

Aus der Klinik für Anästhesiologie
Universitätsklinikum Ulm
Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie
und Verfahrensentwicklung
Sektionsleiter: Prof. Dr. med. Peter Radermacher

**Reduktion von Ischämie-/Reperfusionsschäden
nach thorakalem Aortenclamping beim Schwein
durch Gabe von Parecoxib**

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

Sandra Simone Schunter

Nürtingen

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

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

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Hubert Schelzig

Tag der Promotion: 20. Juni 2008

**Für meine Mutter Hilde
und für Roland**

Abkürzungsverzeichnis	iii
<u>1</u> <u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Ätiologie und Therapie des abdominellen Aortenaneurysmas 1
1.2	Pathophysiologie des thorakalen Aortenclampings und Verhalten der minderdurchbluteten Organe 3
1.2.1	Gesteigerte COX-Aktivität 3
1.2.2	Zelluläre Mechanismen 4
1.2.3	Schädigung des Rückenmarks durch eine Ischämie-/Reperfusionsequenz 4
1.3	COX-2 Hemmer Parecoxib 5
1.4	Aussagekraft von p21/p27 Expression und TUNEL-Test 7
1.4.1	P21 und p27 7
1.4.2	TUNEL-Test 8
1.5	Fragestellung 8
<u>2</u> <u>MATERIAL UND METHODEN</u>	9
2.1	Tiermodell Deutsches Hausschwein 9
2.2	Operative Vorbereitung der Versuchstiere 9
2.2.1	Narkose 9
2.2.2	Operation 11
2.3	Versuchsplan 13
2.4	Entnahme und Aufbereitung der Gewebeproben 15
2.5	Durchführung der Immunhistochemie p21/p27 15
2.6	Durchführung des TUNEL-Tests 17
2.7	Auswertung der Proben 19
2.7.1	Auswertung der immunhistochemischen Präparate 19
2.7.2	Auswertung des TUNEL-Tests 20
2.7.3	Statistische Auswertung der Proben 20
2.8	Weitere im Rahmen der Studie bestimmte Parameter 21
2.8.1	Systemische und regionale Hämodynamik 21
2.8.2	Klinische Chemie 21
2.8.3	Prostaglandine 21
2.8.4	Statistische Analyse der Daten 22

<u>3</u>	<u>ERGEBNISSE</u>	23
3.1	Immunhistochemie	23
3.1.1	Immunhistochemische Färbung des Rückenmarks	23
3.1.2	Immunhistochemische Färbung der Niere	27
3.1.3	Immunhistochemische Färbung des Dünndarms	31
3.1.4	Immunhistochemische Färbung der Leber	35
3.1.5	Immunhistochemische Färbung des Skelettmuskels	39
3.2	TUNEL-Test	43
3.2.1	TUNEL-Test Rückenmark	43
3.2.2	TUNEL-Test Niere	45
3.2.3	TUNEL-Test Dünndarm	47
3.3	Systemische und regionale hämodynamische Parameter	49
3.4	Klinische Chemie	51
3.5	Prostaglandine	52
<u>4</u>	<u>DISKUSSION</u>	53
4.1	Effekt der Gabe von Parecoxib auf die Expression der Cellular senescence-Marker p21 und p27	53
4.1.1	Theoretischer Hintergrund	53
4.1.2	Auswirkungen auf die untersuchten Organe	55
4.2	Effekt der Gabe von Parecoxib auf die Anzahl der Apoptosen	61
4.2.1	Theoretischer Hintergrund	61
4.2.2	Auswirkungen auf die untersuchten Organe	62
4.3	Effekt der Gabe von Parecoxib auf hämodynamische Parameter, Parameter der klinischen Chemie und Prostaglandine	64
4.4	Stellungnahme zur Fragestellung der Studie	65
4.4.1	Kann durch die Gabe des COX-2-Hemmers Parecoxib ein auftretender Ischämie-/ Reperfusionsschaden in den Organen des Splanchnikusgebietes, der Niere, der unteren Extremität und des Rückenmarks begrenzt werden?	65
4.4.2	Zeigt Parecoxib deutliche zytoprotektive Effekte?	66
4.4.3	Kann die Substanz eventuell sogar für eine klinische Anwendung empfohlen werden?	67
<u>5</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	69
<u>6</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAA	Abdominelles Aortenaneurysma
ADAM	Aneurysm detection and management (Studiename)
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
ANOVA	Analysis of variance
AOBF	Aortaler Blutfluss
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CDKI	Cyclin dependent kinase inhibitors
CO	Cardiac output
COX-1	Zyklooxygenase-1
COX-2	Zyklooxygenase-2
DAB	Diaminobenzidin
dMAP	Distaler mittlerer arterieller Druck
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxy-Uridin-Triphosphat
EIA	Enzyme-linked assay
EVAR	Endovascular aneurysm repair
F	French (Maßeinheit)
FiO ₂	Inspiratorische O ₂ -Konzentration
G ₁	Gap 1 Phase des Zellzyklus
HES	Hydroxylethylstärke
HGF	Hepatocyte growth factor
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
I/R	Ischämie/Reperfusion
KHK	Koronare Herzkrankheit
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MPAP	Mittlerer pulmonalarterieller Druck
MZP	Messzeitpunkt
n	Anzahl der Versuchstiere
NaCl	Natriumchlorid

NFkappaB	Nuclear factor kappa B
NYHA	New York Heart Association
p	P-Wert
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (Molekulargewicht 21 kDa)
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (Molekulargewicht 27 kDa)
p53	Tumorsuppressorgen
PAR	Parecoxib
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
pCO ₂	Partialdruck Kohlendioxid
PCWP	Pulmonary capillary wedge pressure
PEEP	Positive end-expiratory pressure
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGE _{2alpha}	Prostaglandin E _{2alpha}
PGG ₂	Prostaglandin G ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PLA	Placebo
pMAP	Proximaler mittlerer arterieller Druck
RBF	Renal blood flow
rHuEPO	Rekombinantes humanes Erythropoetin
RM	Rückenmark
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TBX B ₂	Thromboxan B ₂
TDT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TLBF	Total liver blood flow
TNF _{alpha}	Tumornekrosefaktor alpha
TUNEL	TdT-mediated nick-end labelling technique
TxA ₂	Thromboxan A ₂
U-Test	Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
ZVD	Zentraler Venendruck
6-keto PG	6-keto-Prostaglandin

1 EINLEITUNG

1.1 ÄTIOLOGIE UND THERAPIE DES ABDOMINELLEN AORTENANEURYSMAS

Als häufigste Ursachen für die Ausbildung eines abdominellen Aortenaneurysmas (AAA) bzw. einer Aortendissektion gelten die in den Industrieländern weiterhin zunehmenden Erkrankungen Hypertonie und Arteriosklerose. Das AAA bzw. die Aortendissektion und deren operative Therapie führen nicht selten zu einer Ischämie der abhängigen Organe, so z.B. des Rückenmarks, der Nieren, der Organe des Splanchnikusgebietes und der unteren Extremität. Bei einer Untersuchung (ADAM-Studie) an 52749 Senioren zwischen 50 und 79 Jahren wurden bei 1,2 % der Personen Aneurysmata mit einem Durchmesser von 4 cm und mehr gefunden [55].

Im Falle eines symptomatischen Aneurysmas ist im Allgemeinen eine Behandlungsindikation gegeben. Bei asymptomatischen Aneurysmata der Aorta ist dagegen das Verhältnis zwischen Behandlungsrisiko und spontanem Rupturrisiko unbedingt abzuwägen. Das Risiko einer Spontanruptur hängt in erster Linie vom maximalen Aneurysmadurchmesser ab. Die U.K. Small Aneurysma Trial hat gezeigt, dass 76 % aller rupturierten Aortenaneurysmata einen maximalen Durchmesser von 5 cm und mehr aufwiesen. Bei einem maximalen Durchmesser von 3,5 bis 5 cm fand sich ein jährliches Rupturrisiko von 1 %. Bei einem Beobachtungszeitraum von 3 Jahren lag das jährliche Rupturrisiko hier bei 2,2 % [10]. In anderen Untersuchungen fanden sich Rupturrisiken von bis zu 20,5 % innerhalb von 5 Jahren [94,107]. Es zeigte sich, dass große Aneurysmata mit einem Durchmesser von mehr als 7 cm zwei- bis dreimal häufiger rupturieren als kleinere Aneurysmata [78].

Zur Prävention einer Ruptur und anderer Komplikationen wird im Allgemeinen eine operative Versorgung des Aortenaneurysmas angestrebt. Diese kann in einigen Fällen, in Abhängigkeit von der Lokalisation des Aneurysmas und von der Dringlichkeit des Eingriffs, über eine Drahtprothese (Stent), die über die

Leistenarterie in die Aorta eingebracht wird [92], geschehen. In den meisten Fällen ist aber eine operative Resektion des Aneurysmas bzw. der Dissektion notwendig. Hierzu muss während des Eingriffs die Aorta unterhalb und oberhalb des Aneurysmas abgeklemmt und somit der Blutfluss durch das betroffene Gefäßsegment vorübergehend unterbrochen werden. Dann kann der aneurysmatragende Gefäßanteil durch eine Prothese ersetzt werden. Nach Einnähen in die Gefäßwand wird der Blutstrom wieder freigegeben [77].

Beschränkt man sich auf die Publikationen der vergangenen Jahre, so finden sich perioperative Sterblichkeitsraten bei der elektiven offenen chirurgischen Behandlung des AAA von 1,3 – 8,2 % [5,7,36,81]. Bei einer akuten Dissektion der thorakalen Aorta wird eine Letalität von bis zu 50% angegeben [7].

Fast 30% aller Patienten, die im thorakoabdominellen Übergang der Aorta gefäßchirurgisch therapiert werden müssen, leiden im Anschluss an die Operation an den Folgen der unumgänglichen Ischämie der distalen Körperhälfte. Die häufigsten perioperativen Komplikationen nach elektiver offener chirurgischer Therapie des AAA sind Herz-Kreislauf-Insuffizienz und respiratorische Insuffizienz. Hierbei sind die Patienten insbesondere durch die erheblichen Veränderungen der hämodynamischen Verhältnisse im Rahmen der Operation gefährdet: ein Abklemmen der Aorta führt zu einem drastischen Blutdruckanstieg proximal der Clampingstelle. Ohne eine sofortige medikamentöse Blutdrucksenkung kann die Auswurfleistung des Herzens schnell um bis zu 40% abnehmen. Eine fortdauernde Überbelastung des Herzens kann dann zu einer Überdehnung der linken Herzkammer mit einer Mangel durchblutung der innersten Herzmuskelschichten, einer Mitralklappeninsuffizienz und schließlich zum Lungenödem führen [114]. Die Angaben zur Häufigkeit kardialer und pulmonaler Komplikationen schwanken in der Literatur stark. In einer Metaanalyse von Blankensteijn et al. wurden für kardiale Komplikationen Häufigkeiten von 4,9-13,6% und für pulmonale Komplikationen 3,8-13,5% angegeben. Das größte Risiko für die postoperative Frühletalität stellen kardiale und pulmonale Komplikationen sowie Nachblutungen, Kolon- und Extremitätenischämien dar [7].

1.2 PATHOPHYSIOLOGIE DES THORAKALEN AORTENCLAMPINGS UND VERHALTEN DER MINDERDURCHBLUTETEN ORGANE

Das thorakale Aortenclamping gilt als typisches Beispiel einer Ischämie-/Reperfusionsequenz, bei der es zur Schädigung des minderdurchbluteten Gewebes kommen kann.

Beim Abklemmen der thorakalen Aorta kommt es zu drastischen hämodynamischen Veränderungen; es entsteht eine proximale Hypertension, während die Durchblutung distal der Clampingstelle unterbrochen ist. Prinzipiell lässt sich die proximale Hypertension durch einen Vasodilatator behandeln [72,19]; für die Therapie der Ischämie der distalen Körperhälfte gibt es bisher keine Möglichkeiten und die entstehenden Schäden sind zudem nicht allein durch eine Reperfusion reversibel. Die Ischämie-/Reperfusionsequenz kann über die Aktivierung der Synthese von Prostaglandinen aus der Vorstufe Arachidonsäure bis hin zu einer systemischen Entzündungsreaktion führen [69,89].

1.2.1 GESTEIGERTE COX-AKTIVITÄT

Das intrazellulär lokalisierte Enzym Zyklooxygenase (COX) katalysiert den ersten Schritt der Prostaglandinsynthese, d.h. die Synthese von proinflammatorischen Prostanoiden (PGG_2 und PGH_2) aus der Arachidonsäure. Dieses Enzym gibt es in zwei verschiedenen Isoformen: COX-1 und COX-2 [101,106].

COX-1 wird in fast allen Geweben konstitutiv exprimiert und reguliert, wie auch die COX-2, physiologische Prozesse, z.B. Zytoprotektion und Hämostase [30,49,50,51]. Die Expression von COX-2 wird bei pathologischen Zuständen, wie z.B. bei Krampfanfällen, Ischämie-/Reperfusionsschäden [62] und bei degenerativen Erkrankungen [59,105], hochreguliert.

Die induzierbare COX-2, die von Zellen exprimiert wird, die an akuten und chronischen Entzündungsreaktionen beteiligt sind, ist die Isoform, die hauptsächlich für die Produktion von Prostanoiden ($\text{PGE}_{2\alpha}$, Thromboxan A_2 und PGE_2) [6,11,106] verantwortlich ist.

Erst kürzlich bekannt gewordene Ergebnisse deuten an, dass die COX zur I/R-induzierten Zellschädigung auch durch die Produktion von TNF_{α} beiträgt. Darüber hinaus ist die Verschiebung des Gleichgewichts hin zu den

vasokonstriktorisches Eikosanoid wie dem Thromboxan, das ebenfalls durch die COX produziert wird, mitverantwortlich für den I/R-induzierten Leberschaden [40,116].

1.2.2 ZELLULÄRE MECHANISMEN

Durch die Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr kommt es zu einem zellulären ATP-Mangel, da die mitochondriale oxidative Phosphorylierung bereits nach 3-4 Minuten zum Erliegen kommt. Durch den Mangel an ATP kann die Zelle die Calciumhomöostase, die physiologischerweise durch die ATP-abhängigen Membranpumpen gewährleistet ist, nicht mehr aufrecht erhalten; es kommt zur zellulären Acidose und dadurch zu einem "Zell-Ödem". Durch die gestörte Calcium-Homöostase der Zellen kommt es zu einer Aktivierung zytoplasmatischer Enzyme (vor allem Phospholipasen und Proteasen) und der Leukozyten. In der nachfolgenden Reperfusionphase kann es dadurch zu einer anhaltenden Zellschädigung kommen [68].

Beim thorakalen Crossclamping der Aorta sind insbesondere das Rückenmark sowie die Nieren und der Darm durch die Unterbrechung der Durchblutung gefährdet. Die Unterbrechung der Blutzufuhr kann dabei bis hin zum Verlust der Organfunktion führen. Hierbei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Ischämiezeit und Wahrscheinlichkeit des Verlusts der Organfunktion. Bei Abklemmzeiten über 30 Minuten nimmt beispielsweise die Rate der Querschnittslähmungen exponentiell zu [32,88,112].

1.2.3 SCHÄDIGUNG DES RÜCKENMARKS DURCH EINE ISCHÄMIE-/REPERFUSIONSSEQUENZ

Die Schädigung des Rückenmarks ist eine relativ häufige und in den Konsequenzen schwerwiegende Komplikation der thorakoabdominellen Aortenrekonstruktion. Die Rate des Auftretens einer Parese oder Paraplegie reicht von 0,2 % bei elektiver Reparatur eines abdominellen Aortenaneurysmas bis hin zu 40% nach Dissektion oder Ruptur mit Beteiligung der thorakalen oder thorakoabdominellen Aorta [26]. Als prädiktive Faktoren für das Auftreten eines neurologischen Defizits der unteren Extremität, bedingt durch eine transiente oder

auch permanente Ischämie, gelten unter anderem das Ausmaß des Aneurysmas, die Unterscheidung in Ruptur und Dissektion, Rauchen, postoperative Hypotension und Alter [102,112]. Deshalb wurden bereits viele Techniken untersucht, um eine Ischämie des Rückenmarks zu vermeiden, so z.B. Perfusion der distalen Aorta, Liquordrainage, pharmakologische oder metabolische Beeinflussung, Identifikation der Blutversorgung, Ableiten von somatosensorisch oder motorisch evozierten Potentialen und Hypothermie [26].

Strategien zur Minimierung des Risikos umfassen zurzeit:

1. Minimierung von Dauer und Ausmaß der Ischämie
2. Wiederherstellung der Durchblutung des RM durch Reimplantation von Segmentarterien
3. Protektive Maßnahmen, die das neuronale Überleben nach transientser Rückenmarksischämie unterstützen sollen, z.B. regionale Hypothermie.

1.3 COX-2 HEMMER PARECOXIB

In klinischen und experimentellen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass bei einer Ischämie-/Reperfusionsequenz unter anderem Prostaglandine wie z.B. Prostaglandin E_1 , Prostazyklin, Thromboxan A_2 in unterschiedlicher Konzentration freigesetzt werden [70,85,89].

Aus der Transplantationsmedizin ist zudem bekannt, dass Mediatoren aus dem Arachidonsäurestoffwechsel eine unspezifische Entzündungsreaktion hervorrufen können und über ihre vasoaktive Komponente den Ischämie-/Reperfusionsschaden verstärken können. So hat eine Hemmung der Cyclooxygenase vor Reperfusion nach Nierentransplantation eine verbesserte Früh- und Spätfunktion der Transplantate zur Folge [1]. Daraus entstand die Überlegung, dass selektive COX-2-Hemmer einen therapeutischen Effekt bei I/R-Schäden haben könnten. Bei nichtselektiven COX-Hemmern muss man als Nebeneffekt die Hemmung der Thrombozytenaggregation in Kauf nehmen. Außerdem wird auch die Synthese des als zytoprotektiv bekannten Prostaglandin E_1 gehemmt [29].

Die Ergebnisse aus verschiedenen Studien, wie z.B. reduzierter renaler Thromboxan A_2 (TxA_2)-Exkretion nach Ischämie in der Transplantationsmedizin

[49] und Schutz vor I/R-Schädigung durch Hemmung von TxA₂ [101], unterstützen weiter die Idee eines positiven Effekts von COX-2-Inhibitoren.

Andere Studien bestätigen die wichtige Rolle, die das Enzym COX-2 beim ischämischen Zelltod von Neuronen spielt. Bei Ausschaltung von COX-2 auf genetischer Ebene hat sich gezeigt, dass das Infarktvolumen bei Verschluss der Arteria cerebri media deutlich reduziert ist [38]. Die COX-2 wird in Neuronen an der Infarktgrenze [14,15,37] und auch im Nagetier-Modell bei Schlaganfällen [61] exprimiert. Durch Gabe eines COX-2-Hemmers soll dabei das Infarktvolumen reduziert werden. Diese Tatsache könnte auf einen neuen Mechanismus der Neuroprotektion durch einen dominanten PGE₂-Rezeptor-Subtyp im Gehirn zurückzuführen sein [61]. Während klinische Untersuchungen eine Verbindung zwischen der Langzeitanwendung des COX-2-Hemmers Rofecoxib und einem erhöhten Risiko für atherothrombotische Ereignisse festgestellt haben, konnte dieses erhöhte Risiko nicht für andere COX-2-Hemmer, wie zum Beispiel Parecoxib, einer injizierbaren Vorstufe von Valdecoxib, nachgewiesen werden [43,103,113].

Systemische und renale Effekte von intraoperativ appliziertem Parecoxib wurden bereits im Hausschwein-Modell nach Gabe des Medikaments in die A. renalis während eines juxta-renalen Crossclampings untersucht. Es konnte in dieser Studie keine kardiotoxische Wirkung nachgewiesen werden. Parecoxib zeigte zudem eine renoprotektive Wirkung, die sich in einer signifikant geringeren Abnahme der Kreatininclearance bei den mit Parecoxib behandelten Tieren äußerte [33]. Um einen potentiell schützenden Effekt vor I/R-Schäden beim aortalen Crossclamping zu untersuchen, wurde in dieser Studie der hochselektive COX-2-Hemmer Parecoxib 45 Minuten vor dem Clamping der Aorta in einem klinisch relevanten Grosstiermodell angewandt. Die Einzeldosisempfehlung von 40 mg/h basiert auf tierexperimentellen Daten und Dosisfindungsstudien aus dem humanen Bereich.

1.4 AUSSAGEKRAFT VON P21/P27 EXPRESSION UND TUNEL-TEST

1.4.1 P21 UND P27

P21 und p27 zählen zu den "cyclin dependent kinase inhibitors" (CDKI). Diese können in den Zellzyklus negativ eingreifen, ihn in der G1-Phase blockieren und damit die weitere Entwicklung bis hin zur Mitose hemmen [47]. Die CDKI-Gene gelten als objektiver Marker eines DNS-Schadens, aber auch als Marker für adäquate Reparatur. Eukaryote Zellen haben eine begrenzte Proliferationskapazität und können sich daher nicht unendlich oft teilen. Sie unterliegen einem irreversiblen Stopp ihrer Zellteilungsfähigkeit und gehen in einen veränderten Zellstatus, der als Seneszenz bezeichnet wird, über [13,28]. Seneszenz wird als Tumor-suppressiv angesehen; eine Umgehung der Seneszenz kann potentiell zu einer onkogenen Transformation führen [2].

Eine gesteigerte Expression von p21 lässt sich beispielsweise bei Tieren höheren Alters finden [20], beim Cisplatin-induzierten akuten Nierenversagen [66] und auch bei Cyclosporin-Toxizität [47]. Ebenso findet sich eine Überexpression von p27 bei vorgealterten Zellen [2] und als Antwort auf verschiedene Stressoren, unter anderem Ischämie [79,80]. Eine Telomerlängenverkürzung stellt einen Triggereffekt für die weitere Aktivierung der CDKI-Gene dar [118]. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Ischämie-/ Reperfusionsequenz zu einer signifikanten Überexpression von p21 und p27 in allen renalen Gewebeanteilen kam. Eine I/R-Sequenz ist ein erheblicher Stressor, der zu einer DNS-Zerstörung und zu vorzeitiger Alterung des Nierengewebes führt. Eine Hochregulierung von p21 und p27 könnte somit als protektiver Mechanismus gegen eine Replikation solcher I/R geschädigter Zellen betrachtet werden [93].

1.4.2 TUNEL-TEST

Der TUNEL-Test (TdT-mediated nick end-labelling technique) dient zur Detektion von Apoptosen. Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein so genannter "programmierter Zelltod", das heißt, sie findet auch physiologischerweise statt, z.B. um durch Ischämie/Reperfusion geschädigte Zellen zu eliminieren. Um die Apoptosen besser identifizieren zu können, macht man sich nicht nur die Morphologie des apoptotischen Nukleus, sondern auch die bei der Apoptose zwangsläufig durch die Aktivierung von Endonukleasen entstehenden DNS-Fragmente zunutze [100]. Hierzu soll in dieser Studie der TUNEL-Test zum Einsatz kommen. Durch eine Ischämie mit anschließender Reperfusion kann es zu einer vermehrten Anzahl an Apoptosen im betroffenen Gewebe kommen. Oxidativer Stress durch eine Ischämie-/Reperfusionssequenz führt über vermehrte Lipidperoxidation und einen Abfall des Potentials an der mitochondrialen Membran zur Caspasenaktivierung und damit zur Apoptose [115]. Es soll untersucht werden, ob durch Parecoxib die Anzahl an Apoptosen vermindert werden kann.

1.5 FRAGESTELLUNG

Von dieser Studie werden Antworten auf die folgenden Fragen erwartet:

- 1.) Kann durch die Gabe des COX-2-Hemmers Parecoxib ein auftretender Ischämie- und Reperfusionsschaden in den Organen des Splanchnikusgebietes, der Niere, der unteren Extremität und des Rückenmarks begrenzt werden?
- 2.) Zeigt Parecoxib deutliche zytoprotektive Effekte?
- 3.) Kann Parecoxib evtl. sogar für eine klinische Anwendung empfohlen werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 TIERMODELL DEUTSCHES HAUSSCHWEIN

Mit der durchgeführten Studie soll der Einfluss des COX-2 Hemmers Parecoxib auf Ischämie-/Reperfusionsschäden, die im Rahmen eines 30 minütigen thorakalen Crossclampings der Aorta entstehen können, untersucht werden. Hierbei sollen Veränderungen der Hämodynamik, der Konzentration einzelner Prostaglandine und Veränderungen bei der Expression der Zellalterungsmarker p21 und p27 sowie der Anzahl der Apoptosen (TUNEL-Test) ermittelt werden.

Die Versuche wurden am Tiermodell "Deutsches Hausschwein" durchgeführt. An einem Tiermodell kleinerer Spezies (Mäuse, Ratten) wäre keine ausreichende Probengewinnung hinsichtlich des Blutvolumens möglich gewesen. Außerdem wäre die chirurgische Präparation der Gefäße aufgrund der Größenverhältnisse deutlich erschwert gewesen. Bei den infrage kommenden Spezies war daher das Schwein vorzuziehen, das außerdem eine hohe Homologie zum Menschen besitzt bzgl. der Lage und Konfiguration der abdominalen und thorakalen Organe sowie der physiologischen und pathophysiologischen Prozesse [21].

Der Versuchsplan wurde in Zusammenarbeit mit der Abteilung Biometrie und Medizinische Dokumentation der Universität Ulm erstellt (Gutachten vom 14. Mai 2003). Die Genehmigung der Studie erfolgte durch den Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm und das Regierungspräsidium in Tübingen. Es wurden 18 Hausschweine beider Geschlechter (deutsche Landrasse) im Alter von 3 Monaten mit einem medianen Körpergewicht von 50 kg (41-60 kg) verwendet.

2.2 OPERATIVE VORBEREITUNG DER VERSUCHSTIERE

2.2.1 NARKOSE

Nach 24-stündiger Nahrungskarenz (Wasser war für die Tiere ad libitum verfügbar) erhielten die Versuchstiere eine Stunde vor der Narkoseeinleitung eine intramuskuläre Prämedikation mit 5 mg/kg Azaperon (Stresnil®; Janssen, Neuss,

Deutschland) und 0.05 mg/kg Atropin (Atropinsulfat®; Braun, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurden die Tiere schlafend in einer Transportkiste in den Tier-OP transportiert. Im OP wurden die Tiere auf dem Rücken gelagert, die O₂-Sättigung pulsoxymetrisch über einen "Fingerclip" am Schwanz überwacht. Unter Sauerstoffgabe wurde die Narkose mit 8-10 mg/kg Pentobarbital-Natrium (Narkodorm®, Alvetra, Neumünster, Deutschland) und 2 mg/kg Ketamin (Ketavet®, PharmaCOa & Upjohn, Erlangen, Deutschland) über eine Ohrvenenkanüle eingeleitet. Nach orotrachealer Intubation erfolgte die Muskelrelaxation mit 10 mg Alcuronium (Alloferin®, Roche, Frankreich). Die Beatmung wurde volumenkontrolliert mit einem Luft-Sauerstoff-Gemisch (FiO₂ 0.35, PEEP 4 cm H₂O) mit einer Atemfrequenz von 10-12/min und einem Atemzugvolumen von 15 ml/kg durchgeführt (Servo 900 B, Siemens Elema, Lund, Schweden). Es wurde eine Normoventilation mit einem endtidalen Kohlendioxid-Partialdruck (pCO₂) von 35-40 mm Hg und eine transkutan gemessene arterielle Hämoglobin-Sauerstoff-Sättigung von mehr als 90 % angestrebt (transkutane Pulsoxymetrie, Hewlett Packard 66S™ Monitor, Hewlett Packard, San Antonio, USA). Zur Dekompression wurde eine Magensonde eingelegt. Zur Muskelrelaxation wurden 10-15 mg/h Alcuronium (Alloferin®, Roche, Frankreich) kontinuierlich infundiert. Die Narkose wurde durch eine Dauerinfusion von Pentobarbital (6-12 mg/kg/h) und Buprenorphin (0,9-1,5 mg als Bolus nach Wirkung) (®; Janssen, Neuss, Deutschland) aufrechterhalten. Das EKG und die Rektaltemperatur wurden zusätzlich überwacht. Die Körpertemperatur des Tieres wurde nach Bedarf mit einer Heizmatte oder durch externe Kühlung konstant bei 37.5°-38.5° Celsius (Normalwert) gehalten. Zur Flüssigkeitssubstitution wurde kontinuierlich Ringer-Lösung (10 ml/kg/h) und zur Kreislaufstabilisierung HES 6% (Serumwerk Bernburg, Bernburg, Deutschland) infundiert. Zur Thromboseprophylaxe wurden kontinuierlich 1000 IU/h Natrium-Heparin zugeführt. Der Blutglukosespiegel wurde regelmäßig kontrolliert und bei Bedarf (Glukose < 60 mg/dl) mit Glukose/Xylit 20% (PharmaCOa & Upjohn, Erlangen, Deutschland) auf normoglykämischen Werten gehalten. Dieses Vorgehen bei der Narkose der Tiere hatte sich bereits in mehreren vorangegangenen Studien bewährt [41,74,82,108].

2.2.2 OPERATION

Die weitere Vorbereitung umfasste das Abwaschen des Tieres, Rasieren der Haare, Desinfektion und das sterile Abdecken des Operationsgebietes. Zunächst erfolgte unter sterilen Bedingungen die Freilegung der rechten Arteria carotis communis und Kanülierung mit einem 4 F-Katheter zur kontinuierlichen Überwachung des arteriellen Mitteldrucks der proximalen Körperpartie (pMAP) und zur Gewinnung von Blutproben. Nach Präparation der Vena jugularis interna und Vena submandibularis rechts erfolgte das Einlegen von zwei 8,5 F-Gefäßschleusen. Die kontinuierliche Messung des zentralvenösen Drucks (ZVD), des mittleren Pulmonalarterien drucks (MPAP) sowie die intermittierende Messung des pulmonalkapillären Verschlussdrucks und des Herzzeitvolumens (Thermodilution) wurde durch Einschwenken eines Pulmonalarterienkatheters (7 F-Thermodilutionskatheter Modell 93A 754™, Fa. Baxter Healthcare, Irvine CA, USA) über die distale der beiden 8,5 F-Schleusen ermöglicht. Ein Angiografiekatheter (7 F-Multipurpose® A-1, Cordis, Roden, Niederlande) wurde unter sonografischer Kontrolle über die proximale Gefäßschleuse zur hepatischvenösen Blutentnahme in eine Lebervene vorgeschoben. Die Präparation der Venae jugularis interna links und submandibularis links mit Einlage eines 3-lumigen zentralvenösen Katheters in die Vena cava superior erfolgte zur Applikation von Medikamenten und Infusionsflüssigkeiten. Anschließend wurden die rechten und linken Femoralgefäße freipräpariert. In die rechte Arteria femoralis wurde eine 8,5 F-Gefäßschleuse eingelegt. Hierüber wurde ein 4 F-Katheter zur Blutabnahme distal der Clampingstelle und kontinuierlichen Messung des arteriellen Mitteldrucks der distalen Körperhälfte (dMAP) eingebracht. In die linke Femoralarterie wurde ein fiberoptischer Katheter eingebracht, um mit der Farbverdünnungsmethode das Herzzeitvolumen (cardiac output) zu bestimmen. In die Vena femoralis rechts wurde eine 8,5 F-Gefäßschleuse eingelegt. Hierüber erfolgte das Einbringen eines Katheters (7 F-Multipurpose® A-1, Cordis, Roden, Niederlande), welcher nach Laparotomie zur Messung der Nierenstoffwechselfparameter unter manueller Führung bis in die rechte Vena renalis vorgeschoben wurde. Anschließend erfolgte die Freilegung der linken Vena femoralis zur Einlage einer 8,5 F-Gefäßschleuse. Hierüber wurde ein 2-lumiger zentralvenöser Katheter (7 F-Multipurpose® A-1, Cordis, Roden,

Niederlande) zur Blutentnahme eingebracht, welcher bis in den Bereich des Konfluens der Venae iliacae communis vorgeschoben wurde. Darauf folgten die Durchführung der links-anterioren Thorakotomie und die Präparation der deszendierenden thorakalen Aorta in Atelektase der Lunge. Die Aorta descendens wurde unmittelbar distal des Abgangs der Arteria subclavia sinistra mit einem Kunststoffbändchen angezügelt. Ein Tourniquet wurde eingebracht und transkutan über ein Plastikröhrchen aus dem Brustkorb ausgeleitet. Hierdurch wurde eine temporäre Okklusion der thorakalen Aorta (Clamping) sowie die Wiederfreigabe des Blutstromes (Declamping) nach Wundverschluss ermöglicht. Zur Ableitung von entstehenden Flüssigkeitsansammlungen im Pleuraspalt und zur Prävention eines Spannungspneumothorax wurde noch eine 28F-Thoraxdrainage eingelegt und die Wunde zweischichtig verschlossen. Es folgte eine mediane Laparotomie und die Präparation der Arteria hepatica communis distal des Abgangs der Arteria gastroduodenalis, der Vena portae, der Arteria renalis rechts sowie der infrarenalen abdominellen Aorta. Um diese vier Gefäße wurde jeweils eine Ultraschallflusssonde (T206 Transonic Systems™, Transonic Systems, Ithaca, USA) zur Messung der Durchblutungsrate eingesetzt. Eine vorsichtige Präparation war notwendig, um eine eventuell auftretende Dissektion der Gefäße möglichst gering zu halten. Die Vena portae wurde punktiert und ein 4 F-Katheter (CS-16402; Arrow™, Reading, USA) zur Blutentnahme eingeführt. Eine kurze Ileumschlinge wurde über die mediane Laparotomie als doppeläufiges Ileostoma ausgeleitet und die Laparotomiewunde dreischichtig verschlossen. Das Ileostoma wurde zum Schutz der Schleimhaut vor Flüssigkeits- und Temperaturverlust mit einem Stomabeutel (Stomadres plus®, Bristol-Myers, Baar, Schweiz) versorgt. Anschließend wurde ein fiberoptischer Katheter zur kontinuierlichen intramukosalen pCO₂-Messung (Paratrend 7®, Biomedical Sensors, Highwycombe, United Kingdom) eingebracht. Unter sonografischer Kontrolle erfolgte die perkutane Anlage eines Cystofix-Katheters (Cystofix Suprapubic Catheter FG15™, Medicalproducts, Australien) zur Urinsammlung.

2.3 VERSUCHSPLAN

Im Anschluss an die zweistündige Ruhephase nach der Operation erfolgte zunächst die Erhebung der Basisdaten. Diese entsprechen dem Messzeitpunkt 1 (MZP 1). Danach wurde durch Anziehen des thorakalen Torniquets der Verschluss der thorakalen Aorta unmittelbar distal des Abgangs der linken Arteria subclavia für eine Dauer von 30 Minuten bewirkt. Während des Clampings wurden die Tiere gemäß ihrer Gruppeneinteilung medikamentös behandelt. Die Clampingdauer wurde ausgewählt, um große, sich über mehrere Segmente erstreckende Infarkte des Rückenmarks zu vermeiden, wie sie bei Schweinen bei 45-60 minütigem Abklemmen beobachtet wurden [64].

Tabelle 1: Versuchsplan

n	Anzahl der Versuchstiere	NaCl	Natriumchlorid
Gruppe		Behandlung	
Kontrollgruppe (Placebo, PLA) n=10		Unbehandelte Kontrollgruppe erhält während der Operation identische Volumina von 0,9% NaCl-Lösung intravenös infundiert.	
Versuchsgruppe (Parecoxib, PAR) n=8		Versuchsgruppe erhält während der 45 Minuten vor der Ischämiephase 40 mg Parecoxib in 0,9% NaCl-Lösung kontinuierlich intravenös infundiert	

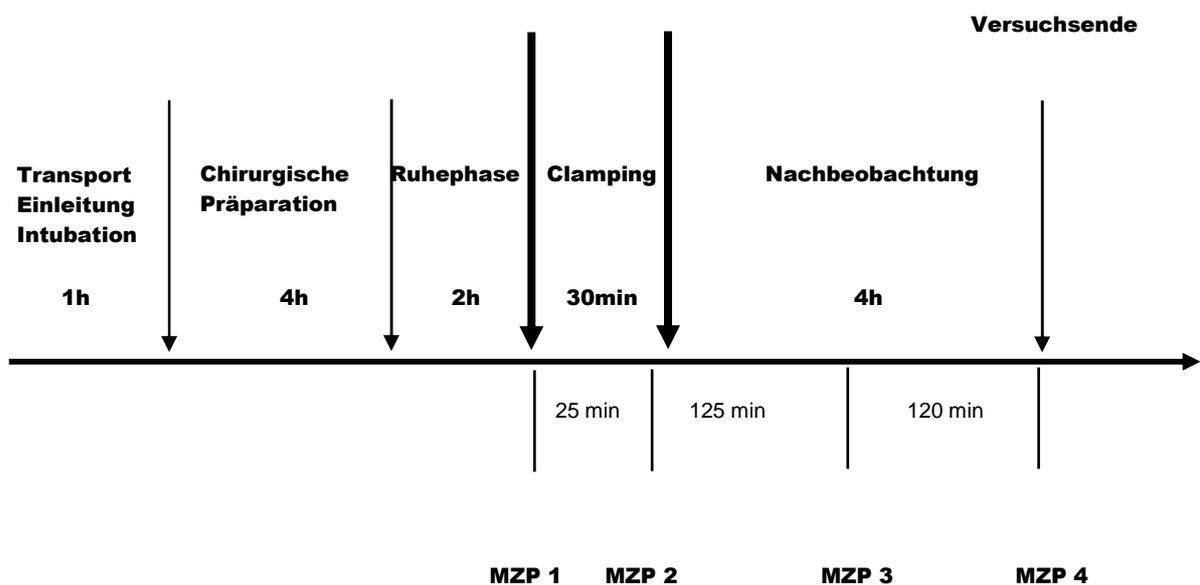
Während des Abklemmens wurde eine Kombination aus Nitroglyzerin (1,7 mg/min; Nitrolingual® infuse, Pohl-Boskamp GmbH & Co, Hohenlockstedt, Deutschland), Esmolol (16,5 mg/min, Brevibloc®, Baxter Healthcare, Unterschleißheim, Deutschland) und Adenosin-5'-Triphosphat (2 - 10 mg/min, Striadyne®, Wyeth-Lederle, Paris, Frankreich) infundiert, um den pMAP zwischen 80 und 120% des Ausgangswertes zu halten. Die Auswahl dieser Medikamente beruht auf den Erfahrungen aus einer vorangegangenen Studie der Abteilung. Um eine kontinuierliche Flüssigkeitszufuhr sicherzustellen, erhielten alle Tiere 10 ml/kg/h Ringer-Lösung (Ringerlösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) vom Beginn der operativen Vorbereitung bis zum Ende des Experiments. Zusätzlich

wurden während der Dauer des Clampings 1500 ml Hydroxylethylstärke infundiert, um die Vorlast vor dem Declamping zu optimieren.

Fünf Minuten vor Freigabe des Aortenlumens wurden die funktionellen und metabolischen Daten von Lunge, Herzkreislaufsystem, Niere, Hepatosplanchnikusgebiet und unterer Extremität erhoben. Diese Daten entsprechen dem Messzeitpunkt 2 (MZP 2). Daraufhin wurde das Aortenlumen langsam über 1 Minute wieder freigegeben. Während der ersten 30 Minuten Reperfusion wurden nochmals 1500 ml Hydroxylethylstärke infundiert um eine Hypotension zu vermeiden. Es schloss sich eine Nachbeobachtungsphase von 4 Stunden an. Weitere Messwerte wurden, soweit nicht anders beschrieben, 2 und 4 Stunden nach Freigabe der Aorta erhoben (MZP 3 und 4).

Nach Abschluss der Messungen und Entnahme der Gewebe zur immunhistochemischen Aufarbeitung wurden die tief narkotisierten Versuchstiere mit einer zusätzlichen Dosis Pentobarbital-Natrium und einer Kaliumchlorid-Injektion (20 mval) getötet.

Zur nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchung wurden Biopsien des Rückenmarks aus dem lumbalen Bereich, der Leber, der Niere, des Skelettmuskels (aus der unteren Extremität) und des Dünndarms entnommen.



MZP Messzeitpunkt

Abbildung 1: Schema des Versuchsablaufes

2.4 ENTNAHME UND AUFBEREITUNG DER GEWEBEPROBEN

Am Versuchsende wurden aus folgenden Organen Biopsien zur histologischen Aufarbeitung entnommen: Rückenmark (lumbal), Leber, Dünndarm, Nieren und Skelettmuskel (untere Extremität). Eine histologische Untersuchung der entnommenen Gewebeproben (RM, Niere, Leber, Darm, Skelettmuskel) mit Bestimmung der p21/p27 Genexpression mittels spezifischer Antikörper, sowie ein TUNEL-Test zur Messung der Apoptoserate in Niere, RM und Darm wurden durchgeführt. Diese Methoden sind in der Abteilung/Universität etabliert [93].

Die Gewebeproben werden zunächst in 3,8%igem neutral gepuffertem Formalin für ca. 72 Stunden fixiert (Verhältnis Gewebe zu Formalin 1:20), anschließend in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und danach mit Xylol wieder vom Alkohol befreit. Die Präparate wurden schließlich in Paraffin eingebettet und bei einer Schichtdicke von 2 µm auf Objektträger aufgebracht (SuperFrost® Plus; Menzel-Gläser®; Art. nr. J1800AMNZ; Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland), fixiert und bei 56°C über Nacht im Brutschrank getrocknet. Nun wird die Expression folgender Gene immunhistologisch in den Gewebeproben evaluiert: p21 (p21 (C-19) sc-397 rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) sowie p27 (p27 (C-19) sc-528 rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA).

Bei den Gewebeproben aus Rückenmark, Niere und Dünndarm wurde zusätzlich ein TUNEL-Test zur Darstellung apoptotischer Zellkerne durchgeführt.

2.5 DURCHFÜHRUNG DER IMMUNHISTOCHEMIE P21/P27

Die Proben wurden im Xylolbad (Xylol Isomerengemisch; Prod.nr. 16446; Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) in 3 Zyklen zu je 10 Minuten vom Paraffin befreit und anschließend in absteigend konzentrierter Alkoholreihe (je 3 Minuten in 100%, 100%, 70%, 50% Isopropanol) rehydriert (2-Propanol für Analyse; Prod.nr. 33539; Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland). Nach dem Waschen in destilliertem Wasser erfolgte die Behandlung der Schnitte in der Mikrowelle. Zur besseren Entfaltung der Antigene und Reduktion der Hintergrundfärbung wurden

die Proben hierbei 20 Minuten in einem Zitratpufferbad (Target Retrieval Solution 10x Concentrate; Prod.nr. S1699; Dako Cytomation, Carpinteria, USA) bei pH 6,0 in der Mikrowelle erhitzt. Um eine kontinuierliche Benetzung der Präparate mit Zitratpuffer zu gewährleisten, wurde mehrfach während der Behandlung überkochender oder verdampfter Zitratpuffer ersetzt. Nach Abkühlen und erneutem Waschen der Proben in destilliertem Wasser und PBS (PBS (10x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; Prod.nr.: 14080-048; Gibco™, Invitrogen Corporation; Paisley, United Kingdom) wurden die Proben mit 2%-iger Wasserstoffperoxidlösung (Wasserstoffperoxid 30% "Baker Analyzed"; Prod.nr.: 7047; J.T. Baker; Mallinckrodt Baker B.V. Deventer, Niederlande) gelöst in Methanol (Methanol zur Analyse; Prod.nr.: 1.06009.2511; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) inkubiert, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Die Gewebeschnitte wurden dann für 1 Stunde mit der betreffenden Antikörperlösung in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert (p21 (C-19) sc-397 rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA und p27 (C-19) sc-528 rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Es wurden 1:50 Verdünnungen des Antikörpers für alle Organe außer für den Darm p27 (hier wurde eine 1:100 Verdünnung verwendet) hergestellt. Die Antikörper wurden hierzu in PBS plus 1% BSA (Albumin, bovine Serum ≥96% Essentially Fatty Acid Free; Prod.nr. A6003-106; Sigma-Aldrich Inc.; St. Louis, USA) gelöst. Das Serumalbumin vermindert dabei die unspezifische zytoplasmatische Hintergrundfärbung. Anschließend wurden die Proben in 3 Zyklen mit PBS gewaschen und nach Auftragen von EnVision+ (EnVision+ ® System Labelled Polymer-HRP Anti-Rabbit; Prod.nr. K4003; Dako Cytomation, Carpinteria, USA) 30 Minuten bei Zimmertemperatur in der Feuchtkammer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Proben mit flüssigem Diaminobenzidin (DAB) (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System; Prod.nr.: K3468; Dako Cytomation, Carpinteria, USA) unter Betrachtung im Mikroskop entwickelt und nach vollständiger Ausprägung der Färbung in destilliertes Wasser gegeben. Dann wurden die Proben in 40%-iger Hämalaunlösung (Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie (enthält Ethanol); Prod.nr.: 1.09249.2500; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2-Propanol für Analyse; Prod.nr. 33539; Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) dehydriert

und nach einem abschließendem Xylolbad eingedeckelt (ENTELLAN® neu, Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie; Prod.nr.: 1.07961.0100; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Negativkontrollen wurden nicht mit Antikörperlösung, sondern stattdessen mit 1%-igem BSA inkubiert.

2.6 DURCHFÜHRUNG DES TUNEL-TESTS

Zur Darstellung apoptotischer Zellkerne wurde bei den Organen Niere, RM und Darm ein TUNEL-Test durchgeführt. Die Schnitte wurden mittels Xylol (Xylol Isomerengemisch; Prod.nr. 16446; Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) in 4 Zyklen à 5 Minuten entparaffiniert. Anschließend wurden sie in 100%-igem Ethanol (Apotheke, Universitätsklinikum Ulm) gewaschen und in absteigender Alkoholreihe (je 10 Minuten in 100%, 90%, 70% Ethanol) rehydriert. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase wurden die Proben dann in Methanol (Methanol zur Analyse; Prod.nr. 1.06009.2511; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 1% Wasserstoffperoxid (Wasserstoffperoxid 30% "Baker Analyzed"; Prod.nr. 7047; J.T. Baker; Mallinckrodt Baker B.V. Deventer, Niederlande) gebadet und anschließend mit PBS-Puffer gespült. Der PBS-Puffer wurde hergestellt aus: 1,4 g Kaliumchlorid (Kaliumchlorid; Prod.nr. 60130; Fluka, Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland); 1,4 g Kaliumdihydrogenphosphat (Kaliumdihydrogenphosphat; Prod.nr. 60219; Fluka, Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland); 8,07 g Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat (Natriummonohydrogenphosphat Dihydrat; Prod.nr. 0326; J.T. Baker; Mallinckrodt Baker B.V. Deventer, Niederlande); 56 g Natriumchlorid (Natriumchlorid; Prod.nr. 71379; Fluka, Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) gelöst in 7 Liter destilliertem Wasser. Die Dünndarmproben wurden daraufhin in der Mikrowelle exakt 1 Minute in Zitratpuffer (Citric Acid Monohydrate; Prod.nr.: C-1909; 10 mmol/l, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) bei pH 6,0 behandelt. Danach wurden die Proben in einer Feuchtkammer bei 37°C für exakt 15 Minuten mit 100µl einer Proteinase K-Mischung (ICN; Bestellnr. 193504) inkubiert. Für die Proben, die in der Mikrowelle inkubiert wurden, wurde eine

Proteinase-Konzentration von 0,15% (verdünnt in PBS-Puffer) gewählt und für die Proben ohne Mikrowellenbehandlung und die Negativkontrollen eine Konzentration von 1,5% (verdünnt in PBS-Puffer). Nach Spülen mit PBS-Puffer wurden die Proben, aber nicht die Negativkontrollen, mit TDT-Spülpuffer inkubiert und in der Feuchtkammer für einige Minuten aufbewahrt. Der TDT-Spülpuffer wurde hergestellt aus 0,36 g 30mM Tris (Tris; Prod.nr. 108382.2500; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland); 2,996 g 140mM Na-Cacodylat (Na-Cacodylat; Prod.nr. 15540.02; Serva, Heidelberg, Deutschland); 0,0238 g 1mM Cobaltchlorid (Cobaltchlorid; Prod.nr. C-2644; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland); 0,25 g BSA (Bovine Serum Albumin; Prod.br. 11930; Serva, Heidelberg, Deutschland), aufgefüllt auf 100 ml mit Aqua dest.; Einstellen des pH-Wertes auf 7,2. Anschließend wurden auf die Proben, nicht aber auf die Negativkontrollen, 30 µl der Inkubationslösung aufgetragen und die Proben für 2 h bei 37°C in der Feuchtkammer inkubiert. Die Inkubationslösung bestand pro Schnitt aus: 24,86 µl Aqua dest; 6,43 µl TDT-(5x)Puffer (Fa. Promega, Madison, USA); 0,54 µl Biotin-16-dUTP (Biotin-16-dUTP; Prod.nr. M189A; Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland); 0,32 µl TDT (Terminal Desoxynucleotidyl Transferase; Prod.nr. M187B; Fa. Promega, Madison, USA). Nach der Inkubation wurden die Schnitte erneut mit PBS-Puffer gespült. Daraufhin wurden auf jeden Schnitt 100 µl biotinyliertes Streptavidin (Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:2000 mit PBS-Spülpuffer aufgetragen und anschließend für 30 Minuten in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Spülen mit PBS-Puffer wurden die Schnitte mit AEC entwickelt. Die AEC-Lösung (10 ml) wurde hergestellt aus: 2,1 ml Essigsäure 0,1M mit Natriumacetat 0,1 M auf 10 ml aufgefüllt und anschließend 500 µl davon verworfen. Diese Mischung wurde zu 4 mg AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol; Prod.nr. A-5754; Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) gemischt mit 500 µl DMF (N, N-Dimethylformamid; Prod.nr. 40240; Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim, Deutschland) gegeben. Kurz vor Gebrauch wurde noch 5 µl H₂O₂ zu den 10 ml AEC-Lösung gegeben. Die Proben wurden dann unter dem Mikroskop betrachtet und bei Färbung, aber spätestens nach 20 Minuten, in Leitungswasser gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die Proben wurden mit Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie (enthält Ethanol); Prod.nr.: 1.09249.2500; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) 1 Minute gefärbt und anschließend 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut.

Abschließend wurden die Objektträger mit auf 70°C erhitzter Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt (Kaiser's Glyceringelatine; Prod.nr. 1.09242.0100; Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland).

2.7 AUSWERTUNG DER PROBEN

2.7.1 AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN PRÄPARATE

Die Schnitte wurden ohne Kenntnis der Zuordnung zu Kontroll- oder Versuchsgruppe am Mikroskop in 10-20 facher Vergrößerung ausgewertet. Hierbei wurde lediglich eine Anfärbung des Zellkerns gewertet und gezählt. Für das Rückenmark konnte für p21 ein kompletter Querschnitt ausgewertet werden. Dazu wurde in jedem Querschnitt, aufgeteilt nach weißer Substanz, grauer Substanz und Blutgefäßen, jeweils die Anzahl der angefärbten Zellkerne bestimmt. Für p27 wurde jeweils ein Gesichtsfeld im Mikroskop in der 20 fachen Vergrößerung ausgezählt, da wegen der höheren Anzahl an angefärbten Zellkernen eine Auszählung eines gesamten Querschnittes nicht möglich war. Für die Niere wurde für p21 und p27 ein Feld von 0,5 x 0,5 cm in der Nierenrinde gewählt und in diesem Feld die Anzahl der angefärbten Zellkerne in den Glomeruli, den Tubuli, den Blutgefäßen und dem Interstitium bestimmt. Für den Muskel wurde für p21 und p27 ein Feld von 0,5 x 0,5 cm gewählt und in diesem Feld die Anzahl der angefärbten Zellkerne in den Muskelzellen, den Blutgefäßen und im Interstitium bestimmt. Für die Leber wurde für p21 wegen der hohen Anzahl an angefärbten Zellkernen lediglich ein Gesichtsfeld in der 10 fachen Vergrößerung ausgezählt. Für p27 wurde ein Feld von 0,5 x 0,5 cm ausgewertet. Hierbei wurde jeweils zwischen Leberzellen/Sinusoiden, Blutgefäßen und Bindegewebe in den Periportalfeldern unterschieden. Für den Darm wurde für p21 und p27 jeweils ein Abschnitt der Darmwand von 0,5 cm Länge ausgezählt. Hierbei wurden angefärbte Zellkerne der Mukosa, der Submukosa, der Muskularis und der Blutgefäße unterschieden.

2.7.2 AUSWERTUNG DES TUNEL-TESTS

Die Schnitte wurden ohne Kenntnis der Zuordnung zu Kontroll- oder Versuchsgruppe am Mikroskop in 10-20 facher Vergrößerung ausgewertet. Hierbei wurde nur eine Anfärbung des Zellkerns zusammen mit den morphologischen Kriterien einer Apoptose gewertet und gezählt. Für das Rückenmark wurde je ein Querschnitt ausgewertet. Dazu wurde in einem Querschnitt, aufgeteilt nach weißer Substanz, grauer Substanz und Blutgefäßen, jeweils die Anzahl der apoptotischen Zellkerne bestimmt. Für die Niere wurde ein Feld von 0,5 x 0,5 cm in der Nierenrinde gewählt und in diesem Feld die Anzahl der apoptotischen Zellkerne in den Glomeruli, den Tubuli, den Blutgefäßen und dem Interstitium bestimmt. Für den Darm wurde jeweils ein Abschnitt der Darmwand von 0,5 cm Länge ausgezählt. Hierbei wurden Zellkerne der Mukosa, der Submukosa, der Muskularis und der Blutgefäße unterschieden.

2.7.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER PROBEN

Die Ergebnisse wurden mit der Software WinSTAT® (www.winstat.de; R. Fitch Software, Bad Krozingen, Deutschland) statistisch ausgewertet.

Zunächst wurde getrennt nach Parameter (p21 und p27) und Kontroll- und Versuchsgruppe für jedes Organ bzw. jede Kategorie Minimum, Maximum und Median bestimmt.

Aus Median, Minimum und Maximum wurden Box-Plots gezeichnet.

Da bei den kleinen Fallzahlen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann, wurde zur statistischen Analyse ein nicht-parametrischer Test gewählt. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde jeweils die Parecoxib- mit der Kontrollgruppe verglichen. Signifikanz wurde bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen.

2.8 WEITERE IM RAHMEN DER STUDIE BESTIMMTE PARAMETER

2.8.1 SYSTEMISCHE UND REGIONALE HÄMODYNAMIK

Zu den Messzeitpunkten 1-4 wurden jeweils die folgenden Daten erhoben:

Das Herzzeitvolumen wurde mit der Thermodilutionsmethode bestimmt. Die Daten sind der Mittelwert aus 4 Injektionen mit je 10 ml eisgekühlter Kochsalzlösung, die jeweils innerhalb eines respiratorischen Zyklus infundiert wurden. Proximaler (pMAP) und distaler (dMAP) arterieller Mitteldruck wurden kontinuierlich bestimmt. Der mittlere Pulmonalarteriendruck (MPAP) sowie der pulmonalkapilläre Verschlussdruck wurden mittels eines Pulmonalarterienkatheters (93 A 754™, Baxter Healthcare, Irvine, USA) gemessen. Der Blutfluss in der A. hepatica communis, der V. portae, der A. renalis und der distalen Aorta abdominalis wurde mit kalibrierten "flow probes" gemessen. Die Signale wurden kontinuierlich mit einem T206 Flowmeter gemessen.

2.8.2 KLINISCHE CHEMIE

Zu den Messzeitpunkten 1, 3 und 4 wurden arterielle Bilirubin- und Kreatininkonzentrationen bestimmt. Die Sammelurinmenge wurde am Messzeitpunkt 4 bestimmt.

2.8.3 PROSTAGLANDINE

Zu den Messzeitpunkten 1, 3 und 4 wurden jeweils die folgenden Daten erhoben:

Die 6-Keto-Prostaglandine und Thromboxan B₂ gelten als Parameter einer inflammatorischen Antwort in der Ischämie-/Reperusionsphase und wurden mit Standardmethoden gemessen (EIA-Kits).

2.8.4 STATISTISCHE ANALYSE DER DATEN

Die Ergebnisse wurden mit der Software SigmaStat for Windows (Version 3.5 Copyright© 2006 Systat Software, Inc., San Jose, USA) statistisch ausgewertet. Zunächst wurde getrennt nach Kontroll- und Versuchsgruppe für jeden Messzeitpunkt und jeden Parameter Minimum, Maximum und Median bestimmt. Da bei den kleinen Fallzahlen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann, wurde zur statistischen Analyse ein nicht-parametrischer Test gewählt. Es wurde eine Friedman repeated measures ANOVA (analysis of variance) on ranks mit anschließendem Dunn's Test zum Vergleich der MZP 2, 3 und 4 mit dem Ausgangswert (MZP 1) durchgeführt. Der Mann-Whitney Rangsummentest (U-Test) wurde verwendet, um die Daten zwischen den Behandlungsgruppen an einem MZP zu vergleichen. Signifikanz wurde bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen.

3 ERGEBNISSE

3.1 IMMUNHISTOCHEMIE

3.1.1 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DES RÜCKENMARKS

Immunhistochemie Rückenmark p21

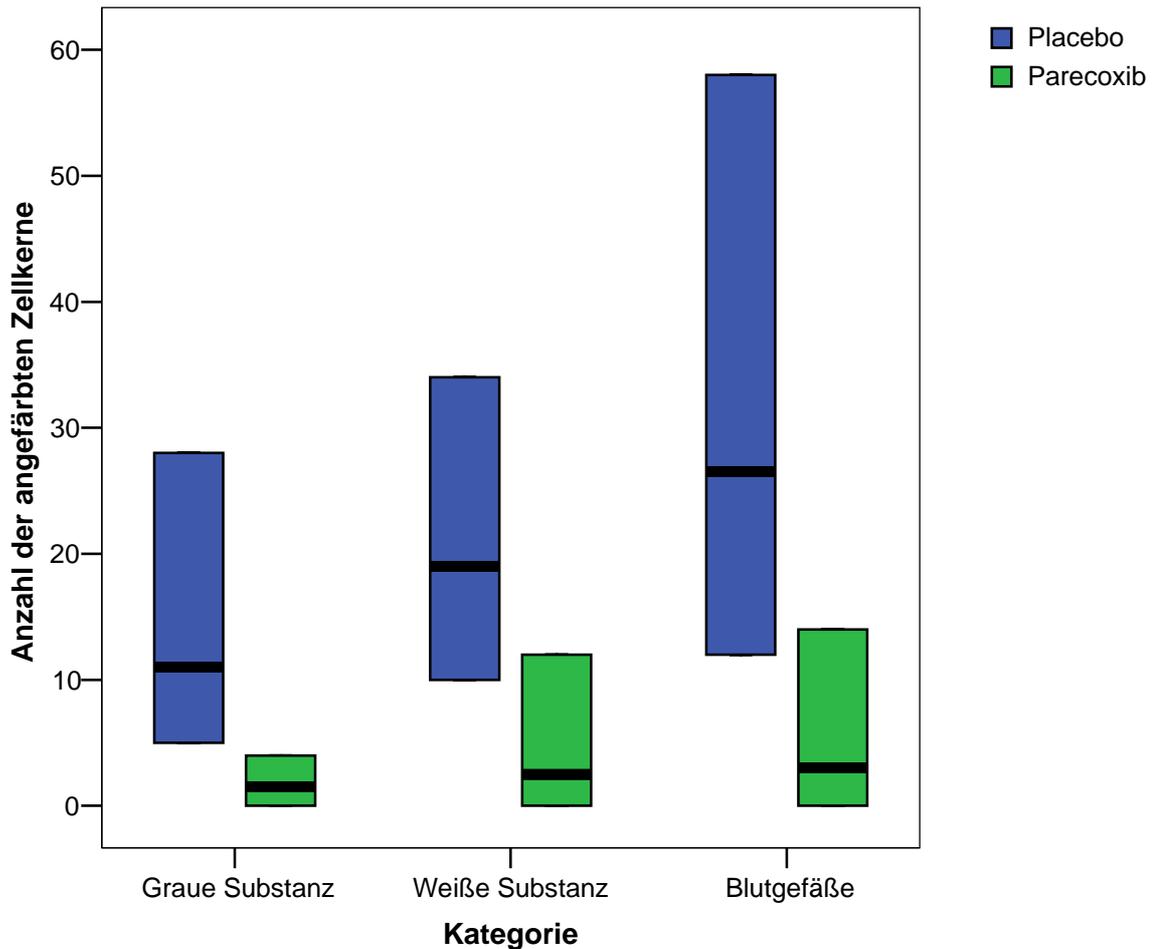


Abbildung 2: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Rückenmarksquerschnitt) bei der Immunhistochemie Rückenmark p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) in der grauen Substanz, der weißen Substanz und in den Blutgefäßen bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 2: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) Rückenmark

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Graue Substanz	Weißer Substanz	Blutgefäße
p-Wert (U-Test)	0,0004*	0,0008*	0,0007*

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Rückenmarksquerschnitt), untergliedert nach grauer Substanz, weißer Substanz und Blutgefäßen zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Werts mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert <0,05 (*).

Es zeigt sich für die Kategorien graue Substanz, weiße Substanz und Blutgefäße eine signifikant geringere Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Versuchsgruppe (Parecoxib) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Placebo).

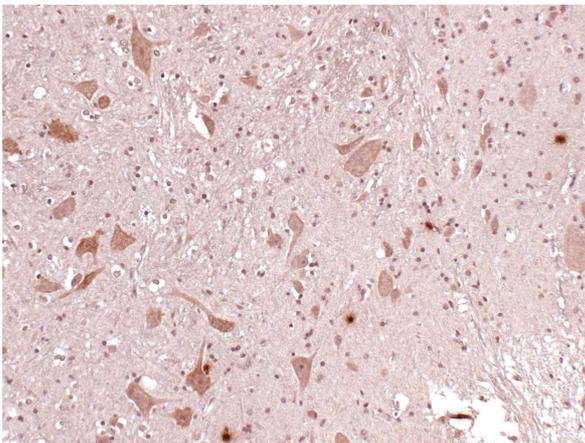


Abbildung 3: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Placebo p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) Rückenmark

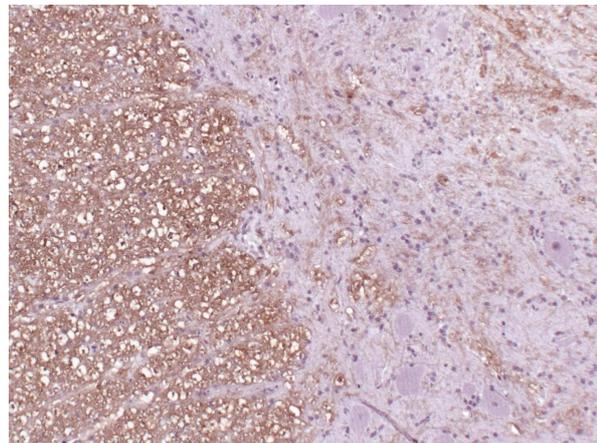


Abbildung 4: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Parecoxib p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) Rückenmark

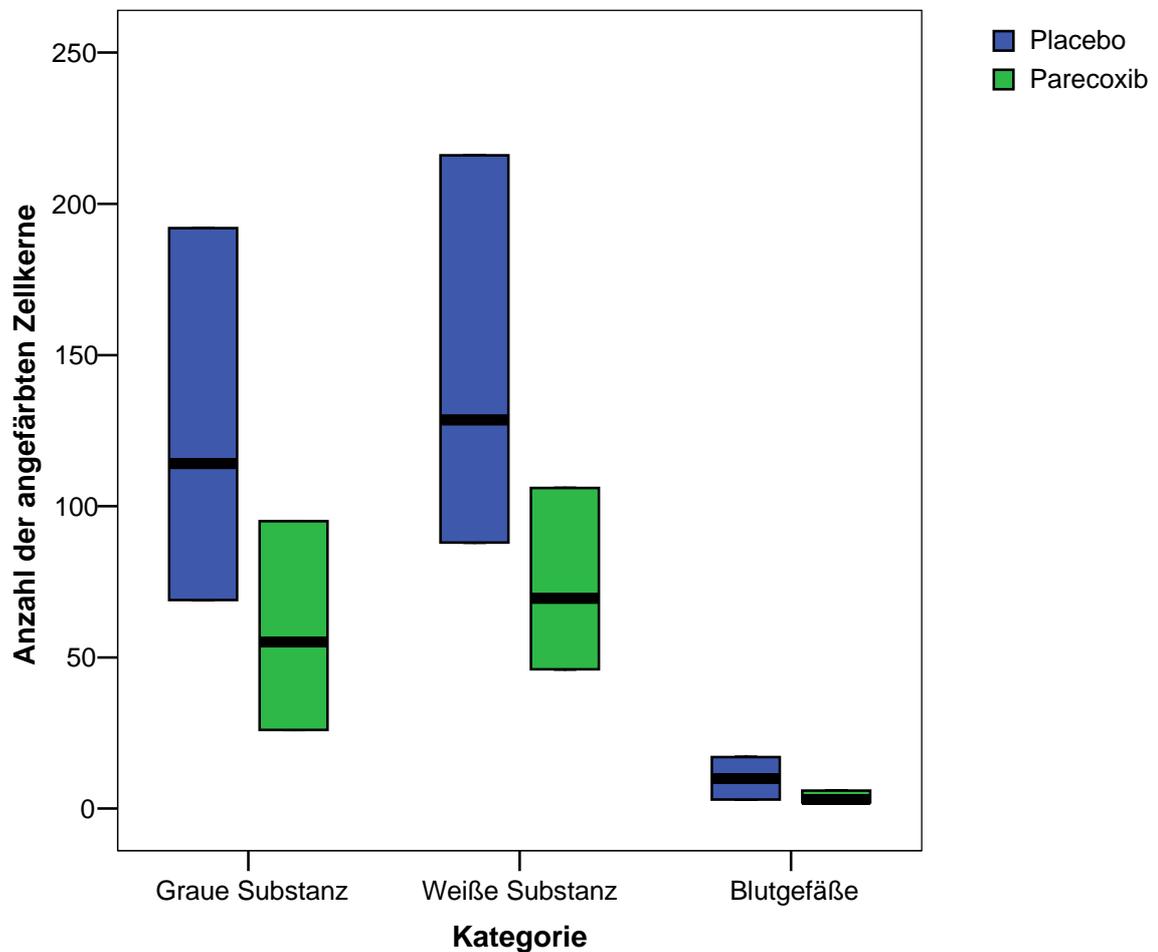
Immunhistochemie Rückenmark p27

Abbildung 5: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Gesichtsfeld bei 20x Vergrößerung) bei der Immunhistochemie Rückenmark p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) in der grauen Substanz, der weißen Substanz und in den Blutgefäßen bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 3: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) Rückenmark

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Graue Substanz	Weißer Substanz	Blutgefäße
p-Wert (U-Test)	0,0010 *	0,0014 *	0,0105 *

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Gesichtsfeld bei 20x Vergrößerung), untergliedert nach grauer Substanz, weißer Substanz und Blutgefäßen zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Wertes mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert <0,05 (*).

Es zeigt sich für die Kategorien graue Substanz, weiße Substanz und Blutgefäße eine signifikant geringere Anzahl an angefärbten Zellkernen für die Versuchsgruppe (Parecoxib) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Placebo).

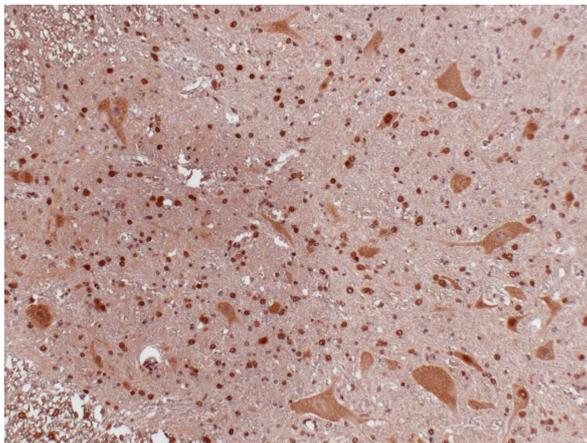


Abbildung 6: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Placebo p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) Rückenmark

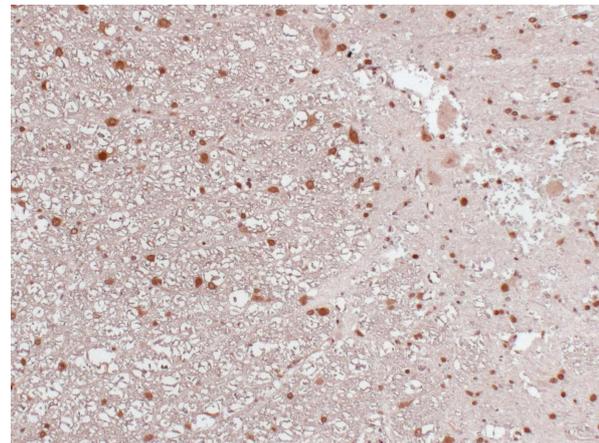


Abbildung 7: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Parecoxib p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) Rückenmark

3.1.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DER NIERE

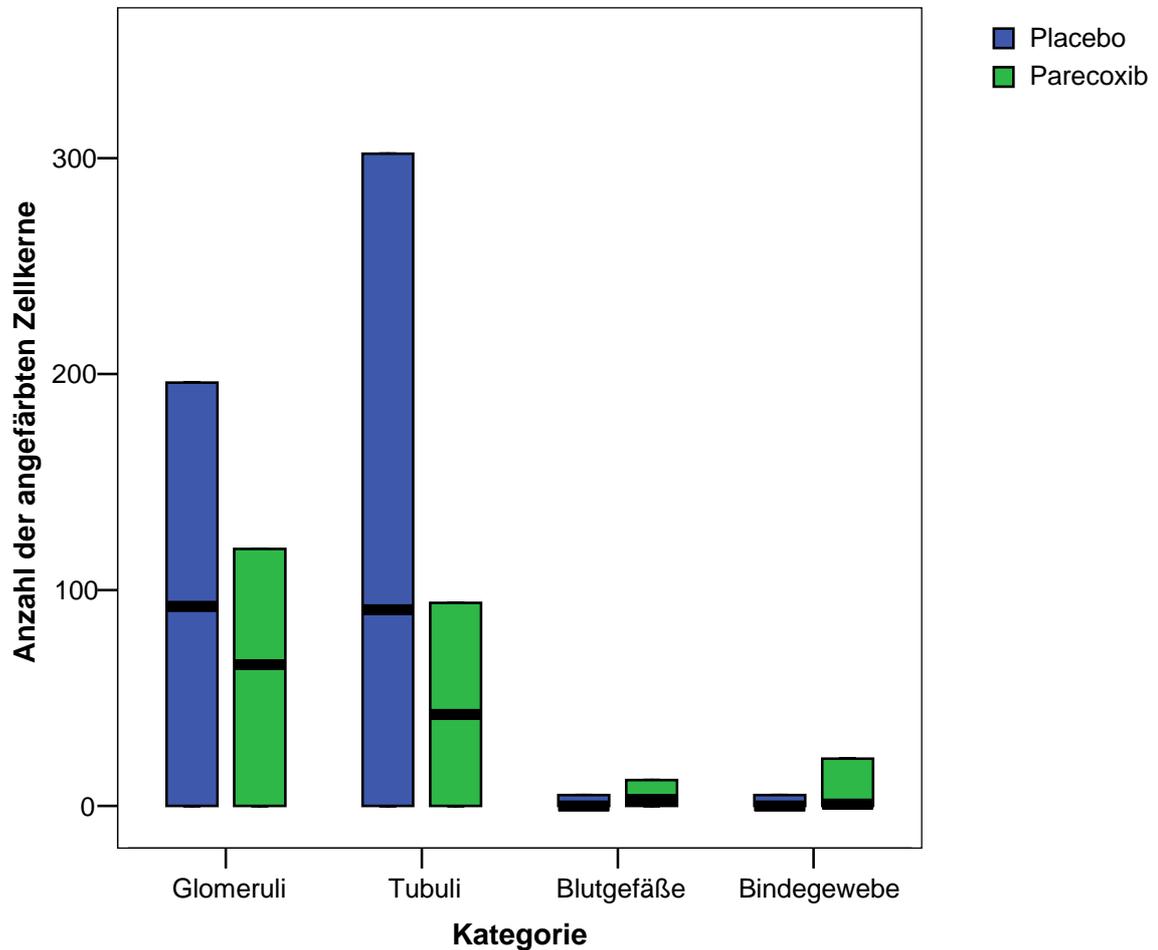
Immunhistochemie Niere p21

Abbildung 8: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (0,5 x 0,5 cm in der Nierenrinde) bei der Immunhistochemie Niere p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) in den Glomeruli, den Tubuli, den Blutgefäßen und dem Bindegewebe bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 4: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) Niere

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Glomeruli	Tubuli	Blutgefäße	Bindegewebe
p-Wert(U-Test)	0,1819	0,0405 *	0,1062	0,0811

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (0,5 x 0,5 cm in der Nierenrinde), untergliedert nach Glomeruli, Tubuli, Blutgefäßen und Bindegewebe zwischen der Kontroll- (Placebo) und Versuchsgruppe (Parecoxib). Berechnung eines p-Werts mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 (*).

Es zeigt sich bei den Tubuli eine signifikant geringere Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Parecoxib- im Vergleich zur Kontrollgruppe.

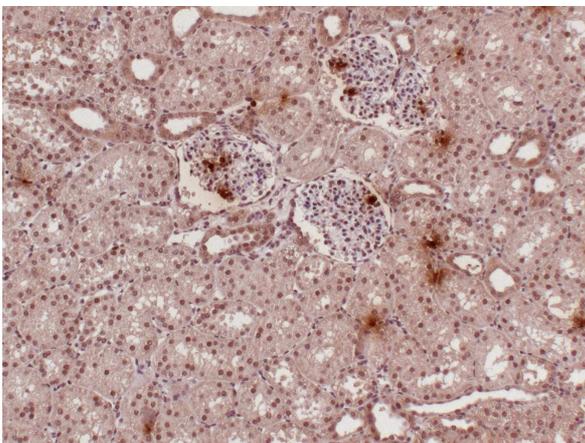


Abbildung 9: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Placebo Niere p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)

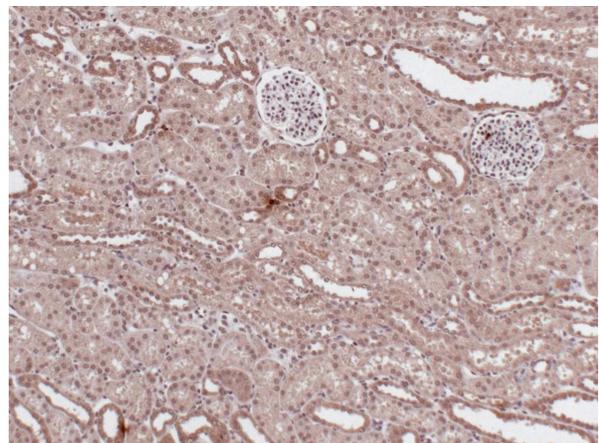


Abbildung 10: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Parecoxib Niere p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)

Immunhistochemie Niere p27

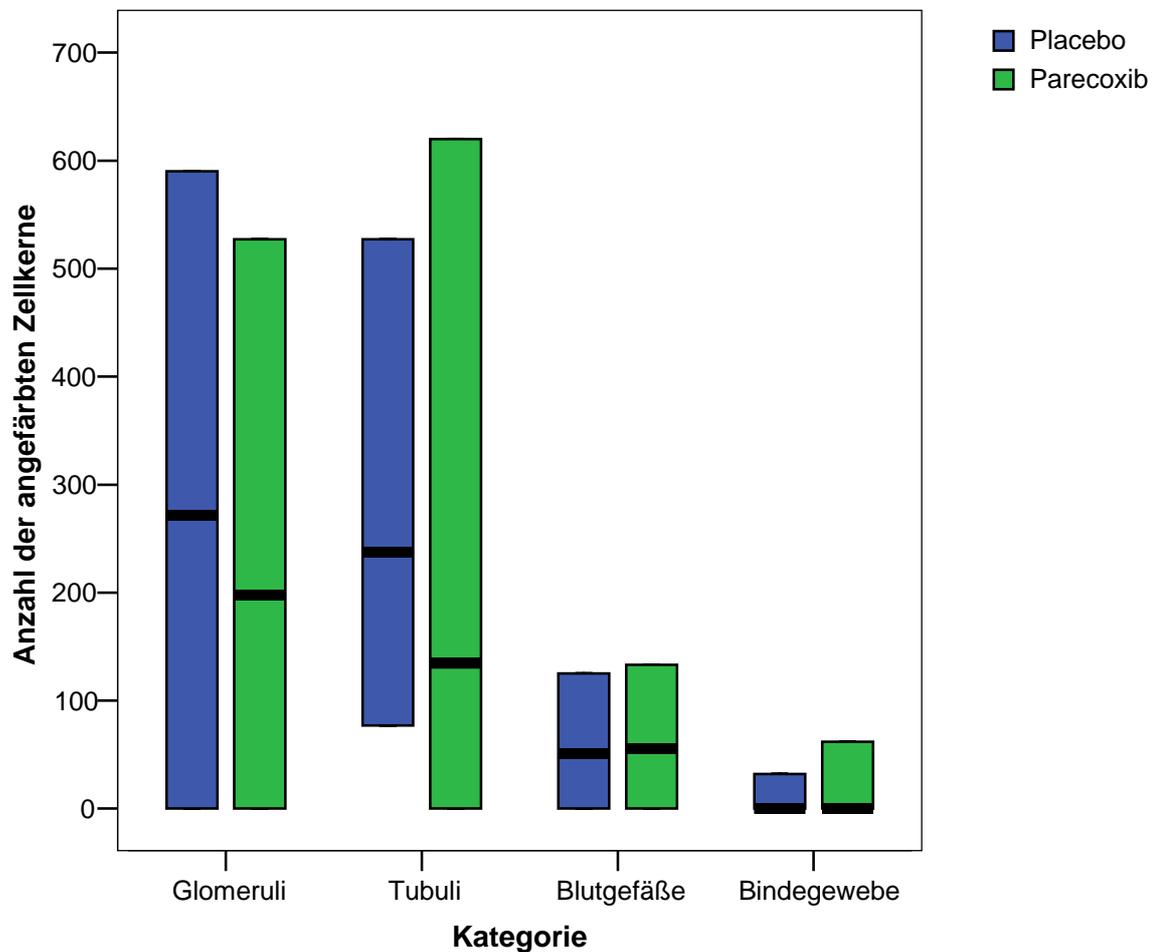


Abbildung 11: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (0,5 x 0,5 cm in der Nierenrinde) bei der Immunhistochemie Niere p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) in den Glomeruli, den Tubuli, den Blutgefäßen und dem Bindegewebe bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 5: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) Niere

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Glomeruli	Tubuli	Blutgefäße	Bindegewebe
p-Wert(U-Test)	0,5634	0,1549	0,6242	0,5605

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (0,5 x 0,5 cm in der Nierenrinde), untergliedert nach Glomeruli, Tubuli, Blutgefäßen und Bindegewebe zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe.

Berechnung eines p-Wertes mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 (*).

Es zeigt sich für keine der Kategorien eine signifikant verschiedene Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Kontroll- und der Versuchsgruppe.

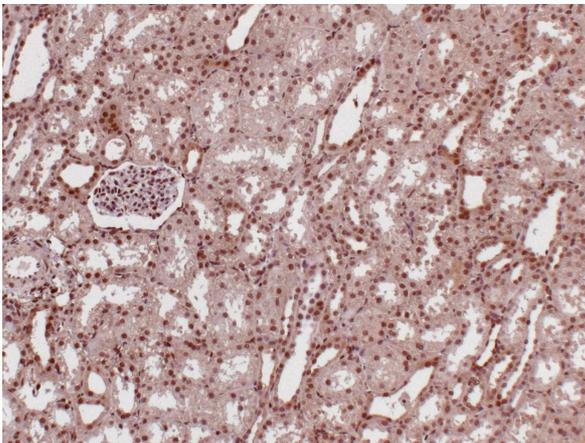


Abbildung 12: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Placebo Niere p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)

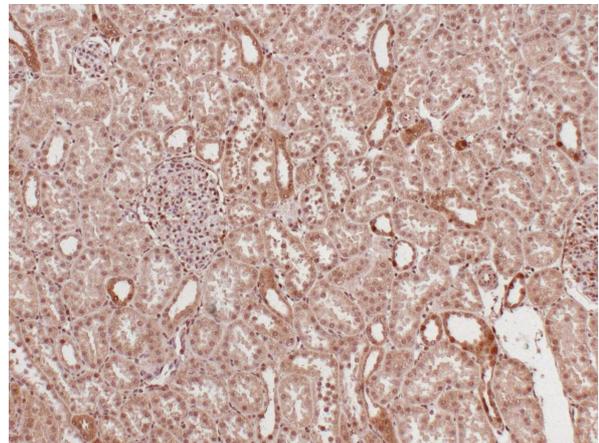


Abbildung 13: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Parecoxib Niere p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)

3.1.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DES DÜNNDARMS

Dünndarm p21

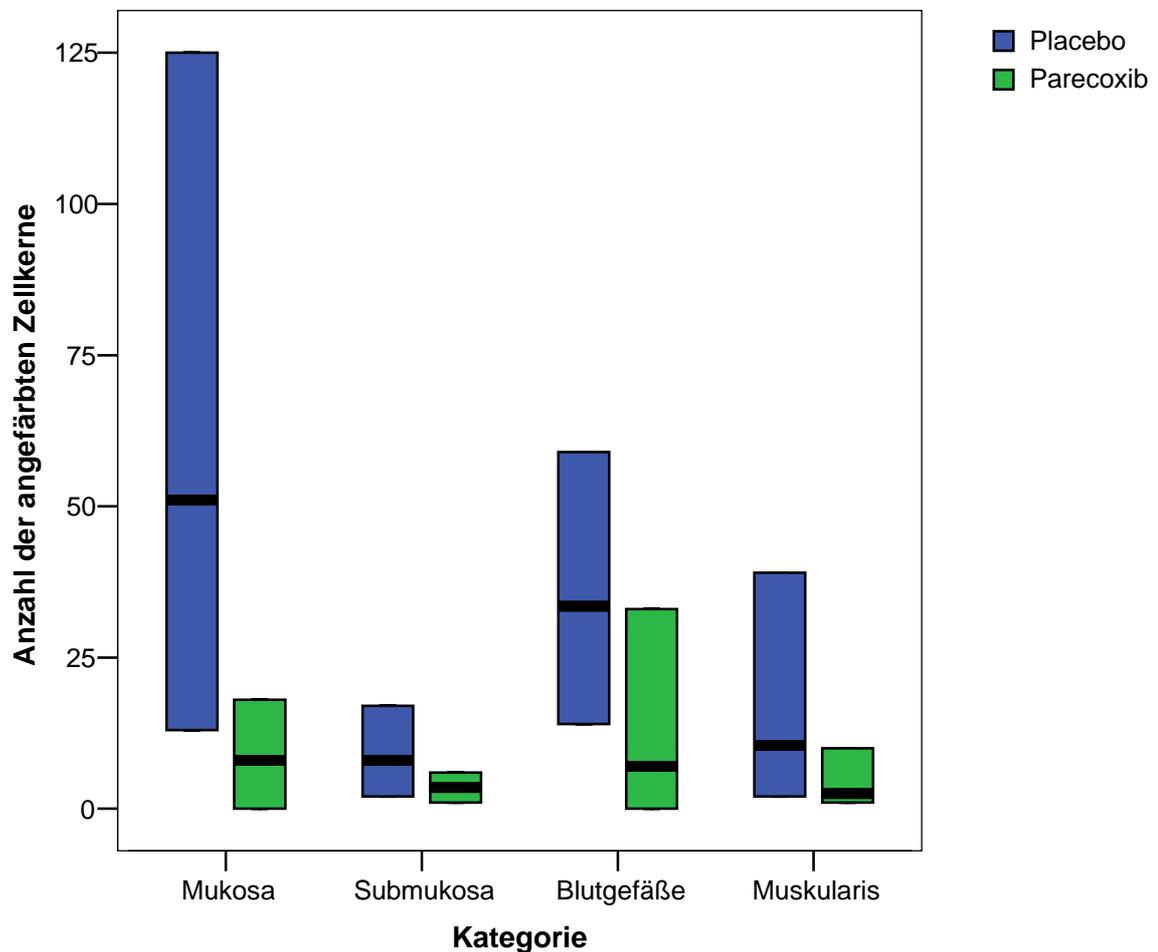


Abbildung 14: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Abschnitt der Darmwand von 0,5 cm Länge) bei der Immunhistochemie Dünndarm p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) in der Mukosa, der Submukosa, den Blutgefäßen und der Muskularis bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 6: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) Dünndarm

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Mukosa	Submukosa	Blutgefäße	Muskularis
p-Wert(U-Test)	0,0005 *	0,1391	0,0112 *	0,0962

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Abschnitt der Darmwand von 0,5 cm Länge), untergliedert nach Mukosa, Submukosa, Blutgefäßen und Muskularis zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Wertes mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 (*).

Es zeigt sich für die Mukosa und die Blutgefäße eine signifikant geringere Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Parecoxib- im Vergleich zur Placebogruppe.

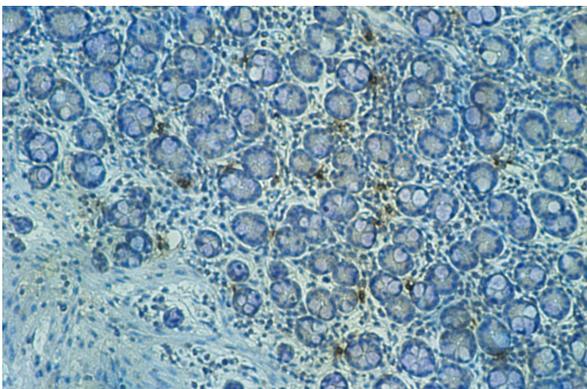


Abbildung 15: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Placebo Darm p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)

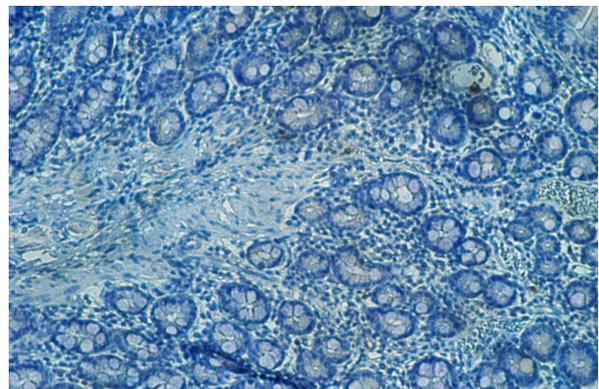


Abbildung 16: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Parecoxib Darm p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A)

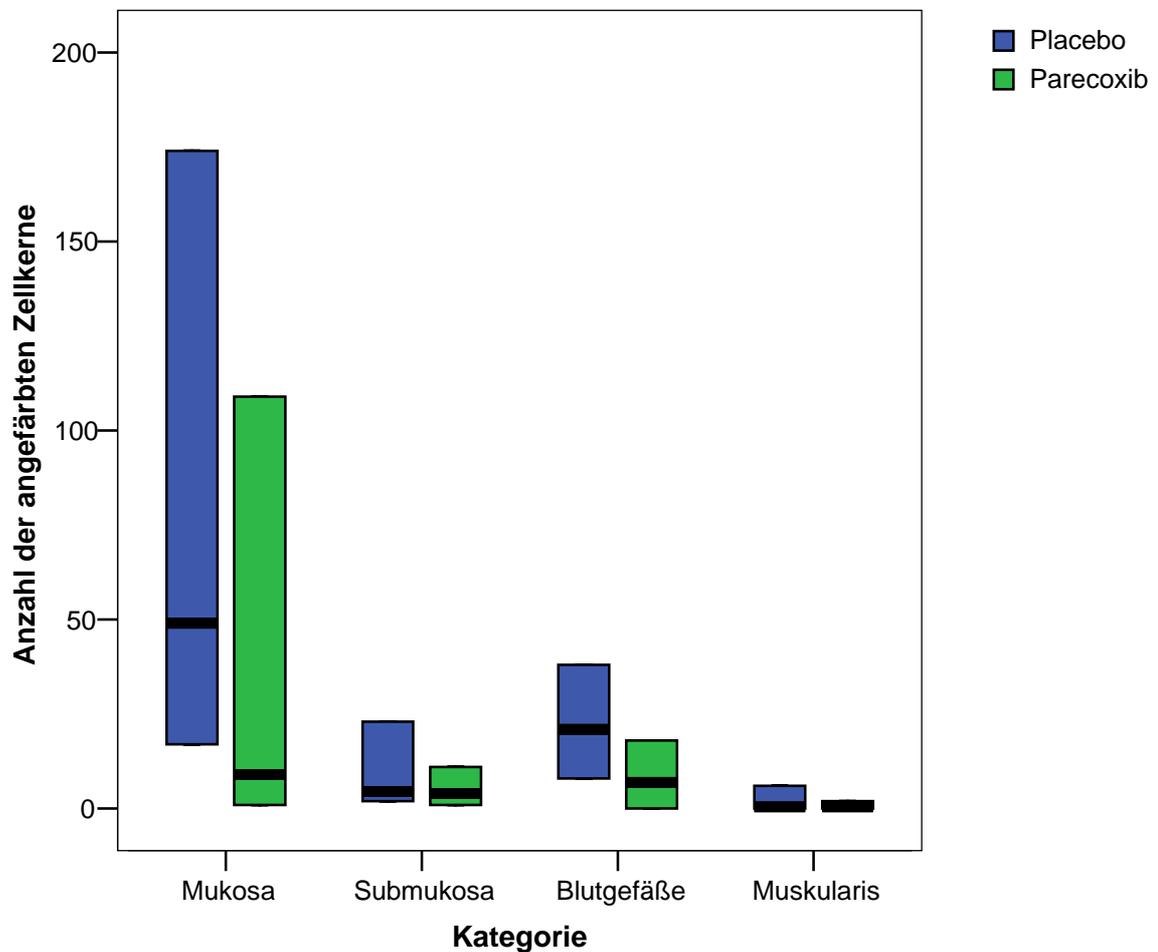
Immunhistochemie Dünndarm p27

Abbildung 17: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Abschnitt der Darmwand von 0,5 cm Länge) bei der Immunhistochemie Dünndarm p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) in der Mukosa, der Submukosa, den Blutgefäßen und der Muskularis bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 7: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) Dünndarm

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Mukosa	Submukosa	Blutgefäße	Muskularis
p-Wert(U-Test)	0,0058 *	0,4181	0,0013 *	0,6653

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Abschnitt der Darmwand von 0,5 cm Länge), untergliedert nach Mukosa, Submukosa, Blutgefäßen und Muskularis zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Wertes mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 (*).

Es zeigt sich für die Mukosa und die Blutgefäße eine signifikant geringere Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Parecoxib- im Vergleich zur Placebogruppe.

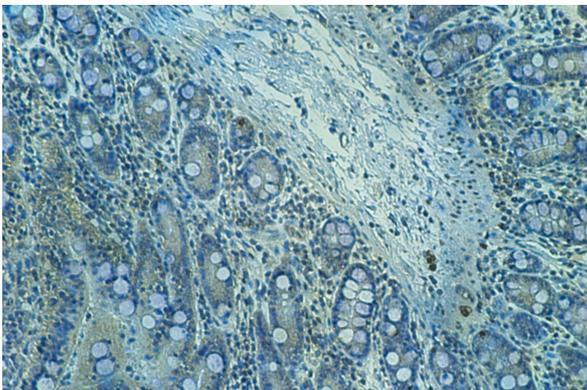


Abbildung 18: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Placebo Darm p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)

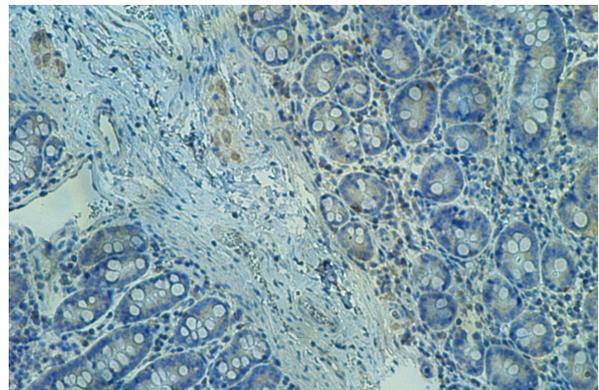


Abbildung 19: Mikroskopisches Präparat Immunhistochemie Parecoxib Darm p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B)

3.1.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DER LEBER

Immunhistochemie Leber p21

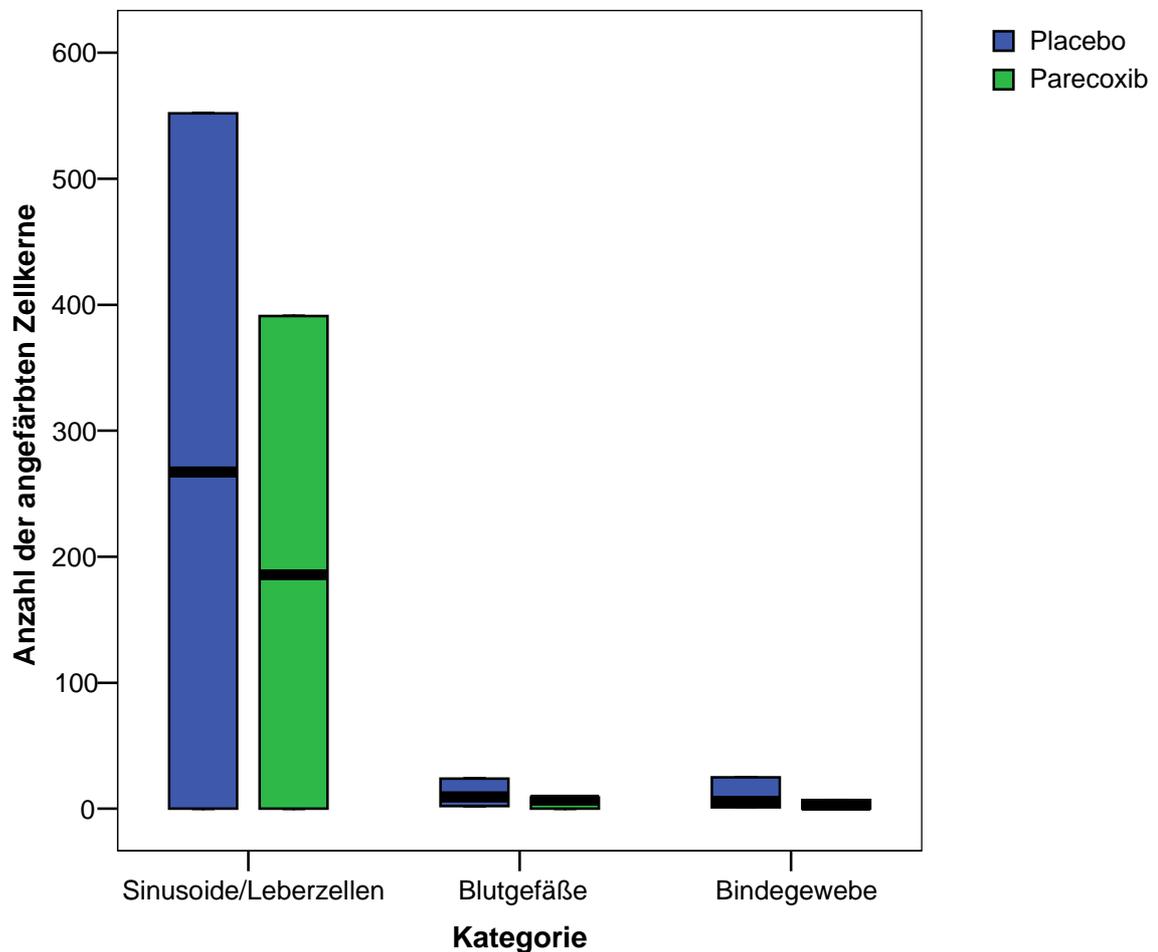


Abbildung 20: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Gesichtsfeld in der 10x Vergrößerung) bei der Immunhistochemie Leber p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) in den Sinusoiden/Leberzellen, den Blutgefäßen und dem Bindegewebe bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 8: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) Leber

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Leberzellen/ Sinusoide	Blutgefäße	Bindegewebe
p-Wert (U-Test)	0,1682	0,0731	0,0447 *

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Gesichtsfeld in der 10x Vergrößerung), untergliedert nach Leberzellen/Sinusoiden, Blutgefäßen und Bindegewebe zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Wertes mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 (*).

Es zeigt sich lediglich für das Bindegewebe eine signifikant geringere Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Parecoxib- im Vergleich zur Placebogruppe.

Immunhistochemie Leber p27

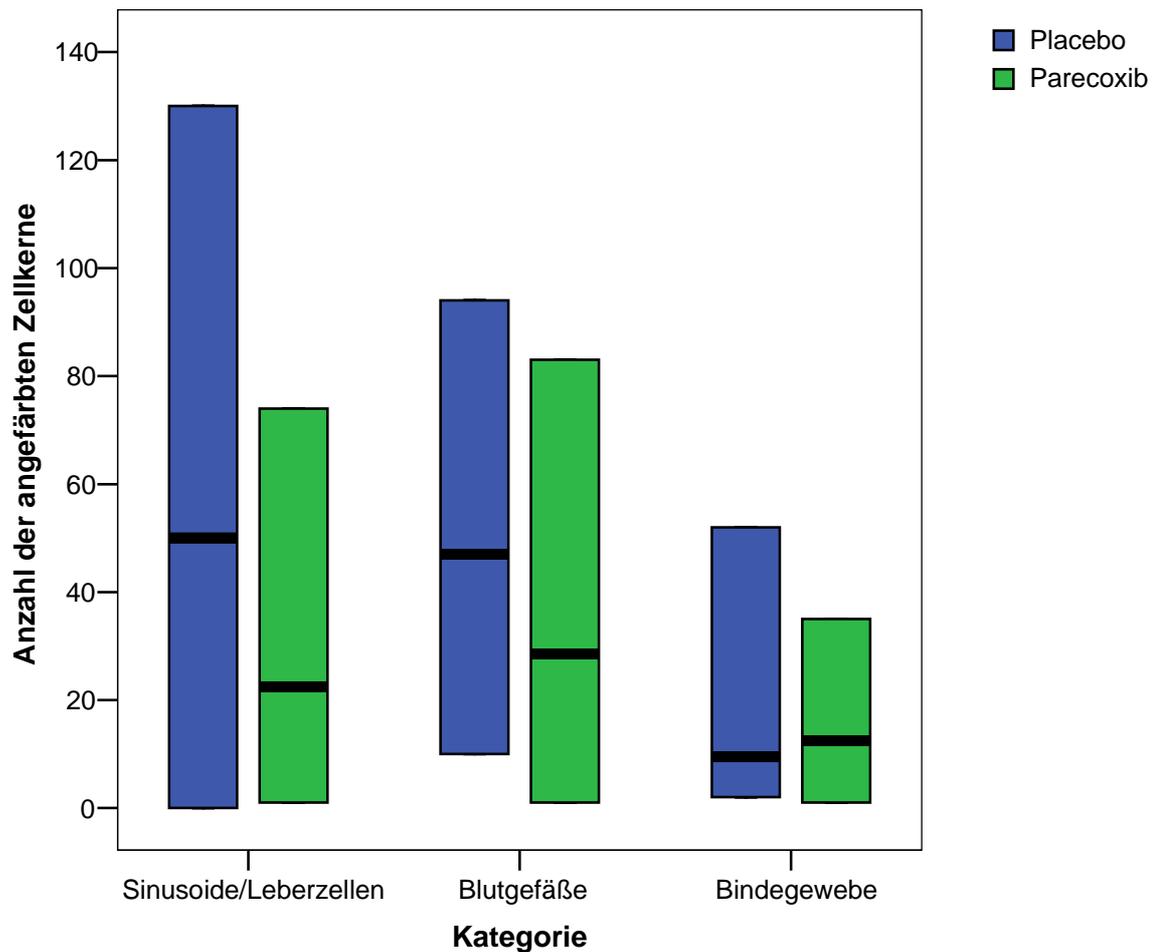


Abbildung 21: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Feld von 0,5 x 0,5 cm) bei der Immunhistochemie Leber p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) in den Sinusoiden/Leberzellen, den Blutgefäßen und dem Bindegewebe bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 9: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) Leber

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Leberzellen/ Sinusoide	Blutgefäße	Bindegewebe
p-Wert (U-Test)	0,2478	0,3981	0,6243

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Feld von 0,5 x 0,5 cm), untergliedert nach Leberzellen/Sinusoiden, Blutgefäßen und Bindegewebe zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Wertes mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 (*).

Es zeigt sich für keine der Kategorien eine signifikant verschiedene Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Placebo- und Parecoxibgruppe.

3.1.5 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DES SKELETTMUSKELS

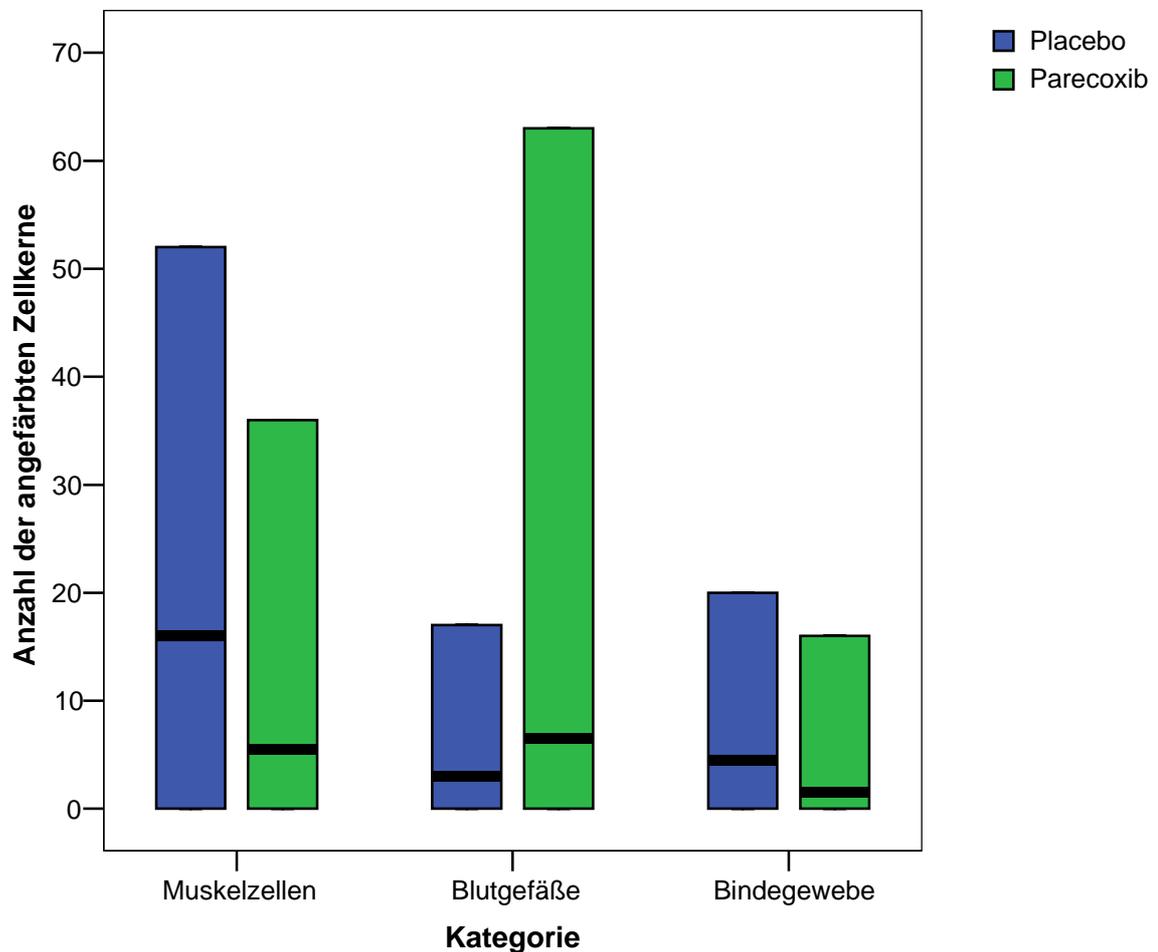
Immunhistochemie Skelettmuskel p21

Abbildung 22: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Feld von 0,5 x 0,5 cm) bei der Immunhistochemie Skelettmuskel p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) in den Muskelzellen, den Blutgefäßen und dem Bindegewebe bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 10: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) Skelettmuskel

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Muskelzellen	Blutgefäße	Bindegewebe
p-Wert (U-Test)	0,5005	0,2289	0,7038

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Feld von 0,5 x 0,5 cm), untergliedert nach Muskelzellen, Blutgefäßen und Bindegewebe zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Wertes mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 (*).

Es zeigt sich für keine der Kategorien eine signifikant verschiedene Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Placebo- und der Parecoxibgruppe.

Immunhistochemie Skelettmuskel p27

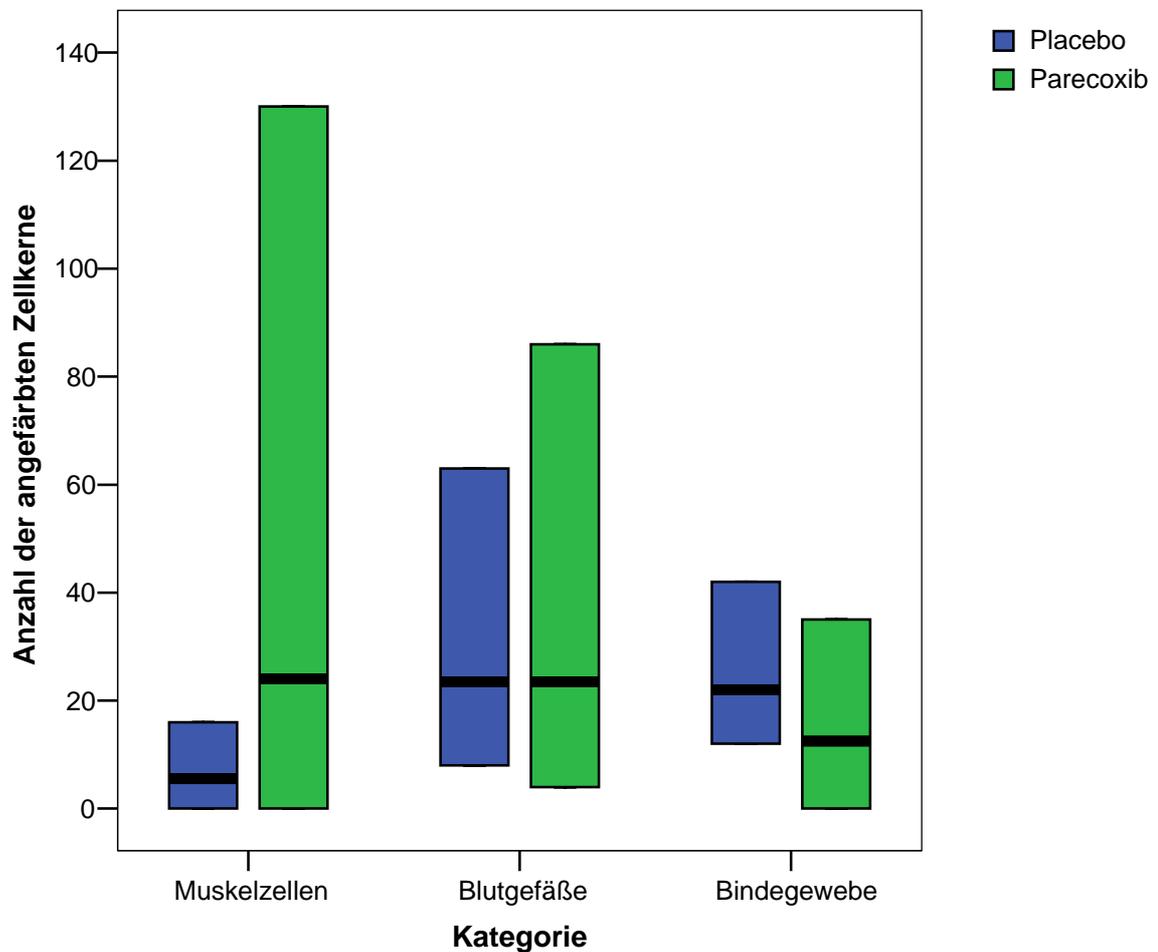


Abbildung 23: Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Feld von 0,5 x 0,5 cm) bei der Immunhistochemie Skelettmuskel p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) in den Muskelzellen, den Blutgefäßen und dem Bindegewebe bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 11: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für die Immunhistochemie p27 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) Skelettmuskel

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Muskelzellen	Blutgefäße	Bindegewebe
p-Wert (U-Test)	0,0747	1,0000	0,0680

Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne im ausgewerteten Areal (Feld von 0,5 x 0,5 cm), untergliedert nach Muskelzellen, Blutgefäßen und Bindegewebe zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Wertes mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05 (*).

Es zeigt sich für keine der Kategorien eine signifikant verschiedene Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Placebo- und der Parecoxibgruppe.

3.2 TUNEL-TEST

3.2.1 TUNEL-TEST RÜCKENMARK

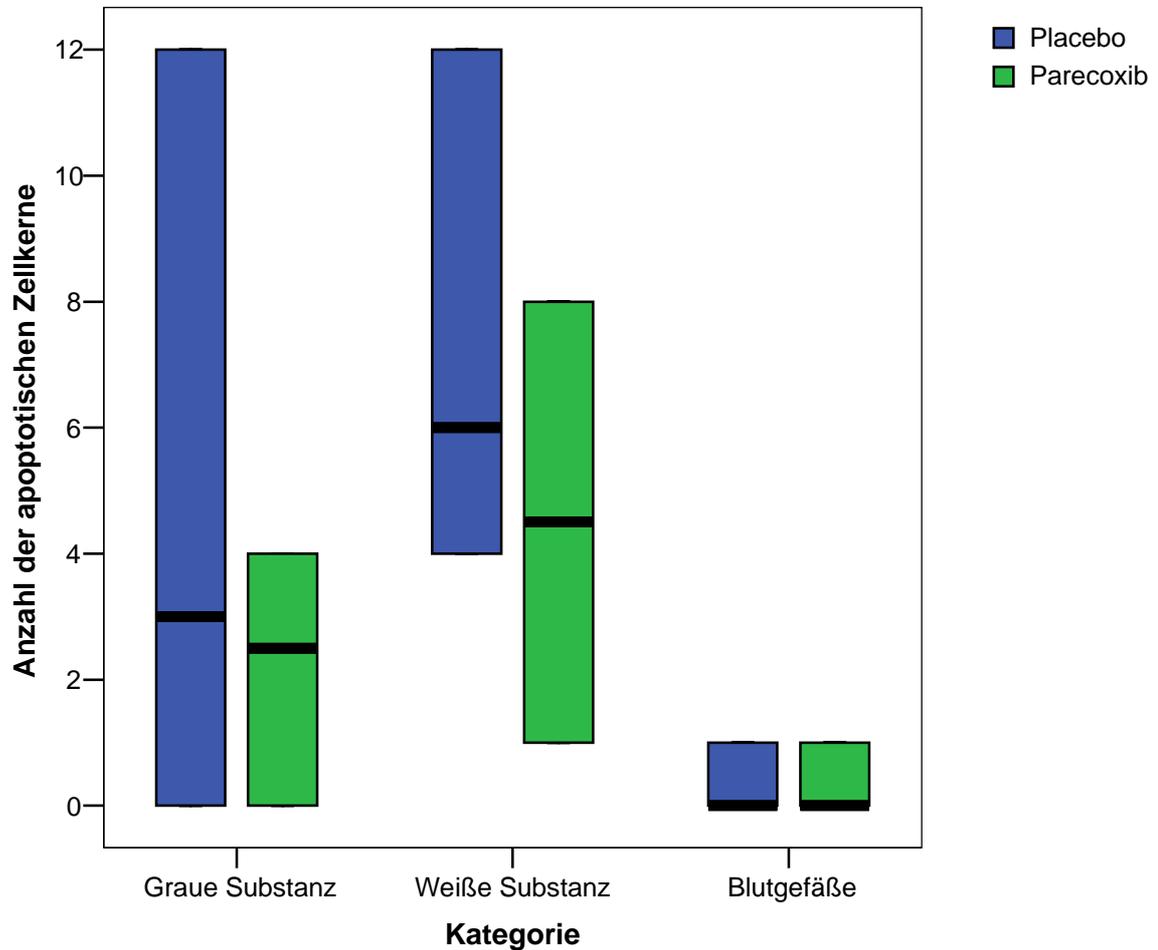


Abbildung 24: Anzahl der apoptotischen Zellkerne im ausgewerteten Areal (Rückenmarksquerschnitt) beim TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Rückenmark in der grauen Substanz, der weißen Substanz und den Blutgefäßen bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 12: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für den TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Rückenmark

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Graue Substanz	Weißer Substanz	Blutgefäße
p-Wert (U-Test)	0,2909	0,0962	0,3885

Vergleich der Anzahl der apoptotischen Zellkerne im ausgewerteten Areal (Rückenmarksquerschnitt), untergliedert nach grauer Substanz, weißer Substanz und Blutgefäßen zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Werts mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert <0,05 (*).

Es zeigt für keine der Kategorien eine signifikant verschiedene Anzahl an apoptotischen Zellkernen in der Versuchsgruppe (Parecoxib) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Placebo).

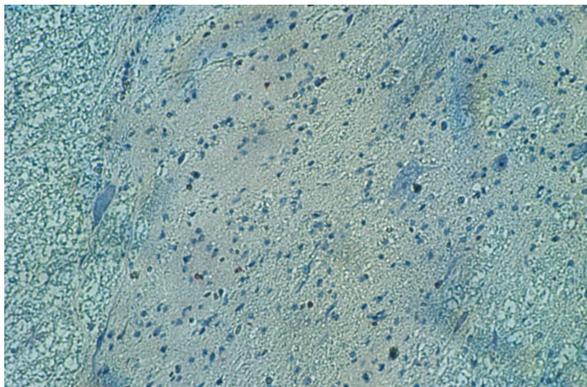


Abbildung 25: Mikroskopisches Präparat TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Placebo Rückenmark

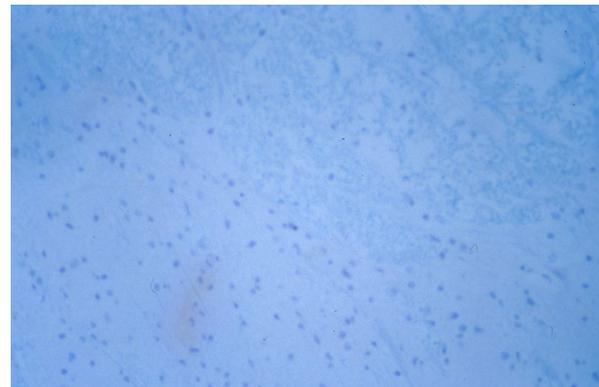


Abbildung 26: Mikroskopisches Präparat TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Parecoxib Rückenmark

3.2.2 TUNEL-TEST NIERE

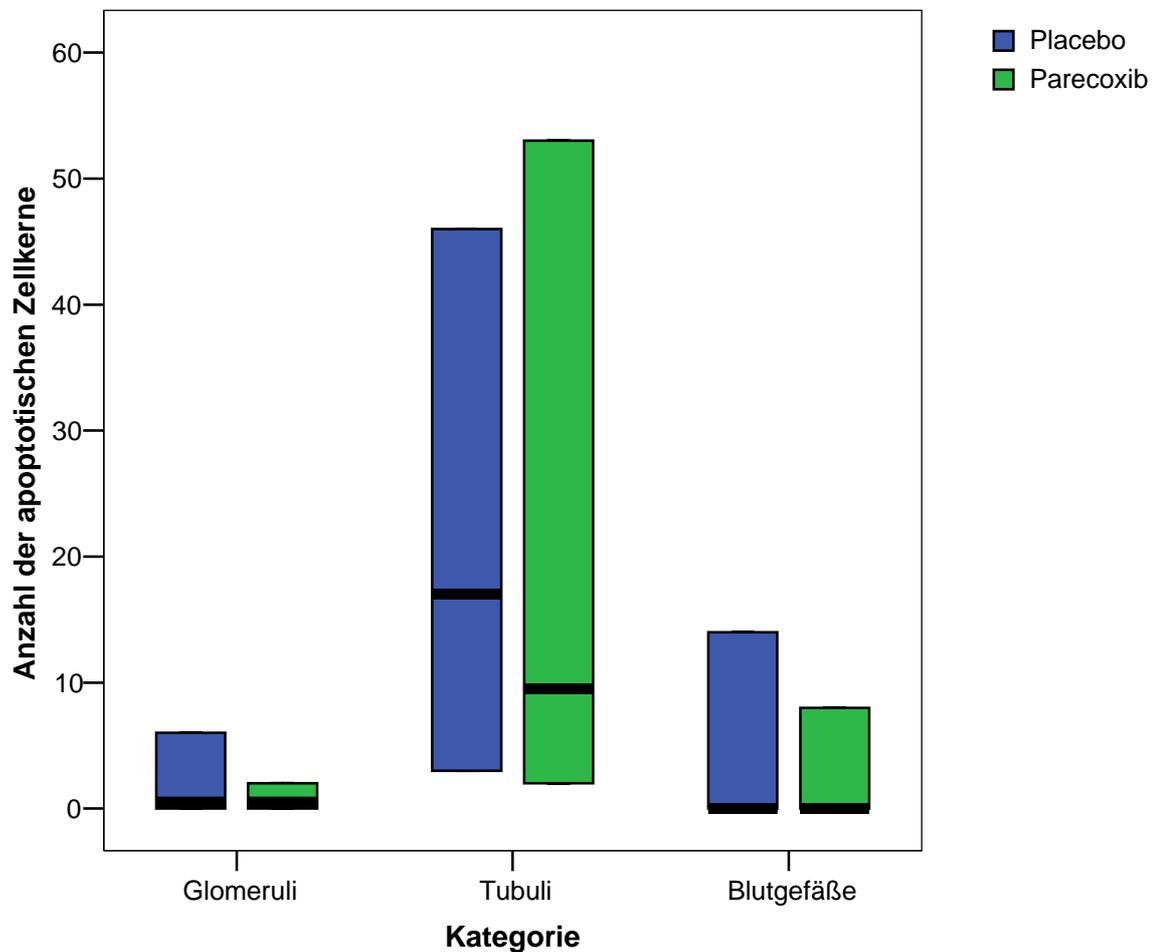


Abbildung 27: Anzahl der apoptotischen Zellkerne im ausgewerteten Areal (Feld von 0,5 x 0,5 cm) beim TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Niere in den Glomeruli, den Tubuli und den Blutgefäßen bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe.

Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 13: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für den TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Niere

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Glomeruli	Tubuli	Blutgefäße
p-Wert (U-Test)	1,0000	0,7189	0,8739

Vergleich der Anzahl der apoptotischen Zellkerne im ausgewerteten Areal (Feld von 0,5 x 0,5 cm), untergliedert nach Glomeruli, Tubuli und Blutgefäßen zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Werts mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert <0,05 (*).

Es zeigt sich für keine der Kategorien eine signifikant verschiedene Anzahl an apoptotischen Zellkernen in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

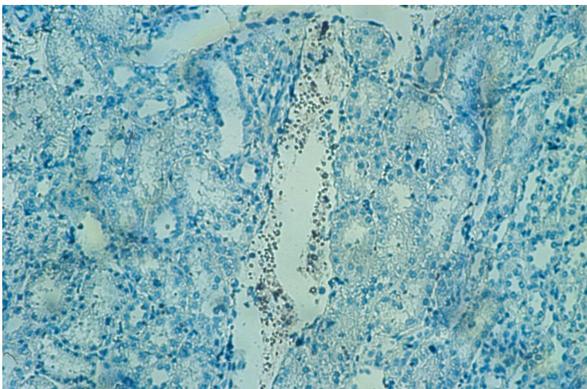


Abbildung 28: Mikroskopisches Präparat TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Placebo Niere

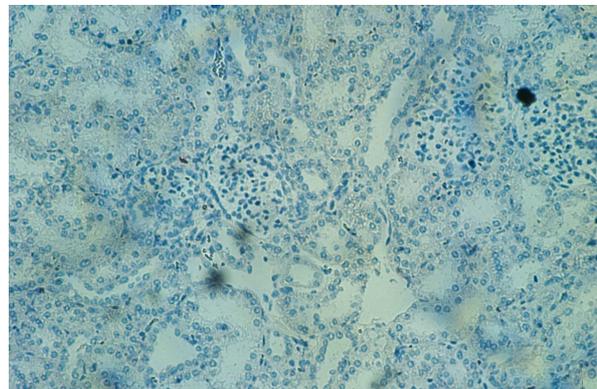


Abbildung 29: Mikroskopisches Präparat TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Parecoxib Niere

3.2.3 TUNEL-TEST DÜNNDARM

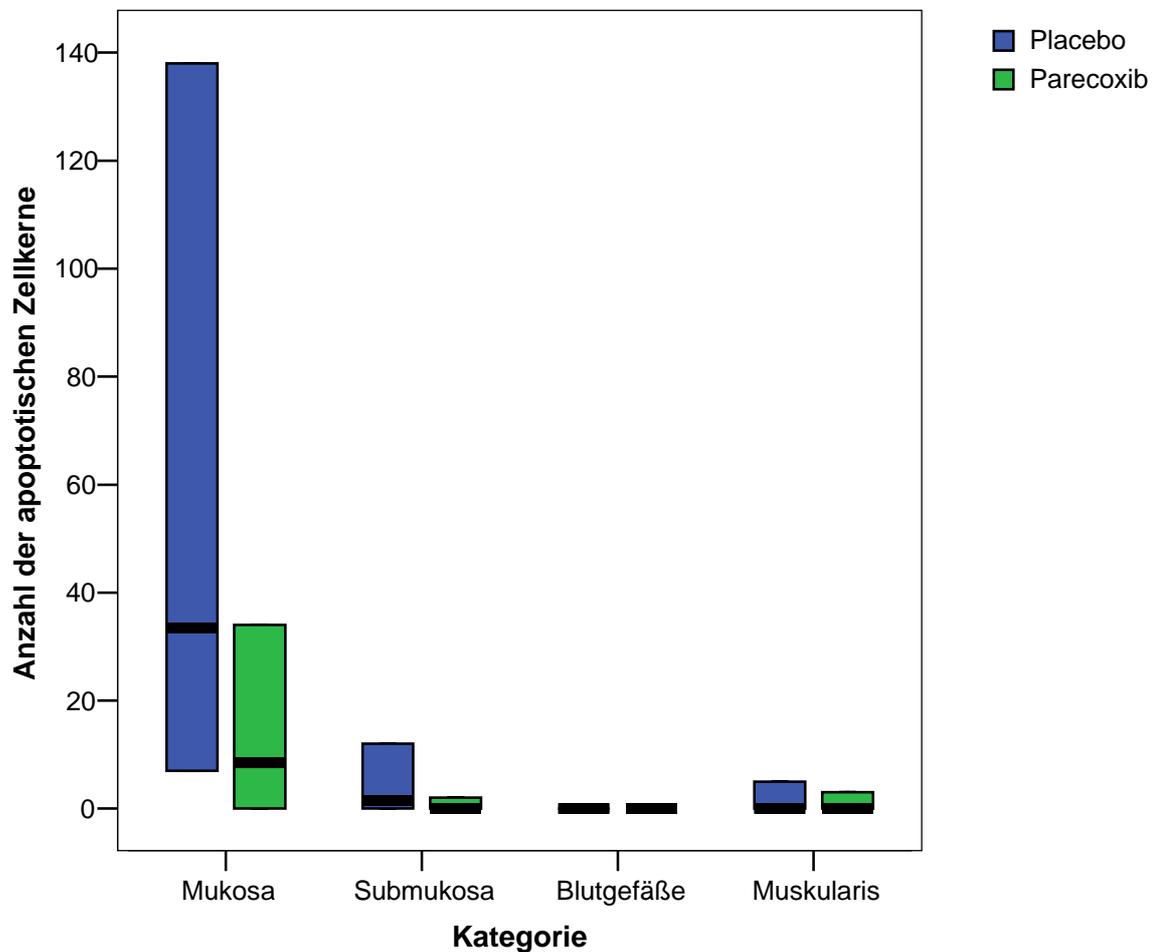


Abbildung 30: Anzahl der apoptotischen Zellkerne im ausgewerteten Areal (Abschnitt der Darmwand von 0,5 cm Länge) beim TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Dünndarm in der Mukosa, der Submukosa, den Blutgefäßen und der Muskularis bei den Tieren der Placebo- und Versuchsgruppe. Daten sind jeweils angegeben als Median (Querbalken), Minimum (untere Begrenzung der Box) und Maximum (obere Begrenzung der Box).

Tabelle 14: Ergebnisse des U-Tests für den Vergleich der Placebo- mit der Versuchsgruppe für den TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) Dünndarm

U-Test Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben

* p-Wert <0,05 (Signifikanz)

Kategorie	Mukosa	Submukosa	Blutgefäße	Muskularis
p-Wert(U-Test)	0,0113 *	0,0382 *	1,0000	0,2161

Vergleich der apoptotischen Zellkerne im ausgewerteten Areal (Abschnitt der Darmwand von 0,5 cm Länge), untergliedert in Mukosa, Submukosa, Blutgefäße und Muskularis zwischen der Kontroll- (Placebo) und der Versuchsgruppe (Parecoxib).

Berechnung eines p-Werts mit dem U-Test. Annahme von Signifikanz bei einem p-Wert <0,05 (*).

Es zeigt sich für die Mukosa und die Submukosa eine signifikant geringere Anzahl an apoptotischen Zellkernen im ausgezählten Darmabschnitt in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

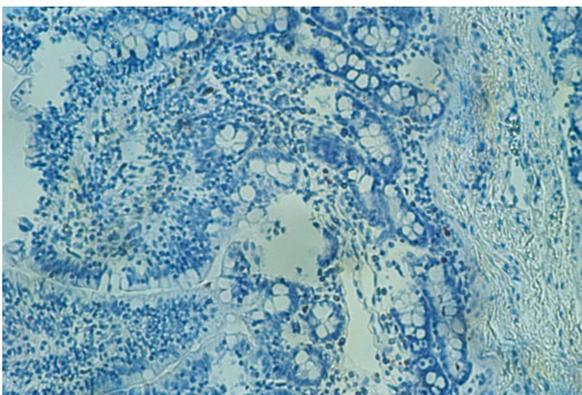


Abbildung 31: Mikroskopisches Präparat TUNEL-Test Placebo (TdT-mediated nick-end labelling technique) Darm

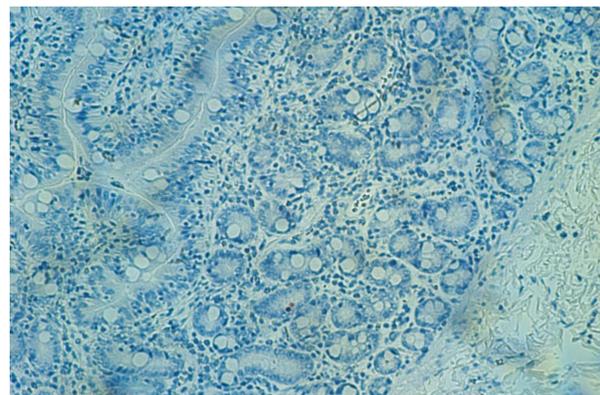


Abbildung 32: Mikroskopisches Präparat TUNEL-Test Parecoxib (TdT-mediated nick-end labelling technique) Darm

3.3 SYSTEMISCHE UND REGIONALE HÄMODYNAMISCHE PARAMETER

Tabelle 15: Vergleich verschiedener systemischer und regionaler hämodynamischer Parameter

Systemische und regionale hämodynamische Parameter vor Versuchsbeginn (baseline), direkt vor dem Declamping (nach 30 Minuten Clamping) und 120 bzw. 240 Minuten nach Declamping.

Daten sind angegeben als Median (Minimum-Maximum).

#: p-Wert <0,05 (Signifikanz) im Friedman repeated measures ANOVA (analysis of variance) on ranks mit anschließendem Dunn´s Test beim Vergleich der MZP 2, 3 und 4 mit dem Ausgangswert (MZP 1) getrennt nach Kontroll- und Versuchsgruppe

§: p-Wert <0,05 (Signifikanz) im Mann-Whitney Rangsummentest (U-Test) zum Vergleich der Daten zwischen den Behandlungsgruppen an einem MZP.

MZP Messzeitpunkt
 CO Cardiac output; Herzzeitvolumen
 pMAP proximaler mittlerer arterieller Druck
 dMAP distaler mittlerer arterieller Druck
 MPAP Mittlerer pulmonalarterieller Druck
 PCWP Pulmonalkapillärer Verschlussdruck
 TLBF Total liver blood flow
 RBF Renal blood flow
 AOBF Distal aortic blood flow

Parameter	Versuchsgruppe	MZP 1 baseline	MZP2 nach 30 Minuten Clamping	MZP3 120 Minuten nach Declamping	MZP4 240 Minuten nach Declamping
CO (ml/min/kg)	Placebo	125 (73-171)	138 (88-217)	128 (92-176)	107 (69-145)
	Parecoxib	128 (96-168)	138 (110-147)	138 (107-164)	107 (93-125)
pMAP (mmHg)	Placebo	98 (85-117)	103 (88-131)	90 (72-110)	88 (76-100)#
	Parecoxib	96 (89-122)	97 (75-131)	88 (76-111)	88 (74-105)#
dMAP (mmHg)	Placebo	95 (71-114)	17 (9-22)#	83 (72-100)	80 (70-97)
	Parecoxib	93 (87-121)	15 (12-18)#	86 (74-107)	84 (78-102)
MPAP (mmHg)	Placebo	27 (20-37)§	29 (25-39)	22 (15-30)#	22 (16-27)§
	Parecoxib	23 (15-24)§	27 (19-34)	22 (18-25)	20 (12-22)§
PCWP (mmHg)	Placebo	11 (7-14)	18 (11-25)	9 (7-12)	7 (4-9)
	Parecoxib	8 (7-11)	15 (7-25)	8 (5-13)	6 (2-8)

Parameter	Versuchsgruppe	MZP 1 baseline	MZP2 nach 30 Minuten Clamping	MZP3 120 Minuten nach Declamping	MZP4 240 Minuten nach Declamping
TLBF (ml/min/kg)	Placebo	20 (14-32)	2 (1-10)#	27 (16-37)	23 (14-37)
	Parecoxib	17 (13-26)	1 (-1-5,5) #	25 (19-37)#	24 (17-33)
RBF (ml/min/kg)	Placebo	4 (1-7)	0 (0-5)#	4 (1-8)	4 (1-7)
	Parecoxib	5 (2-9)	0 (0-0)#	4 (2-8)	4 (2-6)
AOBF (ml/min/kg)	Placebo	25 (14-43)	3 (0-6)#	25 (17-37)	22 (14-33)
	Parecoxib	26 (18-36)	2 (1-5)#	26 (22-32)	22 (16-24)

Der proximale mittlere arterielle Druck war sowohl in der Parecoxib- als auch in der Placebogruppe am MZP4 signifikant geringer im Vergleich zum MZP 1. Der distale mittlere arterielle Druck war bei beiden Gruppen am MZP 2 signifikant geringer als am MZP 1. Der mittlere pulmonalarterielle Druck war bei der Placebogruppe am MZP 3 signifikant geringer als am MZP 1. Der TLBF war bei beiden Gruppen am MZP 2 signifikant geringer als am MZP 1; bei der Parecoxibgruppe am MZP 3 signifikant höher als am MZP 1. Renaler Blutfluss und distaler aortaler Blutfluss waren bei beiden Gruppen am MZP2 signifikant geringer als am MZP 1.

Der MPAP war am MZP 1 und 4 bei der Parecoxibgruppe signifikant geringer als bei der Placebogruppe. Ansonsten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Placebo- und Parecoxibgruppe nachgewiesen werden.

3.4 KLINISCHE CHEMIE

Tabelle 16: Vergleich verschiedener Parameter der klinischen Chemie

Parameter der klinischen Chemie vor Versuchsbeginn (baseline), sowie 120 und 240 Minuten nach Declamping.

Daten sind angegeben als Median (Minimum-Maximum).

#: p-Wert <0,05 (Signifikanz) im Friedman repeated measures ANOVA (analysis of variance) on ranks mit anschließendem Dunn's Test beim Vergleich der MZP 2, 3 und 4 mit dem Ausgangswert (MZP 1) getrennt nach Kontroll- und Versuchsgruppe

§: p-Wert <0,05 (Signifikanz) im Mann-Whitney Rangsummentest (U-Test) zum Vergleich der Daten zwischen den Behandlungsgruppen an einem MZP.

MZP Messzeitpunkt

Parameter	Versuchsgruppe	MZP 1 baseline	MZP3 120 Minuten nach Declamping	MZP4 240 Minuten nach Declamping
Bilirubin arteriell ($\mu\text{mol/l}$)	Placebo	1 (1-2)	1 (1-2)#	1 (0-2)
	Parecoxib	2 (1-2,5)	2 (1-3)	1 (1-6)
Kreatinin arteriell ($\mu\text{mol/l}$)	Placebo	125 (111-185)§	142 (140-201)#§	137 (130-190)§
	Parecoxib	148 (131-164)§	180 (156-200)#§	160 (147-192)§
Sammel- urin (ml)	Placebo			1054 (842-1533)
	Parecoxib			944 (788-1533)

Die Bilirubinkonzentration im arteriellen Blut war bei der Placebogruppe am MZP 3 signifikant geringer als am MZP 1. Die arteriellen Kreatininkonzentrationen waren bei beiden Gruppen am MZP 3 signifikant höher als am MZP 1. Die arteriellen Kreatininkonzentrationen waren außerdem am MZP 1, 3 und 4 bei der Parecoxibgruppe signifikant höher als bei der Placebogruppe. Bei der Menge des Sammelurins konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

3.5 PROSTAGLANDINE

Tabelle 17: Vergleich einzelner Prostaglandine zwischen Versuchs- (Parecoxib) und Placebogruppe

Messdaten zu Versuchsbeginn (baseline), sowie 120 und 240 Minuten nach Declamping.

Daten sind angegeben als Median (Minimum-Maximum).

#: p-Wert <0,05 (Signifikanz) im Friedman repeated measures ANOVA (analysis of variance) on ranks mit anschließendem Dunn's Test beim Vergleich der MZP 2, 3 und 4 mit dem Ausgangswert (MZP 1) getrennt nach Kontroll- und Versuchsgruppe.

§: p-Wert <0,05 (Signifikanz) im Mann-Whitney Rangsummentest (U-Test) beim Vergleich der Daten zwischen den Behandlungsgruppen an einem MZP.

MZP Messzeitpunkt

6-keto PG 6-keto-Prostaglandin

TBX B₂ Thromboxan B₂

Parameter	Versuchsgruppe	MZP 1 baseline	MZP3 120 Minuten nach Declamping	MZP4 240 Minuten nach Declamping
6-keto PG (pg/g Protein)	Placebo	4897 (2774-11643)	7970 (2999-17059)#§	5758 (4100-13177)§
	Parecoxib	3587 (2680-5615)	2535 (2241-3972)§	2259 (1620-5886)§
TBX B₂ (pg/g Protein)	Placebo	6458 (3958-13252)	7589 (3755-12351)	6947 (4606-9701)
	Parecoxib	6471 (3691-33573)	8196 (4885-12280)	9781 (3657-23048)

Die 6-keto-Prostaglandin-Konzentration war bei der Placebogruppe am MZP 3 signifikant höher als am MZP 1. Die 6-keto-Prostaglandin-Konzentrationen waren an den MZP 3 und 4 bei der Parecoxibgruppe signifikant geringer als bei der Placebogruppe.

Bei der TBX B₂-Konzentration konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten oder den Gruppen festgestellt werden.

4 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Auswirkungen der Gabe des selektiven COX-2-Hemmers Parecoxib, einer injizierbaren Vorstufe von Valdecoxib, in einer klinisch relevanten Ischämie-/Reperfusionstudie am Grosstiermodell "Deutsches Hausschwein" zu untersuchen. Hierbei sollte insbesondere die Auswirkung der Gabe von Parecoxib auf die Expression der CDKI-Gene p21 und p27 in den mangel durchbluteten Organen Rückenmark, Niere, Dünndarm, Leber und Skelettmuskel (untere Extremität) sowie die Anzahl der Apoptosen (TUNEL-Test) in den Organen RM, Niere und Dünndarm untersucht werden.

Des Weiteren wurde auch der Effekt von Parecoxib auf die systemische und lokale Hämodynamik, sowie auf Parameter der klinischen Chemie und einzelner Prostaglandine untersucht.

Als Hauptergebnis lässt sich festhalten, dass sich bei der Immunhistochemie und im TUNEL-Test bei einigen der untersuchten Organe eine signifikant geringere Expression von p21/p27 bzw. eine signifikant geringere Anzahl an apoptotischen Zellkernen bei der Versuchsgruppe Parecoxib im Vergleich zur Kontrollgruppe fand.

4.1 EFFEKT DER GABE VON PARECOXIB AUF DIE EXPRESSION DER CELLULAR SENESENCE –MARKER P21 UND P27

4.1.1 THEORETISCHER HINTERGRUND

Der Begriff "Cellular Senescence" steht für Zellalterung. Wie bereits eingangs erwähnt, können sich eukaryote somatische Zellen nicht beliebig oft teilen, sondern gehen nach einer bestimmten Anzahl an durchlaufenen Zellzyklen in einen irreversiblen Ruhezustand über. Diese Limitierung somatischer Zellen in vivo wird auch als "Hayflick limit" bezeichnet [35]. „Cellular senescence“ ist somit ein physiologischer Vorgang im eukaryonten Organismus. Dabei bleiben die Zellen nach erfolgter Mitose irreversibel in der sog. G₁-Phase des Zellzyklus

stehen. Diese Zellen reagieren nicht mehr auf vielerlei externe Stimuli, bleiben aber dennoch metabolisch aktiv und können so auch z.B. zu einer anhaltenden Entzündung beitragen [97].

Eine Möglichkeit, die komplexen Vorgänge der Seneszenz messbar zu machen, ist die immunhistochemische Anfärbung des zu untersuchenden Gewebes mit Antikörpern gegen die CDKI-Gene (cyclin-dependent-kinase-inhibitors). Die cyclin-dependent kinase inhibitors sind in vivo wesentlich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. In dieser Studie wurden die Genprodukte von 2 exemplarischen Vertretern der CDKI-Gene untersucht: p21 und p27. Es gibt bereits Studien, die eine gesteigerte Expression von p21 bzw. p27 nach Ischämie bzw. Ischämie/Reperfusion z.B. nach Nierentransplantation nachweisen konnten [44,79,80]. Des Weiteren konnte eine progressive Anreicherung von p21 in alternden Zellen in einer Studie an humanen diploiden Fibroblasten [99] und eine Überexpression von p27 bei seneszenten Zellen [2] nachgewiesen werden. In der hier durchgeführten Studie soll untersucht werden, ob sich die Hochregulierung von p21/p27 nach Ischämie-/Reperfusionssequenz durch die Gabe des COX-2 Hemmers Parecoxib vermindern lässt.

Auf molekularer Ebene führt der vorübergehende Anstieg an reaktiven Sauerstoffmetaboliten im Organismus bei einer I/R-Sequenz zu DNS-Strangbrüchen, insbesondere an den Telomeren [110,111]. Diese Strangbrüche an der DNS können zu einer Aktivierung von p53 führen, was dann wiederum über eine Aktivierung von Mitgliedern der CDKI-Familie (und einer veränderten Expression von u.a. p21) eine Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus und eine Seneszenz zur Folge hat [39,98]. Eine Hochregulierung von CDKI-Genen kann somit Ausdruck einer Schädigung der Zelle sein, z.B. bedingt durch eine Ischämie-/Reperfusionssequenz, aber ebenso als protektiver Mechanismus gegen eine Replikation solcher I/R geschädigter Zellen betrachtet werden [93].

In der durchgeführten Studie sollte die Fragestellung untersucht werden:

Lässt sich durch die Gabe von Parecoxib eine geringere Expression von p21 und p27 feststellen, da durch die Gabe von Parecoxib weniger Zellschädigung im Rahmen der I/R-Sequenz auftritt?

4.1.2 AUSWIRKUNGEN AUF DIE UNTERSUCHTEN ORGANE

Vulnerable Organe:

Bei den Tieren der Versuchsgruppe Parecoxib fand sich in der grauen Substanz, in der weißen Substanz und auch in den Blutgefäßen des Rückenmarks eine signifikant geringere Anzahl an angefärbten Zellkernen im Vergleich zur Placebo-Gruppe bei Anfärbung mit Antikörpern gegen p21 und p27.

Bei der Färbung des RM p21 konnte bei jedem Versuchstier ein gesamter Rückenmarksquerschnitt ausgezählt werden. Aufgrund der hohen Anzahl angefärbter Zellkerne, insbesondere auch in der weißen Substanz, war es bei der Färbung RM p27 nicht möglich, einen kompletten Rückenmarksquerschnitt auszuzählen. In einer 10 fachen Vergrößerung am Mikroskop war es auch nicht immer möglich, zuverlässig angefärbte Zellkerne (im Vergleich zu einer lediglich zytoplasmatischen Anfärbung einer Zelle) zu identifizieren. Daher erfolgte die Auszählung eines Gesichtsfeldes bei 20 facher Vergrößerung. Aufgrund der homogenen Anfärbung der Präparate war es nicht notwendig, dies für mehrere Gesichtsfelder zu wiederholen.

Eine Ischämie führt zur vermehrten Produktion von Zytokinen und "immediate early genes", die für Zellen im zentralen Nervensystem schädlich sein können [25]. Das Produkt eines dieser "immediate early genes" ist die Zyklooxygenase-2. Sie ist das Schlüsselenzym im Arachidonsäuremetabolismus bei der Produktion von Prostaglandinen und Thromboxanen. Diese Substanzen können eine entzündliche Reaktion unterstützen und erhalten [53]. Die COX-2 wird durch Gabe des Parecoxib vor der Ischämie gehemmt. Für die selektiven COX-2 Inhibitoren SC-58125 and NS-398 konnte bereits gezeigt werden, dass sie dem verzögerten Zelltod von Neuronen im Hippocampus des Gehirns nach einer Ischämie vorbeugen können [73] und auch die Infarktgröße verringern können [71]. Die COX-2 Expression findet nach solchen Schädigungen in den Neuronen statt, die sterben werden [48]. Eine Expression der COX-2 scheint also einen negativen Einfluss auf das Überleben der Nervenzelle zu haben. Die Rückenmarkszellen der mit Parecoxib behandelten Tiere exprimieren nach 30 minütiger Ischämie und anschließender Reperfusion signifikant weniger p21 und p27 (im Vergleich zur

Kontrollgruppe). Dies gilt nicht nur für die ischämie-sensiblen Motoneurone des Rückenmarks [90], sondern auch für die Gliazellen der weißen Substanz.

Ein geplantes Monitoring von motorisch evozierten Potentialen war aufgrund technischer Probleme nicht möglich. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass anhand motorisch evozierter Potentiale (verglichen mit somatosensorisch evozierten Potentialen) sensitiver und spezifischer eine Rückenmarksischämie erkennbar ist und dass ein intraoperatives Monitoring von motorisch evozierten Potentialen helfen kann, eine Paraplegie zu vermeiden [22]. Das Monitoring von motorisch evozierten Potentialen hilft somit eine spinale Ischämie festzustellen, um chirurgische Maßnahmen zur Reduktion eines neurologischen Defizits einzuleiten [42]. Ebenso korreliert die Anzahl an morphologisch normalen Neuronen im Vorderhorn mit der neurologischen Funktion nach infrarenaler Okklusion der Aorta beim Kaninchen [17].

Bei der Anfärbung der Niere zeigte sich lediglich für die Tubuli p21 eine signifikant geringere Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Versuchsgruppe Parecoxib im Vergleich zur Placebogruppe. Es wurde ein 0,5 cm x 0,5 cm großes Quadrat in der Nierenrinde ausgewählt und alle angefärbten Zellkerne in diesem Quadrat, getrennt nach Glomeruli, Tubuli, Blutgefäßen und Bindegewebe, gezählt. Die Färbung der Niere p21 stellte sich qualitativ gut dar. Es gab nur eine geringe Hintergrundfärbung; somit war eine exakte Auswertung möglich. Die Färbung der Niere p27 stellte sich verwaschener dar als die p21-Färbung. Es bestand eine stärkere Hintergrundfärbung, so dass teilweise eine exakte Unterscheidung zwischen zytoplasmatischer Anfärbung und Zellkernfärbung schwierig war. Es wurden einige andere Antikörper getestet, bei dem verwendeten war die Anfärbung aber noch am klarsten bei minimaler Hintergrundfärbung. Des Weiteren hatte sich der Antikörper bereits bei vorangegangenen Studien mit Nierengewebe vom Schwein bewährt.

Es ist bekannt, dass eine Ischämie/Reperfusionverletzung der Nieren zu renaler Zellschädigung bis hin zum akuten Nierenversagen führen kann. Bereits in früheren Studien war zu erkennen, dass eine Ischämie-/Reperfusionsequenz an der Niere zu einer Telomerlängenverkürzung und auch zu einer Überexpression der CDKI p21 und p27 führt. Dies deutet auf einen DNS-Schaden oder auch auf eine beschleunigte "tissue senescence" hin [18]. Andererseits konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass die Nierenfunktion bei p21(-/-) Mäusen

deutlich schlechter und damit die Mortalität deutlich höher war. Bei ihnen fanden sich deutlich erhöhte Level an Zellzyklusaktivität, die für die erhöhte Mortalität verantwortlich gemacht werden [63]. Eine fehlende Expression von p21 wird hier also für eine erhöhte Mortalität der Versuchstiere verantwortlich gemacht.

Bei der I-/R-Sequenz sind die Tubuluszellen am empfindlichsten. P21 soll hierbei eine wichtige Rolle spielen [56]. Aus den Ergebnissen der durchgeführten Studie wird nicht ganz klar, ob sich durch die Gabe von Parecoxib eine Zellschädigung in den Nieren vermeiden oder zumindest vermindern lässt. Bei der Färbung nach p27 sind keine signifikanten Veränderungen bei der Versuchsgruppe im Vergleich zu den Placebo-Tieren zu erkennen. Bei p21 allerdings ist klar zu erkennen, dass bei den Tubuli signifikant weniger Zellkerne angefärbt waren als bei der Kontrollgruppe. Dies deutet darauf hin, dass zumindest die sensiblen Tubulusepithelzellen eine geringere Schädigung durch die Ischämie-/Reperusionssequenz erfahren. Dass dieser Unterschied bei den übrigen Zellen nicht zu erkennen ist, kann daran liegen, dass die Zellen weniger sensibel für eine Ischämie sind. Evtl. würden nach längerer Ischämiezeit die Unterschiede deutlicher werden. Außerdem könnte die Zeit zwischen der Schädigung und der Untersuchung des Gewebes zu kurz gewesen sein. Das Gewebe wurde bereits 4 Stunden nach Beendigung des Clampings entnommen. Evtl. treten die Schäden bzw. deren nachweisbare Auswirkungen erst nach einer längeren Nachbeobachtungszeit auf.

Bei den Zellen der Mukosa und der Blutgefäße des Dünndarms zeigten sich für p21 und p27 signifikant geringere Anzahlen an angefärbten Zellkernen bei den Parecoxib-Tieren im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe. Es wurde ein Feld von 0,5 cm Länge ausgezählt. Die Breite des ausgezählten Feldes entsprach der Dicke der Darmwand. So sollte ein möglichst gleich großes ausgezähltes Areal bei allen Tieren erreicht werden. Es wurden in diesem Feld alle angefärbten Zellkerne, aufgeteilt nach Mukosa, Submukosa, Blutgefäßen und Muskularis, gezählt. Nicht mitgezählt wurden evtl. vorhandene Anfärbungen in Schleimresten im "Lumen". Ebenfalls nicht gewertet wurden Zellen in evtl. im ausgezählten Feld liegenden Peyer-Plaques. Diese waren nur in einer geringen Anzahl der betrachteten Präparate zu erkennen. Um die Wertung nicht zu verfälschen, wurden sie daher ausgespart. Die Färbung p21 Dünndarm zeigte eine sehr klare

Anfärbung der Zellkerne, die Hintergrundfärbung war zu vernachlässigen. Die Färbung p27 Dünndarm war insgesamt gut auswertbar. Es wurde hier eine 1:100 Verdünnung des Antikörpers verwendet, da die Anfärbung und auch die Hintergrundfärbung bei der 1:50 Verdünnung zu stark waren.

Der Dünndarm und alle Organe des portalvenösen Stromgebietes können im Rahmen einer Ischämie-/Reperfusionsequenz gravierende Schäden erleiden und diese können im Rahmen eines Multiorganversagens bzw. eines SIRS auch zu letalen Komplikationen führen. Daher ist es wichtig eine Möglichkeit zu finden, diese Schäden zu vermeiden. Die zytoprotektive Rolle einiger Prostaglandine im Magen-Darm-Trakt [65,86,87] und die Anregung von Reparaturmechanismen im verletzten gastrointestinalen Epithel durch bestimmte Prostaglandine [8,121] ist bereits hinreichend bekannt. So spielt auch die COX-2 eine wichtige Rolle in der Reparatur der Mukosa des Magens [67]. Dennoch stellte sich in unserer Studie durch die Gabe eines COX-2 Inhibitors die Anfärbung der Zellen mit Antikörpern gegen p21 und p27 deutlich geringer dar im Vergleich zur Placebo-Gruppe. In einer anderen Studie am Schwein wird beschrieben, dass eine Hemmung der COX-2 die Erholung einer Ischämie-induzierten Verletzung der Mukosa nicht behindert [9]. Es wird sogar eine Schutzfunktion des selektiven COX-2 Hemmers FK3311 für den Dünndarm nach Ischämie/Reperfusion beschrieben [45]. In einer Studie an ischämischem Pferdegewebe wird beschrieben, dass durch die Gabe eines nicht-selektiven COX-Hemmers (flunixin meglumine) die Produktion von PGE₂ und PGI₂ gehemmt wird und keine Hinweise auf eine Erholung des Gewebes gefunden werden konnten, während bei Gabe des selektiven COX-2 Hemmers Etodolac die Konzentration von PGE₂ und PGI₂ signifikant anstieg und auch eine Erholung erkennbar war [12]. Die Gabe des selektiven COX-2 Hemmers führte also im Gegensatz zum unselektiven COX-Hemmer zur besseren Erholung des Gewebes. Bei Gabe eines selektiven COX-2 Hemmers scheinen also die positiven entzündungshemmenden Effekte die negativen (Verschlechterung der Durchblutung durch Hemmung vasodilatierender Prostaglandine) zu überwiegen.

Nicht-vulnerable Organe:

Bei der Anfärbung des Lebergewebes mit Antikörpern gegen p21 fand sich lediglich für das Bindegewebe eine signifikant geringere Anzahl an angefärbten Zellkernen bei der Parecoxib- im Vergleich zur Placebogruppe. Bei der Färbung p27 fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei der Leber konnte für die p27 Färbung ein 0,5 cm x 0,5 cm großes Feld ausgezählt werden. Für die p21 Färbung war dies aufgrund der hohen Menge an angefärbten Zellkernen nicht möglich. Da die Färbung bereits bei einer Vergrößerung von Faktor 10 zuverlässig erkennbar und beurteilbar war, wurde hier lediglich ein Gesichtsfeld bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt. Die Färbung war in den betrachteten Präparaten homogen verteilt, so dass keine Mittelung aus mehreren ausgezählten Gesichtsfeldern vorgenommen wurde. Im betrachteten Feld wurden die Zellkerne getrennt nach Leberzellen/Sinusoiden, Blutgefäßen (vor allem periportal) und Bindegewebe (vor allem periportal) gezählt. Die meiste Anfärbung fand sich in den "Leberzellen". Bei Betrachtung bei höherer Vergrößerung im Mikroskop stellte sich allerdings heraus, dass nicht auszuschließen ist, dass sich hier nicht die Hepatozyten sondern evtl. auch (eingewanderte?) Zellen in den Sinusoiden darstellen. Da sich dies im Einzelfall nicht klar unterscheiden ließ, wurden Hepatozyten und Zellen in den Sinusoiden in dieser Kategorie zusammengefasst.

Eine der Zellarten in der Leber, die bei der Ischämie-/Reperfluationssequenz eine große Rolle spielt, sind die Kupffer-Zellen [95,104]. Die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF_{alpha}, IL-1) durch aktivierte Kupffer-Zellen soll eine Rolle bei der I/R-Verletzung spielen, eine Hemmung der Kupffer-Zellen die Leber vor einer I/R-Verletzung schützen können, indem die Freisetzung von TNF_{alpha} durch eine Downregulation des toll-like receptor 2 gehemmt wird [120]. Es wäre interessant gewesen, ob sich im Lebergewebe der untersuchten Schweine auch Kupffer-Zellen angefärbt haben und ob diese durch die Ischämie besonders geschädigt wurden.

Die Färbung p27 war teilweise schwierig auszuwerten. Die Färbung stellte sich in den verschiedenen Präparaten sehr unterschiedlich dar, ebenso fand sich eine kräftige Hintergrundfärbung. Mit keinem anderen getesteten Antikörper war allerdings überhaupt eine Anfärbung des Schweinegewebes möglich, daher wurde

der Santa Cruz Antikörper verwendet. Die Färbung nach p21 hingegen war klar auswertbar und ohne wesentliche Hintergrundfärbung. Erstaunlicherweise zeigten einige Parecoxib-Tiere auch bei wiederholter Färbung keinerlei Anfärbung mit den p21-Antikörpern.

Eine Ischämie kann zu einer Störung der Leberfunktion führen. Insbesondere soll aber auch der plötzliche Wiedereinstrom des Blutes in zuvor ischämisches Gewebe zu einer massiven Gewebeschädigung u.a. durch Enzymfreisetzung führen [23]. Eine weitere wichtige Rolle bei der Ischämie-/Reperfusionsschädigung der Leber sollen die Störung der Mikrozirkulation [46], ebenso wie eine entstehende inflammatorische Reaktion spielen. Bisher konnte lediglich bei NFκB-Inhibitoren eine Effektivität gegen eine I/R-Schädigung der Leber nachgewiesen werden [60]. In dieser Studie konnte kein Effekt des antiinflammatorischen Medikaments Parecoxib auf die Expression der Seneszenz-Marker p21 und p27 festgestellt werden. Die Expression von p21 war in einer anderen Studie nach 12 und 24 Std. Reperfusion deutlich induziert, in derselben Studie wird aber auch vorgeschlagen, dass p21 in die Auflösung (resolution) und Erholung von einer I/R-Schädigung der Leber involviert sein könnte [4]. Das Gewebe in der hier durchgeführten Studie wurde bereits 4 Stunden nach Reperfusion entnommen. Daher ist nicht zu beurteilen, ob eine Überexpression nach 12 bzw. 24 Stunden stattgefunden hätte.

Weder bei der Anfärbung des Skelettmuskelgewebes aus der unteren Extremität mit Antikörpern gegen p21, noch bei der Anfärbung mit Antikörpern gegen p27 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Parecoxib- und der Placebogruppe. Beim Skelettmuskel konnte bei beiden Färbungen ein 0,5 cm x 0,5 cm großes Areal markiert und anschließend ausgezählt werden. Hierbei wurden die Zellkerne von Muskelzellen, Blutgefäßen und Bindegewebe unterschieden und getrennt ausgezählt. Die Aufbereitung und Anfärbung des Muskelgewebes gestaltete sich teilweise schwierig. Teilweise schien das Muskelgewebe, obwohl makroskopisch auf dem Objektträger intakt, im mikroskopischen Präparat "zerfetzt". An den entstandenen Kanten und Auffaltungen fand sich, wie oftmals an Rändern, eine deutlich verstärkte aber auch unspezifische Anfärbung. Daneben fand sich in einigen Präparaten fast keine Anfärbung.

Beim Skelettmuskel der unteren Extremität fand sich kein Einfluss von Parecoxib auf die Expression der Seneszenz-Marker. Allerdings funktionierte die Färbung des Muskelgewebes nicht optimal. Bei einigen Tieren war fast keine Anfärbung zu erkennen und die Anfärbung war auch sehr abhängig von der Qualität des Gewebes/Gewebeschnittes. Des Weiteren war die Ischämiezeit für den Skelettmuskel wohl zu kurz, um nachweisbare Schäden zu erzeugen und die Zeit zwischen dem Klemmen und der Gewebeentnahme war möglicherweise ebenfalls zu kurz. Der entstandene Schaden war dadurch eventuell morphologisch noch nicht voll ausgeprägt und nachweisbar. In einer anderen Studie konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von p21 deutlich gesteigert war bei einer Reperfusion nach 3 bzw. 6 h Ischämiezeit [31]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass bei einer Hypoxie/Reoxygenierung bzw. beinahe Ischämie/Reperfusion des Skelettmuskels das Gen für p27 hochreguliert wird [3].

4.2 EFFEKT DER GABE VON PARECOXIB AUF DIE ANZAHL DER APOPTOSEN

4.2.1 THEORETISCHER HINTERGRUND

Bei der Apoptose handelt es sich im Gegensatz zur Nekrose um einen physiologisch im Organismus auftretenden Prozess. Es handelt sich dabei um den so genannten "programmierten Zelltod", der eine große Rolle bei der Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Zellverlust und Zellgewinn spielt. Ebenfalls eine große Rolle wird der Apoptose bei der Karzinogenese bzw. bei der Elimination von mutierten sowie anderweitig geschädigten Zellen zugeschrieben. Die Apoptose läuft nach einem festen Schema ab, bei dem es in einem späteren Stadium zur DNS-Fragmentierung kommt. Diese DNS-Fragmente macht man sich zunutze, um mit Hilfe des TUNEL-Tests apoptotische Zellen zu identifizieren. Die TUNEL-Methode macht dabei freie 3'-OH-End-Gruppen sichtbar [57]. Ischämie kann den Prozess der Apoptose anstoßen [57].

4.2.2 AUSWIRKUNGEN AUF DIE UNTERSUCHTEN ORGANE

Es zeigte sich beim Rückenmark keine signifikant verschiedene Anzahl apoptotischer Zellkerne bei Versuchs- und Kontrollgruppe bei einer insgesamt geringen Anzahl an apoptotischen Zellkernen. Es wurde ein kompletter Rückenmarksquerschnitt, getrennt nach grauer Substanz, weißer Substanz und Blutgefäßen, ausgewertet.

Es ist bekannt, dass Ischämien des RM eine Apoptose der Motoneurone zur Folge haben können [34,58]. Bereits nach 15-minütiger Ischämie und anschließender Reperfusion lassen sich nach 2 Tagen Reperfusion einige Motoneurone mit der TUNEL-Färbung darstellen [34]. Das Rückenmark ist somit eines der empfindlichsten Gewebe des Körpers und eine 30 minütige Ischämie wie in dieser Studie sollte einen ausreichenden Stressor darstellen, um Apoptosen auszulösen. Möglicherweise war das Maximum der Anzahl der apoptotischen Zellkerne noch nicht erreicht; es wird beschrieben, dass die Anzahl TUNEL-positiver Zellen nach Ischämie ein Maximum nach 24 Stunden erreicht, die apoptotischen Zellen finden sich dabei eher "intermediate" bis ventral [58]. Hier wurde das Gewebe bereits 4 Stunden nach Reperfusion entnommen; eventuell hätte man bei längerer Nachbeobachtungszeit mehr Apoptosen erkennen können. Der Aktivität der Zyklooxygenase-2 wird eine Rolle beim Zelltod nach Ischämie zugeschrieben. Durch die COX-2 wird das Cyclin D₁ induziert; sowohl durch eine Hemmung der COX-2 durch NS 398 als auch eine Hemmung des Cyclin D₁ ließ sich die DNS-Fragmentierung nach Anoxie senken und das neuronale Überleben steigern [117]. Ebenso konnte für den selektiven COX-2 Hemmer Nimesulide eine Hemmung der Neuronen-Schädigungen im Hippocampus nachgewiesen werden [91]. Die sekretorische Phospholipase A₂ induziert den neuronalen Zelltod durch Apoptose; dies kann ebenfalls durch einen COX-2 Inhibitor gehemmt werden [119]. In einer Studie, die eine Reduktion des Ischämie-/Reperfusionsschadens durch Gabe von rHuEPO untersuchte, wurden bereits Parallelen zwischen einem histopathologisch nachweisbaren neuroprotektiven Effekt (mit TUNEL-Test nachgewiesene Apoptosen) und dem neurologischen Untersuchungsergebnis gesehen [16]. Ebenfalls wurden bei Ratten, die Linolensäure zur Vermeidung eines Ischämie-/Reperfusionsschadens des Rückenmarks erhielten, weniger Apoptosen nachgewiesen und die Tiere zeigten eine bessere neurologische Funktion [54].

Bei der Niere ließen sich keine signifikanten Veränderungen bzgl. der Anzahl der Apoptosen zwischen den mit Parecoxib behandelten Tieren und denen der Kontrollgruppe feststellen. Es wurde ein 0,5 cm x 0,5 cm großes Areal der Nierenrinde in jedem Präparat markiert und alle Apoptosen in diesem Areal, getrennt nach Glomeruli, Tubuli und Blutgefäßen, ausgezählt.

In der Literatur wird beschrieben, dass der apoptotische Zelltod eine frühe Konsequenz von Ischämie/Reperfusion bei Mäusenieren sein kann [76]. Ein möglicher Ansatzpunkt mit einem COX-2 Hemmer die I/R-Schäden zu reduzieren, liegt in der Entzündung (neutrophil adherence), die als eine der Hauptursachen für I/R-Gewebsschädigungen angesehen wird [109]. In der hier durchgeführten Studie ließ sich kein Effekt bei Gabe von Parecoxib vor dem Clamping auf die Anzahl der Apoptosen in der Niere erkennen.

Bei den Kategorien Mukosa und Submukosa im Dünndarm ließ sich eine signifikant geringere Anzahl an Apoptosen im untersuchten Gewebe der mit Parecoxib behandelten Schweine im Vergleich zu den Schweinen der Kontrollgruppe erkennen. Eine Apoptose in einem Blutgefäß des Dünndarms war in keinem der Präparate der Kontroll- und Versuchsgruppe erkennbar. Es wurde ein 0,5 cm langer Abschnitt der Dünndarmwand markiert und alle apoptotischen Zellkerne in diesem Areal getrennt nach Mukosa, Submukosa, Blutgefäßen und Muskularis ausgezählt. Nicht gewertet wurden apoptotische Kerne in eventuell vorhandenen Peyer-Plaques oder in Schleimauflagerungen im "Darmlumen".

Bereits in anderen Studien wurde berichtet, dass die Mukosa des Darms ein sehr empfindliches Gewebe für eine Ischämie-/Reperusionsverletzung ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass eine I/R-Sequenz im Darm eine Apoptose der Enterozyten induzieren kann [96]. Eine Ischämie mit anschließender Reperfusion des zuvor ischämischen Gewebes führt zu einer Verschlechterung des Gewebes Schadens [75]. Im Gastrointestinaltrakt ist Apoptose allerdings auch ein wichtiges physiologisches Phänomen der Zellerneuerung [83,84]. Die Induktion der Apoptose bei I-/R-Sequenz passiert während der ischämischen Phase und hält noch in der frühen Reperusionsphase an. Die maximale DNS-Fragmentierung findet ca. 1 h nach Reperfusion statt, 6 h danach sind schon wieder die Ausgangswerte erreicht [75]. Die maximale DNS-Fragmentierung müsste in dieser Versuchsanordnung also bereits erreicht und überschritten sein, dennoch ist unsicher, ob bereits alle von der DNS-Fragmentierung betroffenen

apoptotischen Zellen nach 4 Stunden Reperfusion nachweisbar sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch Sucralfat und auch durch HGF (Hepatocyte Growth Factor) die Anzahl an Apoptosen im Darm nach I/R-Sequenz vermindert werden konnte [52,96]. Eine Verminderung der Apoptosen durch einen COX-2 Hemmer konnte bisher meines Wissens nicht nachgewiesen werden. Im Rahmen einer Studie zum Vergleich von konventioneller offener Aortenaneurysma-Reparatur und EVAR (endovascular aneurysm repair) zeigte sich, dass nach offener OP ein deutlicher Anstieg der Apoptosen, sowie von IL-6 und TNF_{alpha} stattfand, wobei IL-6 in den Splanchnikusgefäßen mit der Klemmzeit und den vermehrten Apoptosen positiv korrelierte. Bei der EVAR zeigte sich lediglich postoperativ (nicht aber intraoperativ) ein Anstieg an IL-6 und TNF_{alpha}, es konnten keine histologischen Veränderungen im Vergleich zum Vorbefund gesehen werden [27].

4.3 EFFEKT DER GABE VON PARECOXIB AUF HÄMODYNAMISCHE PARAMETER, PARAMETER DER KLINISCHEN CHEMIE UND PROSTAGLANDINE

Während des Clampings wurde versucht, die systemischen hämodynamischen Parameter mittels intravenöser Gabe von Nitroglyzerin, Esmolol und Adenosintriphosphat stabil zu halten. Distal der Clampingstelle war der mittlere arterielle Druck während des Clampings bei Versuchs- und Kontrollgruppe signifikant niedriger als der Ausgangswert. Ebenso war während des Clampings der Blutfluss in der Leber, der distalen Aorta und den Nieren bei beiden Gruppen signifikant niedriger als der Ausgangswert.

Die arteriellen Kreatininkonzentrationen waren bei beiden Gruppen 120 Minuten nach Declamping signifikant höher als der Ausgangswert, näherten sich aber 240 Minuten nach Declamping schon wieder dem Ausgangswert an. Die Verschlechterung der Nierenfunktion durch das Clamping/Declamping scheint also nur temporär zu sein. Die arteriellen Kreatininkonzentrationen waren an allen Messzeitpunkten bei der Parecoxibgruppe signifikant höher als bei der Placebogruppe. Die Parecoxib-Infusion wurde 45 Minuten vor dem Clamping begonnen und kann somit bereits am MZP 1 gewirkt haben. Bei der Menge des

Sammelurins und bei der arteriellen Bilirubinkonzentration konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Die 6-keto-Prostaglandin-Konzentration war bei der Placebogruppe 120 Minuten nach Declamping signifikant höher als davor. Die 6-keto-Prostaglandin-Konzentrationen waren nach dem Clamping bei der Parecoxibgruppe signifikant geringer als bei der Placebogruppe. Bei der TBXB₂-Konzentration konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten oder den Gruppen festgestellt werden.

4.4 STELLUNGNAHME ZUR FRAGESTELLUNG DER STUDIE

4.4.1 KANN DURCH DIE GABE DES COX-2 HEMMERS PARECOXIB EIN AUFTRETENDER ISCHÄMIE-/REPERFUSIONSSCHADEN IN DEN ORGANEN DES SPLANCHNIKUSGEBIETES, DER NIERE, DER UNTEREN EXTREMITÄT UND DES RÜCKENMARKS BEGRENZT WERDEN?

Die vorliegende Studie gibt Hinweise darauf, dass durch die Gabe des selektiven COX-2 Hemmers Parecoxib ein Ischämie-/Reperfusionsschaden in einigen der untersuchten Organe abgeschwächt werden kann.

So fand sich für das RM eine signifikant geringere Expression an p21 und p27 bei den mit Parecoxib behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Folglich scheint das RM der Parecoxib-Tiere weniger Schaden durch die 30-minütige Ischämie und anschließende Reperfusion, als das der Tiere der Kontrollgruppe genommen zu haben. Für die Niere war diese Schutzwirkung nicht eindeutig nachweisbar. In der p21 Immunhistochemie zeigte sich allerdings für die ischämieempfindlichsten Zellen der Niere, die Tubuluszellen, eine signifikante geringere Anfärbung bei Parecoxib im Vergleich zu Placebo. Für die p27 Färbung fand sich kein signifikantes Ergebnis, die Färbung war aber auch nicht sauber, es war kein optimaler Antikörper für das Schweinegewebe zu finden. Sowohl für Niere, als auch für Rückenmark ließen sich keine signifikanten Unterschiede bei der Anzahl der Apoptosen finden. Bei den Organen des Splanchnikusgebietes bestanden deutliche Unterschiede zwischen den untersuchten Organen Leber und

Dünndarm. Beim Dünndarm zeigte sich für die Mukosa und die Blutgefäße eine signifikant niedrigere Expression von p21 und p27 und signifikant weniger Apoptosen in Mukosa und Submukosa bei den mit Parecoxib behandelten Tieren. Bei der Leber hingegen zeigte sich lediglich für das Bindegewebe in der Anfärbung mit Antikörpern gegen p21 eine signifikant geringere Expression bei den Parecoxib-Tieren. Ein TUNEL-Test wurde nicht durchgeführt. Möglicherweise ist die Ischämieempfindlichkeit der Leber geringer als die bekanntermaßen hohe Empfindlichkeit des Darmes für I/R-Ereignisse. Für den Skelettmuskel zeigte sich ebenfalls kein Schutz durch Parecoxib. Allerdings erscheint fraglich, ob das Gewebe der Skelettmuskeln nach 30-minütiger Ischämie schon deutliche, morphologisch nachweisbare Schädigungen zeigt.

Neben der relativ geringen Anzahl an untersuchten Versuchstieren gab es noch weitere Schwächen im Versuchsdesign. So wäre es z.B. wünschenswert gewesen, Gewebe von Schweinen zu untersuchen, die keinem thorakalen Aortenclamping unterzogen wurden. So hätten "Basiswerte" gewonnen werden können, um eine Aussage darüber zu treffen, wie hoch die Expression von p21 und p27 ohne Ischämie/Reperfusion war und wie groß der Anstieg in der Expression durch das Ischämie-/Reperfusionereignis war.

Des Weiteren wäre eine längere Nachbeobachtungszeit wünschenswert gewesen. Die Gewebe wurden bereits 4 Stunden nach Beendigung des Clampings gewonnen. Morphologisch sichtbare Schäden und auch p21/p27-Expression waren evtl. zu diesem Zeitpunkt noch nicht maximal ausgeprägt; eine längere Nachbeobachtungszeit bis zum Entnahmezeitpunkt hätte evtl. andere bzw. deutlichere Ergebnisse erbracht.

4.4.2 ZEIGT PARECOXIB DEUTLICHE ZYTOPROTEKTIVE EFFEKTE?

Parecoxib zeigt bei einigen der entscheidenden Organe deutliche zytoprotektive Effekte. Besonders schwerwiegend für den Patienten sind Schädigungen des Rückenmarks nach Reparatur eines AAA. Beim Rückenmark zeigte sich in der Parecoxibgruppe eine deutlich geringere Expression der Zellalterungsmarker p21 und p27. Dies deutet auf eine zytoprotektive Wirkung des Parecoxib hin. Ebenfalls ein häufig geschädigtes Organ bei der AAA-Reparatur ist der Darm. Starke Schädigungen hier können über ein SIRS trotz gelungener Operation zum Tode

des Patienten führen. Auch hier zeigt Parecoxib deutliche zytoprotektive Effekte. Für die Niere als drittes entscheidendes Organ bei Operation eines AAA waren die Ergebnisse nicht überzeugend. Dennoch lässt sich zumindest für p21 eine signifikante Reduktion bei den Ischämie-empfindlichen Tubulus-Zellen feststellen. Lediglich beim Darm konnte eine signifikante Reduktion der Apoptosen festgestellt werden. Über die klinische Relevanz der gefundenen Ergebnisse kann hier keine Aussage getroffen werden.

4.4.3 KANN DIE SUBSTANZ EVENTUELL SOGAR FÜR EINE KLINISCHE ANWENDUNG EMPFOHLEN WERDEN?

Was die gefundenen Ergebnisse angeht kann eine klinische Anwendung nach weiterer Testung in Betracht gezogen werden. Momentan ist Parecoxib lediglich zur Kurzzeitbehandlung postoperativer Schmerzen zugelassen. Es besteht eine Kontraindikation bei Herzinsuffizienz ab Stadium NYHA II sowie bei klinisch gesicherter KHK. Patienten mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse sowie einer pAVK sollten das Medikament nur nach Risiko-Nutzen-Abwägung erhalten. Starke Hautreaktionen, wie nach Anwendung von Valdecoxib beobachtet, können bei der Anwendung von Parecoxib nicht sicher ausgeschlossen werden. Des Weiteren wurde bei Patienten nach einer koronaren Bypass-OP beobachtet, dass die Anwendung von Parecoxib postoperativ zu einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre/thromboembolische Ereignisse geführt hat [alle Informationen aus 24]. Die Patienten, die von der Anwendung des Parecoxib im Rahmen der Aneurysma-Reparatur profitieren könnten, leiden sehr häufig gleichzeitig an weiteren Herz-Kreislaufkrankungen, so z.B. einer KHK, einem Hypertonus oder auch einer pAVK. Die Auswirkungen einer Gabe von Parecoxib bei diesen Patienten müsste erst weiter erforscht werden. Ebenso müssten die genauen Modalitäten der Gabe weiter untersucht werden, um zu klären, ob eine Einmalgabe unmittelbar vor dem Clamping bereits den maximalen Effekt bewirkt, oder ob evtl. eine Gabe vor der Operation oder postoperativ einen Vorteil bringen kann.

Eine Erhöhung der Rate kardiovaskulärer Ereignisse bei Gabe von COX-2-Hemmern wird seit einigen Jahren diskutiert; daher scheint fraglich ob es zu weiteren Untersuchungen am Menschen bzgl. einer Reduktion des Ischämie-/

Reperfusionsschadens durch Parecoxib kommen wird. Leider konnte in der durchgeführten Studie eine Untersuchung der Rückenmarksfunktion bzw. ein frühzeitiges Erkennen einer Rückenmarksischämie anhand motorisch evozierter Potentiale aufgrund technischer Probleme nicht durchgeführt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die häufig auftretenden Erkrankungen Hypertonie und Arteriosklerose gelten als Hauptursachen für das Auftreten eines abdominellen Aortenaneurysmas. Die Operation eines Aneurysmas erfordert ein proximales und distales Abklemmen der Aorta mit Ischämie der abhängigen Organe und nachfolgender Reperfusion. Dadurch kann es zu einer Schädigung der minderdurchbluteten Organe unter anderem mit neurologischen Ausfällen, Nierenschädigung oder Schädigung des Darms bis hin zum SIRS (systemic inflammatory response syndrome) kommen. Diese Schädigungen äußern sich auf zellulärer Ebene beispielsweise über eine vermehrte Zellalterung und erhöhte Anzahl an Apoptosen. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der Zyklooxygenase den Ischämie-/Reperfusionsschaden nach Nierentransplantation und Schlaganfall reduziert. In dieser Studie wurde untersucht, ob die Kurzzeitgabe des COX-2 (Zyklooxygenase-2)-Hemmers Parecoxib die durch Ischämie und Reperfusion verursachten Effekte nach thorakalem Aortenclamping in einem klinisch relevanten Grosstiermodell verhindern oder vermindern kann.

8 narkotisierte Hausschweine erhielten 40 mg Parecoxib in 0,9% NaCl-Lösung (PAR, Versuchsgruppe) und 10 narkotisierte Hausschweine 0,9% NaCl-Lösung (PLA, Placebogruppe) über 45 Minuten vor einem 30 minütigen Abklemmen der thorakalen Aorta. Die Wirkung des Parecoxib auf die Hämodynamik, einzelne Parameter der klinischen Chemie sowie auf die Konzentration einzelner Prostaglandine wurde untersucht. Die Parameter wurden sowohl vor und während der ischämischen Phase als auch während der Reperfusion erhoben. Nach 4 Stunden Beobachtungszeit wurden Biopsien der Organe Rückenmark, Niere, Dünndarm, Leber und Muskel zum Nachweis von Apoptosen (mit dem TUNEL (TdT-mediated nick-end labelling technique)-Test) und Zellalterung (immunhistochemische Anfärbung mit Antikörpern gegen p21 und p27) entnommen. Es wurde verglichen, ob signifikante Unterschiede zwischen Parecoxib- und Placebogruppe bezüglich der Anzahl an Apoptosen und p21/p27 (cyclin-dependent kinase inhibitors 1A und 1B) angefärbter Zellkerne bestehen. Die Daten wurden als Median (range) dargestellt und mittels U-Test (Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben) verglichen. Zum Vergleich der Parameter der Hämodynamik, klinischen Chemie und Prostaglandine zwischen den

Messzeitpunkten wurde der Friedman repeated measures ANOVA (analysis of variance) on ranks mit anschließendem Dunn Test durchgeführt; zum Vergleich der Versuchsgruppen an einem Messzeitpunkt wurde der U-Test (Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben) verwendet.

In der Parecoxibgruppe fand sich eine signifikant geringere Expression von p21 und p27 in allen Gewebeanteilen des Rückenmarks (graue Substanz, weiße Substanz und Blutgefäße) (p-Wert < 0.05 vs. Placebo), im Dünndarm in der Mukosa und den Blutgefäßen (p21/ p27: Mukosa p-Wert = 0.0005/ 0.0058 und Blutgefäße p-Wert = 0.0112/ 0.0013 vs. Placebo). Weniger deutlich zeigte sich auch ein Schutz der renalen Zellen (Tubuli p21 p-Wert = 0.0405 vs. Placebo). Des Weiteren zeigte sich beim TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) eine signifikant reduzierte Anzahl an Apoptosen in der Mukosa und Submukosa des Dünndarms (p-Wert = 0.0113 und 0.0382 vs. Placebo). In der Parecoxibgruppe fand sich eine signifikant geringere Konzentration von 6-keto-Prostaglandinen nach dem Clamping im Vergleich zur Placebogruppe; bei Thromboxan B₂ fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Hemmung der Zykllooxygenase-2 mit Parecoxib vor dem aortalen Clamping beugt der ischämie-/reperusionsbedingten Seneszenz und Apoptosen vor. Insbesondere das Rückenmark und der Dünndarm zeigen eine signifikant geringere Expression der Seneszenz-Marker p21 und p27. Schädigungen dieser beiden Organe, z.B. im Rahmen einer operativen Therapie eines abdominalen Aortenaneurysmas, können schwerwiegende Folgen für den Betroffenen haben bis hin zur Lähmung oder einem letalen Ausgang infolge eines SIRS (systemic inflammatory response syndrome). Diese Ergebnisse sollten Anlaß sein, weitere Untersuchungen am Menschen durchzuführen, um abschätzen zu können, inwieweit die hier gefundenen Ergebnisse mit einer klinisch erkennbaren geringeren Läsion der untersuchten Organe einhergehen. In dieser Studie war eine Untersuchung der Rückenmarksfunktion der untersuchten Schweine anhand von motorisch evozierten Potentialen aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht möglich. Eine weitere klinische Untersuchung am Menschen erscheint wegen einer vermuteten Erhöhung der Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse durch Zykllooxygenase-2-Hemmer fraglich.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Abendroth D, Schelzig H, Mickley V, Storck M: Long-term effect of cyclooxygenase inhibition with acetylsalicylic acid in cadaveric renal transplants. *Transplant Proc* 29: 3004-5 (1997)
- 2 Alexander K, Hinds PW: Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. *Mol Cell Biol* 21: 3616-31 (2001)
- 3 Aravindan N, Williams MT, Riedel BJ, Shaw AD: Transcriptional responses of rat skeletal muscle following hypoxia-reoxygenation and near ischaemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand* 183: 367-77 (2005)
- 4 Barone S, Okaya T, Rudich S, Petrovic S, Tehrani K, Wang Z, Zahedi K, Casero RA, Lentsch AB, Soleimani M: Distinct and sequential upregulation of genes regulating cell growth and cell cycle progression during hepatic ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C826-35 (2005)
- 5 Berry AJ, Smith RB 3rd, Weintraub WS, Chaikof EL, Dodson TF, Lumsden AB, Salam AA, Weiss V, Konigsberg S: Age versus comorbidities as risk factors for complications after elective abdominal aortic reconstructive surgery. *J Vasc Surg* 33: 345–352 (2001)
- 6 Beubler E, Schuligoi R, Chopra AK, Ribardo DA, Peskar BA: Cholera toxin induces prostaglandin synthesis via post-transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in the rat jejunum. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 940-5 (2001)
- 7 Blankensteijn JD, Lindenburg FP, Van der Graaf Y, Eikelboom BC: Influence of study design on reported mortality and morbidity rates after abdominal aortic aneurysm repair. *Br J Surg* 85: 1624-30 (1998)
- 8 Blikslager AT, Roberts MC, Rhoads JM, Argenzio RA: Prostaglandins I2 and E2 have a synergistic role in rescuing epithelial barrier function in porcine ileum. *J Clin Invest* 100: 1928-33 (1997)
- 9 Blikslager AT, Zimmel DN, Young KM, Campbell NB, Little D, and Argenzio RA: Recovery of ischaemic injured porcine ileum: evidence for a contributory role of COX-1 and COX-2. *Gut* 50: 615-23 (2002)
- 10 Brown LC, Powell JT: Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. *Ann Surg* 230: 289-97 (1999)

- 11 Brune K, Hinz B: Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scand J Rheumatol* 33: 1-6 (2004)
- 12 Campbell NB, Blikslager AT: The role of cyclooxygenase inhibitors in repair of ischaemic-injured jejunal mucosa in the horse. *Equine Vet J Suppl Jun*: 59-64 (2000)
- 13 Campisi, J. 1996: Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 84: 497-500 (1996)
- 14 Candelario-Jalil E, Alvarez D, Gonzalez-Falcon A, Garcia-Cabrera M, Martinez-Sanchez G, Merino N, Giuliani A, Leon OS: Neuroprotective efficacy of nimesulide against hippocampal neuronal damage following transient forebrain ischemia. *Eur J Pharmacol* 453: 189-95 (2002)
- 15 Candelario-Jalil E, Gonzalez-Falcon A, Garcia-Cabrera M, Alvarez D, Al-Dalain S, Martinez G, Leon OS, Springer JE: Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J Neurochem* 86: 545-55 (2003)
- 16 Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakc S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M: Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2258-63 (2002)
- 17 Chen S, Xiong L, Wang Q, Sang H, Zhu Z, Dong H, Lu Z: Tetramethylpyrazine attenuates spinal cord ischemic injury due to aortic cross-clamping in rabbits. *BMC Neurol* 2:1 (2002)
- 18 Chkhotua AB, Schelzig H, Wiegand P, Grosse S, Reis S, Art M, Abendroth D: Influence of ischaemia/reperfusion and LFA-1 inhibition on telomere lengths and CDKI genes in ex vivo haemoperfusion of primate kidneys. *Transpl Int* 17: 692-8 (2005)
- 19 Crawford ES, Walker HS 3rd, Salwa SA, Normann NA: Graft replacement of aneurysm in descending thoracic aorta. Results without bypass or shunting. *Surgery* 89: 73-85 (1981)
- 20 Ding G, Franki N, Kapasi AA, Reddy K, Gibbons N, Singhal PC: Tubular cell senescence and expression of TGF-beta1 and p21(WAF1/CIP1) in tubulointerstitial fibrosis of aging rats. *Exp Mol Pathol* 70: 43-53 (2001)

- 21 Dodds WJ. The pig mode for biomedical research. *Fed Proc* 41: 247-56 (1982)
- 22 Dong CC, MacDonald DB, Janusz MT: Intraoperative spinal cord monitoring during descending thoracic and thoracoabdominal aneurysm surgery. *Ann Thorac Surg* 74: S1873-6 (2002)
- 23 Duranski MR, Greer JJ, Dejam A, Jaganmohan S, Hogg N, Langston W, Patel RP, Yet SF, Wang X, Kevil CG, Gladwin MT, Lefer DJ: Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver. *J Clin Invest* 115: 1232-40 (2005)
- 24 FachInfo-Service, Fachinformationsverzeichnis Deutschland. BPI Service GmbH, Herausgeber: Fachinformation Dynastat® 40 mg Firma PFIZER PHARMA GmbH, Karlsruhe. Abrufbar unter: URL: <http://www.fachinfo.de/>. Stand der Information: 4/2003 (2003)
- 25 Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC: Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. *Ann N Y Acad Sci* 825: 179-93 (1997)
- 26 Gharagozloo F, Larson J, Dausmann MJ, Neville RF Jr, Gomes MN: Spinal cord protection during surgical procedures on the descending thoracic and thoracoabdominal aorta: review of current techniques. *Chest* 109: 799-809 (1996)
- 27 Ghosh J, Khwaja N, Howarth V, Murray D, Murphy MO, Byers R, Walker MG: Colonic epithelial apoptosis during conventional and endoluminal aortic surgery. *Br J Surg* 92: 443-8 (2005)
- 28 Goldstein, S. 1990: Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249: 1129-33 (1990)
- 29 Grabitz K, Freye E, Prior R, Schror K, Sandmann W: Does prostaglandin E1 and superoxide dismutase prevent ischaemic spinal cord injury after thoracic aortic cross-clamping? *Eur J Vasc Surg* 4: 19-24 (1990)
- 30 Harris RC, Breyer MD: Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F1-11 (2001)
- 31 Hatoko M, Tanaka A, Kuwahara M, Yurugi S, Iioka H, Niitsuma K: Difference of molecular response to ischemia-reperfusion of rat skeletal muscle as a function of ischemic time: study of the expression of p53, p21(WAF-1), Bax protein, and apoptosis. *Ann Plast Surg* 48: 68-74 (2002)

- 32 Hatori N, Yoshizu H, Shimizu M, Hinokiyama K, Takeshima S, Kimura T, Iizuka Y, Tanaka S: Prognostic factors in the surgical treatment of ruptured abdominal aortic aneurysms. *Surg Today* 30: 785-90 (2000)
- 33 Hauser B, Froba G, Bracht H, Strater J, Chkhouta AB, Vassilev D, Schoaff MJ, Huber-Lang M, Bruckner UB, Radermacher P, Schelzig H: Effects of intrarenal administration of the COX-2 inhibitor parecoxib during porcine suprarenal aortic cross-clamping. *Shock* 24: 476-481 (2005)
- 34 Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K, Itoyama Y: Apoptosis of motor neurons with induction of caspases in the spinal cord after ischemia. *Stroke* 29: 1007-13 (1998)
- 35 Hayflick L, Moorhead PS: The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621 (1961)
- 36 Huber TS, Wang JG, Derrow AE, Dame DA, Ozaki CK, Zelenock GB, Flynn TC, Seeger JM: Experience in the United States with intact abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 33: 304-11 (2001)
- 37 Iadecola C, Ross ME: Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 835: 203-17 (1997)
- 38 Iadecola C, Niwa K, Nogawa S, Zhao X, Nagayama M, Araki E, Morham S, Ross ME: Reduced susceptibility to ischemic brain injury and N-methyl-D-aspartate-mediated neurotoxicity in cyclooxygenase-2-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1294-9 (2001)
- 39 Itahana K, Dimri G, Campisi J: Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem* 268: 2784-91 (2001)
- 40 Ito Y, Katagiri H, Ishii K, Kakita A, Hayashi I, Majima M: Effects of selective cyclooxygenase inhibitors on ischemia/reperfusion-induced hepatic microcirculatory dysfunction in mice. *Eur Surg Res* 35: 408-16 (2003)
- 41 Ivanyi Z, Hauser B, Pittner A, Asfar P, Vassilev D, Nalos M, Altherr J, Bruckner UB, Szabo C, Radermacher P, Froba G: Systemic and hepatosplanchnic hemodynamic and metabolic effects of the PARP inhibitor PJ34 during hyperdynamic porcine endotoxemia. *Shock* 19: 415-21 (2003)
- 42 Jacobs MJ, Elenbaas TW, Schurink GW, Mess WH, Mochtar B: Assessment of spinal cord integrity during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Ann Thorac Surg* 74: S1864-6 (2002)

- 43 Jain KK: Evaluation of intravenous parecoxib for the relief of acute post-surgical pain. *Expert Opin Investig Drugs* 9: 2717-23 (2000)
- 44 Joosten SA, van Ham V, Nolan CE, Borrias MC, Jardine AG, Shiels PG, van Kooten C, Paul LC: Telomere shortening and cellular senescence in a model of chronic renal allograft rejection. *Am J Pathol* 162: 1305-12 (2003)
- 45 Kawata K, Takeyoshi I, Iwanami K, Sunose Y, Tsutsumi H, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y: The effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on small bowel ischemia-reperfusion injury. *Hepatology* 50: 1970-4 (2003)
- 46 Khandoga A, Enders G, Biberthaler P, Krombach F: Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: G553-60 (2002)
- 47 Khanna AK, Hosenpud JD: Cyclosporine induces the expression of the cyclin inhibitor p21. *Transplantation* 67: 1262-8 (1999)
- 48 Koistinaho J, Koponen S, Chan PH: Expression of cyclooxygenase-2 mRNA after global ischemia is regulated by AMPA receptors and glucocorticoids. *Stroke* 30:1900-6 (1999)
- 49 Komers R, Anderson S, Epstein M: Renal and cardiovascular effects of selective cyclooxygenase-2 inhibitors. *Am J Kidney Dis* 38: 1145-57 (2001)
- 50 Komers R, Lindsley JN, Oyama TT, Schutzer WE, Reed JF, Mader SL, Anderson S: Immunohistochemical and functional correlations of renal cyclooxygenase-2 in experimental diabetes. *J Clin Invest* 107: 889-98 (2001)
- 51 Kramer BK, Kammerl MC, Komhoff M: Renal cyclooxygenase-2 (COX-2). Physiological, pathophysiological, and clinical implications. *Kidney Blood Press Res* 27: 43-62 (2004)
- 52 Kuenzler KA, Pearson PY, Schwartz MZ: Hepatocyte growth factor pretreatment reduces apoptosis and mucosal damage after intestinal ischemia-reperfusion. *J Pediatr Surg* 37: 1093-7 (2002)
- 53 Lacroix S, Rivest S: Effect of acute systemic inflammatory response and cytokines on the transcription of the genes encoding cyclooxygenase enzymes (COX-1 and COX-2) in the rat brain. *J Neurochem* 70: 452-66 (1998)

- 54 Lang-Lazdunski L, Blondeau N, Jarretou G, Lazdunski M, Heurteaux C: Linolenic acid prevents neuronal cell death and paraplegia after transient spinal cord ischemia in rats. *J Vasc Surg* 38: 564-75 (2003)
- 55 Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, Barone GW, Bandyk D, Moneta GL, Makhoul RG: The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. *Aneurysm detection and management veterans affairs cooperative study investigators. Arch Intern Med* 160: 1425-30 (2000)
- 56 Li KL, Wang JM, Ding HL, Zhao L, Song RH, Chen L: [Effect of p21 on the changes in renal tubular epithelial cells after ischemia/reperfusion injury of kidney.] [Article in Chinese] *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 17: 606-10 (2005)
- 57 Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloga C: Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 26: 1252-8 (1995)
- 58 Mackey ME, Wu Y, Hu R, DeMaro JA, Jacquin MF, Kanellopoulos GK, Hsu CY, Kouchoukos NT: Cell death suggestive of apoptosis after spinal cord ischemia in rabbits. *Stroke* 28: 2012-7 (1997)
- 59 Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Fernandez AP, Rodrigo J, Bosca L, Leza JC: Induction of cyclooxygenase-2 accounts for restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 28: 1579-88 (2003)
- 60 Matsui N, Kasajima K, Hada M, Nagata T, Senga N, Yasui Y, Fukuishi N, Akagi M: Inhibition of NF-kappaB activation during ischemia reduces hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *J Toxicol Sci* 30: 103-10 (2005)
- 61 McCullough L, Wu L, Haughey N, Liang X, Hand T, Wang Q, Breyer RM, Andreasson K: Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J Neurosci* 24: 257-68 (2004)
- 62 McDonald MC, Mota-Filipe H, Paul A, Cuzzocrea S, Abdelrahman M, Harwood S, Plevin R, Chatterjee PK, Yaqoob MM, Thiernemann C: Calpain inhibitor I reduces the activation of nuclear factor-kappaB and organ injury/dysfunction in hemorrhagic shock. *FASEB J* 15: 171-186 (2001)

- 63 Megyesi J, Andrade L, Vieira JM Jr, Safirstein RL, Price PM: Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 60: 2164-72 (2001)
- 64 Meylaerts SA, De Haan P, Kalkman CJ, Jaspers J, Vanicky I, Jacobs MJ: Prevention of paraplegia in pigs by selective segmental artery perfusion during aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 32:160-70 (2000)
- 65 Miller TA: Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am J Physiol* 245: G601-23 (1983)
- 66 Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida A: Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* 12: 900-8 (2001)
- 67 Mizuno H, Sakamoto C, Matsuda K, Wada K, Uchida T, Noguchi H, Akamatsu T, Kasuga M: Induction of cyclooxygenase 2 in gastric mucosal lesions and its inhibition by the specific antagonist delays healing in mice. *Gastroenterology* 112: 387-97 (1997)
- 68 Mustafa NA, Yandi M, Turgutalp H, Ovali E, Aydemir V, Albayrak L: Role of diltiazem in ischemia-reperfusion injury of the intestine. *Eur Surg Res* 26: 335-41 (1994)
- 69 Myers BD, Miller DC, Mehigan JT, Olcott CO 4th, Golbetz H, Robertson CR, Derby G, Spencer R, Friedman S: Nature of the renal injury following total renal ischemia in man. *J Clin Invest* 73: 329-41 (1984)
- 70 Myers SI, Hernandez RH, Horton JW: Acute mesenteric ischemia/reperfusion down regulates renal PGE2 synthesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52: 41-8 (1995)
- 71 Nagayama M, Niwa K, Nagayama T, Ross ME, Iadecola C: The cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 ameliorates ischemic brain injury in wild-type mice but not in mice with deletion of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 1213-9 (1999)
- 72 Najafi H, Javid H, Hunter J, Serry C, Monson D: Descending aortic aneurysmectomy without adjuncts to avoid ischemia. *Ann Thorac Surg* 30: 326-35 (1980)

- 73 Nakayama M, Uchimura K, Zhu RL, Nagayama T, Rose ME, Stetler RA, Isakson PC, Chen J, Graham SH: Cyclooxygenase-2 inhibition prevents delayed death of CA1 hippocampal neurons following global ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10954-9 (1998)
- 74 Nalos M, Vassilev D, Pittner A, Asfar P, Bruckner UB, Schneider EM, Georgieff M, Radermacher P, Froeba G: Tin-mesoporphyrin for inhibition of heme oxygenase during long-term hyperdynamic porcine endotoxemia. *Shock* 19: 526-32 (2003)
- 75 Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY: Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. *Am J Physiol* 274: G270-6 (1998)
- 76 Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, Saito T, Abe K, Saito H, Nakane PK, Nakanishi Y, Koji T: Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: possible involvement of Fas. *J Am Soc Nephrol* 9: 620-31 (1998)
- 77 Orend KH, Liewald F, Kirchdorfer B, Sunder-Plassmann L: Management of descending aortic dissection. *Ann Ital Chir* 66: 821-4 (1995)
- 78 Ouriel K, Green RM, Donayre C, Shortell CK, Elliott J, DeWeese JA: An evaluation of new methods of expressing aortic aneurysm size: relationship to rupture. *J Vasc Surg* 15: 12-20 (1992)
- 79 Park SK, Kim W, Lee CH, Koh GY: Differential changes of CDK activities in glomeruli and tubules during the active DNA synthetic period after ischemic injury. *Nephron* 86: 306-14 (2000)
- 80 Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Monkawa T, Durvasula R, Couser WG, Shankland SJ: Mechanical stress reduces podocyte proliferation in vitro. *Kidney Int* 61: 40-50 (2002)
- 81 Pfeiffer T, Reiher L, Grabitz K, Sandmann W: Ergebnisse der konventionellen chirurgischen Therapie des abdominellen Aortenaneurysmas seit Beginn der „endovasculären Ära“. *Chirurg* 71: 72-9 (2000)
- 82 Pittner A, Nalos M, Asfar P, Yang Y, Ince C, Georgieff M, Bruckner UB, Radermacher P, Froeba G: Mechanisms of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibition-related improvement of gut mucosal acidosis during hyperdynamic porcine endotoxemia. *Intensive Care Med* 29: 312-6. (2003)

- 83 Potten CS, Merritt A, Hickman J, Hall P, Faranda A: Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. *Int J Radiat Biol* 65: 71-8 (1994)
- 84 Potten CS, Wilson JW, Booth C: Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells* 15: 82-93 (1997)
- 85 Reiher L, Vosberg H, Sandmann W: Kidney protection in preventing post-ischaemic renal failure during thoracoabdominal aortic aneurysm repair: does prostaglandin E1 together with cooling provide more protection than cooling alone? *Vasa* 30: 21-3 (2001)
- 86 Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Hanchar AJ: Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology* 77: 433-43 (1979)
- 87 Robert A: Cytoprotection and prostaglandins. *Klin Wochenschr* 64 Suppl 7: 40-3 (1986)
- 88 Roques X, Remes J, Laborde MN, Guibaud JP, Rosato F, MacBride T, Baudet E: Surgery of chronic traumatic aneurysm of the aortic isthmus: benefit of direct suture. *Eur J Cardiothorac Surg* 23: 46-9 (2003)
- 89 Rothenbach P, Turnage RH, Iglesias J, Riva A, Bartula L, Myers SI: Downstream effects of splanchnic ischemia-reperfusion injury on renal function and eicosanoid release. *J Appl Physiol* 83: 530-6 (1997)
- 90 Sakurai M, Aoki M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K: Selective motor neuron death and heat shock protein induction after spinal cord ischemia in rabbits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 113: 159-64 (1997)
- 91 Sasaki T, Kitagawa K, Yamagata K, Takemiya T, Tanaka S, Omura-Matsuoka E, Sugiura S, Matsumoto M, Hori M: Amelioration of hippocampal neuronal damage after transient forebrain ischemia in cyclooxygenase-2-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 107-13 (2004)
- 92 Scharrer-Pamler R, Kapfer X, Orend KH, Sunder-Plassmann L: Endoluminal grafting of infrarenal aortic aneurysms. *Thorac Cardiovasc Surg* 47: 119-21 (1999)

- 93 Schelzig H, Chkhotua AB, Wiegand P, Grosse S, Reis S, Art M, Abendroth D: Effect of ischemia/reperfusion on telomere length and CDKI genes expression in a concordant ex-vivo hemoperfusion model of primate kidneys. *Ann Transplant* 8: 17-21 (2003)
- 94 Schewe CK, Schweikart HP, Hammel G, Spengel FA, Zollner N, Zoller WG: Influence of selective management on the prognosis and the risk of rupture of abdominal aortic aneurysms. *Clin Investig* 72: 585-91 (1994)
- 95 Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van Rooijen N, Tiegs G: Importance of Kupffer Cells for T-Cell-Dependent Liver Injury in Mice. *Am J Pathol* 157: 1671-83 (2000)
- 96 Sencan A, Yilmaz O, Ozer E, Gunsar C, Genc K, Ulukus C, Taneli C, Mir E: Does sucralfate prevent apoptosis occurring in the ischemia/reperfusion-induced intestinal injury? *Eur J Pediatr Surg* 13: 231-5 (2003)
- 97 Serrano M, Blasco MA: Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13: 748-53 (2001)
- 98 Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13: 1501-12 (1999)
- 99 Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V: Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol* 19: 2109-17 (1999)
- 100 Strater J, Gunthert AR, Bruderlein S, Moller P: Microwave irradiation of paraffin-embedded tissue sensitizes the TUNEL method for in situ detection of apoptotic cells. *Histochem Cell Biol* 103: 157-60 (1995)
- 101 Sunose Y, Takeyoshi I, Ohwada S, Tsutsumi H, Iwazaki S, Kawata K, Kawashima Y, Tomizawa N, Matsumoto K, Morishita Y: The effect of cyclooxygenase-2 inhibitor FK3311 on ischemia-reperfusion injury in a canine total hepatic vascular exclusion model. *J Am Coll Surg* 192: 54-62 (2001)
- 102 Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ: Variables predictive of outcome in 832 patients undergoing repairs of the descending thoracic aorta. *Chest* 104: 1248-53 (1993)

- 103 Talley JJ, Bertenshaw SR, Brown DL, Carter JS, Graneto MJ, Kellogg MS, Koboldt CM, Yuan J, Zhang YY, Seibert K: N-[[[(5-methyl-3-phenylisoxazol-4-yl)-phenyl]sulfonyl]propanamide, sodium salt, parecoxib sodium: A potent and selective inhibitor of COX-2 for parenteral administration. *J Med Chem* 43: 1661-3 (2000)
- 104 Teoh NC, Farrell GC: Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *J Gastroenterol Hepatol* 18: 891-902 (2003)
- 105 Therland KL, Stubbe J, Thiesson HC, Ottosen PD, Walter S, Sorensen GL, Skott O, Jensen BL: Cyclooxygenase-2 is expressed in vasculature of normal and ischemic adult human kidney and is colocalized with vascular prostaglandin E2 EP4 receptors. *J. Am Soc Nephrol* 15: 1189-98 (2004)
- 106 Turnheim K: [Coxibs: cyclooxygenase-2 inhibitors]. *Wien Klin Wochenschr* 113: 558-65 (2001)
- 107 Vardulaki KA, Prevost TC, Walker NM, Day NE, Wilmink AB, Quick CR, Ashton HA, Scott RA: Growth rates and risk of rupture of abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg* 85: 1674-80 (1998)
- 108 Vassilev D, Hauser B, Bracht H, Ivanyi Z, Schoaff M, Asfar P, Vogt J, Wachter U, Schelzig H, Georgieff M, Bruckner UB, Radermacher P, Froba G: Systemic, pulmonary, and hepatosplanchnic effects of N-acetylcysteine during long-term porcine endotoxemia. *Crit Care Med* 32: 525-32 (2004)
- 109 Vedder NB, Winn RK, Rice CL, Chi EY, Arfors KE, Harlan JM: Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 2643-6 (1990)
- 110 Von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C: Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 220: 186-93 (1995)
- 111 Von Zglinicki T: Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27: 339-44 (2002)
- 112 Wahlberg E, Dimuzio PJ, Stoney RJ: Aortic clamping during elective operations for infrarenal disease: The influence of clamping time on renal function. *J Vasc Surg* 36: 13-8 (2002)

- 113 Walter MF, Jacob RF, Day CA, Dahlborg R, Weng Y, Mason RP: Sulfone COX-2 inhibitors increase susceptibility of human LDL and plasma to oxidative modification: comparison to sulfonamide COX-2 inhibitors and NSAIDs. *Atherosclerosis* 177: 235-43 (2004)
- 114 Walther A, Bardenheuer HJ: Das abdominale Aortenaneurysma Anästhesiologische Besonderheiten und perioperatives Management bei konservativ chirurgischer Therapie. *Anaesthesist* 49: 690-703 (2000)
- 115 Wang Q, Sun AY, Simonyi A, Jensen MD, Shelat PB, Rottinghaus GE, Macdonald RS, Miller DK, Lubahn DE, Weisman GA, Sun GY: Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. *J Neurosci Res* 82: 138-48 (2005)
- 116 Weight SC, Waller JR, Bradley V, Whiting PH, Nicholson ML: Interaction of eicosanoids and nitric oxide in renal reperfusion injury. *Transplantation* 72: 614-9 (2001)
- 117 Wu Chen R, Zhang Y, Rose ME, Graham SH: Cyclooxygenase-2 activity contributes to neuronal expression of cyclin D1 after anoxia/ischemia in vitro and in vivo. *Brain Res Mol Brain Res* 132: 31-7 (2004)
- 118 Wynford-Thomas D: Cellular senescence and cancer. *J Pathol* 187: 100-11 (1999)
- 119 Yagami T, Ueda K, Asakura K, Hata S, Kuroda T, Sakaeda T, Takasu N, Tanaka K, Gemba T, Hori Y: Human group IIA secretory phospholipase A2 induces neuronal cell death via apoptosis. *Mol Pharmacol* 61: 114-26 (2002)
- 120 Zhang JX, Wu HS, Wang H, Zhang JH, Wang Y, Zheng QC: Protection against hepatic ischemia/reperfusion injury via downregulation of toll-like receptor 2 expression by inhibition of Kupffer cell function. *World J Gastroenterol* 11: 4423-6 (2005)
- 121 Zushi S, Shinomura Y, Kiyohara T, Minami T, Sugimachi M, Higashimoto Y, Kanayama S, Matsuzawa Y: Role of prostaglandins in intestinal epithelial restitution stimulated by growth factors. *Am J Physiol* 270: G757-62 (1996)

DANKSAGUNG

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. P. Radermacher und Dr. med. J. Kick für die stets schnelle Hilfe und gute Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern der Sektion für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, insbesondere Fr. Schulz für die Einarbeitung in die Labormethoden, und den Mitarbeitern der Abteilung Pathologie für die Einarbeitung und die Bereitstellung notwendiger Geräte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Archil Chkhotua für die Unterstützung und Einarbeitung in die Immunhistochemie bedanken.

Und schließlich gilt mein Dank allen anderen, die mich bei der Durchführung meiner Doktorarbeit, auf welche Weise auch immer, unterstützt haben.