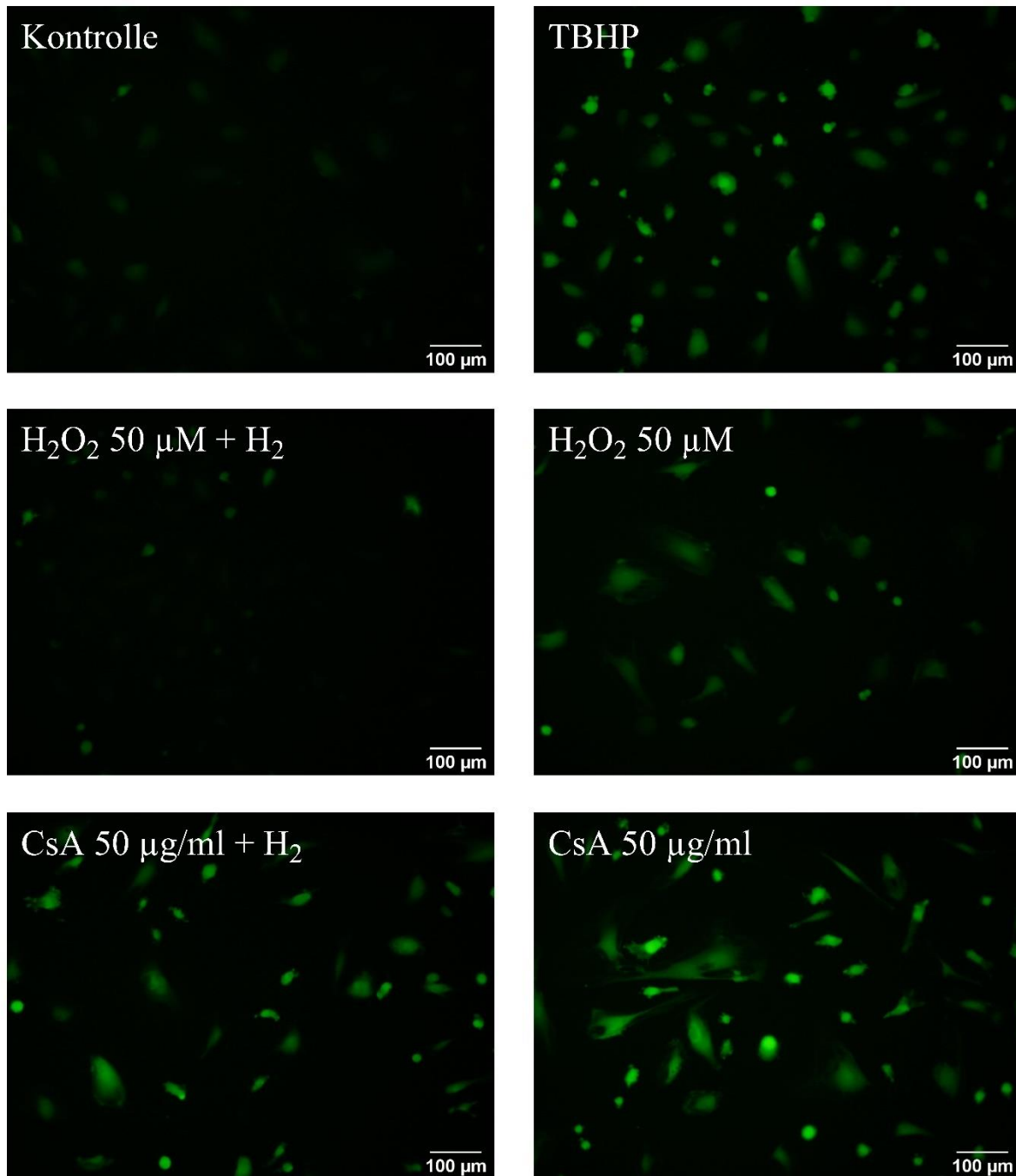


Abbildung 34. ROS-Reduktion mittels H_2 im Objektträger – Versuch 4. Repräsentatives Beispiel der Immunfluoreszenz (ROS-Produktion) detektiert mit DCFDA. Fluoreszenz - Mikroskopie, x40, Objektträger, HUVEC Kultur 2 in Passage 5. Behandlung der zuvor 1 h H_2 -geprimten Zellen mit 50 $\mu\text{g/ml}$ CsA bzw. 50 μM H_2O_2 in H_2 -angereichertem Nährmedium für 6 h (H_2 - sowie CsA/ H_2O_2 -unbehandelte Zellen als Kontrolle). n = 1 Versuchsreplikat.

Zusammenfassend konnte unter den gegebenen Kulturbedingungen in 2 der 4 Versuche eine ROS-Reduktion mittels H_2 bei Behandlung der Zellen mit H_2O_2 sowie mit CsA beobachtet werden.

3.3.2 H₂-Stabilität im Nährmedium

In den Versuchen zur ROS-Reduktion mittels H₂ (*siehe 3.3.1*) stand oftmals die Vermutung einer zu geringen H₂-Konzentration im Nährmedium bzw. die Optimierung der Versuche zur Verringerung von H₂-Verlusten durch Diffusion im Mittelpunkt. Die H₂-Stabilität im Nährmedium und deren Erhalt spielt somit eine wichtige Rolle und stellt eine zentrale Herausforderung bei der Arbeit mit H₂ dar.

Die Ergebnisse der Untersuchung zur H₂-Stabilität im Nährmedium sind nachfolgend beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung des Versuchsablaufs sowie der verwendeten Messmethodik ist in Kapitel 2.6.5 zu finden.

In **Abbildung 35 A** ist die Veränderung der H₂-Konzentration im frisch zubereiteten H₂-Nährmedium vor und nach Überführung in die T25 Zellkulturflaschen zu sehen. Frisch zubereitetes H₂-Nährmedium enthielt 1,57 mg/L H₂ (**Abbildung 35 A, a** (0 min)). Durch Überführen des Nährmediums in die T25 Zellkulturflaschen ist es bereits zu einem signifikanten Abfall der H₂-Konzentration im verbliebenen Restmedium (**Abbildung 35 A, b** (2 min), $P < 0,0001$) gekommen.

Abbildung 35 B stellt den zeitlichen Verlauf der H₂-Stabilität im Nährmedium innerhalb der T25 Zellkulturflaschen dar. Die Konzentration sank nach 30 min bei vollständig gefüllter T25 auf 58 % des Ausgangssättigungsniveaus ab. Bei halb gefüllter T25 sank die Konzentration sogar auf 21 %. Nach 1 h konnten in der vollständig gefüllten T25 noch 56 %, in der halb gefüllten T25 hingegen lediglich noch 11 % gelöstes H₂ im Nährmedium nachgewiesen werden. Nach 2 h verbleiben bei vollständig gefüllter T25 noch 39 % H₂ im Nährmedium. Zum gleichen Messzeitpunkt ist in der zur Hälfte gefüllten T25 bereits kein gelöstes H₂ mehr nachweisbar.

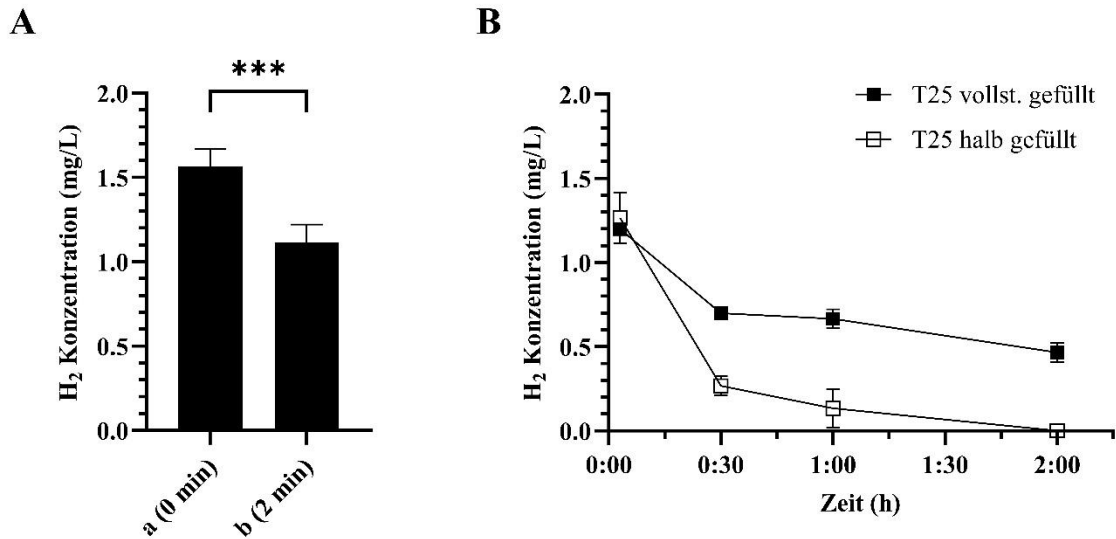


Abbildung 35. Zeitlicher Verlauf der H₂-Stabilität im Nährmedium. **A** H₂-Konzentration im frisch zubereiteten H₂-Nährmedium vor (a, n = 6 Versuchsreplikate) und nach (b, n = 7 Versuchsreplikate) Überführung in T25 Zellkulturflaschen. Mittelwerte aus den Daten aller Versuchsreplikate erstellt. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung. Statistische Auswertung mittels ungepaarter T-Test. **B** zeitlicher Verlauf der H₂-Konzentration im Nährmedium innerhalb der T25 Zellkulturflasche für jeweils vollständig (n = 3 Versuchsreplikate je Messzeitpunkt) und halb gefüllte T25 (n = 3 Versuchsreplikate je Messzeitpunkt). Mittelwerte aus den Daten aller Versuchsreplikate erstellt. Fehlerbalken zeigen die berechnete Standardabweichung.

Zusammengefasst sind durch Überführen des H₂-angereicherten Nährmediums, von einem Kulturgefäß in ein anderes, bereits signifikante H₂-Verluste beobachtet worden. Ebenfalls hat der Füllstand und das daraus resultierende Volumen der Luftsäule über dem Nährmedium innerhalb eines Kulturgefäßes einen entscheidenden Einfluss auf die H₂-Stabilität im Nährmedium. H₂ liegt demnach in einem vollständig gefüllten Gefäß (kleines Volumen der Luftsäule über dem Nährmedium) länger im Nährmedium gelöst vor als in einem halb gefüllten Gefäß mit entsprechend größerem Volumen der Luftsäule.

Demnach würden sich für weiterführende Experimente zur ROS-Reduktion mittels H₂ verschleißbare und somit vollständig mit Nährmedium befüllbare Kulturgefäße anbieten. Ein Beispiel für ein solches Kulturgefäß ist der Zellkultur-Objektträger, welcher bereits in Versuch 4 in den Untersuchungen zur ROS-Reduktion mittels H₂ verwendet wurde (*siehe 3.3.1.3*).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass H_2O_2 und CsA bei HUVEC eine dosisabhängige ROS-Produktion auslösen können. Diese Reaktion kann durch ein Priming der Zellen mit H_2 -angereichertem Nährmedium reduziert werden.

4.1 CsA zeigt nur einen minimalen zytotoxischen Effekt auf HUVEC

Um auszuschließen, dass es sich bei der Untersuchung zum oxidativen Stress der Zellen um eine zytotoxische Wirkung der Medikamente handelt, wurde vorab die dosisabhängige Wirkung von CsA auf die Vitalität der Zellen getestet. Dazu wurde der MTS-Test verwendet, ein einfacher und homogener kalorimetrischer Assay, der die Stoffwechselleistung der behandelten Zellen bestimmt und im 96-well-Maßstab einen hohen Probendurchsatz erlaubt (124). Es wird ihm sogar eine höhere Sensitivität als dem üblichen MTT-Test nachgesagt (156). Bekannt ist dieser Test bei der Prüfung auf Zytotoxizität gemäß DIN EN ISO 10993-5 und stellt damit eines der wichtigsten Prüfverfahren im Rahmen der biologischen Beurteilung von Medizinprodukten dar (157). Zudem wird es mit derartigen Testverfahren möglich, ein zytotoxisches Screening verschiedener Wirkstoffe durchzuführen und deren Dosisabhängigkeit darzustellen (158,159).

Eine Standardisierung des MTS-Testes zur Untersuchung der Zytotoxizität von CsA auf HUVEC war nur bedingt möglich. Die Stoffwechselleistung der Zellen hängt von der ausgesäten Zellzahl und der Kultivierungszeit ab. Je höher die Zelldichte im 96-well und je länger inkubiert wird, desto höher sollte die MTS-Reaktion sein. Allerdings wird die Reaktion von der Kulturfläche begrenzt, da HUVEC als Monolayer wachsen und damit das Zellwachstum beschränkt wird (160). Zudem war auffallend, dass sich die absolute MTS-Reaktion (optische Dichte) bei unabhängigen Versuchen und bei Verwendung unterschiedlicher HUVEC-Kulturen deutlich unterscheidet. Bei HUVEC handelt es sich um Primärzellen aus Humanmaterial, die erfahrungsgemäß nach dem Auftauen ein unterschiedliches Kultivierungsbild zeigen. Um die Zytotoxizität von CsA auf HUVEC darzustellen, wurde daher immer auf die unbehandelte Kontrolle, die die maximale Stoffwechselleistung der Zellen widerspiegelt, bezogen.

Von entscheidender Bedeutung für diese Testungen war die Wirkung der Restmenge an DMSO im Nährmedium. DMSO ist ein bekanntes Lösungsmittel für schwerlösliche polare und unpolare Moleküle (161). Allerdings ist DMSO auch ein starkes Zellgift und ist nach Herstellerangaben nur bei Konzentrationen von <10 % nicht zytotoxisch. CsA musste aufgrund seiner geringen Löslichkeit in Wasser (20-40 µg/ml) in DMSO (Löslichkeit, 100.000 µg/ml) angesetzt werden (162–167). Durch die Verdünnung im Nährmedium auf maximal 100 µg/ml CsA verblieb maximal 0,5 % DMSO im Nährmedium. In der Literatur wird i. d. R. mit Restmengen zwischen 0,1-0,5 % DMSO gearbeitet. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Wirkung von DMSO von Versuchsbedingungen und Zelltyp abhängig sein kann (168). In menschlichen Endothelzellen wurde bis zu einer DMSO-Konzentration von 1 % keine toxische Wirkung festgestellt (169). Dies wurde in der vorliegenden Studie mit HUVEC bestätigt. Somit handelt es sich bei der Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von CsA um einen Medikamenteneffekt.

Bei einer 8-stündigen Inkubationszeit von CsA mit HUVEC zeigte sich bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml keine zytotoxische Wirkung. Lediglich bei 75 bzw. 100 µg/ml CsA wurde eine Reduzierung der Zell-Vitalität auf 91 % bzw. 83 % ermittelt. Auch nach 24 h war die Vitalität der Endothelzellen bei höchster CsA-Dosis nur leicht beeinträchtigt (88 %), was aus der berechneten Apoptoserate der ausgewerteten DCFDA-Fluoreszenzaufnahmen hervorgeht.

Die hohen CsA-Konzentrationen im Nährmedium (50-100 µg/ml) erscheinen aufgrund der schlechten Löslichkeit von CsA in wässrigen Medien (20-40 µg/ml, *siehe oben*) fraglich. Allerdings war zusätzlich eine Restmenge von 0,5 % DMSO im Medium vorhanden. Ob diese jedoch ausreicht, um CsA im Medium komplett zu lösen, bleibt offen. Die für diese Arbeit hergestellten CsA-Lösungen stellten sich stets selbst bei der höchsten Konzentration als klar und ohne jegliche Eintrübung dar, weshalb zu keinem Zeitpunkt ein Hinweis auf eine reduzierte Löslichkeit von CsA im Nährmedium bestand. Andere Autoren verwendeten CsA als gebrauchsfertiges Medikament (Sandimmune) zur Herstellung der CsA-Lösungen (170,171). Dabei handelt es sich um eine selbstemulgierende Formulierung (172), womit als Infusionslösung eine CsA-Konzentration von 2,5 mg/ml in Wasser möglich ist (173).

Analog zu den vorliegenden Daten, war auch in anderen Studien bei niedrigen CsA-Konzentrationen und langen Inkubationszeiten keine zytotoxische Wirkung auf HUVEC nachweisbar (174–176). Bei hohen Konzentrationen liegen unterschiedliche

Studienergebnisse für Endothelzellen vor. Voss et. al. konnten keine Zellschädigung nach 8 h mit 0,1-100 µg/ml CsA feststellen, während die Prostacyclinfreisetzung signifikant und konzentrationsabhängig reduziert war (170). Diese Studie bestätigt unsere Ergebnisse und zeigt damit insgesamt eine hohe Widerstandsfähigkeit von HUVEC gegenüber CsA-induzierter Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu stehen Studien, in denen nach 24-stündiger Behandlung von HUVEC Apoptoseraten von bis zu 55 % beim Einsatz von 22-100 µg/ml CsA beobachtet wurden (177,178). Die diskrepante Studienlage könnte auf unterschiedliche Kulturbedingungen zurückzuführen sein.

Im Gegensatz zu Endothelzellen zeigten Fibroblasten bei CsA-Behandlung eine deutlich höhere Zytotoxizität. Bereits ab einer Konzentration von 1 µg/ml CsA und einer 8-stündigen Inkubationszeit, nahm die Zellzahl und die Stoffwechselleistung von Rattenlungenfibroblasten signifikant ab (119). Menschliche Fibroblasten sind offensichtlich noch empfindlicher (zytotoxischer Effekt ab 0,5 µg/ml CsA nach 24 h) (120).

Sollten sich die in dieser Arbeit gesammelten *in-vitro*-Ergebnisse bestätigen, würde in Endothelzellen mindestens eine 20- bis 40-fach höhere CsA-Dosis als in Fibroblasten vonnöten sein, um eine signifikante Abnahme der Zell-Vitalität zu bewirken. Demnach würden sich Endothelzellen deutlich resistenter gegenüber CsA-induzierter Zytotoxizität verhalten als Fibroblasten.

4.2 Oxidativer Stress bei HUVEC konnte mit H₂O₂ und CsA ausgelöst werden

In der vorliegenden Arbeit konnte weder mit TNF- α noch LPS oxidativer Stress bei HUVEC ausgelöst werden. Trotz vergleichbarer Konzentrationen und Behandlungszeiten standen unsere Ergebnisse damit im Gegensatz zu anderen *in-vitro*-Studien. So konnten für TNF- α -Konzentrationen von 10-50 ng/ml mit Behandlungszeiten von 6-24 h signifikante ROS-Anstiege beobachtet werden (179–185). Bezüglich LPS existiert eine ähnliche Studienlage. Ab einer LPS-Konzentration von 0,1 µg/ml nach 24 h ist bereits eine ROS-Induktion in HUVEC beschrieben (186). Gleiches gilt für 1-10 µg/ml LPS nach 6-24 h (130,132,186–190). Aus unserer Sicht gibt es für diese gegensätzlichen Resultate keine schlüssige Erklärung. U. U. könnten unterschiedliche Kulturbedingungen vorliegen. Für die Aktivität von TNF- α und

LPS standen keine Positivkontrollen zur Verfügung. Eine Option hierfür wäre die konzentrationsabhängige Expression von membranständigen Adhäsionsmolekülen (z.B. E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1) (132,181,182,185,188,191–193).

Ein typischer ROS-Induktor zur Erzeugung von oxidativem Stress in HUVEC ist H₂O₂ (194). Bei H₂O₂ handelt es sich um einen chemischen Katalysator mit einem breiten Anwendungsspektrum (195). In biologischen Systemen ist H₂O₂ mit DNA-Schädigung, Mutationen sowie genetischer Instabilität und dadurch mit Apoptose assoziiert (196).

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels 50 und 100 µM H₂O₂ sowohl nach 6- als auch nach 24-stündiger Behandlung oxidativer Stress in HUVEC erzeugt werden. Dies stimmt mit den Angaben aus der Literatur überein, wo ebenfalls bereits ab 50 µM H₂O₂ nach 6 h oxidativer Stress in HUVEC erzeugt werden konnte (197). Auch für 100 µM H₂O₂ ist dies für verschiedene Behandlungszeiten von 1-24 h mehrfach gezeigt worden (197–202).

Für CsA ist die Induktion von oxidativem Stress in verschiedenen Geweben und HUVEC bekannt (97,98,120,137,138). Dies konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. In unseren Untersuchungen konnte mittels CsA nach 6 sowie 24 h ab einer Konzentration von 50 µg/ml oxidativer Stress in HUVEC nachgewiesen werden. Mit 10 µg/ml CsA wurde hingegen keine ROS-Induktion beobachtet.

Auch die Arbeitsgruppe von Longoni et. al. (1999) hat für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen akutem bzw. chronischem oxidativem Stress und der Bcl-2-Expression in HUVEC hohe CsA-Konzentrationen (bis zu 240 µg/ml) eingesetzt (171). Dabei konnte analog zu unseren Ergebnissen ab einer CsA-Konzentration von 48 µg/ml eine sichtbare ROS-Induktion festgestellt werden. Jedoch wurden diese Ergebnisse bei einer CsA-Behandlungszeit von lediglich 15-50 min beobachtet, was stark von unserem Studiendesign abweicht. Daten der Studie zur zytotoxischen Wirkung von CsA auf HUVEC in niedrigen Konzentrationen bestätigen unsere Ergebnisse (*siehe 4.1*), da bei CsA-Behandlung für 8 Tage mit 3 µg/ml CsA keine zytotoxische Wirkung festgestellt wurde. Eine zytotoxische Wirkung von CsA im Konzentrationsbereich zwischen 9,6-96 µg/ml wurde allerdings nicht untersucht. Somit kann nicht differenziert werden, ob die gezeigte ROS-Induktion ab 48 µg/ml CsA, Medikamenten- oder Apoptose-induziert war, weshalb die Ergebnisse der Studie kritisch zu betrachten sind. Nach unserem aktuellen Kenntnisstand existieren keine weiteren experimentellen Studien zur ROS-Induktion in HUVEC mit hohen CsA-Konzentrationen. Im

Gegensatz zu unseren Ergebnissen stehen Untersuchungen von Krötz et. al. (2007), in welchen bereits ab 0,12 µg/ml CsA für 6 und 24 h jeweils ein signifikanter ROS-Anstieg bei HUVEC zu erkennen war (203). Außerdem zeigten humane umbilikale arterielle Endothelzellen (HUAEC), die für 3 bzw. 6 h mit 1 und 10 µg/ml CsA behandelt wurden, einen signifikanten Anstieg der Superoxidbildung (204). Weiterhin führte eine einstündige Behandlung von bovinen Aortenendothelzellen mit 1,2 µg/ml CsA zu einer signifikanten Verdopplung der ROS-Synthese (205). Über die Gründe für die widersprüchlichen Studienergebnisse kann nur spekuliert werden. Eine Erklärung wären wiederum unterschiedliche Kulturbedingungen. Weiterhin muss auch die eingeschränkte Löslichkeit von CsA im Medium (*siehe 4.1*) berücksichtigt werden.

Im Gegensatz zu HUVEC reagieren Fibroblasten deutlich sensitiver auf CsA. So konnte unsere Arbeitsgruppe in einer vorangegangenen Studie zeigen, dass in Rattenlungenfibroblasten bereits ab 0,25-0,5 µg/ml CsA (8 h) oxidativer Stress erzeugt werden kann (119). Von sogar leicht niedrigeren CsA-Dosen bei menschlichen Fibroblasten (des Zahnfleisches) berichten Lee et. al. (2013) und Chin et. al. (2021), in deren Studien ab 0,2 µg/ml (120) bzw. ab 0,1 µg/ml CsA (206) eine ROS-Induktion beobachtet werden konnte. Die CsA-Dosis-Schwankungen in diesen Fibroblasten-Studien sind möglicherweise auf die unterschiedlich untersuchten Organe (Zahnfleisch/Lunge) oder auf die unterschiedliche Herkunft der Fibroblasten (Mensch/Ratte) zurückzuführen.

Zelltyp-spezifische Unterschiede werden vielfach in der Literatur beschrieben. So zeigen Endothelzellen und Fibroblasten auch bei der Behandlung mit anderen äußeren Stimuli bzw. Reagenzien als CsA ein unterschiedliches Reaktionsverhalten. So wurden in einer Studie unterschiedliche Auswirkungen von ionisierender Strahlung auf Fibroblasten und mikrovaskuläre Endothelzellen aus der menschlichen Haut unter anderem im Hinblick auf Zellzahl, Proliferation und Caspase 3/7 vermittelte Apoptose beobachtet (207). Slany et. al. (2016) stimulierten primäre menschliche Endothelzellen und Fibroblasten mit Interleukin 1-β und untersuchten die sekretierten zytoplasmatischen und nukleären Proteinfractionen. Dabei stellten sie fest, dass sich die Verarbeitung von Interleukin 1-β und die Interferon-Antwort zwischen den untersuchten Zellen erheblich unterschied. Zudem verwendeten die Zellen für ähnliche entzündungsbezogene Aufgaben unterschiedliche Proteinsätze (208). Weiterhin wurde beschrieben, dass bei der Behandlung von menschlichen Fibroblasten und mikrovaskulären Endothelzellen aus der Lunge mit TBHP, eine höhere Resistenz von

Endothelzellen gegenüber TBHP-induziertem oxidativem Stress vorlag. In Endothelzellen wurde erst bei mehr als der doppelten TBHP-Konzentration eine signifikante ROS-Erhöpfung gemessen (209). Auch in der Studie von Barandalla et.al. (2016) stellten sich HUVEC deutlich widerstandsfähiger als die verwendeten Fibroblasten (hs27 Zellen) dar. Konkret wurde bei einer Behandlung mit H₂O₂ für HUVEC erst bei der 4-fachen H₂O₂-Konzentration, eine signifikante Abnahme der Zell-Vitalität sowie eine Anhäufung von ROS-induzierten peroxidierten Lipiden beobachtet als es bei Fibroblasten der Fall war (210).

Wenn wir von einer genauen Konzentrationsangabe für CsA in den vorliegenden Endothelzell-Versuchen ausgehen, könnte man rückschließen, dass Endothelzellen im Vergleich zu Fibroblasten möglicherweise nicht nur eine erhöhte Resistenz gegenüber CsA-induzierter Zytotoxizität (*siehe 4.1*), sondern auch gegenüber CsA-induziertem oxidativem Stress haben. Dies würde für transplantierte Organe bedeuten, dass der CsA-induzierte oxidative Stress und der daraus abgeleitete vaskuläre Schaden vor allen für Gefäße relevant wäre, wo das Endothel durch immunologische Reaktionen geschädigt wird.

Wie bereits beschrieben, wird eine deutlich höhere CsA-Dosis in Endothelzellen als in Fibroblasten benötigt, um eine signifikante Abnahme der Zell-Vitalität und eine Induktion von oxidativem Stress zu beobachten.

Die CsA-Dosis, welche in der vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe in Fibroblasten oxidativen Stress induzierte, entspricht den gängigen therapeutischen Dosierungen (0,1-0,3 µg/ml CsA) die für Patienten nach HTx und LTx *in-vivo* verwendet werden (81,211–217). In Endothelzellen wurde in der vorliegenden Arbeit, selbst beim 30-fachen der *in vivo* therapeutischen Dosierung kein CsA-induzierter oxidativer Stress nachgewiesen. Die für wenige Stunden direkt nach CsA-Gabe auftretenden maximalen Blutkonzentrationen bei Patienten nach HTx und LTx entsprechen ungefähr 1-1,6 µg/ml CsA (215–223). Damit ist die CsA-Dosis, ab der in Endothelzellen oxidativer Stress induziert wird, mindestens um ein 12- bis 25-faches höher als die maximalen Blutkonzentrationen nach HTx bzw. LTx und somit möglicherweise eine für Patienten toxische Dosis.

Unter der Annahme, dass sich unsere Ergebnisse *in vivo* bestätigen, würde das Endothel somit durch seinen anatomisch bedingten Erstkontakt zur Blutstrombahn eine wichtige Barriere-/Schutzfunktion gegenüber CsA-induzierter Zytotoxizität und CsA-induziertem oxidativen Stress für das restliche Gewebe (unter anderem auch Fibroblasten) und damit für das gesamte

Organ darstellen. Erst bei Verletzung des Endothels würden die CsA-induzierenden Effekte zum Tragen kommen.

4.3 H₂ mit großem Potential als nicht-invasive Therapiemöglichkeit

Es gibt Hinweise darauf, dass ein IRI während der Transplantation die ROS-Konzentration erhöht und damit die Transplantatabstoßung vorantreibt (60,224). Oxidativer Stress im Rahmen des IRI führt zur Zellschädigung (unter anderem auch Endothelschädigung) und Immunreaktion und begünstigt damit die Abstoßungsreaktion (225,226). Wenn sich unsere Ergebnisse bestätigen, könnte CsA, bei geschädigtem Endothel, oxidativen Stress im nun nicht mehr durch das Endothel geschützten dahinterliegenden Gewebe hervorrufen (*siehe* 4.2). Dies und die im Tiermodell gefundenen Hinweise darauf, dass ein geschädigtes Endothel zu einer zusätzlichen Überproduktion von ROS führt (227), könnten die Abstoßungsreaktion noch verstärken.

Die Reduktion des bei der Transplantation entstehenden oxidativen Stresses würde den Entstehungsprozess der chronischen Abstoßungsreaktion deutlich abschwächen. Dadurch könnte die zu verabreichende Menge Immunsuppressiva reduziert werden, was wiederum die mit CsA assoziierten Nebenwirkungen senken würde.

Zur Reduktion des oxidativen Stresses hat sich molekularer Wasserstoff (H₂) als äußerst vielversprechend erwiesen. In zahlreichen Studien am Menschen und in Tiermodellen konnten protektive Effekte unter anderem bei Neurodegeneration, Metabolischem Syndrom, IRI (23,228,229) oder z.B. auch bei entzündungsbedingten Krankheiten wie Asthma und COPD (230–232) nachgewiesen werden. Zudem konnte im Tiermodell bereits die Wirkung von H₂ bei LTx nachgewiesen werden. So wurde mehrfach gezeigt, dass eine H₂-Gabe positive Auswirkungen auf den im Rahmen der LTx entstehenden IRI und damit auf das Outcome nach LTx hat (233–238).

Demnach war der Ansatz, der in dieser Arbeit gewählt wurde, durchaus vielversprechend. Es konnte in unserer Studie eine Reduktion des oxidativen Stresses durch H₂ bei mit H₂O₂- und CsA-behandelten Endothelzellen beobachtet werden. Ein kritischer Faktor in unserem experimentellen Design war der hohe Verlust von H₂ aus dem Nährmedium. An dieser Stelle bedarf es weiterer Forschung zur Verbesserung der Methodik. Einen Ansatz zur Verbesserung

liefern unsere Ergebnisse zur H₂-Stabilität im Nährmedium. Aus denen geht hervor, dass nach 2 h in einem halb gefüllten Kulturgefäß (und damit einer hohen Luftsäule über dem Medium) kein gelöstes H₂ im Nährmedium mehr nachweisbar war, wohingegen durch vollständige Füllung des Kulturgefäßes H₂-Verluste signifikant reduziert werden konnten (39 % gelöstes H₂ im Nährmedium nach 2 h).

Neben der oben erwähnten nachweislichen Wirkung von H₂ ist außerdem bekannt, dass H₂ selbst bei hohen Konzentrationen sicher in der Anwendung ist (239,240) und beim Menschen keine Auswirkungen auf physiologische Parameter wie Temperatur, Blutdruck, pH-Wert oder Sauerstoffsättigung des Blutes hat (241). Die Möglichkeiten der Verabreichung von H₂ in Tiermodellen und klinischen Studien am Menschen ist vielfältig: Inhalation von H₂-Gas, Trinken von H₂-angereichertem Wasser, Injektion von H₂-angereicherten Infusionslösungen (242), Augentropfen (243) oder Baden in wasserstoffreichem Wasser (244). Es existieren bereits Geräte zur Inhalation von H₂ (245–248) sowie Methoden zur Herstellung von trinkbarem H₂-angereichertem Wasser und H₂-angereicherten Infusionslösungen (245). Zudem sind neue Materialien und Methoden zur Herstellung von H₂ mit einer Vielzahl von Anwendungen in der Entwicklung (249). Darunter z.B. H₂-beladene Mikrobläschen zur Verhinderung von Ischämie-Reperfusionsschäden am Myokard (250). Sano et al. (2021) entwickeln Verabreichungssysteme für praktische klinische Anwendungen (113), unter anderem ein bei Organtransplantationen einsetzbares portables Gerät zur schnellen Herstellung von H₂-reichen Organkonservierungslösungen um die Organfunktion nach der Transplantation zu verbessern (251).

Somit zeigt H₂ großes Potential für verschiedene medizinische Anwendungen in unterschiedlichen Bereichen (101) und könnte auch als nicht-invasive Therapiemöglichkeit bei Organtransplantationen fungieren (118).

4.4 Limitationen dieser Arbeit

Eine Limitation der Arbeit war die kleine Fallzahl bei den Behandlungen. Besondere Bedeutung hat dabei die rechnerisch hohe CsA-Konzentration, die aufgrund der eingeschränkten Löslichkeit von CsA in wässrigen Medien nicht möglich erscheint.

Als weitere Limitation ist die gewählte Methodik zur Zellfärbung mit DCFDA zu nennen. Es wurden stets die immer gleichen Abläufe und auch Well-Reihenfolge beim Anfertigen der Fluoreszenzaufnahmen eingehalten. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass geringe zeitliche Schwankungen bei der Herstellung der Farbstoffmischung und dem anschließenden Anfertigen der Fluoreszenzaufnahmen, zu leichten Fluoreszenzintensitäts-Schwankungen zwischen den Versuchen geführt haben. Der Farbstoff zeigt ein hohes Bleaching.

Weiterhin ist es nicht gelungen, die protektive Wirkung von H₂ im Nährmedium reproduzierbar abzubilden. Problematisch war dabei die vorhandene Hardware, die es verhinderte, dass H₂ reproduzierbar im Medium gehalten werden konnte.

5 Zusammenfassung

Zielsetzung: Das Langzeitüberleben von Patienten nach Lungentransplantation (LTx) ist oft durch die Entstehung einer chronischen Abstoßungsreaktion (CLAD) limitiert. Eine Schädigung des Gefäßendothels sowie oxidativer Stress, generiert durch eine Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), sind maßgeblich am Entstehungsprozess der CLAD beteiligt. Das zur Verhinderung der CLAD eingesetzte Immunsuppressivum Cyclosporin A (CsA) ist durch eine Induktion von ROS im Endothel mit endothelialer Dysfunktion und somit weiterer Transplantatschädigung assoziiert. Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Untersuchung einer möglichen CsA-induzierten Zytotoxizität und eines CsA-induziertem oxidativem Stress in Endothelzellen sowie dessen Reduktion durch antioxidativ wirkenden molekularen Wasserstoff (H_2).

Methoden: Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) dienten als Zellmodell der durchgeführten *in-vitro*-Versuche. Zytotoxische Effekte von CsA wurden mittels MTS – Zell-Vitalitäts-Test untersucht. 2,7-Dichlorodihydrofluorescein Diazetat (DCFDA) Immunfluoreszenzfärbung diente der Detektion von CsA- (und unter anderem Wasserstoffperoxid (H_2O_2)) induziertem oxidativem Stress und dessen Reduktion durch H_2 .

Ergebnisse: Zytotoxische Effekte einer CsA-Behandlung wurden ab 75 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet. Diese waren selbst bei höchster Dosis (100 $\mu\text{g/ml}$) mit 83 % erhaltener Zell-Vitalität eher gering. H_2O_2 und 50-100 $\mu\text{g/ml}$ CsA zeigten eine dosisabhängige Induktion von oxidativem Stress, verursacht durch eine erhöhte Produktion von ROS. Eine Behandlung der Zellen mit H_2 reduzierte die Bildung von H_2O_2 - und CsA-induzierten ROS.

Fazit: Die Ergebnisse demonstrieren eine CsA-induzierte Zytotoxizität und CsA-induzierten oxidativen Stress in Endothelzellen. Die dafür notwendige Dosis lag allerdings weit über der üblicherweise verwendeten CsA-Dosis für Patienten nach LTx. Somit könnte das Endothel durch seinen anatomisch bedingten Erstkontakt zur Blutstrombahn eine wichtige Schutzfunktion für das Transplantat gegenüber CsA-induzierter Schädigung darstellen. Darüber hinaus besitzt H_2 durch seine gezeigte antioxidative Wirkung großes Potential als nicht-invasive Therapiemöglichkeit der CLAD.

6 Literaturverzeichnis

1. HARDY JD, ERASLAN S, WEBB WR. TRANSPLANTATION OF THE LUNG. *Ann Surg.* 1964;160(3):440–8. doi:10.1097/00000658-196409000-00008 Cited in: PubMed; PMID 14206849.
2. Cooper JD. Herbert Sloan lecture. Lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1989;47(1):28–44. doi:10.1016/0003-4975(89)90229-4 Cited in: PubMed; PMID 2643406.
3. Michel SG, Hagl C, Kauke T, Kneidinger N, Schneider C. Lungentransplantation: aktueller Stand und Entwicklungen [Lung transplantation: current situation and developments]. *Chirurgie (Heidelb).* 2024. ger. doi:10.1007/s00104-023-02023-4 Cited in: PubMed; PMID 38191810.
4. Venuta F, van Raemdonck D. History of lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2017;9(12):5458–71. doi:10.21037/jtd.2017.11.84 Cited in: PubMed; PMID 29312756.
5. Perch M, Hayes D, Cherikh WS, Zuckermann A, Harhay MO, Hsich E, Potena L, Sadavarte A, Lindblad K, Singh TP, Stehlik J. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-ninth adult lung transplantation report-2022; focus on lung transplant recipients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Heart Lung Transplant.* 2022;41(10):1335–47. doi:10.1016/j.healun.2022.08.007 Cited in: PubMed; PMID 36050206.
6. Singh TP, Cherikh WS, Hsich E, Lewis A, Perch M, Kian S, Hayes D, Potena L, Stehlik J, Zuckermann A, Cogswell R. Graft survival in primary thoracic organ transplant recipients: A special report from the International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2023;42(10):1321–33. doi:10.1016/j.healun.2023.07.017 Cited in: PubMed; PMID 37549773.
7. Egeci T, Unek T, Agalar C, Ozbilgin M, Derici S, Cevlik AD, Akarsu M, Ellidokuz H, Astarcioglu I. Survival Outcomes After Liver Transplantation in Elderly Patients: A Single-Center Retrospective Analysis. *Transplant Proc.* 2019;51(4):1143–6. doi:10.1016/j.transproceed.2019.01.090 Cited in: PubMed; PMID 31101188.
8. Poggio ED, Augustine JJ, Arrigain S, Brennan DC, Schold JD. Long-term kidney transplant graft survival-Making progress when most needed. *Am J Transplant.* 2021;21(8):2824–32. doi:10.1111/ajt.16463 Cited in: PubMed; PMID 33346917.
9. Yoshiyasu N, Sato M. Chronic lung allograft dysfunction post-lung transplantation: The era of bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome. *World J Transplant.* 2020;10(5):104–16. doi:10.5500/wjt.v10.i5.104 Cited in: PubMed; PMID 32864356.
10. Verleden GM, Glanville AR, Lease ED, Fisher AJ, Calabrese F, Corris PA, Ensor CR, Gottlieb J, Hachem RR, Lama V, Martinu T, Neil DAH, Singer LG, Snell G, Vos R. Chronic lung allograft dysfunction: Definition, diagnostic criteria, and approaches to treatment-A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant.* 2019;38(5):493–503. doi:10.1016/j.healun.2019.03.009 Cited in: PubMed; PMID 30962148.

11. Sato M. Chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation: the moving target. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;61(2):67–78. doi:10.1007/s11748-012-0167-3 Cited in: PubMed; PMID 23138970.
12. Glanville AR, Verleden GM, Todd JL, Benden C, Calabrese F, Gottlieb J, Hachem RR, Levine D, Meloni F, Palmer SM, Roman A, Sato M, Singer LG, Tokman S, Verleden SE, Thüsen J v. d., Vos R, Snell G. Chronic lung allograft dysfunction: Definition and update of restrictive allograft syndrome-A consensus report from the Pulmonary Council of the ISHLT. *J Heart Lung Transplant*. 2019;38(5):483–92. doi:10.1016/j.healun.2019.03.008 Cited in: PubMed; PMID 31027539.
13. Verleden SE, Thüsen J v. d., Roux A, Brouwers ES, Braubach P, Kuehnel M, Laenger F, Jonigk D. When tissue is the issue: A histological review of chronic lung allograft dysfunction. *Am J Transplant*. 2020;20(10):2644–51. doi:10.1111/ajt.15864 Cited in: PubMed; PMID 32185874.
14. Sato M. Bronchiolitis obliterans syndrome and restrictive allograft syndrome after lung transplantation: why are there two distinct forms of chronic lung allograft dysfunction? *Ann Transl Med*. 2020;8(6):418. doi:10.21037/atm.2020.02.159 Cited in: PubMed; PMID 32355862.
15. Royer P-J, Olivera-Botello G, Koutsokera A, Aubert J-D, Bernasconi E, Tissot A, Pison C, Nicod L, Boissel J-P, Magnan A. Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Systematic Review of Mechanisms. *Transplantation*. 2016;100(9):1803–14. doi:10.1097/TP.0000000000001215 Cited in: PubMed; PMID 27257997.
16. Madill J, Aghdassi E, Arendt B, Hartman-Craven B, Gutierrez C, Chow C-W, Allard J. Lung transplantation: does oxidative stress contribute to the development of bronchiolitis obliterans syndrome? *Transplant Rev (Orlando)*. 2009;23(2):103–10. doi:10.1016/j.trre.2009.01.003 Cited in: PubMed; PMID 19298941.
17. Canton M, Sánchez-Rodríguez R, Spera I, Venegas FC, Favia M, Viola A, Castegna A. Reactive Oxygen Species in Macrophages: Sources and Targets. *Front Immunol*. 2021;12734229. doi:10.3389/fimmu.2021.734229 Cited in: PubMed; PMID 34659222.
18. Jaramillo A, Fernández FG, Kuo EY, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. Immune mechanisms in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Pediatr Transplant*. 2005;9(1):84–93. doi:10.1111/j.1399-3046.2004.00270.x Cited in: PubMed; PMID 15667618.
19. Elssner A, Vogelmeier C. The role of neutrophils in the pathogenesis of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2001;3(3):168–76. doi:10.1034/j.1399-3062.2001.003003168.x Cited in: PubMed; PMID 11493399.
20. Bos S, Filby AJ, Vos R, Fisher AJ. Effector immune cells in chronic lung allograft dysfunction: A systematic review. *Immunology*. 2022;166(1):17–37. doi:10.1111/imm.13458 Cited in: PubMed; PMID 35137398.
21. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. 2012;5(1):9–19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613 Cited in: PubMed; PMID 23268465.

22. Walters DM, Cho H-Y, Kleeberger SR. Oxidative stress and antioxidants in the pathogenesis of pulmonary fibrosis: a potential role for Nrf2. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(2):321–32. doi:10.1089/ars.2007.1901 Cited in: PubMed; PMID 17999635.
23. Ohta S. Molecular hydrogen as a preventive and therapeutic medical gas: initiation, development and potential of hydrogen medicine. *Pharmacol Ther*. 2014;144(1):1–11. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.04.006 Cited in: PubMed; PMID 24769081.
24. Bezerra FS, Lanzetti M, Nesi RT, Nagato AC, Silva CPe, Kennedy-Feitosa E, Melo AC, Cattani-Cavaliere I, Porto LC, Valenca SS. Oxidative Stress and Inflammation in Acute and Chronic Lung Injuries. *Antioxidants*. 2023;12(3):548. doi:10.3390/antiox12030548
25. Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc)*. 2002;67(3):281–92. doi:10.1023/a:1014819832003 Cited in: PubMed; PMID 11970728.
26. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1-3):222–39. doi:10.1016/j.ejphar.2005.12.087 Cited in: PubMed; PMID 16500642.
27. Soodaeva S, Kubysheva N, Klimanov I, Nikitina L, Batyrshin I. Features of Oxidative and Nitrosative Metabolism in Lung Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;20191–12. doi:10.1155/2019/1689861
28. Williams A, Riise GC, Anderson BA, Kjellström C, Scherstén H, Kelly FJ. Compromised antioxidant status and persistent oxidative stress in lung transplant recipients. *Free Radic Res*. 1999;30(5):383–93. doi:10.1080/10715769900300421 Cited in: PubMed; PMID 10342331.
29. Riise GC, Williams A, Kjellström C, Schersten H, Andersson BA, Kelly FJ. Bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients is associated with increased neutrophil activity and decreased antioxidant status in the lung. *Eur Respir J*. 1998;12(1):82–8. doi:10.1183/09031936.98.12010082 Cited in: PubMed; PMID 9701419.
30. Reid D, Snell G, Ward C, Krishnaswamy R, Ward R, Zheng L, Williams T, Walters H. Iron overload and nitric oxide-derived oxidative stress following lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20(8):840–9. doi:10.1016/s1053-2498(01)00282-0 Cited in: PubMed; PMID 11502406.
31. Suesskind-Schwendi M v., Heigel E, Pfaehler S, Haneya A, Schmid C, Hirt SW, Lehle K. Protective function of pirfenidone and everolimus on the development of chronic allograft rejection after experimental lung transplantation. *Histol Histopathol*. 2016;31(7):793–805. doi:10.14670/HH-11-712 Cited in: PubMed; PMID 26707547.
32. Pugh C, Hathwar V, Richards JH, Stonehuerner J, Ghio AJ. Disruption of iron homeostasis in the lungs of transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(11):1821–7. doi:10.1016/j.healun.2005.03.016 Cited in: PubMed; PMID 16297788.
33. Mallol J, Aguirre V, Espinosa V. Increased oxidative stress in children with post infectious Bronchiolitis Obliterans. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2011;39(5):253–8. doi:10.1016/j.aller.2010.09.003 Cited in: PubMed; PMID 21208718.

34. Lu F, Zander DS, Visner GA. Increased expression of heme oxygenase-1 in human lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2002;21(10):1120–6. doi:10.1016/s1053-2498(02)00423-0 Cited in: PubMed; PMID 12398878.
35. Behr J, Maier K, Braun B, Schwaiblmair M, Vogelmeier C. Evidence for oxidative stress in bronchiolitis obliterans syndrome after lung and heart-lung transplantation. The Munich Lung Transplant Group. *Transplantation*. 2000;69(9):1856–60. doi:10.1097/00007890-200005150-00020 Cited in: PubMed; PMID 10830222.
36. Aguilar PR, Michelson AP, Isakow W. Obliterative Bronchiolitis. *Transplantation*. 2016;100(2):272–83. doi:10.1097/TP.0000000000000892 Cited in: PubMed; PMID 26335918.
37. Lin CM, Zamora MR. Update on Bronchiolitis Obliterans Syndrome in Lung Transplantation. *Curr Transplant Rep*. 2014;1(4):282–9. doi:10.1007/s40472-014-0030-9 Cited in: PubMed; PMID 32226712.
38. Verleden SE, Sacreas A, Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden GM. Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation. *Chest*. 2016;150(1):219–25. doi:10.1016/j.chest.2016.04.014 Cited in: PubMed; PMID 27212132.
39. Weigt SS, DerHovanessian A, Wallace WD, Lynch JP, Belperio JA. Bronchiolitis obliterans syndrome: the Achilles' heel of lung transplantation. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34(3):336–51. doi:10.1055/s-0033-1348467 Cited in: PubMed; PMID 23821508.
40. Bonnell MR, Visner GA, Zander DS, Mandalapu S, Kazemfar K, Spears L, Beaver TM. Heme-oxygenase-1 expression correlates with severity of acute cellular rejection in lung transplantation. *J Am Coll Surg*. 2004;198(6):945–52. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2004.01.026 Cited in: PubMed; PMID 15194077.
41. Shiraishi T, Kuroiwa A, Shirakusa T, Kawahara K, Yoneda S, Kitano K, Okabayashi K, Iwasaki A. Free radical-mediated tissue injury in acute lung allograft rejection and the effect of superoxide dismutase. *Ann Thorac Surg*. 1997;64(3):821–5. doi:10.1016/s0003-4975(97)00754-6 Cited in: PubMed; PMID 9307480.
42. Liu H, Drew P, Cheng Y, Visner GA. Pirfenidone inhibits inflammatory responses and ameliorates allograft injury in a rat lung transplant model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130(3):852–8. doi:10.1016/j.jtcvs.2005.04.012 Cited in: PubMed; PMID 16153939.
43. Sierra-Vargas MP, Montero-Vargas JM, Debray-García Y, Vizuet-de-Rueda JC, Loeza-Román A, Terán LM. Oxidative Stress and Air Pollution: Its Impact on Chronic Respiratory Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023;24(1). doi:10.3390/ijms24010853 Cited in: PubMed; PMID 36614301.
44. Ma J, Liu Y, Guo Y, Ma Q, Ji C, Zhao L. Transcriptional Profiling of Aflatoxin B1-Induced Oxidative Stress and Inflammatory Response in Macrophages. *Toxins (Basel)*. 2021;13(6). doi:10.3390/toxins13060401 Cited in: PubMed; PMID 34199697.
45. Demirkapi EN, Ince S, Demirel HH, Arslan-Acaroz D, Acaroz U. Polydatin reduces aflatoxin-B1 induced oxidative stress, DNA damage, and inflammatory cytokine levels in mice. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2023;30(27):70842–53. doi:10.1007/s11356-023-27361-y Cited in: PubMed; PMID 37155108.

46. Shen H, Liu J, Wang Y, Lian H, Wang J, Xing L, Yan X, Wang J, Zhang X. Aflatoxin G1-induced oxidative stress causes DNA damage and triggers apoptosis through MAPK signaling pathway in A549 cells. *Food Chem Toxicol.* 2013;62:661–9. doi:10.1016/j.fct.2013.09.030 Cited in: PubMed; PMID 24090735.
47. Ousingsawat J, Schreiber R, Gulbins E, Kamler M, Kunzelmann K. *P. aeruginosa* Induced Lipid Peroxidation Causes Ferroptotic Cell Death in Airways. *Cell Physiol Biochem.* 2021;55(5):590–604. doi:10.33594/000000437 Cited in: PubMed; PMID 34637202.
48. Suntres ZE, Omri A, Shek PN. *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury: role of oxidative stress. *Microb Pathog.* 2002;32(1):27–34. doi:10.1006/mpat.2001.0475 Cited in: PubMed; PMID 11782118.
49. Saliba AM, Assis M-C de, Nishi R, Raymond B, Marques EdA, Lopes UG, Touqui L, Plotkowski M-C. Implications of oxidative stress in the cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *Microbes Infect.* 2006;8(2):450–9. doi:10.1016/j.micinf.2005.07.011 Cited in: PubMed; PMID 16293434.
50. Scholz M, Cinatl J, Gross V, Vogel JU, Blaheta RA, Freisleben HJ, Markus BH, Doerr HW. Impact of oxidative stress on human cytomegalovirus replication and on cytokine-mediated stimulation of endothelial cells. *Transplantation.* 1996;61(12):1763–70. doi:10.1097/00007890-199606270-00017 Cited in: PubMed; PMID 8685957.
51. Jaganjac M, Matijevic T, Cindric M, Cipak A, Mrakovcic L, Gubisch W, Zarkovic N. Induction of CMV-1 promoter by 4-hydroxy-2-nonenal in human embryonic kidney cells. *Acta Biochim Pol.* 2010;57(2):179–83. Cited in: PubMed; PMID 20512167.
52. Forte E, Zhang Z, Thorp EB, Hummel M. Cytomegalovirus Latency and Reactivation: An Intricate Interplay With the Host Immune Response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:130. doi:10.3389/fcimb.2020.00130 Cited in: PubMed; PMID 32296651.
53. Venkata-Subramani M, Nunley DR, Roman J. Donor factors and risk of primary graft dysfunction and mortality post lung transplantation: A proposed conceptual framework. *Clin Transplant.* 2021;35(12):e14480. doi:10.1111/ctr.14480 Cited in: PubMed; PMID 34516007.
54. Avtaar Singh SS, Das De S, Al-Adhami A, Singh R, Hopkins PM, Curry PA. Primary graft dysfunction following lung transplantation: From pathogenesis to future frontiers. *World J Transplant.* 2023;13(3):58–85. doi:10.5500/wjt.v13.i3.58 Cited in: PubMed; PMID 36968136.
55. Forgie KA, Fialka N, Freed DH, Nagendran J. Lung Transplantation, Pulmonary Endothelial Inflammation, and Ex-Situ Lung Perfusion: A Review. *Cells.* 2021;10(6). doi:10.3390/cells10061417 Cited in: PubMed; PMID 34200413.
56. Chen-Yoshikawa TF. Ischemia-Reperfusion Injury in Lung Transplantation. *Cells.* 2021;10(6). doi:10.3390/cells10061333 Cited in: PubMed; PMID 34071255.
57. Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004;93(1):105–13. doi:10.1093/bja/ae163 Cited in: PubMed; PMID 15121728.
58. Pober JS, Min W, Bradley JR. Mechanisms of endothelial dysfunction, injury, and death. *Annu Rev Pathol.* 2009;47:1–95. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092155 Cited in: PubMed; PMID 18754744.

59. Aird WC. Endothelium and allotransplantation. *Transplantation*. 2006;82(1 Suppl):S6-8. doi:10.1097/01.tp.0000231345.23918.bd Cited in: PubMed; PMID 16829797.
60. Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative Stress and Lung Ischemia-Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015590987. doi:10.1155/2015/590987 Cited in: PubMed; PMID 26161240.
61. Fisher AB, Dodia C. Lung as a model for evaluation of critical intracellular PO₂ and PCO. *Am J Physiol*. 1981;241(1):E47-50. doi:10.1152/ajpendo.1981.241.1.E47 Cited in: PubMed; PMID 7246767.
62. Lum H, Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol*. 1994;267(3 Pt 1):L223-41. doi:10.1152/ajplung.1994.267.3.L223 Cited in: PubMed; PMID 7943249.
63. Gautam N, Herwald H, Hedqvist P, Lindbom L. Signaling via beta(2) integrins triggers neutrophil-dependent alteration in endothelial barrier function. *J Exp Med*. 2000;191(11):1829-39. doi:10.1084/jem.191.11.1829 Cited in: PubMed; PMID 10839800.
64. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298229-317. doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7 Cited in: PubMed; PMID 22878108.
65. Liu X, Cao H, Li J, Wang B, Zhang P, Dong Zhang X, Liu Z, Yuan H, Zhan Z. Autophagy induced by DAMPs facilitates the inflammation response in lungs undergoing ischemia-reperfusion injury through promoting TRAF6 ubiquitination. *Cell Death Differ*. 2017;24(4):683-93. doi:10.1038/cdd.2017.1 Cited in: PubMed; PMID 28157209.
66. Chatterjee S, Nieman GF, Christie JD, Fisher AB. Shear stress-related mechanosignaling with lung ischemia: lessons from basic research can inform lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014;307(9):L668-80. doi:10.1152/ajplung.00198.2014 Cited in: PubMed; PMID 25239915.
67. Chatterjee S, Browning EA, Hong N, DeBolt K, Sorokina EM, Liu W, Birnbaum MJ, Fisher AB. Membrane depolarization is the trigger for PI3K/Akt activation and leads to the generation of ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(1):H105-14. doi:10.1152/ajpheart.00298.2011 Cited in: PubMed; PMID 22003059.
68. Eckenhoff RG, Dodia C, Tan Z, Fisher AB. Oxygen-dependent reperfusion injury in the isolated rat lung. *J Appl Physiol (1985)*. 1992;72(4):1454-60. doi:10.1152/jappl.1992.72.4.1454 Cited in: PubMed; PMID 1592738.
69. Perrot M de, Liu M, Waddell TK, Keshavjee S. Ischemia-reperfusion-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(4):490-511. doi:10.1164/rccm.200207-670SO Cited in: PubMed; PMID 12588712.
70. Shaw JO. Leukocytes in chemotactic-fragment-induced lung inflammation. Vascular emigration and alveolar surface migration. *Am J Pathol*. 1980;101(2):283-302. Cited in: PubMed; PMID 7435538.
71. Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull*. 2004;7071-86. doi:10.1093/bmb/ldh025 Cited in: PubMed; PMID 15494470.
72. Jiang X, Sung YK, Tian W, Qian J, Semenza GL, Nicolls MR. Graft microvascular disease in solid organ transplantation. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(8):797-810. doi:10.1007/s00109-014-1173-y Cited in: PubMed; PMID 24880953.

73. Chow C-W, Herrera Abreu MT, Suzuki T, Downey GP. Oxidative stress and acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;29(4):427–31. doi:10.1165/rcmb.F278 Cited in: PubMed; PMID 14500253.
74. Scheffert JL, Raza K. Immunosuppression in lung transplantation. *J Thorac Dis.* 2014;6(8):1039–53. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.04.23 Cited in: PubMed; PMID 25132971.
75. Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: a review. *J Transplant.* 2012;2012230386. doi:10.1155/2012/230386 Cited in: PubMed; PMID 22263104.
76. Abbas AK, Trotta E, R Simeonov D, Marson A, Bluestone JA. Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Sci Immunol.* 2018;3(25). doi:10.1126/sciimmunol.aat1482 Cited in: PubMed; PMID 29980618.
77. Gui Q, Jiang Z, Zhang L. Insights into the modulatory role of cyclosporine A and its research advances in acute inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2021;93107420. doi:10.1016/j.intimp.2021.107420 Cited in: PubMed; PMID 33540245.
78. Matsuda S, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology.* 2000;47(2-3):119–25. doi:10.1016/s0162-3109(00)00192-2 Cited in: PubMed; PMID 10878286.
79. Chung PA, Dilling DF. Immunosuppressive strategies in lung transplantation. *Ann Transl Med.* 2020;8(6):409. doi:10.21037/atm.2019.12.117 Cited in: PubMed; PMID 32355853.
80. Chambers DC, Cherikh WS, Goldfarb SB, Hayes D, Kucheryavaya AY, Toll AE, Khush KK, Levvey BJ, Meiser B, Rossano JW, Stehlik J. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-fifth adult lung and heart-lung transplant report-2018; Focus theme: Multiorgan Transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2018;37(10):1169–83. doi:10.1016/j.healun.2018.07.020 Cited in: PubMed; PMID 30293613.
81. Nogueiras-Álvarez R, Mora-Cuesta VM, Cifrián-Martínez JM, Cos-Cossío MÁ de, Del García-Sáiz MM. Calcineurin inhibitors' impact on cardiovascular and renal function, a descriptive study in lung transplant recipients from the North of Spain. *Sci Rep.* 2022;12(1):21207. doi:10.1038/s41598-022-25445-2 Cited in: PubMed; PMID 36481797.
82. MedLibrary.org. Neoral (Novartis Pharmaceuticals Corporation): FDA Package Insert [Internet]. 2024 [updated 2024 Jan 30; cited 2024 Jan 30]. Available from: <https://medlibrary.org/lib/rx/meds/neoral/>
83. Weis M, Scheidt W v. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation.* 1997;96(6):2069–77. doi:10.1161/01.cir.96.6.2069 Cited in: PubMed; PMID 9323100.
84. Lee J. Use of antioxidants to prevent cyclosporine a toxicity. *Toxicol Res.* 2010;26(3):163–70. doi:10.5487/TR.2010.26.3.163 Cited in: PubMed; PMID 24278520.
85. Bernatova I. Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: cause or consequence? *Biomed Res Int.* 2014;2014598271. doi:10.1155/2014/598271 Cited in: PubMed; PMID 24738065.
86. Tepperman E, Ramzy D, Prodger J, Sheshgiri R, Badiwala M, Ross H, Rao V. Surgical biology for the clinician: vascular effects of immunosuppression. *Can J Surg.* 2010;53(1):57–63. Cited in: PubMed; PMID 20100415.

87. Ahya VN, Diamond JM. Lung Transplantation. *Med Clin North Am.* 2019;103(3):425–33. doi:10.1016/j.mcna.2018.12.003 Cited in: PubMed; PMID 30955511.
88. Nickel T, Schlichting CL, Weis M. Drugs modulating endothelial function after transplantation. *Transplantation.* 2006;82(1 Suppl):S41-6. doi:10.1097/01.tp.0000231505.91988.26 Cited in: PubMed; PMID 16829796.
89. Wilasrusmee C, Da Silva M, Singh B, Siddiqui J, Bruch D, Kittur S, Wilasrusmee S, Kittur DS. Morphological and biochemical effects of immunosuppressive drugs in a capillary tube assay for endothelial dysfunction. *Clin Transplant.* 2003;17 Suppl 96–12. doi:10.1034/j.1399-0012.17.s9.1.x Cited in: PubMed; PMID 12795661.
90. Blantz RC, Munger K. Role of nitric oxide in inflammatory conditions. *Nephron.* 2002;90(4):373–8. doi:10.1159/000054723 Cited in: PubMed; PMID 11961394.
91. Rodrigues-Diez R, González-Guerrero C, Ocaña-Salceda C, Rodrigues-Diez RR, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M, Ramos AM. Calcineurin inhibitors cyclosporine A and tacrolimus induce vascular inflammation and endothelial activation through TLR4 signaling. *Sci Rep.* 2016;6:27915. doi:10.1038/srep27915 Cited in: PubMed; PMID 27295076.
92. Diederich D, Skopec J, Diederich A, Dai FX. Cyclosporine produces endothelial dysfunction by increased production of superoxide. *Hypertension.* 1994;23(6 Pt 2):957–61. doi:10.1161/01.hyp.23.6.957 Cited in: PubMed; PMID 8206635.
93. López-Ongil S, Hernández-Perera O, Navarro-Antolín J, Pérez de Lema G, Rodríguez-Puyol M, Lamas S, Rodríguez-Puyol D. Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 1998;124(3):447–54. doi:10.1038/sj.bjp.0701847 Cited in: PubMed; PMID 9647467.
94. Calò L, Semplicini A, Davis PA, Bonvicini P, Cantaro S, Rigotti P, D'Angelo A, Livi U, Antonello A. Cyclosporin-induced endothelial dysfunction and hypertension: are nitric oxide system abnormality and oxidative stress involved? *Transpl Int.* 2000;13 Suppl 1S413-8. doi:10.1007/s001470050374 Cited in: PubMed; PMID 11112045.
95. Navarro-Antolín J, Redondo-Horcajo M, Zaragoza C, Alvarez-Barrientos A, Fernández AP, León-Gómez E, Rodrigo J, Lamas S. Role of peroxynitrite in endothelial damage mediated by Cyclosporine A. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(3):394–403. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2006.11.008 Cited in: PubMed; PMID 17210452.
96. Sagiroglu T, Kanter M, Yagci MA, Sezer A, Erboğa M. Protective effect of curcumin on cyclosporin A-induced endothelial dysfunction, antioxidant capacity, and oxidative damage. *Toxicol Ind Health.* 2014;30(4):316–27. doi:10.1177/0748233712456065 Cited in: PubMed; PMID 22903178.
97. Longoni B, Boschi E, Demontis GC, Ratto GM, Mosca F. Apoptosis and adaptive responses to oxidative stress in human endothelial cells exposed to cyclosporin A correlate with BCL-2 expression levels. *FASEB J.* 2001;15(3):731–40. doi:10.1096/fj.00-0163com Cited in: PubMed; PMID 11259391.
98. Neria F, Castilla MA, Sanchez RF, Gonzalez Pacheco FR, Deudero JJP, Calabria O, Tejedero A, Manzarbeitia F, Ortiz A, Caramelo C. Inhibition of JAK2 protects renal endothelial and epithelial cells

- from oxidative stress and cyclosporin A toxicity. *Kidney Int.* 2009;75(2):227–34. doi:10.1038/ki.2008.487 Cited in: PubMed; PMID 18818682.
99. Trapp A, Weis M. The impact of immunosuppression on endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;45(1):81–7. doi:10.1097/00005344-200501000-00014 Cited in: PubMed; PMID 15613984.
100. Moien-Afshari F, McManus BM, Laher I. Immunosuppression and transplant vascular disease: benefits and adverse effects. *Pharmacol Ther.* 2003;100(2):141–56. doi:10.1016/j.pharmthera.2003.08.002 Cited in: PubMed; PMID 14609717.
101. Ohta S. Development of Hydrogen Medicine and Biology: Potential for Various Applications in Diverse Fields. *Curr Pharm Des.* 2021;27(5):583–4. doi:10.2174/138161282705210211144515 Cited in: PubMed; PMID 33726639.
102. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K, Katsura K-I, Katayama Y, Asoh S, Ohta S. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med.* 2007;13(6):688–94. doi:10.1038/nm1577 Cited in: PubMed; PMID 17486089.
103. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006;443(7113):787–95. doi:10.1038/nature05292 Cited in: PubMed; PMID 17051205.
104. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem.* 2001;11(4):173–86. doi:10.1159/000047804 Cited in: PubMed; PMID 11509825.
105. Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* 1992;307(1):108–12. doi:10.1016/0014-5793(92)80911-y Cited in: PubMed; PMID 1322323.
106. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552(Pt 2):335–44. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478 Cited in: PubMed; PMID 14561818.
107. Zhao Z. Hydroxyl radical generations form the physiologically relevant Fenton-like reactions. *Free Radic Biol Med.* 2023;208510–5. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2023.09.013 Cited in: PubMed; PMID 37717792.
108. Setsukinai K, Urano Y, Kakinuma K, Majima HJ, Nagano T. Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem.* 2003;278(5):3170–5. doi:10.1074/jbc.M209264200 Cited in: PubMed; PMID 12419811.
109. Slezák J, Kura B, Frimmel K, Zálešák M, Ravingerová T, Viczenczová C, Okruhlicová L, Tribulová N. Preventive and therapeutic application of molecular hydrogen in situations with excessive production of free radicals. *Physiol Res.* 2016;65 Suppl 1S11-28. doi:10.33549/physiolres.933414 Cited in: PubMed; PMID 27643933.
110. Murad F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep.* 2004;24(4-5):452–74. doi:10.1007/s10540-005-2741-8 Cited in: PubMed; PMID 16134022.
111. Radi R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *J Biol Chem.* 2013;288(37):26464–72. doi:10.1074/jbc.R113.472936 Cited in: PubMed; PMID 23861390.

112. Ohta S. Molecular hydrogen is a novel antioxidant to efficiently reduce oxidative stress with potential for the improvement of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820(5):586–94. doi:10.1016/j.bbagen.2011.05.006 Cited in: PubMed; PMID 21621588.
113. Sano M, Tamura T. Hydrogen Gas Therapy: From Preclinical Studies to Clinical Trials. *Curr Pharm Des*. 2021;27(5):650–8. doi:10.2174/1381612826666201221150857 Cited in: PubMed; PMID 33349213.
114. Salehi B, Martorell M, Arbiser JL, Sureda A, Martins N, Maurya PK, Sharifi-Rad M, Kumar P, Sharifi-Rad J. Antioxidants: Positive or Negative Actors? *Biomolecules*. 2018;8(4). doi:10.3390/biom8040124 Cited in: PubMed; PMID 30366441.
115. Sautin YY, Nakagawa T, Zharikov S, Johnson RJ. Adverse effects of the classic antioxidant uric acid in adipocytes: NADPH oxidase-mediated oxidative/nitrosative stress. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(2):C584–96. doi:10.1152/ajpcell.00600.2006 Cited in: PubMed; PMID 17428837.
116. Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*. 2005;142(1):37–46. doi:10.7326/0003-4819-142-1-200501040-00110 Cited in: PubMed; PMID 15537682.
117. Bjelakovic G, Gluud C. Surviving antioxidant supplements. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(10):742–3. doi:10.1093/jnci/djk211 Cited in: PubMed; PMID 17505064.
118. LeBaron TW, Kura B, Kalocayova B, Tribulova N, Slezak J. A New Approach for the Prevention and Treatment of Cardiovascular Disorders. Molecular Hydrogen Significantly Reduces the Effects of Oxidative Stress. *Molecules*. 2019;24(11). doi:10.3390/molecules24112076 Cited in: PubMed; PMID 31159153.
119. Boxhammer E, Lehle K, Schmid C, Suesskind-Schwendi M v. Anti-oxidative effect of the tyrosine kinase inhibitor nintedanib: a potential therapy for chronic lung allograft dysfunction? *Exp Lung Res*. 2020;46(5):128–45. doi:10.1080/01902148.2020.1738594 Cited in: PubMed; PMID 32169022.
120. Lee S-S, Tsai C-H, Kuan Y-H, Huang F-M, Chang Y-C. The upregulation of transglutaminase-2 by cyclosporin a in human gingival fibroblasts is augmented by oxidative stress. *J Periodontol*. 2013;84(10):1469–75. doi:10.1902/jop.2012.120554 Cited in: PubMed; PMID 23173828.
121. Kocherova I, Bryja A, Mozdziak P, Angelova Volponi A, Dyszkiewicz-Konwińska M, Piotrowska-Kempisty H, Antosik P, Bukowska D, Bruska M, Izycki D, Zabel M, Nowicki M, Kempisty B. Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) Co-Culture with Osteogenic Cells: From Molecular Communication to Engineering Prevascularised Bone Grafts. *J Clin Med*. 2019;8(10). doi:10.3390/jcm8101602 Cited in: PubMed; PMID 31623330.
122. Medina-Leyte DJ, Domínguez-Pérez M, Mercado I, Villarreal-Molina MT, Jacobo-Albavera L. Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease: A Review. *Applied Sciences*. 2020;10(3):938. doi:10.3390/app10030938
123. Schmitz S. Kryokonservierung und Langzeitlagerung von Zellen. In: Schmitz S, editor. *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2011. p. 191–204.

124. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4 Cited in: PubMed; PMID 6606682.
125. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One*. 2010;5(4):e10202. doi:10.1371/journal.pone.0010202 Cited in: PubMed; PMID 20419137.
126. Kuete V. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases*. San Diego, Ann Arbor, Michigan: Elsevier Science & Technology; ProQuest; 2017. 692 p. eng.
127. Chen J-W, Chen Y-H, Lin F-Y, Chen Y-L, Lin S-J. Ginkgo biloba extract inhibits tumor necrosis factor- α -induced reactive oxygen species generation, transcription factor activation, and cell adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(9):1559–66. doi:10.1161/01.ATV.0000089012.73180.63 Cited in: PubMed; PMID 12893683.
128. Uthman L, Homayr A, Juni RP, Spin EL, Kerindongo R, Boomsma M, Hollmann MW, Preckel B, Koolwijk P, van Hinsbergh VWM, Zuurbier CJ, Albrecht M, Weber NC. Empagliflozin and Dapagliflozin Reduce ROS Generation and Restore NO Bioavailability in Tumor Necrosis Factor α -Stimulated Human Coronary Arterial Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2019;53(5):865–86. doi:10.33594/000000178 Cited in: PubMed; PMID 31724838.
129. Juni RP, Kuster DWD, Goebel M, Helmes M, Musters RJP, van der Velden J, Koolwijk P, Paulus WJ, van Hinsbergh VWM. Cardiac Microvascular Endothelial Enhancement of Cardiomyocyte Function Is Impaired by Inflammation and Restored by Empagliflozin. *JACC Basic Transl Sci*. 2019;4(5):575–91. doi:10.1016/j.jacbts.2019.04.003 Cited in: PubMed; PMID 31768475.
130. Yin S-Q, Zhu J-Y, Luo L, Yang X, Liang H-P, Luo Y. Exogenous agmatine inhibits lipopolysaccharide-induced activation and dysfunction of human umbilical vein endothelial cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2018;38(6):652–60. chi. doi:10.3969/j.issn.1673-4254.2018.06.03 Cited in: PubMed; PMID 29997086.
131. Martino E, D'Onofrio N, Balestrieri A, Mele L, Sardu C, Marfella R, Campanile G, Balestrieri ML. MiR-15b-5p and PCSK9 inhibition reduces lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction by targeting SIRT4. *Cell Mol Biol Lett*. 2023;28(1):66. doi:10.1186/s11658-023-00482-5 Cited in: PubMed; PMID 37587410.
132. Ciccone V, Piragine E, Gorica E, Citi V, Testai L, Pagnotta E, Matteo R, Pecchioni N, Montanaro R, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Brancaleone V, Morbidelli L, Calderone V, Martelli A. Anti-Inflammatory Effect of the Natural H₂S-Donor Erucin in Vascular Endothelium. *Int J Mol Sci*. 2022;23(24). doi:10.3390/ijms232415593 Cited in: PubMed; PMID 36555238.
133. Chen S, Tang Y, Qian Y, Chen R, Zhang L, Wo L, Chai H. Allicin prevents H₂O₂-induced apoptosis of HUVECs by inhibiting an oxidative stress pathway. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:321. doi:10.1186/1472-6882-14-321 Cited in: PubMed; PMID 25174844.

134. Wu Y, Wang Y, Nabi X. Protective effect of *Ziziphora clinopodioides* flavonoids against H₂O₂-induced oxidative stress in HUVEC cells. *Biomed Pharmacother.* 2019;117:109156. doi:10.1016/j.biopha.2019.109156 Cited in: PubMed; PMID 31387192.
135. Cai S-Y, Wang Y-M, Zhao Y-Q, Chi C-F, Wang B. Cytoprotective Effect of Antioxidant Pentapeptides from the Protein Hydrolysate of Swim Bladders of Miiuy Croaker (*Miichthysmiiuy*) against H₂O₂-Mediated Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC) Injury. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21). doi:10.3390/ijms20215425 Cited in: PubMed; PMID 31683554.
136. Oh Y, Ahn C-B, Nam K-H, Kim Y-K, Yoon NY, Je J-Y. Amino Acid Composition, Antioxidant, and Cytoprotective Effect of Blue Mussel (*Mytilus edulis*) Hydrolysate through the Inhibition of Caspase-3 Activation in Oxidative Stress-Mediated Endothelial Cell Injury. *Mar Drugs.* 2019;17(2). doi:10.3390/md17020135 Cited in: PubMed; PMID 30823522.
137. Pérez de Hornedo J, Arriba G de, Calvino Fernández M, Benito S, Parra Cid T. Cyclosporin a causes oxidative stress and mitochondrial dysfunction in tubular renal cells. 2007.
138. O'Connell S, Tuite N, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Cyclosporine A--induced oxidative stress in human renal mesangial cells: a role for ERK 1/2 MAPK signaling. *Toxicol Sci.* 2012;126(1):101–13. doi:10.1093/toxsci/kfr330 Cited in: PubMed; PMID 22147139.
139. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004;142(2):231–55. doi:10.1038/sj.bjp.0705776 Cited in: PubMed; PMID 15155533.
140. Hempel SL, Buettner GR, O'Malley YQ, Wessels DA, Flaherty DM. Dihydrofluorescein diacetate is superior for detecting intracellular oxidants: comparison with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, 5-(and 6)-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(1-2):146–59. doi:10.1016/s0891-5849(99)00061-1 Cited in: PubMed; PMID 10443931.
141. Labuschagne CF, Brenkman AB. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. *Ageing Res Rev.* 2013;12(4):918–30. doi:10.1016/j.arr.2013.09.003 Cited in: PubMed; PMID 24080227.
142. Kučera O, Endlicher R, Roušar T, Lotková H, Garnol T, Drahotka Z, Cervinková Z. The effect of tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress on lean and steatotic rat hepatocytes in vitro. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:752506. doi:10.1155/2014/752506 Cited in: PubMed; PMID 24847414.
143. Yeh Y-C, Liu T-J, Lai H-C. Pathobiological Mechanisms of Endothelial Dysfunction Induced by tert-Butyl Hydroperoxide via Apoptosis, Necrosis and Senescence in a Rat Model. *Int J Med Sci.* 2020;17(3):368–82. doi:10.7150/ijms.40255 Cited in: PubMed; PMID 32132872.
144. Afzal M, Matsugo S, Sasai M, Xu B, Aoyama K, Takeuchi T. Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304(4):619–24. doi:10.1016/s0006-291x(03)00641-7 Cited in: PubMed; PMID 12727198.
145. Abramoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International.* 2004;(11):36–42.

146. Avishay DM, Tenny KM. StatPearls: Henry's Law. StatPearls Publishing. Treasure Island (FL); 2023.
147. MHI. Concentration and Solubility of H₂. Molecular Hydrogen Institute. 2023 Feb 5.
148. Sun X, Ohta S, Nakao A. Hydrogen Molecular Biology and Medicine. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. 122 p.
149. Ohta S. Recent progress toward hydrogen medicine: potential of molecular hydrogen for preventive and therapeutic applications. *Curr Pharm Des.* 2011;17(22):2241–52. doi:10.2174/138161211797052664
Cited in: PubMed; PMID 21736547.
150. Borcherding K. Untersuchungen zur Charakterisierung der Makro- und Mikrostruktur von Milchsäumen. Institut für Chemie und Technologie der Milch der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel; 2004. de.
151. Wilde PJ, Clark DC. Foam formation and stability. In: *Methods of Testing Protein Functionality.* Boston, MA: Springer US; 1996. p. 110–52.
152. Junker B. Foam and its mitigation in fermentation systems. *Biotechnology Progress.* 2007;23(4):767–84. doi:10.1021/bp070032r Cited in: PubMed; PMID 17567037.
153. Mollet H, Grubenmann A. Formulierungstechnik: Emulsionen, Suspensionen, Feste Formen. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2009. Online-Ressource. de.
154. H2 Sciences Inc. H2 Sciences Inc. Technical Page [Internet]. 2023 [updated 2023 Aug 7; cited 2023 Aug 7]. Available from: <https://www.h2sciencesinc.com/how-does-h2blue-detect-h2.html>
155. H2 Sciences Inc. H2 Sciences Inc. Technical Page [Internet]. 2023 [updated 2023 Aug 7; cited 2023 Aug 7]. Available from: <https://www.h2sciencesinc.com/how-to-use-h2blue.html>
156. Promega. Zellbasierte und Biochemische Assays Broschüre_REG4609 [Internet] [cited 2024 Jan 2]. Available from: https://www.promega.com/-/media/images/promega-worldwide/europe/promega-germany/lp/2020-brochures/zellbasierte-assays/2022/promega-zellbasierte-assays-broschuere-reg4609.pdf?sc_lang=en
157. ISO 10993–5: 2009 Biological evaluation of medical devices—part 5: tests for in vitro cytotoxicity. ICS 11.100.20. International Organization for Standardization; 2009.
158. Sekhon BK, Roubin RH, Tan A, Chan WK, Sze DM-Y. High-throughput screening platform for anticancer therapeutic drug cytotoxicity. *Assay Drug Dev Technol.* 2008;6(5):711–21. doi:10.1089/adt.2008.148 Cited in: PubMed; PMID 19035851.
159. Racané L, Cindrić M, Zlatar I, Kezele T, Milić A, Brajša K, Hranjec M. Preclinical in vitro screening of newly synthesised amidino substituted benzimidazoles and benzothiazoles. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2021;36(1):163–74. doi:10.1080/14756366.2020.1850711 Cited in: PubMed; PMID 33404264.
160. Schmitz S. *Der Experimentator: Zellkultur.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2020. 389 p.
161. Karim M, Boikess RS, Schwartz RA, Cohen PJ. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a solvent that may solve selected cutaneous clinical challenges. *Arch Dermatol Res.* 2023;315(6):1465–72. doi:10.1007/s00403-022-02494-1 Cited in: PubMed; PMID 36459193.

162. Czogalla A. Oral cyclosporine A--the current picture of its liposomal and other delivery systems. *Cell Mol Biol Lett.* 2009;14(1):139–52. doi:10.2478/s11658-008-0041-6 Cited in: PubMed; PMID 19005620.
163. Ismailos G, Reppas C, Dressman JB, Macheras P. Unusual solubility behaviour of cyclosporin A in aqueous media. *J Pharm Pharmacol.* 1991;43(4):287–9. doi:10.1111/j.2042-7158.1991.tb06688.x Cited in: PubMed; PMID 1676746.
164. Miyake K, Hirayama F, Uekama K. Solubility and mass and nuclear magnetic resonance spectroscopic studies on interaction of cyclosporin A with dimethyl-alpha- and -beta-cyclodextrins in aqueous solution. *J Pharm Sci.* 1999;88(1):39–45. doi:10.1021/js980284 Cited in: PubMed; PMID 9874700.
165. Molpeceres J, Guzmán M, Bustamante P, Del Rosario Aberturas M. Exothermic-endothermic heat of solution shift of cyclosporin a related to poloxamer 188 behavior in aqueous solutions. *International Journal of Pharmaceutics.* 1996;130(1):75–81. doi:10.1016/0378-5173(95)04294-6
166. Schote U, Ganz P, Fahr A, Seelig J. Interactions of cyclosporines with lipid membranes as studied by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-sensitivity titration calorimetry. *J Pharm Sci.* 2002;91(3):856–67. doi:10.1002/jps.10071 Cited in: PubMed; PMID 11920770.
167. selleckchem.com. Cyclosporin A | 99.98%(HPLC) | Selleck | Antineoplastic and Immunosuppressive Antibiotics inhibitor [Internet]. 2023 [updated 2023 Nov 16; cited 2023 Nov 16]. Available from: [https://www.selleckchem.com/products/Cyclosporin-A\(Cyclosporine-A\).html](https://www.selleckchem.com/products/Cyclosporin-A(Cyclosporine-A).html)
168. Gallardo-Villagrán M, Paulus L, Leger DY, Therrien B, Liagre B. Dimethyl Sulfoxide: A Bio-Friendly or Bio-Hazard Chemical? The Effect of DMSO in Human Fibroblast-like Synoviocytes. *Molecules.* 2022;27(14). doi:10.3390/molecules27144472 Cited in: PubMed; PMID 35889344.
169. Camici GG, Steffel J, Akhmedov A, Schafer N, Baldinger J, Schulz U, Shojaati K, Matter CM, Yang Z, Lüscher TF, Tanner FC. Dimethyl sulfoxide inhibits tissue factor expression, thrombus formation, and vascular smooth muscle cell activation: a potential treatment strategy for drug-eluting stents. *Circulation.* 2006;114(14):1512–21. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.638460 Cited in: PubMed; PMID 17000906.
170. Voss BL, Hamilton KK, Samara EN, McKee PA. Cyclosporine suppression of endothelial prostacyclin generation. A possible mechanism for nephrotoxicity. *Transplantation.* 1988;45(4):793–6. doi:10.1097/00007890-198804000-00025 Cited in: PubMed; PMID 3128899.
171. Longoni B, Boschi E, Demontis GC, Marchiafava PL, Mosca F. Regulation of Bcl-2 protein expression during oxidative stress in neuronal and in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;260(2):522–6. doi:10.1006/bbrc.1999.0928 Cited in: PubMed; PMID 10403800.
172. Fatouros DG, Karpf DM, Nielsen FS, Mullertz A. Clinical studies with oral lipid based formulations of poorly soluble compounds. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3(4):591–604. Cited in: PubMed; PMID 18472981.
173. Aliabadi HM, Mahmud A, Sharifabadi AD, Lavasanifar A. Micelles of methoxy poly(ethylene oxide)-b-poly(epsilon-caprolactone) as vehicles for the solubilization and controlled delivery of cyclosporine A. *J Control Release.* 2005;104(2):301–11. doi:10.1016/j.jconrel.2005.02.015 Cited in: PubMed; PMID 15907581.

174. Johnson EN, Lee YM, Sander TL, Rabkin E, Schoen FJ, Kaushal S, Bischoff J. NFATc1 mediates vascular endothelial growth factor-induced proliferation of human pulmonary valve endothelial cells. *J Biol Chem*. 2003;278(3):1686–92. doi:10.1074/jbc.M210250200 Cited in: PubMed; PMID 12427739.
175. Posadino AM, Cossu A, Giordo R, Zinellu A, Sotgia S, Vardeu A, Hoa PT, Deiana L, Carru C, Pintus G. Coumaric acid induces mitochondrial damage and oxidative-mediated cell death of human endothelial cells. *Cardiovasc Toxicol*. 2013;13(3):301–6. doi:10.1007/s12012-013-9205-3 Cited in: PubMed; PMID 23504614.
176. Illsinger S, Janzen N, Lücke T, Bednarczyk J, Schmidt K-H, Hoy L, Sander J, Das AM. Cyclosporine A: impact on mitochondrial function in endothelial cells. *Clin Transplant*. 2011;25(4):584–93. doi:10.1111/j.1399-0012.2010.01301.x Cited in: PubMed; PMID 20633034.
177. Schleger C, Platz SJ, Deschl U. Development of an in vitro model for vascular injury with human endothelial cells. *ALTEX*. 2004;21 Suppl 312–9. Cited in: PubMed; PMID 15057404.
178. L'Azou B, Fernandez P, Bareille R, Beneteau M, Bourget C, Cambar J, Bordenave L. In vitro endothelial cell susceptibility to xenobiotics: comparison of three cell types. *Cell Biol Toxicol*. 2005;21(2):127–37. doi:10.1007/s10565-005-0172-8 Cited in: PubMed; PMID 16142586.
179. Uthman L, Li X, Baartscheer A, Schumacher CA, Baumgart P, Hermanides J, Preckel B, Hollmann MW, Coronel R, Zuurbier CJ, Weber NC. Empagliflozin reduces oxidative stress through inhibition of the novel inflammation/NHE/Na⁺/c/ROS-pathway in human endothelial cells. *Biomed Pharmacother*. 2022;146112515. doi:10.1016/j.biopha.2021.112515 Cited in: PubMed; PMID 34896968.
180. Han BH, Yoon JJ, Choi ES, Da Jeong H, Lee YJ, Kang DG, Lee HS. Inhibitory effect of brassinin on TNF- α -induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):6890–5. doi:10.3892/mmr.2017.7406 Cited in: PubMed; PMID 28901414.
181. Mobasheri L, Khorashadizadeh M, Safarpour H, Mohammadi M, Anani Sarab G, Askari VR. Anti-Inflammatory Activity of Ferula assafoetida Oleo-Gum-Resin (Asafoetida) against TNF- α -Stimulated Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). *Mediators Inflamm*. 2022;20225171525. doi:10.1155/2022/5171525 Cited in: PubMed; PMID 36091666.
182. Lee H-S, Lee M-J, Kim H, Choi S-K, Kim J-E, Moon H-I, Park W-H. Curcumin inhibits TNF α -induced lectin-like oxidised LDL receptor-1 (LOX-1) expression and suppresses the inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) by an antioxidant mechanism. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2010;25(5):720–9. doi:10.3109/14756360903555274 Cited in: PubMed; PMID 20163327.
183. Usui T, Yamawaki H, Kamibayashi M, Okada M, Hara Y. CV-159, a unique dihydropyridine derivative, prevents TNF-induced inflammatory responses in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Sci*. 2010;113(2):182–91. doi:10.1254/jphs.10033fp Cited in: PubMed; PMID 20484867.
184. Zhu Y, Shen T, Lin Y, Chen B, Ruan Y, Cao Y, Qiao Y, Man Y, Wang S, Li J. Astragalus polysaccharides suppress ICAM-1 and VCAM-1 expression in TNF- α -treated human vascular endothelial cells by blocking NF- κ B activation. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(8):1036–42. doi:10.1038/aps.2013.46 Cited in: PubMed; PMID 23728723.

185. Liu Y, Tie L. Apolipoprotein M and sphingosine-1-phosphate complex alleviates TNF- α -induced endothelial cell injury and inflammation through PI3K/AKT signaling pathway. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019;19(1):279. doi:10.1186/s12872-019-1263-4 Cited in: PubMed; PMID 31791242.
186. Biro A, Markovich A, Homoki JR, Szöllösi E, Hegedűs C, Tarapcsák S, Lukács J, Stündl L, Remenyik J. Anthocyanin-Rich Sour Cherry Extract Attenuates the Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Inflammatory Response. *Molecules.* 2019;24(19). doi:10.3390/molecules24193427 Cited in: PubMed; PMID 31546579.
187. Zhang M, Pan H, Xu Y, Wang X, Qiu Z, Jiang L. Allicin Decreases Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells through Suppression of Mitochondrial Dysfunction and Activation of Nrf2. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(6):2255–67. doi:10.1159/000475640 Cited in: PubMed; PMID 28456799.
188. Gao A, Wang Y, Gao X, Tian W. LCZ696 ameliorates lipopolysaccharide-induced endothelial injury. *Aging (Albany NY).* 2021;13(7):9582–91. doi:10.18632/aging.202692 Cited in: PubMed; PMID 33839697.
189. Su Y, Yin X, Huang X, Guo Q, Ma M, Guo L. The BCL2/BAX/ROS pathway is involved in the inhibitory effect of astragaloside IV on pyroptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Pharm Biol.* 2022;60(1):1812–8. doi:10.1080/13880209.2022.2101668 Cited in: PubMed; PMID 36121248.
190. Abdulmahdi W, Patel D, Rabadi MM, Azar T, Jules E, Lipphardt M, Hashemiyoon R, Ratliff BB. HMGB1 redox during sepsis. *Redox Biol.* 2017;13600–7. doi:10.1016/j.redox.2017.08.001 Cited in: PubMed; PMID 28806702.
191. Cepinskas G, Katada K, Bihari A, Potter RF. Carbon monoxide liberated from carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 attenuates inflammation in the liver of septic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294(1):G184-91. doi:10.1152/ajpgi.00348.2007 Cited in: PubMed; PMID 17991708.
192. Zhong M, Zhang X, Shi X, Zheng C. Halofuginone inhibits LPS-induced attachment of monocytes to HUVECs. *Int Immunopharmacol.* 2020;87106753. doi:10.1016/j.intimp.2020.106753 Cited in: PubMed; PMID 32707492.
193. Di Tomo P, Canali R, Ciavardelli D, Di Silvestre S, Marco A de, Giardinelli A, Pipino C, Di Pietro N, Virgili F, Pandolfi A. β -Carotene and lycopene affect endothelial response to TNF- α reducing nitro-oxidative stress and interaction with monocytes. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(2):217–27. doi:10.1002/mnfr.201100500 Cited in: PubMed; PMID 22162208.
194. Lo JF, Sinkala E, Eddington DT. Oxygen gradients for open well cellular cultures via microfluidic substrates. *Lab Chip.* 2010;10(18):2394–401. doi:10.1039/c004660d Cited in: PubMed; PMID 20559583.
195. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758(8):994–1003. doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.015 Cited in: PubMed; PMID 16566894.
196. Roberto D, Micucci P, Sebastian T, Graciela F, Anesini C. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;106(1):38–44. doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00467.x Cited in: PubMed; PMID 19796276.

197. Xu M-C, Shi H-M, Wang H, Gao X-F. Salidroside protects against hydrogen peroxide-induced injury in HUVECs via the regulation of REDD1 and mTOR activation. *Mol Med Rep.* 2013;8(1):147–53. doi:10.3892/mmr.2013.1468 Cited in: PubMed; PMID 23660824.
198. Cheng J, Yang H-L, Gu C-J, Liu Y-K, Shao J, Zhu R, He Y-Y, Zhu X-Y, Li M-Q. Melatonin restricts the viability and angiogenesis of vascular endothelial cells by suppressing HIF-1 α /ROS/VEGF. *Int J Mol Med.* 2019;43(2):945–55. doi:10.3892/ijmm.2018.4021 Cited in: PubMed; PMID 30569127.
199. Ouyang J, Li R, Shi H, Zhong J. Curcumin Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cells against H2O2-Induced Cell Injury. *Pain Res Manag.* 2019;20193173149. doi:10.1155/2019/3173149 Cited in: PubMed; PMID 31565108.
200. Zhou X, Ruan Q, Ye Z, Chu Z, Xi M, Li M, Hu W, Guo X, Yao P, Xie W. Resveratrol accelerates wound healing by attenuating oxidative stress-induced impairment of cell proliferation and migration. *Burns.* 2021;47(1):133–9. doi:10.1016/j.burns.2020.10.016 Cited in: PubMed; PMID 33288327.
201. Ma Y, Li W, Yin Y, Li W. AST IV inhibits H₂O₂-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis by suppressing Nox4 expression through the TGF- β 1/Smad2 pathway. *Int J Mol Med.* 2015;35(6):1667–74. doi:10.3892/ijmm.2015.2188 Cited in: PubMed; PMID 25891879.
202. Peng Z, Zhan H, Shao Y, Xiong Y, Zeng L, Zhang C, Liu Z, Huang Z, Su H, Yang Z. 13-Methylberberine improves endothelial dysfunction by inhibiting NLRP3 inflammasome activation via autophagy induction in human umbilical vein endothelial cells. *Chin Med.* 2020;158. doi:10.1186/s13020-020-0286-1 Cited in: PubMed; PMID 31993073.
203. Krötz F, Keller M, Derflinger S, Schmid H, Gloe T, Bassermann F, Duyster J, Cohen CD, Schuhmann C, Klauss V, Pohl U, Stempfle H-U, Sohn H-Y. Mycophenolate acid inhibits endothelial NAD(P)H oxidase activity and superoxide formation by a Rac1-dependent mechanism. *Hypertension.* 2007;49(1):201–8. doi:10.1161/01.HYP.0000251162.14782.d4 Cited in: PubMed; PMID 17101842.
204. Raymond M-A, Mollica L, Vigneault N, Désormeaux A, Chan JS, Filep JG, Hébert M-J. Blockade of the apoptotic machinery by cyclosporin A redirects cell death toward necrosis in arterial endothelial cells: regulation by reactive oxygen species and cathepsin D. *FASEB j.* 2003;17(3):1–18. doi:10.1096/fj.02-0500fje
205. Navarro-Antolín J, Hernández-Perera O, López-Ongil S, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D, Lamas S. CsA and FK506 up-regulate eNOS expression: role of reactive oxygen species and AP-1. *Kidney Int Suppl.* 1998;68S20-4. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.06807.x Cited in: PubMed; PMID 9839278.
206. Chin Y-T, Tu H-P, Lin C-Y, Kuo P-J, Chiu H-C, Liu S-H, Lee S-Y, Fu E. Antioxidants protect against gingival overgrowth induced by cyclosporine A. *J of Periodontal Research.* 2021;56(2):397–407. doi:10.1111/jre.12832 Cited in: PubMed; PMID 33448057.
207. Muschter D, Geyer F, Bauer R, Ettl T, Schreml S, Haubner F. A comparison of cell survival and heat shock protein expression after radiation in normal dermal fibroblasts, microvascular endothelial cells, and different head and neck squamous carcinoma cell lines. *Clin Oral Investig.* 2018;22(6):2251–62. doi:10.1007/s00784-017-2323-8 Cited in: PubMed; PMID 29307045.

208. Slany A, Bileck A, Kreutz D, Mayer RL, Muqaku B, Gerner C. Contribution of Human Fibroblasts and Endothelial Cells to the Hallmarks of Inflammation as Determined by Proteome Profiling. *Mol Cell Proteomics*. 2016;15(6):1982–97. doi:10.1074/mcp.M116.058099 Cited in: PubMed; PMID 27025457.
209. Akel Bilgic H, Kilic B, Kockaya BD, Sarac BE, Kilic Suloglu A, Kalayci O, Karaaslan C. Oxidative stress stimulation leads to cell-specific oxidant and antioxidant responses in airway resident and inflammatory cells. *Life Sci*. 2023;315121358. doi:10.1016/j.lfs.2022.121358 Cited in: PubMed; PMID 36596408.
210. Barandalla M, Colleoni S, Lazzari G. Differential Response of Human Embryonic Stem and Somatic Cells to Non-Cytotoxic Hydrogen Peroxide Exposure: An Attempt to Model In Vitro the Effects of Oxidative Stress on the Early Embryo. *Cell Dev Biol*. 2016;5(2). doi:10.4172/2168-9296.1000177 Cited in: PubMed; PMID 27774366.
211. Coste G, Chabanne C, Tron C, Lelong B, Verdier M-C, Roussel M, Le Gall F, Turlin B, Desille-Dugast M, Flécher E, Laviolle B, Lemaitre F. Blood, Cellular, and Tissular Calcineurin Inhibitors Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Relationship in Heart Transplant Recipients: The INTRACAR Study. *Ther Drug Monit*. 2023;45(2):229–35. doi:10.1097/FTD.0000000000001025 Cited in: PubMed; PMID 36006706.
212. Rivinius R, Helmschrott M, Ruhparwar A, Schmack B, Klein B, Erbel C, Gleissner CA, Akhavanpoor M, Frankenstein L, Darche FF, Thomas D, Ehlermann P, Bruckner T, Katus HA, Doesch AO. Analysis of malignancies in patients after heart transplantation with subsequent immunosuppressive therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2015;993–102. doi:10.2147/DDDT.S75464 Cited in: PubMed; PMID 25552900.
213. Andreassen AK, Andersson B, Gustafsson F, Eiskjaer H, Radegran G, Gude E, Jansson K, Solbu D, Sigurdardottir V, Arora S, Dellgren G, Gullestad L. Everolimus initiation and early calcineurin inhibitor withdrawal in heart transplant recipients: a randomized trial. *Am J Transplant*. 2014;14(8):1828–38. doi:10.1111/ajt.12809 Cited in: PubMed; PMID 25041227.
214. Robertsen I, Falck P, Andreassen AK, Næss NK, Lunder N, Christensen H, Gullestad L, Asberg A. Endomyocardial, intralymphocyte, and whole blood concentrations of ciclosporin A in heart transplant recipients. *Transplant Res*. 2013;2(1):5. doi:10.1186/2047-1440-2-5 Cited in: PubMed; PMID 23566530.
215. Caforio ALP, Tona F, Piaserico S, Gambino A, Feltrin G, Fortina AB, Angelini A, Alaibac M, Bontorin M, Calzolari D, Peserico A, Thiene G, Illiceto S, Gerosa G. C2 is superior to C0 as predictor of renal toxicity and rejection risk profile in stable heart transplant recipients. *Transpl Int*. 2005;18(1):116–24. doi:10.1111/j.1432-2277.2004.00001.x Cited in: PubMed; PMID 15612993.
216. Maziers N, Bulpa P, Jamart J, Delaunois L, Eucher P, Evrard P. Correlations between cyclosporine concentrations at 2 hours post-dose and trough levels with functional outcomes in de novo lung transplant recipients. *Transplant Proc*. 2012;44(9):2880–4. doi:10.1016/j.transproceed.2012.09.081 Cited in: PubMed; PMID 23146546.
217. Hangler HB, Ruttman E, Geltner C, Bucher B, Nagiller J, Laufer G, Mueller LC. Single time point measurement by C2 or C3 is highly predictive in cyclosporine area under the curve estimation

- immediately after lung transplantation. *Clin Transplant*. 2008;22(1):35–40. doi:10.1111/j.1399-0012.2007.00738.x Cited in: PubMed; PMID 18217903.
218. Jia Y, Meng X, Li Y, Xu C, Zeng W, Jiao Y, Han W. Optimal sampling time-point for cyclosporin A concentration monitoring in heart transplant recipients. *Exp Ther Med*. 2018;16(5):4265–70. doi:10.3892/etm.2018.6711 Cited in: PubMed; PMID 30402164.
 219. Wang S-S, Chou N-K, Chi N-H, Huang S-C, Wu I-H, Wang C-H, Yu H-Y, Chen Y-S, Tsao C-I, Ko W-J, Shun C-T. Can cyclosporine blood level be reduced to half after heart transplantation? *Transplant Proc*. 2010;42(3):930–3. doi:10.1016/j.transproceed.2010.03.014 Cited in: PubMed; PMID 20430207.
 220. Iversen M, Nilsson F, Sipponen J, Eiskjaer H, Mared L, Bergan S, Nyström U, Fagertun HE, Solbu D, Simonsen S. Cyclosporine C2 levels have impact on incidence of rejection in de novo lung but not heart transplant recipients: the NOCTURNE study. *J Heart Lung Transplant*. 2009;28(9):919–26. doi:10.1016/j.healun.2009.05.022 Cited in: PubMed; PMID 19716045.
 221. Méndez A, Monforte V, Berastegui C, López-Meseguer M, Bravo C, Pou L, Roman A. High intra-individual variability of cyclosporine pharmacokinetics in lung transplant recipients without cystic fibrosis. *Clin Transplant*. 2014;28(6):743–8. doi:10.1111/ctr.12371 Cited in: PubMed; PMID 24708188.
 222. Irani S, Fattinger K, Schmid-Mahler C, Achermann E, Speich R, Boehler A. Blood concentration curve of cyclosporine: impact of itraconazole in lung transplant recipients. *Transplantation*. 2007;83(8):1130–3. doi:10.1097/01.tp.0000259724.44008.9d Cited in: PubMed; PMID 17452906.
 223. Jaksch P, Kocher A, Neuhauser P, Sarahrudi K, Seweryn J, Wisser W, Klepetko W. Monitoring C2 level predicts exposure in maintenance lung transplant patients receiving the microemulsion formulation of cyclosporine (Neoral). *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(8):1076–80. doi:10.1016/j.healun.2003.05.002 Cited in: PubMed; PMID 16102443.
 224. Ovechkin AV, Lominadze D, Sedoris KC, Robinson TW, Tyagi SC, Roberts AM. Lung ischemia-reperfusion injury: implications of oxidative stress and platelet-arteriolar wall interactions. *Arch Physiol Biochem*. 2007;113(1):1–12. doi:10.1080/13813450601118976 Cited in: PubMed; PMID 17522980.
 225. Laubach VE, Sharma AK. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury. *Curr Opin Organ Transplant*. 2016;21(3):246–52. doi:10.1097/MOT.0000000000000304 Cited in: PubMed; PMID 26945320.
 226. Chatterjee S. Endothelial Mechanotransduction, Redox Signaling and the Regulation of Vascular Inflammatory Pathways. *Front Physiol*. 2018;9:524. doi:10.3389/fphys.2018.00524 Cited in: PubMed; PMID 29930512.
 227. Bouloumié A, Bauersachs J, Linz W, Schölkens BA, Wiemer G, Fleming I, Busse R. Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production. *Hypertension*. 1997;30(4):934–41. doi:10.1161/01.hyp.30.4.934 Cited in: PubMed; PMID 9336396.
 228. Fukuda K, Asoh S, Ishikawa M, Yamamoto Y, Ohsawa I, Ohta S. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361(3):670–4. doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.088 Cited in: PubMed; PMID 17673169.

229. Hayashida K, Sano M, Ohsawa I, Shinmura K, Tamaki K, Kimura K, Endo J, Katayama T, Kawamura A, Kohsaka S, Makino S, Ohta S, Ogawa S, Fukuda K. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(1):30–5. doi:10.1016/j.bbrc.2008.05.165 Cited in: PubMed; PMID 18541148.
230. Zhang N, Deng C, Zhang X, Zhang J, Bai C. Inhalation of hydrogen gas attenuates airway inflammation and oxidative stress in allergic asthmatic mice. *Asthma Res Pract*. 2018;43. doi:10.1186/s40733-018-0040-y Cited in: PubMed; PMID 29568538.
231. Ning Y, Shang Y, Huang H, Zhang J, Dong Y, Xu W, Li Q. Attenuation of cigarette smoke-induced airway mucus production by hydrogen-rich saline in rats. *PLoS One*. 2013;8(12):e83429. doi:10.1371/journal.pone.0083429 Cited in: PubMed; PMID 24376700.
232. Wang S-T, Bao C, He Y, Tian X, Yang Y, Zhang T, Xu K-F. Hydrogen gas (XEN) inhalation ameliorates airway inflammation in asthma and COPD patients. *QJM*. 2020;113(12):870–5. doi:10.1093/qjmed/hcaa164 Cited in: PubMed; PMID 32407476.
233. Zhou H, Fu Z, Wei Y, Liu J, Cui X, Yang W, Ding W, Pan P, Li W. Hydrogen inhalation decreases lung graft injury in brain-dead donor rats. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32(2):251–8. doi:10.1016/j.healun.2012.11.007 Cited in: PubMed; PMID 23273744.
234. Noda K, Shigemura N, Tanaka Y, Bhama J, D'Cunha J, Kobayashi H, Luketich JD, Bermudez CA. Hydrogen preconditioning during ex vivo lung perfusion improves the quality of lung grafts in rats. *Transplantation*. 2014;98(5):499–506. doi:10.1097/TP.0000000000000254 Cited in: PubMed; PMID 25121557.
235. Zheng P, Kang J, Xing E, Zheng B, Wang X, Zhou H. Lung Inflation With Hydrogen During the Cold Ischemia Phase Alleviates Lung Ischemia-Reperfusion Injury by Inhibiting Pyroptosis in Rats. *Front Physiol*. 2021;12:699344. doi:10.3389/fphys.2021.699344 Cited in: PubMed; PMID 34408660.
236. Kawamura T, Huang C-S, Tochigi N, Lee S, Shigemura N, Billiar TR, Okumura M, Nakao A, Toyoda Y. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of lung transplant-induced ischemia/reperfusion injury in rats. *Transplantation*. 2010;90(12):1344–51. doi:10.1097/TP.0b013e3181fe1357 Cited in: PubMed; PMID 21048533.
237. Liu R, Fang X, Meng C, Xing J, Liu J, Yang W, Li W, Zhou H. Lung inflation with hydrogen during the cold ischemia phase decreases lung graft injury in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(9):1214–22. doi:10.1177/1535370214563895 Cited in: PubMed; PMID 25662956.
238. Jiang T, Yang W, Zhang H, Song Z, Liu T, Lv X. Hydrogen Sulfide Ameliorates Lung Ischemia-Reperfusion Injury Through SIRT1 Signaling Pathway in Type 2 Diabetic Rats. *Front Physiol*. 2020;11:596. doi:10.3389/fphys.2020.00596 Cited in: PubMed; PMID 32695008.
239. Abraini JH, Gardette-Chauffour MC, Martinez E, Rostain JC, Lemaire C. Psychophysiological reactions in humans during an open sea dive to 500 m with a hydrogen-helium-oxygen mixture. *J Appl Physiol (1985)*. 1994;76(3):1113–8. doi:10.1152/jappl.1994.76.3.1113 Cited in: PubMed; PMID 8005852.

240. Saitoh Y, Harata Y, Mizuhashi F, Nakajima M, Miwa N. Biological safety of neutral-pH hydrogen-enriched electrolyzed water upon mutagenicity, genotoxicity and subchronic oral toxicity. *Toxicol Ind Health*. 2010;26(4):203–16. doi:10.1177/0748233710362989 Cited in: PubMed; PMID 20203135.
241. Hirohisa Ono, Yoji Nishijima, Naoto Adachi, Masaki Sakamoto, Yohei Kudo, Kumi Kaneko, Atsunori Nakao, Takashi Imaoka. A basic study on molecular hydrogen (H₂) inhalation in acute cerebral ischemia patients for safety check with physiological parameters and measurement of blood H₂ level.
242. Qian L, Shen J, Sun X. Methods of Hydrogen Application. In: Sun X, Ohta S, Nakao A, editors. *Hydrogen Molecular Biology and Medicine*. Dordrecht: Springer; 2015. p. 99–107. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-017-9691-0_7 en.
243. Oharazawa H, Igarashi T, Yokota T, Fujii H, Suzuki H, Machide M, Takahashi H, Ohta S, Ohsawa I. Protection of the retina by rapid diffusion of hydrogen: administration of hydrogen-loaded eye drops in retinal ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51(1):487–92. doi:10.1167/iovs.09-4089 Cited in: PubMed; PMID 19834032.
244. Ignacio RM, Yoon Y-S, Sajo MEJ, Kim C-S, Kim D-H, Kim S-K, Lee K-J. The balneotherapy effect of hydrogen reduced water on UVB-mediated skin injury in hairless mice. *Mol. Cell. Toxicol*. 2013;9(1):15–21. doi:10.1007/s13273-013-0003-6
245. Kurokawa R, Seo T, Sato B, Hirano S-I, Sato F. Convenient methods for ingestion of molecular hydrogen: drinking, injection, and inhalation. *Med Gas Res*. 2015;513. doi:10.1186/s13618-015-0034-2 Cited in: PubMed; PMID 26504515.
246. Camara R, Huang L, Zhang JH. The production of high dose hydrogen gas by the AMS-H-01 for treatment of disease. *Med Gas Res*. 2016;6(3):164–6. doi:10.4103/2045-9912.191362 Cited in: PubMed; PMID 27867484.
247. Kurokawa R, Hirano S-I, Ichikawa Y, Matsuo G, Takefuji Y. Preventing explosions of hydrogen gas inhalers. *Med Gas Res*. 2019;9(3):160–2. doi:10.4103/2045-9912.266996 Cited in: PubMed; PMID 31552881.
248. Tamura T, Hayashida K, Sano M, Suzuki M, Shibusawa T, Yoshizawa J, Kobayashi Y, Suzuki T, Ohta S, Morisaki H, Fukuda K, Hori S. Feasibility and Safety of Hydrogen Gas Inhalation for Post-Cardiac Arrest Syndrome - First-in-Human Pilot Study. *Circ J*. 2016;80(8):1870–3. doi:10.1253/circj.CJ-16-0127 Cited in: PubMed; PMID 27334126.
249. Zhang L, Yu H, Tu Q, He Q, Huang N. New Approaches for Hydrogen Therapy of Various Diseases. *Curr Pharm Des*. 2021;27(5):636–49. doi:10.2174/1381612826666201211114141 Cited in: PubMed; PMID 33308113.
250. He Y, Zhang B, Chen Y, Jin Q, Wu J, Yan F, Zheng H. Image-Guided Hydrogen Gas Delivery for Protection from Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury via Microbubbles. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017;9(25):21190–9. doi:10.1021/acsami.7b05346 Cited in: PubMed; PMID 28557412.
251. Kobayashi E, Sano M. Organ preservation solution containing dissolved hydrogen gas from a hydrogen-absorbing alloy canister improves function of transplanted ischemic kidneys in miniature pigs. *PLoS One*. 2019;14(10):e0222863. doi:10.1371/journal.pone.0222863 Cited in: PubMed; PMID 31574107.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Karla Lehle, für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit unter ihrer Leitung am Universitätsklinikum Regensburg anfertigen zu können und für die wertvolle Hilfestellung und zielorientierten Diskussionen.

Ebenfalls danke ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Elke Eggenhofer für ihre Zusage als 2. Berichterstatterin.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Labors, besonders bei Frau Angelika Urbanek, bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Freundin Susanne Dykiert und meinen Eltern für deren verständnisvolle Unterstützung.