

Universitätsklinikum Ulm
Institut für Anästhesiologische Pathophysiologie und
Verfahrensentwicklung
Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Radermacher

Histopathologie von Leber, Lunge und Niere des Schweines im hämorrhagischen Schockmodell unter Gabe von Na₂S (post-treatment)

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Kai Freerik Losch

geboren in Ostfildern

2016

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

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

Berichterstatter 2: PD Dr. med. Volker Bürkle

Tag der Promotion: 27.04.2017

Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:	III
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Traumatisch bedingte Hämorrhagie.....	1
1.2 Klinik und Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks	2
1.3 Der hämorrhagische Schock auf zellulärer Ebene	3
1.4 Das Phänomen des Ischämie-/Reperfusionsschadens	4
1.5 Schwefelwasserstoff	5
1.5.1 Schwefelwasserstoff als toxisches Gas.....	5
1.5.2 Schwefelwasserstoff im menschlichen Organismus	5
1.5.3 Experimentell nachgewiesene Effekte von Schwefelwasserstoff	7
1.5.4 Therapeutisches Potential von Schwefelwasserstoff in der Hämorrhagie	9
1.5.5 Schwefelwasserstoff in geeigneter therapeutischer Form.....	11
1.6. Die Wahl des Versuchstieres.....	12
1.7. Fragestellung	13
2. MATERIAL UND METHODIK	14
2.1 Studiendesign	14
2.2 Das Versuchsmodell	14
2.3 Das Studienmedikament.....	14
2.4 Versuchsaufbau	15
2.4.1 Anästhesiologisches Procedere	15
2.4.2 Chirurgische Präparation.....	17
2.4.3 Versuchsprotokoll.....	18
2.5 Histologische Aufarbeitung und Auswertung	21
2.5.1 Organentnahme und Gewebefixierung	21
2.5.2 Histologische Aufbereitung.....	23
2.5.3 Beurteilung der Gewebeschnitte.....	25
2.5.4 Auswertung Niere.....	25
2.5.5 Auswertung Leber	32
2.5.6 Auswertung Lunge:	35
2.6. Statistische Analyse und Darstellung.....	40

3. ERGEBNISSE	41
3.1 Erhobene Daten.....	41
3.2 Überleben	41
3.3 Systemische Parameter.....	42
3.3.1 <i>Parameter des hämorrhagischen Schocks</i>	42
3.3.2 <i>Verlaufparameter der Körperkerntemperatur</i>	43
3.3.3 <i>Parameter der systemischen Sauerstoffaufnahme (VO₂) und der Kohlenstoffdioxidproduktion (VCO₂)</i>	43
3.4 Histologischer Vergleich der Versuchsgruppen - Niere.....	44
3.5 Histologischer Vergleich der Versuchsgruppen - Leber	47
3.6 Histologischer Vergleich der Versuchsgruppen - Lunge	50
4. DISKUSSION	53
4.1. Das Studienmodell und - protokoll	53
4.2. Einfluss von H ₂ S auf Kreislaufparameter und den Metabolismus	53
4.3. Überleben der Versuchstiere	55
4.4. Die histopathologische Auswertung	55
4.4.1 <i>Auswertung der Nierenpräparate</i>	55
4.4.2 <i>Auswertung der Leberpräparate</i>	56
4.4.3. <i>Auswertung der Lungenpräparate</i>	56
4.5. Limitationen der Studie	57
4.6. Schlussfolgerung	58
5. ZUSAMMENFASSUNG	60
6. LITERATURVERZEICHNIS	62
7. LEBENSLAUF	73
9. DANKSAGUNG	74

Abkürzungsverzeichnis:

3 MST:	3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase
%:	Prozent
°C:	Grad Celsius
μmol:	Mikromol
A.:	Arteria (Arterie)
Aa.:	Arteriae (Arterien)
AP:	Apoptose
APV:	Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
ATP:	Adenosintriphosphat
ARDS:	acute respiratory distress syndrome
BGA:	Blutgasanalyse
bpm:	beats per minute/Herzschläge pro Minute
bzw:	beziehungsweise
Ca ²⁺ :	Calcium
CBS:	Cysthationin- β-Synthase
cm:	Zentimeter
cmH ₂ O:	Zentimeter Wassersäule
CO ₂ :	Kohlenstoffdioxid
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CSE:	Cystathionin- γ-Lyase
dest.	destilliert
DIC:	disseminierte intravasale Gerinnung
DIH:	diffuse intraalveoläre Hämorrhagie

DNA:	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
Dys:	Dysteletase
EF:	Ejektionsfraktion
et al.:	und andere
FiO ₂ :	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
F:	French (medizinische Maßeinheit \cong 1mm Außenumfang)
FiO ₂ :	Fraction of inspired Oxygen (Sauerstoffanteil der Einatemluft)
g:	Gramm
GFR:	glomeruläre Filtrationsrate
GT:	glomeruläre Tubularisation
h:	Stunden
Hä:	Hämorrhagie
HAES:	Hydroxyethylstärke
HF:	Herzfrequenz
HO [•] :	Hydroxylradikal
H ₂ O:	Wasser
H ₂ O ₂ :	Hydrogenperoxid
H ₂ S:	Schwefelwasserstoff
HS ⁻ :	Hydrosulfid Anion
HWZ:	Halbwertszeit
HZN:	Hepato-zelluläre Nekrose
HZV:	Herz-Zeit-Volumen
i.d.R.	in der Regel
I/E-Ratio:	Inspirations-/Expirationsverhältnis
IRS:	Ischämie-/Reperfusionsschaden

i.v.:	intravenös
K _{ATP} :	Adenosintriphosphat sensitiver Kaliumkanal
KKT	Körperkerntemperatur
KG:	Körpergewicht
kgKG:	(pro) Kilogramm Körpergewicht
LI:	Leukozyteninfiltration
μL:	Mikroliter
μm:	Mikrometer
MAD:	mittlerer arterieller Druck
mg:	Milligramm
min:	Minute:
ml:	Milliliter
mmHG:	Millimeter Quecksilbersäule
mmol:	Millimol
MOV:	Multiorganversagen
MZP:	Messzeitpunkt
n:	Anzahl
Na ₂ S:	Dinatriumsulfid
NaCl:	Natriumchlorid
nmol:	Nanomol
NO:	Stickstoffmonoxid
NoA:	Noradrenalin
O ₂ :	Sauerstoff
O ₂ ⁻ :	Hyperoxidanionen
PAS:	periodic acid schiff

PAVD:	pulmonalarterieller Verschlussdruck
pCO ₂ :	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PEEP:	positiv endexpiratorischer Druck
pH:	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pO ₂ :	Sauerstoffpartialdruck
PZ:	Proteinzyylinder
rER:	raues endoplasmatisches Retikulum
RNS:	reaktive Stickstoffstoffspezies
ROS:	reaktive Sauerstoffspezies
ROSC:	return of spontaneous circulation
RR:	Riva-Rocci (systolischer arterieller Blutdruck)
s.c.:	subcutan
sER:	glattes endoplasmatisches Retikulum ("smooth endoplasmatic reticulum")
SIRS:	systemic inflammatory response syndrome
S _p O ₂ :	peripher arterielle Sauerstoffsättigung des Hämoglobins
SV:	Schlagvolumen
TA:	Apoptosen des Tubulusepithels (tubuläre Apoptosen)
THP:	Tamm-Horsefall-Protein
TNF- α :	Tumornekrosefaktor α
TN:	tubuläre Nekrose
T.U.N.E.L.:	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP nick end labeling
u.a.	unter anderem
U:	Unit
V.:	vena

VAM:	verbreiterte Alveolarmembran
VEGF:	vascular endothelial growth factor
Vol:	Volumen
Vv.:	venae
VZD:	Verlust der zellulären Definition
ZLS:	Zentro-lobuläre Stauung
ZVD:	Zentralvenöser Druck
ZVK:	Zentralvenöser Katheter

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Schwefelwasserstoff auf die Organhistopathologie im hämorrhagischen Schock untersucht. Hierbei kam ein Großtiermodell (Landschweine) zum Einsatz, bei dem gewichtsadaptiert Schwefelwasserstoff in einer ionischen Verbindung (Dinatriumsulfid) systemisch verabreicht wurde.

1.1 Traumatisch bedingte Hämorrhagie

Weltweit starben im Jahre 2000 geschätzt 5 Millionen Menschen an Verletzungsfolgen, bei einer Population von 100.000 Menschen liegt die Mortalitätsziffer bei 83. Verletzungen machen 9% der weltweiten Todesfälle aus, wobei Entwicklungs- und Schwellenländer klar führend sind [72].

Führt eine Verletzung oder deren direkte Folge zu einem hämorrhagischen Schock, bedeutet dies seit jeher ein schlechtes Outcome für den Patienten. Frühe Hypotension (systolischer Blutdruck (RR) \leq 90mmHg) schon an der Unfallstelle und/oder bei der initialen klinischen Untersuchung ist mit Komplikationen wie Multiorganversagen und konsekutiven Schäden bis hin zu Infektionen/Sepsis behaftet [31, 39].

Man kann die frühe (präklinische) Mortalität am Unfallort oder während des Transportes in die Klinik von der späten (innerklinischen) Mortalität abgrenzen [44]. Die frühe Mortalität ereignet sich im Rahmen des massiven Blutverlustes mit Erliegen der Blutzirkulation, die späte Mortalität zeigt sich als komplexes Krankheitsgeschehen, bei dem diverse pathologische Prozesse ineinandergreifen.

So wird durch den traumatisch bedingten Weichteilschaden je nach Ausdehnung eine postakute Entzündungsreaktion hervorgerufen, deren Kaskade durch die Gewebhypoxie im Rahmen der Hypovolämie und entstehende generalisierte Kapillarschädigungen zusätzlich verstärkt wird. Im Rahmen der Endothelschädigung kommt es nicht selten zu einer pathologischen Überaktivierung des Gerinnungssystems mit einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC). Hierbei wird die Mikrothrombenbildung auf Arteriolen-/Kapillarebene durch den erhöhten Hämatokrit aufgrund des intravasalen

Flüssigkeitsverlustes zusätzlich unterhalten. Der rasche Verbrauch der Gerinnungsfaktoren bedingt dann wiederum eine hämorrhagische Diathese [25].

In Kombination führen diese Faktoren zu einem sich selbst „anheizenden“ Circulus vitiosus, welcher als Systemisches Inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) zusammengefasst wird und zu konsekutiver Organdysfunktion sowie undurchbrochen zum Multiorganversagen (MOV) führt [18, 39].

Paradoxerweise birgt auch eine erreichte Reperfusion von zuvor ischämischem/hypoxischem Gewebe im Rahmen einer Volumentherapie/Bluttransfusionen und nach erfolgter chirurgischer damage control Gefahren: Freiwerdende reaktive Sauerstoffspezies bedingen nach erfolgter Reperfusion einen sogenannten Ischämie-/Reperfusionsschaden (IRS), hierbei werden unter anderem (u.a.) durch Lipidperoxidation Zellmembranen geschädigt.

Additiv drohen im klinischen Verlauf neben genannten Folgen unabhängig vom Trauma weitere Komplikationen wie Infektionen, postoperative Wundheilungsstörungen, respiratorassoziierte Pneumonien, Sepsis, Darmatonie, Kontrakturen und andere.

1.2 Klinik und Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks

Ein Schock zeigt sich im Rahmen von Minderdurchblutung essentieller Organsysteme. Beim hämorrhagischen Schock kommt es durch den intra- und/oder extrakorporalen Blutverlust zu einem absoluten Volumenmangel, während bei anderen Schockzuständen, wie dem septischen, dem anaphylaktischen oder neurogenen Schock, durch die Flüssigkeitsverschiebung vom Intravasalraum ins Interstitium ein relativer Volumenmangel besteht. Durch das abnehmende Blutvolumen im Rahmen der Hämorrhagie und dem damit reduzierten Herzzeitvolumen (HZV) bei abnehmender kardialer Vorlast, entsteht eine Imbalance zwischen dem im Kreislauf zirkulierenden Sauerstoff und dem Sauerstoffbedarf auf zellulärer Ebene. Die Endstrecke der Hämorrhagie bedeutet somit eine Gewebhypoxie. Diese wird initial durch die vermehrte Katecholaminfreisetzung und die damit verbundene Vasokonstriktion, v.a. im

Arteriolen- und Kapillarbereich, peripher sogar verstärkt, um Volumen im Gefäßsystem zu halten. Die neuroendogen generierte Zentralisation des Blutvolumens gewährleistet somit zunächst eine weitere Durchblutung von Myokard und Gehirn, der Körper führt gewissermaßen eigenständig eine „Triagierung“ der Organsysteme durch. Erst mit zunehmender Gewebehypoxie im Spätstadium des Schocks dilatieren die Arteriolen im Rahmen der Ansammlung saurer Metabolite (vor allem Laktat), es kommt zu interstitiellen Flüssigkeitsverschiebungen, der intravasale Volumenmangel wird verstärkt. Je nach Fulminanz des Verlaufes kommt es abhängig vom Sauerstoffbedarf des Zielgewebes in einem entsprechenden Zeitfenster zu irreversiblen Organschäden und im weiteren Verlauf zu Multiorganversagen.

1.3 Der hämorrhagische Schock auf zellulärer Ebene

Das Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -verbrauch, konkret der Abfall des Sauerstoffpartialdruckes (pO_2), induziert eine Gewebehypoxie. Folge der Hypoxie ist eine vermehrte Energiegewinnung über die anaerobe Glykolyse. Endprodukte dieses Stoffwechselweges sind saure Metabolite, wie Laktat und Sauerstoffradikale, die einen hochtoxischen Effekt auf Zellmembranen ausüben. Durch den Sauerstoffmangel im Gewebe werden verschiedene proinflammatorische Mediatoren und Zytokine freigesetzt, die eine Gefäßwandschädigung induzieren, das sogenannte „kapillare Leck“. Flüssigkeitsverschiebungen aus dem Intra- in den Extravasalraum lassen ein lokales Ödem entstehen, welches eine weitere Verschlechterung der Sauerstoffversorgung des Gewebes bewirkt [3, 2]. Dieser pathophysiologische Gesamtkomplex wird unter dem Begriff SIRS zusammengefasst (Siehe Abbildung 1).

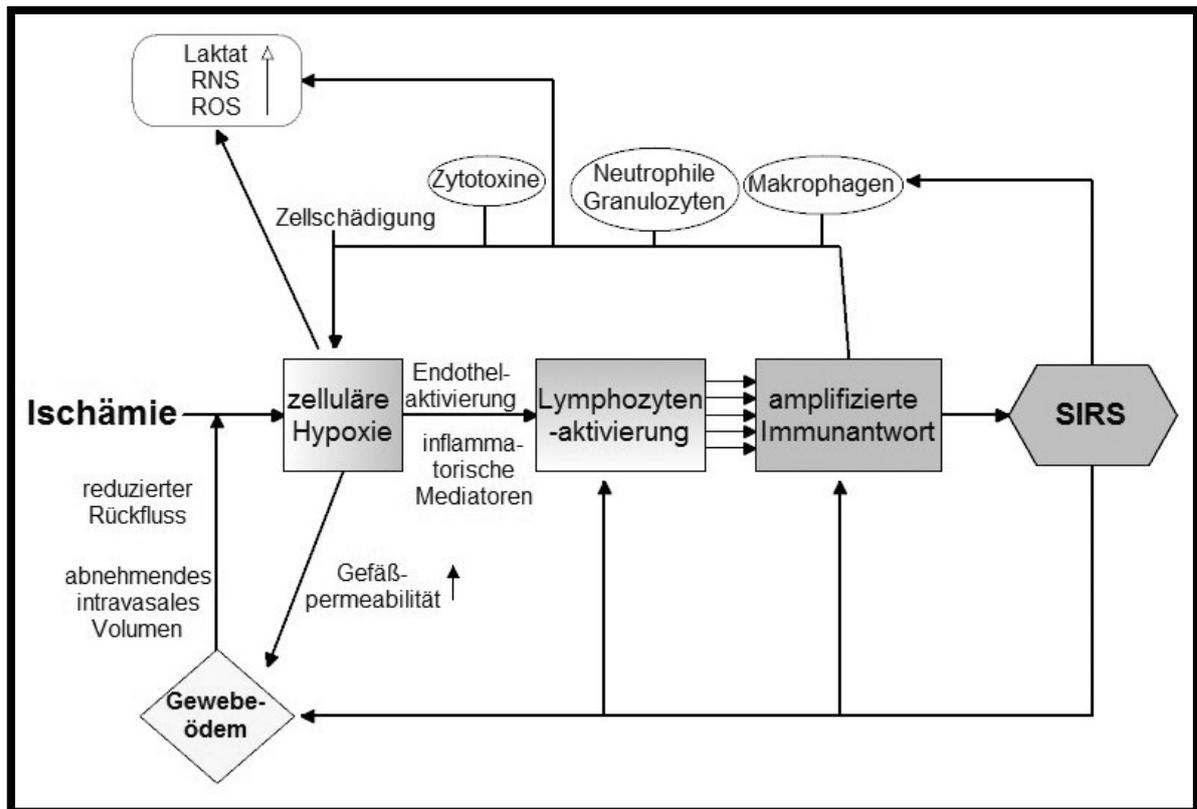


Abbildung 1: Entstehung des SIRS und dessen hierdurch hervorgerufene pathologische Aggravierung.
 SIRS=systemic inflammatory response syndrom,
 ROS=reactive oxygen species, RNS=reactive nitrogen species

1.4 Das Phänomen des Ischämie-/Reperfusionsschadens

Ziel der medizinischen Behandlung eines hämorrhagischen Schockpatienten mit allen anästhesiologischen und chirurgischen Maßnahmen ist letztendlich die Wiederherstellung der Durchblutung und damit der zellulären Oxygenierung, um das Überleben des Gewebes/der Organe zu sichern. Die Reperfusion der ischämischen Gewebeareale bringt jedoch auch weitere Schädigungen mit sich, was mit dem Begriff des „oxygen paradox“ treffend beschrieben ist [16]. Die Sauerstoffminderversorgung auf zellulärer Ebene im Rahmen des Schockgeschehens führt innerhalb weniger Minuten zu einem nahezu vollständigen Abbau von Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Energielieferanten der Zellen. Als Abbauprodukt entsteht Hypoxanthin, das in der Reperusionsphase durch das Enzym Xanthinoxidase zu Xanthin oxidiert wird. Bei

diesem Prozess entstehen freie Sauerstoffradikale (ROS), wie zum Beispiel Superoxid (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxyl-Radikale (HO^\cdot), die die Zellen oxidativ schädigen, aber auch inflammatorische Prozesse aktivieren können [74]. Als Folge kommt es unter anderem zur Lipidmembranschädigung, zu Alterationen im Calciumhaushalt mit Aktivierung von Stoffwechselprozessen, Schädigungen der Desoxynukleinsäure (DNA), Aktivierung von Leukozyten mit Einwanderung in das geschädigte Gewebe, Störungen der Mikrozirkulation und zur Schädigung der Mitochondrien mit Zusammenbruch der Energieproduktion [104, 74].

Besonders bezüglich dieser Pathologiemechanismen könnte der Einsatz von H_2S aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften und Reduktion der zellulären Sauerstoffanforderung vielversprechend sein [54].

1.5 Schwefelwasserstoff

1.5.1 Schwefelwasserstoff als toxisches Gas

Das Vorkommen von H_2S als hoch toxisches Umweltgas sowie sein typischer Geruch nach faulen Eiern sind wohlbekannt. Es entsteht bei organischen Zersetzungsprozessen und kommt in variabler Konzentration in Quellen, Gasen (z.B. Erd- oder Darmgas), Erdöl und beim Abbau von Biomasse im Rahmen von Verwesung und Fäulnis vor [53]. Bei Inhalation hoher Konzentrationen ($> 0,1\%$ der Einatemluft) ist H_2S schon nach kurzer Zeitexposition (Sekunden bis Minuten) potentiell lebensbedrohlich. Der wesentliche Pathomechanismus hierbei besteht in der Inhibition von Enzymen der Atmungskette, entscheidend ist hierbei die Bindung an das 3-wertige Eisen der Cytochrom-c-Oxidase [94].

1.5.2. Schwefelwasserstoff im menschlichen Organismus

Neben dem gasförmigen Vorkommen in der Natur spielt H_2S eine wichtige Rolle im Organismus von Säugetieren, wenn auch dessen vielfältige Wirkmechanismen bis dato nur zum Teil verstanden sind. Hier fungiert es als regulatorisches Molekül und zählt neben Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO) zu den drei

gasförmigen Transmittern, wie erstmals 2002 beschrieben [98]. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu etwa 14% als reines H₂S, zu 86% als Hydrogensulfidation (HS⁻) und in Spuren auch als Sulfidation (S²⁻) in Organen und im Blutplasma vor [26]. Die physiologische Serumkonzentration liegt bei etwa 44 µmol/L [57], intrazelluläre steady-state Konzentrationen werden abhängig vom Gewebe zwischen 15-30nmol (Nanomol) geschätzt [34, 55, 93]. H₂S passiert als kleines, unpolares Molekül Zellmembranen ohne Transportkanäle. Die komplexen physiologischen Wirkungen und Wechselwirkungen von H₂S auf zellulärer Ebene sind bis dato nicht vollständig verstanden und Thema anhaltender Forschung. Bezüglich der Effekte existieren weiterhin kontroverse Aussagen und Forschungsergebnisse. Einigkeit besteht aber in der grundlegenden Funktion von H₂S als regulierendes Signalmolekül auf zellulärer Ebene und dass dessen vielfältige Wirkungsmechanismen stark konzentrationsabhängig sind [97]. Hierbei reicht die Spannweite, je nach Konzentration, von zytoprotektiven bis zu zytotoxischen Effekten [40]. Endogenes H₂S wird vor allem enzymatisch aus den Aminosäuren Cystein und Homocystein synthetisiert. Es wird durch drei bis dato bekannte Enzyme katalysiert, die Cystathionin-β-Synthase (CBS), die Cystathionin-γ-Lyase (CSE) und die 3-Mercaptopyruvat-Sulfurtransferase (3-MST) [99]. Die Enzyme CBS und 3-MST kommen hauptsächlich im zentralen Nervensystem sowie in der Leber vor. Die CSE generiert im Verhältnis die größte Menge an H₂S und tritt vor allem in der Niere, der Leber und im Gefäßsystem auf [8]. Die Halbwertszeit des Moleküls beträgt nur wenige Sekunden [52].

Es gibt Erkenntnisse, dass Calcium eine wesentliche Rolle als Regulator der Enzymaktivität der genannten Enzyme gilt. Untersuchungen zeigen, dass sich die Enzymaktivität reziprok zum intrazellulären Calciumspiegel verhält. Mikami et al. zeigten, dass die endogene H₂S Produktion durch die CSE bei ansteigendem Ca²⁺ abnimmt [64]. Gleiches wurde für die 3-MST beschrieben [63]. Das Sauerstoffangebot im Gewebe scheint ebenso einen großen Einfluss auf die endogene H₂S-Produktion zu haben, hierbei fördert ein geringer pO₂ die H₂S-Synthese [49]. Auch die H₂S-Wirkung scheint in einigen Organen sauerstoffabhängig zu sein [47].

1.5.3 Experimentell nachgewiesene Effekte von Schwefelwasserstoff

In in vivo und in vitro Tiermodellen wurden experimentell unterschiedliche H₂S Wirkungsmechanismen nachgewiesen und beobachtet. Die gezeigten Effekte beziehen sich auf Nachweise am Kleintiermodell (Nager):

Kardiale Effekte:

In Versuchen an Nagetieren konnte unter H₂S ein negativ inotroper Effekt nachgewiesen werden [105], welcher jedoch bei hohen Konzentrationen (>100µM) wieder erlosch [65]. H₂S bewirkte in einem Versuchsmodell an Ratten eine neg. Chronotropie, dies wird am wahrscheinlichsten einer direkten Aktivierung von K_{ATP} (Adenosintriphosphat sensitive Kaliumkanäle) durch H₂S zugeschrieben [1].

Ebenso an Nagetiermodellen zeigten sich sich negative dromotrope Effekte, diese entstehen am ehesten durch die Blockade von myokardialen Calciumkanälen vom L-Typ [85].

Vasodilatation:

Durch Aktivierung von kaliumabhängigen ATP-Kanälen an glatten Muskelzellen bewirkt H₂S eine Gefäßrelaxierung [17, 108]. Dieser Effekt wurde bei hohen Konzentrationen eines H₂S-Donors (NaHS) an Ratten nachgewiesen, hierbei überstieg die Plasmakonzentration von H₂S das mindestens 10-fache des physiologischen Wertes (Plasmakonzentration von 300-600 µmol/L) [108].

Es erfolgt sowohl eine Dilatation der grossen Gefäße (Aorta,..) als auch der Gefäße der Endstrombahn (Arteriolen und Kapillaren) [103].

Inflammation:

Die komplexe Rolle von H₂S im Rahmen von Entzündungsgeschehen ist noch nicht klar. Vieles deutet jedoch darauf hin, dass H₂S im Rahmen einer Entzündungsreaktion eine Schlüsselrolle bei der Interaktion zwischen

Gefäßendothel und Leukozyten spielt. Es konnte gezeigt werden, dass H₂S die Leukozytenadhäsion an das Gefäßendothel reduziert, was letztendlich eine geringere transvaskuläre Migration und geringere Ausbildung eines entzündlichen Extravasates bedeutet [106, 6, 96].

Zytoprotektion:

In einigen Studien konnten zytoprotektive Eigenschaften von H₂S nachgewiesen werden. Diese kommen Untersuchungen zufolge v. a. durch eine H₂S vermittelte Hochregulation von Gluthation, dem wichtigsten intrazellulären Antioxidans, zustande. In geringerem Umfang (so gezeigt in Mitochondrien) werden ROS und reaktive Stickstoffspezies (RNS) sogar in direkter Reaktion mit H₂S neutralisiert [45, 46, 102].

In Kleintiermodellen, bei denen Ratten und Mäuse einer hämorrhagisch bedingten Ischämie unterzogen wurden, konnten unter H₂S-Gabe organprotektive Effekte für Herz und Nieren vor Reperfusionsschäden gefunden werden [29, 91, 109, 15].

In einem Ischämie-/Reperfusionsmodell an Ratten senkte H₂S zudem die durch oxidativen Stress bedingte Apoptose, dies schien mit der Aktivierung mitochondrialer K_{ATP} zusammenzuhängen [82].

Reduktion des Zellmetabolismus:

In den medizinischen Fokus geriet H₂S initial aufgrund seiner Fähigkeit an Nagern reversible winterschlafähnliche Zustände ("suspended animation") erzeugen zu können. In einem bahnbrechenden Versuch zeigten Blackstone et al. 2005 an wachen, spontanatmenden Mäusen, dass eine Inhalation von H₂S bei dieser Spezies zu einer Art winterschlafähnlichem Zustand mit verringertem Energiestoffwechsel und abfallender Körpertemperatur führte [10]. Wenig später wurde gezeigt, dass inhalativ verabreichtes H₂S Mäuse vor sonst tödlicher Hypoxie [11] und Hämorrhagie [66] schützen kann. Der hemmende Einfluss von H₂S auf die mitochondriale Atmungskette durch reversible Bindung an die Cytochrom-c-Oxidase scheint hierbei die entscheidende Rolle zur Induzierung der

sog. "suspended animation" zu spielen. Der zelluläre Sauerstoff (O_2) - Verbrauch wird reduziert und ein winterschlafähnlicher Zustand generiert. Die Versuchstiere wurden so vermutlich vor hypoxischen Einflüssen geschützt und konnten eine sonst tödliche Hämorrhagie/Hypoxie überleben [11, 66].

1.5.4 Therapeutisches Potential von Schwefelwasserstoff in der Hämorrhagie

Die Imbalance zwischen zellulärem Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf stellt eine der wesentlichen Pathomechanismen im Verlauf einer relevanten Hämorrhagie dar. Hier ein Therapeutikum in der Hand zu haben, um regulierend in den Zellstoffwechsel eingreifen zu können, wäre ein deutlicher Schritt nach vorne, um Organe vor ischämischen Schädigungen zu schützen und damit das Outcome des Patienten zu verbessern. Bei einigen Krankheitsbildern ist es mittlerweile medizinisch anerkannt Kühlungsverfahren zur kontrollierten Hypothermie eines Patienten anzuwenden, da hier ein verbessertes neurologisches und kardiales Outcome zu erwarten ist. Dieses Verfahren findet u. a. bei Patienten, die sich herzchirurgischen Eingriffen unterziehen, bei definierten Patientengruppen, welche ein Schädelhirntrauma oder einen Schlaganfall erleiden, und/oder Patienten, die unter Wiederbelebensmaßnahmen einen Return of spontaneous Circulation (ROSC) erfahren, bereits Anwendung [5, 33, 36, 73]. Jedoch haben diese Verfahren auch Nachteile wie eine erhöhte Infektrate und Koagulopathien [32].

So könnte es nützlich sein andere Methoden zu entwickeln, mit denen sich eine rasche Reduktion des Stoffwechsels erreichen lässt, zumal sich Kühlkathetersysteme in der ambulanten Notfallmedizin aufgrund der Invasivität und des technischen/zeitlichen Aufwandes nicht eignen und somit für das Krankheitsbild einer akuten Hämorrhagie keine Therapieoption darstellen.

Die Idee hinter den Bemühungen der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung (APV) der Universität Ulm ist es, den Stoffwechsel eines Patienten unter einer lebensbedrohlichen Hämorrhagie temporär zu reduzieren, dass zum einen die Zeitspanne bis zum drohenden Exitus letalis verlängert werden kann und in dieser die notwendige Blutungskontrolle (chirurgisch oder interventionell) erfolgen kann, und zum anderen auch die zu

erwartenden Folgeschäden (in erster Linie Ischämie-/Reperfusionsschäden) verringert werden können. Schwefelwasserstoff könnte aufgrund seines unter Kapitel 1.5.3. genannten Wirkprofils das Molekül sein, welches genannte Überlegungen zulässt. Die aktuelle Studienlage wirft anhand kontroverser Ergebnisse jedoch noch einige Fragen auf:

So wurden die meisten Daten bis dato an Kleintiermodellen (in erster Linie Nagetiere) unter inhalativer H_2S -Applikation erhoben.

Können diese zum großen Teil vielversprechenden und benefitären Effekte von H_2S im Rahmen einer Ischämie/Hypoxie auf ein Großtiermodell und letztendlich auf den Menschen übertragen werden?

Die bis dato im Großtiermodell gezeigten Effekte unter H_2S bei Hämorrhagie lieferten kontroverse Ergebnisse, hierbei reicht die Bandbreite von protektiven (unter 1.) bis zu keinen (unter 2.) oder gar deletären Effekten (unter 3.):

1.) Unter intravenöser Verabreichung des H_2S -Donors Dinatriumsulfid (Na_2S) konnte bei Schweinen eine Abschwächung des IRS nach myokardialer Ischämie mit geringerer myokardialer Nekrose und geringerer Apoptoserate von Myozyten gezeigt werden [68, 83, 71].

Bei aortalen Clampingversuchen an Schweinen unter Gabe von Na_2S konnte ein reduzierter renaler IRS festgestellt werden. Es zeigten sich während des Versuches signifikant bessere Retentionswerte als in der Kontrollgruppe [81].

2.) Inhalativ zugeführtes H_2S bis zu einer Konzentration von 80 parts per million (ppm) ($\cong 0,008\%$) zeigte bei Versuchsschafen [38] und –schweinen [56] keinerlei Auswirkung auf metabolische Prozesse.

3.) In einem Ischämiemodell an Schweinen, provoziert durch eine 30 minütige Aortenokklusion, zeigte sich in der Verumgruppe ein signifikant niedriger arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO_2) bei sonst vergleichbaren Kreislaufparametern [80].

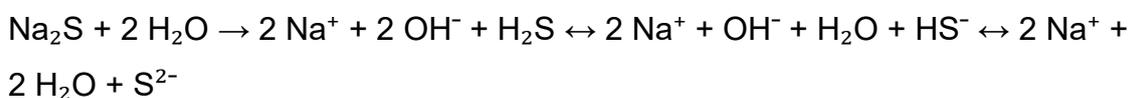
In einem Versuchsmodell, bei dem bei Schweinen ein Herzstillstand induziert und Na₂S während und nach der Reanimation infundiert wurde, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl in der Hoch- als auch in der Niedrigdosisverumgruppe ein deutlich herabgesetztes Herz-Zeitvolumen (HZV). Zudem erreichten 2 Versuchstiere der Hochdosis-Verumgruppe keinen ROSC, während alle anderen Versuchstiere (bis zum Versuchsende) überlebten [24].

Vor der Erwägung eines klinischen Einsatzes von H₂S bedarf es also weiterer Studien zur weiteren Verifizierung der dosisabhängigen H₂S-Effekte am Großtiermodell.

1.5.5 Schwefelwasserstoff in geeigneter therapeutischer Form

Eine inhalative Applikation von H₂S birgt aufgrund der Flüchtigkeit des Stoffes in Gasform das Risiko einer direkten Exposition der Umgebung und damit des durchführenden Personals. Bei Austritt des Gases, z.B. durch ein offenes Ventil oder Diskonnektion/Dislokation des Tubus, besteht neben dem unangenehmen fauligen Geruch und der Reizung von Augen und Luftwegen bei höheren Konzentrationen auch eine reelle Vergiftungsgefahr anwesender Personen [77]. Zum anderen könnte das Gas nach Entweichen mit anderen Agenzien in der Umgebung akkumulieren und unvorhergesehene und unerwünschte Effekte hervorrufen. Übertragen auf eine therapeutische Anwendung in einem Notfallszenario eines hämorrhagischen Patienten wäre eine gasförmige Applikation nur bedingt vertretbar, zumal die hierfür nötige obligate Intubation und Herstellung eines geschlossenen Gaskreislaufes aus zeitlichen und technischen Gründen nicht immer möglich und die Sicherheit des Personals nicht adäquat gewährleistet ist.

In unserer Versuchsreihe wurde daher der H₂S-Donor Dinatriumsulfid zur intravenösen Applikation verwendet. Na₂S dissoziiert spontan in wässriger Lösung wie folgt:



1.6. Die Wahl des Versuchstieres

Aufgrund der engen anatomischen, metabolischen und physiologischen Homologie zum Menschen [37, 23] wurde im folgenden Versuchsmodell die Spezies Deutsches Landschwein gewählt. In den meisten bis dato erfolgten Versuchsmodellen zum Thema H₂S wurden Nagetiere verwendet. Diese besitzen aufgrund ihres im Vergleich zur Oberfläche deutlich geringeren Massenverhältnisses jedoch die Fähigkeit ihre Körperkerntemperatur (KKT) zu senken. Beim Schwein ist dieser Effekt wesentlich geringer ausgeprägt und kommt dem Menschen hierbei deutlich näher. Desweiteren haben Gewebe dieser Spezies ähnliche antioxidative Eigenschaften sowie eine vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber ROS, wie auch die Gewebe des Menschen [4]

1.7. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fragen untersucht:

- 1.) Hat die Gabe des H₂S-Donors Na₂S als „post-treatment“ (im Rahmen der Retransfusion/Reperfusion) im hämorrhagischen Schockmodell des Schweines Einfluss auf die Histomorphologie der Niere, Leber und Lunge?

- 2.) Lassen sich hierdurch mögliche zyto-/organprotektive Effekte ableiten?

2. Material und Methodik

2.1 Studiendesign

Prospektive, randomisierte, kontrollierte Tierstudie.

2.2 Das Versuchsmodell

Für die gesamte Versuchsreihe zur Ermittlung der Effekte von H₂S im hämorrhagischen Schock am Schweinemodell wurden 76 Versuchstiere beantragt. Das Versuchsvorhaben/Versuchsprotokoll wurde sowohl vom Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm als auch vom Regierungspräsidium Tübingen/Baden Württemberg genehmigt, somit war die gesetzliche Grundlage nach § 8 Abs.1 des Tierschutzgesetzes gegeben (Tierversuch-Registrierungsnummer: 886). Die Versuchsreihe wurde nach den gängigen Richtlinien „Umgang mit Labortieren“ des „Bundesinstituts für Gesundheit“ durchgeführt.

Im Versuchsprotokoll waren verschiedene Therapiearme vorgesehen, welche sich in den Applikationszeitpunkten von Na₂S unterschieden. In diesem Teilprojekt der Studie, dem späten Behandlungsarm („Post-Treatment“), wurde Na₂S mit Beginn und über den Zeitraum der Retransfusion/Reperfusion verabreicht (Siehe Abbildung 4, Kapitel 2.4.3). Hierfür wurden 24 Versuchstiere beiderlei Geschlechts verwendet. Bei diesen handelte es sich um eigens für Tierversuche gezüchtete, ca. 16 Wochen alte und zwischen 44 - 63 kg schwere deutsche Landschweine. Die Versuche wurden im Tier-OP der APV durchgeführt. Die 24 Versuchstiere wurden verblindet randomisiert auf eine Kontrollgruppe (n=14 Tiere) und eine Verumgruppe (n=10 Tiere) verteilt. Beide Gruppen wurden der identischen operativen Vorbereitung unterzogen. An allen Tieren wurde eine kontrollierte volumengesteuerte Hämorrhagie mit 40% des berechneten Soll-Blutvolumens angewandt, hierbei wurde ein arterieller Mitteldruck von 30mmHg aufrechterhalten. Während die Verumgruppe Na₂S-Lösung erhielt, wurde bei der Kontrollgruppe volumenäquivalent Kochsalzlösung verwendet.

2.3 Das Studienmedikament

Das in diesen Versuchen verwendete Na₂S wurde von Ikaria (Seattle, WA)

speziell für die parenterale Gabe hergestellt. Hierbei wird H_2S -Gas durch eine wässrige Lösung aus NaOH und NaCl suffliert und dadurch pH-neutral und isoosmolar gemacht [88]. Bei physiologischem pH liegt Sulfid als Gas und als Hydrosulfidanion (HS^-) vor [87]. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden eignet sich Na_2S nicht als reines „Bolusmedikament“, sondern muss kontinuierlich infundiert werden, um eine „stabile“ Konzentration im Blutplasma zu erreichen. Der Hersteller veranschaulichte das in Pilotexperimenten an Hunden, ebenso wurde eine nichttoxische Dosisempfehlung via Pilotstudien und experimentellen Erfahrungen bei Nagetieren und Schweinen von Icaria herausgegeben.

Die Na_2S -Dosierung in dieser Versuchsreihe wurde aus Erfahrungswerten vorheriger Na_2S -Experimente am Hausschwein gewählt, welche im Institut der APV durchgeführt wurden [80, 81].

2.4 Versuchsaufbau

2.4.1 Anästhesiologisches Procedere

Eine Woche vor Versuchsbeginn verbrachte das jeweilige Versuchstier im Tierforschungszentrum Oberer Eselsberg/Universität Ulm. 18 Stunden vor Versuchsstartpunkt begann die Nahrungskarenz, die Tiere bekamen jedoch Trinkwasser zur freien Verfügung. Am Morgen des Versuchstages erhielten sie zur Prämedikation und Sedierung vor dem Transport in den Tier-OP der Sektion APV (Parkstraße/Ulm) eine intramuskuläre Injektion Azaperon von 5mg/kgKG (pro Kilogramm Körpergewicht) (Stresnil®, Janssen, Neuss, Deutschland). Der Transport erfolgte in einer dafür vorgesehenen Transportbox.

Im Tier-OP erfolgte die Anlage eines peripheren Zugangs an einer Ohrvene (Vasofix® Safety Braunülen 18 G, Braun, Melsungen Deutschland) und die Präoxygenierung unter SpO_2 -Monitoring anhand eines Farbsensorclips am Schwanz (Datex Capnomac Ultima® ULT-S-3301, Datex Instrumentarium Corp, Helsinki, Finnland). Zur Narkoseeinleitung wurden i.v. 2mg/kgKG Propofol-Lipuron 2% (Propofol®, Braun, Melsungen, Deutschland) und 1–2mg/kgKG Ketamin

(Ketavet® 100mg/ml Pfizer Pharmacia GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. In Rückenlagerung konnte nun die orotracheale Intubation durchgeführt werden (Lo-Contour Magill® Tubus, Durchmesser 8,5mm, Mallinckrodt Medical, Athlone, Ireland). Das flow- und volumenkontrollierte Beatmungsregime wurde mit folgenden Standard-Respiratoreinstellungen (Servo 900C, Siemens, Erlangen, Deutschland) begonnen: Tidalvolumen 8ml/kgKG, Beatmungsfrequenz 10-12/min, inspiratorische O₂-Konzentration 35% (Fraction of inspired Oxygen (FiO₂) = 0,35), PEEP (positive endexpiratory pressure) 10 cmH₂O (Zentimeter Wassersäule), Inspirations-Expirationsverhältnis (I/E Ratio) 1:1,5. Die FiO₂ wurde je nach Monitoringwert adjustiert, um eine peripher arterielle Sauerstoffsättigung des Hämoglobins (S_pO₂) von > 90% zu erreichen. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden kontinuierlich 8-12mg/kgKG/h Natrium-Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland) und zur Analgesie intermittierend 30µg/kgKG Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) als Bolus verabreicht. Die perioperative Muskelrelaxierung erfolgte mit Alcuronium via Perfusor mit 0,28mg/kgKG/h (Alloferin®-Injektionslösung, Valeant Pharmaceuticals, Switzerland). Während des Narkoseverlaufs wurde darauf geachtet den arteriellen pCO₂ (Kohlenstoffdioxidpartialdruck) im Zielbereich von 35-40 mmHg zu halten. Um beatmungsinduzierte Lungenschäden zu vermeiden, wurden Beatmungsspitzendrücke von 40cmH₂O nicht überschritten. Zur Entlastung des Magens erhielten die Tiere eine Magensonde (Braun CH16/125cm, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit Sekretablaufbeutel (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde rektal über eine Temperaturmesssonde überwacht und exogen nicht beeinflusst (Temperatursonde, YSI Incorporated, Yellow Springs Instruments Co. Inc., YS,Ohio). Die Raumtemperatur im Tier-OP wurde zwischen 24-26°C gehalten. Die intravenöse Flüssigkeitssubstitution erfolgte durch Ringerlösung (Ringerlösung Fresenius®, Fresenius) mit 10ml/kgKG/h. Während der chirurgischen Instrumentierung wurde je nach RR eine Hydroxyethylstärkelösung (HES-steril® 6% 200/0.5, Fresenius Kabi, Bad Homburg) verabreicht, um adäquate kardiale Füllungsdrücke aufrechtzuerhalten.

2.4.2 Chirurgische Präparation

Es wurde die Desinfektion und Rasur der Unterbauchpartie vorgenommen, im Anschluss das sterile Abwaschen und Abdecken des Versuchstieres.

Es erfolgte das bilaterale Aufsuchen, Darstellen und Anzügeln der Vv. (Venae) jugulares. Mittels Seldingertechnik wurden beidseits Katheterschleusen (9F SI-11142 Arrow International, Reading, PA, USA) eingebracht. Über die linke jugulare Schleuse wurde ein 7F-Pulmonalkatheter (7F/110cm Edwards Lifescience Germany GmbH, Unterschleissheim, Deutschland) zur Messung des zentralvenösen Drucks (ZVD), des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (MPAP) und des pulmonalarteriellen Verschlussdruckes (PAVD) eingeschwenkt. Über die rechte Schleuse der Vena jugularis wurde ein ZVK (zentraler Venenkatheter) zur i.v. Medikamenten-/Volumengabe in die obere Hohlvene (V. cava superior) vorgeschoben. Die A. carotis communis sinistra wurde im Anschluss mittels einer 5F-Schleuse (5F/10cm CP-07511 Arrow International, Reading, PA, USA) kanüliert, worüber ein 5F-PICCO®-Katheter (PulsioCath, 5F, ThermoDilutionskatheter, Pulsions Medical Systems, München) zur kontinuierlichen Messung des Herzzeitvolumens (HZV), des intrathorakalen Blutvolumens und des extravaskulären Lungenwassers eingebracht wurde. Im Folgenden wurden beidseitig inguinal die Aa. (Arteriae) femorales palpatorisch aufgesucht und kanüliert (10F/11cm CI-07011 Arrow International, Reading, PA, USA). In eine der beiden Aa. femorales wurde eine 4F-oxymetrische Thermo-Farb-Dilutionssonde (PulsioCath 4F oxymetrische Thermo-Farb-Dilutionssonde, Pulsion Medical Systems, München) eingebracht. Über die andere Femoralarterie erfolgte die Anlage eines großlumigen arteriellen Katheters (10F CP-07511 Arrow International, Reading, PA, USA) für die hochvolumige Blutentnahme zur Induzierung des hämorrhagischen Schocks. Rechtsseitig erfolgte zudem die Kanülierung der V. femoralis (7F/10cm SI-09700 Arrow International, Reading, PA, USA) und Vorschieben eines Katheters (7F/100cm, High flow Angiographic Catheter, Cordis Corporation, Miami, USA) zur Entnahme renalen Blutes bis in die V. renalis, dessen Lage nach Eröffnung der Bauchhöhle (siehe unten) im Situs palpatorisch kontrolliert und nachjustiert wurde. Zur weiteren diagnostischen Instrumentierung von visceralen Gefäßen erfolgte im Anschluss eine mediane

Laparotomie. Im Situs wurde die A. hepatica, sowie die V. porta mit einem dopplersonographischen Messkopf ("Transonic-Flowprobe", Transonic System Inc. Ithaca, NY) zur Flussbestimmung versehen. Zudem wurde die V. portae punktiert und kanüliert (4F/30cm CS-16402 Arrow International, Reading, PA, USA). Über den nach sonographischer Lagekontrolle in die V. hepatica angelegten 7F-Katheter (Angiographic Catheter 7F, Cordis Cooperation, Miami, USA) waren hepatovenöse Blutentnahmen möglich. Eine Erweiterung der Laparotomie nach transversal rechts ermöglichte die Darstellung der kompletten rechten Niere, sowie deren versorgender Gefäße. Zur renal-arteriellen Flussbestimmung und somit Messung der Nierenperfusion wurde ebenfalls an die A. renalis eine Ultraschall-Durchfluss-Sonde angelegt. Abschließend erfolgte die transkutane Anlage eines suprapubischen Blasenkatheters (Freka®Zyst Standard CH10/8cm, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) zur Urinableitung und Bestimmung des Urinvolumens. Der Verschluss der Bauchdecke erfolgte mittels dreischichtiger Naht.

Der zeitliche Aufwand für Narkoseeinleitung und chirurgische Präparation betraß sich auf etwa 4 Stunden. Zur Erholung des Versuchstieres wurde im Anschluss eine ca. vierstündige Ruhephase veranschlagt.

2.4.3 Versuchsprotokoll

1.) Rekonvaleszenzphase (ca. 4h)

Nach der Operation wurden die Tiere in die Versuchsgruppen randomisiert. Die Kontrollgruppe bestand aus 14 (n=14, Gewicht 43-63 kg, männlich/weiblich 11/3), die Therapiegruppe aus 10 Tieren (n=10, Gewicht 44-56kg, männlich/weiblich 7/3).

Am Ende der Ruhephase war um 16.00 Uhr der 1. Messzeitpunkt (MZP 1) zur Erhebung der Ausgangsdaten datiert. Hierbei wurden wie an den folgenden weiteren 3 Messzeitpunkten Parameter zur Hämodynamik, zum Gasaustausch, Säure-Basen-Status, Glukosemetabolismus, organspezifische Laborparameter der Herz-, Leber- und Nierenfunktion, sowie Laborparameter zur Inflammation und zum oxidativen Stress bestimmt. Die FiO₂ wurde auf 21% (Raumluftniveau), die

I/E-Ratio auf 1:2 modifiziert. Als Vorbereitung auf die Hämorrhagie wurde der PEEP auf 0cmH₂O reduziert, um die Vorlast/das Herzzeitvolumen (HZV) zu erhöhen und damit das „Ausbluten“ des Versuchstieres zu erleichtern.

2.) Phase der Hämorrhagie (4h)

Im Anschluss begann die Phase des induzierten hämorrhagischen Schocks durch die Entnahme von 40% des errechneten Sollblutvolumens des jeweiligen Versuchstieres über den Zeitraum von 60min („volume controlled hemorrhage“). Das zu entnehmende Blutvolumen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{kg} \times 0,08 \times 0,4 \times 1,1$$

kg = Körpergewicht des Versuchstieres in Kilogramm

0,08 = geschätzter Anteil des Blutes am Körpergewicht

0,4 = Anteil des zu entnehmenden Blutes des Gesamtblutvolumens
(im Versuch mit 40% veranschlagt)

1,1 = Dichteausgleichsfaktor Blut gegenüber Wasser

Die Abnahme des Blutes über den in der A. femoralis liegenden 10F-Katheter erfolgte in Standard-Transfusionsbeutel (ACD-Beutel), diese wurden bei 8-10°C gelagert. Während der Hämorrhagiephase wurde versucht den arteriellen Mitteldruck (MAD) auf 30 ± 5 mmHg zu justieren. Dies geschah entweder durch eine zusätzliche portionsweise Entnahme von Blutboli bzw. einer Retransfusion von jeweils 50ml Blut im Abstand von 15 Minuten. Ziel war, den MAD während der gesamten Schockphase auf 30 ± 5 mmH zu halten.

3.) Phase der Retransfusion/Reperfusion (12h)

Nach der vierstündigen Schockphase war der 2. MZP um 20.00 Uhr datiert, es erfolgte die Erhebung der gleichen Parameter wie bei MZP 1. Im direkten Anschluss ging der Versuch in die Retransfusions-/Reperfusionsphase über, das entnommene Blut wurde über eine Zeitspanne von 60 Minuten retransfundiert. Die Tiere der Therapiegruppe erhielten zum Startpunkt der Retransfusion einen

initialen Bolus des Versuchsmedikamentes Na₂S (Ikaria, Seattle/ WA) von 0,2 mg/kgKG, gefolgt von einer zwölfstündigen Dauerinfusion Na₂S von 1 mg/kgKG/h. Die Tiere der Placebogruppe erhielten statt Na₂S die äquivalente Volumenmenge an physiologischer Kochsalzlösung (Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% NaCl, Braun, Melsungen). Zu Beginn der Retransfusion wurde der FiO₂ auf 100% eingestellt, um die Hämoglobinaussättigung (SpO₂) über 90% zu halten, dieser wurde dann je nach SpO₂ reduziert. Bei einem Horowitz-Index (PaO₂/FiO₂) < 200 wurde die I/E-Ratio auf 1:1 angehoben und der PEEP auf bis zu 12cmH₂O gesteigert.

Neben der Retransfusion des Eigenblutes wurden über den ZVK Ringerlösung (Ringerlösung Fresenius®, Fresenius) und HydroxyethylstärkeLösung (HAES-steril® 6% 200/0.5, Fresenius Kabi, Bad Homburg) mit einer jeweiligen Flussrate von 10ml/kgKG/h infundiert. Bei Nichterreichen der MAD-Ausgangswerte -allein durch das retransfundierte Blut und die Volumengabe- wurde als Vasopressor bedarfsadaptiert Noradrenalin (Arterenol® 25ml, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt) eingesetzt. Dieses wurde jedoch bei einer Herzfrequenz von ≥ 160/min nicht weiter gesteigert, um eine tachykardieinduzierte Myokardischämie zu vermeiden. Um 08.00 Uhr des Folgetages wurde Na₂S nach 12 stündiger Dauerinfusion zum MZP 3 (Datenerhebung wie bei MZP 1 und MZP 2) abgesetzt.

4.) Post – Reperfusionphase/Erholungsphase (10h)

Um die Organfunktionen nach der Reperfusion weiter beurteilen zu können, wurde vor dem letzten MZP eine 10 stündige Beobachtungsphase angeschlossen.

Für die weiteren 10h (08.00 Uhr – 18.00 Uhr) wurden die Infusionsraten sowohl der Ringerlösung als auch der HydroxyethylstärkeLösung mit 10 ml/kgKG/h beibehalten. Bei pulmonalarteriellen Verschlussdrücken bei > 18 mmHg wurden diese jedoch auf jeweils 5ml/kgKG/h reduziert.

Um 18.00 Uhr erfolgte die letzte Parametererhebung zum MZP 4.

Im Anschluss (nach insgesamt 34h Versuchszeitfenster) wurden die Tiere in tiefer Narkose durch eine i.v. Bolusinjektion von 20 mval Kaliumchlorid (KCL-Lösung Fresenius®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) getötet.

Abbildung 4 verdeutlicht das Versuchsprotokoll schematisch.

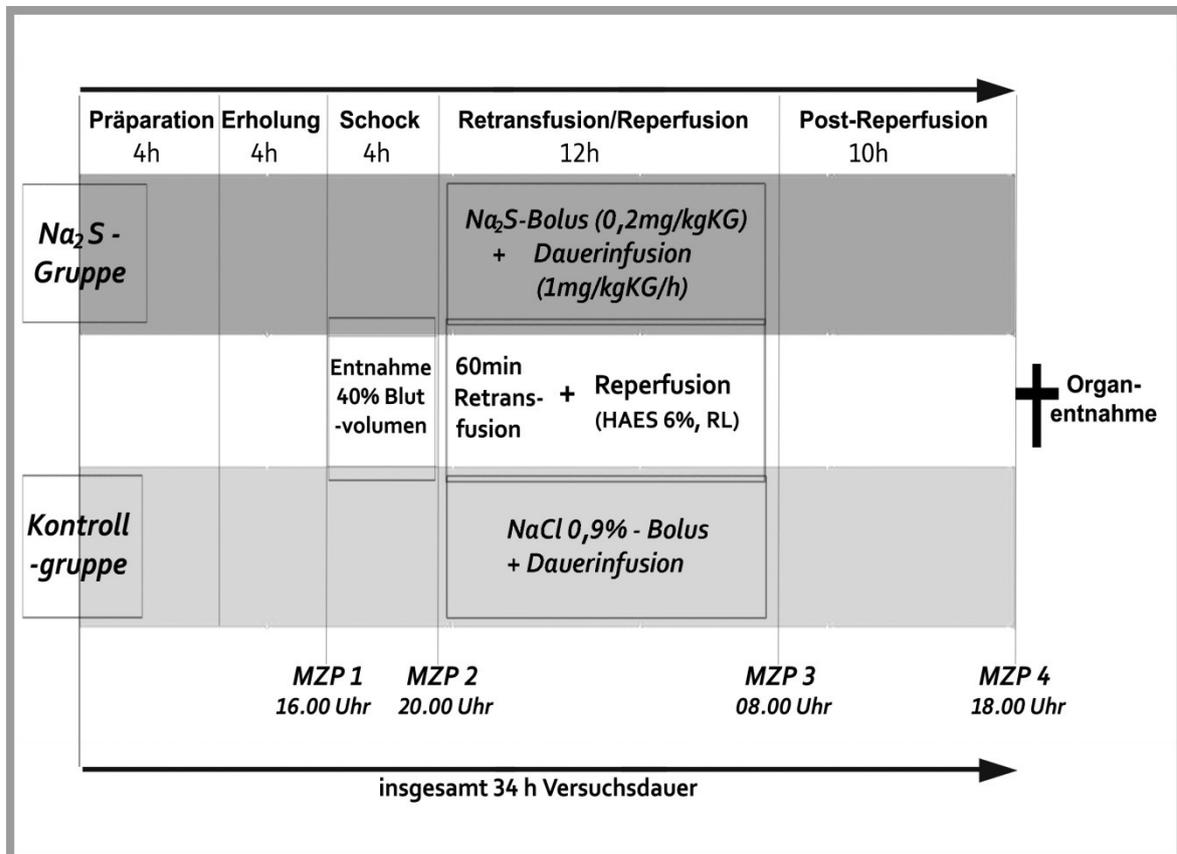


Abbildung 4: Schematischer Versuchsaufbau, Gesamtdauer 34h:
h = Stunden, MZP = Messzeitpunkt, NoA = Noradrenalin,
HAES = HydroxyethylstärkeLösung, RL = Ringerlösung

2.5 Histologische Aufarbeitung und Auswertung

2.5.1 Organentnahme und Gewebefixierung

Unmittelbar nach dem kontrollierten exitus letalis des Versuchstieres wurden dessen Organe (Leber, Lunge, Niere) entnommen. Hierfür wurde der initiale Laparotomiezugang zur Instrumentierung wiedereröffnet, um Zugang zur Bauchhöhle zu erhalten. Die rechte Niere wurde en bloc reseziert und umgehend auf einem Schneidetablett mit einem Einwegskalpell vorbereitet. Die Gerota-

Faszie wurde entfernt, der obere Nierenpol unter Mitnahme des Nierenbeckens vom restlichen Organ unter Vermeidung von Gewebekompression scharf abgelöst. Unter Einbeziehung von Cortex, Medulla und Nierenkelchsystem wurde das Organsegment im Volumenverhältnis von 1:10 in einem luftdicht verschlossenem Konservierbecher mit 4 prozentiger Formaldehydlösung (Formalin) (Otto Fischar GmbH + Co., Saarbrücken, Deutschland) eingelegt.

Danach erfolgte die Entnahme der Leber. Von dieser wurde der rechte Leberlappen kaudal bearbeitet und verwendet, hierbei wurden Randgebiete ausgespart und ein Gewebequader herausgelöst, welcher in gleicher Weise konserviert wurde wie das renale Gewebe.

Der rechte Lungenflügel wurde im Anschluss vom Hauptbronchus abgesetzt und aus dem Situs herausgelöst. Der basale Lungenlappen wurde separiert und vor dem Zurechtschneiden des finalen Gewebeblockes über freiliegende/eröffnete Bronchien mit der Formaldehydlösung (via Spritzenapplikation) perfundiert, um eine bessere Durchtränkung und Entlüftung der luftgefüllten Räume zu erreichen. Danach erfolgte die Herauslösung eines Gewebequaders unter Aussparung der pulmonalen Randbezirke und schließlich die Einbettung in die Formaldehydlösung analog zu Niere und Leber.

Von den 3 angefertigten Organproben wurde zur histologischen Aufbereitung je Organ ein etwa 1,5 x 1,5 x 0,5cm (Breite x Höhe x Dicke) bemessender Gewebequader abgesetzt und in einer Histosette (Simport, Beloeil, Canada) plaziert, welche wieder im Volumenverhältnis 1:10 (Gewebe : Formaldehyd) luftdicht abgeschlossen konserviert wurde. Die Präparate wurden chronologisch archiviert und bei Raumtemperatur 7 Tage gelagert.

Formaldehyd (in Lösung \triangleq Formalin) verhindert durch eine Reihe von chemischen Reaktionen mit Proteinstrukturen, welche zu Quervernetzungen („cross-linking“) von Makromolekülen führen das Fortschreiten der Autolyse und verhindert Fäulnis [69]. Hierbei kommt es nur zu einer geringfügigen Denaturierung und damit Veränderung der Proteinkonformation [22], so dass die Sekundärstruktur weitgehend erhalten bleibt. Gewebe können so dauerhaft konserviert werden. Die Eindringgeschwindigkeit von Formalin beträgt - abhängig von der Dichte des

Gewebes - ca. 0,5-1mm/h [84]. Somit war nach einwöchiger Liegezeit vor der weiteren histologischen Weiterverarbeitung eine vollständige Durchkonservierung der Gewebepreparate gesichert.

2.5.2 Histologische Aufbereitung

Nachfolgend an das einwöchige Fixierungsintervall wurden die Gewebepreparate in der Histosette mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom (Leica Mikrotom 2030 Mot) 3µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf ein warmes Wasserbad übertragen. Aus diesem wurden die Schnitte dann mit einem Objektträger (Menzel Gläser Superfrost® Plus, Menzel GmbH&Co KG, Braunschweig) von der Wasseroberfläche geborgen. Dieser atraumatische Vorgang schützt die hauchdünnen Schnittpräparate vor dem Zerfallen. Eine Trocknungsphase von mindestens 24 Stunden bei 40-50°C im Wärmeschrank schloss sich an. Von allen Organpräparaten wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) angefertigt, von den Nierenschnittpräparaten wurde zusätzlich eine PAS (periodic acid schiff)-Färbung ausgeführt.

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die H.E.-Färbung hat sich schon seit langer Zeit als eine der am weitest verbreiteten histologischen Färbung zur morphologischen Beurteilung von Geweben etabliert [35]. Die H.E.-Färbung setzt sich aus 2 Einzelfärbungen zusammen und basiert auf Wechselwirkungen der Agenzien mit den Zellbestandteilen aufgrund ihres unterschiedlichen pH-Wertes:

Das basische Alaunhämatoxylin, bekannt als „Hämalaun“, färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau ein, insbesondere sind dies die Nuclei (Zellkerne) mit der darin enthaltenen DNA und das mit Ribosomen angereicherte raue endoplasmatische Retikulum (rER) [76]. Das saure Eosin färbt alle azidophilen/basischen (eosinophilen) Strukturen rot ein, dies sind vor allem Zellplasmaproteine, Mitochondrien, das glatte endoplasmatische Retikulum (sER), Kollagen und Keratin [76].

Die Anfertigung der H.E.-Gewebefärbungen erfolgte in der Sektion Pathologie der

Universitätsklinik Ulm. Dieser ging primär eine 20 minütige Entparaffinierung im Heizofen (80°C) voraus. Danach wurden die Gewebeschnitte maschinell im HE-Automat (Färbeautomat Tissue Tek II, Histo Tek) angefärbt.

Die PAS (periodic acid schiff) - Färbung

Zur genaueren Beurteilung der Nierenschnitte wurde zusätzlich eine PAS-Färbung, oder eigentlich korrekt PAS-Reaktion, durchgeführt. Hierdurch lassen sich pathologische Veränderungen wie bspw. die glomeruläre Tubularisation durch die Anfärbung hyaliner Membranen besser darstellen, als mit der herkömmlichen H.E.-Färbung. Die PAS-Reaktion dient zum Nachweis von Kohlenhydraten wie Glykogen, Cellulose, Mukopolysacchariden, Muko- und Glykoproteinen sowie Glykolipiden. Diese kommen in Basalmembranen, Zellwänden (Glykokalix), Bindegewebsfasern (Kollagen) und im Schleim exogener Drüsen vor [9].

Das PAS-Reagenz besteht aus einer farblosen fuchsinschwefeligen Säure, dem Schiff'schen Reagenz, sowie aus Perjodsäure (HIO_4). Durch die Periodsäure, ein starkes Oxidationsmittel, werden Glycolgruppen zu Aldehydgruppen oxidiert, wodurch das sich hier anbindende Schiff'sche Reagenz in seiner molekularen Struktur verändert und chromogene Eigenschaften entwickelt - es färbt sich typisch magenta-rot [7]. Im Färbeergebnis zeigen sich neutrale Mucopolysaccharide magenta-rot bis pink, Zellkerne blauviolett bzw. bei höheren RNA-Konzentrationen bläulich gefärbte Zytoplasmata [92].

Die angefertigten renalen Gewebeschnitte wurden in vier verschiedenen Xylobädern (Merck, Darmstadt) entparaffiniert, dann mithilfe einer absteigenden Ethanolreihe (100%→90%→70%→40%) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) rehydriert und 5min in Aqua destillata (Delta Pharma, Boehringer Ingelheim) gewaschen. Danach konnten die Gewebeschnitte auf den Objektträgern in einprozentiger Perjodsäure (Periodic acid solution, Sigma Aldrich, Steinheim) oxidiert und nach mehrmaligem Spülen in Aqua destillata für 15 min in dem Schiff'schen Reagenz (Schiff's reagent, Sigma Aldrich, Steinheim) behandelt werden. Nun erfolgte nach erneutem Spülen die Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun (Merck, Darmstadt), dann konnten die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%→90%→100%) dehydriert und abschließend eingedeckelt

(Neo-Mount®, Merck, Darmstadt) werden.

2.5.3 Beurteilung der Gewebeschnitte

Die histologische Auswertung erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Angelika Scheuerle (Sektion Neuropathologie des Instituts für Pathologie der Universität Ulm; Leiter Prof. Dr. med. P. Möller). Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte verblindet (Zeiss, Axioplan 2, Objektiv 5-40x und Okular 10x). Zur Dokumentation der unterschiedlichen Schädigungsstadien wurden Bilder mittels Photomikroskop (Axiophot Nr.: 451887, Carl Zeiss) erstellt. Die Auswertung der Organpräparate folgte orientierend der Arbeit von Kubiak und Kollegen [50].

2.5.4 Auswertung Niere

Die Nieren machen nur etwa 2% des menschlichen Körpergewichtes aus, benötigen aber rund 25% des kardialen Herz-Zeit-Volumens um ihre Funktionen aufrechtzuerhalten. Dieses Verhältnis verdeutlicht, wie anfällig das renale System gegenüber einer Minderperfusion ist. Durch Autoregulation kann die Niere Blutdruckschwankungen zwischen 80–180 mmHG ausgleichen und in diesem Bereich die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) stabil halten [42]. Bei anhaltender Hypoperfusion verliert die Niere jedoch die Fähigkeit zur Autoregulation und zeigt relativ schnell charakteristische pathomorphologische Veränderungen, welche einen Verlust der zellulären Integrität bedeuten [20]. Als besonders vulnerabel gilt die Mark-Rindengrenze [86].

Folgende pathomorphologischen Veränderungen zeigen sich im Rahmen einer renalen Hypoxie und wurden in der Arbeit untersucht:

2.5.4.1 Glomeruläre Tubularisation (GT):

Die GT gilt als histologischer Frühmarker einer akuten renalen Ischämie. Hierbei sprosst das Epithel der proximalen Tubuli retrograd in die Bowman-Kapsel ein. Je nach Ausprägung kann dieses sogar die gesamte Zirkumferenz der Bowmann Kapsel ausfüllen. Hierbei liegt das einschichtige kubische Epithel dem parietalen Blatt der Bowmanschen Kapsel eng an. Diese Veränderung beruht auf akuter ischämischer oder toxischer Schädigung der Zellen der Lamina parietalis der Bowmannkapsel und deren konsekutivem Stabilitätsverlust, so dass Zellen des

proximalen Tubulussystems in die Bowmannkapsel einfallen („hernieren“) [41].

Zum Vergleich der Ausprägung der GT an den Versuchsgruppen wurden je Nierenpräparat 50 Glomeruli nach dem Zufallsprinzip gewählt. Das Vorhandensein der GT wurde als positiv beurteilt und prozentual in Relation zur Gesamtmenge der 50 beurteilten Glomeruli gesetzt.

(Ausprägung der GT (%) = $\frac{\text{Glomeruli von GT betroffen}}{50 \text{ zufällig gewählte Glomeruli}}$). Die Beurteilung der GT

erfolgte anhand der PAS-gefärbten Nierenpräparate, da hier die Zellmembranen besser voneinander abgrenzbar sind. Abbildung 5 verdeutlicht das morphologische Bild.

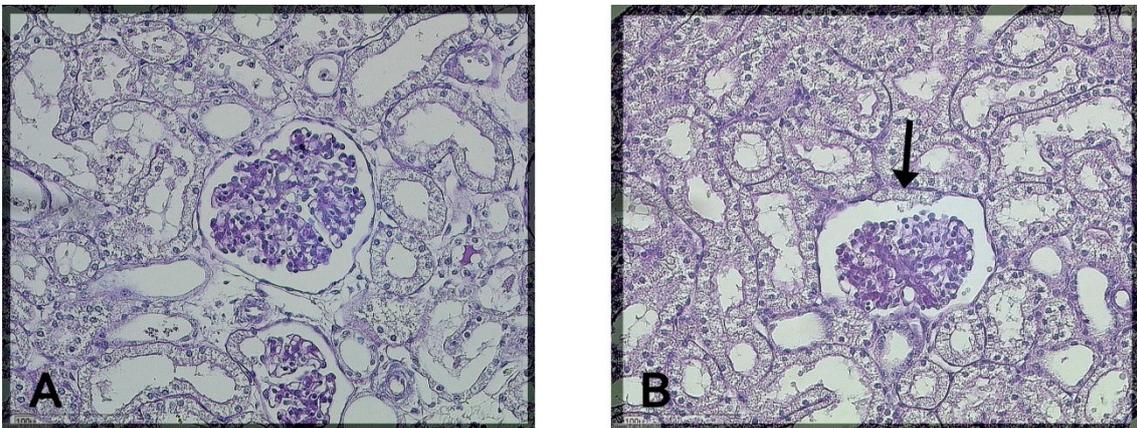


Abbildung 5: Phänomen der glomerulären Tubularisation

Bild A zeigt eine regelhafte Konfiguration der Bowmann Kapsel und des Glomerulums.

Auf Bild B imponiert Zylinderepithelpithel im Rahmen der glomerulären Tubularisation in die Bowmann Kapsel eingeschlagen.

(Schweineniere, PAS- Färbung. Mikroskop: Zeiss, Axioplan 2, Okular 10x , Objektiv 20x)

2.5.4.2 Tubuläre Nekrose:

Durch den frühen Abfall von ATP im Rahmen der Gewebshypoxie kommt es zum Ausfall der ATP-abhängigen Ionenpumpen/-kanäle im Tubulussystem und damit zu einem Ionenungleichgewicht und Volumenverschiebungen. Intrazelluläre Ionenkonzentrationsverschiebungen von Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ führen zu einer

Anhäufung von Phospholipidmetaboliten und zur Dephosphorylierung von Proteinen [48]. Am empfindlichsten reagiert das proximale Tubulussystem auf die Minderperfusion [27]. Morphologische Charakteristika im akuten ischämischen Nierenversagen sind ein Anschwellen der Zellen, ein Verlust des Bürstensaumes im proximalen Tubulussystem und eine Fragmentierung des Zellkerns [75]. Es bildet sich ein interstitielles Ödem und eine Eosinophilie des Gewebes im Rahmen des „inflammatory response“ [51].

Bei Fortschreiten lösen sich tubuläre Epithelzellen von der Basalmembran, es kommt zum Verlust der Zell-Zell-Kontakte, Tubuluszellen finden sich vermehrt intraluminal im Tubulussystem und verlegen diese [89].

Die Beurteilung der Nekrotestadien erfolgte anhand der PAS-gefärbten Präparate.

Es erfolgte die Einteilung des Gesichtsfeldes in 4 Quadranten. Jedes Gesichtsfeld wurde nach folgenden Kriterien beurteilt und mit einer entsprechenden numerischen Graduierung (siehe Tabelle 1) versehen:

Tabelle 1: *Einteilung des Nekroseausmaßes. Pro Präparat wurden 5 Gesichtsfelder nach den unten angegebenen Kriterien beurteilt, die Punkte dann zu einem Graduierungswert (Schädigungsscore) zusammenaddiert. Die Auswertung erfolgte in 100facher Vergrößerung der PAS-gefärbten Schnitte.*

Größe des Nekroseareals	Punktwert
keine Nekrose/kein Verlust der Tubuli	0
sporadische Nekrose/ Tubulusverlust in 1 Quadrant	1
Nekrose/Verlust der Tubuli in 2 Quadranten	2
Nekrose/Verlust der Tubuli in 3 Quadranten	3
Nekrose/Verlust quasi aller Tubuli im Gesichtsfeld	4

Abbildung 6 veranschaulicht die morphologischen Phänomene.

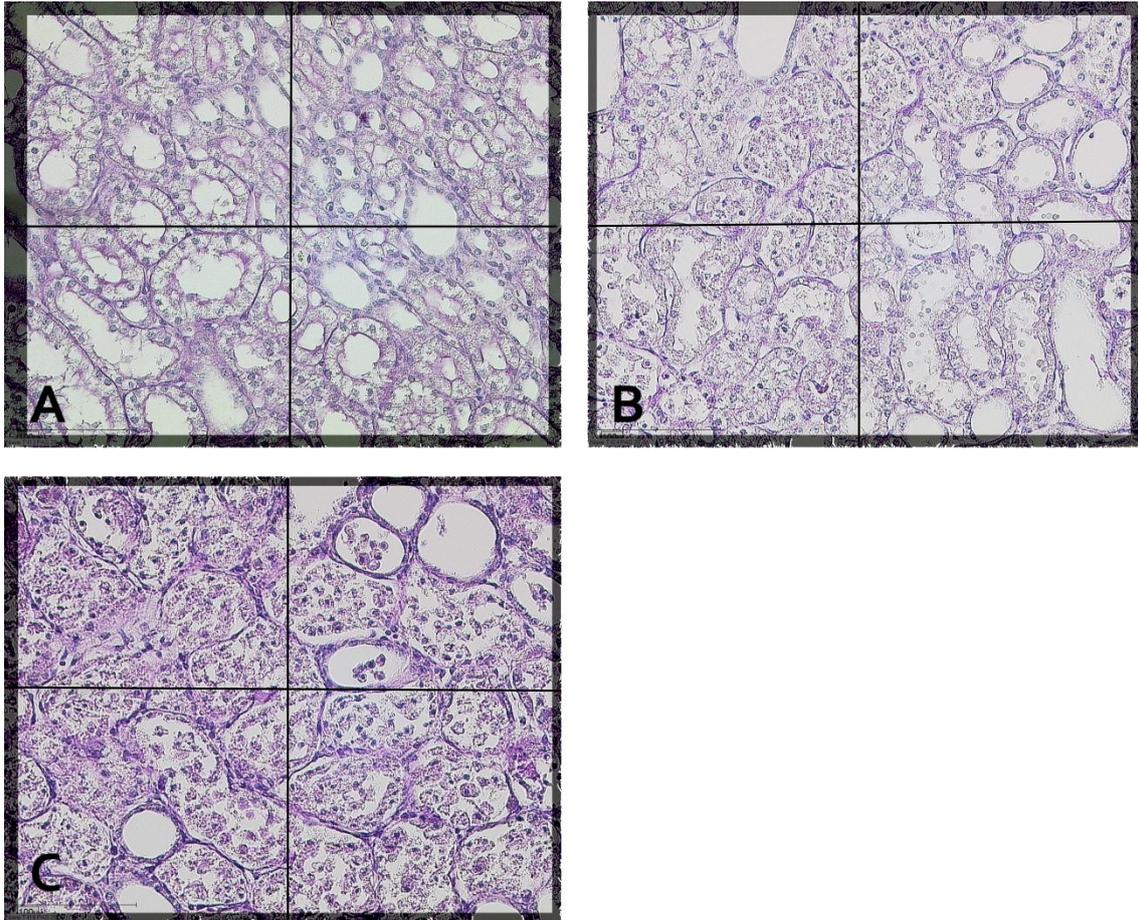


Abbildung 6: Bewertung der Stadien der tubulären Nekrose:

Bild A: Regelmäßig konfigurierte Tubulstruktur, keine Anzeichen für Nekrose
→ 0 Punkte

Bild B: Nekrosekriterien zeigen sich in 2 Quadranten → 2 Punkte

Bild C: ubiquitärer Verlust der zellulären Integrität im Gesichtsfeld, Nekrose
in allen 4 Quadranten → 4 Punkte

*(Schweineniere, PAS-Färbung. Mikroskop: Zeiss, Axioplan 2, Okular 10x,
Objektiv 20x)*

2.5.4.3 Apoptose des Tubulusepithels

Die Apoptose spielt im Vergleich zur Nekrose erst im längeren Ischämieverlauf eine Rolle, da sie mediatorisch vermittelt wird und keine direkte Schädigung durch eine Noxe oder einen Mangelzustand ist. Zudem wird für den kompletten Apoptoseweg ATP benötigt [14]. Es kommt zum Anstieg von proapoptotischen Proteinen wie bax und bak, welche am Mitochondrium andocken und dadurch

innermitochondrial Cytochrom c freisetzen [110].

Morphologisch zeigt sich eine Kondensation der apoptotischen Zelle und des Zellkerns sowie eine nukleäre Fragmentierung (Karyorrhexis) und Chromatinverdichtung im Zellkern (Karyopyknose). Es kommt zum Schrumpfen der Zelle, während es bei der Nekrose zum Anschwellen der Zelle kommt.

Apoptose wird vermehrt im distalen Tubulussystem beobachtet, dieser Abschnitt ist aufgrund höherer Glykolisierung weniger vulnerabel gegenüber nekrosefördernden Einflüssen [70].

Die histologische Beurteilung und Graduierung der Apoptose wurde wie folgt in Tabelle 2 beschrieben durchgeführt:

Tabelle 2: *Jedes Gesichtsfeld wurde in 4 Quadranten eingeteilt, pro Schnittpräparat (Versuchstier) wurden 5 Gesichtsfelder graduiert und deren Punktwerte zu einem Gesamtwert (Schädigungsscore) addiert. Die Auswertung erfolgte in 100 facher Vergrößerung der PAS-gefärbten Schnitte.*

Apoptoseareale des Tubulussystems	Punktwert
Keine Apoptose	0
Sporadische Apoptosen in einem Quadranten	1
Apoptosen in 2 Quadranten	2
Apoptosen in 3 Quadranten	3
Ubiquitär Apoptosen in einem Gesichtsfeld	4

Abbildung 7 veranschaulicht das morphologische Bild von tubulären Apoptosen in der H.E.-Färbung.

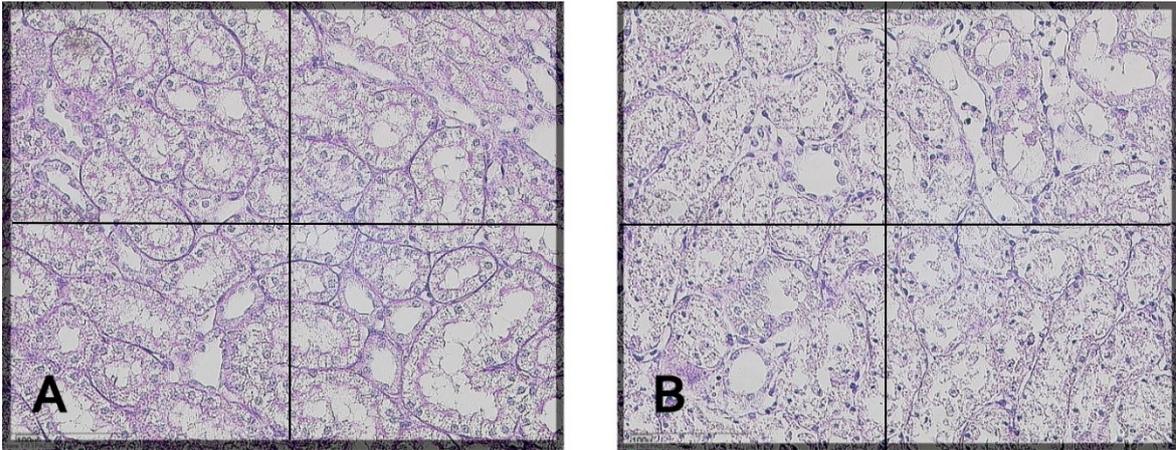


Abbildung 7: Apoptosen von proximalen Tubuluszellen:

Bild A zeigt normal ein konfigurirtes proximales Tubulussystem.

Bild B weist Apoptosen in allen 4 Quadranten auf, es imponieren geschrumpfte Epithelzellen mit kondensierten und teilweise fragmentierten Nuclei analog einem Punktwert von 4.

(Schweineniere, PAS- Färbung. Mikroskop: Zeiss, Axioplan 2, Okular 10x, Objektiv 20x)

2.5.4.4 Agglutinationen von Proteinzyllindern:

Bei fortgeschrittener renaler Ischämie und damit Nekrose imponieren häufig intraluminale Proteinzyllinder im Tubulussystem, welche diese größtenteils komplett verlegen. Diese entstehen durch Agglutinationen von Zelldebris, abgestossenen Tubulusepithelzellen, Bürstensaummembranen und extrazellulärer Matrix im Tubulussystem. Durch Elektrolytverschiebung, v.a. durch Anstieg der intraluminalen Na^+ -Konzentration, wird intraluminales Tamm-Horsefall-Protein (THP) polymerisiert. Das TPH wird im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife gebildet und ins Lumen sezerniert, physiologisch liegt es als Monomer vor. Vermutlich durch direkte Na^+ -Einwirkung bilden sich Polymere des THP, was zu einer gelartigen Substanz führt und oben genannte Zellbestandteile verkleben kann [100]. Die Proteinzyllinder (PZ) imponieren histologisch als intraluminales ungeordnetes galertartiges Konglomerat.

Das Scoring dieser pathologischen Veränderung erfolgte nach der hier angelegten Tabelle 3.

Tabelle 3: Je nach Auftreten von Proteinzyklindern in den 4 Quadranten eines Gesichtsfeldes wurden 0-4 Punkte vergeben. Je Präparat wurden 5 Gesichtsfelder à 4 Quadranten bewertet und die Punktwerte zu einem Gesamtwert (Schädigungsscore) addiert. Die Auswertung wurde bei einer 100fachen Vergrößerung an den PAS-gefärbten Präparaten vorgenommen.

Vorkommen von Proteinzyklindern	Punkteskala
Kein Nachweis von Proteinzyklindern (PZ)	0 Punkte
Nachweis von PZ in 1 Quadranten	1 Punkt
Nachweis von PZ in 2 Quadranten	2 Punkte
Nachweis von PZ in 3 Quadranten	3 Punkte
Nachweis von PZ im gesamten Gesichtsfeld	4 Punkte

Abbildung 8B zeigt das morphologische Bild von Proteinzyklindern an einem Versuchstier.

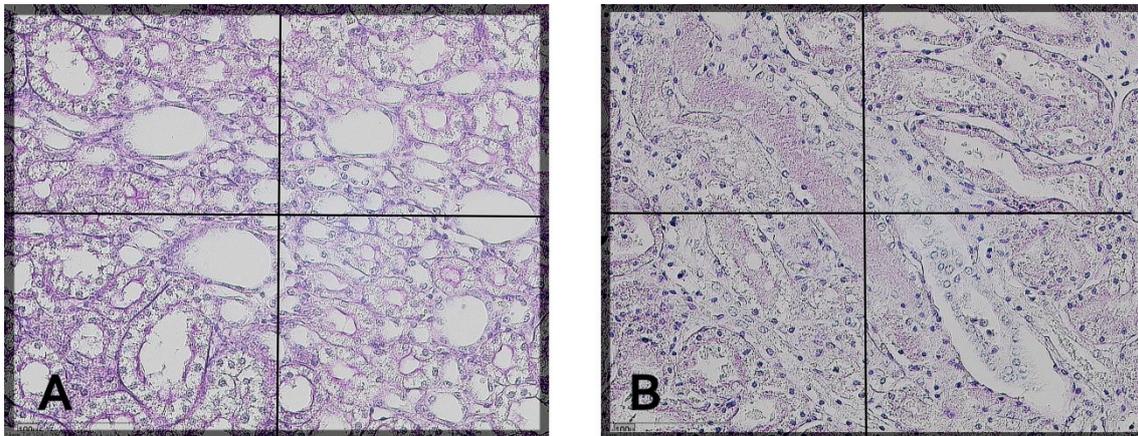


Abbildung 8: Agglutination von Proteinzyklindern:

Bild A zeigt freie tubuläre Lumina.

In Bild B imponieren in 3 Quadranten durch Proteinzyklinder verlegte Lumina analog einem Punktwert von 3.

(Schweineniere, PAS- Färbung. Mikroskop: Zeiss, Axioplan 2, Okular 10x , Objektiv 10x)

2.5.5 Auswertung Leber

In ischämischen Leberabschnitten zeigen sich Schädigungen histologisch zuerst in der zentrolobulären Region. Dies ist der Durchblutungsanatomie der Leber geschuldet, dabei ist der Zentrolobulärbereich sozusagen die letzte Wiese, da dieser Bereich den sauerstoffreichen Gefäßregionen der Periportalfelder nachgeschaltet ist. Es bilden sich zentrolobuläre Nekrosen [79].

Die Beurteilung der hepato-zellulären Schädigung wurde anhand folgender Phänomene vorgenommen:

2.5.5.1 Hepato-zelluläre Nekrose:

Die Nekroseausdehnung erfolgt wie im Kapitel 2.5.7 genannt zentrifugal vom Leberläppchenzentrum (um die Zentralvene) zur Leberläppchenperipherie (Periportalfeld) [79]. Histomorphologische Charakteristika der hepato-zellulären Nekrose sind eine zunehmende Eosinophilie (in der H.E.-Färbung) des Zytoplasmas. Diese entsteht durch eine vermehrte Bindung von Eosin an denaturierte Proteine, Zellkernveränderungen wie Schrumpfung (Kernpyknose) oder Zellkernfragmentierung (Karyorrhesis) und konsekutive Auflösung (Karyolysis). Zudem imponiert eine Zellschwellung, Membranausbuchtung und Auflösen der Zell-Zell-Kontakte [12].

Es erfolgte pro Schnittpräparat die Auswertung von 5 zufällig gewählten Leberläppchen. Tabelle 4 erläutert das Scoring der hepato-zellulären Nekrose.

Tabelle 4: Einteilung des nekrotischen Schädigungsgrades der Leberläppchen. Die Punktwerte von 5 zufällig ausgewählten Leberläppchen je Schnittpräparat wurden zu einem Schädigungsscore addiert.

Schädigungsgrad des Leberläppchens	Punktwert
Keine morphologisch sichtbare Nekrose	0
Nekroseareal von bis zu 25% des Leberläppchens	0,25
Nekroseareal zwischen 25 - 50% des Leberläppchens	0,50
Nekroseareal zwischen 50 - 75% des Leberläppchens	0,75
Komplette Nekrose des Leberläppchens	1

Abbildung 8 zeigt rechts in einer Übersichtsaufnahme nekrotische Areale der zentralen Leberläppchen begleitet von einem Stauungsphänomen.

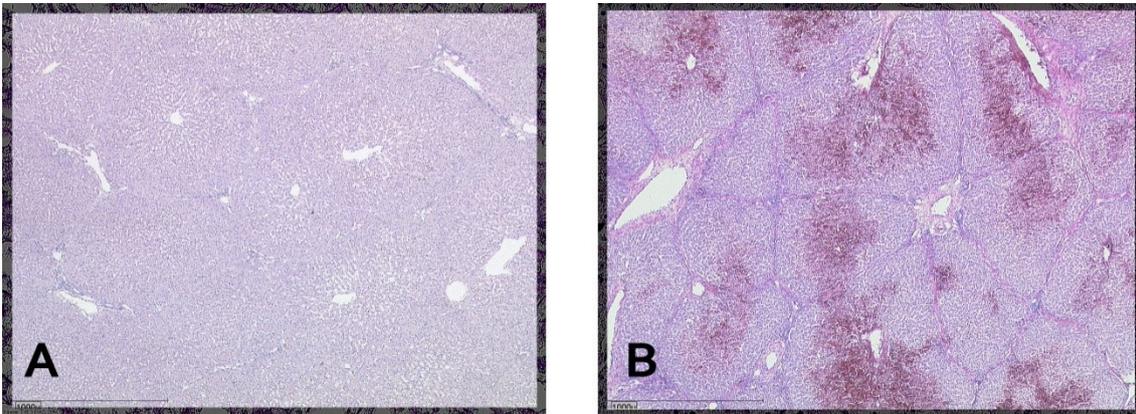


Abbildung 8: Hepatozelluläre Nekrosen in der Übersichtsaufnahme:

Bild A zeigt vitale Leberläppchenstrukturen.

Bild B zeigt Leberläppchen mit 25 bis zu 75 prozentigen Nekrosearealen, Punktwerte je Leberläppchen von 0,25 - 0,75.

(Schweineleber, H.E.-Färbung. Mikroskop: Zeiss Axioplan 2, Okular 10x, Objektiv 2,5x)

2.5.5.2 Leukozyteninfiltration:

Es ereignet sich in den ischämischen Leberläppchen eine konsekutive Gewebeeinfiltration von überwiegend neutrophilen Granulozyten, aber auch von Lymphozyten und Makrophagen im Rahmen der entzündlichen Begleitreaktion der Nekrose [12].

Tabelle 5: Einteilung der Stadien der Leukozyteninfiltration am histologischen Schnittbild des Versuchstieres. Es erfolgte die Auswertung von 5 zufällig gewählten Leberläppchen eines Schnittpräparates, die Punktwerte wurden zu einem Schädigungsscore addiert.

Leukozyteninfiltration (LI)	Punktwert
Keine Leukozyteninfiltration	0
Sporadische LI in bis 25% des Leberläppchens	0,25
LI in 25 – 50% des Leberläppchens	0,5
LI in 50 – 75% des Leberläppchens	0,75
LI im gesamten Leberläppchen	1

Abbildung 9 veranschaulicht das morphologische Bild einer Leukozytenansammlung im Leberläppchen eines Versuchstieres.

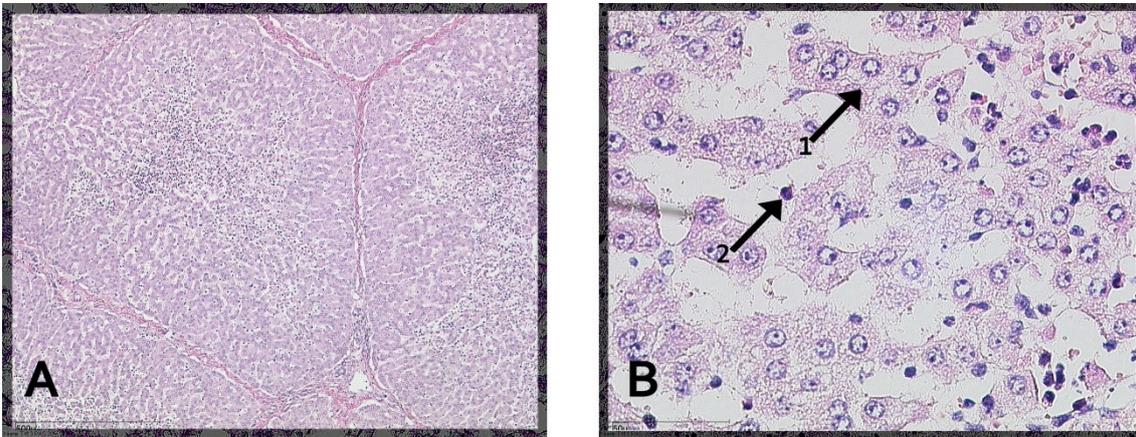


Abbildung 9: Leukozyteninfiltrationen der Leberläppchen:

Bild A zeigt eine Leukozyteninfiltration des Leberläppchens zwischen 25 – 50 % gemäß einem Punktwert von 0,5.

Bild B zeigt selbiges Präparat in 400-facher Vergrößerung, Pfeil 1 deutet auf eine Akkumulation von neutrophilen Granulozyten (typisch der segmentierte Zellkern), Pfeil 2 weist auf einen Lymphozyten.

(Schweineleber, Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Mikroskop: Zeiss, Axioplan 2, Okular 10x, Bild A Objektiv 5x, Bild B Objektiv 40x)

2.5.5.3 Zentro-lobuläre Stauung

Eine zentro-lobuläre hepatische Stauung kann sich im Rahmen der Hämorrhagie aufgrund des kardialen Versagens bei Volumenmangel und dem damit verbundenen mangelnden venösen Abfluss zeigen. Gemäß den anatomischen Verhältnissen ist diese im Zentrum des Leberläppchens um die Zentralvene herum lokalisiert. Begleitend imponieren die Sinusoide durch den Blutstau dilatiert [78].

Mikrothrombenbildungen im Rahmen des SIRS können das Stauungsphänomen augmentieren.

Zur Beurteilung des Stauungsgrades wurden je Schnittpräparat 5 Leberläppchen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und der Stauungsgrad wie in Tabelle 6 angegeben dokumentiert.

Tabelle 6: Einteilung des Stauungsgrades am histologischen Schnittbild des Versuchstieres. Im Anschluss erfolgte die Addition von 5 graduierten Leberläppchen zu einem Schädigungsscore.

Stauungsgrad im Leberläppchen	Punktwert
Keine Stauung sichtbar	0
Geringfügige Stauung bis zu 25% der lobulären Fläche	0,25
Stauung zwischen 25 bis 50 % der lobulären Fläche	0,5
Stauung zwischen 50 bis 75 % der lobulären Fläche	0,75
Stauung im gesamten Leberläppchen	1

Abbildung 10 B demonstriert das histologische Bild eines lobulären Blutstaus an einem Versuchstier.

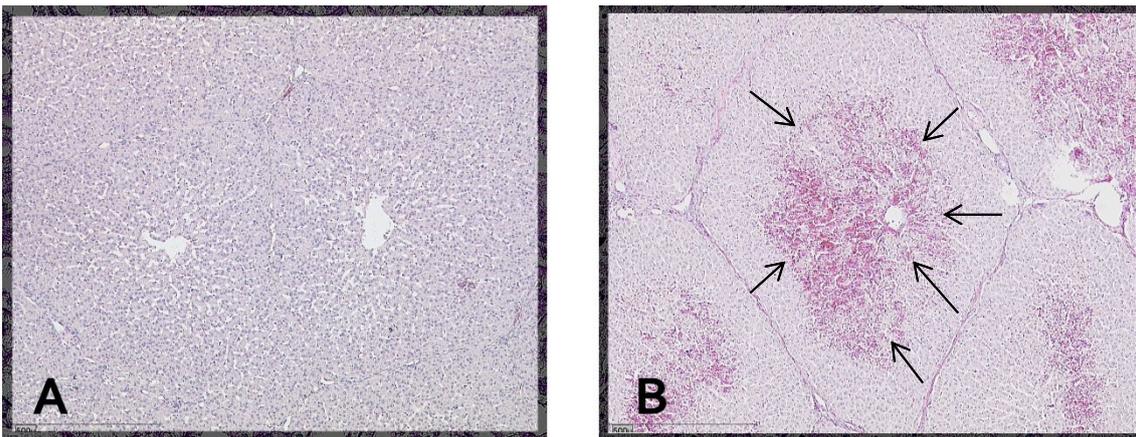


Abbildung 10: Zentrolobuläre Stauung:

Bild A: 2 Leberläppchen ohne Anzeichen einer Stauung

Bild B: Ausgeprägte Stauung zentrifugal von der Zentralvene ausgehend
Das Stauungsareal beträgt zwischen 50–75 % der lobulären Fläche und erhält den Punktwert 0,75.

(Schweineleber, H.E.-Färbung. Mikroskop: Zeiss Axioplan 2, Okular 10x, Objektiv 5x)

2.5.6 Auswertung Lunge:

Die Lunge an sich zeigt im hämorrhagischen Schock meist erst im Spätverlauf direkte ischämische histologische Veränderungen. Im Rahmen eines schweren

Schocks mit Minderperfusion (Schocklunge) entwickelt sich ein „acute respiratory distress syndrom“ (ARDS), dessen Verlauf meist protrahiert ist (die Entwicklung des Vollbildes kann 2 Wochen betragen) und über mehre Stadien zur Ausbildung hyaliner Membranen und letztendlich zum narbigen Umbau des Lungengewebes (interstitielle Fibrose) führt [13].

In der Akut- und Postakutphase des hämorrhagischen Schocks, im Zeitfenster von mehreren Stunden, steht die sogenannte exudative Phase des ARDS im Vordergrund. Hierbei kommt es durch die stark reduzierte pulmonale Mikrozirkulation zu Endothelschäden und Ausbildung eines exudativen proteinreichen, erst interstitiellen und danach intraalveolären Ödems, mikroskopisch als Atelektase/Dystelektase imponierend. Die Alveolarmembran kann verbreitert sein, im Rahmen des „inflammatory response“ zeigt sich eine diffuse leukozytäre Infiltration mit vor v.a. neutrophilen Granulozyten, als auch Makrophagen [101]. Durch die epitheliale Schrankenstörung kann sich eine alveoläre Hämorrhagie zeigen. Die Mediatorenkaskade im Rahmen des SIRS und ROS, deren Konzentration während der Reperfusion stark ansteigt, unterhalten die genannten Vorgänge [61, 58].

Folgende pathomorphologische Veränderungen des Lungengewebes wurden in dieser Arbeit untersucht und als Marker für die Ausprägung des ARDS verwendet:

2.5.6.1 Dystelektasen/Atelektasen:

Im Gegensatz zur rein hypoventilatorischen Atelektase zeigen sich Atelektasen im hämorrhagischen Schock als Folge des diffusen Alveolarschadens im Kontext der ARDS-Pathologie. In der Frühphase des ARDS kommt es zur Nekrose und Desquamation von Pneumozyten und Endothelzellen, was eine Permeabilitätsstörung nach sich zieht. Es entsteht ein interstitielles und proteinreiches alveoläres Ödem und intravasale Aggregationen von neutrophilen Granulozyten und Thromben durch die interstitielle Entzündungsreaktion [58]. Intraalveolar entstehen dadurch sogenannte hyaline Membranen. Zum einen entstehen Atelektasen also im Rahmen einer entzündlichen Verklebung/Verlegung, als auch durch direkten Kollaps der Alveolen im Rahmen eines Mangels an Surfactant, wenn Typ-2-Pneumozyten geschädigt werden. Die

Beurteilung der atelektatischen Areale im Schnittpräparat erfolgte wie in Tabelle 7 angegeben.

Tabelle 7: Beurteilung der Atelektaseareale: Einteilung eines Gesichtsfeldes in 4 Quadranten und Vergabe des jeweiligen tabellarisch aufgeführten Punktwertes. Pro Präparat wurden 5 zufällig gewählte Gesichtsfelder beurteilt und deren Punktwerte zu einem Schädigungsscore addiert. Auswertung anhand der H.E.-gefärbten Schnittpräparate in 100facher Vergrößerung.

Atelektaseausprägung	Punktwert
Keine Atelektase	0
Leichte Atelektase	0,25
Mäßige Atelektase	0,5
Ausgeprägte Atelektase	0,75
Komplett atelektatisches Gesichtsfeld	1

Abbildung 11 verdeutlicht die Auswertungskriterien an Schnittbildern von Versuchstieren.

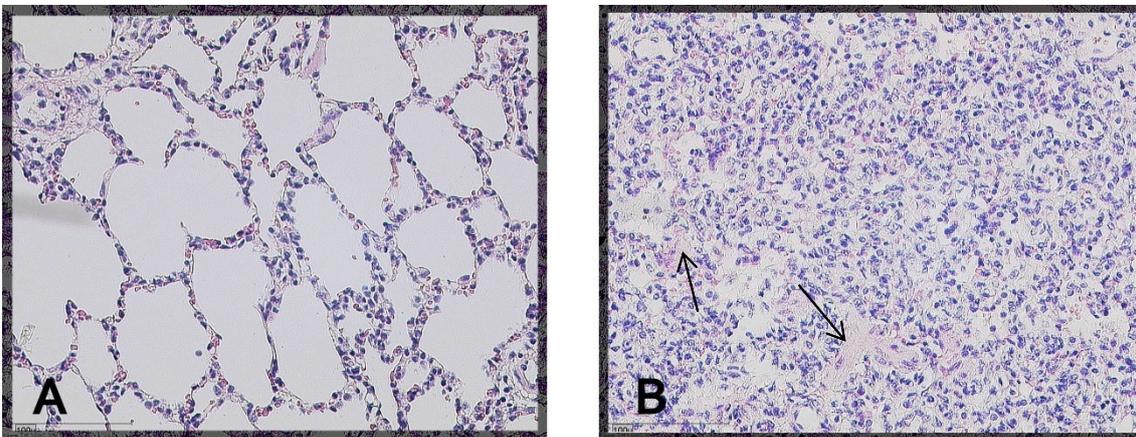


Abbildung 11: Gesunde und pathologisch veränderte Alveolarbereiche:

Bild A zeigt ein regelhaftes Alveolarsystem ohne Schrankenstörung.

Bild B weist einen komplett atelektatischen Alveolarbereich mit diffuser leukozytärer Infiltration und Schrankenstörung auf. Die Alveolarsepten als solche sind kaum mehr zu erkennen. Die beiden Pfeile sind auf Hyalinmembranen gerichtet.

(Schweinelunge, H.E.-Färbung. Mikroskop: Zeiss Axioplan 2, Okular 10x, Objektiv 20x)

2.5.6.2 Verbreiterung der Alveolarmembranen:

Im Rahmen der entzündlichen Begleitreaktion der exudativen Phase eines ARDS kann die Alveolarmembran durch das entzündliche Ödem verbreitert sein. Eine Verdickung durch fibrotischen Umbau wäre frühestens nach mehreren Tagen zu erwarten (Fibro-proliferative Phase im Spätstadium des ARDS) [13].

Die Auswertung erfolgte nach den in Tabelle 8 genannten Kriterien:

Tabelle 8: Beurteilung der Alveolarmembranverdickung: Einteilung eines Gesichtsfeldes in 4 Quadranten. Graduierung je nach Auffinden von Alveolarmembranverbreiterungen pro Quadrant. Pro Schnittpräparat (Versuchstier) wurden 5 Gesichtsfelder nach dem Zufallsprinzip ausgewählt und ausgewertet. Die Punktwerte wurden zu einem Schädigungsscore addiert. Dies erfolgte an den H.E.-gefärbten Schnittpräparaten bei 100facher Vergrößerung.

Alveolarmembranverbreiterung	Punktwert
Keine Verbreiterung der Alveolarmembran	0
Verbreiterte Alveolarmembranen in 1 Quadranten	0,25
Verbreiterte Alveolarmembran in 2 Quadranten	0,5
Verbreiterte Alveolarmembran in 3 Quadranten	0,75
Verbreiterte Alveolarmembran im gesamten Gesichtsfeld	1

Abbildung 12 B veranschaulicht physiologische Alveolarmembranen mit inflammatorisch veränderten Membranen und damit verbundener Verbreiterung der Alveolarmembran. Physiologisch beträgt die Dicke der Alveolarmembran je nach Lungenabschnitt zwischen 0,2 bis 1 μm , beim Landschwein analog zum Menschen.

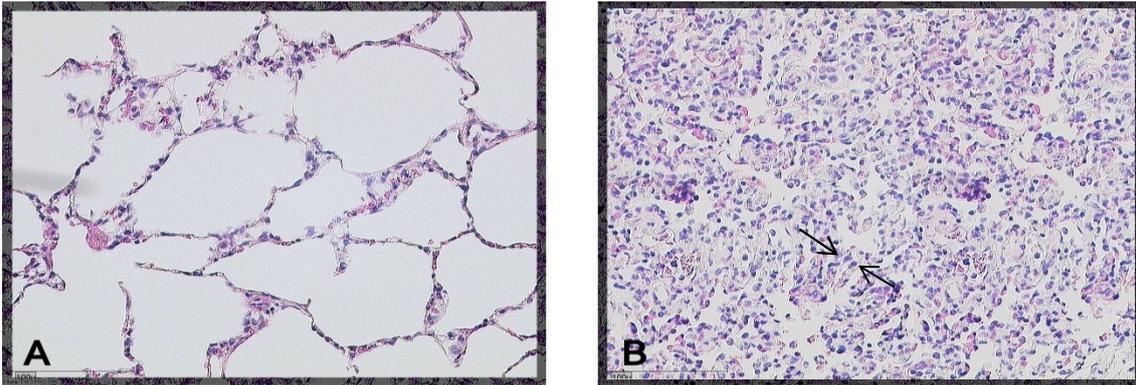


Abbildung 12: Verbreiterte Alveolarsepten, entzündliches Ödem:

Bild A: normal-weite Alveolarmembranen

Bild B: deutlich verdickte Membranen (als Beispiel siehe Pfeile) und diffuse Leukozyteninfiltration im kompletten Schnittbild.

(Schweinelunge, H.E.-Färbung. Mikroskop: Zeiss Axioplan 2, Okular 10x, Objektiv 20x)

2.5.6.3 Diffuse alveoläre Hämorrhagie

In einigen Präparaten wurde eine diffuse alveoläre Blutung beobachtet, weshalb sie als Beurteilungskriterium zur Schwere der pulmonalen Schädigung mit eingeschlossen wurde. Als Ursache ist hier am ehesten eine Schrankenstörung durch hypoxische Kapillarschädigungen zu sehen, also im Rahmen einer hämorrhagischen Infarzierung. Das Ausmaß der diffusen alveolären Hämorrhagie wurde wie in Tabelle 9 aufgelistet beurteilt, Abbildung 13 B gibt einen visuellen Eindruck.

Tabelle 9: Einteilung der alveolären Hämorrhagie. Es erfolgte die Einteilung jedes Gesichtsfeldes in 4 Quadranten. Pro Präparat wurden 5 zufällige Gesichtsfelder ausgewertet und die vergebenen Punktwerte zu einem Gesamtwert (Schädigungsscore) addiert. Die Auswertung erfolgte an den H.E.-gefärbten Präparaten in 100facher Vergrößerung.

Diffuse alveoläre Hämorrhagie im Gesichtsfeld	Punktwert
Keine intralveolären Erythrozyten	0
Freie intraalveoläre Erythrozyten in einem Quadrant	0,25
Freie intraalveoläre Erythrozyten in 2 Quadranten	0,5
Freie intraalveoläre Erythrozyten in 3 Quadranten	0,75
Diffuse alveoläre Hämorrhagie im gesamten Gesichtsfeld	1

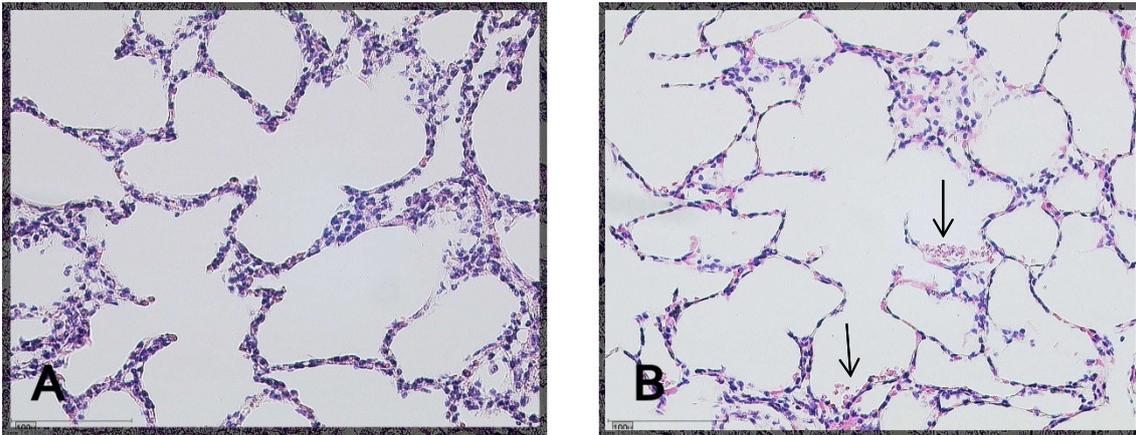


Abbildung 13: Intraalveoläre Hämorrhagie:

Bild A: alveolärer Normalbefund

Bild B: Die Pfeile weisen auf freie intraalveoläre Erythrozyten

(Schweinelunge, H.E.-Färbung. Mikroskop: Zeiss, Axioplan 2, Okular 10x, Objektiv 20x)

2.6. Statistische Analyse und Darstellung

Die statistische Auswertung der erhobenen histologischen Schädigungspunktwerte (Schädigungsscores) der Versuchstiere erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 6. Für den Vergleich der histologischen Merkmale der Verum- und Kontrollgruppe wurde der Mann-Whitney-Rank Sum Test eingesetzt. Die Darlegung der erhobenen Daten erfolgte als Median mit den 25% und 75%-Quartilen. Die graphische Darstellung der histopathologischen Ergebnisse wurde durch Dotplots veranschaulicht. Kreislaufparameter Messdaten beider Versuchsgruppen wurden zu den jeweiligen Messzeitpunkten mit dem Mann-Whitney-Rank-Sum Test verglichen. Verlaufparameter einer Versuchsgruppe zum jeweiligen Ausgangswert wurden mit dem Wilcoxon Signed Rank Test dargestellt und hier tabellarisch in den Ergebnisteil integriert. Die Überlebenswahrscheinlichkeit im Ablauf des Versuchsprotokolls wurde mit Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und das Signifikanzniveau hieraus mit dem Gehan-Breslow-Wilcoxon-Test berechnet.

Das Konfidenzintervall wurde standardmäßig mit 95% veranschlagt, somit wurde bei allen statistischen Ergebnissen ein p-Wert von $< 0,05$ als signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

3.1 Erhobene Daten

In der Versuchsreihe kamen 24 deutsche Landschweine zum Einsatz. In der Kontrollgruppe (n=14) verstarben 4 Versuchstiere, in der Verumgruppe (n=10) ein Versuchstier vor dem zeitlichen Ablauf des Versuchsprotokolls. Diese Versuchstiere wurden für die statistische Auswertung der histopathologischen Daten nicht berücksichtigt.

3.2 Überleben

Wie in Abbildung 14 angezeigt starben von den 14 Kontrolltieren 4 vor Ablauf des Versuchsprotokolls. 3 starben in der Phase der Retransfusion/Reperfusion, eines in der Post-Reperfusion. Hierbei waren bei 2 Versuchstieren nicht beherrschbare therapierefraktäre Arrhythmien und bei den anderen beiden Versuchstieren pulslose elektrische Aktivitäten zu verzeichnen. Von den 10 Versuchstieren der Verumgruppe starb 1 Tier, bei diesem kam es zu akutem Kammerflimmern.

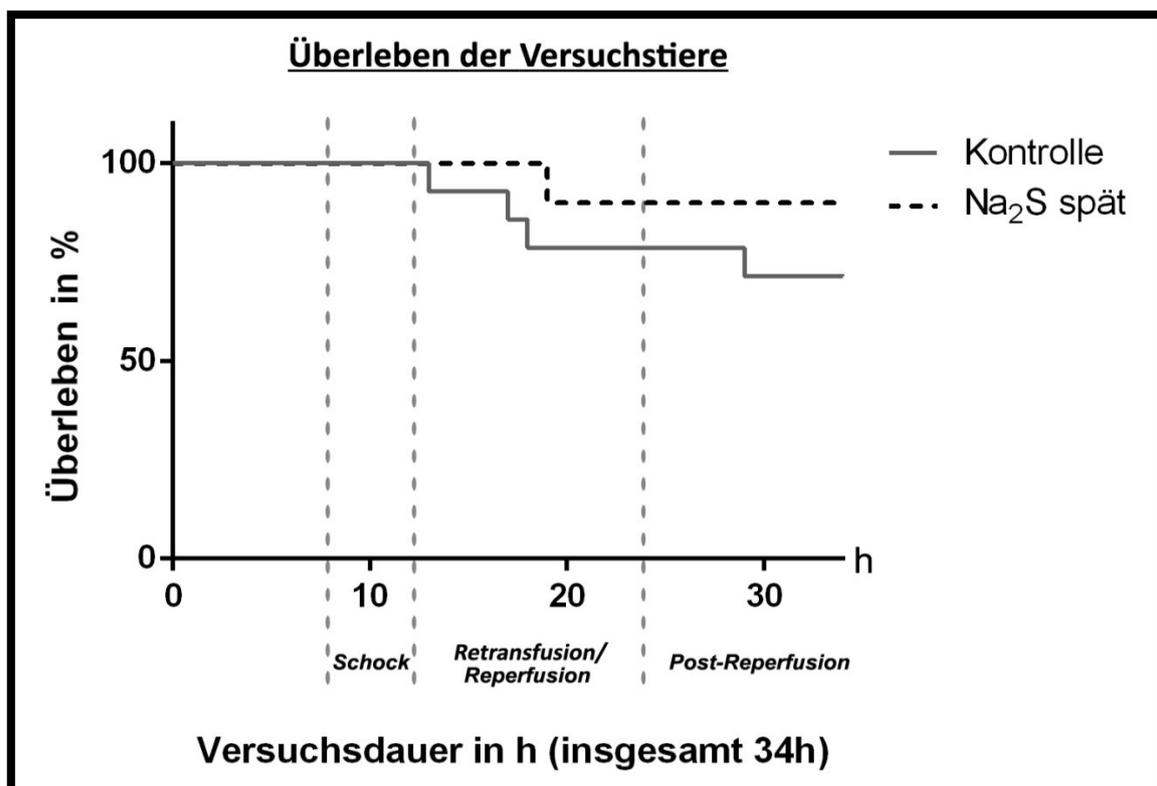


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Kurven für das Überleben im Versuchsverlauf
h = Stunden, % = Prozent

In der Kontrollgruppe überlebten somit 71%, in der Na₂S-Gruppe 90% der Versuchstiere.

3.3 Systemische Parameter

3.3.1 Parameter des hämorrhagischen Schocks

Während des Versuches wurden für den Zeitraum des hämorrhagischen Schocks die parametrischen Schockkriterien für beide Versuchsgruppen erreicht, wie Tabelle 10 verdeutlicht. Zudem imponiert in der Behandlungsgruppe zum letzten Messzeitpunkt (MZP4) eine signifikant erniedrigte Herzfrequenz zum gruppeneigenen Ausgangswert ($p_{\beta} = 0,004$), als auch im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p_{\alpha} < 0,0001$).

Tabelle 10: Messdaten der Kontroll-, und Na₂S-Verumgruppe für den mittleren arteriellen Blutdruck (MAD) und die Herzfrequenz (HF) zu den 4 Messzeitpunkten (MZP). EBV = Entnommenes Blutvolumen in ml pro Kilogramm Körpergewicht (zur Induzierung des Schocks). Voranstehend der mediane Wert, in Klammern die 25% und 75 % Quartile. α = Signifikanz zwischen den Behandlungsgruppen. β = Signifikanz zum Ausgangswert der eigenen Gruppe

Kontrollgruppe n = 14, Na₂S-Verumgruppe n = 10

	MZP 1 Rekonvaleszenz -phase	MZP 2 Schockphase	MZP 3 Retransfusion/ Reperfusion	MZP 4 Post-Reperfusion- Phase
MAD Kontrolle (mmHg)	96 (87-101)	30 (29-32)	85 (75-93)	86 (68-96)
MAD Na ₂ S (mmHg)	86 (80-96)	30 (29-33)	85 (77-90)	80 (74-93)
HF Kontrolle (pro min)	92 (73-105)	107 (94-125)	104 (79-150)	114 (82-135)
HF Na ₂ S (pro min)	87 (73-105)	94 (84-119)	92 (57-122)	75 (58-101) α, β
EBV Kontrolle (ml/kgKG)		30 (24-35)		
EBV Na ₂ S (ml/kgKG)		33 (23-35)		

3.3.2 Verlaufparameter der Körperkerntemperatur

Während des gesamten Versuchablaufes wurde über eine rektal eingebrachte Temperaturmesssonde die Körperkerntemperatur bestimmt.

Diese war zum MZP 3 und MZP 4 im Behandlungsarm zum gruppeneigenen Ausgangswert signifikant erniedrigt ($p_{\beta}=0,004$).

Ebenso war zu den genannten beiden Messzeitpunkten des Behandlungsarmes die KKT im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (MZP 3: $p_{\alpha}=0,03$, MZP 4: $p_{\alpha}=0,018$).

Tabelle 11: Messdaten der Körperkerntemperatur (KKT) zu den 4 Messzeitpunkten (MZP). Oben der mediane Wert, darunter in Klammern die 25% und 75%-Quartile, °C = Grad Celsius, α = Signifikanz zwischen den Behandlungsgruppen. β = Signifikanz zum Ausgangswert der eigenen Gruppe. Kontrollgruppe n = 14, Verumgruppe n = 10

	MZP 1 Rekonvaleszenz -phase	MZP 2 Schockphase	MZP 3 Retransfusions-/ Reperfusionphase	MZP 4 Post-Reperfusion- phase
KKT (°C)	37,1	37,7	37,8	37,5
<i>Kontrollgruppe</i>	(36,6 - 37,8)	(36,2 - 38,8)	(35,8 - 39,1)	(35,4 - 39,7)
KKT (°C)	36,5	36,5	35,3 α,β	34,4 α,β
<i>Na₂S-Gruppe</i>	(35,6 – 37,1)	(35,3 – 37,2)	(34,4 – 36,8)	(33,3 – 35,6)

3.3.3 Parameter der systemischen Sauerstoffaufnahme (VO₂) und der Kohlenstoffdioxidproduktion (VCO₂)

Die Ermittlung der systemischen Sauerstoffaufnahme (VO₂) zeigte zwischen der Kontroll- und Verumgruppe keine Unterschiede, während bei der systemischen Kohlenstoffdioxidproduktion (VCO₂) im Behandlungsarm zum MZP 4 ein signifikant ($p_{\alpha}=0,01$) erniedrigter Wert im Vergleich zum Kontrollgruppe zu verzeichnen war.

Tabelle 12: Messdaten des systemischen Sauerstoffverbrauches und der systemischen Kohlenstoffdioxidproduktion zu den 4 Messzeitpunkten (MZP).
 Oben der mediane Wert, darunter in Klammern die 25% und 75% Quartile,
 VO_2 = Systemische Sauerstoffaufnahme,
 VCO_2 = Systemische Kohlenstoffdioxidproduktion,
 ml = Milliliter, min = Minute, kgKG = Kilogramm Körpergewicht,
 α = Signifikanz zwischen den Behandlungsgruppen,
 β = Signifikanz zum Ausgangswert der eigenen Gruppe.
 Kontrollgruppe n = 14, Verumgruppe n = 10

	MZP 1 Rekonvaleszenz -phase	MZP 2 Schockphase	MZP 3 Reperusionsphase	MZP 4 Post-Reperusions- phase
VO_2 (ml/min/kgKG) <i>Kontrollgruppe</i>	4,4 (4,1 - 4,6)	3,1 β (2,6 - 3,8)	4,4 (4,3 - 5,6)	4,7 (4,0 - 5,5)
VO_2 (ml/min/kgKG) <i>Na₂S-Gruppe</i>	4,1 (3,8 - 4,5)	3,5 β (2,8 - 3,9)	4,5 (3,7 - 5,2)	4,4 (3,5 - 4,8)
VCO_2 (ml/min/kgKG) <i>Kontrollgruppe</i>	2,9 (2,8 - 3,2)	2,4 (2,2 - 3,0)	3,3 (3,1 - 3,6)	3,4 β (3,1 - 4,0)
VCO_2 (ml/min/kgKG) <i>Na₂S-Gruppe</i>	2,7 (2,4 - 3,3)	2,5 (2,0 - 3,0)	2,8 (2,7 - 3,5)	2,5 α (2,4 - 3,1)

3.4 Histologischer Vergleich der Versuchsgruppen - Niere

Bei der Auswertung beider Versuchsgruppen konnten bei allen verglichenen histopathologischen Veränderungen keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Die p-Werte erreichten für die untersuchten histopathomorphologischen Veränderungen kein Signifikanzniveau:

3.4.1 Glomeruläre Tubularisation

Die mediane Ausprägung der GT (in %) war in der Verumgruppe (10%) zwar geringer als zur Kontrollgruppe (21%), der p-Wert zeigte mit 0,433 jedoch keine Signifikanz für das Merkmal.

3.4.3 Apoptose des Tubulusepithels

Die Anzahl der tubulären Apoptosen (TA) fiel in der Kontrollgruppe unsignifikant geringer aus ($p=0,733$).

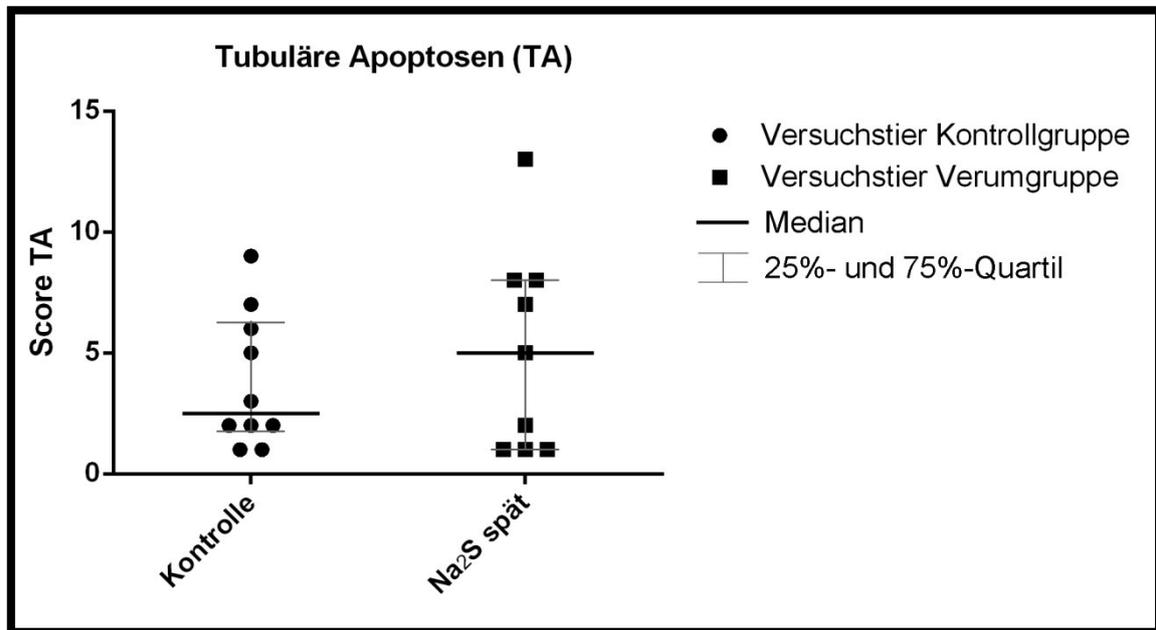


Abbildung 17: Dotplot für das Merkmal der TA (Tubulären Apoptose)
Median Kontrollgruppe = 2,5 , Median Verumgruppe = 5,0

3.4.4 Agglutination von Proteinzyklindern

Für dieses Merkmal zeigte sich ein minimaler Unterschied zu Gunsten der Verumgruppe ohne Signifikanz ($p=0,822$)

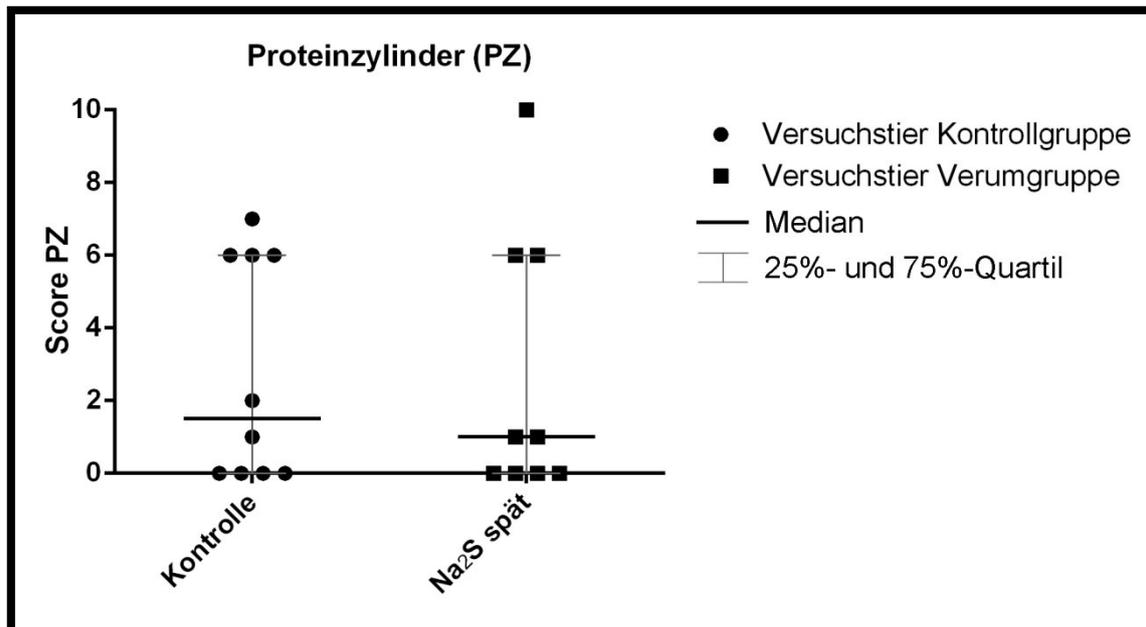


Abbildung 18: Dotplot für das Merkmal Proteinzyylinder (PZ)
Median Kontrollgruppe = 1,5, Median Verumgruppe = 1,0

3.4.5 Histopathologischer Gesamtschädigungsscore Niere

Insgesamt fielen die untersuchten renalen Schädigungsmerkmale in der Verumgruppe zwar etwas geringer aus, jedoch zeigte sich hierbei kein signifikanter Zusammenhang. Der p-Wert des histopathologischen Gesamtscores lag bei $p=0,549$.

Tabelle 13: Histopathologischer Gesamtschädigungsscore
Vorne anstehend der Median, in Klammern das 25%- und 75%-Quartil
 Na_2S = Dinatriumsulfid

Histopathologischer Gesamtschädigungsscore	Kontrollgruppe	Verumgruppe (Na_2S spät)
Niere	2,5 (1 ; 7)	2,0 (0 ; 7,75)

3.5 Histologischer Vergleich der Versuchsgruppen - Leber

Der Vergleich beider Versuchsgruppen zeigte bei den untersuchten Merkmalen keine signifikanten Unterschiede.

3.5.1 Hepatozelluläre Nekrose

In der Verumgruppe zeigten sich weniger hepatozelluläre Nekrosen als in der Kontrollgruppe, dies jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,173$).

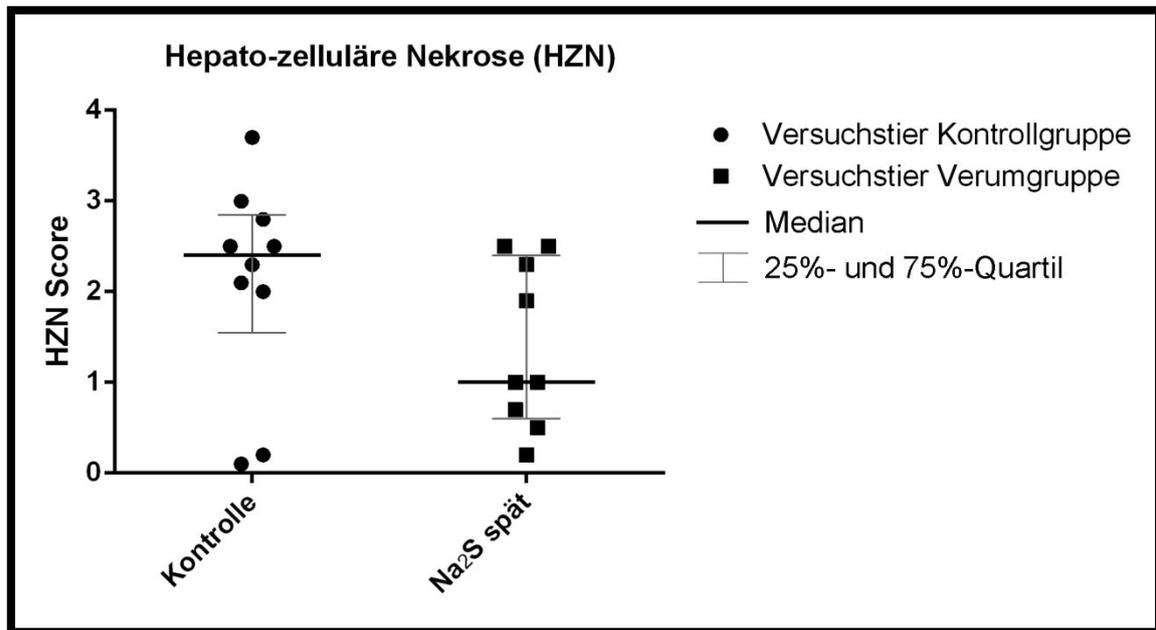


Abbildung 19: Dotplot für das Merkmal der Hepatozellulären Nekrose (HZN)
Median Kontrollgruppe = 2,4 , Median Verumgruppe = 1,0

3.5.2 Leukozyteninfiltration

Es zeigte sich in der Verumgruppe eine vermehrte Leukozyteninfiltration des lobulären Leberparenchyms, dies jedoch ohne Signifikanz ($p=0,137$).

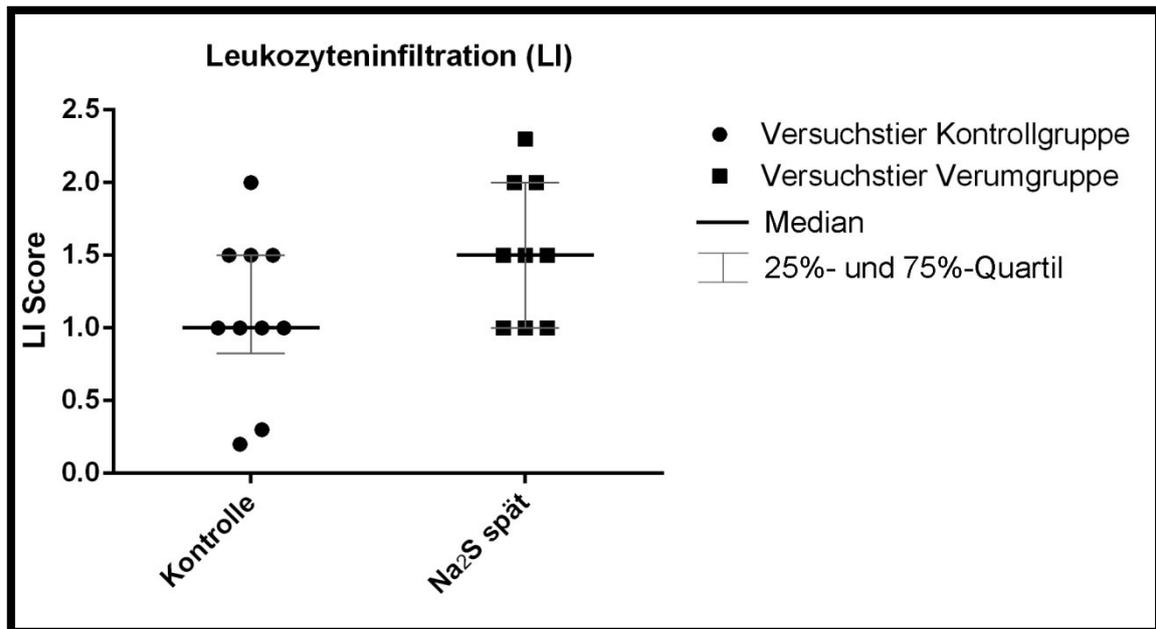


Abbildung 20: Dotplot für das Merkmal der interstitiellen Leukozyteninfiltration
Median Kontrollgruppe = 1,0 , Median Verumgruppe = 1,5

3.5.3 Zentro-lobuläre Stauung (ZLS)

In Bezug auf die untersuchte ZLS konnte histologisch kein signifikanter Unterschied der Verum- zur Kontrollgruppe gesehen werden ($p=0,428$).

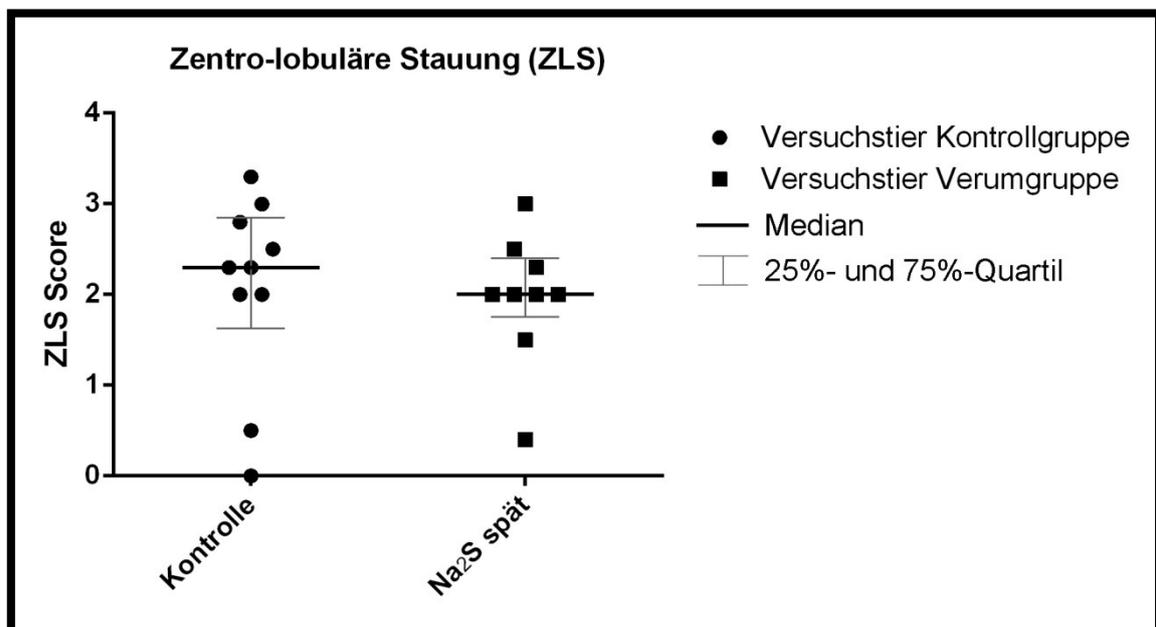


Abbildung 21: Dotplot für das Merkmal der Zentro-lobulären Stauung (ZLS)
Median Kontrollgruppe = 2,3 , Median Verumgruppe = 2,0

3.6.2. Verbreiterte Alveolarmembran

Bezüglich der beiden Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden ($p=0,98$).

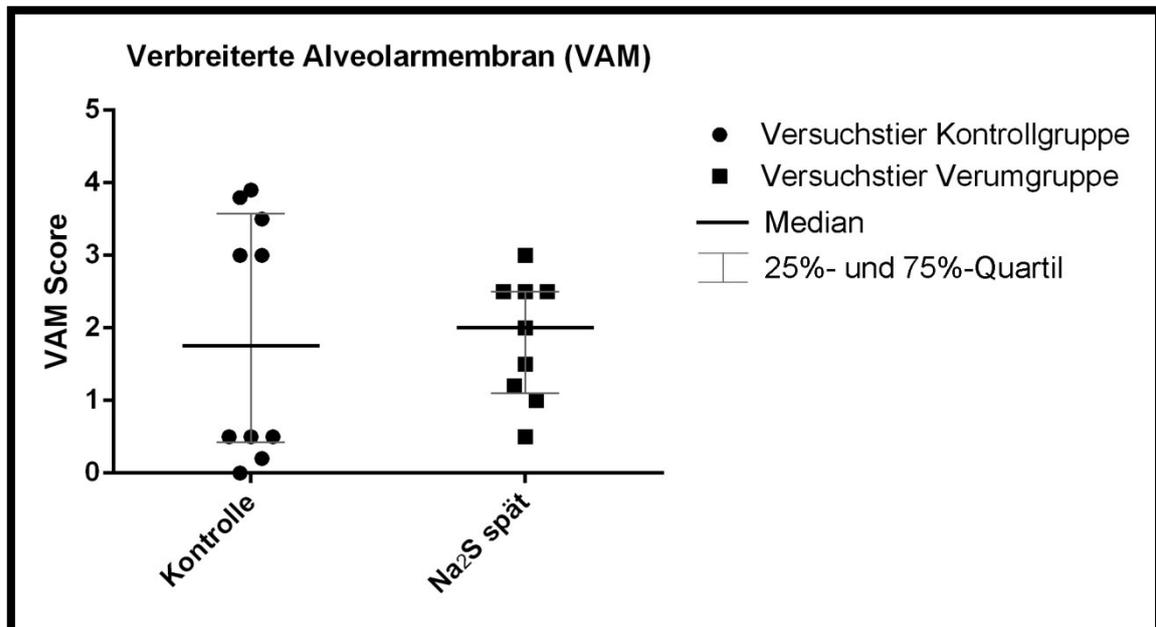


Abbildung 23: Dotplot für das Merkmal der verbreiterten Alveolarmembran
Median Kontrollgruppe = 1,75 , Median Verumgruppe = 2,0

3.6.3. Diffuse alveoläre Hämorrhagie

Bei beiden Versuchsgruppen zeigte sich im Median eine gleichsam ausgeprägte alveoläre Hämorrhagie.

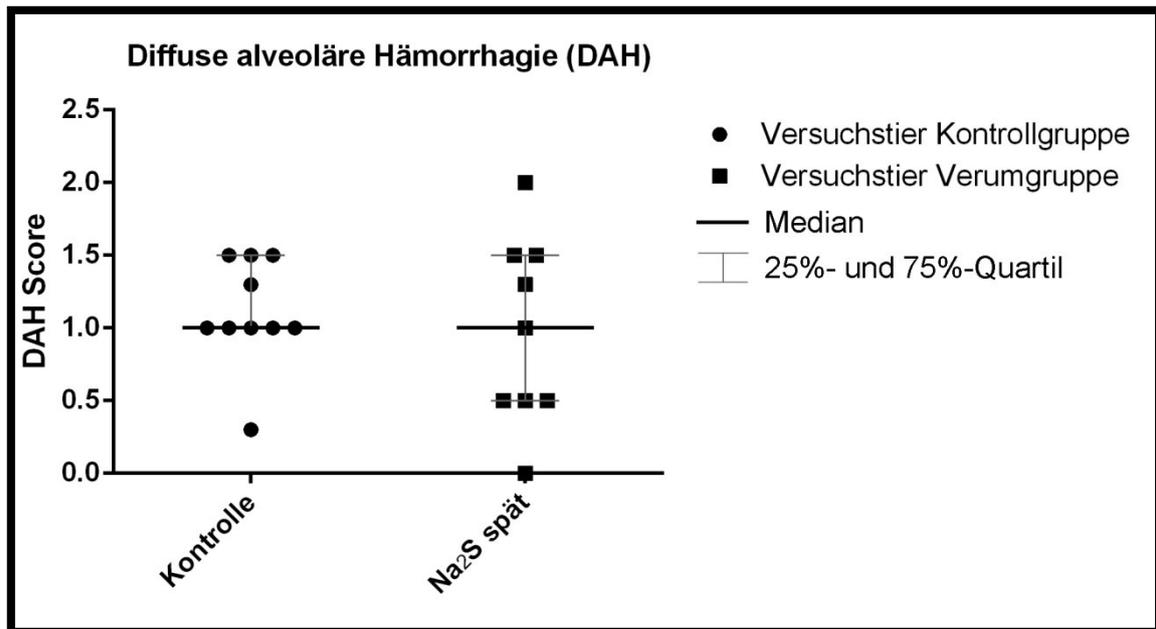


Abbildung 24: Dotplot für das Merkmal der alveolären Hämorrhagie
Median Kontrollgruppe = 1,0 , Median Verumgruppe = 1,0

3.6.4 Histopathologischer Gesamtschädigungsscore Lunge

Der pulmonale Gesamtschädigungsscore verblieb ohne signifikanten Unterschied (siehe Tabelle 15), der errechnete p-Wert hierbei 0,83.

Tabelle 15: Vergleich der histopathologischen Schädigungsscores der Lunge.
Vorne anstehend der Median, in Klammern das 25%- und 75%-Quartil, Na₂S=Dinatriumsulfid

Histopathologischer Gesamtschädigungsscore	Kontrollgruppe	Verumgruppe (Na₂S spät)
Lunge	1,0 (0,5 ; 3)	1,5 (0,5 ; 2)

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des Schwefelwasserstoffdonors Na_2S auf die Pathohistomorphologie von Leber, Niere und Lunge im hämorrhagischen Schock des deutschen Landschweines untersucht. Hierbei war die Frage, ob Na_2S histomorphologische Schäden an Leber, Nieren und Lunge attenuiert.

4.1. Das Studienmodell und -protokoll

Die Spezies Schwein lässt aufgrund seiner Homologie zum menschlichen Organismus und Metabolismus Rückschlüsse bzw. eine Übertragung auf den Menschen zu (Siehe Kapitel 1.6).

Durch die Entnahme eines am Gewicht des jeweiligen Versuchstieres berechneten Blutvolumens (siehe Kapitel 2.4.3.) und der hierunter dokumentierten Kreislaufparameter (MAD und HF) wurden die Definitionskriterien eines hämorrhagischen Schockzustandes erreicht (Siehe Kapitel 3.3.1).

In dieser Arbeit wurde Na_2S mit Beginn der Retransfusion und Reperfusion appliziert. Übertragen auf ein humanes Szenario, würde ein Patient im Rahmen der innerklinischen Notfallversorgung oder bei einem elektiven operativen Eingriff, das Medikament neben der Applikation von Blutkonserven und Infusionslösungen erhalten. Vom zeitlichen Applikationsfenster des Medikamentes ist das Versuchsprotokoll somit prinzipiell auf eine reale Versorgung eines Schwerverletzten und/oder der Anwendung bei einer Operation mit größerem Blutverlust übertragbar.

4.2. Einfluss von H_2S auf Kreislaufparameter und den Metabolismus

Wie unter Kapitel 3.3 tabellarisch dargelegt, zeigte sich zum letzten MZP eine signifikante Reduktion der HF in der Na_2S -Gruppe, diese ging mit einer signifikant erniedrigten KKT und einem signifikant geringerem systemischen VCO_2 einher. Unterstellt man eine Divergenz der Stoffwechselaktivität zwischen Verum- und Kontrollgruppe, zeigte sich diese somit „erst“ 10 Stunden nach Beendigung der Na_2S -Applikation. Die zeitliche Latenz zwischen Applikation und Effekt könnte für einen hemmenden Einfluss von H_2S auf inflammatorische Prozesse (im Rahmen

des SIRS) sprechen, wie bereits durch Ball, Wallace und Zanardo et al. dokumentiert wurde [6, 96, 106]. Weitere metabolische Daten sind jedoch notwendig, um dies konkret zu belegen.

Ob sich bei den Versuchstieren der Zustand einer „suspended animation“ einstellte, wie sie Blackstone et al [10] an Mäusen hervorrufen konnten, kann anhand der hier bearbeiteten Messdaten nicht vollständig beantwortet werden. Eher dagegen spricht, dass eine in Kombination signifikante Reduktion der KKT, der HF und des VCO_2 erst nach der o.g. Latenz zum Studienmedikament gemessen wurde. H_2S hat, wie unter Kapitel 1.5.2 geschildert, eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden [52]. Das würde in diesem Fall eher für den genannten möglichen modulatorischen Effekt von H_2S auf Signalwege der Inflammation sprechen. Weitere Parameter sind notwendig um dieser Frage nachzugehen. Diese wurden von anderer Person in dieser Studie erhoben.

Bei einer dieser Arbeit vorangegangenen Studie im Institut der APV mit Applikation von systemischem Na_2S bei aortalem Clamping wurde ebenfalls im Schweinmodell eine signifikante Reduktion der KKT dokumentiert [81]. Dieses Phänomen entspricht bis dato bekannten Studienergebnissen bei Nagern, auch wenn der Abfall der KKT (hier um $2,1^\circ C$ zum Ausgangswert) deutlich geringer ausfiel - bei Mäusen wurde eine Reduktion der KKT bis zu $8^\circ C$ beobachtet [95]. Nagetiere haben aufgrund der deutlich größeren Körperoberfläche im Verhältnis zum Gewicht und anderer Oberflächenbeschaffenheit aber auch völlig andere physiologische Voraussetzungen für die Reduktion der KKT.

Drabek et al. hingegen beobachteten keinerlei Auswirkung von intravenös verabreichtem H_2S auf die Körpertemperatur oder das Überleben von Schweinen im hämorrhagischen Schockmodell [28]. Paradoxerweise waren dort die verabreichten Mengen von H_2S um ein vielfaches höher als im Versuchsprotokoll der hier vorliegenden Arbeit. Dies legt nahe, dass sich bei zu hohen Konzentrationen von H_2S attenuierende Effekte auf den Metabolismus möglicherweise aufheben und das toxische Profil von H_2S in den Vordergrund rückt.

4.3. Überleben der Versuchstiere

Anhand der geringen Fallzahl des Teilprojektes, welches dieser Arbeit zugrunde liegt, kann keine Aussage zu einem potentiell verbesserten Überleben der Versuchstiere in der Verumgruppe gemacht werden.

4.4. Die histopathologische Auswertung

Die an jeweils gleichen Organregionen entnommen Proben wurden nach der Konservierung und Entwässerung für die Auswertung mit der H.E.-Färbung und der PAS-Reaktion eingefärbt. Die histologischen Schnittbilder wurden unter Mithilfe einer erfahrenen Pathologin ausgewertet. Die Auswertung der Schnittbilder erfolgte verblindet, erst nach Abgabe der Auswertungsdaten (Schädigungsscores) im Institut der APV erhielt der Verfasser vor dem Schreiben dieser Arbeit Zugang zu den Versuchsprotokollen. Somit waren die Voraussetzungen für eine vollständig verblindete Auswertung gegeben.

4.4.1 Auswertung der Nierenpräparate

Fast alle Nierenpräparate wiesen ischämietypische Veränderungen in unterschiedlicher Ausprägung auf, jedoch zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen, obwohl in der Na₂S-Gruppe eine Tendenz zur geringeren Schädigung (glomeruläre Tubularisation und tubuläre Nekrose) zu erkennen war. Vorversuche des Instituts der APV zeigten unter der systemischen Gabe von Na₂S bei aortalem Clamping histologisch einen verringerten glomerulären Schaden in den ausgewerteten Präparaten [81].

Manche nephropathologischen Veränderungen, wie vor allem die Apoptose, brauchen jedoch auch einen längeren Zeitrahmen zur Etablierung. Die Organentnahme fand nach Terminierung des Versuches circa 26h nach Initiierung der Hämorrhagie statt. Da der apoptotische Signalweg aber nur unter Anwesenheit von Sauerstoff erfolgen kann und er durch eine intrazellulläre Laktatazidose unterbunden wird [59], ist zumindest theoretisch die Generierung von Apoptosen erst nach Reperfusion (im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens) möglich. So blieben nach Versuchsschema maximal 21h Zeit zur

Ausbildung von histologisch sichtbaren tubulären Apoptosen. Möglicherweise hätte sich bei einem längeren Zeitprotokoll nach der Hämorrhagiephase eine weitaus höhere tubuläre Apoptoserate gezeigt [19].

4.4.2 Auswertung der Leberpräparate

In den histologischen Präparaten der Leber zeigte das ischämiebedingte Merkmal der hepatozellulären Nekrose in der H₂S-Gruppe eine geringere Tendenz, die anderen untersuchten Veränderungen waren in den beiden Gruppen nahezu gleichsam ausgeprägt. Insgesamt ergab sich kein signifikanter Unterschied der beiden Versuchsarme.

Zhang et al. zeigten an Ratten eine histo-pathologische Attenuierung der hepatozellulären Schädigung durch eine Prekonditionierung der Versuchstiere mit H₂S vor einer initiierten Ischämie/Reperfusion [107]. Selbigen zeitassoziierten Effekt von H₂S demonstrierten Kang et al. in einem Ischämie-/Reperfusions-Modell (auch an Ratten), hierbei zeigte sich im Pre-Treatment-Arm eine reduzierte Nekrose, Leukozyteninfiltration, und geringerer Blutstau in den histologischen Schnittbildern des Leberparenchyms [43].

Dies stützt die These wie vermutlich entscheidend und eng das Applikationszeitfenster für einen potentiell vorteilhaften Effekt von H₂S ist. Zur weiteren Differenzierung und ergänzend hätte in dieser Arbeit womöglich die Durchführung einer T.U.N.E.L. (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)-Färbung zur Detektion von hepatozellulären Apoptosen weitere Aufschlüsse erbringen können.

4.4.3. Auswertung der Lungenpräparate

Die Ergebnisse der histologischen Auswertung der Lungenschädigungsmerkmale erbrachten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die untersuchten Merkmale der verbreiterten Alveolarmembran durch ein interstitielles entzündliches Ödem, Ate-/Dystelektasen und eine alveoläre Hämorrhagie können sowohl durch den induzierten Schock, als auch durch ein direktes Barotrauma im Rahmen der Beatmung entstehen [30]. Eine Differenzierung dieser beiden potentiellen Ursachen war hier nur eingeschränkt bis nicht möglich.

Eine inhalative Verabreichung von H_2S als klassisches Gas, wie in zahlreichen anderen Studien durchgeführt, verursacht lokale Reizzustände des Lungenparenchyms, welche ebenso zu einem entzündlichen Ödem und damit verbreiterten Alveolarmembran führen [90, 21]. Diese lokalen Nebenwirkungen konnten durch die systemische Verabreichung des H_2S -Donors in dieser Versuchsreihe vermieden werden.

4.5. Limitationen der Studie

Bezüglich der möglichen klinischen Applikation von parenteralem Na_2S gab es bei der Studie noch Einschränkungen, da es sich beim vorliegenden Medikament um eine „Pilot“-Substanz handelte, es gab bei Beginn der Studie noch keinen idealen H_2S -Donor, der H_2S langsam in moderaten Dosen freisetzte. Möglicherweise war die Wirkung zu kurzfristig [60]. H_2S passiert als gasförmiger Transmitter die Zellmembran ohne Transportkanäle. Endogenes (körpereigenproduziertes) H_2S befindet sich unmittelbar an den Zielzellen. Es bleibt noch unklar, wieviel von dem intravenös zugeführten H_2S -Donor Na_2S über den rechten Vorhof via ZVK überhaupt als wirksames H_2S an den Zielorganen und in deren Zielzellen ankommt. Die starke Varianz der Effekte von H_2S in verschiedenen Studien liegt vermutlich noch an der fehlenden Kenntnis einer therapeutischen Dosierung und der Wahl des richtigen Applikationszeitpunktes, erschwerend hinzu kommt die sehr kurze HWZ von Na_2S [87]. Diese macht es auch extrem schwierig einen Plasmaspiegel von H_2S im Blut zu bestimmen oder diesen adäquat zu monitoren, da es hierfür noch keine verlässlichen und einheitlichen Nachweismethoden gibt [62]. Die vorgelegte Arbeit beinhaltet also noch Grundlagenforschung.

Bei der kleineren Stichprobenanzahl der Tiere, welche dieser Arbeit zugrund liegt, war keine Normalverteilung gegeben, so dass sich Probleme bei der statistischen Auswertung ergeben können, da aufgrund der nicht parametrischen Daten der Median angegeben werden muss. Bei kleinen Fallgruppen kann es so zu zufälligen Effekten oder Ausreißern kommen, die Ergebnisse potentiell verzerren können. Konkret war dies in der statistischen Auswertung der Niere beim Merkmal der tubulären Nekrose (TN) der Fall, bei welcher in der Verumgruppe bei einer

Fallzahl von $n=9$ in 5 Präparaten keine TN auftrat, wodurch der Median den Wert 0 erhielt. Die in der Studie gewonnenen Erkenntnisse sollten durch größere Stichproben weiter verfolgt werden, um verbindlichere Ergebnisse zu erhalten (Dies geschah auch im Anschluss an diese Arbeit, die Versuchsreihe Na_2S im Schockmodell des Schweines wurde im Institut weiter fortgeführt).

Aufgrund des Studiendesigns kann keine Aussage über ein potentielles „outcome“ getroffen werden, da der Endzeitpunkt des Versuches mit dem Tod des jeweiligen Versuchstieres einherging und ein Überleben des Versuchstieres nicht vorgesehen war.

4.6. Schlussfolgerung

In der Behandlungsgruppe mit Verabreichung von Na_2S ab Beginn der Retransfusion/Reperfusion zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der histopathologischen Veränderungen in den untersuchten Organen.

In einer Parallelarbeit der dieser Arbeit zugrundeliegenden Na_2S -Studie konnte im simultanen Behandlungsarm (Gabe von H_2S mit Beginn des hämorrhagischen Schocks) in den histologischen Schnittbildern der Niere bei den Merkmalen der tubulären Nekrose und Apoptose eine signifikant niedrigere Schädigung festgestellt werden. Zudem zeigte sich dort in der histologischen Auswertung der Lunge ein signifikant geringer Alveolarschaden [67].

Der Applikationszeitraum in Bezug auf die Hämorrhagie scheint also eine zentrale Rolle für einen möglichen vorteilhaften Effekt von H_2S zu spielen. Hierfür wären weitere Studien mit höherer Fallzahl empfehlenswert.

Desweiteren müssten bezüglich einer „therapeutischen“ Dosierung noch weitere Forschungen betrieben und adäquate Messmethoden zur Bestimmung der Serumkonzentration von H_2S entwickelt werden [62].

Um Vorstellungen über das potentielle „outcome“ der Tiere zu erhalten, sollten in der Folge Versuche mit einem Versuchsprotokoll angeschlossen werden, die ein Überleben der Versuchstiere vorsehen.

Zuguterletzt wurden die durchgeführten Versuche an organgesunden Tieren durchgeführt. Nach weiteren Fortschritten im Großtiermodell müssten dann auch

Untersuchungen bei älteren/organinsuffizienten Versuchstieren folgen, um der vitalen „Spannbreite“ potentieller Patienten gerecht zu werden.

5. Zusammenfassung

Traumapatienten, welche eine volumenrelevante Blutung mit konsekutiver Hypotension (<90mmHg) erleiden, haben auch in Zeiten und Ländern moderner technisierter Medizin eine hohe Letalität. Unabhängig von der Ursache sterben etwa 50% dieser Patienten, entweder direkt im hämorrhagischen Schock und der damit verbunden Gewebhypoxie oder im klinischen Verlauf am Multiorganversagen, getriggert durch den Ischämie-/Reperfusionsschaden, das systemic inflammatory response syndrom und Infektionen.

Durch Veröffentlichung einer aufsehenerregenden Arbeit von M. Roth und E. Blackstone im Fachmagazin Science im Jahre 2005, bei der Mäuse durch inhalierten Schwefelwasserstoff in einen reversiblen winterschlafähnlichen Zustand versetzt werden konnten, gelangte das zuvor nur als toxisch eingestufte und bekannte Gas H₂S in den Focus der Notfallmedizin. Die Möglichkeit direkten Einfluss auf den Zellmetabolismus zu nehmen und den Sauerstoff-/Energiebedarf eines Organismus dadurch herabzusetzen, könnte für einen Patienten unter massivem Blutverlust lebensrettend sein.

Nach zahlreichen vielversprechenden experimentellen Studien mit dem Einsatz von H₂S am Kleintiermodell sind Grosstiermodelle mit größerer Homologie zum Menschen notwendig, um einen potentiellen Einsatz am Menschen weiter zu eruieren.

In einem hämorrhagischen Schockmodell am Deutschen Landschwein wurde der Einfluss von H₂S im Rahmen der Retransfusion/Reperfusion auf die Histologie von Leber, Niere und Lunge untersucht. Nach Anästhesie und chirurgischer Präparation wurde den zuvor in eine Verum- (n=10) und Kontrollgruppe (n=14) randomisierten Versuchstieren gewichtsadaptiert 40% des Blutvolumens entzogen und dieser hämorrhagische Zustand 4 Stunden aufrechterhalten. Im Rahmen der Reperfusion des entnommenen Blutes und additiver intravenöser Volumengabe wurde Na₂S intravenös als Bolus (0,2mg/kgKG) und dann kontinuierlich (1mg/kgKG/h) über einen Zeitraum von 12 Stunden infundiert. Die Tiere der

Kontrollgruppe erhielten analog NaCl 0,9%. Nach einer angeschlossenen 10-stündigen Ruhephase mit entsprechender Flüssigkeitssubstitution wurden die Versuchstiere mit Kaliumchlorid getötet und Niere, Lunge und Leber zur Organfixierung entnommen. Histologisch wurden Schnittpräparate aus jeweils gleichen Organpartien mit H.E.- und PAS-Färbung angefertigt und verblindet ausgewertet.

Die untersuchten hämorrhagie-assoziierten histopathologischen Veränderungen von Leber, Niere und Lunge zeigten zwischen den beiden Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Im Behandlungsarm waren Herzfrequenz, Körperkerntemperatur und die systemische Kohlenstoffdioxidproduktion nach Gabe von Na₂S signifikant niedriger als im Kontrollarm. Es verstarben in der Kontrollgruppe 4 Versuchstiere vor Ablauf des Versuchsprotokolls, während in der Verumgruppe nur 1 Tier verstarb.

Intravenöses Na₂S als „Post-Treatment“ attenuierte die untersuchten histologischen Schäden an Lunge, Niere und Leber in diesem Teilprojekt der Studie nicht.

Weitere Studien mit größeren Fallzahlen sollten erwogen werden um die Effekte von Schwefelwasserstoff im hämorrhagischen Schock und die Frage zu klären, ob ein Einsatz von Dinatriumsulfid in der Humanmedizin der Zukunft denkbar ist.

6. Literaturverzeichnis

1. *Abramochkin DV, Moiseenko LS, Kuzmin VS: The effect of hydrogen sulfide on electrical activity of rat atrial myocardium. Bull Exp Biol Med 147: 683–686 (2009)*
2. *Adams HA, Baumann G, Gänsslen A, Janssens U, Knoefel W, Koch T, Marx G, Müller-Werdan U, Pape HC, Prange W, Roesner D, Standl T, Teske W, Werner G, Zander R: Definition of shock types. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther., 36 Suppl 2: 140-143 (2001)*
3. *Adams, HA: Zur Diagnostik und Therapie der Schockformen, Empfehlungen der interdisziplinären Arbeitsgruppe Schock der DIVI Teil II. Anästhesiologie und Intensivmedizin: 111-124 (2005)*
4. *Almond GW: Research applications using pigs. Vet.Clin.North Am.Food Anim.Pract. 12: 707-716 (1996)*
5. *Arrich J, Holzer M, Herkner H, Mullner M: Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. Cochrane Database Syst Rev 9:CD004128. doi:10.1002/14651858.CD004128.pub3, PMID: 22972067 [PubMed-indexed for MEDLINE] (2012)*
6. *Ball CJ, Reiffel AJ, Chintalapani S, Kim M, Spector JA, King MR: Hydrogen sulfide reduces neutrophil recruitment in hind-limb ischemia-reperfusion injury in an L-selectin and ADAM-17-dependent manner. Plast Reconstr Surg 131: 487–497 (2013)*
7. *Barka T, Ornstein L: Some Observations of the Reaction of Schiff Reagent with Aldehydes: J Histochem Cytochem. 8, 208-213 (1960):*
8. *Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou S, Moore PK: Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. J Pharmacol Exp Ther 316: 670–678 (2006)*
9. *Baum S: The PAS Reaction for Staining Cell Walls. In: CSH protocols. Band 2008, S. pdb.prot4956 (2008)*

10. Blackstone E, Morrison M, Roth MB: *H₂S induces a suspended animation-like state in mice. Science* 308: 518 (2005)
11. Blackstone E, Roth MB: *Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. Shock* 27: 370-372 (2007)
12. Böcker W, Denk H, Heitz P, Moch H: *Pathologie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 4. Auflage, S. 58-60 (2008)*
13. Böcker W, Denk H, Heitz P, Moch H: *Pathologie. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 4. Auflage, S. 578 (2008)*
14. Bonegio R, Lieberthal W: *Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. Curr Opin Nephrol Hypertens* 11: 301–308 (2002)
15. Bos EM, Leuvenink HGD, Snijder PM, Koosterhuis NJ, Hillebrands J-L, Leemans JC, Florquin S, Goor H: *Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury. J Am Soc Nephrol* 20:1901–1905 (2009)
16. Butnariu M: *The Oxygen Paradox. J Pharmacogenom Pharmacoproteomics* 3:e104. doi:10.4172/2153-0645.1000e104 (2012)
17. Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R: *Hydrogen sulphide induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. Am Physiol Heart Circ Physiol* 287: 2316-2323 (2004)
18. Cobb JP, Buchman TG, Karl IE, Hotchkiss RS: *Molecular biology of multiple organ dysfunction syndrome: injury, adaptation, and apoptosis. Surg Infect (Larchmt)* 1:207-213; discussion 214-205 (2000)
19. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC: *Major DNA Fragmentation is a Late Event in Apoptosis. Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 45: 923-934 (1997)
20. Conger JD, Robinette JB, Schrier RW: *Smooth muscle calcium and endothelium-derived relaxing factor in the abnormal vascular responses of acute renal failure. J. Clin. Invest.* 82: 532-537 (1988)
21. Couch L, Martin L, Rankin N: *Near death episode after exposure to toxic gases from liquid manure. N Z Med J* 118: U1414 (2005)
22. Dapson RW: *Macromolecular changes caused by fixation and antigen retrieval, J. of. Biotechnic and Histochemistry*, 82: 133-140 (2007)

23. Deitch EA: *Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. Shock* 9: 1-11 (1998)
24. Derwall M, Westerkamp M, Löwer C, Fries M: *Hydrogen sulfide does not increase resuscitability in a porcine model of prolonged cardiac arrest. Shock* 34: 190-195 (2010)
25. Dimitrios AT: *Ursachen und Pathogenese der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC), Schweiz Med Forum*;4: 1109-1112 (2004)
26. Dombkowski RA, Russell MJ, Olson KR: *Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286: 678-685 (2004)
27. Dong Z, Patel Y, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA: *Development of porous defects in plasma membranes of ATP-depleted Madin-Darby canine kidney cells and its inhibition by glycine. Lab Invest* 78: 657-668 (1998)
28. Drabek T, Kochanek PM, Stezoski J, Wu X, Bayr H, Morhard RC, Stezoski SW, Tisherman SA: *Intravenous hydrogen sulfide does not induce hypothermia or improve survival from hemorrhagic shock in pigs. Shock* 35: 67-73 (2010)
29. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C: *Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 15560–15565 (2007)
30. Frank JA, Matthay MA: *Science review: Mechanisms of ventilator-induced injury. Crit Care* 7: 233-241 (2003)
31. Franklin GA, Boaz PW, Spain DA, Lukan JK, Carrillo EH, Richardson JD: *Prehospital hypotension as a valid indicator of trauma team activation. Trauma* 48: 1034-1037 (2000)
32. Fries M, Stoppe C, Brucken D, Rossaint R, Kuhlen R: *Influence of mild therapeutic hypothermia on the inflammatory response after successful resuscitation from cardiac arrest. J Crit Care* 24: 453-457 (2009)
33. Fukudome EY, Alam HB: *Hypothermia in multisystem trauma. Crit Care Med* 37: 265-272 (2009)

34. Furne J, Saeed A, Levitt MD: *Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1479-R1485 (2008)
35. Godwin A: *Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review: International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences. Bd. 1, 24-34* (2011)
36. Grigore AM, Murray CF, Ramakrishna H, Djaiani G: *A core review of temperature regimens and neuroprotection during cardiopulmonary bypass: does rewarming rate matter? Anesth Analg* 109: 1741-1751 (2009)
37. Hannon JP, Bossone CA, Wade CE: *Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. Lab Anim Sci* 40: 293-298 (1990)
38. Haouzi P, Notet V, Chenuel B, Chalon B, Sponne I, Ogier V, Bihain B: *H₂S induced hypometabolism in mice is missing in sedated sheep. Respir Physiol Neurobiol* 160: 109-115 (2008)
39. Heckbert SR, Vedder NB, Hoffman W, Winn RK, Hudson LD, Jurkovich GJ, Copass MK, Harlan JM, Rice CL, Maier RV: *Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients. J Trauma* 45: 545-549 (1998)
40. Huang Y, Li F, Tong W, Zhang A, He Y, Fu T, Liu B: *Hydrogen sulfide, a gaseous transmitter, stimulates proliferation of interstitial cells of cajal via phosphorylation of AKT protein kinase. Tohoku Journal of Experimental Medicine* 221: 125-132 (2010)
41. Isaac J, Tögel FE, Westenfelder C: *Extent of glomerular tubularization is an indicator of the severity of experimental acute kidney injury in mice. Nephron Exp Nephrol* 105: 33-40 (2007)
42. Just A: *Mechanisms of renal blood flow autoregulation: dynamics and contributions. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: 1-17 (2007)
43. Kang K, Zhao M, Jiang H, Tan G, Pan S, Sun X: *Role of Hydrogen Sulfide in Hepatic Ischemia/Reperfusion-induced Injury in Rats. Liver Transplantation* 15: 1306-1314 (2009)

44. *Kauvar DS, Lefering R, Wade CE J: Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. Trauma 60: 3-11 (2006)*
45. *Kimura Y, Goto Y, Kimura H: Hydrogen sulfide increases glutathione production and suppresses oxidative stress in mitochondria. Antioxid Redox Signal 12: 1-13 (2010)*
46. *Kimura Y, Kimura H: Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. FASEB J 18: 1165–1167 (2004)*
47. *Kiss L, Deitch EA, Szabo C: Hydrogen sulfide decreases adenosine triphosphate levels in aortic rings and leads to vasorelaxation via metabolic inhibition. Life Sci 83: 589-594 (2008)*
48. *Kobryn CE, Mandel LJ: Decreased protein phosphorylation induced by anoxia in proximal renal tubules. Am J Physiol Cell Physiol 267: 1073-1079 (1994)*
49. *Koenitzer JR: Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O₂-dependent manner. Am J Physiol Heart Circ Physiol 292: 1953-1960 (2007)*
50. *Kubiak BD, Albert SP, Gatto LA, Snyder KP, Maier KG, Vieau CJ, Roy S, Nieman GF: Peritoneal negative pressure therapy prevents multiple organ injury in a chronic porcine sepsis and ischemia/reperfusion model. Shock 34: 525-534 (2010)*
51. *Lameire N: The Pathophysiology of Acute Renal Failure. Crit Care Clin 21: 197-210 (2005)*
52. *Barr LA, Calvert JW: Discoveries of Hydrogen Sulfide as a Novel Cardiovascular Therapeutic, Circulation Journal Vol.78: 2111 – 2118 (2014)*
53. *Legrum W: Riechstoffe zwischen Gestank und Duft, Vieweg + Teubner Verlag: 61-62 (2011)*
54. *Leslie M: Nothing rotten about hydrogen sulfide's medical promise Science 320: 1155-1157 (2008)*
55. *Levitt MD, Abdel-Rehim MS, Furne J: Free and acid-labile hydrogen sulfide concentrations in mouse tissues: anomalously high free hydrogen sulfide in aortic tissue. Antioxid Redox Signal 15: 373-378 (2011)*

56. Li J, Zhang G, Cai S, Redington AN: Effect of inhaled hydrogen sulfide on metabolic responses in anesthetized, paralyzed, and mechanically ventilated piglets. *Pediatr Crit Care Med* 9: 110-112 (2008)
57. Li L, Bhatia M, Zhu YZ, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore PK: Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J* 19: 1196-1198 (2005)
58. Li Y, Xiang M, Yuan Y, Xiao G, Zhang J, Jiang Y, Vodovotz Y, Billiar TR, Wilson MA, Fan J: Hemorrhagic shock augments lung endothelial cell activation: role of temporal alterations of TLR4 and TLR2; *American journal of physiology, regulatory, integrative and comparative physiology* 297: 1670-1678 (2009)
59. Linkermann A, De Zen F, Weinberg J, Kunzendorf U, Krautwald S: Programmed necrosis in acute kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 27: 3412-3419 (2012)
60. Lowicka E, Beltowski J: Hydrogen sulfide (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep* 59: 4-24 (2007)
61. Matthay M, Zimmerman G: Acute Lung Injury and the Acute Respiratory Distress Syndrome - Four Decades of Inquiry into Pathogenesis and Rational Management; *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33: 319-327 (2005)
62. McCook O, Radermacher P, Volani C, Asfar P, Ignatius A, Kemmler J, Möller P, Szabó C, Whiteman M, Wood ME, Wang R, Georgieff M, Wachter U: H₂S during circulatory shock: some unresolved questions. *Nitric Oxide* 41: 48-61 (2014)
63. Mikami Y, Shibuya N, Kimura Y, Nagahara N, Yamada M, Kimura H: Hydrogensulfide protects the retina from light-induced degeneration by the modulation of Calcium influx, *J Biol Chem* 286: 39379–39386 (2011)
64. Mikami Y, Shibuya N, Ogasawara Y, Kimura H: Hydrogensulfide is produced by cystathionine μ -lyase at the steady-state low intracellular Calcium concentrations. *BiochemBiophysRes Commun* 431: 131-135 (2013)

65. Minamishima S, Bougaki M, Sips PY, Yu JD, Minamishima YA, Elrod JW, Lefer DJ, Bloch KD, Ichinose F: Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. *Circulation* 120: 888-896 (2009)
66. Morrison ML, Blackwood JE, Lockett SL, Iwata A, Winn RK, Roth MB: Surviving blood loss using hydrogen sulfide. *J Trauma* 65: 183-188 (2008)
67. Müller S: Einfluss einer H₂S-induzierten "suspended animation" auf histomorphologische Parameter der Niere, Leber und Lunge am hämorrhagischen Schockmodell des Schweins. *Med. Dissertation, Universität Ulm* (2014)
68. Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, Szabo C, Sellke FW: The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury, *European Journal of Cardiothoracic Surgery* 33: 906-913 (2008)
69. Nielsen TW: Preparation of Cross-Linked Cellular Extracts with Formaldehyde, *Cold Spring Harb Protoc.* 2014: pdb.prot080879. doi: 10.1101 (2014)
70. Oberbauer R, Rohmoser M, Regele H, Muhlbacher F, Mayer G: Apoptosis of tubular epithelial cells in donor kidney biopsies predicts early renal allograft function. *J Am Soc Nephrol* 10: 2006-2013 (1999)
71. Osipov RM, Robich MP, Feng J, Liu Y, Clements RT, Glazer HP, Sodha NR, Szabo C, Bianchi C, Sellke FW: Effect of hydrogen sulfide in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion: Comparison of different administration regimens and characterization of the cellular mechanisms of protection. *J Cardiovasc Pharmacol* 54: 287-297 (2009)
72. Peden M, McGee K, Sharma G: *The Injury Chart Book: a Graphical Overview of the Global Burden of Injuries.* Geneva: World Health Organization: 6-74 (2002)
73. Polderman KH: Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med* 37: 186-202 (2009)

74. Prasad A, Stone GW, Holmes DR, Gersh B: Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the "dark side" of reperfusion. *Circulation* 120: 2105-2112 (2009)
75. Racusen LC: The morphologic basis of acute renal failure. In Molitoris BA & Finn WF (eds) *Acute Renal Failure - A Companion to Brenner and Rector's The Kidney*. Philadelphia: Saunders: 1-12 (2001)
76. Ramulu S, Kale AD, Hallikerimath S, Kotrashetti V: Comparing modified papanicolaou stain with ayoub-shklar and haematoxylin-eosin stain for demonstration of keratin in paraffin embedded tissue sections. *Journal of oral and maxillofacial pathology*: 23-30 (2013)
77. Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH: Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology Band 32*: 109-134 (1992)
78. Rubin R, Reisner H: *Essentials of Rubin's Pathology: Sixth Edition* Chapter 14, S. 419 (2014)
79. Rubin R SD, Rubin E, McDonald JM, Michalopoulos GK, Trojanowski JQ, Ward PA *Rubin's Pathology, Clinicopathologic Foundations of Medicine 5*: S.252 (2007)
80. Simon F, Giudici R, Duy CN, Schelzig H, Oter 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)
81. Simon F, Scheuerle A, Gröger M, Stahl B, Wachter U, Vogt J, Speit G, Hauser B, Möller P, Calzia E, Szabó C, Schelzig H, Georgieff M, Radermacher P, Wagner F: Effects of intravenous sulfide during porcine aortic occlusion-induced kidney ischemia/reperfusion injury. *Shock* 35: 156-163 (2011)
82. Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiemeermann C: Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock* 31: 267-274 (2009)

83. Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, Szabo C, Stahl GL, Sellke FW: Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg* 138: 977-984 (2009)
84. Start RD: Reassessment of the rate of fixative diffusion, *J. Clin. Pathol.* 45: 1120-1121 (1992)
85. Sun YG, Cao YX, Wang WW, Ma SF, Yao T, Zhu YC: Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 79: 632-641 (2008)
86. Sutton TA: Alteration of microvascular permeability in acute kidney Injury, *Microvasc Res* 77: 4-7 (2009)
87. Szabo C: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Drug Discovery* 6: 917-935 (2007)
88. Szabó, Veres G, Radovits T, Gero D, Módis K, Miesel-Gröschel C, Horkay F, Karck M: Cardioprotective effects of hydrogen sulfide: *Nitric Oxide* 25: 201-210 (2011)
89. Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV: Acute renal failure. *New England Journal of Medicine* 334: 1448-1460 (1996)
90. Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, Gatti R, Gazzieri D, Lissi N, Zagli G, Creminon C, Geppetti P, Harrison S: Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *Br J Pharmacol* 145: 1123-1131 (2005)
91. Tripatara P, Patel NSA, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, Benetti E, Stewart KN, Brown PAJ, Yaqoob MM, Fantozzi R, Thiernemann C: Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine γ -lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. *Lab Invest* 88: 1038-1048 (2008)
92. van der Laarse WJ, van Noort P, Diegenbach PC: Calibration of quantitative histochemical methods: estimation of glycogen content of muscle fibers using the PAS reaction. *Biotechnic & histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission. Band 67, Nr. 5, S. 303-308* (1992)

93. Vitvitsky V, Kabil O, Banerjee R: High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations. *Antioxid Red Signal* 17: 22-31 (2012)
94. Vohr HW: *Toxikologie: Band 2 - Toxikologie der Stoffe*, Wiley-VCH Verlag: S. 24-26 (2010)
95. Volpato GP, Searles R, Yu B, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Ichinose F, Zapol WM: Inhaled Hydrogen Sulfide - A Rapidly Reversible Inhibitor of Cardiac and Metabolic Function in the Mouse. *Anesthesiology* 108: 659-668 (2008)
96. Wallace JL, Ferraz JG, Muscara MN: Hydrogen sulfide: an endogenous mediator of resolution of inflammation and injury. *Antioxid Redox Signal* 17: 58-67 (2012)
97. Wang R: Hydrogen sulfide: a new EDRF. *Kidney International* 76, Nr. 7: 700-704 (2009)
98. Wang R: Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *Faseb J* 16: 1792-1798 (2002)
99. Wang R: Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev* 92: 791-896 (2012)
100. Wangsiripaisan A, Gengaro PE, Edelstein CL, Schrier RW: Role of polymeric Tamm-Horsfall protein in cast formation: oligosaccharide and tubular fluid ions. *Kidney Int.* 59: 932-940 (2001)
101. Wheeler A, Bernard G: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review, *Lancet* 369: 1553-1564 (2007)
102. Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Hheung NS, Halliwell B, Moore PK: The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? *J Neurochem* 90: 765-768 (2004)
103. Whiteman M, Moore PK: Hydrogen sulfide and the vasculature: a novel vasculoprotective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? *J Cell Mol Med* 13: 488-507 (2009)
104. Yellon DM, Hausenloy DJ: Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med* 357: 1121-1135 (2007)

105. Yong QC, Pan TT, Hu LF, Bian JS: Negative regulation of beta-adrenergic function by hydrogen sulphide in the rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 44: 701-710 (2008)
106. Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL: Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J* 20: 2118-2120 (2006)
107. Zhang Q, Fu H, Zhang H, Xu F, Zou Z, Liu M, Wang Q, Miao M, Shi X: Hydrogen sulfide preconditioning protects rat liver against ischemia/reperfusion injury by activating Akt-GSK-3 β signaling and inhibiting mitochondrial permeability transition. *PLoS One* 8: e74422. doi: 10.1371/journal.pone.0074422 (2013)
108. Zhao W, Zhang J, Lu Y, and Wang R: The vasorelaxant effects of H₂S as a novel endogenous gaseous KATP channel opener. *EMBO J* 20: 6008-6016 (2001)
109. Zhu JXG, Kalbfleisch M, Yang YX, Bihari R, Lobb I, Davison M, Mok A, Cepinskas G, Lawendy A-R, Sener A: Detrimental effects of prolonged warm renal ischaemia-reperfusion injury are abrogated by supplemental hydrogen sulphide: an analysis using real-time intravital microscopy and polymerase chain reaction. *BJU* 110:E1218-E1227 (2012)
110. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR: The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92: 57-70 (2001)

7. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

9. Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Dr. h.c. Peter Radermacher für die Annahme als Doktorand, Vertrauen und Unterstützung beim Schreiben dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts der APV der früheren Parkstraße und mittlerweile Helmholzstraße für die stets offene Tür, Ratschläge, Unterstützung und Anleitung bedanken. Insbesondere seien hier Andrea Seifritz, Oscar McCook und Dr. med. Sebastian Hafner genannt.

Auch danke ich Carmen Veneruso am chirurgischen Zentrum der Uniklinik Ulm für die Anleitung und Hilfe bei der histologischen Aufarbeitung der Gewebeschnitte.

Besonderer Dank gebührt Fr. Dr. med. Angelika Scheuerle, ohne deren histopathologische Erfahrung und Unterstützung die fundierte Auswertung der Schnittpräparate in diesem Umfang nicht möglich gewesen wäre.

Dank gilt auch PD Dr. med. Bürkle (ehemals „Pathologisches Institut der Klinik am Eichert/Göppingen“) für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und des mikroskopischen Instrumentariums zur Auswertung der histologischen Präparate.