

Universität Ulm

Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung

Leitung: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Peter Radermacher

**Effekte einer therapeutischen Beatmung mit 100%igem
Sauerstoff in der Akutphase des hämorrhagischen
Schockes in einem Langzeitmodell im Schwein**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Elisabeth Friederike Knöller

geboren in Essen

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Peter Radermacher

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Miriam Kalbitz

Tag der Promotion: 12.07.2019

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Knöller E., Stenzel T., Broeskamp F., Hornung R., Scheuerle A., McCook O., Wachter U., Vogt J. A., Matallo J., Wepler M., Gässler H., Gröger M., Matejovic M., Calzia E., Lampl L., Georgieff M., Möller P., Asfar P., Radermacher P., Hafner S.: Effects of hyperoxia and mild therapeutic hypothermia during resuscitation from porcine hemorrhagic shock. *Crit. Care Med.* 44(5): 264–277 (2016)[58]

I INHALTSVERZEICHNIS

I INHALTSVERZEICHNIS	IV
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Hämorrhagischer Schock	3
1.1.1 Oxidativer und nitrosativer Stress	4
1.1.2 Entzündungsreaktion.....	6
1.2 Die Niere im hämorrhagischen Schock.....	7
1.2.1 H ₂ S-Metabolismus: ein sauerstoffsensitives System.....	8
1.3 Hyperoxie.....	10
1.4 Fragestellung.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1 Material	13
2.1.1 Tiere	13
2.1.2 Instrumentationsphase und Überwachung.....	14
2.1.3 Probenverarbeitung	18
2.1.4 Histologie	22
2.1.5 Datenauswertung.....	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Versuchsprotokoll	24
2.2.2 Perioperative Parameter	31
2.2.3 Parameterbestimmung aus Blut und Urin	34
2.2.4 Histopathologie, Immunhistochemie.....	39
2.3 Statistische Analyse.....	44
3 ERGEBNISSE.....	46
3.1 Überleben	46
3.2 Systemische Parameter.....	46
3.2.1 Hämodynamik	46
3.2.2 Blutgasanalyse und Metabolismus	50
3.2.3 Oxidativer und nitrosativer Stress	54
3.2.4 Systemische Entzündungsreaktion.....	56
3.3 Die Niere im hämorrhagischen Schock.....	61
3.3.1 Blutfluss und Parameter der Sauerstoffschuld	61
3.3.2 Nierenfunktion	64

3.3.3	Histopathologie	67
3.3.4	Immunhistologie.....	69
4	DISKUSSION	76
4.1	Das Tiermodell und die Tierintensivstation	76
4.2	Das Überleben	78
4.3	Die Organfunktion.....	79
4.3.1	Die Hämodynamik	79
4.3.2	Die Lungenfunktion	80
4.4	Metabolismus	82
4.5	Die Nierenfunktion.....	83
4.6	Oxidativer und nitrosativer Stress	85
4.7	Entzündungsreaktion.....	86
4.8	H ₂ S-Metabolismus: ein sauerstoffsensitives System.....	88
4.9	Limitationen	89
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
6	LITERATURVERZEICHNIS	93
	ANHANG	106
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	106
	TABELLENVERZEICHNIS	107
	DANKSAGUNG.....	108

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A/Aa	Arterie/ Arterien
Abb.	Abbildung
ANV	Akutes Nierenversagen
BGA	Blutgasanalyse
BMW-Schweine	Bretoncelles, Meishan, Willebrand
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EKG	Elektrokardiogramm
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
HES	Hydroxyethylstärke
HRP	horseradish peroxidase
I.E.	Internationale Einheit
I/E-Verhältnis	Inspiration/Expirationsverhältnis
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
M	Molare Masse
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOF	Multiorganversagen
mol	Mol, Stoffmenge
MZP	Messzeitpunkt
n	Fallzahl
NaCl	Natriumchlorid
NGAL	Neutrophilengelatine-assoziertes Lipocalin
NO	Stickstoffmonoxid
NoA	Noradrenalin
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Hyperoxidanion
ONOO ⁻	Peroxynitrit

p	p-Wert, Signifikanzwert
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck pCO ₂ Kohlendioxidpartialdruck
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
PiCCO	Pulse Contour Cardiac Output
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TBS(T)	Tris-buffered saline (with Tween 20)
TRIS	Trometamol
V/V _v	Vene/Venen
vs.	versus

1 EINLEITUNG

Der traumatisch-hämorrhagische Schock ist die Folge eines akuten, starken Blutverlustes nach einem Trauma und die häufigste Todesursache in der Altersgruppe unter 45 Jahren. [52, 118]

30-40% der Todesfälle durch ein Trauma sind auf nicht stillbare Blutungen in der akuten bzw. präklinischen Phase des hämorrhagischen Schockes (<24-48h) zurückzuführen. Zudem führt die Minderperfusion vitaler Organsysteme zu Gewebhypoxie. Hypoxie ist direkter Auslöser einer systemischen Entzündungsreaktion, die im Verlauf zu Multiorganversagen führen kann und für hohe, „späte“ (>48h) Mortalitätsraten verantwortlich ist [3, 42]. Auch die therapeutische Wiederherstellung des Blutflusses und damit die Reperfusion des hypoxischen Gewebes können zu einer Verstärkung der hyperinflammatorischen Reaktion durch oxidativen und nitrosativen Stress führen [3, 91]. Die Aufrechterhaltung einer adäquaten Sauerstoffversorgung im Gewebe und damit das Aufhalten dieser Kaskaden ist demnach das oberste Ziel in der notfallmedizinischen Versorgung.

Trotzdem raten Leitlinien derzeit zum Einsatz von möglichst niedrigen inspirativen Sauerstoffkonzentrationen [4]. Grund dafür sind die seit über einem Jahrhundert bekannten toxischen Eigenschaften von Sauerstoff [1, 19]. Hyperoxie führt zur Bildung radikaler Sauerstoffspezies, triggert Entzündung und beeinträchtigt die Oxygenierung des Blutes in der Lunge durch Shunt-Bildung [23, 32, 49]. Zudem scheint Hyperoxämie nach Kreislaufstillstand ein unabhängiger Risikofaktor für eine verschlechterte neurologische Erholung und Mortalität zu sein [54, 98].

Es fällt jedoch auf, dass deletäre Effekte hoher Sauerstoffkonzentrationen erst nach längerer Expositionsdauer (>24h) und/oder bei Einsatz schädlicher Beatmungsdrücke auftreten [15, 111]. Ein kurzzeitiger Einsatz (12-48h) in Kombination mit einer lungenprotektiven Beatmung scheint keine negativen, ja sogar positive Effekte auf das Schockgeschehen zu haben [8, 11, 18, 32, 41, 54, 123].

So konnte gezeigt werden, dass Hyperoxie auch bei reduziertem Hämoglobingehalt der Hypoxämie und Gewebhypoxie entgegen wirkt [53]. In verschiedenen Schockmodellen wurden positive Effekte auf den Kreislauf und eine daraus resultierend verbesserte Organfunktion und verminderte Gewebnekrose, sowie antiinflammatorische Wirkungen

nachgewiesen. In eigenen Studien an Schweinen in septischem Schock konnten antiapoptotische und antibiotische Effekte gezeigt werden [8, 11, 41].

Die ohnehin spärliche Literatur steht der Frage zum Einsatz einer Beatmung mit 100%igem Sauerstoff während der akuten Phase des hämorrhagischen Schockes ambivalent gegenüber.

Diese prospektive, randomisierte Studie diente der Überprüfung der Frage, ob eine 24stündige Beatmung mit 100%igem Sauerstoff in der akuten Phase nach hämorrhagischem Schock an einem klinisch relevanten Großtiermodell, den oxidativen und nitrosativen Stress verringern, und damit der Entstehung einer systemischen Entzündungsreaktion und eines Multiorganversagens entgegen wirken kann.

Durchgeführt wurden die Experimente an Schweinen, die aus einer Kreuzung aus Tieren der Stämme Bretoncelles, Meishan und Willebrand (BMW-Schweine) hervorgingen. Das Schwein ist dem Organismus des Menschen in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich. Ein entscheidender Unterschied ist die für Schweine sonst typische Neigung zur Hyperkoagulabilität. Durch einen genetischen Defekt entfällt dies bei der hier gewählten Kreuzung, wodurch eine möglichst genaue Simulation der pathophysiologischen Mechanismen des hämorrhagischen Schockes im Menschen ermöglicht werden sollte. Um eine Übertragbarkeit dieser präklinischen Studie auf die Klinik im Sinne eines translationalen Ansatzes zu ermöglichen, werden die Tiere in der institutseigenen Großtier-Intensivstation betreut.

1.1 Hämorrhagischer Schock

Als Schock wird eine kritische Minderdurchblutung vitaler Organsysteme bezeichnet, die zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und –nachfrage im Gewebe führt [7, 122]. Ein Verlust von mehr als 15% des Blutvolumens innerhalb einer halben Stunde führt in der Regel zum klinischen Bild eines Schockzustandes, welches durch folgende diagnostische Kriterien gekennzeichnet ist:

- Absinken des MAP unter 70mmHg, assoziiert mit reflektorischer Tachykardie
- Klinische Anzeichen einer Minderperfusion peripherer Gewebe (Kalt-schweißige, zyanotische Gliedmaßen, Absinken der Urinproduktion auf $<0,5\text{ml/kgKG/h}$, neurologische Ausfälle und Verwirrtheit, bis hin zur Bewusstlosigkeit)
- Umstieg der Zellen auf anaeroben Metabolismus, zu erkennen am Anstieg des Blut-Laktatlevels $>1,5\text{mmol/l}$ [64, 122]

Das oberste Ziel der Kompensationsmechanismen ist eine effiziente Durchblutung von Herz und Gehirn [48]. Der Blutdruckabfall bewirkt die Ausschüttung von Katecholaminen, die zum einen die Herzfrequenz und so das Herzzeitvolumen erhöht und zum anderen eine periphere Vasokonstriktion nach sich zieht. Die unterschiedliche Verteilung der Adrenozeptoren bewirkt eine Zentralisation des Blutvolumens zu Gunsten von Herz und Gehirn was zu Lasten der anderen Organe und Gliedmaßen geht [44]. Venöse Vasokonstriktion bewirkt einen vermehrten Rückstrom aus den Kapazitätsgefäßen [48].

Auf mikrozirkulatorischer Ebene zieht die Vasokonstriktion zusätzlich zur Hypotension einen weiteren Abfall der Gewebepfusion nach sich und damit der Versorgung mit Sauerstoff und energiereichen Substraten [3]. Die so entstehende Sauerstoffschuld des Gewebes scheint eine entscheidende Variable für den Schweregrad des hämorrhagischen Schockes und die Wahrscheinlichkeit eines hieraus entstehenden Multiorganversagens zu sein. Die Messung der Sauerstoffschuld selbst ist erschwert, Werte wie Laktat, Base excess (BE) und pH im arteriellen Blut scheinen jedoch geeignete Parameter zu sein [7, 97].

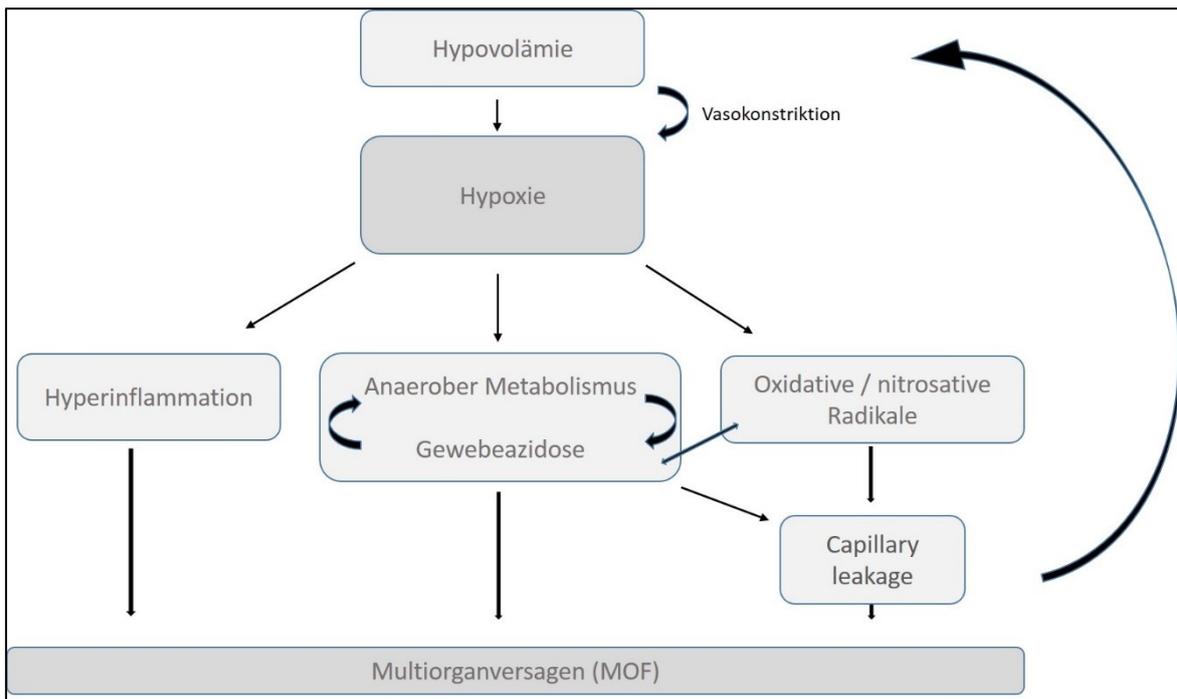


Abbildung 1 Hämorrhagischer Schock: Vereinfachte schematische Darstellung der zusammenhängenden Abläufe im Organismus. In Anlehnung an Angele et al. (2008) [3].

1.1.1 Oxidativer und nitrosativer Stress

Oxidativer und nitrosativer Stress tragen wesentlich zur Dekompensation nach Ischämie-/ Reperfusionsequenz bei [26].

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale sind instabile Moleküle mit ungepaarten Elektronen, die leicht mit anderen Molekülen reagieren, um selbst einen stabilen Zustand zu erreichen [74]. In der mitochondrialen Atmungskette entsteht das Superoxid-Radikal (O_2^-) als Nebenprodukt durch die Übertragung eines Elektrons auf ein Sauerstoffmolekül, anstatt auf den nächsten Reaktionspartner der Kette. Diese Bildung von Superoxid (O_2^-) wird durch zelluläre Hypoxie und Oxidantien-vermittelte Schäden an Mitochondrien verstärkt. Große Mengen an O_2^- werden zudem über die NADPH-Oxidase der Endothelzellen und einwandernden Leukozyten durch die Übertragung eines Elektrons von NADPH auf ein Sauerstoffmolekül im ischämischen Gewebe gebildet. Dieser Mechanismus dient normalerweise der Abwehr von Mikroorganismen, also dem Schutz des Organismus [88].

Ein weiteres Beispiel für ein Radikal stellt Stickstoffmonoxid (NO) dar. Im Endothel wird NO durch NO-Synthasen aus L-Arginin unter dem Verbrauch von O_2 und NADPH gebildet.

Als Gasotransmitter kann NO über die Membran diffundieren und so den umliegenden glatten Muskelzellen das Signal zur Relaxation vermitteln. In der akuten Phase des hämorrhagischen Schockes wird die Produktion von NO als Reaktion auf die schockassoziierte Vasokonstriktion rasch gesteigert. Später wird dieser Prozess vor allem durch proinflammatorische Zytokine unterhalten [40].

Normalerweise steht die physiologische Bildung von radikalen Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) im Gleichgewicht mit antioxidativen Valenzen [105]. Die während der Ischämiephase entstehende Gewebe-Hypoxie steigert jedoch die Bildung von ROS und RNS und antioxidative Valenzen werden aufgebraucht. In der anschließenden Reperfusionphase kommt es zu einer Verstärkung der Gewebeschäden und dadurch zu resultierenden Organfehlfunktion [36]. Eine bedeutende Rolle wird hierbei den radikalen Sauerstoffspezies zugeschrieben, die in kleinen Mengen bereits während der Ischämie-Phase gebildet werden, jedoch in großer Anzahl durch die Reperfusion und damit die Versorgung von zuvor hypoxem Gewebe mit Sauerstoff anfallen [62]. Werden die Kapazität der antioxidativen Valenzen und die Reparaturmöglichkeiten der Zelle überschritten, kommt es zu Schäden an Proteinen, Membranlipiden und DNA. Schäden an den Zellmembranen, vor allem des Endothels, führen zum Verlust der Barrierefunktion und konsekutiv zu Flüssigkeitsverlust in das Interstitium. Es ist zudem bekannt, dass oxidativer Stress durch verstärkte Sekretion proinflammatorischer Moleküle aus aktivierten Makrophagen direkt eine Immunsystemaktivierung nach sich zieht [93]. Inaktivierung endogener Katecholamine durch Oxidierung, sowie das Herabsetzen der Sensibilität des Endothels gegenüber Noradrenalin, verstärken die Hypotension [38, 88]. Gesteigerte Produktion von NO und Versagen der Atmungskette führen schließlich zu myokardialer Depression [131]. Durch den therapeutischen Einsatz von Katecholaminen, wie zum Beispiel Noradrenalin wird die Bildung von Superoxid Radikalen verstärkt [81, 102].

Vor allem für periphere Gewebe, wie die Niere spielt die Bildung von Radikalen im Schock eine wichtige Rolle. Hier sind sicher nicht allein die radikalen Sauerstoffspezies für eine Dekompensation nach Ischämie-/Reperfusionstrauma verantwortlich. In verschiedenen Tierstudien konnte die dauerhafte Reduktion der Nierenfunktion jedoch durch die systemische Gabe von antioxidativen Valenzen, wie z.B. der Superoxid Dismutase, deutlich reduziert werden [20, 26, 132].

1.1.2 Entzündungsreaktion

Bezeichnend für das Schockgeschehen ist eine Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems, unabhängig davon, ob ein Trauma zugrunde liegt oder die Hämorrhagie in einer sterilen Umgebung stattfindet [28]. Die Tatsache, dass der Mangel an Sauerstoff eine Entzündungsreaktion im gesamten Körper auslöst, ist allgemein akzeptiert. Patienten mit Höhenkrankheit oder nach Organtransplantationen beispielsweise zeigen hohe Zytokinlevel im Serum und Verschiebung von Flüssigkeit in den 3. Raum, was zu einem pulmonalen und zerebralen Ödem führen kann [28].

Hypoxie führt über die Aktivierung von Sauerstoff-regulierten Kaskaden, wie dem Hypoxie-induzierten Faktor (HIF-1 α /-1 β), zur Expression verschiedener pro-inflammatorischer Mediatoren, wie z.B. des nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF κ B). NF κ B liegt in der ruhenden Zelle inaktiv vor. Durch Aktivierung der Zelle transloziert es in den Kern, wo es selbst als Transkriptionsfaktor für einige inflammatorische Gene wirkt, unter anderem auch für TNF α [28]. TNF α trägt maßgeblich zur Hypotonie, Laktatazidose und respiratorischen Insuffizienz bei.

Neben den mechanischen Schäden durch das Trauma führt auch die Hypoxie zum Zelltod im Gewebe. Nekrotische Zellen sind hoch immunstimulierend und Komplement-aktivierend.

Die Reperfusion des Gewebes führt zur Einwanderung einer großen Zahl von Immunzellen, wie Makrophagen und Leukozyten. Diese tragen ihrerseits durch Ausschüttung von Lipasen, Proteasen, sowie reaktiver Sauerstoffspezies zur Schädigung des Gewebes bei. Während der Reperfusionsphase kommt es schlagartig zur Ansammlung großer Zellmengen [26]. Messbar sind diese Vorgänge, durch einen Anstieg von Zytokinen im Blut [28].

Durch gegenseitige Aktivierung und Potenzierung entwickelt sich eine überwältigende, autodestruktive Immunantwort mit hohen Zytokin-Konzentrationen. Eine verzögerte Inaktivierung dieser Vorgänge mündet schließlich in Immunsuppression und einer damit erhöhten Anfälligkeit für Sekundärinfektionen. Die Entwicklung eines Akuten Lungenschädigungs-Syndroms und eines Multiorganversagens mit hohen Mortalitätsraten können die Folge sein [3].

1.2 Die Niere im hämorrhagischen Schock

Ischämie ist eine wichtige Ursache für akutes Nierenversagen (ANV) bei Erwachsenen und eine schwere Komplikation des hämorrhagischen Schocks [127]. Das ANV ist mit einer Mortalität von 50-80% und einer Dialysepflicht von etwa 10% unter den Überlebenden assoziiert [65, 105]. Klinisch definiert ist akutes Nierenversagen durch Abfallen der Urinproduktion ($<0,5\text{ml/kgKG/h}$) und den Anstieg des Kreatininwertes im Blut [105, 122]. Diese Kriterien werden in der RIFLE-Klassifikation (Risk, Injury, Failure, Loss, End stage kidney disease) zur Stadieneinteilung herangezogen [9].

Diese besondere Empfindlichkeit des Nierengewebes gegenüber ischämischen Ereignissen hat mehrere Gründe. In Ruhe erhalten die Nieren zusammen etwa 20% des Herzzeitvolumens und zählen damit zu den am stärksten durchbluteten Organen des Körpers. Der hämorrhagische Schock führt zu einer Reduktion der Durchblutung im Nierengewebe bis auf 5-10% des Normalwertes [91].

Durch die komplexe Anordnung des renalen Gefäßsystems ergibt sich ein Sauerstoffgradient von der Rinde in Richtung der Papillen [108]. Aus den Vasa efferentes der Glomeruli an der Mark-Rinden-Grenze entspringen die Artereolae rectae, die wiederum strahlenförmig in Richtung der Papille ziehen. Sie versorgen das Mark und gehen dann U-förmig in die Venae rectae über. Durch eine Parallelschaltung dieser Gefäßabschnitte mit dem Pars rectae des Tubulussystems kann ein Diffusionsgradient aufgebaut werden, der für die Harnkonzentration und den Sauerstoffaustausch essentiell ist. Eine adäquate Gewebeoxygenierung des Markes hängt also von einer guten Durchblutung der Rinde ab. Trotzdem beträgt auch unter physiologischen Bedingungen der Anteil der Nierendurchblutung, der ins Mark gelangt, nur etwa 10% [65].

Die Zellen jedes Bereiches haben ihren Metabolismus an das Sauerstoffangebot in ihrer Mikroumgebung angepasst [108]. Besonders anfällig für hypoxische Ereignisse sind die Zellen der korticomedullären Übergangzone und die Tubuluszellen. Auf Grund ihrer Abhängigkeit von aerober Glykolyse besteht hier ein besonders hoher Sauerstoffbedarf [105].

Erschöpfung der Energiereserven führt zu einem Kollaps verschiedener energieabhängiger Systeme, wie z.B. der Ionenpumpen, was zu drastischen Veränderungen der Elektrolytkonzentrationen innerhalb der Zelle führt [68]. Vor allem der Anstieg der

Kalzium-Konzentration hat deletäre Effekte. Durch Umorganisation von Membranproteinen wie z.B. der Na^+/K^+ -ATPase kommt es zum einen zum Verlust der Zellpolarität und zum anderen zu verminderter Na^+ -Absorption im proximalen Tubulus. Natrium wird stattdessen im distalen Tubulus aufgenommen und führt durch eine Feedback-Schleife zu präglomerulärer arteriöler Vasokonstriktion, sodass der Blutfluss weiter gedrosselt wird. Zusammen mit den Transportern lösen sich auch z.B. Integrine ab, wodurch die Zelle den Kontakt zu der Basalmembran verliert. Zellen werden mit dem Urin hinausgespült oder verstopfen die Glomeruli, was zu Rückstau und weiterer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate führt. Die geschädigten Zellen exprimieren Chemokine, Zytokine und Adhäsionsmoleküle für Leukozyten, was zu einer Verstärkung der Entzündung beiträgt.

Intrarenale Vasokonstriktion wird durch das aktivierte Renin-Angiotensin-System verstärkt. Auch das geschädigte Endothel gibt Endothelin frei und kann gleichzeitig die Produktion vasodilatatorischer Mediatoren wie NO und Prostaglandine nicht aufrechterhalten.

Reperfusion kann schließlich zu noch stärkerer Beeinträchtigung des Gewebes führen. Die Entzündung wird durch Zufluss von Leukozyten, Plasmaproteinen und aktiviertem Komplement verstärkt [63]. Zytoskelettale Schädigung, Azidose, Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und die Aktivierung proteolytischer und phospholipolytischer Wege sind die Folge. Histologisch erkennbar sind geschwollene Zellen, abgelöste Zellen im Tubuluslumen, Proteinzyklern aus Tamm-Horsfall Protein, unter Umständen Hämoglobin und anderen Plasmaprotein und schließlich Apoptose und Nekrose [63, 68].

1.2.1 H_2S -Metabolismus: ein sauerstoffsensitives System

Ähnlich wie Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO) ist Schwefelwasserstoff (H_2S) ein Gasotransmitter im menschlichen Körper und spielt eine wichtige Rolle in der Vasorelaxation und in inflammatorischen Kaskaden [16, 90]. Es wurden ihm sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen [22, 27, 126, 133]. Weiterhin wurde gezeigt, dass H_2S zum einen selbst als Antioxidans wirkt, zum anderen aber auch die Kreisläufe anderer Antioxidantien wie beispielsweise Glutathion reguliert [126].

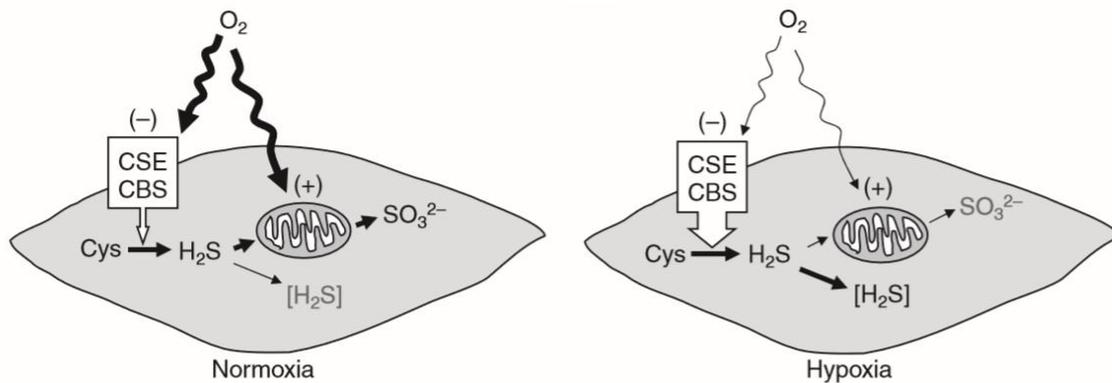


Abbildung 2 Schematische Darstellung der sauerstoffabhängigen Bildung von Schwefelwasserstoff (H₂S). Mit freundlicher Genehmigung des Journal of Experimental Biology [86]

Es sind 3 Enzyme bekannt, die eine wesentliche Rolle in der H₂S-Produktion spielen: Cystathionin- γ -Lyase (CSE), Cystathionin- β -Synthase (CBS) und 3-Mercaptopyruvat Sulfurtransferase (MST). Es wurde gezeigt, dass die Expression von CBS und CSE gewebsspezifisch ist: CBS wird vor allem im Gehirn exprimiert, während CSE im gesunden Organismus in peripheren Geweben wie der Niere konstitutiv nachweisbar ist. Es wurde gezeigt, dass die Expression von CSE im Nierengewebe essenziell für die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion im Schockgeschehen ist. Das Maß einer Reduktion der Expression korrelierte mit der Einschränkung der Nierenfunktion [77]. MST wurde erst vor wenigen Jahren entdeckt. Bisher ist jedoch noch nicht erwiesen, ob es tatsächlich auch einen relevanten Beitrag zur H₂S-Produktion bei Säugern leistet [90].

Olson et al. postulierten den H₂S- Metabolismus als sauerstoffsensitives System. CSE generiert H₂S aus L-Cystein im Zytosol. Steht Sauerstoff zur Verfügung, wird H₂S anschließend in den Mitochondrien zu SO₃²⁻ und SO₄²⁻ (Sulfit und Sulfat) oxidiert. Ist das Sauerstoffangebot zu gering, ist dieser Schritt nicht möglich und die H₂S-Konzentration steigt. Somit ergibt sich ein gegensätzliches Verhältnis von Sauerstoffangebot und H₂S-Konzentration im Gewebe. Interessanterweise scheint das Enzym sogar selbst eine sauerstoffabhängige Untereinheit zu besitzen [86]. Bisher gibt es jedoch kaum Daten über einen Zusammenhang der Expression dieser Enzyme und Hyperoxie [77].

Ein Maß für die Auswirkung von Hyperoxie auf das Gewebe soll neben der Immunhistologie unter anderem die Expression des Schwefelwasserstoff-(H₂S)-generierenden Enzyms Cystathionin- γ -Lyase (CSE) sein.

1.3 Hyperoxie

Sauerstoff ist für jede Zelle des Körpers essentiell. Die deletären Effekte der Hypoxämie und Gewebhypoxie wurden bereits erwähnt: Sauerstoffmangel ist Ursache für Azidose, oxidativen und nitrosativen Stress, sowie direkter Auslöser einer lokalen und systemischen Entzündung [3, 88]. Es kommt zu kritischer Reduktion der intrazellulären Sauerstoffkonzentration, was die mitochondriale Funktion beeinträchtigt und so zelluläre Abläufe und die Integrität der Zellmembranen stört. Das Ausmaß der Gewebhypoxie und der folgenden Prozesse beeinflusst entscheidend den Outcome des hämorrhagischen Schockes [11].

In der Klinik und vor allem in Notfalleinsätzen wird Sauerstoff ubiquitär eingesetzt. Auch in der eingeschränktesten Ausrüstung ist Sauerstoff in der Regel vorhanden, als Atemgas leicht zu dosieren und vergleichsweise günstig [10]. Die logische Konsequenz erscheint daher die Erhöhung der Sauerstoffzufuhr. Die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der Atemluft wird allerdings in der Literatur kontrovers diskutiert. Grund hierfür sind die seit über einem Jahrhundert bekannten toxischen Eigenschaften von Sauerstoff [15, 19]. Sauerstoff ist ein potenter Vasokonstriktor und führt nachweislich zu verminderter Perfusion von peripherem Gewebe [25, 87, 100]. Da es im Schockzustand bereits zu Minderperfusion in der Peripherie und schließlich in lebenswichtigen Organen kommt, wäre eine weitere Senkung der Durchblutung deletär [23]. In der Tat bewirkt eine Beatmung mit 100%igem Sauerstoff einen Anstieg des Blutdruckes durch periphere Vasokonstriktion und nachfolgend zu einer Abnahme von Herzfrequenz und Herzzeitvolumen [23, 32].

Die Auswirkungen von Hyperoxie auf regionale Gefäßbetten sind noch wenig erforscht. Es wurde unter stabilen hämodynamischen Bedingungen jedoch gezeigt, dass der Blutfluss in Gehirn, Koronarien und Extremitäten unter hyperoxischen Bedingungen sinkt. Als Mechanismus dahinter wird die Reduktion der Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid durch Sauerstoffradikale vermutet [78].

Hohe Sauerstoffkonzentrationen verstärken die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. In der durch Hyperoxie ausgelösten Entzündungsreaktion, produzieren aktivierte Makrophagen, Thrombozyten und Neutrophile große Mengen ROS. [49]. Hierdurch kommt es zur Entkopplung der mitochondrialen Atmungskette und Reduktion der ATP Synthese [6]. Die Balance von Radikalen und antioxidativen Valenzen wird gestört [18, 49]. Dadurch kommt

es zunehmend zu Schäden an Proteinen, Enzymen, Membranlipiden und der DNA [10]. Durch diese Abläufe scheint substituierter Sauerstoff bei gesunden Probanden mit einer Sättigung über 90% den Sauerstofftransport in periphere Gewebe nicht verbessern zu können. Erst bei einer Sättigung unter 90% kann der Sauerstofftransport durch hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen beispielsweise im Myokard gesteigert werden [23]. Für die meisten Situationen in der Klinik wird daher eine Sauerstoffsubstitution erst bei einer Sättigung unter 94% und bei Dyspnoe empfohlen [6]. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass Hyperoxie Hypoxämie und Gewebhypoxie, wie sie im hämorrhagischen Schock herrschen, entgegen wirken kann [25]). Hämodynamik und Organfunktion konnten in verschiedenen Modellen eines systemischen Schockes, wie z.B. Sepsis [8], Hämorrhagie [12, 117], kritische Hämodilution [79] und Ischämie-/Reperusionsmodell [114] damit verbessert werden.

Beatmung mit 100%igem Sauerstoff konnte durch anti-inflammatorische und antimikrobielle Eigenschaften die systemische Entzündungsreaktion im septischen Schock mildern [8, 23]. In institutseigenen Experimenten zu Beatmung mit 100% Sauerstoff für 24h im Rahmen eines frühen septischen Schockes konnte jedoch keine Verstärkung des oxidativen Stresses beobachtet werden. Apoptose in Leber- und Lungengewebe war wesentlich reduziert [8]. Fujita et al zeigten sogar eine Reduktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in einem I/R-Setting durch eine inspiratorische Sauerstoffkonzentration von 100% [33].

1.4 Fragestellung

Aus den bisher zusammengefassten Erkenntnissen ergeben sich folgende Fragestellungen, die beantwortet werden sollten:

1. Kann durch die Verwendung von 100%igem Sauerstoff in der akuten Phase nach Induktion eines nahezu letalen hämorrhagischen Schockes die Hämodynamik positiv beeinflusst und so die Durchblutung des Gewebes verbessert werden?
2. Zeigt sich hierdurch ein Effekt auf die metabolische Situation?
3. Kann durch die Beatmung mit purem Sauerstoff die Entzündungsreaktion und Entwicklung des oxidativen Stresses gelindert und die Entwicklung eines Multiorganversagens aufgehalten werden?
4. Ist eine Minderung der Organdysfunktion und der Gewebeschäden am Beispiel der Niere zu erreichen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Tiere

Die Versuche wurden an jeweils 9 Schweinen einer speziellen Kreuzung aus Tieren der Stämme Bretoncelles, Meishan und Willebrand (BMW-Schweine) beiderlei Geschlechts durchgeführt. Das Geschlecht wurde bei der Auswahl der Tiere nicht berücksichtigt, da vorangegangene Experimente unserer Arbeitsgruppe gezeigt hatten, dass es keinen Einfluss auf die von uns gemessenen Faktoren hatte [109].

Die Tiere wiesen eine Genmodifikation des von-Willebrand-Faktors auf, wodurch dessen Aktivität mit der des von-Willebrand-Faktors beim Menschen vergleichbar wurde [83]. Hierzu erfolgte eine randomisierte Zuteilung der Tiere zu der Kontroll- beziehungsweise Hyperoxiegruppe. So ergeben sich folgende Fallzahlen:

Kontrollgruppe n=9 Tiere

Hyperoxiegruppe n=9 Tiere

Die Tiere waren 12-18 Monate alt und das durchschnittliche Gewicht betrug 74kg (54;80) in der Kontrollgruppe und 65kg (60;69) in der Hyperoxiegruppe.

2.1.2 Instrumentationsphase und Überwachung

Geräte

Absaugpumpe	Wisa Absaugpumpe	W.Sauber GmbH&CoKG, Wuppertal, DE
Beatmungsgerät	Servo ⁱ Ventilator System	Maquet Critical Care AB, Solna, Schweden
Blutgasanalyse-Gerät	ABL System 625	Radiometer, Copenhagen, Dänemark
COLD-System	Pulsion COLD Z-021®	Pulsion Medical Systems, München, DE
Eismaschine	S-No. 117165	Ziegra Eismaschinen, Isernhagen, DE
Flowmeter- Monitoringseinheit	Datex-Ohmeda S5 D- LCC15	Planar Systems Inc., Oregon, USA
Flusskopf	Transsonic® Flowprobe8SB, 3SB, 4SB	Transonic Systems Inc., New York; USA
Infusomaten	Infusomat® fm	B. Braun, Melsungen, DE
Injektomat	Infusomat® securap	B. Braun, Melsungen, DE
Kühlschrank	SN ST 1021	LIEBHERR, Bulle, Schweiz
Minimalinvasives hämodynamisches Monitoring	PICCO® Plus	Pulsion Medical Systems, München, DE
Pulsoxymeter	Radical-7 Signal Extraction Pulse CO-Oximeter MASIMO SET®	Masimo Corporation, Irvine, USA
Stabile Isotopen Messung	HeliFans-System	Fischer Analysen Instrumente GmbH, Leipzig, DE
Ultraschallflussmesseinheit	Small Animal Blood Flowmeter T206	Transonic Systems Inc., New York; USA

Umlaufkühler	Umlaufkühler Julabo FC 600S	Julabo, Seelbach, DE
---------------------	--------------------------------	----------------------

Infusionszubehör und sonstige Materialien

ACD Transfusionsbeutel	MacoPharma Blutbeutel CPD, 500ml	MacoPharma, Mouvaux, Frankreich
Dreiwegehähne	Discofix® 3SC	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Infusomat-Leitungen	Original Infusomat®- Leitung	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Kathetersysteme		
	Coolgard Katheter: ICY® Intravascular Heat Exchange Catheter Kit (3lumens) 9,3Fr., IC- 3893AE	Zoll Circulation, Sunnyvale, CA, USA
	High flow Angiographic Catheter 7F, 100cm	Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
	Introducer Kit, 4F	Pulsion Medizintechnik, München, DE
	Peripherer Venenkatheter (Ohr): Vasofix Braunüle, 18G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
	Pulsiocath, 5F Thermodilutions-Katheter	Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland
	RIC® Rapid Infusion Catheter Exchange Set 8,5 Fr., RC-09850	Arrow International, PA, USA
	Super Arrow-Flex®PSI Set 5Fr. CP-07511	Arrow International, PA, USA

	Super Arrow-Flex® Percutaneous Sheath Introducer Set 10Fr., CL-07011	Arrow International, PA, USA
	Thermodilutionskatheter mit AMC Thromboshield, 7.5 F	Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, USA
	Zentraler Venenkatheter: MAC™ Two-Lumen Central Venous Access Set 9Fr., SI-11142	Arrow International, PA, USA
Magensonde	Duodenalsonde nach Levin	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Perfusor-Leitungen	Original Perfusor®-Leitung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Perfusor-Spritzen	Original-Perfusor® Syringe 50ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Spritzen	Injekt®, 2-20ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
	BD Plastipak™, 1ml Luer	Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien
	BD 10ml Syringe, Luer-Lok™Tip	BD, NJ, USA
Suprapubischer Dauerkatheter- Cystofix	Freka®Cyst Standard 8cm- CH10	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE
Transfusionsbesteck	Sangofix®B 9G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Tubus	Trachealtubus 7,5; Lo- Contour™ Magill	Mallinckrodt Medical, Athlone, Ireland
Urinbeutel	Sekretbeutel 1500ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

Medikamente und Infusionen

Amiodaron	Amiodaron-hameln 50 mg/ml	Hameln pharma plus GmbH Hameln, DE
Aqua	Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Atropin	Atropinsulfat	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Azaperon	Stresnil®	Janssen Animal Health, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, DE
Buprenorphin	Temgesic®	Reckitt Benckiser Healthcare (UK) Ltd., Hull, UK
Cafedrin + Theodrenalin	Akrinor®	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE
Esketamin	Ketanest®S,	Pfizer Pharma GmbH, Berlin, DE
Glucose	Glucose 40%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Heparin	Heparin-Natrium Braun „Multi“, 10 000 I.E./ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Hydroxyethylstärke	Vitafusal®6%	Serumwerk, Bernburg, DE
Indocyaningrün	ICG-Pulsion®	Pulsion Medical Systems SE, Feldkirchen; DE
Kaliumchlorid	1 M-Kaliumchlorid-Lösung 7,46%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., DE
Metoprololtartrat	Lopresor®,	Recordati Pharma, Ulm, DE
Midazolam	Midazolam-ratiopharm®	Ratiopharm, Ulm, DE
Natriumchlorid	NaCl 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

Norepinephrin	Arterenol®,	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, DE
Pancuronium	Pancuronium duplex- Actavis	Actavis Deutschland GmbH & Co. KG, München, DE
Pentobarbital	Narcofen®	Merial GmbH, Hallbergmoos, DE
Propofol	Propofol-Lipuro 2%	B. Braun, Melsungen, DE
Sauerstoff		MTI Industriegase Ulm, DE
Vollelektrolytlösungen	Jonosteril® Infusionslösung	Fresenius Kabi Bad Homburg v.d.H. DE
	Ringerlösung Fresenius	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H., DE

2.1.3 Probenverarbeitung

Laborgeräte

Eismaschine	Scotsman AF80 Ice Flaker	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Elektrophorese	Mini-Protean Tetra cell	Bio-Rad, München, DE
Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT Basic	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Heizblock	Mixing Block MB-102	BIOER, Biozym Scientific GmbH, Olendorf, DE
Heizrührer	RTC Basic	IKA Labortechnik, Staufen, DE
Kühlschrank	Glass Line	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop	Olympus BX41 U-LH100HG U-RLF-T	Olympus, Tokyo, Japan
Mikrowelle	Bosch Mikrowellenherd 842C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen, DE

Nitratanalysegerät	Sievers 280 NOA	FMI GmbH, Seeheim/ Ober-Beerbach, DE
Photo Prozessor	Photo Prozessor	Eastman Kodak Company, Rochester, USA
pH-Meter	Mettler MP220	Mettler Toledo, Giessen, DE
Pipetten	Pipetten 10-1000µl	Eppendorf Research, Hamburg, DE
Spannungsversorgung	Consort E835	LTF Labortechnik, Wasserburg/ Bodensee, DE
Vortex-Schüttler	REAX2000	Heidolph, Schwabach, DE
Waage	Mettler Toledo, XS603S	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, DE
Wasserbad	Haake C1	FMI GmbH Seeheim/Oberberrbach, DE
Zentrifuge I	Rotina 38R	Hettich Lab Technology Tutlingen, DE
Zentrifuge II	Biofuge 13R	Heraeus Sepatech, Osterode, DE

Labormaterialien

Bechergläser		Schottglas Mainz, DE
Calorimetrie	Quark RMR	Cosmed Pulmonary Function Equipment Srl Rom, Italien
Deckgläser		Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Erlenmeyerkolben		Schottglas, Mainz, DE
Küvetten	Färbeküvetten (nach Hellendahl)	VWR International, Darmstadt, DE

MATERIAL UND METHODEN

	Küvette 4ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Micro Test Tubes 1,5 ml		Eppendorf, Hamburg, DE
Monovetten	Coagulation 5ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
	EDTA K 2,7ml	
	Li-Heparin 2,7ml	
	Li-Heparin 9ml	
	Serum Z 2,7ml	
	ThromboExact 2,7ml	
Multiadapter	Multiadapter lang	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Objekträger		Marienfeld, Lauda- Königshofen, DE
Pipetten	Eppendorf Reference® : 0,5-10, 10-100, 100-1000	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipettenspitzen	Eppendorf Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Probengefäß 20ml		Sarstedt, Nümbrecht, DE
Röntgenkassette		Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England
Saranfolie		Dow Chemical Company, Schwalbach, DE
Zentrifugen-Röhrchen	Zentrifugen-Röhrchen 14ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE

Chemikalien

Acrylamid EC-890		Fa. National Diagnostics, Hesse, UK
Ammoniumpersulfat #A7460		Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
DMSO		Merck, Darmstadt, DE
Ethanol		Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ethidiumbromid		Carl Roth, Karlsruhe, DE

Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
LMP-Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
MEEO-Agarose	Merck, Darmstadt, DE
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Na₂-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Natriumnitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Natronlauge 1M	Merck, Darmstadt, DE
PBS-Puffer	Invitrogen Cooperation, Paisley, Schottland
Salzsäure 1M	Merck, Darmstadt, DE
Stickstoff, gasförmig und flüssig	MTI Industriegase, Ulm, DE
Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Vanadiumchlorid	Merck, Darmstadt, DE

ELISA und Analysekits

Photometer	Sunrise®	Tecan Group Ltd., Männerdorf, Schweiz
ELISA-Kits		
Gesamtprotein im Plasma	SYS1 BM/Hitachi 704/911	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Kreatinin	Creatinine CR 511 / CR 528	Randox Laboratories Limited, Crumlin, County Antrim, UK
IL-1β	Qantikine®-ELISA Porcine IL-1 β	R&D Systems, Europe Ltd, Abingdon, UK

IL-6	Qantikine®-ELISA Porcine IL-6	R&D Systems,Europe Ltd, Abingdon, UK
IL-10	Qantikine®-ELISA Porcine IL-10	R&D Systems,Europe Ltd, Abingdon, UK
8-Isoprostane	8-Isoprostane EIA Kit	Cayman Chemical, Ann Abror, Michigan, USA
NGAL	Pig NGAL ELISA Kit	BioPorto Diagnostics A/S, Gentofte, Dänemark
TNFα	Qantikine®-ELISA Porcine TNF- α	R&D Systems,Europe Ltd, Abingdon, UK
Troponin-I	Pig Cardiac Troponin-I ELISA Kit	Life Diagnostics, Inc., West Chester, UK

2.1.4 Histologie

Standardfärbungen

Aqua dest.	Veolia Water solutions and technologies, Saint Maurice, Frankreich
ETOH (99,9%) (Ethanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Meyer's acid hemalaun	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Neo-Mount®	Merk, Darmstadt, Deutschland
PBS (phosphate buffered saline) 50 mM Natriumphosphat; pH 7,4; 200 mM NaCl	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Periodsäure- Lsg	Sigma-Aldrich, Runnymede, UK
Schiff's Reagenz	Sigma-Aldrich, Runnymede, UK
Xylol	VWR Prolabo 28975.325; Batch: 09F150516

Immunhistochemie

Sekundärantikörper	Goat anti rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Sekundärantikörper	Horse anti mouse	Cell Signaling Technology, New England BioLabs, Frankfurt a.M. Deutschland
Anti-Nitrotyrosine		Millipore™, Billerica, MA, USA
Anti-CSE		Abcam, Berlin, Deutschland
Anti-Caspase 3		Cell Signaling Technology, New England BioLabs, Frankfurt a.M. Deutschland
Anti-Albumin		Abcam, Berlin, Deutschland

2.1.5 Datenauswertung

GraphPad Prism 6®	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Microsoft Office / 365 Home Premium	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Windows 7	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Zeiss Axio Vision Software rel 8.4	Zeiss, Jena, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsprotokoll

Die Durchführung der Versuche erfolgte nach den Vorgaben der deutschen und europäischen Richtlinien zum Umgang mit Labortieren. Das Versuchsprotokoll (Antrag Reg.-Nr. 1087) wurde vom Tierschutzausschuss der Universität Ulm und dem Regierungspräsidium Tübingen, Baden Württemberg, genehmigt

In Abbildung 3 ist der Versuchsaufbau gezeigt. Die Versuchsdauer betrug 34 Stunden.

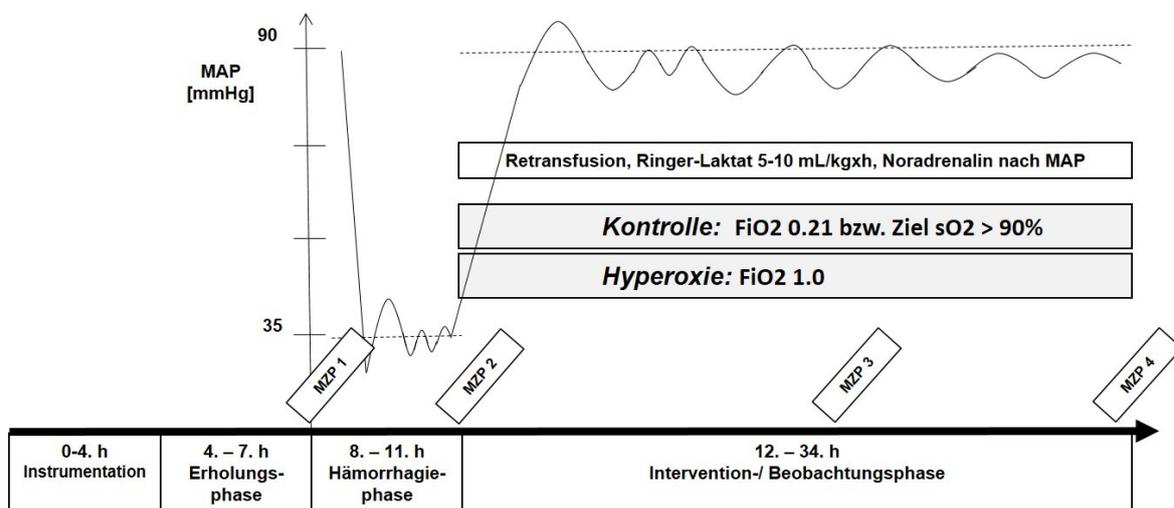


Abbildung 3 Schematischer Versuchsablauf. Nach einer standardisierten Vorbereitung begann der Versuch mit der 4 stündigen Instrumentierungsphase. Es folgte eine Erholungszeit, nach der die 4 stündige Hämorrhagie mit anschließender Reperfusion und Intervention eingeleitet wurde. Die Beobachtungsphase dauerte 22 Stunden. An das Versuchsende schlossen sich Organ-Entnahme und -Aufbereitung an. MAP = mittlerer arterieller Druck, MZIP = Messzeitpunkt. Universität Ulm 2014.

Durchgeführt wurden die Versuche an je 9 BMW (Bretoncelles, Meishan, Willebrand) Schweinen, die randomisiert der Kontroll-, beziehungsweise Interventionsgruppe zugeordnet wurden. In der Interventionsgruppe betrug die Sauerstoffkonzentration der Einatemluft ab der Reperfusionsphase 100%, während sie in der Kontrollgruppe 30% betrug, beziehungsweise nach Sauerstoffsättigung angepasst wurde (Ziel war eine Sättigung über 90%).

Vorbereitungsphase

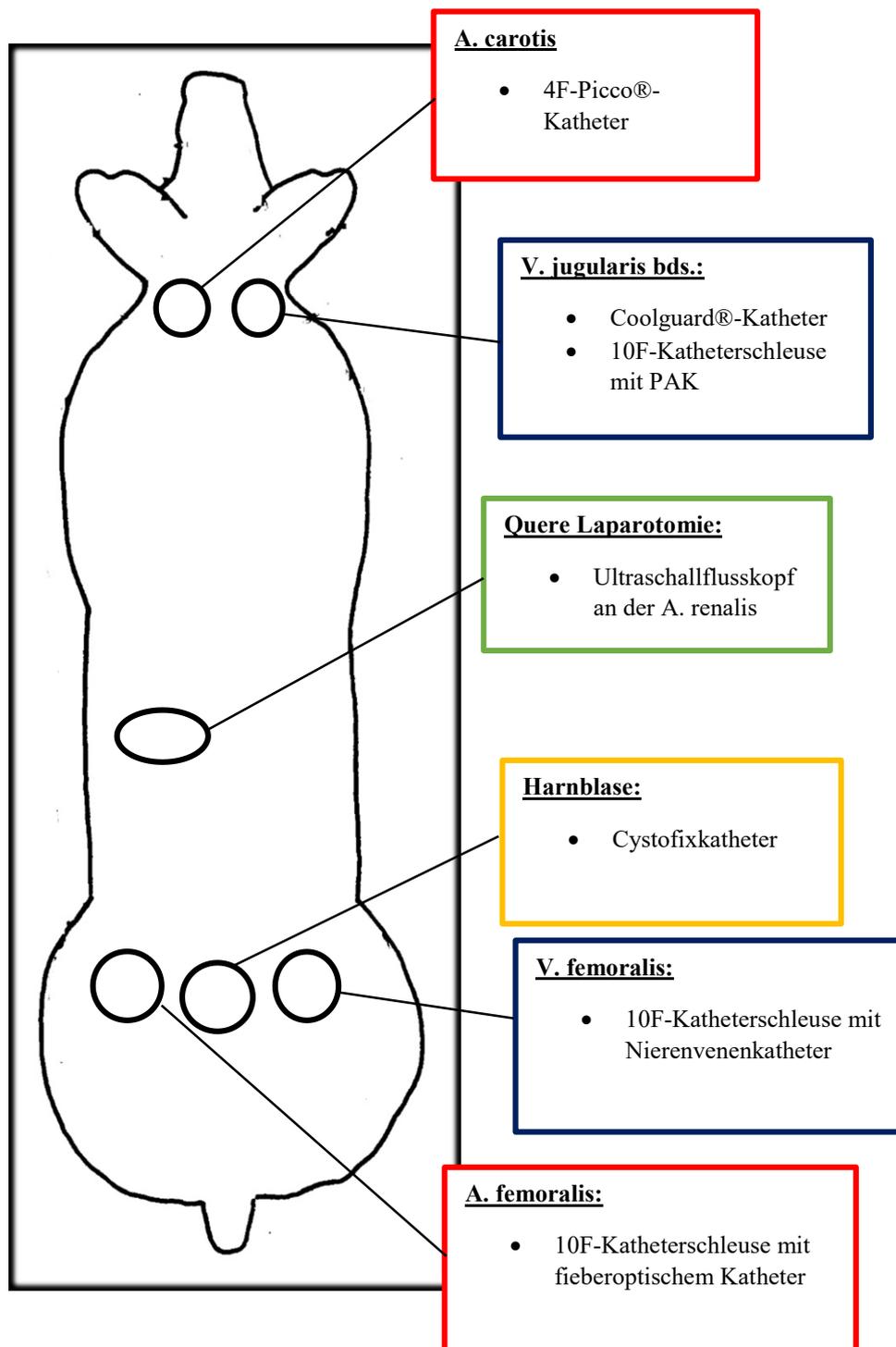
Am Morgen des Versuches wurde das jeweilige Tier in einer eigens für diese Versuche angefertigten Transportbox verladen und gewogen. So konnte schon vor Ort gewichtsabhängig prämediziert werden, um einen möglichst schonenden Transport in die institutseigene Tier-Intensivstation (Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung Helmholtzstraße 8/1 89081 Ulm) zu gewährleisten. Dazu wurden intramuskulär Azaperon (5mg/kgKG), und Midazolam (0,5mg/kgKG) verabreicht.

Zur Einleitung der Narkose wurden unter Sauerstoffgabe und Sättigungskontrolle, über eine Verweilkanüle in einer Ohrvene, Propofol (1-2mg/kgKG) und Ketamin (0,5-1mg/kgKG) verabreicht.

Die Aufrechterhaltung der Narkose gewährleistete eine kontinuierliche Gabe von Pentobarbital (8mg/kgKG/h) und Buprenorphin (initial 30µg/kgKG, dann 10µg/kgKG achtstündlich und bei Bedarf, also z.B. bei Tachykardien und Blutdruckanstieg), sowie Pancuronium (0,1 mg/kg/h) zur Muskelrelaxation. (Barth 2008). Eine Muskelrelaxation wurde durchgeführt, um Veränderungen der Beatmungsparameter durch die Änderung der Thoraxwandcompliance auszuschließen. Die Lagerung erfolgte in Rückenlage. Nach endotrachealer Intubation (Tubusgröße 8,5mm Innendurchmesser) wurde das Tier an die Überwachungseinheit angeschlossen. EKG-Ableitungen nach Einthoven erfolgten an den Extremitäten über Clips, ein Pulsoxymeter zur Kontrolle der Sauerstoffsättigung wurde an einem Ohr angebracht, und eine Temperatursonde rektal eingeführt. Um während der Narkose einen Reflux mit der Gefahr einer stummen Aspiration zu vermeiden, wurde eine Magensonde gelegt und etwaiger Mageninhalt abgelassen.

Instrumentierungsphase

Die Abbildung 4 zeigt ein Schema der Instrumentierung.



A. = Arterie, V. = Vene, bds. = beidseits, PAK = Pulmonal-Arterien-Katheter

Abbildung 4 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Auflistung der verwendeten Katheter.
Mit freundlicher Genehmigung von Rouven Hornung.

Die für die Instrumentierung vorgesehenen Körperstellen wurden gewaschen, desinfiziert und steril abgedeckt. Nun folgte die Präparation und Darstellung der benötigten Gefäße zur Einführung der Messinstrumente, beginnend mit der linken Arteria carotis. Nach der Seldinger-Technik erfolgte hier das Einführen eines 4F Thermodilutionskatheters über eine Schleuse. Mit Hilfe der Thermodilutionsmethode und Pulskonturanalyse ließen sich so der mittlere arterielle Druck (MAP), das Schlagvolumen, sowie das intrathorakale und enddiastolische Volumen über den gesamten Versuch ermitteln. Auf diese Weise war es auch möglich, den Volumenstatus und die kardiale Vorlast während des Versuches zu beurteilen [35, 84].

Beide Venae jugulares wurden freipräpariert und mit Schleusen versehen. Darüber wurde rechts ein zweilumiger Coolgard-Katheter eingeführt, über den eine Injektion der Kühlflüssigkeit zur Einstellung der Körpertemperatur erfolgte. Über einen extrakorporalen Wärmeaustauscher wurde so die Körpertemperatur während des gesamten Versuches bei 38°C gehalten. Die linke Vena jugularis wurde mit einem Pulmonalarterienkatheter versorgt, über den das Herzzeitvolumen (HZV), der Zentralvenöse Druck (ZVD) und der pulmonalarterielle Verschlussdruck (Wedge-Druck, PCWP) ermittelt werden konnte (siehe unten), sowie die Gabe von Medikamenten erfolgte.

Nach einer rechtsseitigen, queren Laparotomie wurden die Nierengefäße dargestellt. Zur kontinuierlichen Aufzeichnung der Nierenperfusion wurde um die Arteria renalis ein Ultraschallfluss-Messkopf angebracht. Ein über die linke V. femoralis bis in die V. renalis vorgeschobener Katheter, diente während der Messzeitpunkte der Entnahme von renalvenösen Blutproben. Es folgte ein dreischichtiger Bauchdeckenverschluss.

Ein suprapubischer Blasenkatheter ermöglichte die Überwachung der Urinproduktion und damit indirekt der Nierenfunktion.

Nach Verschluss aller Inzisionen folgte eine vierstündige Erholungsphase.

Hämorrhagie und Interventionsphase

Mit der Entnahme von 30% des errechneten Blutvolumens über einen Zeitraum von einer halben Stunde wurde schließlich ein Volumen- und Druck-kontrollierter hämorrhagischer Schock eingeleitet. Das zu entnehmende Volumen ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Blutvolumen [kg]} = \text{Körpergewicht [kg]} \times 0,08 \text{ (8 \% des Körpergewichtes)} \times 0,30 \text{ (30\% des Blutvolumens)} \times 1,1 \text{ (angenommene Dichte des Blutes)}$$

Abbildung 5 Formel zur Berechnung des zu entnehmenden Blutvolumens zur Einleitung der Hämorrhagie.

Um ein reproduzierbares Ausmaß des hämorrhagischen Schockes zu ermöglichen, wurde anschließend durch Gabe und Entnahme von 50ml-Aliquots des Blutes in viertelstündigem Abstand der arterielle Mitteldruck auf 35 ± 5 mmHg eingestellt. Das restliche Blut wurde in CPD („Citrate-Phosphate-Derivative“)-Transfusionsbeuteln kühl gelagert (4°C).

An diese auf 4 Stunden festgelegte Hämorrhagie-Phase schloss sich die Interventionsphase an, in der die Tiere ihr Blut über eine Stunde hinweg zurückerhielten.

Zeitgleich begann die Beatmung der Tiere in der Hyperoxie-Gruppe mit 100%igem Sauerstoff über die Einatemluft.

Beatmungsprotokoll:

Für die Dauer der *operativen Instrumentierung*:

Tabelle 1 Beatmungsparameter während der Instrumentierungsphase. FiO_2 = inspiratorische Sauerstoffkonzentration, PEEP = positive endexpiratory pressure, I/E-Verhältnis = Verhältnis Inspiration/Expiration.

FiO ₂	0,30
PEEP	10mmHg o cmH ₂ O
Tidalvolumen	8ml/kgKG
I/E-Verhältnis	1:1,5
Atemfrequenz	10-12/min Ziel PCO ₂ 35-45mmHg

Ab Beginn der *postoperativen Ruhephase*:

Tabelle 2 Beatmungsparameter während der postoperativen Ruhephase. FiO₂ = inspiratorische Sauerstoffkonzentration, PEEP = positive endexpiratory pressure, I/E-Verhältnis = Verhältnis Inspiration/Expiration.

FiO ₂	0,21
PEEP	10 mmHg o cmH ₂ O
Tidalvolumen	8ml/kgKG
I/E-Verhältnis	1:1,5
Atemfrequenz	10-12/min Ziel PCO ₂ 35-45mmHg

Ab Beginn der *Intervention*:

Tabelle 3 Beatmungsparameter während der Interventions-/ Beobachtungsphase. FiO₂ = inspiratorische Sauerstoffkonzentration, PEEP = positive endexpiratory pressure, I/E-Verhältnis = Verhältnis Inspiration/Expiration.

FiO ₂	Hyperoxiegruppe: 1,0 Kontrollgruppe: 0,30 bzw. Ziel-sO ₂ >90%
PEEP	12-15 mmHg o cmH ₂ O
Tidalvolumen	8ml/kgKG
I/E-Verhältnis	1:1
Atemfrequenz	10-12/min Ziel PCO ₂ 35-45mmHg

Volumentherapie

Während der Instrumentierungsphase erhielten die Tiere eine balancierte Vollelektrolytlösung (15 mL·kg⁻¹·h⁻¹). Zusätzlich wurde Hydroxyethylstärke (HES) in balancierter Vollelektrolytlösung gegeben, um den Füllungsdruck aufrecht zu halten [58]. Während der Hämorrhagie wurde die Flüssigkeitsgabe auf 10ml/ h reduziert. In der Interventionsphase erhielten alle Tiere neben der Bluttransfusion HES und eine kristalloide Lösung, 10ml/kg·h bzw. 5ml/kg·h, sobald der ZVD oder PAOP über 18mmHg betrug. Noradrenalin wurde titriert um den MAP auf dem jeweiligen Ausgangswert vor Einleitung des Schockes zu halten. Nach 5 Stunden der Intervention wurde HES gestoppt, Kristalloide aber weiter mit 15ml/kg·h und Kolloidale nach Füllungsdruck gegeben. Sobald die Herzfrequenz über 180/min stieg, wurde NoA nicht weiter erhöht, um eine myokardiale

Ischämie zu vermeiden. Abbruchkriterium war ein MAP<50mmHg trotz maximaler NoA-Gabe.

Versuchsende und Organaufbereitung

Am Ende der insgesamt 34 stündigen Versuchszeit wurde unter Erhöhung der Pentobarbital-Gabe die linke Flanke eröffnet. Die regelhaft reichlich vorhandene Aszites-Flüssigkeit wurde abgesaugt und die linke Niere von Faszie und Kapsel befreit. Vor der Durchtrennung der Hilusgefäße und des Ureters wurde das Tier mit je einem Bolus Pentobarbital und Kaliumchlorid euthanasiert.

Die linke Niere wurde entnommen, vermessen und fotografiert. Sie wurde anschließend sagittal gespalten und die Schnittfläche ebenfalls makroanatomisch überprüft.



Abbildung 6 Beispielbild der Nierenpräparation postoperativ nach sagittaler Teilung.

Nun wurden 2 Proben aus dem Rindenbereich entnommen (ca. 1cm³) und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Eine weitere Probe wurde in Immu Mount® Medium eingebettet und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Gewebeproben dienten der nachfolgenden biochemischen Aufarbeitung (siehe Kapitel 2.2.4)

Für die Histopathologie und Immunhistologie wurden je 3 Pyramiden mit angrenzender Rinde in ca. 4mm Dicke aus dem Nierengewebe geschnitten. Diese wurden dann für 7 Tage in Formaldehyd-Lösung 3,5% gelagert.

Anschließend wurde das Gewebe über Nacht im Tissue Tec® Gewebeeinbettautomaten entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit dem Mikrotom wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt und auf spezielle Objektträger gegeben. Durch ihre positiv geladene Oberfläche werden die dünnen Schnitte elektrostatisch fixiert. Anschließend trockneten die Schnitte mindestens 24 Stunden bei 45-50°C.

2.2.2 Perioperative Parameter

Während des gesamten Versuches wurde das jeweilige Tier in der institutseigenen Tier-Intensivstation am Monitor überwacht und betreut.

Messzeitpunkte

An 4 Messzeitpunkten wurden eine Reihe von Daten, die Hämodynamik betreffend, erhoben, sowie arterielle, venöse und renalvenöse Blutproben entnommen: Vor und nach der Hämorrhagie-Phase, sowie 12 und 22 Stunden nach Intervention. An jedem Messzeitpunkt wurden Daten zur Hämodynamik erfasst und Blutproben in Monovetten entnommen.

Hämodynamik

Folgende Parameter wurden bestimmt, um die Hämodynamik im Schock und während der Interventionsphase zu beurteilen:

- Herzfrequenz (HF)
- Mittlerer arterieller Druck (MAP)
- Schlagvolumen (SV) und Herzzeitvolumen (HZV in ml/min*kg)
- Mittlerer Pulmonalarterieller Druck (MPAP)
- Pulmonalarterieller Verschlussdruck (PCWP)
- Zentralvenöser Druck (ZVD)

Über die linke Vena jugularis externa erfolgte das Einführen eines Pulmonalis-(Thermodilutions)katheters. Unter kontinuierlicher Kontrolle der Pulscurve am Monitor wurde der Ballon am Katheter insuffliert und so mit dem Blutstrom über das rechte Herz in eine Lungenarterie eingeschwenkt. Auf diese Weise war es möglich den pulmonalarteriellen Verschlussdruck (PAOP) zu bestimmen und Rückschlüsse auf die Druckverhältnisse im linken Vorhof zu ziehen[34]. Mit Hilfe der Thermodilutionsmethode ermöglichte der Pulmonaliskatheter auch die Bestimmung des Herzzeitvolumens. Über ein proximales Lumen am Katheter erfolgte die Injektion von kalter Kochsalzlösung. Die Veränderung der Temperatur über die Zeit wurde an der Katheterspitze detektiert. Die Fläche unter der hieraus entstehenden Temperaturkurve wurde mit Hilfe der Stewart-Hamilton-Gleichung zur Berechnung des Herzzeitvolumens genutzt:

$$\text{HZV} = \frac{T_b - T_i}{\int \Delta T_b(t) dt}$$

Abbildung 7 Formel zur Berechnung des Herzzeitvolumens (HZV): unter Einbeziehung der Temperatur des Blutes vor der Injektion (T_b), der Temperatur des Injektats (T_i) und der Fläche unter der Kurve die durch die Veränderung der Temperatur über die Zeit gebildet wird ($\int \Delta T_b(t) dt$) [34].

Zu den Messzeitpunkten erfolgte über den Pulmonaliskatheter auch die Abnahme der gemischt-venösen Blutproben. Ein über die rechte A. femoralis eingeführter Picco Katheter ergänzte die Überwachung des Herzzeitvolumens.

Blutgasanalyse

Mit Hilfe eines Radiometer-Vollautomaten wurde eine Blutgasanalyse an den arteriellen und renalvenösen Blutproben vorgenommen:

- Sauerstoffpartialdruck (pO_2)
- Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO_2)
- Standard-Bicarbonat (HCO_3^-)
- Base Excess (BE)
- pH
- Laktat

Da das Institut über ein eigenes Gerät verfügt, konnten die Messungen ohne Verzögerung direkt nach Abnahme an den Blutproben vorgenommen werden.

Der Sauerstoffpartialdruck wurde durch eine spezielle Gold- oder Platinsonde amperometrisch gemessen. Er diente gemeinsam mit der Sauerstoffsättigung der Beurteilung der Lungenfunktion, und wurde so unter anderem bei der Berechnung der Oxygenierung des Blutes genutzt. Kohlenstoffdioxid und Blut-pH-Wert wurden potentiometrisch bestimmt und daraus der Base Excess errechnet. Zusammen mit dem Standard-Bikarbonat, welches über die Henderson-Hasselbalch-Gleichung berechnet wurde, gaben diese Werte Auskunft über den Säure- und Basenhaushalt des Organismus. Sie ermöglichten eine Differenzierung von metabolischen und respiratorischen Störungen.

Mit Hilfe einer ionensensitiven Elektrode wurden die Konzentrationen von Natrium und Kalium potentiometrisch bestimmt. Mit einer ionenselektiven Elektrode wurde, die durch spezielle Oxidasen gebildet, Menge an H_2O_2 gemessen, und so die Laktat- und Glukose-Konzentrationen bestimmt.

Mittels Absorptionsphotometrie wurde der Hämoglobingehalt des Blutes bestimmt, welcher indirekt Aussagen über das Ausmaß der vaskulären Barrierefunktion erlaubte.

Lungenfunktion und Beatmungsparameter

Am institutseigenen Beatmungsgerät Servo-Ventilator-System® der Firma Maquet konnten folgende Parameter eingestellt und kontrolliert werden:

- Inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2)
- Atemzugvolumen (AZV)
- Verhältnis Inspiration zu Expiration (I:E)
- Atemminutenvolumen (AMV)
- Positiver endexpiratorischer Druck (PEEP)

Um die Oxygenierung des Blutes und damit einen möglichen Lungenschaden beurteilen zu können, wurde schließlich der Horovitz-Index über folgende Formel berechnet:

$$\text{Horovitzindex} = \frac{pO_2}{FiO_2}$$

Abbildung 8 : Formel zur Berechnung des Oxygenierungsindex nach Horovitz unter Einbeziehen des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes (p_aO_2) und der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO_2).

2.2.3 Parameterbestimmung aus Blut und Urin

Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Folgende Parameter wurden mit dem ELISA aus arteriellen Blutproben zu allen 4 Messzeitpunkten bestimmt:

- **Troponin-I:** Kardiales Troponin-I ist Bestandteil des Troponin-Komplexes und bei Schädigung der kardialen Muskulatur im Serum erhöht nachweisbar. In dieser Studie dient der Nachweis als Parameter für kardialen Stress [85].
- **IL-1 β** und TNF α sind zwei vor allem durch Monozyten sezernierte Parameter, die schon rasch nach einem hämorrhagischen Trauma nachweisbar sind und deren Konzentrationsanstieg im Serum mit der Prognose korreliert [3]. IL-1 β führt schon in kleinsten Mengen zu Fieber, Hypotension und Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 [21].
- **IL-6** ist ein wichtiger Mediator in der akuten Entzündungsreaktion und ist beteiligt an der Lymphozytenaktivierung und Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen [82].
- **IL-10** als wichtiger anti-inflammatorischer Gegenspieler inhibiert unter anderem die Produktion von pro-inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α , IL -6, IL-1 und die Generation von Stickstoffmonoxid durch Monozyten [121].
- **TNF α** trägt maßgeblich zur Hypotonie, Laktatazidose und respiratorischen Insuffizienz bei. Es kontrolliert die Differenzierung und Aktivierung von Lymphozyten und führt ebenfalls zur Freisetzung der Akute-Phase-Proteine [82].

- **NGAL:** Die häufigste Ursache für akute Nierenschädigung ist renale Minderperfusion. Innerhalb von Stunden kann sich eine reversible Reduktion der Nierenfunktion zu einer irreversiblen Schädigung entwickeln. Trotz guter Nierenersatzverfahren, wie der Hämodialyse, bedingt die hohe Komplikationsrate eine Sterblichkeit von 60% [65, 105]). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) wird von einer Vielzahl an Zellen, so auch von den Tubuluszellen, als Reaktion auf verschiedene Schädigungsmechanismen, sezerniert. Das Maß der Sekretion korreliert dabei direkt mit dem Grad der Schädigung im Gewebe [104]. Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass ein Anstieg von NGAL im Serum oder Urin ein Prediktor für akutes Nierenversagen im Schock sein könnte [13, 129]. Da NGAL physiologischerweise im proximalen Tubulus reabsorbiert wird, ist sein Erscheinen im Urin zudem ein Marker für eine fehlerhafte Barrierefunktion der Glomeruli und für Tubulusschäden. Während andere Marker wie die Kreatinin-Clearance erst mit einer Verzögerung von 1-3Tagen ansteigen, lassen sich Veränderungen in der NGAL-Konzentration in Blut und Urin bereits nach wenigen Stunden nachweisen [104]. Im Urin steigt die Konzentration dabei um ein 10000faches der Norm, im Plasma um ein 100faches [120]. In diesem Experiment wurde die NGAL-Konzentration im Urin mit Hilfe eines ELISA Kits der Firma BioPorto bestimmt. Um dabei den Verdünnungseffekt während der Reperfusionphase zu berücksichtigen und eine Vergleichbarkeit zwischen den Tieren zu bewahren, wurde die NGAL-Konzentration in Abhängigkeit von dem Gesamtprotein der Probe angegeben.

Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA)

Sowohl für die Messung der Zytokinlevel, als auch für die Messung des NGAL- und Troponingehaltes im Serum wurden käuflich erhältliche ELISA-Kits verwendet, die nach dem Prinzip des Sandwich-ELISAs funktionieren.

Am Beispiel von Troponin soll das Prinzip des ELISA erklärt werden.

Die im Kit enthaltenen 96-well Platte war mit anti-cTnI-Antikörpern beschichtet. 100µl des zuvor bei -80° C gelagerten Serums, wurde zusammen mit 100µl des HRP (Meerrettichperoxidase)- konjugierten Antikörpers in ein Well gegeben. Nach einer 60minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Mixtur in 5 Waschgängen

entfernt. Nun wurde jedem Well 100µl Tetramethylbenzidin (TMB)-Reagenz beigelegt. TMB ist ein Substrat der Meerrettichperoxidase und seine Umsetzung ist anhand der Blaufärbung zu erkennen. Nach 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 100µl HCl gestoppt, was einen Farbumschlag zu gelb bewirkt. Die kolorimetrische Messung wurde bei 450nm durchgeführt. Dabei war die Konzentration von cTnI direkt proportional zur Absorption bei 450nm. Anhand der im Kit mitgelieferten Standardproben konnte eine Standardkurve erstellt werden, mit deren Hilfe die cTnI-Konzentration der einzelnen Proben bestimmt werden konnte.

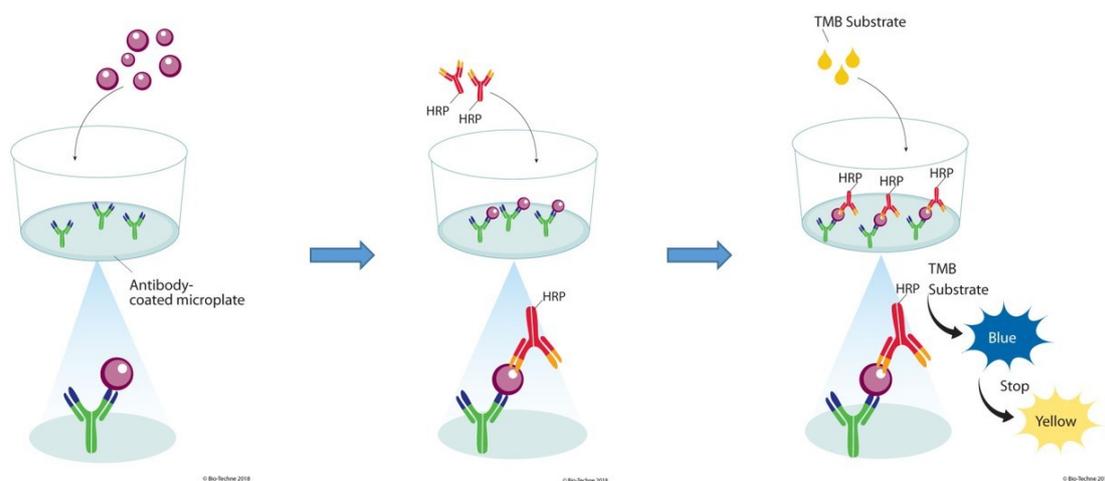


Abbildung 9 Schematische Darstellung des Messprinzips des Sandwich-ELISAs. HRP= Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase); TMB= Tetramethylbenzidin. *Mit freundlicher Genehmigung von R&D Systems, Inc.*

Nachweis von 8-Isoprostan durch den Enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (EIA)

8-Isoprostan wurde als Marker für oxidativen Stress. Arachidonsäure, eine Vorstufe von Leukotrienen und Prostaglandinen, wird im Rahmen des Schockgeschehens vermehrt ausgeschüttet. Durch Lipid-Peroxidation entsteht aus ihr auch Isoprostan als messbarer Marker im Serum [41, 45]. In dieser Studie wurde 8-Isoprostan aus arteriellem Plasma bestimmt. Um zwischen Entnahme der Blutprobe und Bestimmung des Wertes eine ex vivo Bildung von 8-Isoprostan zu vermeiden, wurde der Probe sowohl Indometacin, als auch Butylhydroxytoluol zugesetzt und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung erfolgte mit dem Kit der Firma Cayman Chemical. Im Kit enthalten war eine Reaktionsplatte auf die Anti-Kaninchen-IgG-Maus-Antikörper gebunden waren. Um diese Bindungsstellen konkurrierten die im Plasma enthaltenen 8-Isoprostan-Moleküle mit den zugesetzten Tracer-

Molekülen, die aus an 8-Isoprostan gebundene Acetylcholinesterase bestand. Je nach Menge des im Plasma vorhandenen 8-Isoprostan konnten also umgekehrt proportional viele Tracer Moleküle an die Antikörper der Reagenzplatte binden. Nach abwarten der Einwirkzeit wurden die ungebundenen Anteile ausgewaschen. Anschließend wurde das Ellman's Reagenz hinzugefügt und eine enzymatische Reaktion mit der Acetylcholinesterase gestartet. Hierdurch entstand eine Gelbfärbung, deren Intensität gemessen wurde und umgekehrt proportional zum ursprünglich im Plasma enthaltenen Anteil an 8-Isoprostan war. Durch Vergleich mit der Standardreihe konnte die Konzentration bestimmt werden.

Nachweis von Nitrit/Nitrat:

Beispiele für reaktive Stickstoffspezies sind Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit (ONOO⁻). NO ist ein wichtiges Signalmolekül im Körper und hat Anteil an vielen physiologischen und pathophysiologischen Abläufen. Es ist vor allem ein potenter Vasodilatator und wurde so zunächst als Endothelium derived-relaxing factor (EDRF) bekannt [88].

In der akuten Phase des hämorrhagischen Schockes wird die Produktion von NO als Reaktion auf die schockassoziierte Vasokonstriktion rasch gesteigert. In der späten Phase wird dieser Prozess vor allem durch proinflammatorische Zytokine unterhalten [40].

Es kommt im Schockgeschehen also vermehrt zur Bildung von Stickstoffmonoxid und Superoxid im Gewebe. Diese reagieren miteinander und bilden Peroxynitrit. Dies wird entweder zu Nitrit und Nitrat oxidiert oder kann durch die Übertragung von Nitrit-Gruppen auf Tyrosinreste in Proteinen und Peptiden zur Bildung von 3-Nitrotyrosin führen. Erhöhte Nitrit und Nitratwerte im Serum stellen daher ein Maß für eine vermehrte NO-Produktion dar [31]. Zu den zytotoxischen Auswirkungen zählen Lipid-Peroxidation, Inaktivierung von Enzymen oder transmembranäre Kanäle, Hemmung der Atmungskette, Initiierung von DNA-Schäden und in der Folge Apoptose oder Nekrose [36]. 3-Nitrotyrosin wurde als verlässlicher Marker für Schäden durch Peroxynitrit etabliert [88].

Der Nachweis von Nitrit/ Nitrat erfolgte im institutseigenen Nitric Oxide Analyser. Hierzu war die Reduktion von Nitrit und Nitrat zu NO durch eine Vanadiumchlorid-Lösung erforderlich. Stickstoff diente als Trägersubstanz und führte das entstandene NO der

Analysatoreinheit zu. Der hieraus errechnete Gehalt an Nitrit/Nitrat wurde in nmol/gProtein angegeben, bezogen auf das Gesamtprotein der jeweiligen Plasmaprobe.

Organfunktion

In dieser Arbeit sollte die Funktion der Niere, als lebenswichtiges und zugleich gegenüber Hypoxie anfälliges Organ, im Vordergrund stehen.

Parameter für Oxygenierung des Nierengewebes und ihrer Funktion waren:

- Renalarterieller Blutfluss
- Renalvenöser pH
- Renalvenöses Laktat
- Urinproduktion
- Kreatinin-Clearance
- Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) im Serum

Nachweis von Kreatinin und Berechnung der Kreatinin-Clearance

Die direkte Ermittlung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) ist durch eine Reihe von praktischen Problemen aufwendig und anfällig für Fehler. Die Bestimmung der Kreatinin-Clearance dient der Abschätzung der GFR und ist damit ein indirektes Maß für die Ausscheidungsfunktion der Niere. Kreatinin ist ein Produkt des Muskelstoffwechsels und wird in Abhängigkeit der Muskelmasse relativ konstant an das Blut abgegeben. In der Niere wird das Kreatinin zu einem Hauptteil über die Nephronen frei aus dem Blut gefiltert und mit dem Urin ausgeschieden. Ein sehr kleiner Teil wird durch die Tubuli resorbiert und eine weitere geringe Menge wird aktiv sezerniert [66].

Für die Berechnung der Kreatinin-Clearance wird dann die Kreatinin-Konzentration im Urin in Abhängigkeit vom Urinminutenvolumen ins Verhältnis zur Kreatinin-Konzentration im Plasma gesetzt:

Die Bestimmung der Kreatinin-Konzentrationen aus Urin und Plasma erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit nach dem Jaffe-Prinzip. Dabei wird Pikrinsäure zu der Probe gegeben, welche mit Kreatinin Kreatinin-Pikrakt-Komplexe bildet, die photometrisch detektiert werden können.

Für die Bestimmung des Urinminutenvolumens wurde über einen suprapubischen Katheter Urin direkt aus der Blase geleitet und jeweils über den Zeitraum vom Start der Hämorrhagie bis zum MZP 3 (12h Behandlungszeit/ Resuscitation) und von MZP 3 bis zum Ende des Versuches (22h Behandlungszeit) gesammelt. So ergibt sich ein Vergleich zwischen der Nierenfunktion während der frühen und späten Behandlungsphase, im Hinblick auf die Dauer der Beatmung mit purem Sauerstoff.

Physiologische Normwerte für die Kreatinin-Clearance des Schweines liegen bei 3,3-3,7 ml/min kgKG [124, 128] und für Schweine unter Narkose bei 2,5 ml/min kgKG [89].

2.2.4 Histopathologie, Immunhistochemie

Histopathologie

Für die histopathologische Bewertung des Nierengewebes wurden folgende Marker für die ischämische Nierenschädigung ausgewählt:

- **Glomeruläre Tubularisation:** Ischämische Schädigung im Nierengewebe findet in erster Linie an den Tubuli statt. Die Glomeruli sind in der Regel nicht histomorphologisch betroffen. Glomeruläre Tubularisation bezeichnet ein Phänomen, bei dem Epithelzellen des proximalen Tubulus retrograd in das Glomerulum einwachsen. Der parietale Anteil der Bowman'schen Kapsel ist normalerweise mit flachen Epithelzellen ausgekleidet, während das Epithel des proximalen Tubulus aus cuboidalen Zellen mit prominentem Bürstensaum besteht. Der Übergang ist in der Regel abrupt. An Patienten mit akuter ischämischer Nierenschädigung wurde beobachtet, dass sich das Epithel des proximalen Tubulus in die Bowman'sche Kapsel vorschiebt. Dies ist eine relativ frühe histologische Auffälligkeit und kann das einzige Anzeichen für eine Gewebereaktion bleiben (Heptinstall). In der Tat konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen

insuffizienter Nierenfunktion und Ausmaß der glomerulären Tubularisation festgestellt werden [46].

- **Dilatation der Bowman'schen Kapsel:** Die Vergrößerung des peritubulären Raumes ist ebenfalls ein frühes Zeichen der ischämischen Nierenschädigung.
- **Synechien:** Adhäsionen zwischen den beiden Blättern der Bowmann'schen Kapsel finden sich vor allem bei längerfristiger Schädigung.
- **Tubuläres Ödem:** Früh im Verlauf des ischämischen Ereignisses beginnt eine Umorganisation des Zytoskeletts und den darin enthaltenen Transportern. Erhöhte endotheliale und vaskuläre Permeabilität führt zu interstitiellem Ödem.
- **Tubulusdilatation:** Gleichzeitig kommt es durch erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembranen und einen gestörten Elektrolytaustausch zu Schwellung der Zellen.
- **Blutstau:** Zusammen führen diese Vorgänge zu einer Kompression der Kapillaren und können hierdurch die Durchblutungssituation zusätzlich verschlechtern. [65]
- **Eiweißzylinder:** Abgeschilferte Zellen und ausgefallenes Tamm-Horsfall-Protein verstopfen die Tubuli, was zu weiterer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate führt [63].
- **Tubulusnekrose:** Ischämische Nierenschädigung führt unter anderem durch Koagulationsnekrose zum Absterben der Zellen. Diese zeichnen sich durch eosinophiles Cytoplasma aus; teilweise ist der Zellkern pyknotisch oder geht ganz verloren.

Färbungen

Für die histopathologische Auswertung der Schnitte wurden 2 Standardfärbungen angefertigt: Eine Hämatoxylin-Eosin- (H.E.) und eine Periodic Acid-Schiff- (PAS)-Färbung.

Die H.E.-Färbung dient der Beurteilung einer Reihe feingeweblicher Strukturen. Der natürliche, basische Farbstoff Hämatoxylin färbt basophile Strukturen blau. Dazu gehören DNA, Zellkerne und Ribosomen. Eosin auf der anderen Seite ist ein synthetischer, saurer Farbstoff, der alle eosinophilen Strukturen rötlich färbt. Darunter fallen auch Kollagenfasern und zytoplasmatische Proteine [71].

Die H.E.-Färbungen wurden freundlicherweise durch die Abteilung für Pathologie der Universität Ulm unter Einsatz des AS-2-Färbeautomaten von Wendt durchgeführt.

Folgende Marker wurden anhand der H.E.-Färbungen nach einem standardisierten Schema ausgewertet: Tubuläres Ödem, Blutstau, Eiweißzylinder, Tubulusnekrose, Dilatation der Bowman'schen Kapsel.

Die Durchführung der PAS-Färbungen erfolgte im institutseigenen Labor. Für die PAS-Reaktion wurden Perjodsäure (HIO₄) und eine farblose, fuchsinschweifige Säure, das Schiffsche-Reagenz, verwendet. Zunächst mussten die zu färbenden Schnitte entparafiniert werden. Dazu wurden sie vier Mal je 2 bis 5 Minuten in Xylol getaucht. Anschließend durchliefen sie zur Rehydrierung eine absteigende Ethanolreihe (100%, 90%, 70%) und wurden kurz in destilliertem Wasser gespült. Die Schnitte wurden nun 5 Minuten in 1%ige Perjodsäure getaucht und anschließend wieder einige Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 15 Minuten mit dem Schiffschen Reagenz inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Spülschritt. Das Prinzip dieser Reaktion besteht darin, dass im Gewebe benachbarte Aldehydgruppen durch die Perjodsäure oxidiert werden. Diese reagieren mit dem Schiff'schen Reagenz und bewirken in ihm durch einen strukturellen Umbau die Entfaltung einer chromogenen Eigenschaft. Auf diese Weise werden Polysaccharide, Glykoproteine und Muzine magentarot gefärbt. Die anschließende Färbung mit Hämalaun dient einer kontrastreichen Darstellung des Zellkerns. Dazu werden die Schnitte für etwa 30 Sekunden in Hämalaun getaucht und anschließend mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült. Eine aufsteigende Ethanolreihe (70%, 90%, 100%) dient abschließend der Dehydrierung der Schnitte, die danach wiederum kurz in Xylol getaucht und dann mit Immu-Mount eingedeckelt werden [71].

Da durch die PAS-Reaktion Basalmembranen deutlich hervorgehoben werden, wurden anhand dieser Färbung die glomeruläre Tubularisation, Synechien und Tubulusdilatationen bewertet.

Auswertungsschema

Die Auswertung erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit Frau Dr. Scheuerle (Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Ulm, Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. P. Möller).

Anhand PAS-gefärbter Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop in 100facher Vergrößerung (Okular:10x; Objektiv:10x) 50 kortikale und 30 medulläre Glomeruli auf

vorhandene glomeruläre Tubularisation untersucht. Die Menge der positiven Glomeruli sind in Prozent von 80 angegeben.

Um eine Quantifizierung der restlichen Marker zu ermöglichen wurde in Anlehnung an Kubiak et al [17, 61] ein Bewertungssystem entwickelt. Dazu wurde, nach gründlicher Durchsicht eines Schnittes am Lichtmikroskop (Zeiss, Axioplan 2) in 200facher Vergrößerung, eine Aufnahme gemacht. Anhand der Häufigkeit (in Prozent) richtete sich anschließend eine Punktvergabe von 0 bis 4.

Tabelle 4 Bewertungssystem des Schweregrades einer Schädigung am Beispiel der Tubulusnekrose.

Schädigungsgrad	Beschreibung
0	keine Tubulusnekrose zu erkennen
1	Tubulusnekrose bei bis zu 25% der im Bild erkennbaren Tubuli zu erkennen
2	Tubulusnekrose bei 25% bis 50% der im Bild erkennbaren Tubuli zu erkennen
3	Tubulusnekrose bei 50% bis 75% der im Bild erkennbaren Tubuli zu erkennen
4	Tubulusnekrose bei 75% bis 100% der im Bild erkennbaren Tubuli zu erkennen

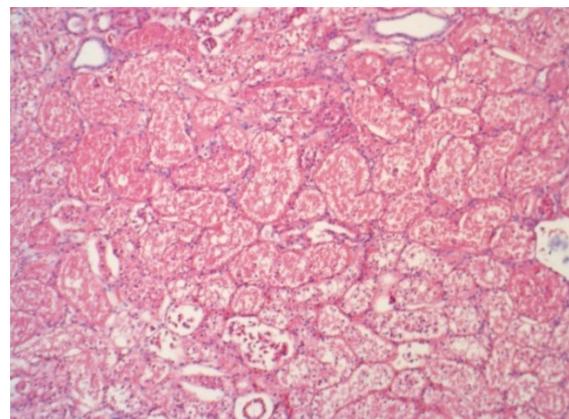
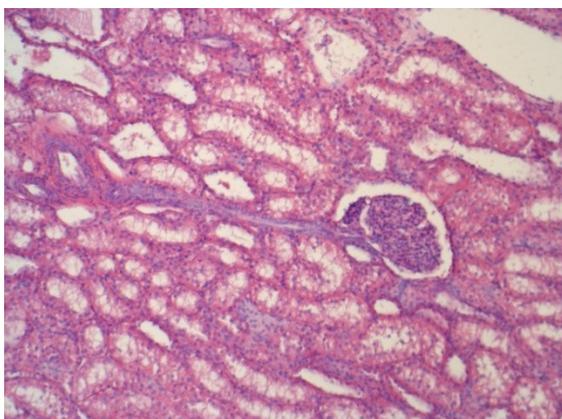


Abbildung 10 Beispielbilder der auszuwertenden Schnitte mit HE-Färbung, Bildausschnitte in **100facher Vergrößerung**. Hier mit Fokus auf Gewebenekrose: keine Nekrose (links) und ausgedehnte nekrotische Areale (rechts).

Immunhistochemie

Mit Hilfe von Antikörpern wurde die Expression von CBS und CSE, sowie die Bildung der Aminosäure Nitrotyrosin und das Vorkommen von Caspase-3 und Albumin im Nierengewebe detektiert.

- **Caspase-3:** Caspasen (*cysteinyI-aspartate specific protease*) wirken regulatorisch auf die Apoptose-Kaskade. Caspase-3 ist ein pro-apoptotisch wirkendes Enzym [60].
- **Albumin:** Das Protein Albumin fungiert im Serum als Trägerprotein für verschiedene Substanzen und hält den kolloidosmotischen Druck aufrecht. Auf Grund seiner großen Molekülmasse kann es Endothelien in der Regel nicht einfach passieren. Der Nachweis von Albumin im Nierengewebe am Ende des Versuches soll hier ein Marker für Capillary leakage nach insgesamt 22 Stunden Intervention mit 100% Sauerstoff sein [107].
- **Nitrotyrosin:** Wie zuvor beschrieben, kommt es im Schockgeschehen zu vermehrter Bildung von Stickstoff und Superoxid, welche miteinander reagieren und Peroxynitrit bilden. Durch die Übertragung von Nitrit-Gruppen auf Tyrosinreste in Proteinen und Peptiden kommt es zur Bildung von 3-Nitrotyrosin. Dies führt zu Lipid-Peroxidation, Inaktivierung von Enzymen oder transmembranären Kanälen, Hemmung der Atmungskette, Initiierung von DNA-Schäden und in der Folge Apoptose oder Nekrose [119]. 3-Nitrotyrosin wurde als verlässlicher Marker für Schäden durch Peroxynitrit etabliert [88].
- **CSE:** Das H₂S-produzierende Enzym CSE wurde in Kapitel 1.2.1 vorgestellt und ist Teil eines sauerstoffsensitiven Stressantwort-Systems im Nierengewebe.

Dazu mussten auch diese 5µm dicken Schnitte zunächst entparafiniert und rehydriert werden (siehe oben). Da die Formalin-Fixierung zwar die morphologische Struktur des Gewebes konserviert, aber die dreidimensionale Struktur der Proteine unter Umständen verändern kann, war eine Vorbehandlung des Gewebes mit Hitze nötig. Dadurch wurden Epitope an den zu detektierenden Proteinen wiederhergestellt und konnten so mit dem Antigen interagieren (HIAR: heat induced antigen retrieval). In Citratpuffer (pH=6) wurden die Schnitte für 4min und dann für 3min in der Mikrowelle auf höchster Stufe erwärmt. Anschließend kühlten die Schnitte für etwa 10min ab.

Um eine unspezifische Bindung des primären Antikörpers an andere Proteine beziehungsweise deren Epitope zu verhindern, wurden die Schnitte im nächsten Schritt mit 10%igem Ziegen-Serum in Diluent für 30min „geblockt“. Der Diluent bestand aus TBS, Tween 20 und Serum. Nachdem die Block-Flüssigkeit mit TBS abgespült wurde, wurden die Schnitte für 60min mit dem primären Antikörper inkubiert.

Diese Bindung wurde nach einem erneuten Waschvorgang in TBS und TBST mit Hilfe der Alkalische-Phosphatase-anti-Alkalische-Phosphatase-Methode (APAAP) sichtbar gemacht. Hierbei stellt ein Brückenantikörper die Verbindung zwischen dem primären Antikörper und einem Immunkomplex her. Dieser besteht aus einem anti-alkalische-Phosphatase-Antikörper und der alkalischen Phosphatase, die in einem weiteren Schritt über ein rotes Chromogen sichtbar gemacht wird (Dako APAAP REAL, Dako Cort.).

In einer Gegenfärbung wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin dargestellt. Anschließend erfolgte eine Entwässerung in aufsteigender Ethanolreihe und Xylol, sowie die Eindeckelung mit wasserfreiem Eindeckmittel.

Die Auswertung der Färbungen erfolgte am Mikroskop in der 10er Vergrößerung mit Hilfe der Mikroskop-Software Zeiss AxioVision. Vier repräsentative Areale (je zwei aus dem Cortex und zwei aus der Medulla) einer Größe von 800,000 μm^2 wurden pro Objektträger und Tier ausgewertet. Aus den jeweiligen vier Werten wurde ein Mittelwert erhoben, der in die Auswertung einfließt. Die Intensität der Färbung wurde dann als densitometric sum red angegeben.

2.3 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Programm GraphPad Prism 5 in der Version 5.04 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) verwendet. Hierzu wurde zunächst ein Kruskal-Wallis Rangsummentest und nachfolgend der Dunn's Test für Mehrfachvergleiche ausgeführt. Die meisten Daten wurden als Quartile mit Median, 1. und 3. Quartil angegeben.

Ein errechneter p-Wert unter 0.05 wurde als statistisch signifikant erachtet. Basierend auf Daten der Kreatinin Konzentration und des durchschnittlichen Noradrenalin-Bedarfes

vergänger Studien wurde im Hinblick auf den Gesamtversuch mit 4 Versuchsarmen die Gruppengröße von je 10 Tieren festgelegt [8, 39].

Die Daten der Tiere, die mindestens 18 Stunden des Versuches überlebten, flossen in die Wertung des letzten Messzeitpunktes ein.

Unabhängig von der Überlebensdauer wurden Western-Blots, histopathologische und immunhistochemische Färbungen an dem Gewebe aller Tiere vorgenommen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Überleben

In Abbildung 12 ist das Überleben der Tiere beider Versuchsgruppen über die Versuchsdauer in Stunden aufgezeichnet. Ein Tier der Hyperoxiegruppe und vier Tiere der Kontrollgruppe verstarben vor Ende des Versuches. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,131$).

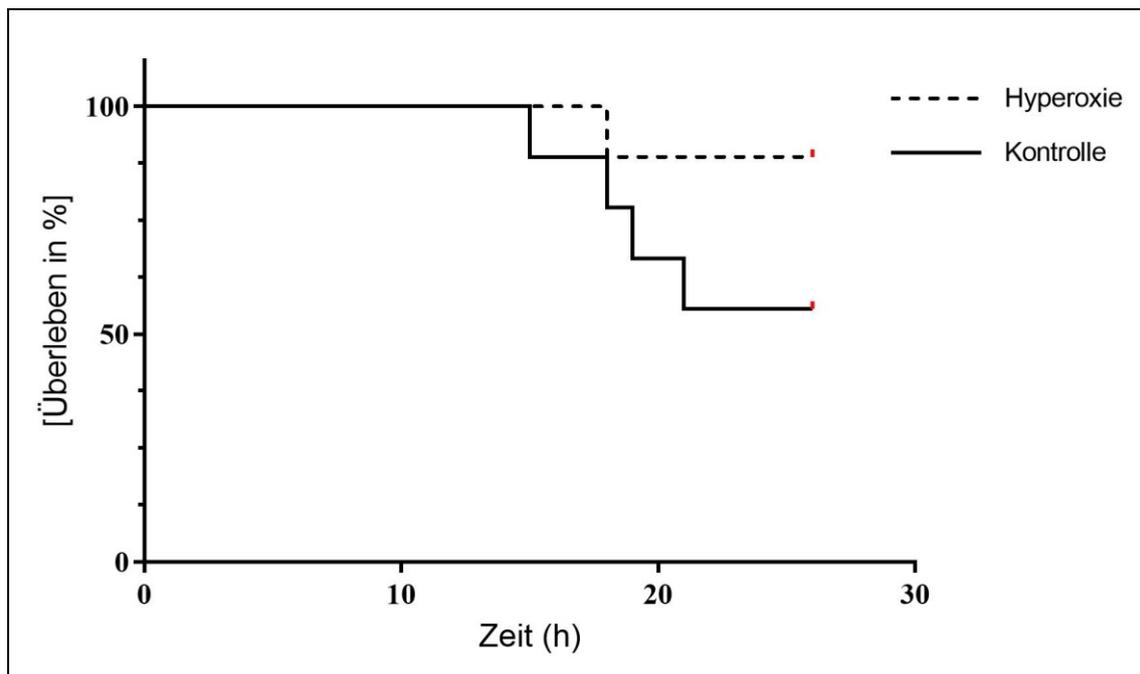


Abbildung 11 Kaplan-Meier Überlebensanalyse der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe über die gesamte Versuchsdauer. Je Versuchsgruppe 9 Tiere ($n=9$). Universität Ulm 2014.

3.2 Systemische Parameter

3.2.1 Hämodynamik

Die Maßgabe zur Einleitung der Hämorrhagie war die Entnahme von 30% des Blutvolumens. Das tatsächlich entnommene Volumen nach der Titration des mittleren arteriellen Druckes auf 35mmHg bezogen auf das Körpergewicht entsprach in der Kontrollgruppe 34 ml/kg (28;42) und in der Hyperoxiegruppe 33 ml/kg (27;37).

Der Bedarf an substituiertem Volumen in Form von HAEs betrug in der Kontrollgruppe 50 ml/kg (50;50) und in der Hyperoxiegruppe 50 ml/kg (50;54).

Es ergab sich jeweils kein signifikanter Unterschied.

Der Noradrenalin-Bedarf in $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}^{-1}$ wurde in der Interventionsphase für die Tiere beider Gruppen aufgezeichnet und kann der Abbildung 13 entnommen werden. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,162$).

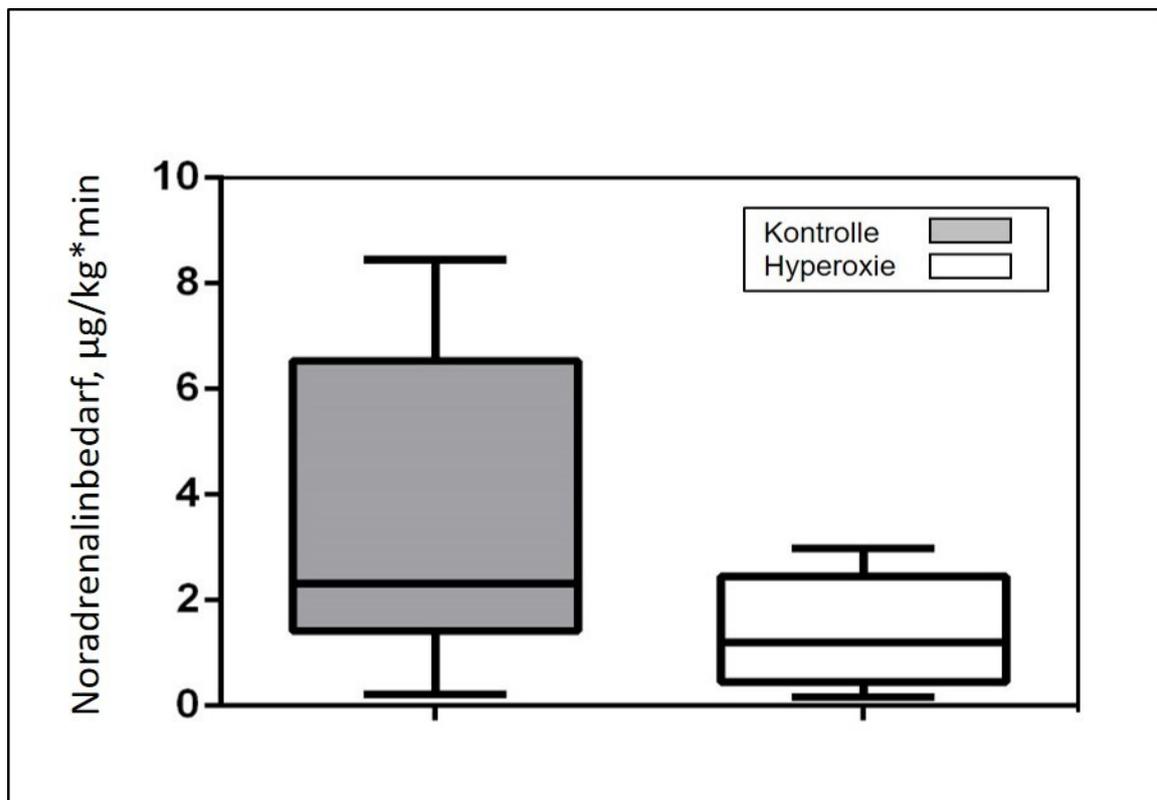


Abbildung 12 Noradrenalin-Bedarf der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe in μg bezogen auf das Körpergewicht und die totale Infusionszeit. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot: Median, 25. Quartil und 75. Quartil, sowie Maximum und Minimum. Je Versuchsgruppe 9 Schweine ($n=9$). Universität Ulm 2014.

Tabelle 5: Parameter der Hämodynamik der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP). MZP1 als Ausgangspunkt vor Einleitung der Hämorrhagie, MZP2 nach 4 Stunden Hämorrhagie und MZP3 und 4 jeweils nach 12 und 22 Stunden der Interventionsphase. Die Daten der beiden Gruppen werden jeweils als Median, 25. Quartil und 75. Quartil angegeben. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. HF= Herz Frequenz, MAP= Mittlerer arterieller Druck, SV= Schlagvolumen, HZV= Herzzeitvolumen, MPAP= Mittlerer pulmonalarterieller Druck, PCWP= Lungenkapillaren-Verschlussdruck, ZVD= Zentraler Venendruck, Hb art.= Hämoglobinwert im arteriellen Blut. Universität Ulm 2014.

		Vor Hämorrhagie - MZP1-	Nach 4h Hämorrhagie - MZP2 -	Nach 12h Intervention - MZP3 -	Nach 22h Intervention - MZP4 -
HF <i>/min</i>	Kontrolle	109 (89;117)	190 (163;200)#	157 (143;185)#	162 (143;203)#
	Hyperoxie	108 (97;120)	177 (171;190)#	157 (136;182)#	161 (142;178)#
MAP <i>mmHg</i>	Kontrolle	108 (96;115)	34 (32;38)#	84 (65;95)	72 (61;96)
	Hyperoxie	116 (112;117)	34 (33;37)#	94 (83;105)	90 (70;105)#
SV <i>ml/kg</i>	Kontrolle	0,98 (0,95;1,07)	0,18 (0,16;0,21)#	0,62 (0,43;0,75)	0,55 (0,51;0,62)
	Hyperoxie	0,90 (0,83;1,00)	0,17 (0,14;0,18)#	0,66 (0,52;0,75)	0,71 (0,67;0,74)
HZV <i>ml/min*kg</i>	Kontrolle	102 (93;113)	33 (28;41)#	108 (58;118)	104 (69;135)
	Hyperoxie	89 (87;107)	28 (27;37)#	106 (92;122)	114 (73;126)
MPAP <i>mmHg</i>	Kontrolle	28 (21;34)	20 (19; 26)	33 (29; 40)	38 (33; 43)
	Hyperoxie	26 (23;31)	24 (16; 29)	29 (28; 34)	31 (29;38)
PCWP <i>mmHg</i>	Kontrolle	8 (6;11)	2 (2;5)	15 (13;16)	18 (17;18)#
	Hyperoxie	8 (5;10)	4 (1;4)	14 (9;16)	15 (12;17)#
ZVD <i>mmHg</i>	Kontrolle	6 (3;8)	1 (1;4)	15 (12;16)	17 (14;20)#
	Hyperoxie	5 (3;7)	2 (0;3)	13 (8;15)	14 (13;15)#
Hb, art. <i>g/L</i>	Kontrolle	92 (76;93)	102 (98;115)	117 (105;129) #	111 (102;126)#
	Hyperoxie	100 (95;105)	105 (98;116)	109 (100;122)	117 (105;121)

Die Tiere beider Versuchsgruppen wiesen zu den Messzeitpunkten nach der Hämorrhagiephase im Vergleich zum Ausgangswert eine signifikant erhöhte Herzfrequenz auf (jeweils $p < 0,05$), ohne deutlichen Unterschied zwischen den Gruppen. Der mittlere arterielle Blutdruck war in beiden Gruppen nach Beendigung der Hämorrhagiephase signifikant geringer als der Ausgangswert (jeweils $p < 0,05$) und stieg nach der Reperfusion während der Interventionsphase in der Hyperoxiegruppe wieder an. Insgesamt zeigt sich kein signifikanter Unterschied (MZP3 $p=0,130$, MZP4 $p=0,332$).

Parallel dazu sanken Schlagvolumina und Herzzeitvolumina während der Hämorrhagiephase signifikant ab (jeweils $p < 0,05$) und stiegen während der Interventionszeit wieder an. Hierbei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Interessanterweise sanken die Werte der Kontrollgruppe, nachdem sie nach 12h der Intervention deutlich höher waren, nach 22h der Intervention wieder leicht ab. Der mittlere pulmonalarterielle Blutdruck blieb in der Hyperoxiegruppe während des gesamten Versuches nahezu konstant. Im Vergleich dazu stieg er in der Kontrollgruppe während der Interventionsphase an, ohne signifikanten Unterschied (MZP4 $p=0,145$). Der zentralvenöse Druck sank nach der Hämorrhagie deutlich ab, um dann in der Interventionsphase über den Ausgangswert hinaus anzusteigen. Dieser Anstieg war in beiden Gruppen nach 22h der Intervention signifikant ((jeweils $p < 0,05$)). Dabei lagen die Werte in der Kontrollgruppe nahezu signifikant über denen der Hyperoxiegruppe (MZP3 $p=0,083$ MZP4 $p=0,087$). Der pulmonale Verschlussdruck verhielt sich ähnlich. Es kam zu nahezu signifikant höheren Werten in der Kontrollgruppe nach 22h der Intervention ($p=0,073$).

Als Zeichen für kardiale Belastung wurde Troponin in ng/g Protein im Serum an den 4 Messzeitpunkten bestimmt. In beiden Gruppen stieg Troponin während der Interventionsphase signifikant an (jeweils $p < 0,05$). Hierbei waren die Werte der Hyperoxiegruppe jeweils signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (MZP3 $p=0,032$, MZP4 $p=0,046$).

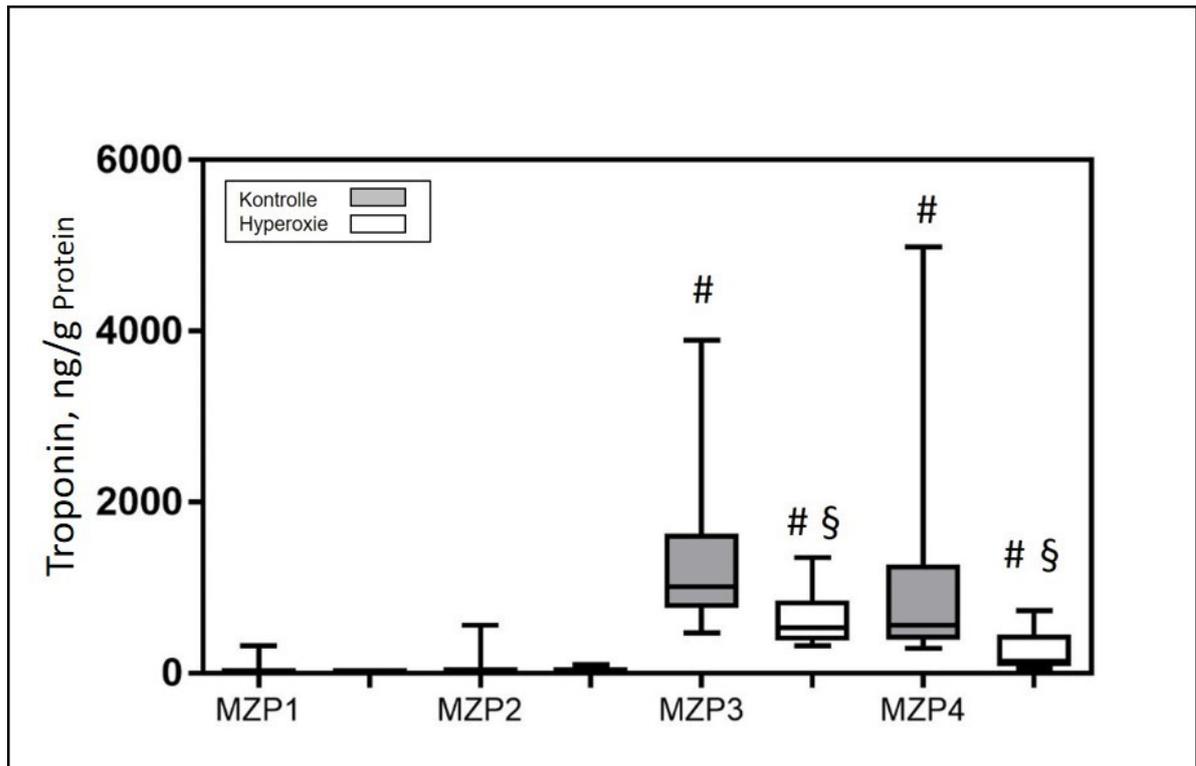


Abbildung 13 Troponin der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP), gemessen mit dem ELISA und angegeben in Nanogramm (ng) pro Gramm (g) Gesamtprotein im Serum. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot: Median, 25. Quartil und 75. Quartil, sowie Maximum und Minimum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine ($n=9$). Universität Ulm 2014.

3.2.2 Blutgasanalyse und Metabolismus

Nachfolgend werden Marker der Blutgasanalyse und des Metabolismus aufgelistet.

pH und Laktat

In beiden Gruppen zeigt sich nach der Hämorrhagiephase eine Azidose mit erhöhten Laktatwerten. Die pH-Werte beider Gruppen sind im Anschluss an die Hämorrhagie signifikant niedriger (jeweils $p < 0,05$) im Vergleich zum Ausgangswert. In der Hyperoxiegruppe sind die pH-Werte tendenziell höher; dieser Unterschied wird am MZP4 signifikant (MZP3 $p=0,131$; MZP4 $p=0,038$). Die Laktatwerte der Hyperoxiegruppe sind trotz eines vergleichbaren Ausmaßes des Schockzustandes am MZP2 kurz nach der Hämorrhagiephase signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p=0,032$). Die Werte nähern sich im Verlauf wieder dem Ausgangswert vor der Hämorrhagie an. Es gibt keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den Gruppen (MZP3 $p=0,248$; MZP4 $p=0,157$).

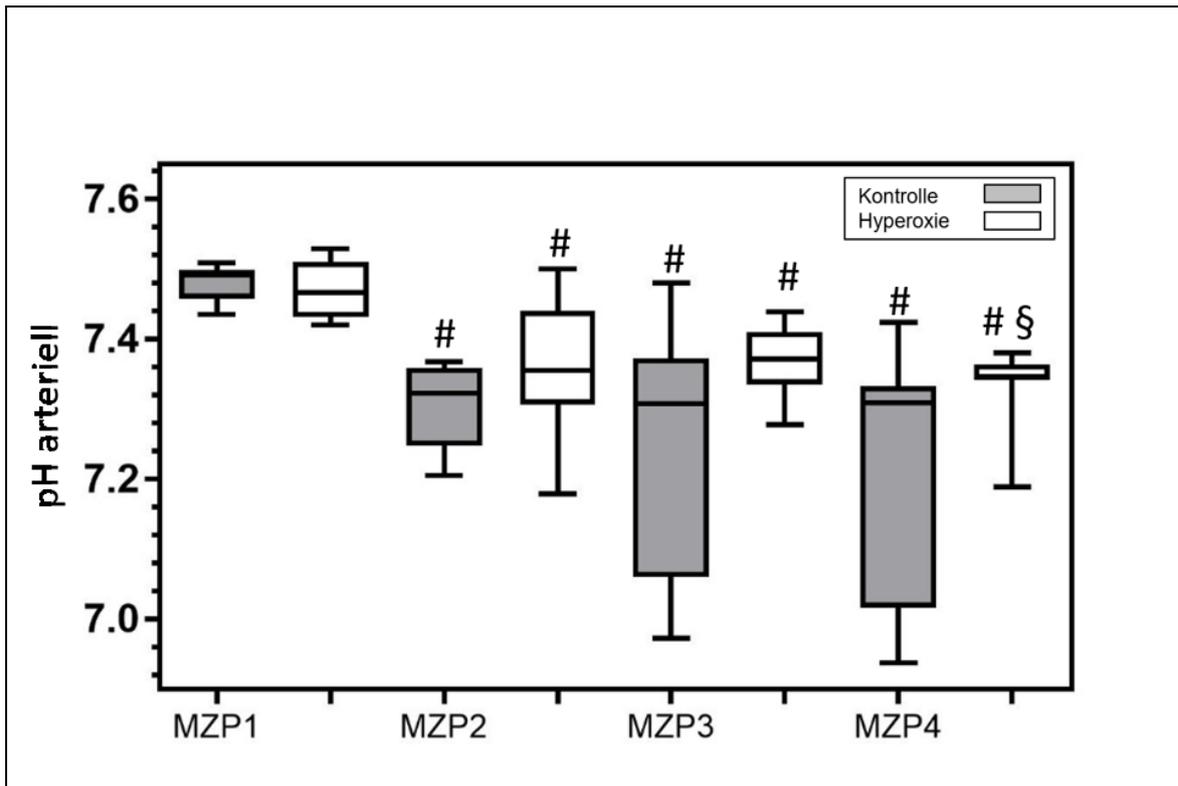


Abbildung 14 pH-Werte im arteriellen Blut der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP) mit Hilfe des Radiometer-Vollautomaten für Blutgasanalysen. Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

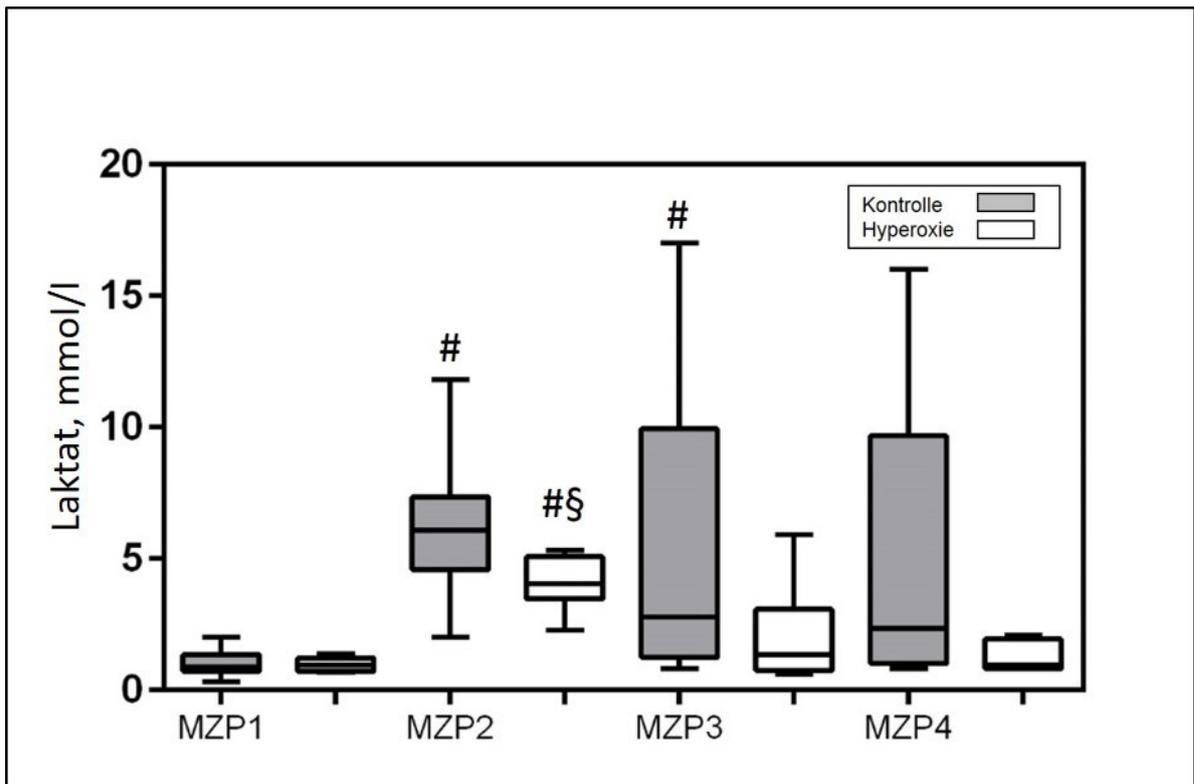


Abbildung 15 Laktat im arteriellen Blut der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP) mit Hilfe des Radiometer-Vollautomaten für Blutgasanalysen, angegeben in mmol/l. Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine ($n=9$). Universität Ulm 2014.

Weitere Parameter der Blutgasanalyse und Sauerstoffaufnahme

Im Folgenden sind weitere Parameter der Blutgasanalyse zu allen 4 Messzeitpunkten aufgeführt. Stündliche Blutgasanalysen wurden genutzt, um die Beatmungsparameter anhand des Protokolls anzupassen. Im Rahmen der Intervention wurde der inspiratorische Sauerstoffanteil in der Hyperoxiegruppe auf 1,0 gestellt. So liegen die Werte des Sauerstoffpartialdruckes zum MZP3 und 4 signifikant über denen des Ausgangswertes (jeweils $p < 0,05$). Der Horowitz-Index, als Zeichen für die Oxygenierungsfähigkeit und damit ein Marker für Lungenschädigung, sinkt bei den Tieren der Kontrollgruppe während der Interventionsphase, bis sie an MZP4 signifikant niedriger als ihr Ausgangspunkt sind ($p=0,003$). Im Vergleich dazu bleiben die Werte der Hyperoxietiere konstant, bzw. steigen leicht an und sind signifikant höher (MZP3 $p=0,012$; MZP4 $p=0,003$).

Der arterielle CO_2 Partialdruck als Maß für die interne CO_2 Produktion steigt in der Hyperoxiegruppe im Verlauf des Experimentes leicht an, während die Werte der

Hyperoxietiere gegen Ende des Versuches wieder auf das Ausgangsniveau sinken. Der Unterschied ist am MZP4 signifikant ($p=0,049$).

Tabelle 6 Beatmungsparameter, gemessen im arteriellen (art.) Blut der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP). MZP1 als Ausgangspunkt vor Einleitung der Hämorrhagie, MZP2 nach 4 Stunden Hämorrhagie und MZP3 und 4 jeweils nach 12 und 22 Stunden der Interventionsphase. Die Daten der beiden Gruppen werden jeweils als Median, 25. Quartil und 75. Quartil angegeben. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie, § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine ($n=9$). pO_2 = Sauerstoffpartialdruck, art. = im arteriellen Blut, FiO_2 = inspiratorische Sauerstoffkonzentration, pO_2/FiO_2 = Oxygenierungsindex, pCO_2 = Kohlenstoffdioxidpartialdruck, VO_2 = Sauerstoffausschöpfung, HCO_3^- = Bicarbonat, BE = Base excess. Universität Ulm 2014.

		Vor Hämorrhagie - MZP1-	Nach 4h Hämorrhagie - MZP2 -	Nach 12h Intervention - MZP3 -	Nach 22h Intervention - MZP4 -
pO_2, art. <i>mmHg</i>	Kontrolle	88 (76;100)	73 (69;78)	116 (102;130)	101 (91;118)
	Hyperoxie	82 (71;86)	78 (65;89)	462 (434; 501)#§	414 (349;496) #§
PO_2/FiO_2 <i>mmHg</i>	Kontrolle	419 (360;460)	349 (331, 372)	355 (337;413) #	299 (242;336) #
	Hyperoxie	390 (340; 409)	373 (308; 424)	462 (434; 501) §	414 (349;496) §
pCO_2, <i>art.</i> <i>mmHg</i>	Kontrolle	35 (33;37)	38 (34;40)	34 (33;38)	34 (29;35)
	Hyperoxie	35 (33;37)	37 (32;38)	35 (35;35)	38 (36;39) §
VO_2, art. <i>mlO₂/min</i> <i>*kg</i>	Kontrolle	3,4 (2,8;4,1)	3,0 (2,5;3,8)	3,8 (3,4;5,1)	4,1 (3,1;4,7)
	Hyperoxie	3,0 (2,6;3,8)	2,7 (2,1;3,3)	3,4 (2,5;4,6) #	3,3 (2,9;4,7)
HCO_3^-, <i>art.</i> <i>mmol/l</i>	Kontrolle	26,7 (26,4;27,1)	18,1 (17,8;19,3)#	18,8 (10,2;20,7)#	17,8 (9,8;18,6)#
	Hyperoxie	25,8 (24,7; 27,1)	19,8 (18,3; 22,0)#	19,8 (18,3; 22,2)#	21,3 (20,1; 21,8) §
BE, art.	Kontrolle	2,7 (1,1; 3,9)	-7,3 (-9,3; -4,5)#	-6,4 (-21,8;-4,2)#	-8,3 (-20,3;-7,1)#
	Hyperoxie	2,9 (0,8; 3,6)	-5,4 (-9,7; -2,9) #	-5,7 (-8,4; -2,4)#	-4,6 (-6,4; -3,2) §,#

Die Sauerstoffausschöpfung des Organismus sinkt bei beiden Versuchsgruppen während der Hämorrhagie. Während der Interventionsphase steigt sie bei der Kontrollgruppe stärker an. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gibt es nicht.

In der Hyperoxiegruppe zeigen sich nach der Hämorrhagiephase signifikant niedrigere Bikarbonat- und Base-Excess-Werte im Vergleich zum Ausgangswert (jeweils $p < 0,05$), mit Ausnahme des HCO_3^- Wertes der Hyperoxiegruppe am MZP4. Die Werte haben sich hier dem Ausgangswert soweit angenähert, dass sie sich nicht mehr signifikant unterscheiden. Zudem ergibt sich hierdurch ein signifikant höherer Wert in der Hyperoxiegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = 0,014$). Der BE der Tiere der Hyperoxiegruppe ist ebenfalls signifikant höher als der der Kontrolltiere ($p = 0,035$) am MZP4.

3.2.3 Oxidativer und nitrosativer Stress

Marker des oxidativen und nitrosativen Stresses wurden im Serum der Tiere beider Versuchsgruppen an den Messzeitpunkten (MZP), sowie im Nierengewebe am Ende des Versuches, nachgewiesen.

8-Isoprostan

Als Marker für oxidativen Stress wurde 8-Isoprostan im Serum mit Hilfe des ELISAs bestimmt.

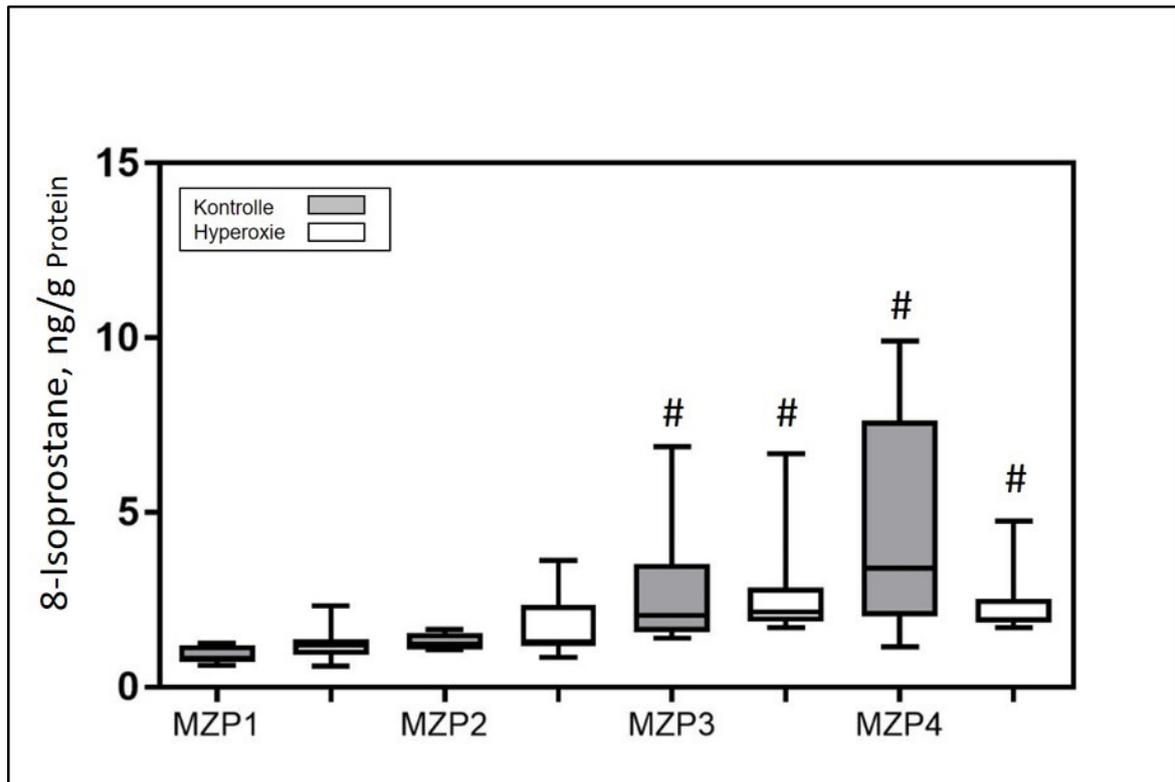


Abbildung 16 8-Isoprostan im Plasma der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP), gemessen mit dem ELISA und angegeben in ng pro Gramm Gesamtprotein. Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

Abb. 17 zeigt die Bildung von 8-Isoprostan im Serum. In beiden Gruppen kommt es durch das hämorrhagische Trauma zu vermehrtem oxidativem Stress, zu sehen an erhöhten 8-Isoprostan-Leveln im Serum (Keel 2005). Es zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen (MZP3 $p=0,730$; MZP4 $p=0,139$).

Nitrit/ Nitrat

Als Marker für nitrosativen Stress wurde Nitrit/ Nitrat im Plasma bestimmt.

Tabelle 7 Nitrit/ Nitrat im Plasma der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP), angegeben in nmol pro Gramm Gesamtprotein. Die Daten der beiden Gruppen werden jeweils als Median, 25. Quartil und 75. Quartil angegeben. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

		Vor Hämorrhagie - MZP1-	Nach 4h Hämorrhagie - MZP2 -	Nach 12h Intervention - MZP3 -	Nach 22h Intervention - MZP4 -
Nitrit/ Nitrat nmol/g Protein	Kontrolle	127 (115;160)	166 (137;221)	566 (348;749)#	1158 (534;2164)#
	Hyperoxie	93 (63;189)	151 (95;229)	340 (231;487)#	858 (319;1495)#

Nach Abschluss der Hämorrhagiephase sind im Serum erhöhte Nitrit/Nitrat-Werte nachweisbar. Während der Interventionsphase steigen diese Werte in beiden Gruppen weiter an und sind schließlich signifikant zu den Vergleichswerten erhöht (jeweils $p < 0,05$). Zum MZP 4 sind die Werte in der Kontrollgruppe deutlich höher als in der Hyperoxiegruppe, ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (MZP3 $p=0,222$; MZP4 $p=0,370$).

3.2.4 Systemische Entzündungsreaktion

Zur Analyse der Entzündungsreaktion wurden die Mediatoren Il-1 β , Il-6, Il-10 und TNF α sowie die Anzahl der Leukozyten im Blutbild zu allen 4 Messzeitpunkten bestimmt.

Um einen Vergleich zwischen den Tieren zu ermöglichen und eventuelle Volumenverschiebungen zu berücksichtigen, wurden die Zytokine in das Verhältnis zum jeweiligen Gesamtprotein gesetzt und daher in ng/gProtein angegeben.

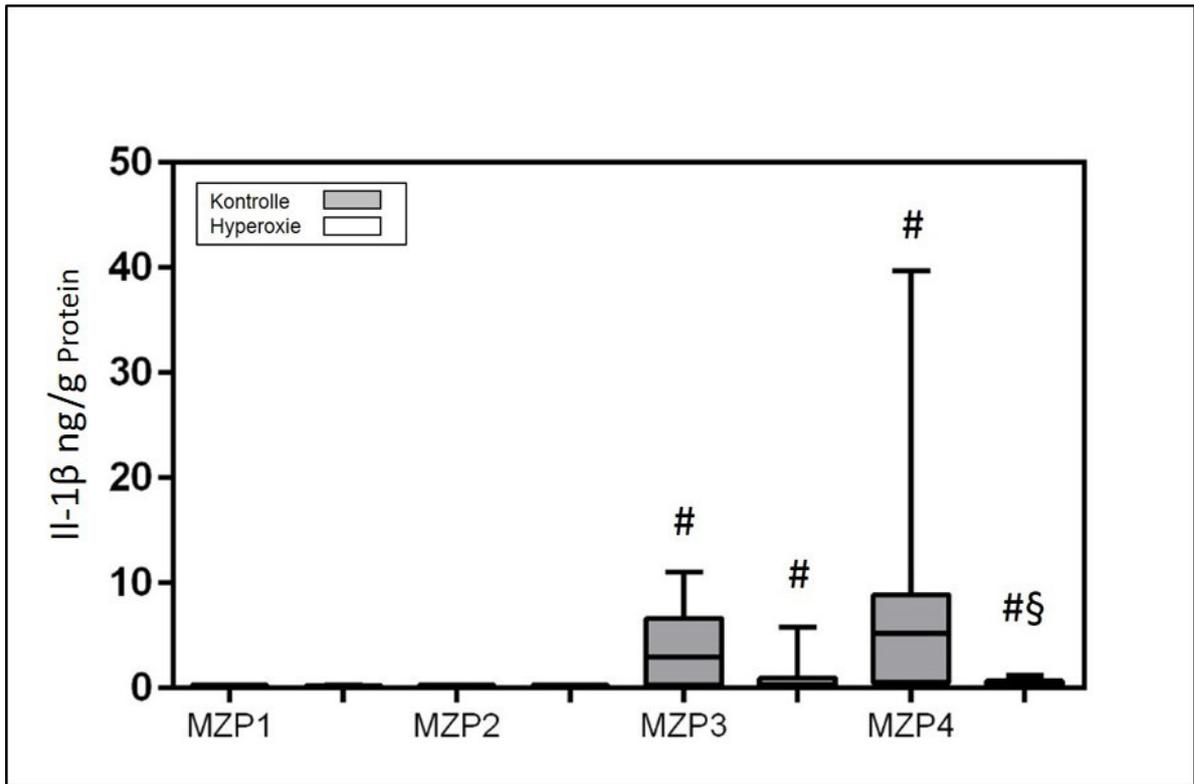


Abbildung 17 IL-1 β im arteriellen Blut der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP) mit Hilfe des ELISA, angegeben in Nanogramm (ng) bezogen auf das Gesamtprotein. Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

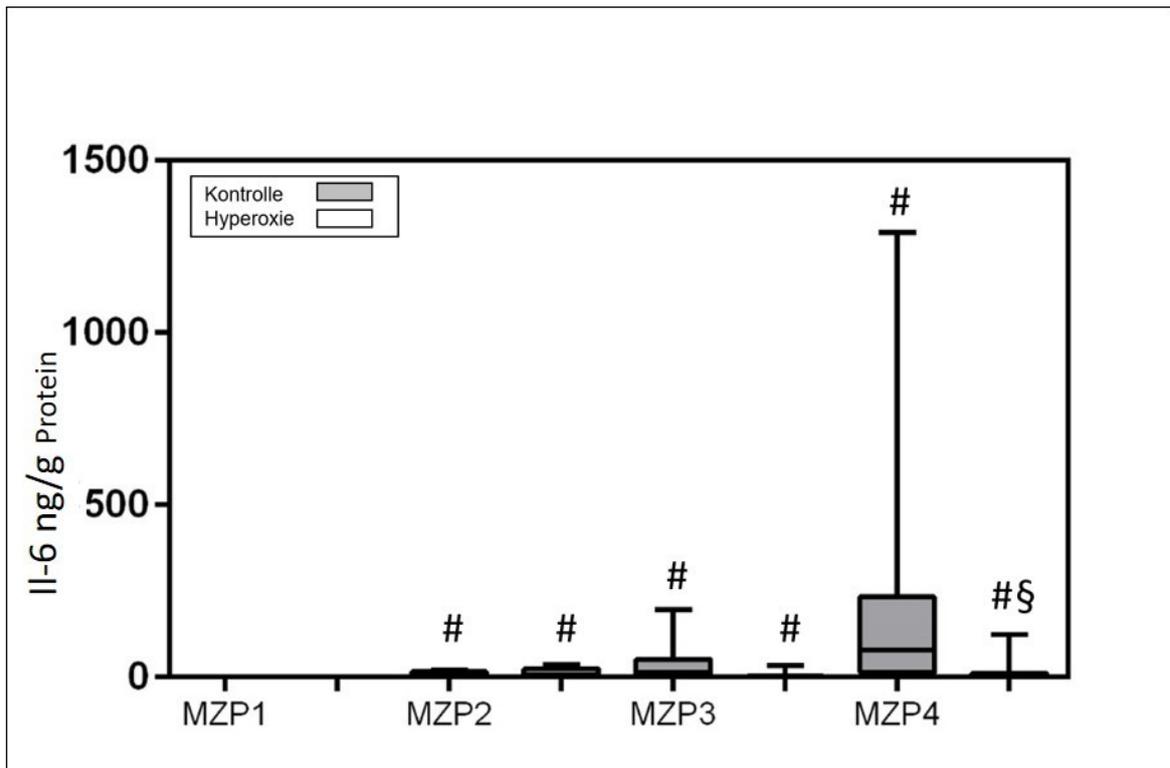


Abbildung 18 Il-6 im arteriellen Blut der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP) mit Hilfe des ELISA, angegeben in Nanogramm (ng) pro Gramm (g) Gesamtprotein. Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

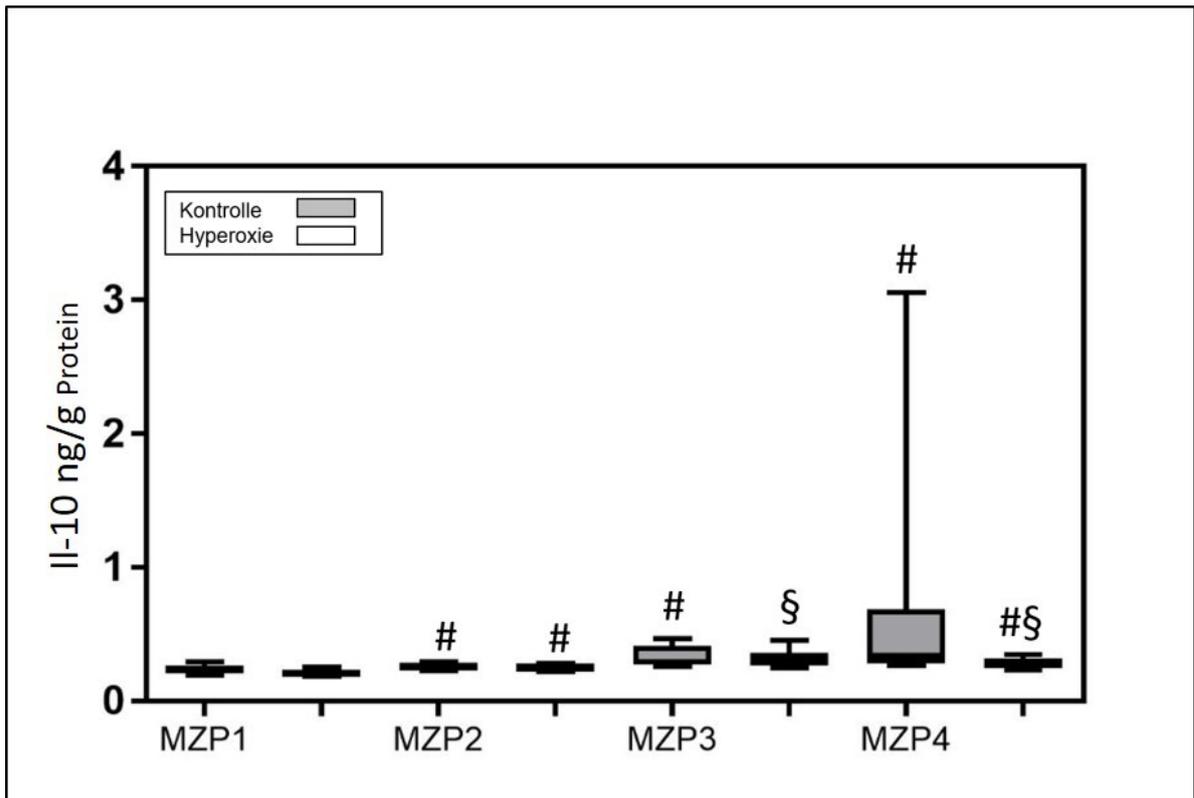


Abbildung 19 IL-10 im arteriellen Blut der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP) mit Hilfe des ELISA, angegeben in Nanogramm (ng) pro Gramm (g) Gesamtprotein. Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine ($n=9$). Universität Ulm 2014.

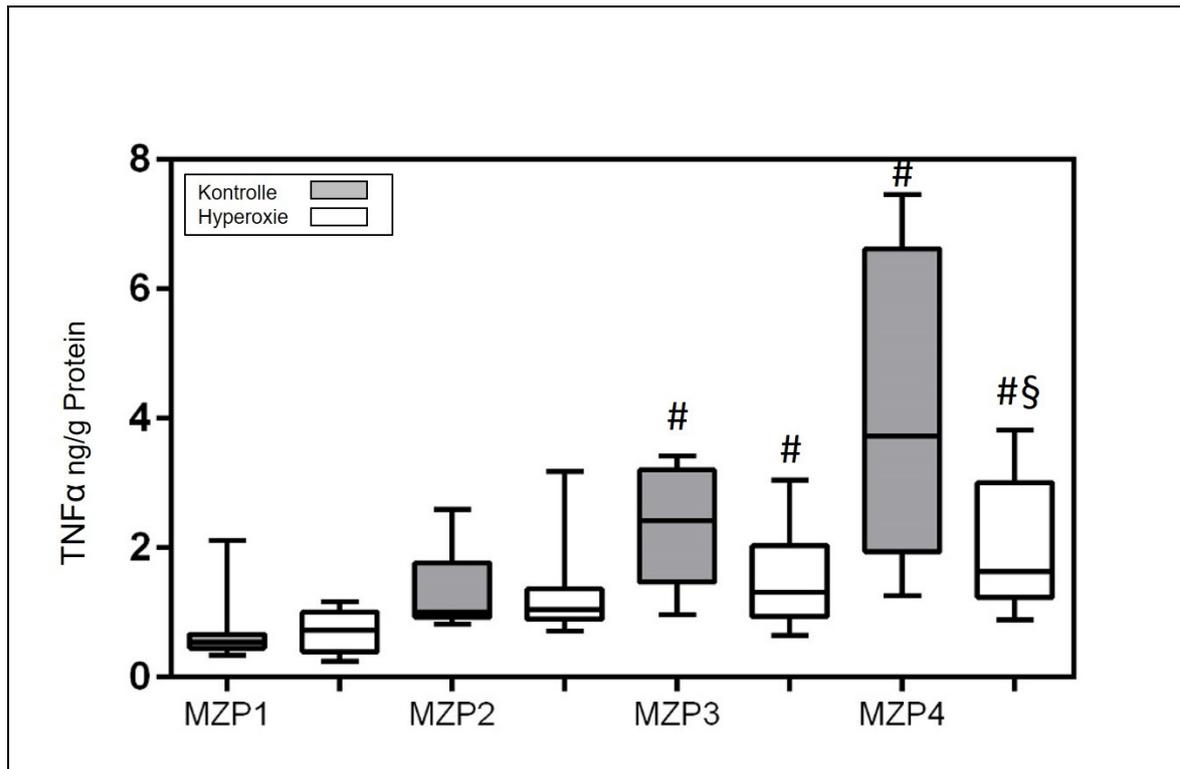


Abbildung 20 TNF α im arteriellen Blut der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP) mit Hilfe des ELISA, angegeben in Nanogramm (ng) pro Gramm (g) Gesamtprotein. Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

Das proinflammatorische Il-1 β steigt zu den MZP3 und 4 in beiden Gruppen an, in der Kontrollgruppe jedoch deutlich stärker als in der Hyperoxiegruppe. Dieser Unterschied ist zum Ende des Versuches signifikant (MZP3 $p=0,077$; MZP4 $p=0,006$). Eine ähnliche Entwicklung zeigt Il-6 (MZP3 $p=0,063$; MZP4 $p=0,021$). Das antiinflammatorische Il-10 ist in der Hyperoxiegruppe ebenfalls niedriger: Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen während der gesamten Interventionsphase (MZP3 $p= 0,046$; MZP4 $p=0,021$). Die Werte des regulatorischen TNF α verhalten sich ähnlich wie die anderen Entzündungswerte. Am Ende des Versuches liegen die Werte der Hyperoxiegruppe signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe (MZP3 $p= 0.094$; MZP4 $p=0,046$).

3.3 Die Niere im hämorrhagischen Schock

Um die Auswirkung einer Beatmung mit 100%igem Sauerstoff auf den Körper während des hämorrhagischen Schockes zu untersuchen, wurde die Funktion verschiedener lebenswichtiger Organe beurteilen.

Die Niere ist gegenüber ischämischen Ereignissen besonders empfindlich (Young 2010) und wird daher hier detailliert betrachtet.

3.3.1 Blutfluss und Parameter der Sauerstoffschuld

Wie zu erwarten sinkt die Durchblutung der Arteria renalis am Ende der Hämorrhagiephase im Vergleich zum Ausgangswert in beiden Versuchsgruppen signifikant ab. In der Hyperoxiegruppe steigt sie während der Beatmung mit 100% Sauerstoff und nähert sich dem Ausgangswert an, sodass es keinen signifikanten Unterschied mehr im Vergleich zum Ausgangswert gibt. Im Vergleich dazu nehmen die Werte der Durchblutung in der Kontrollgruppe im Verlauf der Beobachtungsphase tendenziell ab und sind signifikant niedriger als der Ausgangswert. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (MZP3 $p=0,099$; MZP4 $p=0,094$).

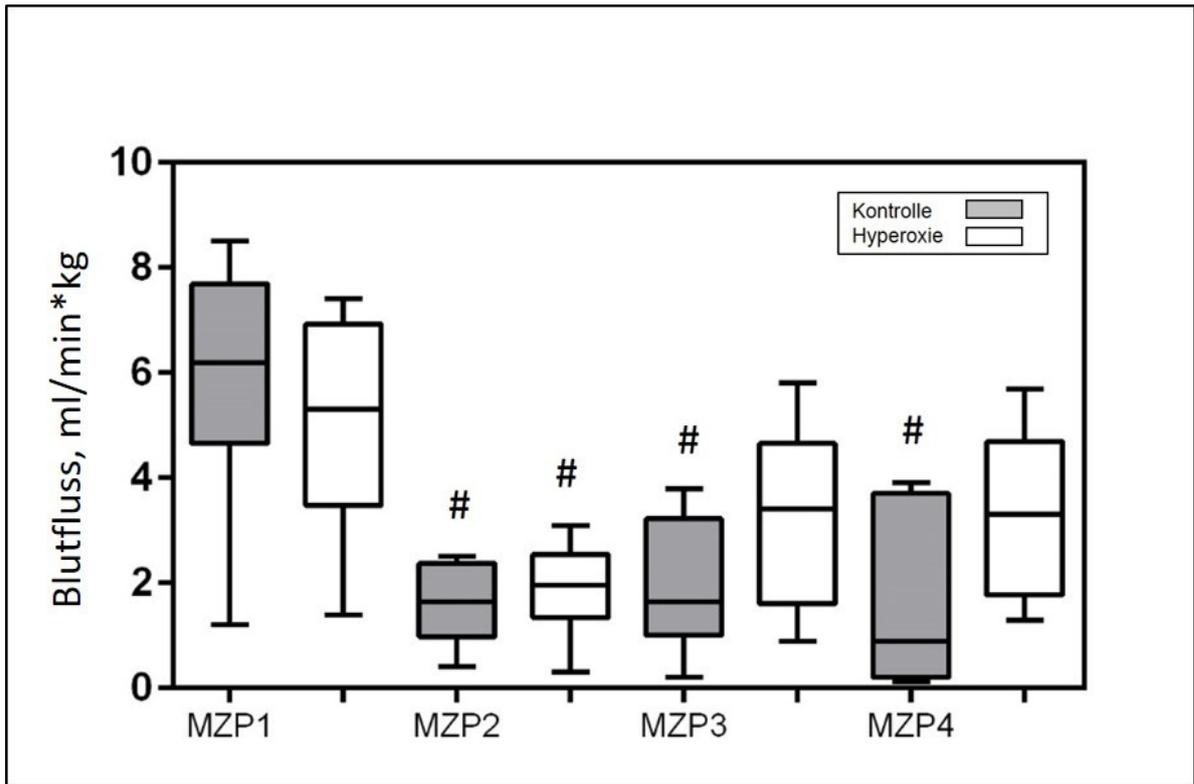


Abbildung 21 Blutfluss in der Arteria renalis der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP), gemessen durch den Ultraschallflusskopf und angegeben in Milliliter (ml) pro Minute Versuchszeit (min) und Körpergewicht in Kilogramm (kg). Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

Tabelle 8 Parameter des renalen Metabolismus der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP). MZP1 als Ausgangspunkt vor Einleitung der Hämorrhagie, MZP2 nach 4 Stunden Hämorrhagie und MZP3 und 4 jeweils nach 12 und 22 Stunden der Interventionsphase. Die Daten der beiden Gruppen werden jeweils als Median, 25. Quartil und 75. Quartil angegeben. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). rv = gemessen im renalvenösen Blut, VO₂ = Sauerstoffaufnahme. Universität Ulm 2014.

		Vor Hämorrhagie - MZP1-	Nach 4h Hämorrhagie - MZP2 -	Nach 12h Intervention - MZP3 -	Nach 22h Intervention - MZP4 -
pH, rv	Kontrolle	7,48 (7,46;7,49)	7,3 (7,25;7,34)#	7,31 (7,03;7,37)#	7,3 (6,87;7,35)#
	Hyperoxie	7,46 (7,43;7,52)	7,34 (7,22;7,42)#	7,34 (7,29;7,38)#	7,34 (7,32;7,35)#
Laktat, rv (mmol/l)	Kontrolle	1,0 (0,8;1,6)	5,6 (4,8;7,0)#	2,3 (1,3;9,9)	2,1 (0,9;10,3)
	Hyperoxie	1,0 (0,8;1,3)	4,2 (3,2;4,9) #§	1,4 (0,7;4,0)	1,0 (0,8;1,3)
VO₂, rv (mlO ₂ /min* kg)	Kontrolle	2,1 (1,8;4,6)	1,5 (1,1;2,1)	5,6 (4;6,3)	4,1 (2,9;4,3)
	Hyperoxie	2,3 (2,0;2,6)	1,0 (0,9;1,4)	3,3 (0,7;3,7)§	2,8 (2,2;3,3)

Im renal-venösen Blut sinkt der pH nach Beendigung der Hämorrhagie in beiden Gruppen bis in den azidotischen Bereich jeweils signifikant ($p < 0,05$) im Vergleich zum Ausgangswert ab. Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Parallel dazu steigen die Serum-Laktatwerte an, wobei diese Werte in der Kontrollgruppe an MZP2 schon signifikant höher ($p = 0,020$) sind. Die Werte sinken in beiden Gruppen ab, und weisen dann keinen signifikanten Unterschied mehr zueinander (MZP3 $p = 0,156$; MZP4 $p = 0,206$) auf.

Während der Interventionsphase ergibt sich eine deutlich höhere Sauerstoffausschöpfung des Nierengewebes in der Kontrollgruppe als in der Hyperoxiegruppe. Dieser Unterschied ist zum MZP 3 signifikant (MZP3 $p = 0,022$; MZP4 $p = 0,082$).

3.3.2 Nierenfunktion

Zur Beschreibung der Nierenfunktion wurden die Urinausscheidung und Kreatinin Clearance jeweils für 2 Beobachtungsphasen aufgezeichnet: Phase 1 vom Anfang der Hyperoxie bis 12h nach Beginn der Intervention und Phase 2 für die verbleibenden 10h der Intervention bis zum Versuchsende. Während die Menge des ausgeschiedenen Urins in Phase 2 in der Kontrollgruppe abnimmt, steigt sie in der Gruppe mit 100% Sauerstoff Beatmung ohne signifikanten Unterschied an (Phase 1 $p=0,560$; Phase 2 $p=0,226$). Die Werte der berechneten Kreatinin Clearance verhalten sich ähnlich (Phase 1 $p=0,340$; Phase 2 $p=0,370$).

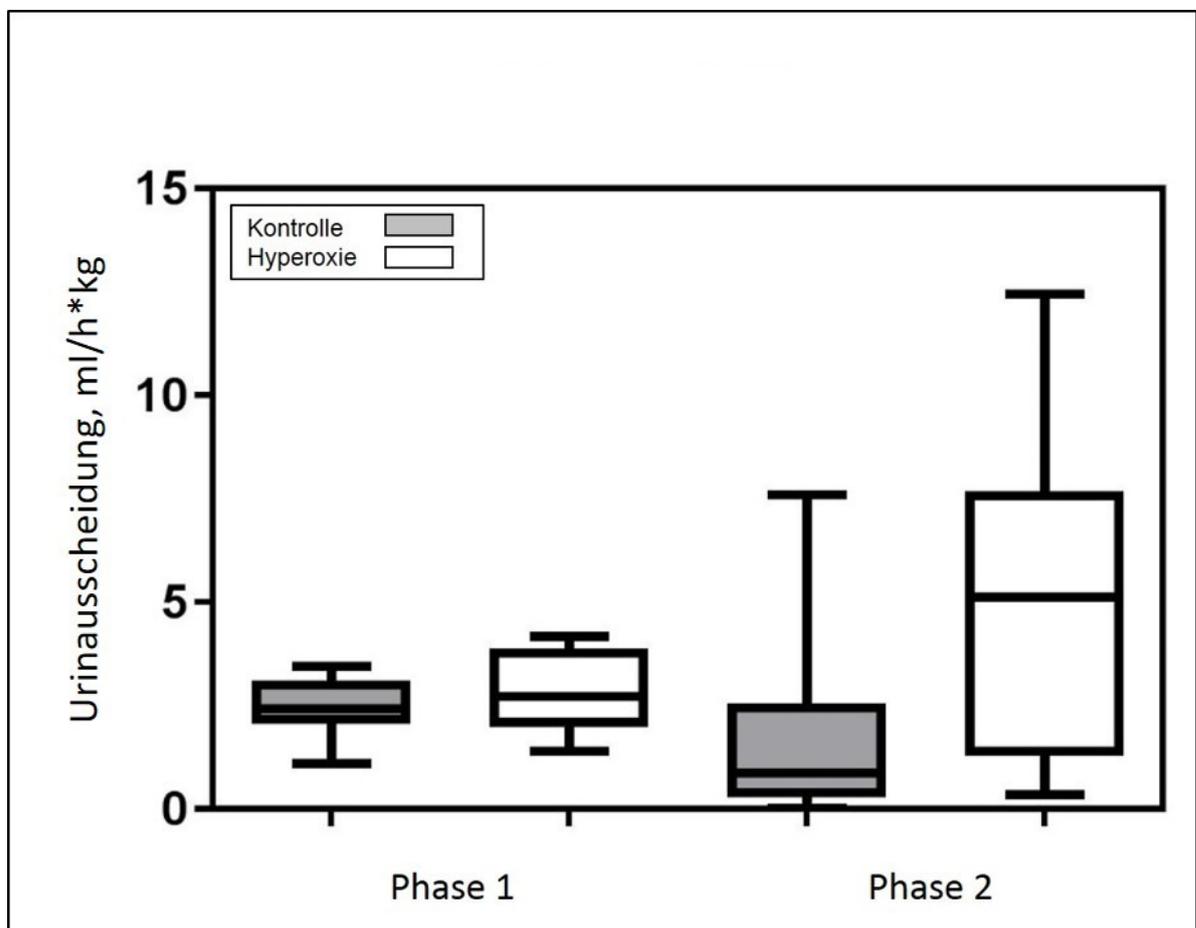


Abbildung 22 Urinausscheidung der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe über 2 Überwachungsphasen, angegeben in ml pro Zeiteinheit in Stunden (h) und pro Körpergewicht (kg). Phase 1 entspricht der Zeit zwischen dem Start der Hämorrhagie und dem MZP3 (12h Intervention), Phase 2 entspricht der anschließenden Zeit der Intervention bis MZP4 (12. bis 22. Stunde Intervention). Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

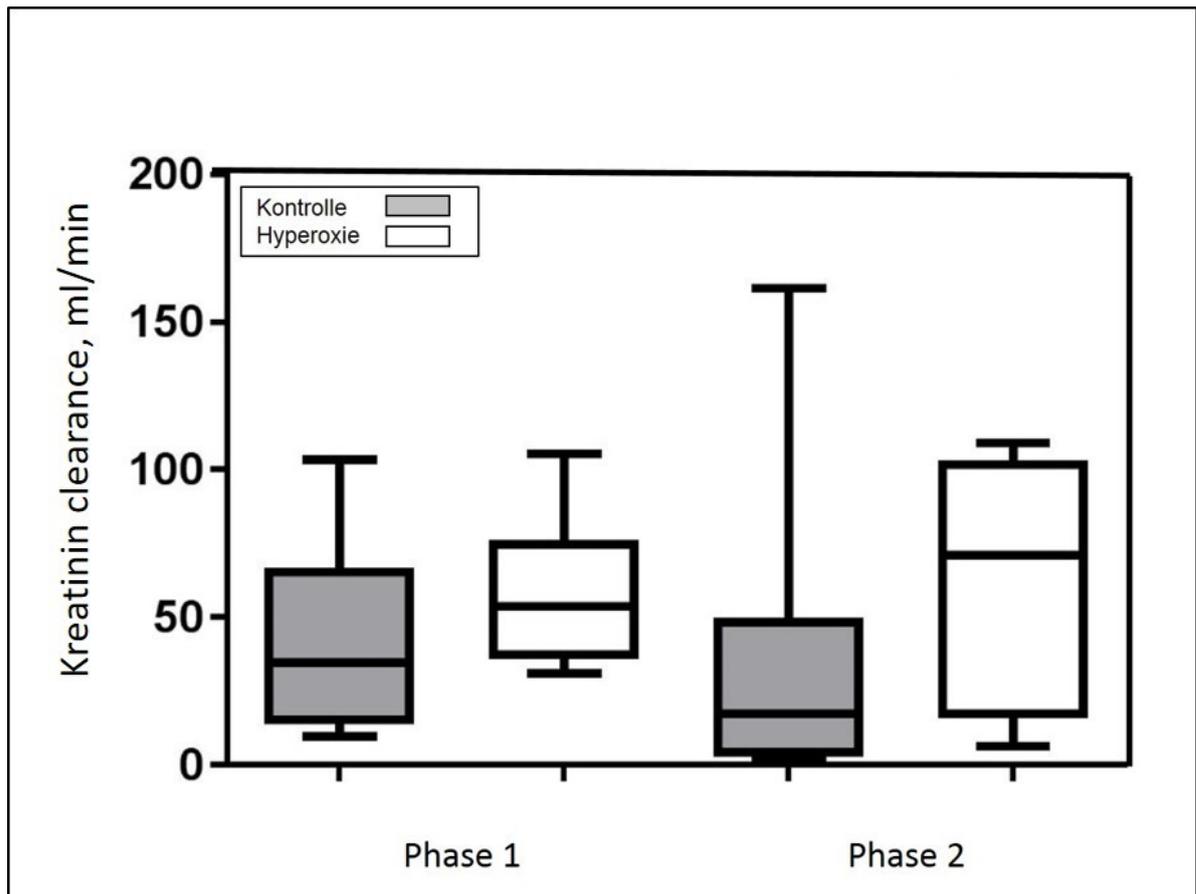


Abbildung 23 Kreatinin Clearance der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe über 2 Überwachungsphasen, angegeben in ml pro Zeiteinheit in Minuten (min). Phase 1 entspricht der Zeit zwischen dem Start der Hämorrhagie und dem MZP3 (12h Intervention), Phase 2 entspricht der anschließenden Zeit der Intervention bis MZP4 (12 bis 22h Intervention). Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

Parallel zu den oben beschriebenen Werten zeigte sich folgende Entwicklung der Werte des Kreatinins im Serum: Die gemessenen Serum-Kreatinin-Werte beider Gruppen steigen nach der Hämorrhagiephase an. In der Hyperoxiegruppe zeigen sich tendenziell niedrigere Werte als in der Kontrollgruppe, jeweils ohne signifikanten Unterschied (MZP3 $p=0,074$; MZP4 $p=0,075$).

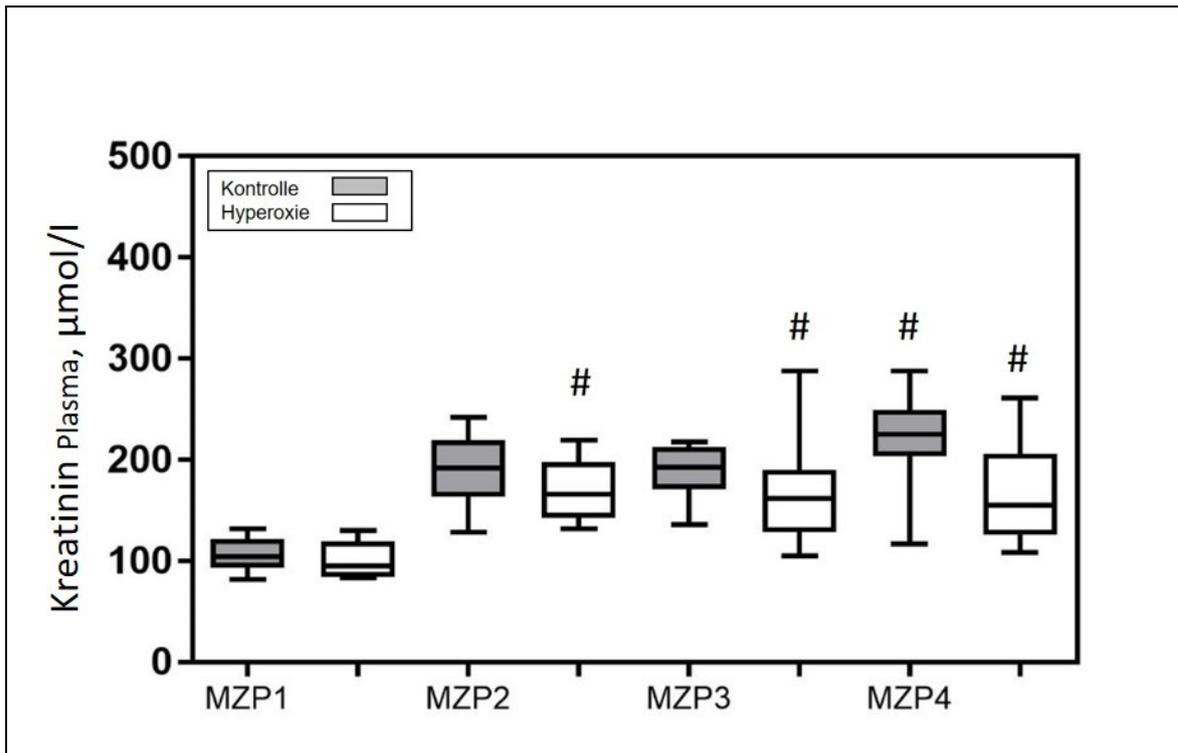


Abbildung 24 Kreatinin im Plasma der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP), gemessen nach dem Jaffe-Prinzip und angegeben in $\mu\text{mol pro Liter (l)}$. Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. Je Versuchsgruppe 9 Schweine ($n=9$). Universität Ulm 2014.

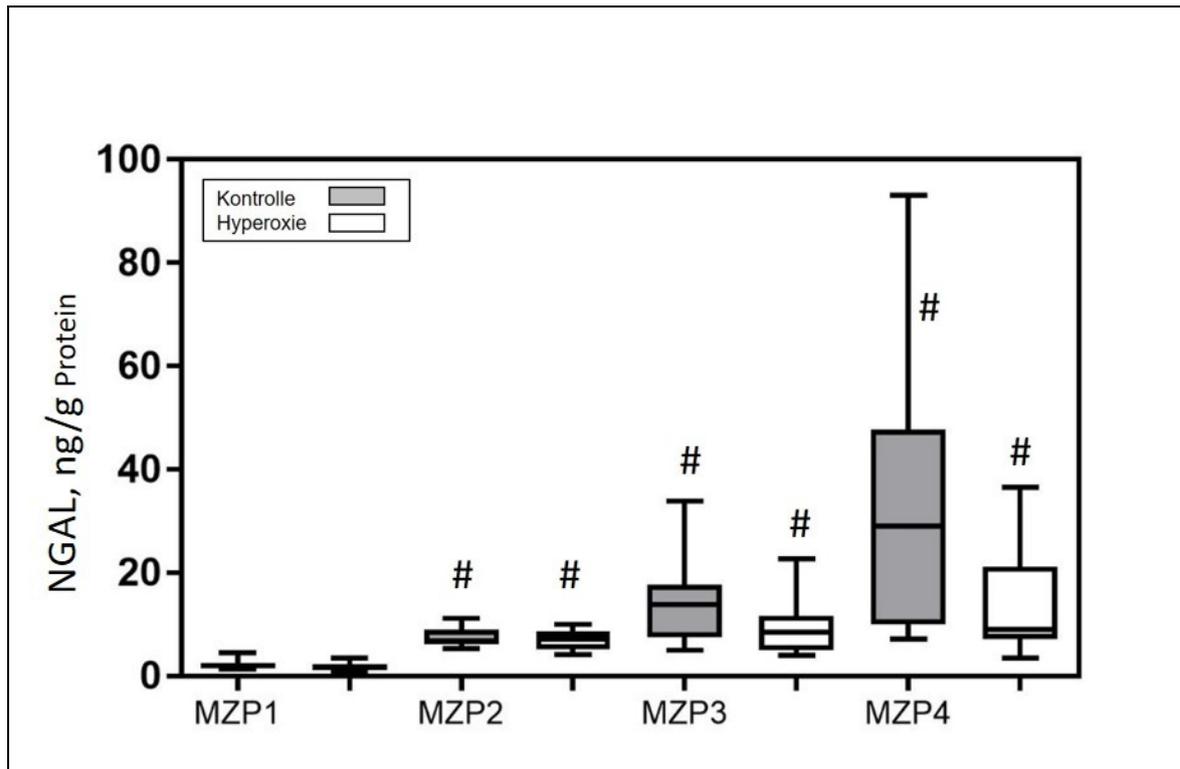


Abbildung 25 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) im Plasma der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten (MZP), gemessen mit dem ELISA und angegeben in ng pro Gramm Gesamtprotein. Darstellung als Box-Plot mit Median, 1. und 3. Quartile, sowie dem Minimum und Maximum. # entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Hämorrhagie. Je Versuchsgruppe 9 Schweine ($n=9$). Universität Ulm 2014.

Als weiterer Marker der Nierenschädigung wurde Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) im Plasma der Versuchstiere bestimmt (Abb 27). Bereits nach den 4 Stunden der Hämorrhagiephase zeigen sich signifikant erhöhte Werte im Vergleich zum Ausgangswert im Serum beider Versuchsgruppen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe steigen diese Werte während der Beatmung mit 100%igem Sauerstoff langsamer und geringfügiger an; es zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (MZP3 $p=0,136$; MZP4 $p=0,114$).

3.3.3 Histopathologie

Neben den immunhistochemischen Markern für Nierenschädigung auf zellulärer Ebene, wurden histopathologische Marker zum Nachweis der Auswirkung des hämorrhagischen Schockes und der Hyperoxie auf mikroskopisch erkennbarer struktureller Ebene mit Hilfe

der Standardfärbungen Periodic Acid-Schiff (PAS) reaction und der Hämatoxylin-Eosin (H.E.Färbung untersucht.

Glomeruläre Tubularisation

Tabelle 9 Glomeruläre Tubularisation in Prozent (%), nachgewiesen an PAS-gefärbten Schnitten des Nierengewebe der Tiere der Kontroll- und Hyperoxiegruppe am Ende des Versuches. Die Daten der beiden Gruppen werden jeweils als Median, 25. Quartil und 75. Quartil angegeben. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

	Hyperoxie	Kontrolle
Glomeruläre Tubularisation, %	0(0;0,5)	0(0;2)

Einzel- und Gesamtscore der histopathologischen Marker

Tabelle 10 Weiterer Parameter der Histopathologie nachgewiesen an H.E.- und PAS-gefärbten Schnitten des Nierengewebes der Tiere der Kontroll- und Hyperoxiegruppe am Ende des Versuches. Die Daten der beiden Gruppen werden jeweils als Median, 25. Quartil und 75. Quartil angegeben. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

	Hyperoxie	Kontrolle
Dilatation der Bowman'schen Kapsel	0 (0;1,3)	0 (0;1)
Synechien	0 (0;0)	0 (0;0)
Tubuläres Ödem	0,3 (0;0,5)	1 (0;1)
Tubulusdilatation	1 (0;1)	0 (0;2)
Tubulusnekrose	0 (0;0,5)	0 (0;1)
Blutstau	0,8 (0;1)	1 (0;1)
Eiweißzylinder	0,5 (0;2)	0,5 (0;1)
Gesamtscore	3,3 (2,4;6,4)	3 (2,5;5)

Es gab keine signifikanten Unterschiede bei den Parametern der Histopathologie der Niere.

3.3.4 Immunhistologie

Das pro-apoptische Enzym Caspase-3 wurde immunhistochemisch im Nierengewebe am Ende des Versuches nachgewiesen (Abb 28 und 29). Caspase-3 ist im Nierengewebe der Hyperoxiegruppe signifikant niedriger exprimiert ($p=0,014$).

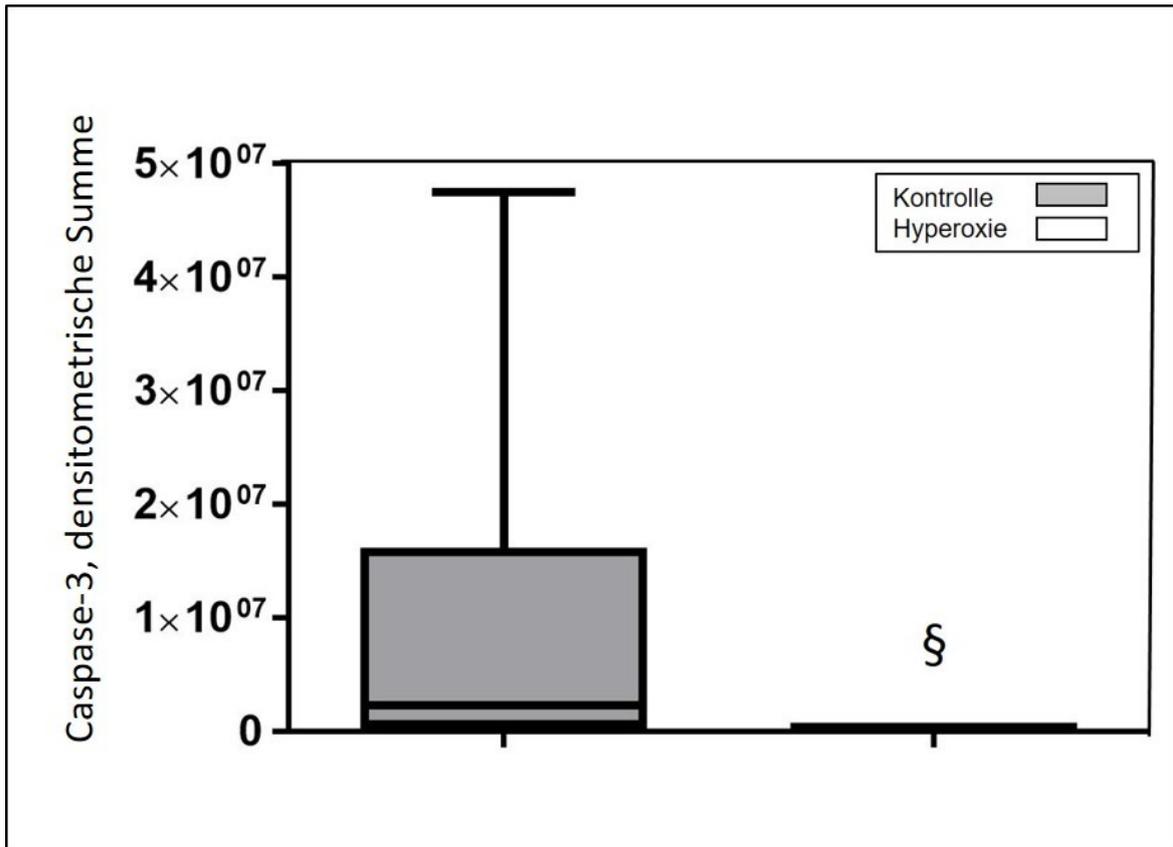


Abbildung 26 Caspase-3 im Nierengewebe der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe am Ende des Versuches, nachgewiesen durch Immunfluoreszenz und angegeben als densitometrische Summe nach Detektion am Mikroskop. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot: Median, 25. Quartil und 75. Quartil, sowie Maximum und Minimum. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Tiere (n=9). Universität Ulm 2014.

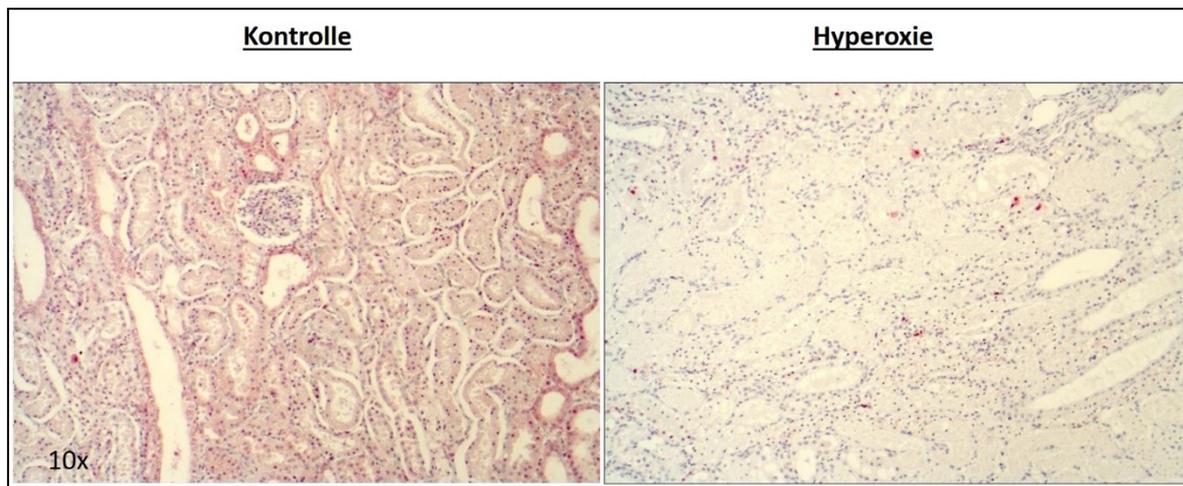


Abbildung 27 Repräsentative Beispielbilder der immunhistochemischen Detektion von Caspase-3 in Nierengewebe je eines Tieres der Kontroll- und Hyperoxiegruppe am Ende des Versuches. Die rötliche Farbe stellt dabei das detektierte Caspase-3 im Interstitium dar. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

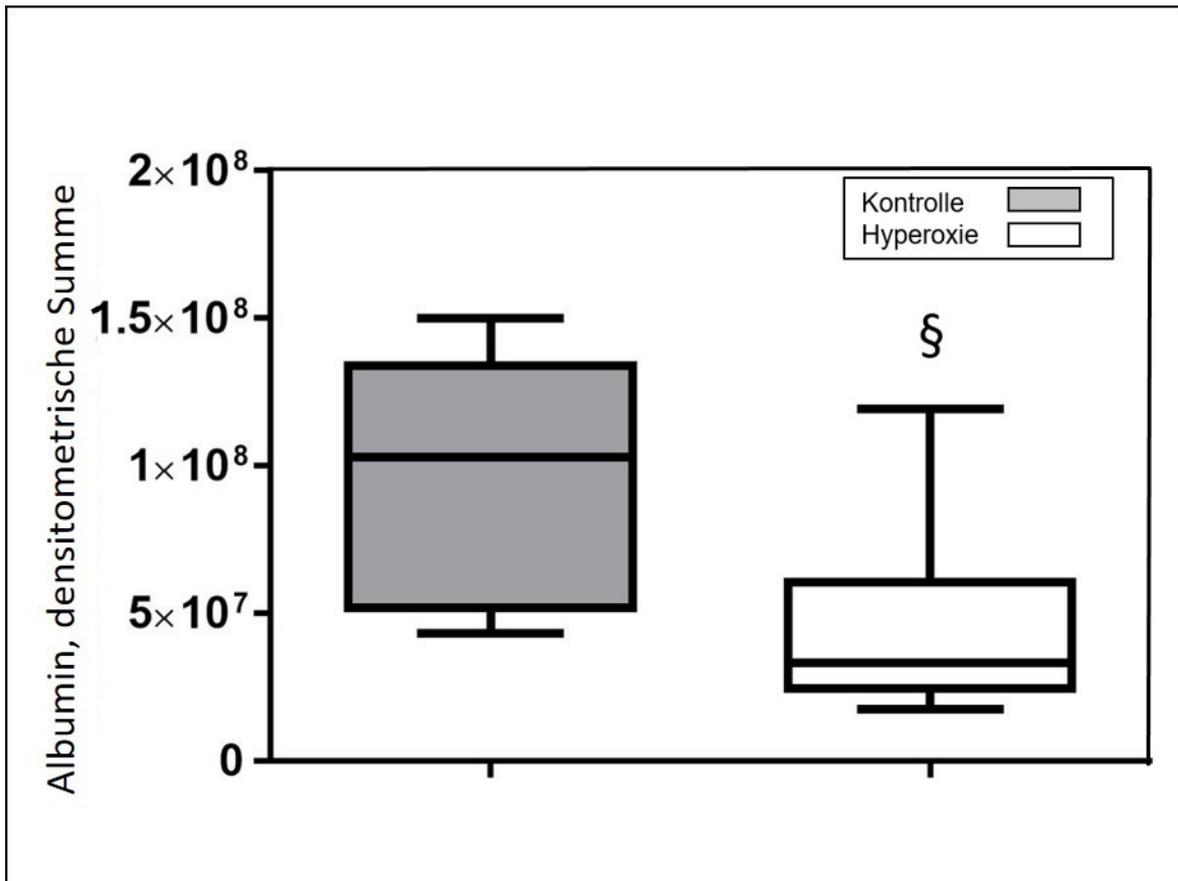


Abbildung 28 Albumin im Nierengewebe der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe am Ende des Versuches, nachgewiesen durch Immunfluoreszenz und angegeben als densitometrische Summe nach Detektion am Mikroskop. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot: Median, 25. Quartil und 75. Quartil, sowie Maximum und Minimum. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

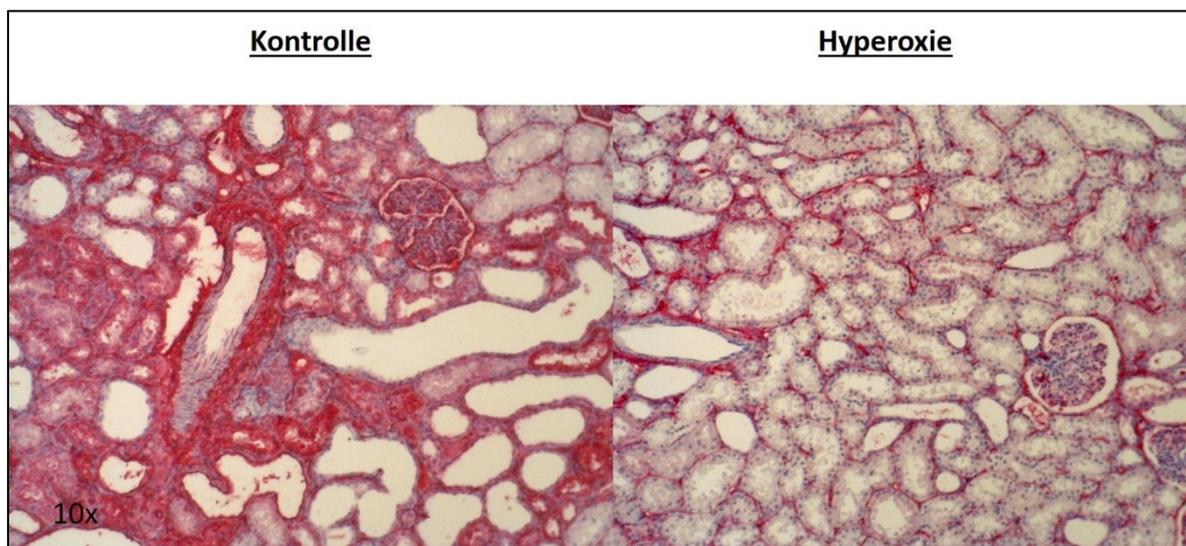


Abbildung 29 Repräsentative Beispielbilder der immunhistochemischen Detektion von Albumin in Nierengewebe je eines Tieres der Kontroll- und Hyperoxiegruppe am Ende des Versuches. Die rötliche Farbe stellt dabei das detektierte Albumin im Interstitium dar. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

Bei den Tiere, die während der Interventionsphase mit purem Sauerstoff beatmetet wurden, fand sich, als Zeichen für die geringer ausgeprägte Permeabilitätssteigerung der Endothelien, signifikant ($p=0,005$) weniger Albumin im Nierengewebe.

Nitrotyrosin

Als Marker für nitrosativen Stress wurde Nitrotyrosin im Nierengewebe am Ende des Versuches immunhistochemisch nachgewiesen.

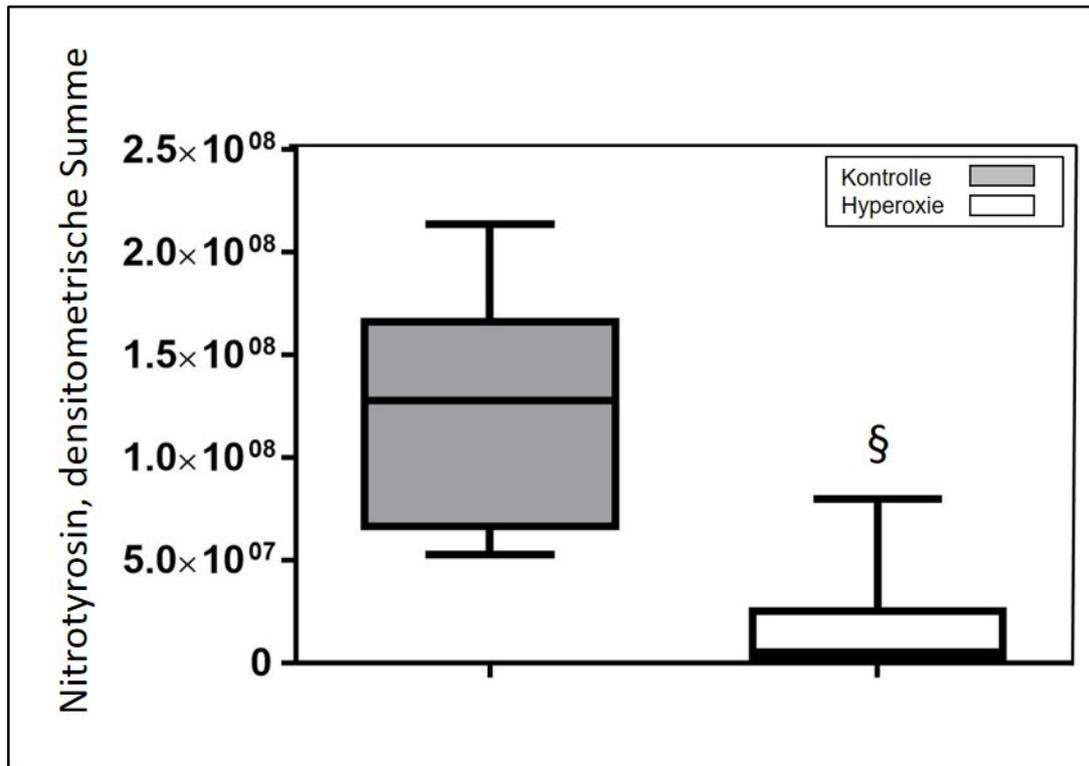


Abbildung 30 Nitrotyrosin im Nierengewebe der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe am Ende des Versuches, nachgewiesen durch Immunfluoreszenz und angegeben als densitometrische Summe nach Detektion am Mikroskop. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot: Median, 25. Quartil und 75. Quartil, sowie Maximum und Minimum. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

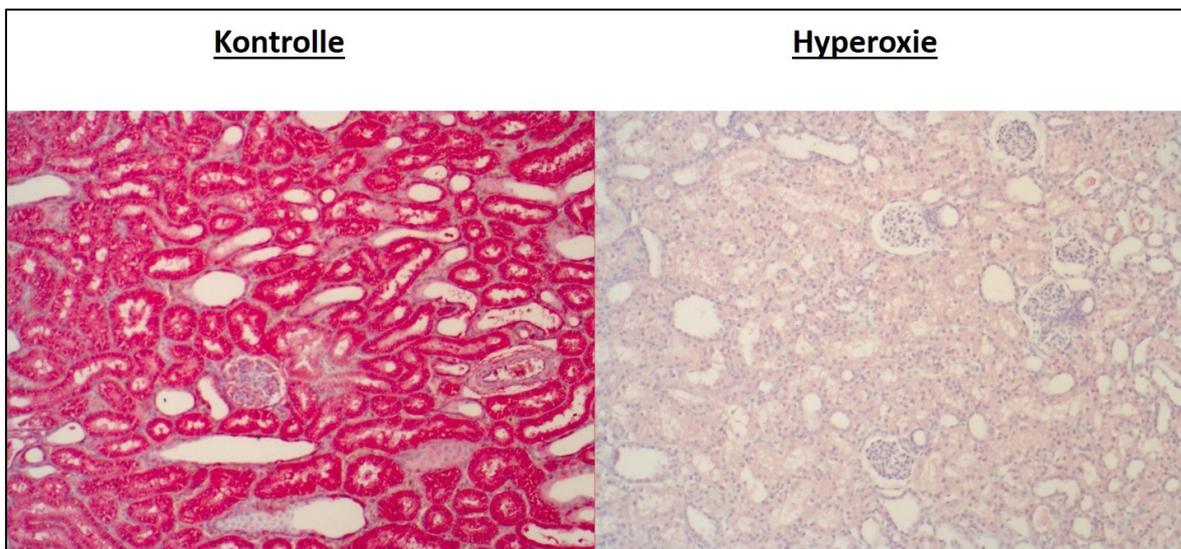


Abbildung 31 Repräsentative Beispielbilder der immunhistochemischen Detektion von Nitrotyrosin im Nierengewebe je eines Tieres der Kontroll- und Hyperoxiegruppe am Ende des Versuches. Die rötliche Farbe stellt dabei das detektierte Nitrotyrosin im Interstitium dar. Je Versuchsgruppe 9 Schweine (n=9). Universität Ulm 2014.

Korrelierend zu den systemischen Markern zeigt sich die Bildung von Nitrotyrosin in der Hyperoxiegruppe signifikant geringer exprimiert, als in der Kontrollgruppe ($p=0,003$). Abb 33 zeigt 2 Beispiele der Färbungen, die ausgewertet wurden.

Cystathionin γ -Lyase (CSE)

Das H₂S-produzierende Enzym Cystathionin- γ -Lyase (CSE) ist in den postinterventionell genommenen Nierenbiopsien bei den Tieren der Hyperoxiegruppe signifikant (p=0,003) stärker exprimiert, als bei den Tieren der Kontrollgruppe.

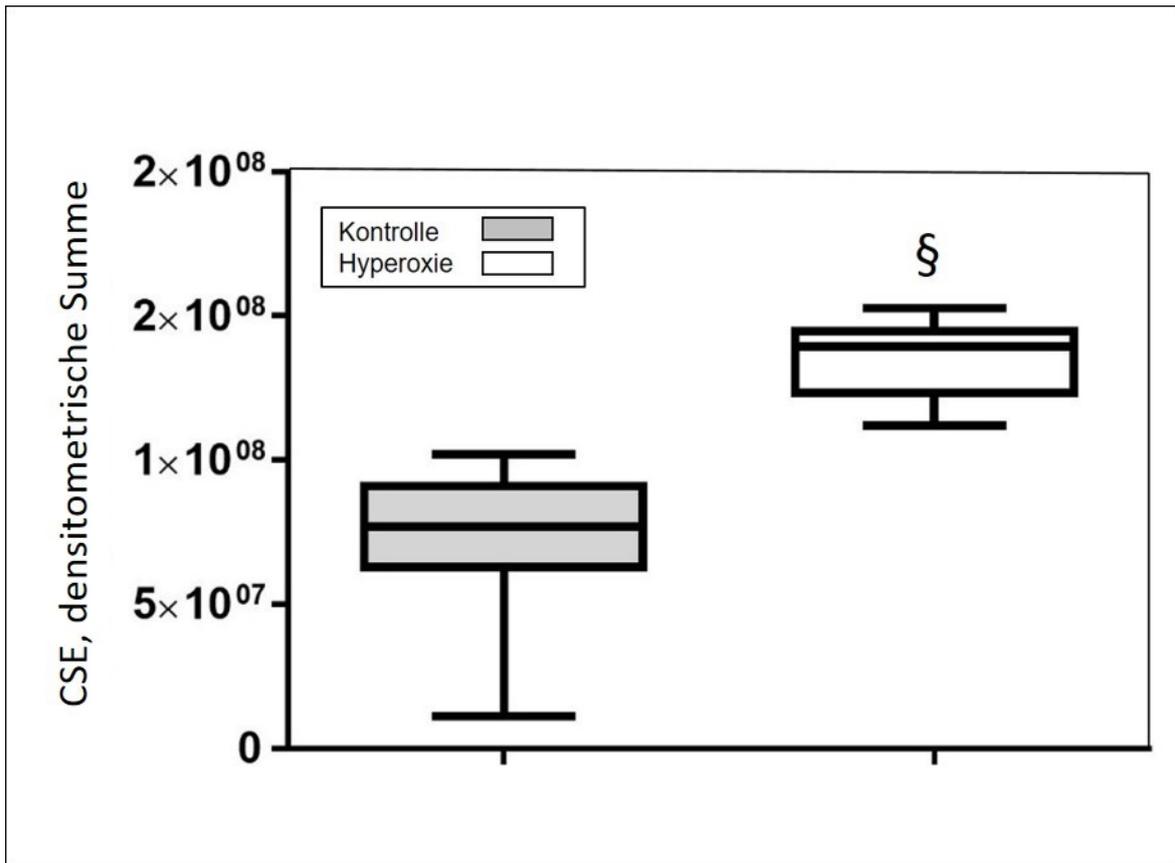


Abbildung 32 Cysthationin- γ -Lyase (CSE), im Nierengewebe der Versuchstiere der Hyperoxie- und Kontrollgruppe am Ende des Versuches, nachgewiesen durch Immunfluoreszenz und angegeben als densitometrische Summe nach Detektion am Mikroskop. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot: Median, 25. Quartil und 75. Quartil, sowie Maximum und Minimum. § entspricht $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe. Je Versuchsgruppe 9 Schweine ($n=9$). Universität Ulm 2014.

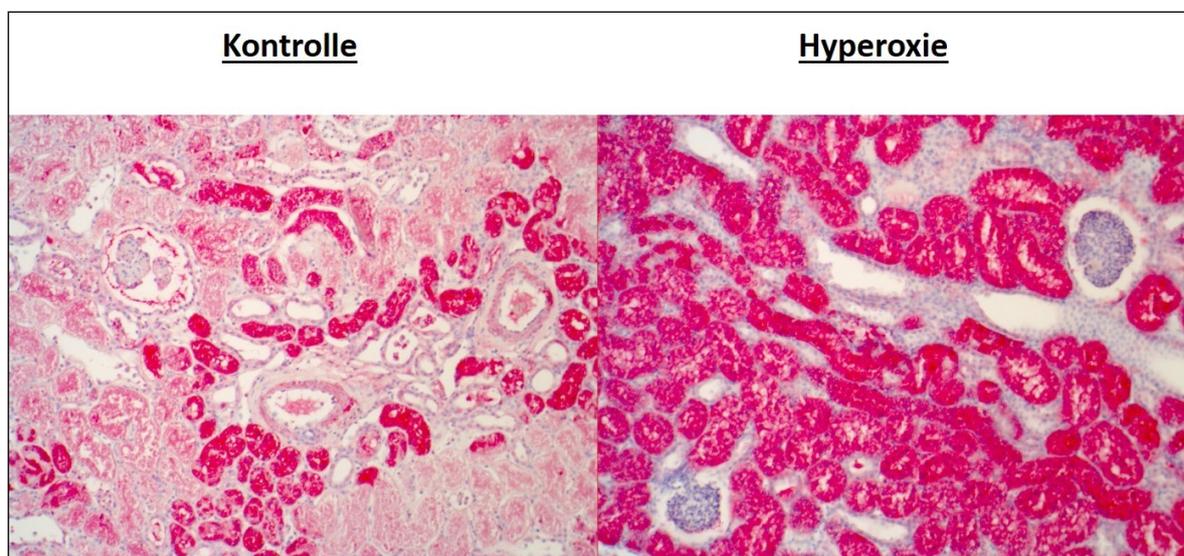


Abbildung 33 Repräsentative Beispielbilder der immunhistochemischen Detektion von CSE in Nierengewebe je eines Tieres der Kontroll- und Hyperoxiegruppe am Ende des Versuches. Die rötliche Farbe stellt dabei das detektierte Nitrotyrosin im Interstitium dar. Je Versuchsgruppe 9 Schweine ($n=9$). Universität Ulm 2014.

4 DISKUSSION

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob eine Beatmung mit 100%igem Sauerstoff in der akuten Phase eines hämorrhagischen Schockes im Schwein der Entwicklung eines Multiorganversagens entgegenwirken kann.

Diese Studie baute auf dem Projekt „The role of pure O₂ breathing in a clinically relevant, long-term, hyperdynamic porcine model of fecal peritonitis-induced septic shock“ auf, welches bereits anti-apoptische und anti-inflammatorische Effekte einer reinen Sauerstoff-Ventilation über 12 Stunden in einem Langzeitmodell am Schwein mit fäkaler Peritonitis zeigen konnte (Barth 2008, Hauser 2009, Calzia 2010). Das hier verwendete Langzeitmodell des hämorrhagischen Schockes am Schwein wurde im Rahmen des BMVg-Forschungsprojektes „H₂S-induzierte „suspended animation“ bei hämorrhagischem Schock“ (Bracht 2012, Gröger 2013) entwickelt.

Überprüft wurden die Auswirkungen des Sauerstoffs auf: Hämodynamik, Lungenfunktion und Gasaustausch, oxidativer und nitrosativer Stress, sowie systemische Entzündungsreaktion und Organfunktion am Beispiel der Niere.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Beatmung mit 100%igem Sauerstoff tendenziell die Organfunktion und das Überleben verbesserte, was vermutlich mit der reduzierten systemischen Entzündungsreaktion und reduziertem oxidativem und nitrosativem Stress zusammenhing.

4.1 Das Tiermodell und die Tierintensivstation

Der traumatisch-hämorrhagische Schock ist die häufigste Todesursache in der Altersgruppe zwischen 5 und 44 Jahren [52, 118]. Die Etablierung eines klinisch relevanten Versuchsmodells ist daher von großem Interesse. Um die pathophysiologischen Mechanismen des hämorrhagischen Schockes im Menschen möglichst genau zu replizieren, entschieden wir uns für ein Langzeitmodell am Schwein und gegen ein etabliertes Nager-Modell. Mäuse und Ratten beispielsweise sind als Versuchstiere beliebt, da sie auf Grund ihrer Größe einfach zu handhaben und bezüglich Haltung und Pflege günstig sind. Sie haben

eine kurze Generationsdauer und produzieren so in kurzer Zeit eine hohe Zahl an Nachkommen. Transgene Ansätze und gezielte Genmanipulation sind zu Standardtechniken geworden. Jahrelange Nutzung von Mäusen in der Forschung hat eine Vielzahl an Inzuchtlinien hervorgebracht [30]. Schweine haben hingegen eine längere Generationszeit [37]. Durch ihre Körpergröße sind sie deutlich teurer in der Haltung und benötigen während der Operationsphase eine Medikation in höherem Maße.

Dennoch ist das Schwein als Großtiermodell in einer präklinischen Studie zum hämorrhagischen Schock dem Nager deutlich überlegen. Das Schwein weist bezüglich der Anatomie, Physiologie und Immunantwort hohe Homologien zum Menschen auf, was für die Übertragbarkeit der komplexen Abläufe des hämorrhagischen Schocks von größter Wichtigkeit ist [108, 115]. Nicht zuletzt aufgrund ihrer Körpergröße war der hier erfolgte Umfang der Blutentnahmen und somit die Generierung von großen Datensätzen möglich, um die Pathophysiologie des hämorrhagischen Schockes und den potenziellen Therapieansatz eines Intensivpatienten möglichst genau zu erforschen. Durch hohe Analogien im kardiovaskulären System sind hämodynamische Abläufe übertragbar und der Einsatz von handelsüblichen Kanülen und Blutentnahmesets aus der Human-Medizin möglich. Die Körpergröße macht die Gewinnung von Probenmaterial in einem Umfang möglich, der bei Nagern undenkbar wäre [109, 112].

Wie zuvor beschrieben, stellten Nierenfunktion und Pathophysiologie der Nieren einen wichtigen Teilabschnitt dieser Arbeit dar. Die Nierenanatomie von Schwein und Mensch besitzt eine höhere Ähnlichkeit als die anderer Spezies [116]. Wie bei Menschen und Affen finden sich bei Schweine multilobuläre, multipapilläre Nieren mit einem verzweigten Kelchsystem. Im Gegensatz hierzu weisen zum Beispiel Mäuse, Ratten und Hamster Strukturen mit unilobulären und unipapillären Nieren auf. Dieser Unterschied setzt sich in der arteriellen und venösen Gefäßstruktur fort [108]. Bei Menschen und Schweinen findet sich ein kompliziertes System aus interlobulären und segmentalen Arteriolen, die Anastomosen miteinander bilden und die zahlreichen Nierenläppchen mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen. Bei Mäusen und Ratten sind alle Arteriae renales Endarterien und es finden sich keine Anastomosen. Diese sind durch das Fehlen eines multilobulären Systems auch nicht notwendig [99]. Diese Unterschiede legen nahe, dass sich der kortikale und medulläre Sauerstoffbedarf zwischen den einzelnen Spezies deutlich unterscheidet.

Einige Punkte erschweren die Übertragbarkeit der Daten des Schweines auf den Menschen. So weist das normale Hausschwein dem Menschen gegenüber eine Hyperkoagulabilität auf.

Die in dieser Studie verwendete Schweinerasse war eine spezielle Kreuzung aus Tieren der Stämme Bretoncelles, Meishan und Willebrand (BMW-Schweine). Die Tiere wiesen eine Genmodifikation des von-Willebrand-Faktors auf, wodurch dessen Aktivität mit der des von-Willebrand-Faktors beim Menschen vergleichbar wurde [83].

Die Relevanz des hier verwendeten Tiermodelles und der verwendeten Schweinerasse wurde in der Literatur [2, 24] und in eigenen Projekten bestätigt [17, 110].

Die Zuordnung des jeweiligen Tieres zu einer Versuchsgruppe erfolgte am Morgen des Versuches nach abgeschlossener Narkoseeinleitung über eine Auslosung. So wurde eine Präferenz bei der Auswahl der Tiere vermieden. Das Gewicht der Tiere wies aufgrund der Altersspanne von 12-18 Monaten relativ große Unterschiede auf. Eine weitere Eingrenzung war aufgrund der langen Generationsdauer der Tiere nicht möglich und sollte eine mögliche Übertragung der Ergebnisse in ein klinisches Setting eher erleichtern. Um nun trotzdem ein vergleichbares Maß des hämorrhagischen Schockes zu erreichen erfolgte die Einleitung der Hämorrhagie gewichtsadaptiert über die Entnahme von 30% des Blutvolumens. Die Messungen zeigen, dass sich die Menge des tatsächlich entnommenen Blutvolumens nicht zwischen den Gruppen unterschied.

Die institutseigene Tier-Intensivstation ermöglichte die maßstabgetreue Simulation der Therapie eines Patienten im hämorrhagischen Schock. Sie diente bereits in vergangenen Studien als Setting für Versuche an Schweinen [17, 110]. Die Überwachungseinheit, mit der z.B. die hämodynamischen Parameter aufgezeichnet wurden bestand aus Instrumenten, wie sie auch für Menschen verwendet werden. Es standen Geräte wie eine BGA-Maschine und chirurgische Instrumente zur Verfügung. Geleitet und durchgeführt wurden die Versuche zudem durch in der Intensivmedizin erfahrene Anästhesisten und einen Tierarzt.

4.2 Das Überleben

In der Hyperoxiegruppe starb ein Tier vor Ende des Versuches, während 4 Tiere in der Kontrollgruppe frühzeitig verstarben. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Die Beatmung mit 100%igem Sauerstoff führte damit in diesem Langzeitversuch des

hämorrhagischen Schockes nicht zu einem signifikant verlängerten Überleben während der Beobachtungsphase von 22 Stunden.

Ziel der Studie war es, die Effekte von 100%igem Sauerstoff auf die Organfunktion am Beispiel der Niere zu überprüfen. Eine Aussage über einen Überlebensvorteil ist zum einen durch die Fallzahl erschwert, die wie in jedem Tierversuch aus ethischen und ökonomischen Gründen abgewogen werden muss und zum anderen dadurch, dass eine Langzeitbeobachtung der Tiere über die Beendigung des Versuches in der Intensivstation hinaus ebenfalls ethisch nicht vertretbar ist. Wie bereits erwähnt, ist die Entwicklung eines Multiorganversagens durch Gewebehypoxie jedoch ursächlich für hohe, „späte“ (>48h) Mortalitätsraten [3, 42]. Da es in der Hyperoxiegruppe zu einer tendenziellen Verbesserung der Organfunktion kam, wäre es interessant zu sehen, welche Ergebnisse eine längere Beobachtungsphase in einer nachfolgenden Studie erbringen würde.

4.3 Die Organfunktion

4.3.1 Die Hämodynamik

Zeichen eines systemischen Schockes sind ein mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) unter 70mmHg, assoziiert mit reflektorischer Tachykardie [122]. In diesem Versuch unterschied sich das tatsächlich entnommene Blutvolumen nach der Titration des mittleren arteriellen Druckes auf 35mmHg bezogen auf das Körpergewicht zwischen den Tieren nicht wesentlich. Die Messungen des mittleren arteriellen Druckes (MAP) am 2. Messzeitpunkt, also 4 Stunden nach Einleitung der Schockphase, zeigten in beiden Gruppen den durch das Versuchsprotokoll angestrebten MAP von 35mmHg und eine daraus resultierende deutlich erhöhte Herzfrequenz. Somit befanden sich alle Tiere ab diesem Zeitpunkt in einem vergleichbaren Schockzustand.

Die Hämodynamik-Parameter wiesen während der Beobachtungsphase keinen signifikanten Unterschied auf. Auch die Menge der Hydroxyethylstärke (HES)-Substitution unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Der Bedarf an Noradrenalin, um die hämodynamischen Ziele zu erreichen, war während der Intervention in der Kontrollgruppe jedoch tendenziell höher als in der Hyperoxiegruppe.

Sauerstoff ist ein potenter Vasokonstriktor, was sowohl bei gesunden Probanden [87], als auch bei Patienten im Schock [100] gezeigt wurde. In der Tat bewirkte eine Beatmung mit

100%igem Sauerstoff einen Anstieg des Blutdruckes durch periphere Vasokonstriktion und nachfolgend eine Abnahme von Herzfrequenz und Herzzeitvolumen sowohl in Schockmodellen der Literatur [10, 23, 32], als auch in vorrangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe [8, 41]. Durch das frühzeitige Versterben eines Tieres in der Hyperoxiegruppe aufgrund eines Kreislaufzusammenbruches, kam es bei einigen Werten nicht zu einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Zu der stabileren hämodynamischen Situation hat sicherlich auch die Reduktion der Flüssigkeitsverschiebung aus den Gefäßen in das Interstitium geführt. Die Messung des Hb-Wertes zeigte an MZP 4 einen Anstieg bei allen Tieren. Dies ist am ehesten durch Hämokonzentration durch Extravasation zu erklären. Klinisch sichtbar wurde dies durch Aszites, welche in gewissem Maß bei jedem Tier am Ende des Versuches bei der Organpräparation vorlag. Der immunhistochemische Nachweis von Albumin im Nierengewebe aller Tiere am Ende des Versuches ergab signifikant niedrigere Werte im Gewebe der Hyperoxietiere. Dies ist durch die reduzierte systemische Entzündungsreaktion erklärbar. Die Ischämie-/Reperfusionsequenz führt bei den Tubuluszellen früh zu einem Verlust der Zellintegrität durch Veränderungen am Zytoskelett und Abbau des junctionalen Komplexes durch entzündliche Mediatoren [14]. Auch die Tubuluszellen produzieren Mediatoren wie Zytokine, die zum einen die Entzündungsreaktion potenzieren und zum anderen über die Aktivierung der Leukozyten und des Komplementsystems das Einwandern von Leukozyten und durch mikrovaskuläre Dysfunktion ein Flüssigkeitsdurchtritt in das Interstitium begünstigen [14, 29].

Die Tiere der Hyperoxiegruppe wiesen in diesem Kontext auch signifikant niedrige Werte des kardialen Troponin I (cTnI) als Marker für kardiale Belastung auf [130].

Die Auswirkungen von Hyperoxie auf regionale Gefäßbetten sind noch wenig erforscht. Auch im Hinblick auf andere Organsysteme wäre dies ein interessanter Ansatzpunkt für kommende Projekte.

4.3.2 Die Lungenfunktion

Negative Auswirkungen von purem Sauerstoff auf die Lunge und die Atmung sind schon über ein Jahrhundert bekannt [15]. Durch das Fehlen von Stickstoff in der Atemluft, kommt

es zu Resorptionsatelektasen [6, 103]. Die Austauschfläche für Sauerstoff verringert sich durch intrapulmonale Shunts, was die Oxygenierung des Blutes erheblich beeinträchtigt [95, 103]. Exposition von Sauerstoffkonzentrationen von über 90% über Stunden bis Tage führt zu einer lokalen Entzündungsreaktion [49]. Als Folge dieser Alveolitis können sich im Verlauf hyaline Membranen und ein pulmonales Ödem ausbilden, was bei kontinuierlicher Exposition zum Tod führt [111]. Studien an gesunden Probanden und Versuchstieren hierzu stammen weitestgehend aus den 1960er und 1970er Jahren. Sauerstoff wurde über 14 Stunden bis hin zu 30 Tagen verabreicht. Es wurde gezeigt, dass das Ausmaß dieser Hyperoxie induzierten Lungenschädigung direkt proportional zum Sauerstoffpartialdruck und der Dauer der Exposition ist [49].

Das heutzutage gängige Konzept der lungenprotektiven Beatmung war zu dieser Zeit noch nicht bekannt [6, 10, 49]. Durch niedrige Tidalvolumina und den Einsatz von positivem endexpiratorischem Druck (PEEP) kann Resorptionsatelektasen durch Hyperoxie vorgebeugt werden kann [18]. So sahen einige Studien der letzten Jahre keinen negativen Effekt von Hyperoxie auf Lungenmechanik oder Gasaustausch, trotz einer Expositionsdauer von über 24-40 Stunden [8, 18]

Es scheint zudem eine unterschiedliche Empfindlichkeit der verschiedenen Spezies zu geben: In Nagern wurde gezeigt, dass Hyperoxie bestehende Lungenschädigung verstärkt, während ein vorbestehender Lungenschaden die Empfindlichkeit gegenüber Hyperoxie steigert. Dieser Effekt scheint für Primaten nicht nachweisbar zu sein [70].

In diesem Versuch führte Beatmung mit 100%igem Sauerstoff nicht zu einer messbaren Verschlechterung der Lungenfunktion. Die Hyperoxietiere wiesen einen signifikant höheren Horowitz-Index auf als die Kontrolltiere. Der Horowitz-Index ist als Quotient aus dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck (paO_2) und der Sauerstoffkonzentration der Einatemluft (FiO_2) in der Klinik ein Maß für die Einschätzung der Oxygenierungsfähigkeit der Lunge. Nach der Berliner Definition des Akuten Respiratorischen Distress Syndromes (ARDS) wird eine paO_2/FiO_2 zwischen 200 und 300mmHg als mildes, zwischen 100 und 200mmHg als mittelgradiges und unter 100mmHg als schwergradiges ARDS bezeichnet [94]. Das ARDS ist immer ein lebensbedrohlicher Zustand, der intensivmedizinische Betreuung erfordert, häufig mit Multiorganversagen vergesellschaftet und mit hohen Morbiditäts- und Mortalitätsraten [73]. Die Werte der Kontrolltiere sanken in der Beobachtungsphase sukzessive ab, sodass am Ende des Versuches einige der Kontrolltiere ein mildes ARDS aufwiesen. Im Gegensatz hierzu waren die Oxygenierungswerte der Hyperoxietiere

signifikant höher. Diese Beobachtung kann als gebesserte Lungenfunktion durch Beatmung mit purem Sauerstoff gewertet werden. Zum Teil ist sie aber vermutlich auch Ausdruck des negativen linearen Zusammenhanges zwischen dem Index und FiO_2 , der sich aus seiner mathematischen Berechnung ergibt [43].

4.4 Metabolismus

Die Laktatazidose ($pH < 7,2$) ist ein unabhängiger Risikofaktor für eingeschränkte Katecholamin-Effizienz und myokardiale kontraktile Dysfunktion [55], sowie für einen paralysierten Gefäßtonus, reduzierte Nierenfunktion und Beeinträchtigungen der Gerinnung [67]. Im Schockgeschehen ist sie assoziiert mit hoher Morbidität und Mortalität [47, 96].

Hypoxie zwingt die Zellen dazu auf anaeroben Stoffwechsel umzusteigen, was nicht nur energetisch gesehen ineffektiver ist, sondern zur Anhäufung von Laktat im Gewebe führt [96]. In der Glykolyse im Cytoplasma entsteht Pyruvat, welches unter aeroben Bedingungen über die oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA in den Zitratzyklus einfließt. Unter anaeroben Bedingungen oder bei intensivierter Glykolyse wird Pyruvat hingegen über die Laktat-Dehydrogenase (LDH) zu Milchsäure umgewandelt. In wässriger Lösung dissoziiert Milchsäure dann fast vollständig zu Laktat und einem Wasserstoff-Ion [92]. Diese Wasserstoff-Ionen, fließen während der oxidativen Phosphorylierung in die Produktion des ATPs ein. Ist dieser Weg blockiert oder überlastet, kommt es zu einer Anhäufung von Wasserstoff-Ionen, die zur Azidose führt. Die Eliminierung von Laktat aus dem Kreislauf erfolgt durch die Leber und die Nieren, was durch den reduzierten Blutfluss der Organe im Schockzustand erschwert wird, und zu einem weiteren Ansteigen des Laktatlevel im Blut führt.

Am Ende der 4-stündigen Hämorrhagiephase zeigten alle Tiere azidotische pH-Wert, sowie signifikant zum Ausgangswert erhöhte Laktat-Werte als Zeichen für den anaeroben Metabolismus des Organismus. Der pH-Wert der Tiere in der Hyperoxiegruppe stieg während der Interventionsphase wieder an und war im Vergleich zum Ausgangswert nur noch grenzwertig erniedrigt, während die Werte der Kontrolltiere weiter in den azidotischen Bereich sanken. Passend hierzu kam es bei den Interventionstieren zu einer deutlichen

Reduktion des Serumlaktatwertes auf Normwertniveau, während die Werte der Kontrolltiere im Durchschnitt fast doppelt so hoch waren.

Die Höhe, der im Blut gemessenen Laktatwerte reflektieren direkt die Sauerstoffmangelbedingungen auf zellulärer Ebene, und sind einerseits ein wichtiger diagnostischer und prognostischer Parameter [122] und andererseits ein guter Indikator für die Schwere des Schockzustandes [3]. Inflammatorische Botenstoffe, sowie körpereigene oder substituierte Katecholamine, steigern die Glykolyse und potenzieren so die Laktatbildung [96]. Neben der verbesserten Sauerstoffversorgung auf zellulärer Ebene hat also sicherlich auch die Reduktion des Bedarfes an Noradrenalin und die abgeschwächte Entzündungsreaktion zu einer Reduktion der Laktatazidose geführt.

4.5 Die Nierenfunktion

Durch Zentralisierung während des Schockgeschehens kommt es zu einer Reduktion des Blutflusses in den peripheren Organen und damit auch in den Nieren. Die Durchblutung der Nieren sinkt dabei verhältnismäßig stärker als die der anderen Organe. Die Reduktion der Nierendurchblutung scheint Teil eines Kompensationsmechanismus des Körpers zu sein, in dem die Blutzufuhr von in Ruhe hyperperfundierten Organen reduziert, und damit die Sauerstoffzufuhr des gesamten Körpers erhöht wird [91].

In dieser Studie führte die Beatmung mit 100%igem Sauerstoff nicht nur zu einer Verbesserung der systemischen hämodynamischen Parameter, sondern hatte auch eine deutliche Zunahme der Nierendurchblutung zur Folge. Diese näherte sich in der Hyperoxiegruppe während der Interventionsphase den Ausgangswerten an und war zu MZP 3 ($p=0,357$) und 4 ($p=0,407$) nicht mehr signifikant erniedrigt. Dies unterstützt, was in der Vergangenheit sowohl in der Literatur beschrieben wurde, als auch durch eigene Experimenten gezeigt werden konnte: Hyperoxie führt zu einer Umverteilung des Herzzeitvolumens zu Gunsten der Leber [8] und Nieren [11, 23, 113].

Als Folge hiervon kam es zu einer deutlich verbesserten Nierenfunktion bei den Tieren der Interventionsgruppe:

Klinisch definiert ist akutes Nierenversagen durch Abfallen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) ($<0,5\text{ml/kgKG/h}$) und dem damit verbundenen Anstieg des Kreatinin- und Natriumwertes im Blut [105, 122]. Die Messung der Urinproduktion nach 12h Intervention ergab noch keinen deutlichen Unterschied zwischen den Gruppen, während sie sich nach 22 Stunden Intervention bei den Hyperoxie-Tieren durchschnittlich verdoppelte und bei den Kontrolltieren sogar weiter absank. Diese Werte korrelierten mit einer deutlich verbesserten Kreatinin-Clearance in der Phase 2 bei den Hyperoxietieren.

Das Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) ist ein Biomarker, der für die frühe Detektion der Entstehung eines akuten Nierenversagens in Plasma und Urin etabliert werden soll. Als endogene Substanz ist es im Plasma und Urin nachweisbar und zeigt bereits nach einer Stunde einen deutlichen Anstieg an [50]. Wie zuvor beschrieben, korreliert dabei das Maß der Sekretion direkt mit dem Grad der Schädigung im Gewebe [104]. Als Zeichen für eine Schädigung durch das Schockgeschehen, wiesen in diesem Versuch alle Tiere bereits in der Messung nach Ende der Hämorrhagie einen signifikant erhöhten NGAL Wert im Serum auf. Im Einklang mit den Ergebnissen der gebesserten Organfunktion wurden in den Hyperoxietiere in der Interventionsphase signifikant niedrigere Werte gemessen als in den Kontrolltieren.

I/R Schädigung der Nieren bei Nagern führen zu Arealen an Nekrose des proximalen Tubulus. Im Gegensatz hierzu ist eine ausgeprägte tubuläre Nekrose in der menschlichen Niere sehr selten und schwächer ausgeprägt, wenn überhaupt vorhanden [75]. Wie zuvor beschrieben gibt es große Homologien zwischen der menschlichen Niere und der der Schweine. Hierdurch ist erklärbar, warum trotz des nahezu tödlichen Ausmaß des hämorrhagischen Schockes hier bei beiden Gruppen ein so geringes Ausmaß an histopathologisch nachweisbaren Gewebeschäden gesehen wurde. Anhand der immunhistopathologischen Markern konnte jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen gezeigt werden. Das Nierengewebe der Kontrolltiere wies einen signifikant höheren Wert an Caspase-3 auf. Caspase-3 ist ein pro-apoptotisch wirkendes Enzym [60].

4.6 Oxidativer und nitrosativer Stress

Wie zuvor beschrieben spielen oxidativer und nitrosativer Stress eine wichtige Rolle bei der Dekompensation im systemischen Schock. Während der Ischämie-/Reperfusionsequenz entsteht in der mitochondrialen Atmungskette vermehrt Superoxid (O_2^-). Diese Bildung kann zum einen durch die im Schockzustand vermehrt einwandernden Entzündungszellen und zum anderen durch die zelluläre Hypoxie und durch Oxidantien-vermittelte Schäden an Mitochondrien, verstärkt werden [36, 88]. Durch Lipid-Peroxidation entsteht aus Arachidonsäure 8-Isoprostan, als messbarer Marker für den oxidativen Stress im Serum [45]. In dieser Studie kam es durch den hämorrhagischen Schock bei allen Tieren zu vermehrtem oxidativem Stress, was an einer Zunahme der 8-Isoprostan-Werte erkennbar war. Während der Reperusionsphase kam es bei allen Tieren zu einer weiteren Zunahme des oxidativen Stresses. Diese war jedoch deutlich verstärkt bei den Kontrolltieren. Insgesamt zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Stickstoff und Superoxid reagieren miteinander und bilden Peroxynitrit, welches wiederum in Nitrit und Nitrat zerfällt oder über die Übertragung von Nitrit-Gruppen auf Tyrosinreste in Proteinen und Peptiden zur Bildung von 3-Nitrotyrosin führen kann [119]. In der späten Phase wird dieser Prozess vor allem durch proinflammatorische Zytokine unterhalten. Erhöhte Nitrit und Nitratwerte im Serum stellen daher ein Maß für vermehrte NO-Produktion dar [31]. 3-Nitrotyrosin wurde als verlässlicher Marker für Schäden durch Peroxynitrit etabliert [88]. Zu den zytotoxischen Auswirkungen zählen Lipid-Peroxidation, Inaktivierung von Enzymen oder transmembranären Kanälen, Hemmung der Atmungskette, Initiierung von DNA-Schäden und in der Folge Apoptose oder Nekrose [119]. Schäden an den Zellmembranen, vor allem des Endothels, führen zum Verlust der Barrierefunktion und konsekutiv zu Flüssigkeitsverlust in das Interstitium [93]. Immunhistologisch wurde eine signifikant niedrigere 3-Nitrotyrosin Bildung in der Hyperoxiegruppe nachgewiesen, was eine Reduktion des nitrosativen Stresses auch auf zellulärer Ebene beweist. Auch die reduzierte Extravasation von Albumin bei den Hyperoxietieren passt zu dieser Beobachtung.

Für Hyperoxie per se wurde bereits in anderen Studien eine Reduktion des oxidativen Stresses nachgewiesen [33]. In institutseigenen Experimenten führte eine 24-stündige Beatmung mit 100%igem Sauerstoff während einem frühen septischen Schock zu keiner Verstärkung des oxidativen Stresses [8]. In einem I/R-Setting durch eine inspiratorische

Sauerstoffkonzentration von 100%, zeigten Fujita et al sogar eine Reduktion der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies [33]. Über die daraus abzuleitende Organprotektion sind die Daten jedoch widersprüchlich [12]. In unserer Studie ging die Reduktion des oxydativen und nitrosativen Stresses auf systemischer und zellulärer Ebene mit einer verbesserten Funktion der Niere einher.

Die Tiere der Hyperoxiegruppe dieser Studie wiesen den niedrigsten Bedarf an Noradrenalin auf. Noradrenalin begünstigt oxidativen Stress durch die Bildung von Superoxid-Radikalen [81, 102], sowie durch die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette [72]. Der reduzierte Noradrenalinbedarf der hyperoxen Tiere sollte also zum reduzierten Nachweis der Stress-Marker beigetragen haben.

Schließlich wird der Prozess der verstärkten Bildung von NO auch durch proinflammatorische Zytokine aufrechterhalten. So stehen diese Ergebnisse im Einklang mit der verbesserten Nierenfunktion, sowie mit der erhaltenen Barriere-Funktion und Sauerstoffextraktion des Nierengewebes und dem reduzierten pro-apoptotischen Marker. Stickstoffmonoxid (NO) spielt in der Entwicklung des Nierenversagens durch eine Ischämie/Reperfusion-Seqenz eine entscheidende Rolle: es ist bekannt, dass die Bildung von NO über ein physiologisches Maß hinaus für das Nierengewebe schädlich ist. Auf der anderen Seite ist eine gewisse Verfügbarkeit von NO für den zellulären Ablauf wichtig: der Vasodilatator NO arbeitet als Gegenspieler für Vasopressin, Noradrenalin und Angiotensin II und hält so eine gewisse Perfusion im Kapillarbett aufrecht [26]. Inhibition der NO Produktion führte zu einer deutlichen Reduktion der Perfusion in Mark und Rinde der Niere [125]. Wie zuvor besprochen reagieren ROS mit NO und bilden 3-Nitrotyrosine [26]. Die Reduktion des oxidativen Stresses hat also vermutlich auch die Bioverfügbarkeit von NO verbessert und so zu einer besseren Perfusion im Kapillarbett geführt.

4.7 Entzündungsreaktion

Im Schockgeschehen kommt es durch Gewebhypoxie zu einer Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems [106], was sich ungebremst zu einer massiven autodestruktiven Reaktion im Körper steigern und schließlich in Multiorganversagen münden kann [3, 101]. Diese systemischen Entzündungsreaktion sind die Ursache für die

hohe Anzahl „später“ (>48h) Todesfälle durch den hämorrhagischen Schock [3, 42]. Die therapeutische Reperfusion des Gewebes scheint diese Vorgänge weiter zu verstärken [106]. Vor allem in Hinblick auf die Nierenfunktion ist letzteres von großer Bedeutung: die durch Ischämie geschädigten Nierenzellen produzieren chemische Signalstoffe, die eine Einwanderung von Entzündungszellen in das Nierengewebe begünstigen. Diese Zellen wiederum produzieren Zytokine, die die lokale Entzündung potenzieren und so den mikrovaskulären Blutfluss weiter reduzieren [26].

In dieser Studie wurden die proinflammatorischen Zytokine Il-1 β , Il-6 und TNF-a, sowie das anti-inflammatorisch regulierende Il-10 als Marker für die systemische Entzündungsreaktion nach einem hämorrhagischen Trauma mit Reperfusion im Serum gemessen und untersucht, welche Auswirkung eine Beatmung mit 100%igem Sauerstoff auf diese Werte hat.

Il-1 β und TNF α werden vor allem durch Makrophagen als Reaktion auf die frühe Aktivierung des Immunsystems sezerniert. Sie sind nach einem Trauma sehr schnell messbar und die Serum Level korrelieren nachweislich mit der Prognose [3]. Il-1 β ist ein Schlüssel-Mediator in der Kaskade der Immunantwort auf Pathogene und trägt im Wesentlichen dazu bei, die Immunantwort zu verstärken und die Sekretion der Akute-Phase-Proteine anzustoßen [69].

Auch Il-6 ist bereits früh nach einem Trauma nachweisbar erhöht und stellt daher einen guten Marker für die Akutdiagnostik, sowie für die Entstehung eines Multiorganversagens dar [80].

Als Gegenspieler dieser 3 Zytokine wirkt Il-10. Es führt zu einer Hemmung ihrer Sekretion und so zur Eindämmung einer überschießenden Reaktion des Immunsystems [121]. Die experimentelle inhalative Applikation von Il-10 in einem Modell des hämorrhagischen Schockes konnte die lokale Entzündungsreaktion und die Entstehung eines Multiorganversagens eindämmen [59].

Durch den hämorrhagischen Schock kam es in diesem Versuch zu einer Aktivierung des Immunsystemes, sodass in beiden Gruppen ab Beendigung der Hämorrhagie (Il-6), bzw. nach 12 und 22h der Interventionsphase alle 4 Zytokine signifikant zu den Ausgangswerten vor Einleiten der Hämorrhagie erhöht waren.

Es ließ sich insgesamt eine deutliche Reduktion der Entzündungsparameter in der Hyperoxiegruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren nachweisen, deren Werte im Verlauf eher weiter anstiegen. Diese Unterschiede waren signifikant.

Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur sowie in vorangegangenen eigenen Experimenten gezeigte anti-inflammatorische Wirkung einer dosierten Gabe von inhalativem purem Sauerstoff: hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentrationen führten zu einer Reduktion der durch die Hypoxie im Schock angestoßenen proinflammatorischen Kaskade: Es kam zur Reduktion der Level von Il-6, NF-kB und der Durchwanderung von Leukozyten [51, 113]. Zudem konnte der durch Sepsis induzierte Anstieg von TNF-a und die mikrobielle Last in Blutkulturen gemindert werden [41]. Die Tatsache, dass auch die Level des anti-inflammatorischen Il-10 reduziert waren, deutet darauf hin, dass nicht nur die Hypoxie-getriggerten proinflammatorischen Parameter reduziert wurden, sondern auch ein geringerer Bedarf an Regulation der, sich selbst verstärkenden und schließlich potentiell in Multiorganversagen mündenden, überschießenden Immunreaktion bestand.

Konsekutiv zeigten die Tiere der Hyperoxiegruppe eine bessere Organfunktion. Ob sich ein Überlebensvorteil über einen längeren Zeitraum hinaus bestätigt bleibt zu erforschen.

4.8 H₂S-Metabolismus: ein sauerstoffsensitives System

Wie bereits erwähnt scheint die konsekutive Expression des H₂S-produzierenden Enzyms Cystathionin- γ -Lyase (CSE) in engem Zusammenhang mit systemischer Hypoxämie und der Aufrechterhaltung der Nierenfunktion während eines systemischen Schockes zu stehen [77]. In dieser Studie kam es zu einer signifikant höheren CSE Expression im Nierengewebe und einer konsekutiv verbesserten Organfunktion bei den Tieren der Hyperoxiegruppe.

Dies bestätigte Beobachtungen in vorangegangenen Experimenten. Am Beispiel des Thorax-Traumas überprüften wir die Expression von CSE in der Niere bei Nagern [57, 123]. Ein Thorax-Trauma führte durch Hypoxämie und konsekutiver Gewebhypoxie zu starker Apoptose und Nekrose im Nierengewebe der Nager. Die Nachweisbarkeit der CSE-Expression in der Niere wurde hierdurch deutlich reduziert. Eine Beatmung mit 100%igem Sauerstoff konnte die Expression wieder auf den Stand eines gesunden Tieres anheben und die Gewebeschäden deutlich reduzieren, sowie die Nierenfunktion verbessern [56].

Gleichzeitig scheinen H₂S-produzierende Enzyme Teil einer Anpassungsstrategie des Gewebes in Stress-Situationen zu sein [123]. Im Nierengewebe des Schweins wird CSE normalerweise konstitutiv exprimiert. Wir überprüften die Expression von CSE in der

Schweineniere nach Ischämie-/Reperfusionsschaden durch Aorten Ballon Okklusion. Durch die zuvor bereits aufgezeigten anatomischen Unterschiede zwischen Nager und Schwein, zeigten sich hier nur moderate fleckige Nekroseareale. Es kam jedoch es zu einem signifikanten Abfall der Kreatinin-Clearance, Urin-Ausscheidung und zur Reduktion der CSE Expression [76]. Dies deckt sich mit den Berichten über menschliche Nieren: auch hier scheint die CSE Expression mit der GFR zu korrelieren [16, 77].

So trug die Expression von CSE im Nierengewebe ebenfalls zur Verbesserung der Organfunktion bei. Dies ist gleichzeitig ein Hinweis darauf, dass die Beatmung mit 100%igem Sauerstoff seine Wirkung nicht nur systemisch zeigt, sondern auch einen messbaren Effekt im peripheren Gewebe hat.

4.9 Limitationen

Diese Studie wurde konstruiert, um einen schweren hämorrhagischen Schock durch Blutverlust in abgelegenen Gegenden bzw. in Kampfsituationen zu imitieren. Daher wurde eine vergleichsweise lange Hämorrhagiephase gewählt, die im klinischen Alltag selten in dieser Ausprägung vorzufinden ist. Während des gesamten Versuchs waren die Tiere in Narkose, so auch während der Schockphase. Hierdurch wurden sicherlich auch Auswirkungen des Kreislaufschockes auf den Organismus zumindest zum Teil abgefangen. Weiterhin ist bekannt, dass eine Sedierung den Sauerstoffverbrauch eines Körpers insgesamt reduziert [17]. Zudem wurden während der Hämorrhagiephase eine bedarfsgerechte Flüssigkeitssubstitution und die Gabe von Sauerstoff zurückgehalten, um einen vergleichbaren Schock bei allen Tieren zu erreichen.

Die Gabe von 100% Sauerstoff über 22 Stunden war Teil des Versuchsprotokolls. In den Leitlinien wird aktuell empfohlen Sauerstoff nur zuzufügen, wenn die Sättigung unter 94% sinkt bzw. bei Gefahr der CO₂ Retention (z.B. Asthma, COPD) unter 88% [5]. Die Ergebnisse dieser Studie hätten anders ausfallen können, wären wir früher zur Standard FiO₂ gewechselt.

Die chirurgische Präparation der Tiere dauerte 3 bis 4 Stunden und war essenziell für die Erhebung dieser Datenmenge. Hierbei erfolgte die Freilegung der großen Hals- und Leistengefäße, sowie eine Laparotomie und Präparation der Nierenarterie. Man kann sich

vorstellen, dass diese Maßnahmen einen Einfluss auf den Organismus und damit auf die Ergebnisse des gesamten Versuches hatten. Um diesen „first hit“ auszugleichen, bzw. die Auswirkungen auf die Messungen möglichst gering zu halten, folgte für jedes Tier eine vierstündige Ruhezeit; weiterhin wurden vor Einleitung der Hämorrhagie Ausgangswerte erhoben, die als Bezugspunkt für weitere Messungen dienten.

Viele der Werte zeigten zwar einen deutlichen Trend, wurden jedoch nicht signifikant. Bei größeren Versuchsgruppen wäre dieser Trend vielleicht deutlicher geworden. Wie immer bei Tierversuchen muss jedoch die Anzahl der Tiere gründlich abgewogen werden.

Die entscheidendste Frage ist schließlich die Frage nach dem Überleben des Patienten nach einem hämorrhagischen Schock. Tishermann konstatiert, dass die Vielzahl der Todesfälle durch hypovolämen Schock in den ersten 24 Stunden nach dem Trauma eintreten und daher der Fokus auf Strategien für die Akuttherapie gelegt werden sollte [118]. Wie jedoch bereits besprochen ist die Entwicklung eines Multiorganversagens ursächlich für hohe, „späte“ (>48h) Mortalitätsraten [3, 42]. Mit einer Interventions- bzw. Beobachtungsphase von 22 Stunden ist dieser Versuch bereits länger, als viele in der Literatur beschriebene Studien. Die Beobachtung der Tiere über die Narkose hinaus, ist jedoch aktuell weder realisierbar, noch mit dem Tierschutzgesetz vereinbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der traumatisch-hämorrhagische Schock ist die häufigste Todesursache in der Altersgruppe unter 45 Jahren. Die infolge des hohen Blutverlustes entstehende Gewebhypoxie ist Auslöser einer systemischen Entzündungsreaktion, welche zu Multiorganversagen führt und hohe Mortalitätsraten bedingt. Der Ischämie-/ Reperfusionsschaden, durch eine therapeutische Wiederherstellung der Perfusion, führt zu einer Verstärkung der Entzündung durch oxidativen Stress. Das akute Nierenversagen ist eine schwere Komplikation des hämorrhagischen Schockes und mit einer Mortalität von 50-80% und einer Dialysepflicht von etwa 10% unter den Überlebenden assoziiert. Berichte in der Literatur über den Einsatz von hohen Sauerstoffkonzentrationen, mit dem Ziel der Korrektur der Gewebhypoxie, sind widersprüchlich bezüglich potenziell toxischer Auswirkungen auf die Lungenfunktion und der Entstehung von oxidativem Stress. In vergangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnten durch eine lungenprotektive Beatmung mit 100% Sauerstoff, über 12 Stunden in einem Langzeitmodell am Schwein mit fäkaler Peritonitis, anti-apoptotische und anti-inflammatorische Effekte erzielt werden, was zu einer Verbesserung der Organfunktion und des Überlebens führte. Ziel dieser Studie war es daher, die Auswirkungen einer 22-stündigen Beatmung mit 100% Sauerstoff auf Gesamtüberleben, Lungen- und Nierenfunktion, sowie Entzündungsreaktion und Entstehung von oxidativem Stress in der akuten Phase eines hämorrhagischen Schockes am Schwein zu untersuchen. Die Versuche wurden an je 9 Bertoncelles-Meishan-Willebrand-Schweinen in der institutseigenen Großtier-Intensivstation durchgeführt. Durch eine Genmutation wies das Gerinnungssystem dieser Schweinezucht nicht mehr die, für Schweine typische, Hyperkoagulabilität auf. Zur Einleitung der 4-stündigen Hämorrhagiephase wurden allen Tieren, nach entsprechender Präparation, 30% des Blutvolumens entnommen und anschließend durch Titration mit 5ml Boli ein mittlerer arterieller Blutdruck von 35 ± 5 mmHg eingestellt. Die 22-stündige Interventions- und Überwachungsphase wurde durch die Reperfusion mit dem tiereigenen Blut eingeleitet. Gleichzeitig begann die Beatmung mit 100%igem Sauerstoff in der Interventionsgruppe. An vier Messzeitpunkten, vor und nach der Hämorrhagie, sowie nach 12 und 22 Stunden Beobachtungs- und Interventionsphase, wurden Daten der Hämodynamik, Lungen- und Nierenfunktion erhoben, sowie Blutentnahmen zum Nachweis der Entzündungsreaktion und des oxidativen Stresses getätigt. 4 der 9 Tiere der Kontroll- und ein Tier der Hyperoxiegruppe verstarben vorzeitig. Es kam daher zu keiner signifikanten Verlängerung des Überlebens durch eine Beatmung mit 100%igem Sauerstoff während der ersten 22 Stunden der Behandlungsphase eines nahezu tödlichen hämorrhagischen Schockes.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Hyperoxie zu einer tendenziell verbesserten Organfunktion führte, was am ehesten durch die signifikant verminderte Entzündungsreaktion zu erklären ist. Mehrere Mechanismen scheinen hierfür verantwortlich zu sein. Sauerstoff ist ein potenter Vasokonstriktor. In Studien an gesunden Patienten und solchen im septischen Schock führte Hyperoxie zu Vasokonstriktion. In diesem Versuch konnte hierdurch der Bedarf an Noradrenalin, zur Erreichung der hämodynamischen Ziele, gesenkt werden. Hyperoxie führte ebenfalls zu einer Umverteilung des Herzzeitvolumens. Typischerweise führt ein systemischer Schock zur Zentralisierung und damit zu einer Minderung der Perfusion in peripheren Organen. Nierenversagen im Rahmen des Multiorganversagens kann hieraus resultieren. In dieser Studie führte eine Beatmung mit purem Sauerstoff zu einer Wiederherstellung der Nierenperfusion bei einigen Tieren, mit daraus resultierender tendenziell verbesserter Nierenfunktion. Im Einklang mit diesen Beobachtungen wiesen die Hyperoxietiere reduzierte Marker des oxidativen und nitrosativen Stresses auf. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass eine Beatmung mit purem Sauerstoff per se oxidativen Stress vermeiden kann. Es gibt bisher jedoch kaum Daten zur Organprotektion. Noradrenalin kann oxidativen Stress durch die Steigerung der Produktion von Superoxidradikalen oder durch die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette begünstigen. Letzteres hat ebenfalls negative Auswirkungen auf den Metabolismus und den Energiehaushalt. Durch die Reduktion des Noradrenalinbedarfes wiesen die Hyperoxietiere die niedrigste metabolische Azidose und die niedrigsten Laktatwerte im Blut auf. Hypoxie ist direkter Auslöser für lokale und systemische Entzündungsreaktion, was durch die therapeutische Reperfusion potenziert werden kann. Die Tiere der Hyperoxiegruppe wiesen deutlich geringere Zeichen einer systemischen Entzündungsreaktion auf. Die konstitutionelle Expression des Schwefelwasserstoffproduzierenden Enzymes Cystathionin- γ -Lyase scheint essenziell für die Nierenfunktion zu sein. Das Maß der Expression während des Schockes korreliert mit der Reduktion der Nierenfunktion. Passend zu der besseren Nierenfunktion der Hyperoxietiere wies das Nierengewebe eine signifikant höhere Cystathionin- γ -Lyase Expression auf. Im Gegensatz zu den herkömmlichen Medikamenten der Intensivmedizin scheint Sauerstoff eine Balance zwischen Vasokonstriktion und peripherer Durchblutung während des systemischen Schockes zu ermöglichen. Wie bei allen Medikamenten spielt hierbei die Dosierung, in diesem Fall also die Dauer der Anwendung, eine wichtige Rolle. Bezüglich eines Überlebensvorteiles bleiben die Ergebnisse kontrovers und sollten in weiteren Studien überprüft werden, bevor eine Übertragung in den klinischen Alltag möglich ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Acott C: Oxygen Toxicity - A Brief History of Oxygen in Diving. *Spums* 29: 150–155 (1999)
2. Alam H B, Shuja F, Butt M U, Duggan M, Li Y, Zacharias N, Fukudome E Y, Liu B, DeMoya M, Velmahos G C: Surviving blood loss without blood transfusion in a swine poly-trauma model. *Surgery* 146: 325–333 (2009)
3. Angele M K, Schneider C P, Chaudry I H: Bench-to-bedside review: Latest results in hemorrhagic shock. *Crit Care* 12: 1–13 (2008)
4. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMD) Ständige Kommission Leitlinien: S3 – Leitlinie Polytrauma /Schwerverletzten-Behandlung, AWMF Register-Nr. 012/019: 446 (2016)
5. Arntz H R, Bossart L, Fillipatos G: Initiales management von patienten mit akutem koronarsyndrom - Abschnitt 5 der Leitlinien zur reanimation 2005 des European Resuscitation Council. *Notfall und Rettungsmedizin* 9: 81–89 (2006)
6. Asfar P, Singer M, Radermacher P: Understanding the benefits and harms of oxygen therapy. *Intensive Care Med* 41: 1118–1121 (2015)
7. Barbee R W, Reynolds P S, Ward K R: Assessing shock resuscitation strategies by oxygen debt repayment. *Shock* 33: 113–122 (2010)
8. Barth E, Bassi G, Maybauer D M, Simon F, Gröger M, Öter S, Speit G, Nguyen C D, Hasel C, Möller P, Wachter U, Vogt J A, Matejovic M, Radermacher P, Calzia E: Effects of ventilation with 100% oxygen during early hyperdynamic porcine fecal peritonitis. *Crit Care Med* 36: 495–503 (2008)
9. Bellomo R, Ronco C, Kellum J A, Mehta R L, Palevsky P, Acute Dialysis Quality Initiative workgroup: Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* 8: R204-12 (2004)
10. Bitterman H: Bench-to-bedside review: Oxygen as a drug. *Crit Care* 13: 205 (2009)
11. Bitterman H, Brod V, Weisz G, Kushnir D, Bitterman N: Effects of oxygen on regional hemodynamics in hemorrhagic shock. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 271: H203–H211 (1996)
12. Blasiolo B, Bayr H, Vagni V A, Janesko-Feldman K, Cheikhi A, Wisniewski S R, Long J B, Atkins J, Kagan V, Kochanek P M: Effect of hyperoxia on resuscitation

- of experimental combined traumatic brain injury and hemorrhagic shock in mice. *Anesthesiology* 118: 649–663 (2013)
13. Bolignano D, Donato V, Coppolino G, Campo S, Buemi A, Lacquaniti A, Buemi M: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) as a Marker of Kidney Damage. *Am J Kidney Dis* 52: 595–605 (2008)
 14. Bonventre J V., Zuk A: Ischemic acute renal failure: An inflammatory disease?, *Kidney International*, 66: 480–485 (2004)
 15. Bornstein A: Ueber Sauerstoffvergiftung. *Dtsch med Wochenschr* 38(32): 1495–1497 (1912)
 16. Bos E M, Wang R, Snijder P M, Boersema M, Damman J, Fu M, Moser J, Hillebrands J-L, Ploeg R J, Yang G, Leuvenink H G D, van Goor H: Cystathionine γ -Lyase Protects against Renal Ischemia/Reperfusion by Modulating Oxidative Stress. *J Am Soc Nephrol* 24: 759–770 (2013)
 17. Bracht H, Scheuerle A, Gröger M, Hauser B, Matallo J, McCook O, Seifritz A, Wachter U, Vogt J A, Asfar P, Matejovic M, Möller P, Calzia E, Szabó C, Stahl W, Hoppe K, Stahl B, Lampl L, Georgieff M, Wagner F, Radermacher P, Simon F: Effects of intravenous sulfide during resuscitated porcine hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 40: 2157–2167 (2012)
 18. Calzia E, Asfar P, Hauser B, Matejovic M, Ballestra C, Radermacher P, Georgieff M: Hyperoxia may be beneficial. *Crit Care Med* 38: 559–568 (2010)
 19. Carraway M S, Piantadosi C A: Oxygen toxicity. *Respir Care Clin N Am* 5: 265–295 (1999)
 20. Chen C F, Tsai S Y, Ma M C, Wu M S: Hypoxic preconditioning enhances renal superoxide dismutase levels in rats. *J Physiol* 552: 561–569 (2003)
 21. Church L D, Cook G P, McDermott M F: Primer: inflammasomes and interleukin 1beta in inflammatory disorders. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4: 34–42 (2008)
 22. Collin M, Anuar F B M, Murch O, Bhatia M, Moore P K, Thiernemann C: Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol* 146: 498–505 (2005)
 23. Cornet A D, Kooter A J, Peters M J, Smulders Y M: The potential harm of oxygen

- therapy in medical emergencies. *Crit Care* 17: 313 (2013)
24. Drabek T, Kochanek P M, Stezoski J, Wu X, Bayr H, Morhard R C, Stezoski S W, Tisherman S A: Intravenous hydrogen sulfide does not induce hypothermia or improve survival from hemorrhagic shock in pigs. *Shock* 35: 67–73 (2011)
 25. Dyson A, Simon F, Seifritz A, Zimmerling O, Matallo J, Calzia E, Radermacher P, Singer M: Bladder tissue oxygen tension monitoring in pigs subjected to a range of cardiorespiratory and pharmacological challenges. *Intensive Care Med* 38: 1868–1876 (2012)
 26. Efrati S, Berman S, Aharon G Ben, Siman-Tov Y, Averbukh Z, Weissgarten J: Application of normobaric hyperoxia therapy for amelioration of haemorrhagic shock-induced acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 23: 2213–2222 (2008)
 27. Elrod J W, Calvert J W, Morrison J, Doeller J E, Kraus D W, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow C-W, Lefer D J: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci* 104: 15560–15565 (2007)
 28. Eltzschig H K, Carmeliet P: Hypoxia and Inflammation. *N Engl J Med* 364: 656–665 (2011)
 29. Eltzschig H K, Eckle T: Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation. *Nat Med* 17:1391–1401 (2011)
 30. Fairbairn L, Kapetanovic R, Sester D P, Hume D A: The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. *J Leukoc Biol* 89: 855–871 (2011)
 31. Foresti R, Motterlini R: The Heme Oxygenase Pathway and its Interaction with Nitric Oxide in the Control of Cellular Homeostasis. *Free Rad Res* 31: 459–475 (1999)
 32. Fracica P J, Knapp M J, Piantadosi C A, Takeda K, Fulkerson W J, Coleman R E, Wolfe W G, Crapo J D: Responses of baboons to prolonged hyperoxia: physiology and qualitative pathology. *J Appl Physiol* 71: 2352–2362 (1991)
 33. Fujita M, Tsuruta R, Kaneko T, Otsuka Y, Kutsuna S, Izumi T, Aoki T, Shitara M, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T: Hyperoxia suppresses excessive superoxide anion radical generation in blood, oxidative stress, early inflammation,

- and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats: Laboratory study. *Shock* 34: 299–305 (2010)
34. Geerts B F, Aarts L P, Jansen J R: Methods in pharmacology: Measurement of cardiac output. *Br J Clin Pharmacol* 71: 316–330 (2011)
35. Goedje O, Seebauer T, Peyerl M, Pfeiffer U J, Reichart B: Hemodynamic monitoring by double-indicator dilution technique in patients after orthotopic heart transplantation. *Chest* 118: 775–781 (2000)
36. Granger D N, Kvietys P R: Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 6: 524–551 (2015)
37. Groenen M A M: A decade of pig genome sequencing: A window on pig domestication and evolution. *Genet Sel Evol*, 48: 23 (2016)
38. Gröger M: Einfluss einer Beatmung mit 100% Sauerstoff auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen und die Parameter des oxidativen Stress im Langzeitmodell des septischen Schocks beim Schwein. (2007)
39. Gröger M, Scheuerle A, Wagner F, Simon F, Matallo J, McCook O, Seifritz A, Stahl B, Wachter U, Vogt J A, Asfar P, Matejovic M, Möller P, Lampl L, Bracht H, Calzia E, Georgieff M, Radermacher P, Stahl W: Effects of pretreatment hypothermia during resuscitated porcine hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 41: 105–117 (2013)
40. Han X, Fink M P, Delude R L: Proinflammatory cytokines cause NO* -dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* 19: 229–237 (2003)
41. Hauser B, Barth E, Bassi G, Simon F, Gröger M, Öter S, Speit G, Ploner F, Möller P, Wachter U, Vogt J A, Matejovic M, Calzia E, Georgieff M, Radermacher P, Maybauer D M: Hemodynamic, metabolic, and organ function effects of pure oxygen ventilation during established fecal peritonitis-induced septic shock. *Crit Care Med* 37: 2465–2469 (2009)
42. Heckbert S R, Vedder N B, Hoffman W, Winn R K, Hudson L D, Jurkovich G J, Copass M K, Harlan J M, Rice C L, Maier R V.: Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients. *J Trauma - Inj Infect Crit Care* 45: 545–549 (1998)
43. Helmerhorst H J F, Schouten L R A, Wagenaar G T M, Juffermans N P, Roelofs J J

- T H, Schultz M J, de Jonge E, van Westerloo D J: Hyperoxia provokes a time- and dose-dependent inflammatory response in mechanically ventilated mice, irrespective of tidal volumes. *Intensive Care Med Exp* 5: 27 (2017)
44. Herold G: Innere Medizin. Herold, Gerd, Köln, S. 314–319 (2012)
45. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C C, Bhindi R, Figtree G A: Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol* 1: 483–491 (2013)
46. Isaac J, Tögel F E, Westenfelder C: Extent of glomerular tubularization is an indicator of the severity of experimental acute kidney injury in mice. *Nephron - Exp Nephrol* 105: (2006)
47. Jansen T C, Van Bommel J, Schoonderbeek F J, Sleeswijk Visser S J, Van Der Klooster J M, Lima A P, Willemsen S P, Bakker J: Early lactate-guided therapy in intensive care unit patients: A multicenter, open-label, randomized controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 752–761 (2010)
48. Jung F T: Klinische Pathophysiologie. *JAMA- J Am Med Assoc* 212: 1071 (1970)
49. Kallet R H, Matthay M A: Hyperoxic Acute Lung Injury. *Respir Care* 58: 123–141 (2013)
50. Kanchi M, Manjunath R, Massen J, Vincent L B K: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for predicting acute kidney injury during off-pump coronary artery bypass grafting. *Ann Card Anaesth* 20: 297–302 (2017)
51. Karu I, Loit R, Zilmer K, Kairane C, Paapstel A, Zilmer M, Starkopf J: Pre-treatment with hyperoxia before coronary artery bypass grafting - Effects on myocardial injury and inflammatory response. *Acta Anaesthesiol Scand* 51: 1305–1313 (2007)
52. Kauvar D S, Wade C E: The epidemiology and modern management of traumatic hemorrhage: US and international perspectives. *Crit Care* 9: 1–9 (2005)
53. Kemming G I, Meisner F G, Wojtczyk C J, Packert K B, Minor T, Thiel M, Tillmanns J, Meier J, Bottino D, Keipert P E, Faithfull S, Habler O P: Oxygen™ as a top load to colloid and hyperoxia is more effective in resuscitation from hemorrhagic shock than colloid and hyperoxia alone. *Shock* 24: 245–254 (2005)
54. Kilgannon J H, Jones A E, Shapiro N I, Angelos M G, Milcarek B, Hunter K, Parrillo

- J E, Trzeciak S: Association between arterial hyperoxia following resuscitation from cardiac arrest and in-hospital mortality. *JAMA - J Am Med Assoc* 303: 2165–2171 (2010)
55. Kimmoun A, Novy E, Auchet T, Ducrocq N, Levy B: Erratum to: Hemodynamic consequences of severe lactic acidosis in shock states: From bench to bedside. *Crit Care* 19: 175 (2017)
56. Knoeller E, Scheuerle A, Wagner K, Wagner F, Groeger M, Radermacher P, McCook O: Effect of hyperoxia on tissue CBS and CSE expression after blunt chest trauma. (2014)
57. Knöferl M W, Liener U C, Seitz D H, Perl M, Brückner U B, Kinzl L, Gebhard F: Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. *Shock* 19: 519–525 (2003)
58. Knöller E, Stenzel T, Broeskamp F, Hornung R, Scheuerle A, Mccook O, Wachter U, Vogt J A, Matallo J, Wepler M, Gässler H, Gröger M, Matejovic M, Calzia E, Lampl L, Georgieff M, Möller P, Asfar P, Radermacher P, Hafner S: Effects of hyperoxia and mild therapeutic hypothermia during resuscitation from porcine hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 44(5): 264–277 (2016)
59. Kobbe P, Lichte P, Schreiber H, Reiss L K, Uhlig S, Pape H C, Pfeifer R: Inhalative IL-10 attenuates pulmonary inflammation following hemorrhagic shock without major alterations of the systemic inflammatory response. *Mediators Inflamm* 2012: 2011–6 (2012)
60. Kriebel F, Wittemann S, Hsu H Y, Joos T, Weiss M, Schneider E M: Caspase-3 activation, Bcl-2 contents, and soluble FAS-ligand are not related to the inflammatory marker profile in patients with sepsis and septic shock. *Ann N Y Acad Sci* 1090: 168–176 (2006)
61. Kubiak B D, Albert S P, Gatto L A, Snyder K P, Maier K G, Vieau C J, Roy S, Nieman G F: Peritoneal negative pressure therapy prevents multiple organ injury in a chronic porcine sepsis and ischemia/reperfusion model. *Shock* 34: 525–534 (2010)
62. Kumar V, Abbas A K A J C and R S L: Robbins Basic Pathology. 9th Edition, Elsevier, Saunders, Philadelphia, S. 17–18 (2013)
63. Kumar V, Abbas A K A J C and R S L: Robbins Basic Pathology. 8th Edition,

- Elsevier, Saunders, Philadelphia, PA, S. 564–566 (2007)
64. Larsen G Y, Mecham N, Greenberg R: An Emergency Department Septic Shock Protocol and Care Guideline for Children Initiated at Triage. *Pediatrics* 127: e1585–e1592 (2011)
65. Legrand M, Mik E G, Johannes T, Payen D, Ince C: Renal hypoxia and dysoxia after reperfusion of the ischemic kidney. *Mol Med* 14: 502–516 (2008)
66. Levey A S, Becker C, Inker L A, Author C: Glomerular Filtration Rate and Albuminuria for Detection and Staging of Acute and Chronic Kidney Disease in Adults: A Systematic Review HHS Public Access. *JAMA* 24: 837–846 (2015)
67. Lier H, Krep H, Schroeder S, Stuber F: Preconditions of hemostasis in trauma: A review. the influence of acidosis, hypocalcemia, anemia, and hypothermia on functional hemostasis in trauma. *J Trauma - Inj Infect Crit Care* 65: 951–960 (2008)
68. Liu YH, Lu M B J: Hydrogen sulfide and renal ischemia. *Expert Rev Clin Pharmacol Jan* 4(1): 49–61 (2011)
69. Lopez-Castejon G, Brough D: Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev* 22: 189–195 (2011)
70. de los Santos R, Coalson J J, Holcomb J R, Johanson W G: Hyperoxia exposure in mechanically ventilated primates with and without previous lung injury. *Exp Lung Res* 9: 255–275 (1985)
71. Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage., Thieme Verlag, Stuttgart, S. 595–596 (2006)
72. Lunemann J D, Buttgerit F, Tripmacher R, Baerwald C G, Burmester G R, Krause A: Norepinephrine inhibits energy metabolism of human peripheral blood mononuclear cells via adrenergic receptors. *Biosci Rep* 21: 627–635 (2001)
73. Maca J, Jor O, Holub M, Sklienka P, Bur a F, Burda M, Janout V, ev ik P: Past and Present ARDS Mortality Rates: A Systematic Review. *Respir Care* 62: 113–122 (2017)
74. Magder S: Reactive oxygen species: Toxic molecules or spark of life? *Crit Care* 10: 1–8 (2006)

75. Martín-Govantes J: Insuficiencia renal aguda. *An Pediatr Contin* 4: 151–158 (2006)
76. Matějková S: Einsatz von carbamylisiertem Erythropoetin zur Prophylaxe von Ischämie- und Reperfusionsschäden der Niere nach Ballonokklusion der Aorta am Schweinemodell. , Universität Ulm (2013)
77. McCook O, Radermacher P, Volani C, Asfar P, Ignatius A, Kemmler J, Möller P, Szabó C, Whiteman M, Woodg M E, Wang R, Georgieff M, Wachter U: H₂S during circulatory shock: Some unresolved questions. *Nitric Oxide - Biol Chem* 41: 48–61 (2014)
78. McNulty P H, Robertson B J, Tulli M A, Hess J, Harach L A, Scott S, Sinoway L I: Effect of hyperoxia and vitamin C on coronary blood flow in patients with ischemic heart disease. *J Appl Physiol* 102: 2040–2045 (2007)
79. Meier J, Kemming G I, Kisch-Wedel H, Wölkhammer S, Habler O P: Hyperoxic Ventilation Reduces 6-Hour Mortality at the Critical Hemoglobin Concentration. *Anesthesiology* 100: 70–76 (2004)
80. Meylaerts S A, De Haan P, Kalkman C J, Jaspers J, Vanicky I, Jacobs M J H M: Prevention of paraplegia in pigs by selective segmental artery perfusion during aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 32: 160–170 (2000)
81. Neri M, Cerretani D, Fiaschi A I, Laghi P F, Lazzerini P E, Maffione A B, Micheli L, Bruni G, Nencini C, Giorgi O, D’Errico S, Fiore C, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Fineschi V: Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *J Cell Mol Med* 11: 156–170 (2007)
82. Neurath M F, Finotto S: IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 22: 83–89 (2011)
83. Nichols T C, Bellinger D A, Merricks E P, Raymer R A, Kloos M T, DeFriess N, Ragni M V, Griggs T R: Porcine and Canine von Willebrand Factor and von Willebrand Disease: Hemostasis, Thrombosis, and Atherosclerosis Studies. *Thrombosis* 2010: 1–11 (2010)
84. Nirmalan M, Niranjana M, Willard T, Edwards J D, Little R A, Dark P M: Estimation of errors in determining intrathoracic blood volume using thermal dilution in pigs with acute lung injury and haemorrhage. *Br J Anaesth* 93: 546–551 (2004)

85. O'Brien P J: Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 245: 206–218 (2008)
86. Olson K R: Hydrogen sulfide and oxygen sensing: implications in cardiorespiratory control. *J Exp Biol* 211: 2727–2734 (2008)
87. Orbegozo Cortés D, Puflea F, Donadello K, Taccone F S, Gottin L, Creteur J, Vincent J L, De Backer D: Normobaric hyperoxia alters the microcirculation in healthy volunteers. *Microvasc Res* 98: 23–28 (2015)
88. Pacher P, Beckman J, Liaudet L: Nitric Oxide and Peroxynitrite. *Physiol Rev* 87: 315–424 (2007)
89. Palnaes Hansen C, Bie P, Stadil F: Assessment of renal function by ⁵¹Cr-EDTA and endogenous creatinine clearances in the pig. *Acta Physiol Scand* 161: 253–260 (1997)
90. Paul B D, Snyder S H: H₂S signalling through protein sulfhydration and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 499–507 (2012)
91. Peitzman A B, Harbrecht B G, Udekwu A O, Billiar T R, Kelly E, Simmons R L: Hemorrhagic shock. *Curr Probl Surg* 32: (1995)
92. Phipers B, Pierce J M T: Lactate physiology in health and disease. *Contin Educ Anaesthesia, Crit Care Pain* 6: S. 128–132 (2006)
93. Powers K A, Szászi K, Khadaroo R G, Tawadros P S, Marshall J C, Kapus A, Rotstein O D: Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Cell Biol* 174: (2006)
94. Ranieri V M, Rubenfeld G D, Thompson B T, Ferguson N D, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky A S: Acute respiratory distress syndrome: The Berlin definition. *JAMA - J Am Med Assoc* 307: 2526–2533 (2012)
95. Reber A, Engberg G, Wegenius G, Hedenstierna G: Lung aeration. The effect of pre-oxygenation and hyperoxygenation during total intravenous anaesthesia. *Anaesthesia* 51: 733–737 (1996)
96. Revelly J P, Tappy L, Martinez A, Bollmann M, Cayeux M C, Berger M M, Chioléro R L: Lactate and glucose metabolism in severe sepsis and cardiogenic shock. *Crit Care Med* 33: 2235–2240 (2005)

97. Rixen D, Siegel J H: Bench-to-bedside review: Oxygen debt and its metabolic correlates as quantifiers of the severity of hemorrhagic and posttraumatic shock. *Crit Care* 9: 441–453 (2005)
98. Roberts B W, Kilgannon J H, Hunter B R, Puskarich M A, Pierce L, Donnino M, Leary M, Kline J A, Jones A E, Shapiro N I, Abella B S, Trzeciak S: Association Between Early Hyperoxia Exposure After Resuscitation From Cardiac Arrest and Neurological Disability. *Circulation* 137: 2114–2124 (2018)
99. Rollhäuser W., Kriz W. H W: Das Gefäss-System der Rattenniere. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 64: 381–403 (1964)
100. Rossi P, Tauzin L, Weiss M, Rostain J C, Sainty J M, Boussuges A: Could hyperoxic ventilation impair oxygen delivery in septic patients? *Clin Physiol Funct Imaging* 27: 180–184 (2007)
101. Roumen R M, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen G A, Sauerwein R W, van der Meer J W, Goris R J: Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann Surg* 218: 769–76 (1993)
102. Rump A F E, Klaus W: Evidence for norepinephrine cardiotoxicity mediated by superoxide anion radicals in isolated rabbit hearts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349: 295–300 (2004)
103. Santos C, Ferrer M, Roca J, Torres A, Hernández C, Rodriguez-roisin R: Pulmonary Gas Exchange Response to Oxygen Breathing in Acute Lung Injury the dispersion of the blood flow distribution is disturbed, suggesting release of hypoxic pulmonary. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 26–31 (2000)
104. Schmidt-Ott K M, Mori K, Li J Y, Kalandadze A, Cohen D J, Devarajan P, Barasch J: Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 18: 407–413 (2007)
105. Schrier R W, Wang W, Poole B, Mitra A: Acute renal failure: Definitions, diagnosis, pathogenesis, and therapy. *J Clin Invest* 114: 5–14 (2004)
106. Schwartz R S, Eltzschig H K, Carmeliet P: Mechanisms of Disease Hypoxia and Inflammation. *N engl j med* 364(7): 656–665 (2011)

107. Siddall E, Khatri M, Radhakrishnan J: Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management. *Kidney Int* 92: 37–46 (2017)
108. Simmons M N, Schreiber M J, Gill I S: Surgical Renal Ischemia: A Contemporary Overview. *J Urol* 180: 19–30 (2008)
109. Simon F, Giudici R, Duy C N, Schelzig H, Öter S, Gröger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabó C, Radermacher P, Calzia E: Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide during porcine ischemia/reperfusion injury. *Shock* 30: 359–364 (2008)
110. Simon F, Scheuerle A, Gröger M, Vcelar B, McCook O, Möller P, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Schelzig H: Comparison of carbamylated erythropoietin-FC fusion protein and recombinant human erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced spinal cord ischemia/reperfusion injury. *Intensive Care Med* 37: 1525–1533 (2011)
111. Smith R A, Venus B, Masood S, Carter M C: Effects of hyperoxia in the presence of acute lung injury. *Crit Care Med* 18: 198–202 (1990)
112. Steinberg D: Thematic review series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part V: The discovery of the statins and the end of the controversy. *J Lipid Res* 47: 1339–1351 (2006)
113. Sukhotnik I, Krausz M M, Brod V, Balan M, Turkieh A, Siplovich L, Bitterman H: Divergent effects of oxygen therapy in four models of uncontrolled hemorrhagic shock. *Shock* 18: 277–284 (2002)
114. Sukhotnik I, Brod V, Lurie M, Rahat M A, Shnizer S, Lahat N, Mogilner J G, Bitterman H: The effect of 100% oxygen on intestinal preservation and recovery following ischemia-reperfusion injury in rats. *Crit Care Med* 37: 1054–1061 (2009)
115. Swindle M M, Makin A, Herron A J, Clubb F J, Frazier K S: Swine as Models in Biomedical Research and Toxicology Testing. *Vet Pathol* 49: 344–356 (2012)
116. Swindle M, Smith A: Comparative anatomy and physiology of the pig. *Scand J Lab Anim Sci* 40(1):47-50 (1998)
117. Takasu A, Iwamoto S, Ando S, Minagawa Y, Kashiba M, Yamamoto Y, Sakamoto T: Effects of various concentrations of inhaled oxygen on tissue dysoxia, oxidative

- stress, and survival in a rat hemorrhagic shock model. *Resuscitation* 80: 826–831 (2009)
118. Tisherman S A, Schmicker R H, Brasel K J, Bulger E M, Kerby J D, Minei J P, Powell J L, Reiff D A, Rizoli S B, Schreiber M A: Detailed description of all deaths in both the shock and traumatic brain injury hypertonic saline trials of the resuscitation outcomes consortium. *Ann Surg* 261: 586–590 (2015)
119. Tsikas D, Duncan M W: Mass spectrometry and 3-nitrotyrosine: Strategies, controversies, and our current perspective. *Mass Spectrom Rev* 33: 237–276 (2014)
120. Uttenthal: NGAL as a marker of renal injury RENAL DISEASE NGAL : how useful is the new marker of kidney damage ? *Clin Lab Intern* (2007)
121. Verma R, Balakrishnan L, Sharma K, Khan A A, Advani J, Gowda H, Tripathy S P, Suar M, Pandey A, Gandotra S, Prasad T S K, Shankar S: A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *J Cell Commun Signal* 10: 61–67 (2016)
122. Vincent J-L, De Backer D: Circulatory Shock. *N Engl J Med* 369: 1726–1734 (2013)
123. Wagner F, Scheuerle A, Weber S, Stahl B, McCook O, Knöferl M W, Huber-Lang M, Seitz D H, Thomas J, Asfar P, Szabó C, Möller P, Gebhard F, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Wagner K: Cardiopulmonary, histologic, and inflammatory effects of intravenous Na₂S after blunt chest trauma-induced lung contusion in mice. *J Trauma - Inj Infect Crit Care* 71: 1659–1667 (2011)
124. Waldmann K, Bickhardt K: Vergleichende Untersuchung der Inulin- und Creatinin-Clearance beim Schwein. *J Vet Med Ser A* 37: 752–759 (1990)
125. Walker L M, Walker P D, Imam S Z, Ali S F, Mayeux P R: Evidence for Peroxynitrite Formation in Renal Ischemia-Reperfusion Injury: Studies with the Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitor L-N 6-(1-Iminoethyl) lysine. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 417–422 (2000)
126. Wang K, Ahmad S, Cai M, Rennie J, Fujisawa T, Crispi F, Baily J, Miller M R, Cudmore M, Hadoke P W F, Wang R, Gratacós E, Buhimschi I A, Buhimschi C S, Ahmed A: Dysregulation of hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine γ -lyase contributes to maternal hypertension and placental abnormalities in preeclampsia. *Circulation* 129(22): e517-8 (2013)

-
127. Wang L, Song J, Buggs J, Wei J, Wang S, Zhang J, Zhang G, Lu Y, Yip K-P, Liu R: A new mouse model of hemorrhagic shock-induced acute kidney injury. *Am J Physiol - Ren Physiol* 312: F134–F142 (2017)
 128. Wendt M, Waldmann K -H., Bickhardt K: Vergleichende Untersuchung der Inulin- und Creatinin-Clearance beim Schwein. *J Vet Med* 37: 752–759 (1990)
 129. Wheeler D S, Devarajan P, Ma Q, Harmon K, Monaco M, Cvijanovich N, Wong H R: Pediatric Critical Care Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a marker of acute kidney injury in critically ill children with septic shock. *Crit Care Med* 36: 1297–1303 (2008)
 130. Wu A H B: Increased troponin in patients with sepsis and septic shock: Myocardial necrosis or reversible myocardial depression? *Intensive Care Med* 27: 959–961 (2001)
 131. Xu C, Yi C, Wang H, Bruce I C, Xia Q: Mitochondrial nitric oxide synthase participates in septic shock myocardial depression by nitric oxide overproduction and mitochondrial permeability transition pore opening. *Shock* 37: 110–115 (2012)
 132. Yin M, Wheeler M D, Connor H D, Zhong Z H I, Bunzendahl H, Dikalova A, Samulski R J, Schoonhoven R, Mason R P, Swenberg J A, Thurman R G: Cu / Zn-Superoxide Dismutase Gene Attenuates Ischemia- Reperfusion Injury in the Rat Kidney. *J Am Soc Nephrol* 12: 2691–2700 (2001)
 133. Zhang H, Zhi L, Moochhala S M, Moore P K, Bhatia M: Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *J Leukoc Biol* 82: 894–905 (2007)

ANHANG

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 34:	Hämorrhagischer Schock	4
Abb. 35:	Sauerstoffabhängige Bildung von Schwefelwasserstoff	9
Abb. 36:	Versuchsablauf	24
Abb. 37:	Versuchsaufbau	26
Abb. 38:	Berechnung des zu entnehmenden Blutvolumens	28
Abb. 39:	Nierenpräparation postoperativ	30
Abb. 40:	Berechnung des Herzzeitvolumens	32
Abb. 41:	Berechnung des Oxygenierungsindex	34
Abb. 42:	Messprinzips des Sandwich-ELISAs	36
Abb. 43:	Beispielbilder der auszuwertenden Schnitte mit HE-Färbung	42
Abb. 44:	Kaplan-Meier Überlebensanalyse	46
Abb. 45:	Noradrenalin-Bedarf	47
Abb. 46:	Troponin	50
Abb. 47:	pH-Werte im arteriellen Blut	51
Abb. 48:	Laktat im arteriellen Blut	52
Abb. 49:	8-Isoprostan	55
Abb. 50:	IL-1 β	57
Abb. 51:	IL-6	58
Abb. 52:	IL-10	59
Abb. 53:	TNF α	60
Abb. 54:	Blutfluss in der Arteria renalis	62
Abb. 22:	Urinausscheidung	64
Abb. 55:	Kreatinin Clearance	65
Abb. 56:	Kreatinin im Plasma	66
Abb. 57:	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)	67
Abb. 58:	Caspase-3	70
Abb. 59:	Beispielbilder der immunhistochemischen Detektion von Caspase-3	70
Abb. 60:	Albumin im Nierengewebe	71
Abb. 61:	Beispielbilder der immunhistochemischen Detektion von Albumin	71
Abb. 62:	Nitrotyrosin	73
Abb. 63:	Beispielbilder der immunhistochemischen Detektion von Nitrotyrosin	73
Abb. 64:	Cysthationin- γ -Lyase (CSE)	75
Abb. 65:	Beispielbilder der immunhistochemischen Detektion von CSE	75

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 11	Beatmungsparameter Instrumentierungsphase	28
Tabelle 12	Beatmungsparameter postoperativen Ruhephase	29
Tabelle 13	Beatmungsparameter Interventions-/ Beobachtungsphase	29
Tabelle 14	Bewertungssystem der Histopathologie	42
Tabelle 15	Parameter der Hämodynamik	48
Tabelle 16	Beatmungsparameter	53
Tabelle 17	Nitrit/ Nitrat	56
Tabelle 18	renal Metabolismus	63
Tabelle 19	Glomeruläre Tubularisation	68
Tabelle 20	Histopathologie	68

DANKSAGUNG

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Peter Radermacher für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung und für die Überlassung des sehr interessanten Themas danken. Besonders danken möchte ich auch für die Möglichkeit, im Rahmen dieser Zeit als Student auf den Kongressen der Shock Society in Charlotte, NC, USA 2014 und der European Society of Anaesthesiology in Berlin 2015 bereits „Kongress-Luft“ schnuppern zu dürfen. Es waren jeweils tolle Erfahrungen für mich, die mich in meiner wissenschaftlichen und persönlichen Entwicklung enorm gefördert haben. Nicht viele Studenten erhalten diese Möglichkeit und ich weiß es sehr zu schätzen.

Ein besonderer Dank gilt auch Oscar McCook für die immer freundliche und fröhliche, aber stets kompetente Betreuung meiner Laborarbeit, sowie die konstruktive Kritik bei der Vorbereitung auf Präsentationen, Abstracts und diese Arbeit. Ich bin sehr gespannt auf dein literarisches Werk!

PD Dr. med. Sebastian Hafner möchte ich sehr für die Betreuung bei der Durchführung der Studie, die Unterstützung und konstruktiven Kritik beim Schreiben und dafür, dass ich mich mit allen Fragen zu jedem Zeitpunkt an ihn wenden durfte, herzlich danken.

Frau Dr. med. Friederike Elisabeth Bröskamp und Herrn Dr. med. Rouven Hornung danke ich für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung zu jedem Zeitpunkt- auch über die Doktorarbeit hinaus. Ihr habt einen wichtigen Teil meiner Studienzeit ausgemacht und ich bin dankbar, dass ich euch zu meinen Freunden zählen kann!

Dem gesamten Team der APV gilt ein großes Dankeschön für die Durchführung der Studie, Hilfe bei der Auswertung der enormen Datenmengen und für die stets hilfsbereite und freundliche Unterstützung: insbesondere Frau Tanja Schulz, Frau Anja Gröger, Herrn Dr. biol. hum. Michael Gröger, Frau Christa Klein, Frau Andrea Seifritz und Frau Bettina Stahl, sowie José Matallo.

Abschließend möchte ich mich aufrichtig bei meinen Eltern und Brüdern bedanken, die mich- jeder auf seine Weise- über das gesamte Studium hinweg unterstützt, bei jeder Klausur und beim Schreiben dieser Arbeit mitgefiebert haben und ohne die ich viele Schritte nicht gewagt hätte.

Johannes ich danke dir, dass du auf deine verrückte Art die Dinge für mich oft einfacher machst und dafür gesorgt hast, dass ich während des Schreibens nie verhungert bin.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

