Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie
Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Georgieff
Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und
Verfahrensentwicklung (APV)
Sektionsleiter:
Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Peter Radermacher

Einfluss einer H_2S-induzierten „Suspended Animation“ auf die Organmorphologie der Niere nach 120 Minuten Aortenokklusion beim Schwein

Dissertation

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

vorgelegt von Sebastian Tobias Eff
aus Feuchtwangen

2012

Amtierender Dekan: **Prof. Dr. Thomas Wirth**

1. Berichterstatter: **PD Dr. Claus-Martin Muth**

2. Berichterstatter: **PD Dr. Bernd Mühling**

Tag der Promotion: **07.12.2012**

Meiner lieben Frau Anna, meinen Kindern David und Amelie, sowie meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 H_2S induzierte „Suspended Animation“ 1
1.2 Der Gefäßchirurgische Eingriff an der abdominalen Aorta als Versuchsgrundlage 2
1.3 Apoptose 3
1.4 Das Versuchstier Schwein 4
1.5 Fragestellung 4
2 Material und Methoden 5
2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation 5
2.2 Versuchsdurchführung 8
2.3 Histologische Bearbeitung und gemessene Parameter 10
2.3.1 Systemische Hämodynamik 11
2.3.2 Systemischer Metabolismus 12
2.3.3 Lokale Hämodynamik in der rechten Niere und Nierenfunktion 13
2.3.5 Histologie 14
2.4 Datenverarbeitung und statistische Auswertung 16
3. Ergebnisse 18
3.1 Systemische Hämodynamik 18
3.1.1 Herzfrequenz 18
3.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) 19
3.1.3 Zentralvenöser Druck (ZVD) 20
3.1.4 Cardiac-Output-Index (COI) 21
3.1.5 Noradrenalinverbrauch 22
3.2 Systemischer Metabolismus 23
3.2.1 Sauerstoffaufnahme (VO_2) 23
3.2.2 Kohlendioxidproduktion (VCO_2) 24
3.2.3 Körpertemperatur 25
3.2.4 arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO_2) 26
3.2.5 arterieller Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) 27
3.2.6 Lactat 28
3.2.7 Blutzucker 29
3.3 lokale Hämodynamik der rechten Niere und Nierenfunktion 30
3.3.1 Nierenperfusion 30

3.3.2 Mikrozirkulation 31
3.3.3 Kreatinin-Clearance 32
3.4 Histologie 33
3.4.1 Immunhistologische Tunel-Färbung 33
3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) 34
4 Diskussion 35
4.1 Das Versuchsmodell 35
4.2 Systemische Hämodynamik 36
4.3 Systemischer Metabolismus 37
4.4 Lokale Hämodynamik und Nierenfunktion 39
4.5 Histologie 40
4.5.1 HE-Färbung 40
4.5.2 Tunel-Färbung 40
4.6 Schlussfolgerung 41
5. Zusammenfassung 42
6. Literaturverzeichnis 44

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
AEC	3-Amino-9Ethyl-Carbazol
AMV	Atemminutenvolumen
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BZ	Blutzucker
CO	Kohlenmonoxid
CO_2	Kohlendioxid
COI	Cardiac-Output-Index
DNA	Deoxyribonucleidacid
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
FiO_2	inspiratorische O_2-Konzentration
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
H_2S	Hydrogensulfid
HAES	Hydroxyethylstärke
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
i.m.	intramuskulär
IE	Internationale Einheit
I-R	Ischämie-Reperfusion
MAP	mittlerer arterieller Druck
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MZP	Messzeitpunkt
µm	Mikrometer
NA	Noradrenalin
Na_2S	Natriumsulfid
NO	Stickstoffmonoxid
O_2	Sauerstoff

p	Druck
pCO_2	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PEEP	positive endexpiratory pressure
pO_2	arterieller Sauerstoffpartialdruck
ppm	parts per million
SpO_2	Sauerstoffsättigung
TBS	Tris-buffered Saline
TDT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
Temp.	Temperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase Vermittelte DNA- Strangbruchmarkierung
V.	Vene
VCO_2	CO_2-Produktion
VO_2	Sauerstoffaufnahme
Vs.	versus = im Vergleich zu
ZVD	Zentralvenöser Druck

1 Einleitung

1.1 H_2S induzierte „Suspended Animation“

Der Winterschlaf dient zahlreichen Tierarten dazu, die kalte Jahreszeit ohne Nahrungsaufnahme zu überdauern. Dies geht mit physiologischen Veränderungen wie Erniedrigung der Körpertemperatur und Herabsetzung der Stoffwechselrate einher. Selbst höhere Säugetiere besitzen die Fähigkeit wesentliche Lebensfunktionen reversibel zu verlangsamen oder anzuhalten und sich somit vor widrigen Umweltbedingungen zu schützen (Roth et al. 2005). Seit einiger Zeit wird versucht, diesen besonderen Zustand therapeutisch zu nutzen. Dieser künstlich hergestellte winterschlafartige Zustand wird als „Suspended Animation“ bezeichnet. Zunächst stellten Forschergruppen diesen Zustand an Versuchstieren durch Infusion kalter Elektrolytlösung und Senkung der Körperkerntemperatur her (Behringer et al. 2000, Behringer et al. 2003, Rhee et al. 2000). In der praktischen Anwendung ist dieses Vorgehen jedoch nur schwer durchzuführen. Es zeigte sich, dass „Suspended Animation“ auch pharmakologisch durch Kohlenmonoxid (CO) induziert werden kann (Nystul et al. 2004). CO bindet aber bei höheren Lebewesen in großen Mengen an Hämoglobin und ist nur schwer aus dieser Bindung zu verdrängen. Dadurch kommt es zu einer lebensgefährlichen Hypoxämie. Daher wurde von Blackstone et al CO durch Hydrogensulfid (H_2S) ersetzt(Blackstone et al. 2005). Bis vor wenigen Jahren war Hydrogensulfid durch seine Bindung an die mitochondriale Atmungskette als äußerst toxische Substanz bekannt (Couch et al. 2005, Truong et al. 2006, Bhambhani et al. 1991). Neuere Untersuchungen zeigen, dass H_2S neben Stickstoffmonoxid (NO) und CO der dritte endogene gasförmige Mediator ist (Wang 2002, Lowicka et al. 2007). Er beeinflusst die ATP-abhängigen Kaliumkanäle in der glatten Gefäßmuskulatur, in Myokardzellen, Neuronen und in β-Zellen des Pankreas. Die Forschungsgruppe um Blackstone konnte an wachen, spontan atmenden Mäusen durch H_2S-Inhalation eine „Suspended Animation“ induzieren (Blackstone et al. 2005). Dabei konnten sie einen reduzierten Metabolismus beobachtet, der sich durch erniedrigten O_2-Verbrauch und Hypothermie äußerte. Die Tiere wurden einer Atmosphäre mit 80 ppm H_2S ausgesetzt. Dabei fiel die Stoffwechselaktivität bis auf ein Zehntel des

Normwertes ab. Die Atemfrequenz verringerte sich und die Körperkerntemperatur fiel auf 15°C ab. Zurückzuführen ist dieser Effekt auf die reversible Bindung von H_2S an die Cytochrom Oxidase c in der mitochondrialen Atmungskette (Khan et al. 1990). Die Versuchstiere konnten zudem vor hypoxischen Schäden bewahrt werden (Blackstone et al. 2007). Nach 6 Stunden H_2S-Exposition ließen sich die Mäuse in den Ausgangszustand zurückversetzen und zeigten bei durchgeführten Funktions- und Verhaltenstests keine Auffälligkeiten. Aufgrund der hierbei beobachteten starken Atemwegsreizung, die selbst durch kleine inhalative Mengen H_2S hervorgerufen wurde (Couch et al. 2005, Szabo 2007), wurde eine intravenös applizierbare Form getestet. Es handelt sich bei dieser aufgearbeiteten Variante um Natriumsulfid (Na_2S), welches aber in gleicher Weise wie H_2S Sulfidionen im Körper freisetzt. Dieses zeigte ähnliche Erfolge, jedoch wurde auch bei diesem Weg der H_2S-Applikation eine pneumotoxische Wirkung beobachtet (Simon et al. 2008). Um den Lungenschaden möglichst gering zu halten, wurde jetzt getestet, ob dasselbe Medikament auch in halber Dosierung und halber Applikationsdauer einen Effekt aufweist.

1.2 Der Gefäßchirurgische Eingriff an der abdominalen Aorta als Versuchsgrundlage

Große Aortenoperationen werden vor allem bei Aneurysmen durchgeführt. Die Indikationen, Aneurysmen durch einen großen abdominalen Eingriff zu resezieren, sind die gedeckte oder freie Ruptur, Typ-A-Dissektionen, symptomatische Aneurysmen und asymptomatische Aneurysmen ab einer Größe von 5-6 cm. Risikofaktoren für einen vergrößerten abdominalen Aortendurchmesser sind neben Alter, männlichem Geschlecht und erhöhtem Body-Mass-Index, hauptsächlich fortgeschrittene Arteriosklerose (Allison et al. 2008). In verschiedenen Studien wird dabei die Prävalenz eines Aortenaneurysmas mit 1,7 – 8,9% angegeben (Bonamigo et al. 2003, Singh et al. 2001).

Bei der operativen Versorgung eines solchen interventionsbedürftigen Aneurysmas wird während des Einnähens der Gefäßprothese der Blutfluß im Gefäß durch Abklemmen der Aorta proximal des Aneurysmas (Clamping) unterbrochen. Distal gelegenes Gewebe ist somit einer vorübergehenden Ischämie ausgesetzt. Desweiteren kann die nach Wiederfreigabe des Blutflusses folgende Reperfusion die Verletzung des Gewebes um ein Vielfaches

verstärken (Parks et al. 1988, Carden et al. 2000). Der so entstandene Schaden wird als Ischämie-Reperfusions (I-R)-Schaden bezeichnet. Bei Eingriffen auf Höhe der Nierenarterienabgänge oder darüber besteht in bis zu 50% der Fälle die Gefahr postoperativer Nierenstörungen, die bis zur Notwendigkeit einer Hämodialyse führen können (Sasaki et al. 2000, Giulini et al. 2000). Der entscheidende Faktor für die Entstehung eines postoperativen Nierenversagens und somit für eine erhöhte perioperative Mortalität (Coselli et al. 1996) ist die Dauer des Clampings (Kudo et al. 2004). Das Modell des abdominalen Aortenclampings, wie es in diesem Versuch verwendet wird, stellt also eine Möglichkeit dar, die H_2S-induzierte „Suspended Animation“ an der Niere im Großtierversuchsmodell zu testen. 2008 zeigten Tripatara und Mitarbeiter, dass durch H_2S ein I-R-Schaden an Rattennieren verringert werden kann.

1.3 Apoptose

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet. Vor allem in der embryonalen Entwicklung und im normalen Zell-Turnover kommt der Apoptose eine große Bedeutung zu. Es handelt sich hierbei um einen lebenswichtigen Vorgang, bei dem mutierte, infizierte oder gefährdete Zellen eliminiert werden. Viele Krankheiten wie bestimmte Krebsarten, AIDS, Chorea Huntigton, Autoimmunerkrankungen oder auch Morbus Alzheimer sind auf eine fehlgesteuerte Apoptose zurückzuführen (Haslett et al. 2001, Renehan et al. 2001, Oliveira et al. 2008). Es existieren sowohl extrinsische, als auch intrinsische Wege, die die Apoptose einleiten können. Der extrinsische Weg führt über Tumornekrosefaktor-Rezeptoren, die an der Zelloberfläche aktiviert werden. Die Freisetzung mitochondrialer Enzyme leitet den intrinsischen Weg ein (Reed 2000). In der nachfolgenden Kaskade, die durch Caspasen in Gang gesetzt und unterhalten wird, kommt es zur Chromatinkondensation, Kernsegmentation, DNA-Fragmentation und zum so genannten Blebbing der Zellmembran (Majno et al. 1995, Fadeel et al. 2005, Kerr et al. 1972). Abschließend zerfällt die Zelle in sogenannte „apoptotic bodies“ und wird, ohne dass hierbei eine Entzündungsreaktion initiiert wird, von Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert (Savill et al. 1993). Von der Apoptose abzugrenzen ist der Vorgang der Nekrose, bei der es zunächst zu einer Zellschwellung und anschließend zu einer Entzündungsreaktion kommt. Biochemisch lassen

sich beide Vorgänge dadurch unterscheiden, dass es bei der Nekrose nicht zu einer systematischen Fragmentierung der DNA kommt. Durch Endonukleasen wird bei der Apoptose die DNA in Bruchstücke von definierter Länge geschnitten, die dem Ein- oder Vielfachen von ungefähr 200 Basenpaaren entsprechen. Bei der TUNEL-Färbung wird zum Detektieren von Apoptosen genau dieser Umstand ausgenutzt.

1.4 Das Versuchstier Schwein

Das Schwein ist als Großtiermodell besonders gut geeignet, weil es sowohl anatomisch als auch physiologisch eine große Ähnlichkeit mit dem Menschen aufweist. In einem Kleintiermodell mit Nagern (Ratten, Mäusen, Hamstern) hingegen ist es unmöglich, ausreichend Blutproben für die Untersuchungen zu gewinnen. Darüber hinaus können an Nagern entsprechende Gefäß- und Organpräparationen nicht durchgeführt werden (Douglas 1972, Hannon et al. 1990). Somit wurden für diese Studie Deutsche Landschweine verwendet.

1.5 Fragestellung

Aufgrund der in der Einleitung beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen und der Pneumotoxizität von H_2S in hohen Dosen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1) Kann in diesem Versuch eine „Suspended Animation“ nachgewiesen werden?
2) Hat die H_2S induzierte „Suspended Animation“ Einfluss auf die Morphologie der Niere?
3) Ist durch Reduzierung der Dosis und der Infusionsdauer von H_2S ein Rückgang der Pneumotoxizität zu beobachten?

2 Material und Methoden

2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation

Die Versuchstiere wurden nach den Richtlinien „Umgang mit Labortieren“ des „Bundesinstituts für Gesundheit“ durchgeführt. Das Versuchsprotokoll wurde sowohl von dem Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm kontrolliert, als auch vom Regierungspräsidium Tübingen, Baden-Württemberg genehmigt (Reg-Nr. 905).

Für den Versuch wurden 18 Deutsche Landschweine beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 45 kg und 55 kg verwendet. Vor Studienbeginn wurden an zwei Schweinen Vorversuche durchgeführt, um Aufschluss über das Clamping mit nur einem Ballon auf Höhe der Abgänge der Nierenarterien zu erlangen. Mit den restlichen 16 Versuchstieren wurde die eigentliche Studie durchgeführt. 18 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Schweinen das Futter entzogen. Wasser stand in dieser Zeit in ausreichendem Maße zur Verfügung. Als Prämedikation wurde den Schweinen im Tierforschungszentrum Atropin (2,5mg Atropinsulfat®, Braun, Melsungen, Deutschland) und Azaperone, ein in der Tiermedizin routinemäßig eingesetztes Neuroleptikum (5mg/kgKG, Stresnil®, Jansen, Neuss, Deutschland) i.m. verabreicht. Die sedierten Versuchstiere wurden in einer Transportkiste in den Tier-OP der Sektion „Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung“, Parkstraße 11, 89073 Ulm, gebracht. Zunächst wurde hier in eine Ohrvene ein intravenöser Zugang gelegt, anschließend wurden die Schweine präoxigeniert. Über einen Fingerclip am Schwanz wurde während der Narkoseeinleitung die Sauerstoffsättigung (SpO_2) überwacht (Datex Capnomac Ultima® ULT-S-3301, Datex Instrumentarium Corp, Helsinki Finnland). Über den Zugang in der Ohrvene wurde mit Propofol (2-3mg/kgKG) und Ketamin (1-2mg/kgKG Ketavet®, Pharmacia &Upjohn, Erlangen, Deutschland) die Narkose unter Sauerstoffgabe eingeleitet. Die Tiere wurden danach auf den Rücken gelagert und orotracheal intubiert. Die maschinelle Beatmung (Servo 900B® Siemens, Erlangen, Deutschland) wurde mit einer inspiratorischen O_2-Konzentration (FiO_2) von 0.35, einer Atemfrequenz von 10-12/min und einem Positiv Endexspiratorischem Druck (PEEP) von 4cm H_2O durchgeführt. Während der Narkose galt ein arterieller Ziel-pCO_2 zwischen 35-40 mmHg und eine Ziel-SpO_2 von über

90%. Eine kontinuierliche EKG-Überwachung wurde durchgeführt und eine Magensonde eingelegt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden Propofol (6-12mg/kgKG/h) und Remifentanil (0,25-0,5mg/kgKG/h) appliziert. Mit einer EEG-Ableitung wurde die Narkosetiefe überprüft. Die Körpertemperatur wurde durchgehend rektal gemessen. Um Einflüsse der Umgebungstemperatur auf die Körpertemperatur so gering wie möglich zu halten und im Vorfeld Effekte einer Hypothermie auszuschließen, wurden die Versuchstiere auf einer 39°C warmen Wärmematte gelagert und die Raumtemperatur konstant zwischen 24°C und 26°C gehalten. Während des gesamten Versuchs wurde eine Ringer-Lösung (Ringer-Lösung Fresenius®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) und während der Präparation bei Bedarf zusätzlich Hydroxyethylstärke (HAES-steril® 6% /0,05, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) gegeben. Zur Thromboseprophylaxe wurden 1000 IE/h unfraktioniertes Heparin intravenös appliziert.

Die Versuchstiere wurden abgewaschen, rasiert und steril abgedeckt. Die operative Präparation erfolgte nach dem bereits etablierten Modell von Hauser et al (Hauser et al. 2005, Hauser et al. 2006). Die linke A. carotis wurde freigelegt und mit einer 6F Schleuse, sowie zur kontinuierlichen Messung des Herzminutenvolumens und zur proximalen Blutdruckbestimmung mit einem 3F PiCCO®-Katheter versehen. An der freigelegten V. jugularis interna rechts wurde eine 3-lumige 8,5F Katheterschleuse eingebracht. Über diese wurde ein Swan-Ganz Katheter eingeschwemmt, welcher die Messung des zentralen Venendrucks und des Pulmonalarteriendrucks ermöglichte. Parallel dazu wurde die rechte freipräparierte A. femoralis mit einer 10F Schleuse versehen, über die ein Ballonkatheter in der Aorta auf Höhe der Nierenarterienabgänge platziert wurde. Durch eine transversale Laparotomie wurde die rechte Niere mit den Nierengefäßen dargestellt. Über diesen abdominellen Zugang wurde auch der korrekte Sitz des Ballonkatheters in der Aorta überprüft und ggf. korrigiert. Die rechte A. renalis wurde angeschlungen und zur kontinuierlichen Aufzeichnung der Nierenperfusion mit einem Ultraschallfluss-Messkopf versehen. In der V. renalis wurde ein 4F-Katheter platziert, der über die rechte V. femoralis vorgeschoben wurde. Dieser diente zur Entnahme von Blutproben. Auf der Niere wurde eine Knopfsonde zur kontinuierlichen Messung des Mikrozirkulationsflusses mittels Laserdopplerverfahren (OxyLab LDF®, Oxford Optronics, UK) aufgenäht. Zur Messung des pO_2 wurde unterhalb der Nierenkapsel eine Nadelsonde im Nierenparenchym eingestochen

(OxyLab PO_2®, Oxford Optronics, UK). Ebenso wurde ins Nierenparenchym ein Mikrodialysekatheter eingebracht. Über diesen wurden die Konzentration von Laktat, Pyruvat, Glycerin und Glukose im Nierengewebe bestimmt. Der Urin wurde über einen angelegten Cystofix-Katheter gesammelt. Zum Schluss wurde die Laparotomiewunde so verschlossen, dass die Messsonden über die Wunde ausgeführt werden konnten.

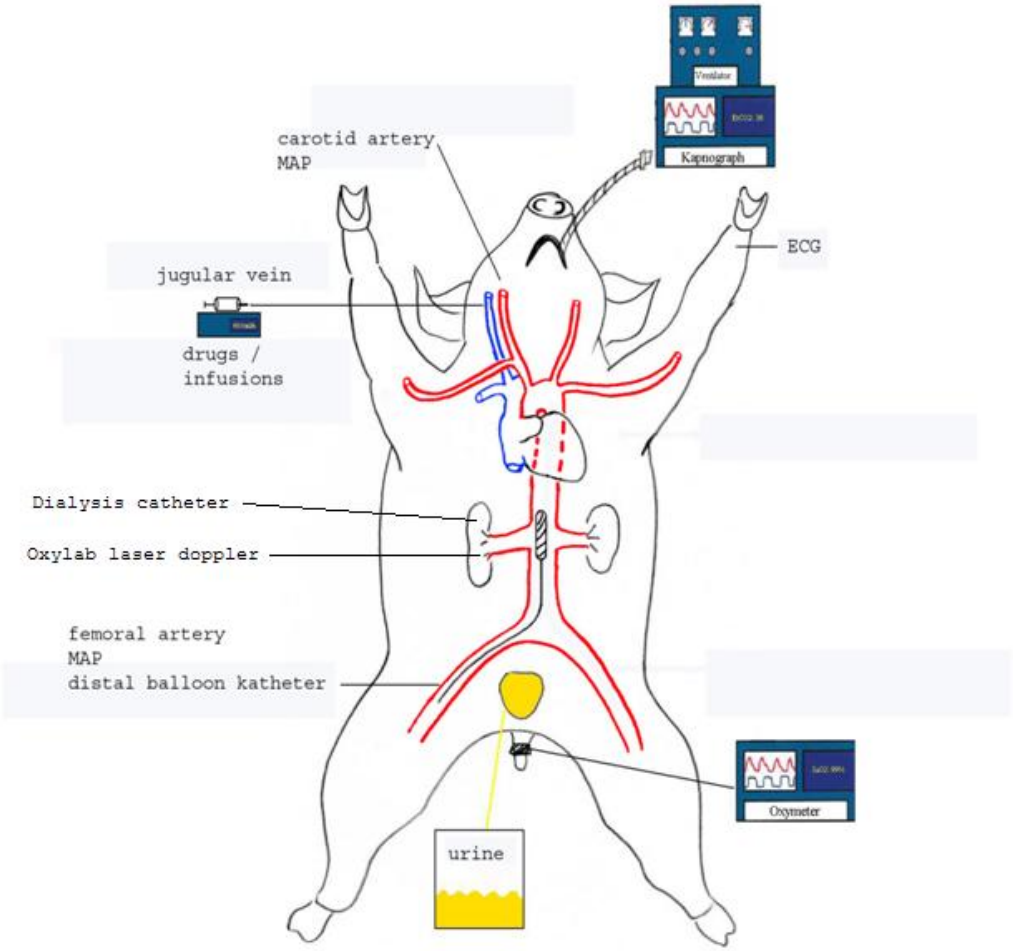

Abb.1: Skizze des Versuchaufbaus. ECG = Elektrokardiogramm, MAP = mittlerer arterieller Druck

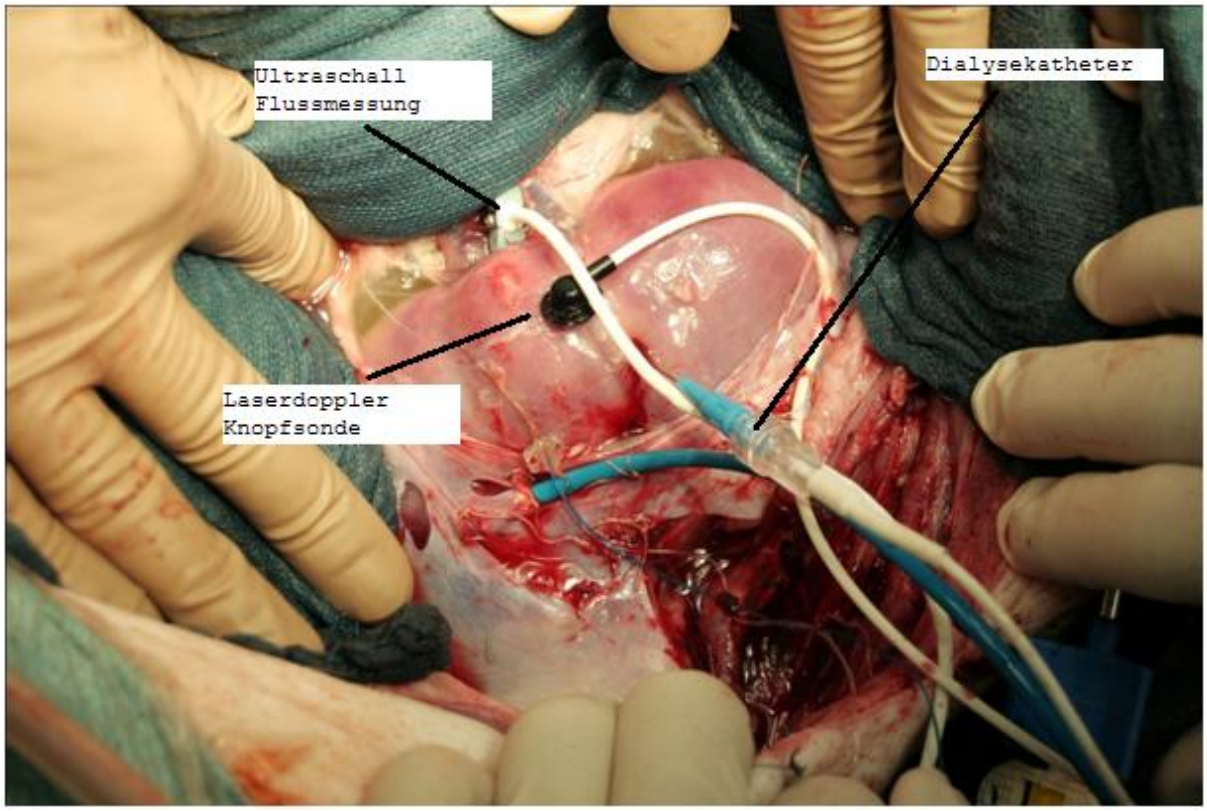

Abb. 2: Blick auf die freipräparierte und mit Messsonden versehene rechte Niere

2.2 Versuchsdurchführung

Zwei Stunden vor Beginn der Aortenokklusion wurde mit der Applikation des Studienmedikamentes IK-1001 bzw. des Placebos begonnen. Das Studienmedikament war in 5% Glukose gelöst und wurde als Bolus von 0,1mg/kgKG und anschließend kontinuierlich als Dauerinfusion von 1mg/kgKG/h verabreicht. Vier Stunden nach Wiedereröffnung der Aortenstrombahn wurde die Gabe beendet. Zwei Stunden nach Beginn der Infusion wurde mit der 120 minütigen Aortenokklusion begonnen. Der mittlere arterielle Druck wurde mittels Nitroglycerin, Esmolol und dem ultrakurz wirksamen Vasodilatator ATP bei +/- 20% des Ausgangswertes gehalten. Nach 120 Minuten Clamping-Zeit wurde die distale Aorta durch Ablassen des Ballonkatheters wieder freigegeben. Um dem arteriellen Blutdruckabfall in dieser Zeit entgegen zu wirken, wurde je nach Bedarf Noradrenalin infundiert. Dabei wurde der MAP bei über 80% des Wertes während der Clampingphase gehalten. Der Noradrenalin-Bedarf wurde als unabhängige Variable registriert. Für den zentralvenösen Druck (ZVD) wurden als Startwert 12cmH_2O angestrebt. Zusätzlich wurde der Kreislauf

während der Aortenokklusion und bis 60 Minuten danach mit einer kontinuierlichen Infusion von 1000ml/h HAES (HAES-steril® 6% 200/0,5, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) unterstützt. Nach diesen 60 Minuten wurde diese Infusion auf 250ml/h reduziert. An die Clamping-Phase schloss sich eine achtstündige Nachbeobachtungsphase an. Alle Messwerte wurden vor Beginn der Applikation des Studienmedikaments bzw. Placebos (MZP0), direkt vor Beginn der Aortenokklusion (MZP1) sowie 1 (MZP2), 2 (MZP3), 4 (MZP4) und 8 (MZP5) Stunden nach Wiederfreigabe der Aortenstrombahn erhoben. Nach dem letzten Messzeitpunkt wurde das Versuchstier durch intravenöse Applikation einer Kaliumchlorid-Lösung (Kcl 20%) getötet. Sofort danach wurde die rechte Niere entnommen und in Formalin eingelegt.

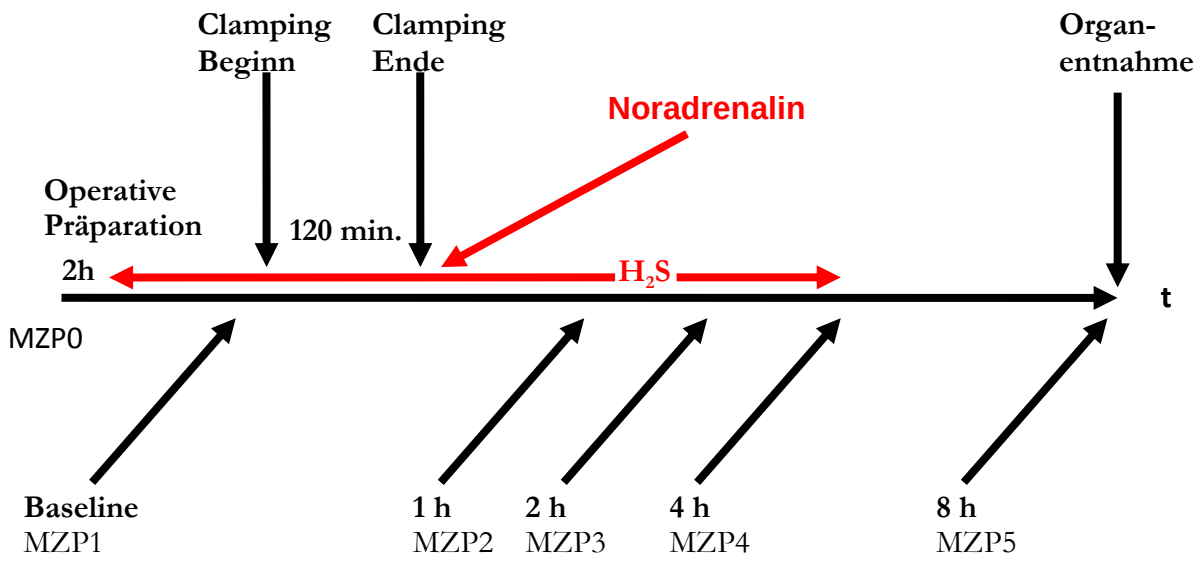

Abb. 3: Grafische Darstellung des Versuchablaufs. (MZP=Messzeitpunkt)

2.3 Histologische Bearbeitung und gemessene Parameter

Nachfolgende Parameter wurden zu den einzelnen Messzeitpunkten erfasst:

Tab. 1: Erfasste Messparameter an den einzelnen Messzeitpunkten

	MZP0	**MZP1**	**MZP2**	**MZP3**	**MZP4**	**MZP5**
HF	X	X	X	X	X	X
MAP	X	X	X	X	X	X
ZVD	X	X	X	X	X	X
COI	X	X	X	X	X	X
NA-Verbrauch						X
VO_2	X	X	X	X	X	X
VCO_2	X	X	X	X	X	X
Temp	X	X	X	X	X	X
pO_2	X	X	X	X	X	X
pCO_2	X	X	X	X	X	X
Lactat	X	X	X	X	X	X
BZ	X	X	X	X	X	X
Nierenperfusion	X	X	X	X	X	X
Mikrozirkulation	X	X	X	X	X	X
Kreatinin-Clearance	X	X	X	X	X	X
Histologie						X

HF: Herzfrequenz
MAP: Mittlerer arterieller Blutdruck
ZVD: Zentraler Venendruck
COI: Cardiac-Output-Index
NA-Verbrauch: Noradrenalin-Verbrauch
VO_2: Sauerstoffaufnahme
VCO_2: CO_2-Produktion
Temp: Temperatur
pO_2: arterieller Sauerstoffpartialdruck
pCO_2: arterieller CO_2-Partialdruck
BZ: Blutzucker

2.3.1 Systemische Hämodynamik

Herzfrequenz (HF)

Die Herzfrequenz wurde kontinuierlich über die EKG-Ableitung gemessen und zu den vorgegebenen Messzeitpunkten protokolliert.

Mittlerer arterieller Druck (MAP) und zentralvenöser Druck (ZVD)

MAP und ZVD wurden ebenfalls kontinuierlich mit einem Hewlett-Packard-Patientenmonitor aufgezeichnet und zu allen Messzeitpunkten dokumentiert.

Cardiac-Output-Index (COI)

Um die Werte untereinander besser vergleichbar zu machen, wurde der COI verwendet. Der Cardiac-Output wurde dabei automatisch durch das PiCCO-Gerät (Pulse Contour Cardiac Output) auf das Körpergewicht der Versuchstiere bezogen. Der COI wurde mittels PiCCO über eine Thermodilutionsmethode als Mittelwert von drei Injektionen kalter physiologischer Kochsalzlösung bestimmt.

Noradrenalinverbrauch

Nach Versuchsende wurde zudem der Noradrenalinverbrauch berechnet. In der Postokklusionsphase wurde zum Aufrechterhalten des MAP Noradrenalin infundiert. Anhand der gegebenen Menge bezogen auf das Körpergewicht des Versuchstiers konnte die Auswirkung des Versuchs auf den Noradrenalinverbrauch ermittelt werden.

2.3.2 Systemischer Metabolismus

Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidproduktion

Der Sauerstoff- und CO_2-Stoffwechsel wurde mittels eines Delta Trac (Datex-Ohmeda, Helsinki, Finland) Metabolismus-Monitoring-Systems erfasst. Hierbei wurden die Sauerstoffaufnahme (VO_2) und die Kohlendioxidproduktion (VCO_2) kontinuierlich gemessen und zu den vorgegebenen Messzeitpunkten protokolliert.

Körpertemperatur

Im Rahmen einer „Suspended Animation“ kommt es zum Absinken der Körpertemperatur (Blackstone et al. 2005). Um eine Auswirkung des Versuchs auf die Körpertemperatur festzustellen, wurde diese kontinuierlich mit einer rektal eingeführten Temperatursonde gemessen und zu allen Messzeitpunkten protokolliert.

pO_2, pCO_2, Laktat und Blutzucker

Zu allen sechs Messzeitpunkten wurde durch eine arterielle BGA mit einem automatischen Blutgasanalysator (Stat Profile Ultra, NOVA Biomedical Waltham, Massachusetts/USA) pO_2, pCO_2, Laktat und Blutzucker bestimmt. Das Gerät war entsprechend für das Blut anderer Spezies (Schwein) kalibriert.

2.3.3 Lokale Hämodynamik in der rechten Niere und Nierenfunktion

Renaler Blutfluß

Über einen Ultraschallmesskopf wurde kontinuierlich der renale Blutfluß in der rechten A. renalis aufgezeichnet und zu allen MZP dokumentiert. Somit war es möglich, den korrekten Sitz des Ballonkatheters zu überprüfen. Zusätzlich konnten Auswirkungen der Therapie auf den renalen Blutfluß überprüft werden.

Mikrozirkulation in der rechten Niere

Über ein Laser-Doppler-System (Laser-Doppler remission spectrophotometry probe, O2C System, LEA Medizintechnik, Gießen, Germany) wurde kontinuierlich der kapilläre Blutfluß in der Nierenkapsel aufgezeichnet und zu allen Messzeitpunkten notiert (Groner et al. 1999).

Kreatinin-Clearance

Sowohl zum MZP 1 als auch zum MZP 5 wurde durch Bestimmung des Urinvolumens der Urinkreatininkonzentration und der Plasmakreatininkonzentration die Kreatinin-Clearance berechnet. Somit war ein Rückschluss auf die Nierenfunktion möglich. Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Kreatinin} - \text{Clearance} = \text{Volumen}_{(\text{Urin/Minute})} * \frac{\text{Kreatinin}_{(\text{Urin})}}{\text{Kreatinin}_{(\text{Plasma})}}$$

2.3.5 Histologie

Nach acht Stunden (MZP5) wurde bei den Versuchstieren eine Organentnahme durchgeführt. Umgehend nach der Entnahme wurde das Nierengewebe in Formalin (6%) eingelegt und über mindestens zwei Wochen fixiert. Danach wurden die Proben entwässert und in Paraffin eingegossen. Die so entstandenen Paraffinblöcke wurden am Mikrotom (Leica Mikrotom 2030 Mot, Wetzlar, Germany) in 2µm dicke Paraffin-Gewebsschnitte geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Bei der Auswertung stand mit Frau Dr. Scheuerle (Neuropathologie Günzburg) eine erfahrene Pathologin zur Seite.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die 2µm dicken Schnitte wurden automatisch in einem HE-Automaten (Tissue Tek II, Färbeautomat, Histo Tek) angefärbt. Die Auswertung erfolgte mit dem Lichtmikroskop (Zeiss, Axioplan 2, Jena, Germany) nach morphologischen Gesichtspunkten.

Färbung nach der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling)

Im Rahmen der Apoptose kommt es durch die Fragmentierung der DNA durch Endonukleasen zur Entstehung freier 3´-Hydroxylenden. Bei der TUNEL-Färbung werden freie 3´-Hydroxylenden doppel- oder einzelsträngiger DNA angefärbt, die durch einen Bruch entstanden sind. Somit ermöglicht es die TUNEL-Färbung, apoptotische Zellen zu detektieren.

Je Schnitt wurde ein Weiterer als Negativkontrolle mitgeführt, der nicht mit TDT (terminale Desoxyribonukleotidyltransferase) inkubiert wurde. Die Positivkontrolle erfolgte mit einem Lymphknoten und mit einem TUNEL-positiven Lungenschnitt. Die Paraffinschnitte wurden wie folgt entparaffiniert: 4x5min eintauchen in Xylol (Merck, Darmstadt, Germany), danach 2x spülen in 100% Ethanol (Merck, Darmstadt, Germany), dann absteigend je 10 min in eine Alkoholreihe (100%, 70%, 40%) eintauchen, abschließend 2x in Aqua destillata spülen.

Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in Tris-Puffer (10mM, pH 8,0) gestellt. Danach wurden sie in einer Feuchtkammer bei 37°C exakt 15 Minuten lang mit Proteinase K 20µg/ml und 200µl pro Schnitt (Firma Roth, Bestell-Nr.: 7528.1, Karlsruhe, Germany) angedaut. Dieser Vorgang wurde mit zweimaligem Spülen in Aqua destillata gestoppt. Nach einmaligem Spülen in TBS-Puffer (Tris-buffered Saline, 50mM, pH 7,6) wurden die Schnitte für 30 Minuten in 0,1%igem Wasserstoffperoxid (verdünnt mit TBS) inkubiert. Dies verhinderte die Anfärbung der endogenen Peroxidase. Nach abermaligem Spülen mit TBS-Puffer wurden die Schnitte für 5 Minuten mit TdT-Puffer (5-fach, Firma Promega, Madison, Wisconsin, USA) versehen. Bis auf die Negativkontrollen wurden anschließend alle Präparate mit 50µl Inkubationslösung versehen. Diese bestand aus Terminal Desoxynucleotidyl Transferase (TDT 15U, Firma: Promega, Bestell-Nr.: M1871, Madison, Wisconsin, USA), Digoxigenin-11-dUTP (Firma: Roche Boehringer, Kat-Nr.: 1093088, Mannheim, Germany,) und TdT-Puffer (5fach, Firma Promega, Bestell-Nr.: M189A, Madison, Wisconsin, USA). Alle Schnitte wurden anschließend bei 37°C in einer Feuchtkammer für zwei Stunden inkubiert. Bevor die Schnitte für 5 Minuten in 2%iges Pferdeserum (verdünnt mit TBS-Puffer) gestellt wurden, erfolgte wiederum ein Spülen in TBS-Puffer. Die einzelnen Schnitte wurden nun mit Anti-Dig Antikörper (Anti-Dig Fab Schaf, Firma Roche, Bestell-Nr.: 1214667, Basel, Schweiz, 1:200 verdünnt mit 2%igem Pferdeserum) versehen und eine Stunde lang inkubiert. Nach Spülen in TBS-Puffer wurden die Präparate eine weitere Stunde mit Anti-Schaf-Antikörper (anti-Schaf POD Firma Dianova, Bestell-Nr.:713-036-147, Hamburg, Germany 1:200 verdünnt mit 2%igem Pferdeserum) versehen. Dieser Vorgang wurde ebenfalls mit Spülen in TBS-Puffer beendet. Zur Detektion wurde AEC (3-Amino-9Ethyl-Carbazol, Firma Sigma, Steinheim, Germany) verwendet. Nach ca. 25 Minuten wurde der Farbumschlag lichtmikroskopisch festgestellt und die Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Die Schnitte wurden kurz mit Hämalaun gegengefärbt und anschließend mit Gelatine (Firma Merck, Darmstadt, Germany) eingedeckt.

Die Präparate wurden mit Unterstützung einer erfahrenen Pathologin ausgewertet. Bei einer 400fachen Vergrößerung (Objektiv: 40x + Okular10x) wurden mit dem Lichtmikroskop 50 Gesichtsfelder betrachtet. Dabei wurden die Apoptosen ausgezählt und es wurde darauf geachtet, dass die Nuklei morphologisch mit einer Apoptose vereinbar waren (siehe Abb. 4).

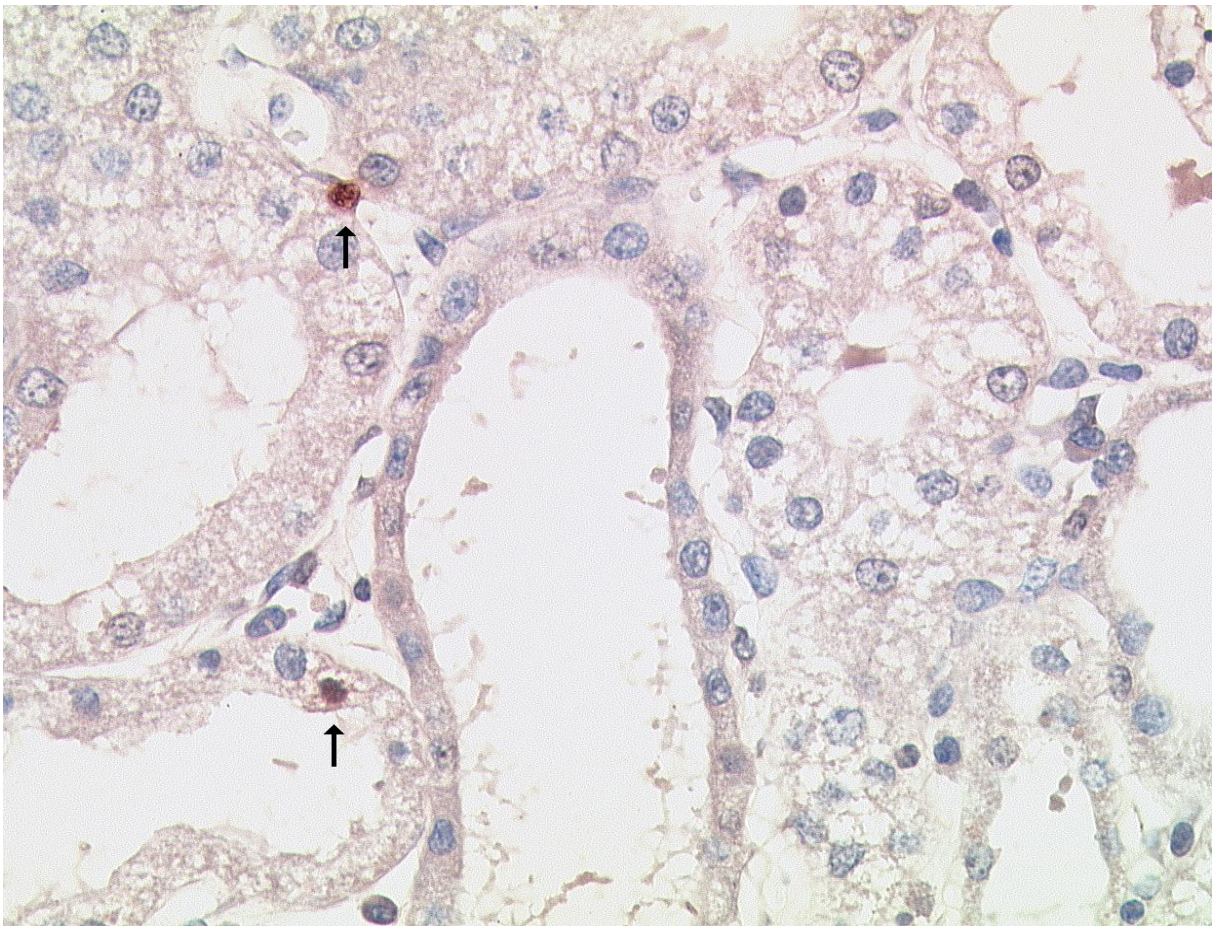

Abb. 4: Beispiel einer Tunelfärbung an der Niere eines Versuchtieres (Schwein). Die apoptotischen Zellen sind rot eingefärbt und mit Pfeilen gekennzeichnet.

2.4 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden für die Messergebnisse beider Versuchsgruppen der Median sowie Minimal- und Maximalwerte berechnet und im Text oder in Tabellen aufgeführt. Zur graphischen Darstellung kommen Boxplots zur Anwendung. Begrenzung der Box sind das 25%- und das 75%- Quantil, der Median ist in der Mitte eingezeichnet.

In der Auswertung kam folgendes statistisches Testverfahren zur Anwendung:

- Mann-Whitney Rank Sum Test: Vergleich der Ergebnisse der beiden Versuchsgruppen.

- Friedman-Test (RM ANOVA on Ranks): Vergleiche der verschiedenen Messzeitpunkte einer Medikamentengruppe. Bei einem signifikanten Ergebnis kam im Anschluss die Student-Newman-Keuls Methode zur Anwendung.

Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Zur Dokumentation der Daten wurde das Programm Microsoft Office Excel 2003 verwendet. Die Berechnung und statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Sigmastat 2.03. Die graphische Darstellung erfolgte mit SigmaPlot 8.0.

3. Ergebnisse

Signifikante (p<0,05) Ergebnisse sind mit * gekennzeichnet.

3.1 Systemische Hämodynamik

3.1.1 Herzfrequenz

Der Verlauf der Herzfrequenz zeigte sich in beiden Gruppen annähernd gleich [Kontrollgruppe: MZP1: 104 (84-125) bpm <> MZP5: 98,5 (83-132) bpm. Verumgruppe: MZP1: 99 (77-140) bpm <> MZP5: 99 (78-108) bpm. Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,324; MZP1 p=0,829; MZP2 p=0,868; MZP3 p=0,425; MZP4 p=0,766; MZP5 p=0,413].

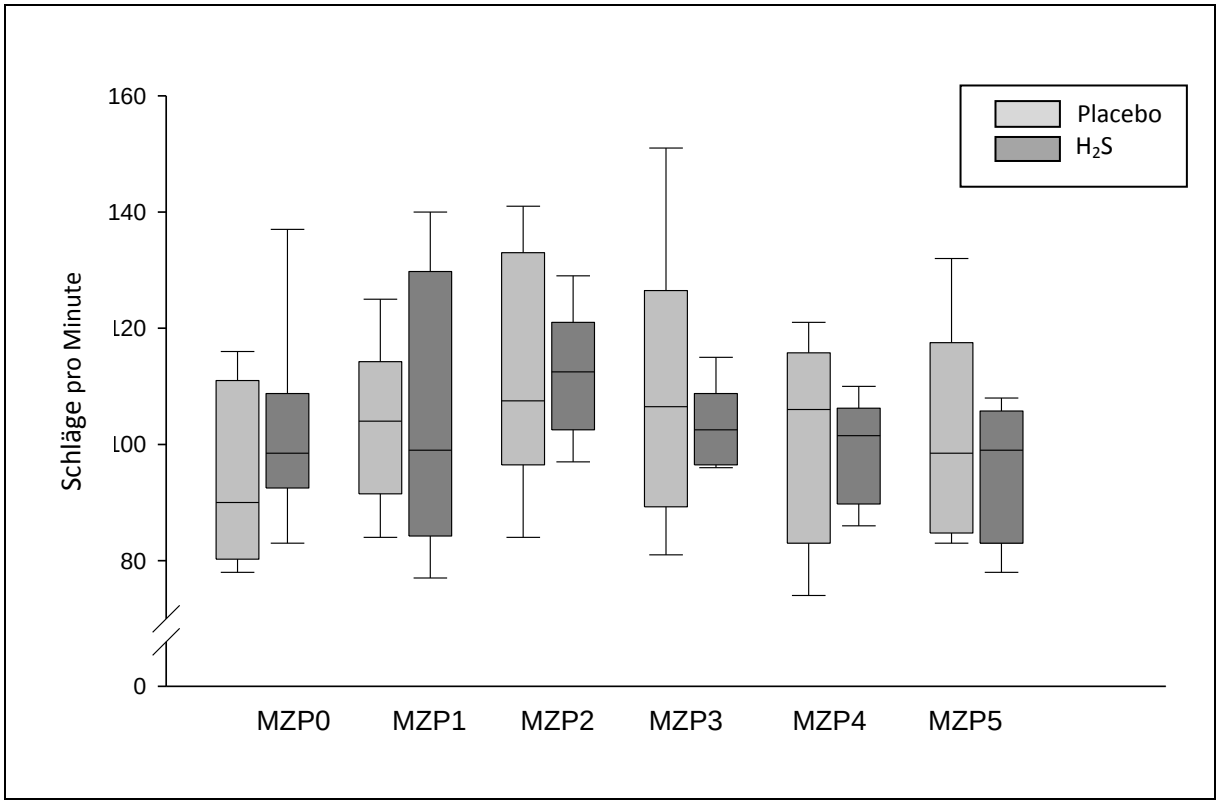

Abb. 5: Herzfrequenz der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Tendentiell ließ sich in der Verumgruppe ein höherer MAP ausmachen. Zu keinem Messzeitpunkt fiel dieser jedoch signifikant höher aus als in der Kontrollgruppe. Zum Messzeitpunkt 4 und 5 wurde in der Verumgruppe ein signifikant höherer MAP gemessen als direkt vor Aortenclamping (MZP1) [Verumgrupe: MZP1: 89,5 (75-104) mmHg <> MZP4: 116 (81-160) mmHg p=0,006 <> MZP5: 122 (70-156) mmHg p=0,003. Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,138; MZP1 p=0,238; MZP2 p=0,125; MZP3 p=0,085; MZP4 p=0,074; MZP5 p=0,100.].

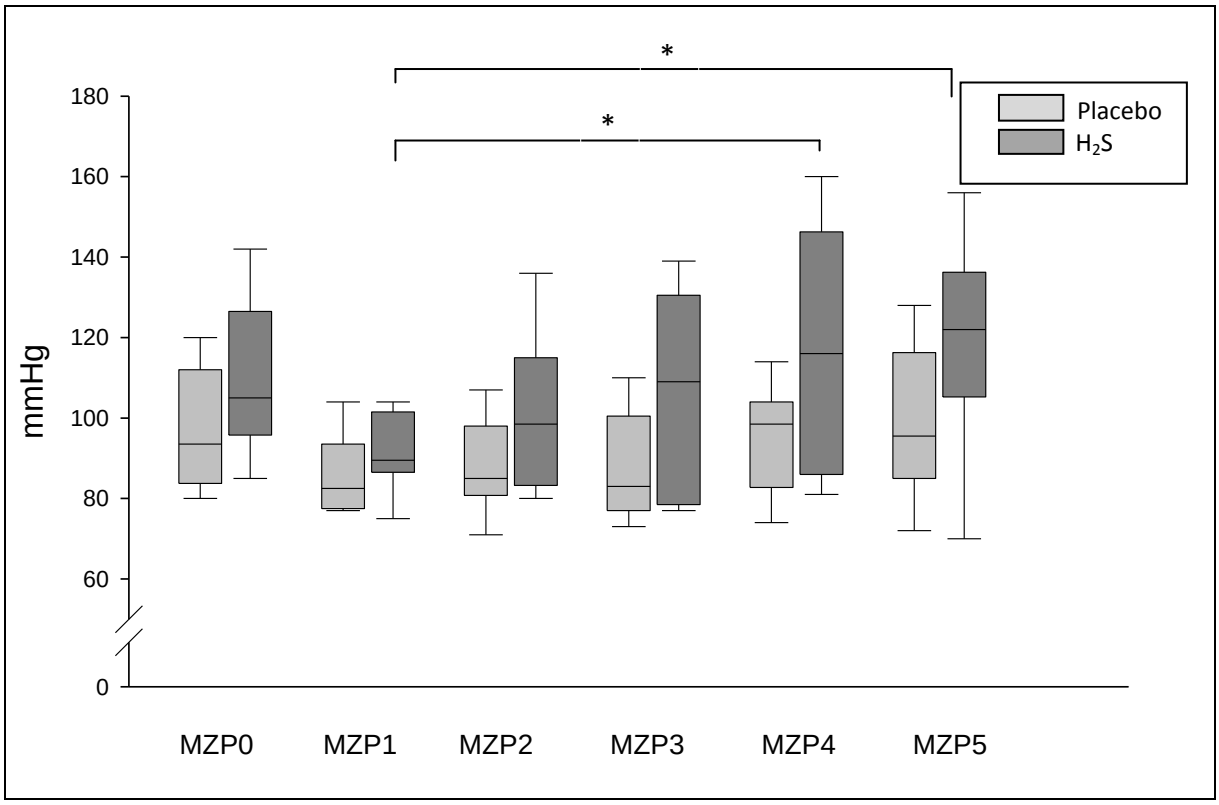

Abb. 6: mittlerer arterieller Druck (MAP) der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.1.3 Zentralvenöser Druck (ZVD)

Der ZVD zeigte sich in beiden Gruppen annähernd gleich hoch. Zu keinem Messzeitpunkt wurde eine signifikante Abweichung zwischen beiden Gruppen gemessen. In der Nachbeobachtungsphase zeigte sich jedoch ein signifikanter Anstieg des ZVD im Vergleich zum Ausgangswert direkt vor der Aortenokklusion (MZP1) in beiden Gruppen [Kontrollgruppe: MZP1: 11,5 (9-19) mmHg <> MZP2: 16 (13-18) mmHg p=0,011. Verumgruppe: MZP1: 10,5 (8-12) mmHg <> MZP2: 14 (12-16) mmHg p=<0,001. Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,167; MZP1 p=0,144; MZP2 p=0,166; MZP3 p=0,574; MZP4 p=0,797; MZP5 p=0,793.].

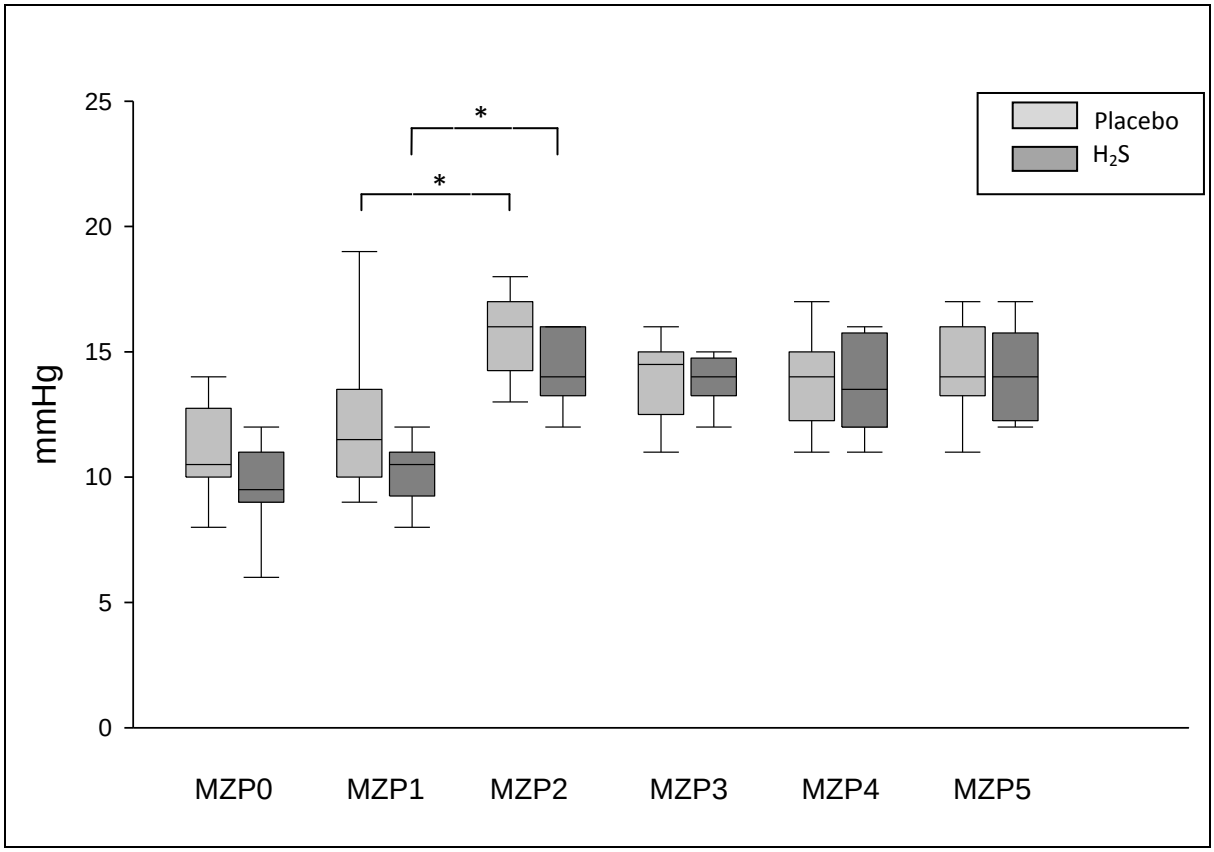

Abb. 7: Zentralvenöser Druck ZVD der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.1.4 Cardiac-Output-Index (COI)

Der COI zeigte nach Wiedereröffnung der Aortenstrombahn einen signifikanten Anstieg [Kontrollgruppe: MZP1: 102 (69-132) <> MZP2: 171 (109-202) p=0,01. Verumgruppe: MZP1: 91 (87-162) <> MZP2: 171 (118-195) p=<0,001]. Zwischen den beiden Gruppen ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied feststellen [Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,348; MZP1 p=0,442; MZP2 p=0,619; MZP3 p=0,862; MZP4 p=0,744; MZP5 p=1,0].

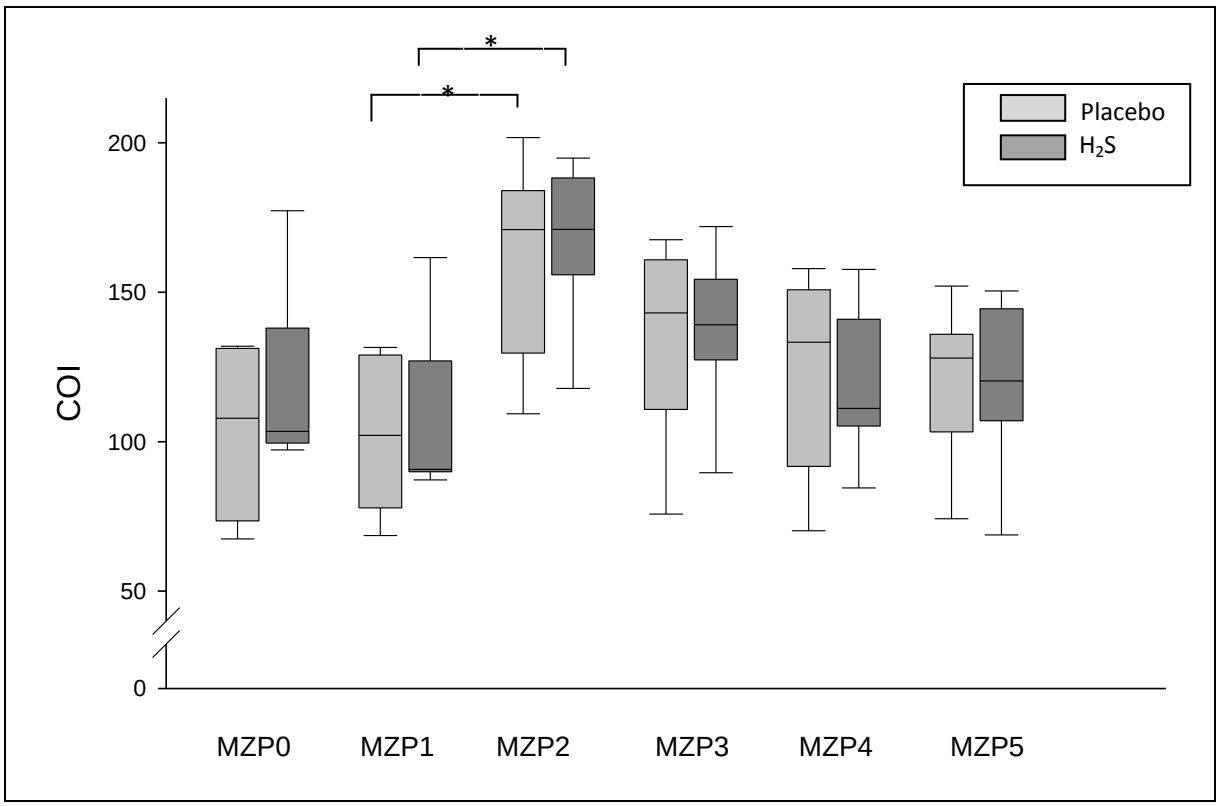

Abb. 8: Cardiac-Output-Index (COI) der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.1.5 Noradrenalinverbrauch

Beim Noradrenalinverbrauch zeigte sich ein eindeutig signifikantes Ergebnis zugunsten von H_2S. Es konnte ein deutlich geringerer Noradrenalinverbrauch in der Verumgruppe nachgewiesen werden [Kontrollgruppe: 35,70 (15,96-99,72) µg/kgKG. Verumgruppe: 18,39 (10,43-42,59) µg/kgKG p=0,031].

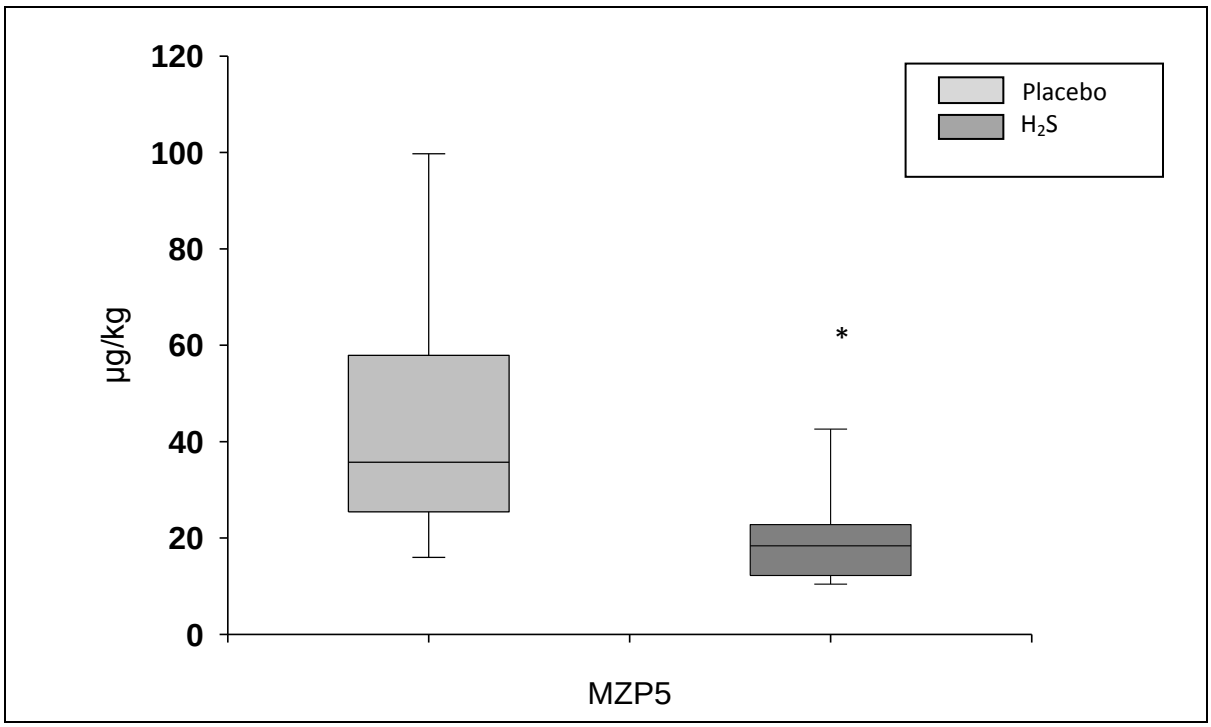

Abb. 9: Noradrenalinverbrauch der Versuchstiere (Schweine) in der kompletten Nachbeobachtungsphase zum Messzeitpunkt 5 (MZP5)

3.2 Systemischer Metabolismus

3.2.1 Sauerstoffaufnahme (VO_2)

Bei der Sauerstoffaufnahme (VO_2) zeigte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Auch innerhalb der beiden Gruppen kam es zu keiner signifikanten Änderung der Sauerstoffaufnahme [Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,322; MZP1 p=0,205; MZP2 p=0,695; MZP3 p=0,660; MZP4 p=0,707; MZP5 p=0,738].

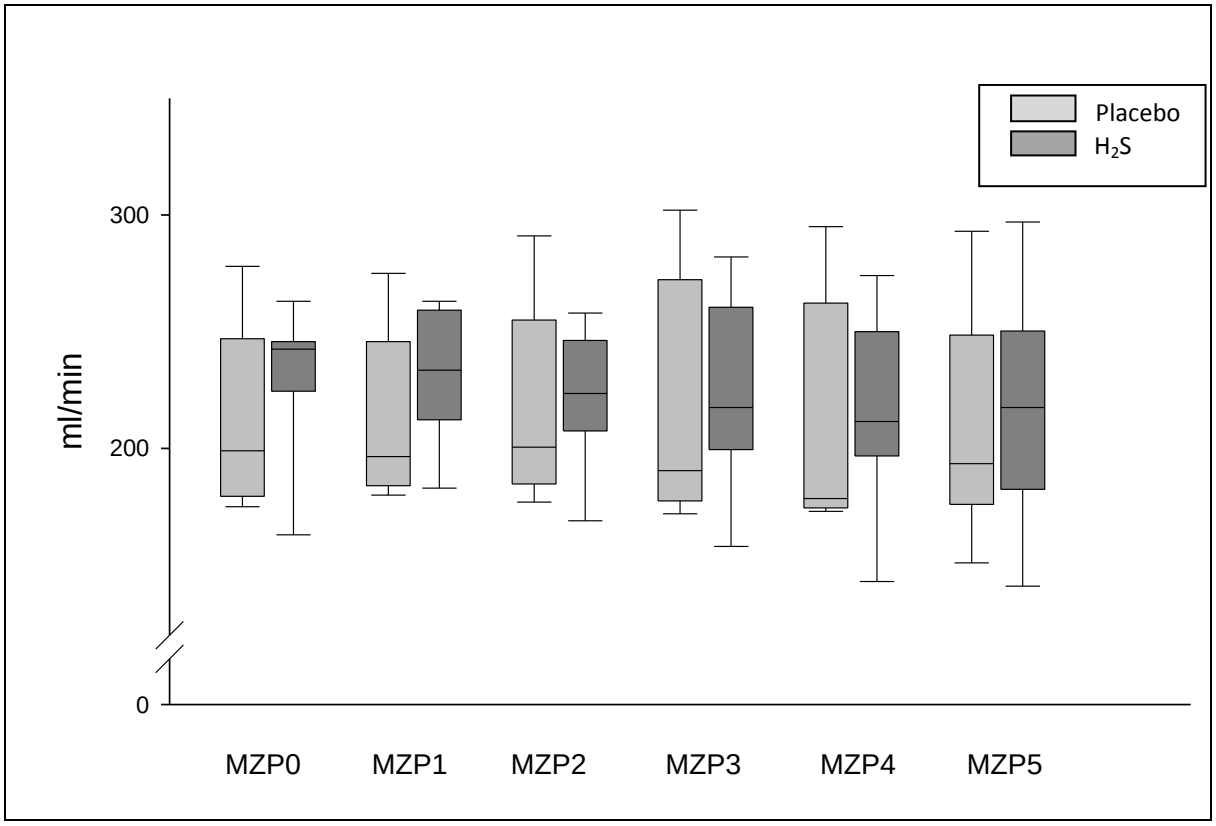

Abb. 10: Sauerstoffaufnahme der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.2.2 Kohlendioxidproduktion (VCO_2)

Die Kohlendioxidproduktion zwischen den beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Zu Beginn der Nachbeobachtungsphase, direkt nach Wiedereröffnung der Aortenstrombahn (MZP2) zeigte sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg des VCO_2, welcher sich bis zum Versuchsende wieder normalisierte [Kontrollgruppe: MZP1: 121,5 (109-177) ml/min <> MZP2: 132 (127-217) ml/min p=0,011. Verumgruppe: MZP1: 148,5 (109-170) ml/min <> MZP2: 154,5 (126-204) ml/min p=0,010. Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,327; MZP1 p=0,191; MZP2 p=0,591; MZP3 p=0,379; MZP4 p=0,421; MZP5 p=0,402].

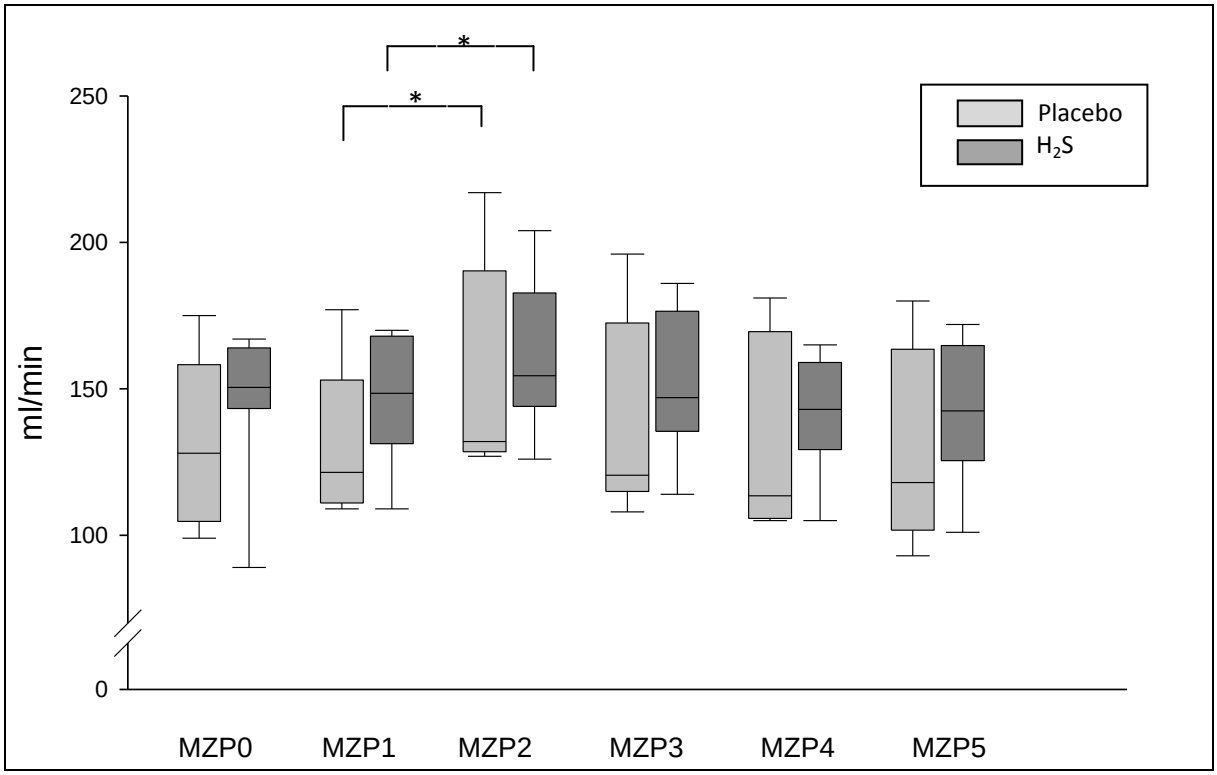

Abb. 11 Kohlendioxidproduktion der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.2.3 Körpertemperatur

Es konnte kein Effekt auf die Körpertemperatur nachgewiesen werden. In beiden Gruppen kam es zu einer leichten Absenkung der Körpertemperatur während des Versuches [Kontrollgruppe: MZP1: 36,6 (35,1-38,8) °C <> MZP5: 35,2 (33,3-38,5) °C. Verumgruppe: MZP1: 36,8 (35,9-38,3) °C <> MZP5: 35,3 (33,5-37,4) °C. Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,690; MZP1 p=0,785; MZP2 p=0,875; MZP3 p=0,940; MZP4 p=0,908; MZP5 p=1,0].

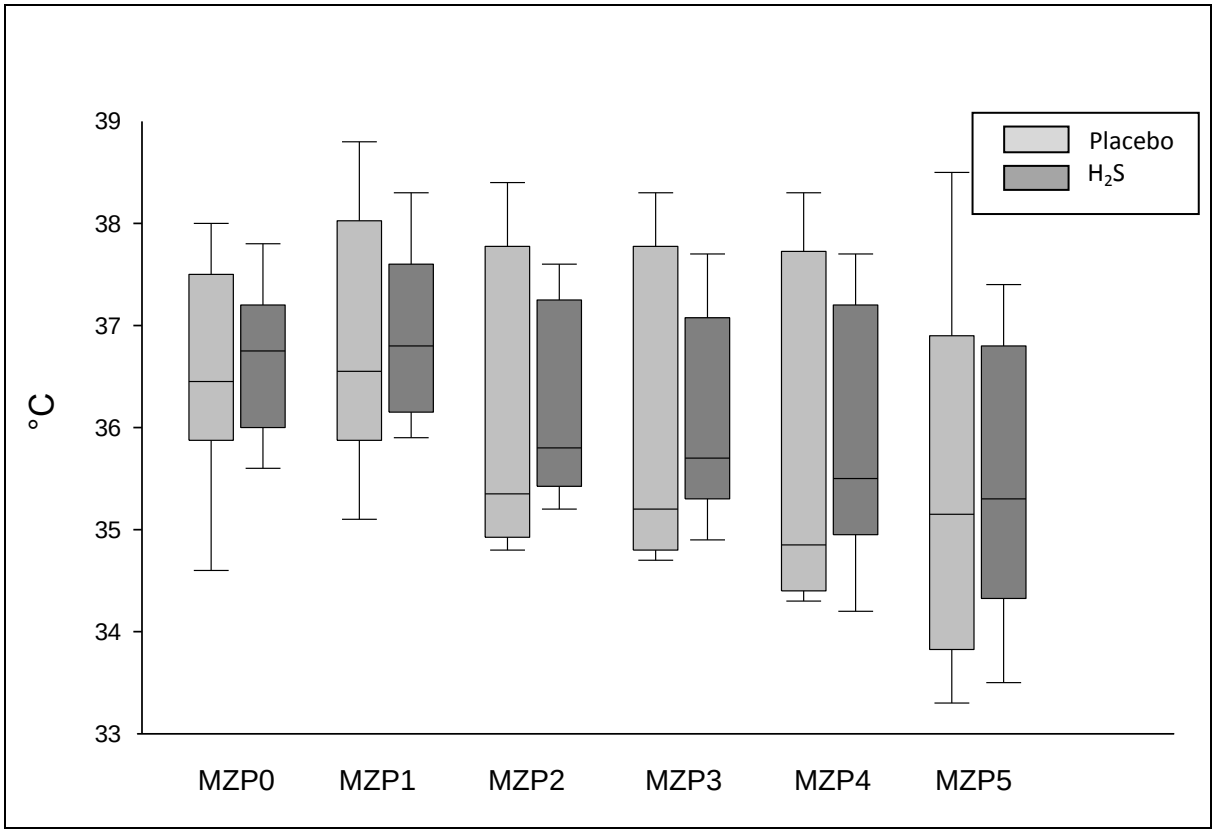

Abb. 12: Körpertemperatur der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.2.4 arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO_2)

In Bezug auf den pO_2 zeigte sich zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Zum Messzeitpunkt 2 konnte ein Rückgang des pO_2 bei beiden Gruppen beobachtet werden. Bei den MZP 3-5 zeigte sich eine leichte Erhöhung des pO_2 zu Gunsten der Verum-Gruppe, welche die Signifikanz jedoch deutlich verfehlt [Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,646; MZP1 p=0,739; MZP2 p=0,822; MZP3 p=0,819; MZP4 p=0,886; MZP5 p=0,808].

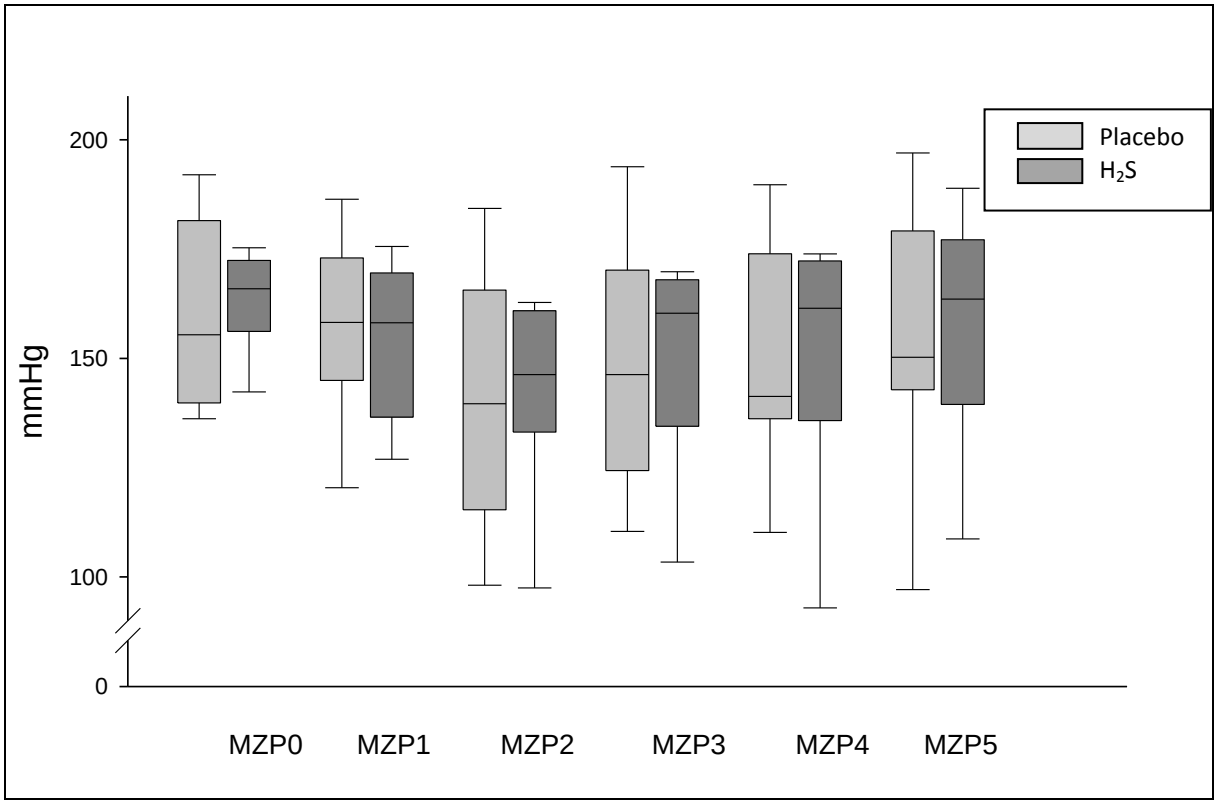

Abb. 13: arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO_2) der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.2.5 arterieller Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2)

Auch der pCO_2 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Zum Messzeitpunkt 2 kommt es zu einer deutlichen Erhöhung des pCO_2, welche das Signifikanzniveau auch erreicht [Kontrollgruppe: MZP1: 39,35 (32,2-43,7) mmHg <> MZP2: 44,7 (53,1-33,7) mmHg p=0,004. Verumgruppe: MZP1: 37,4 (30-44,5) mmHg <> MZP2: 39,5 (36,7-54,3) mmHg p=0,016. Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,639; MZP1 p=0,703; MZP2 p=0,662; MZP3 p=0,535; MZP4 p=0,792; MZP5 p= 0,991].

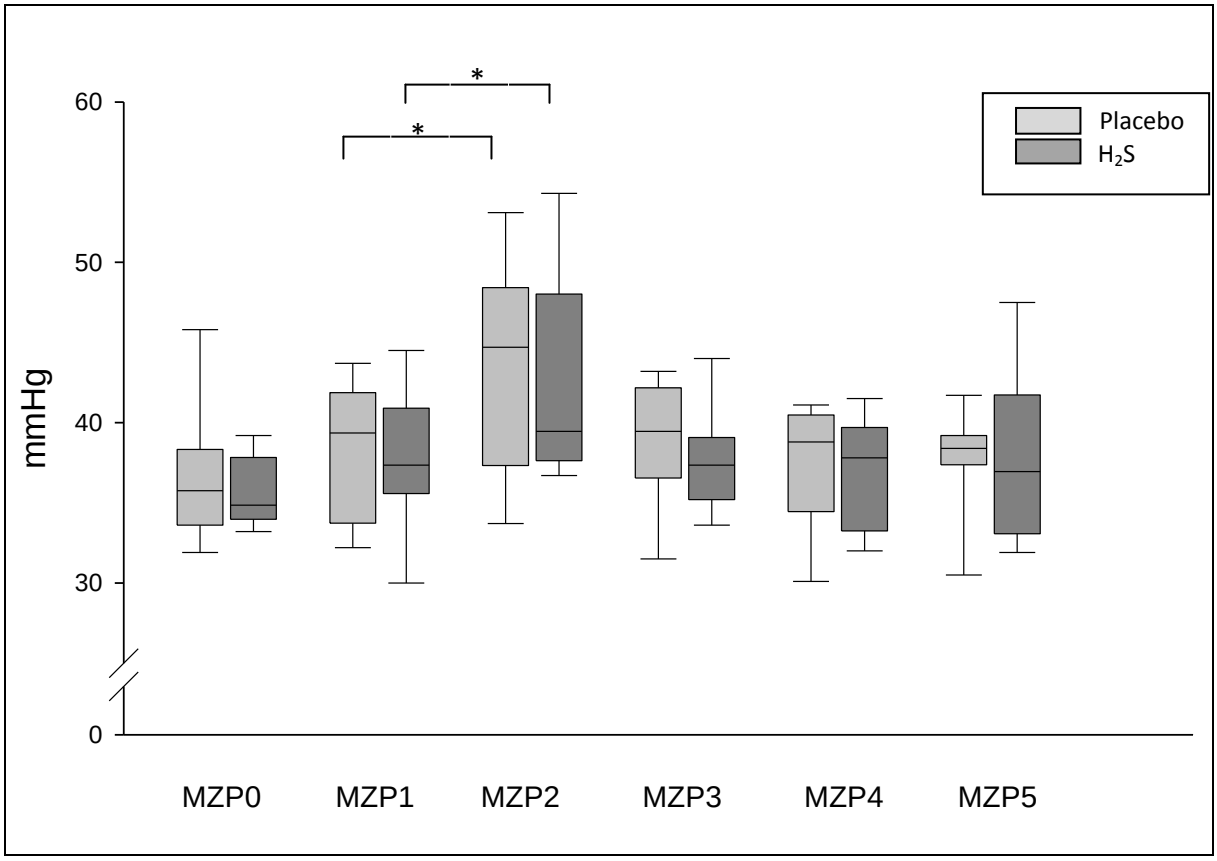

Abb. 14: arterieller Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.2.6 Lactat

Die Lactatkonzentration zeigte in der Nachbeobachtungsphase zunächst in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg [Kontrollgruppe: MZP1: 1,35 (0,30-2,60) mmol/l <> MZP2: 4,75 (2,50-6,50) mmol/l p=<0,001. Verumgruppe: MZP1: 0,65 (0,20-3,50) mmol/l <> MZP2: 3,35 (1,90-10,20) mmol/l p=<0,001]. Bis zum Versuchsende normalisierte sich die Lactatkonzentration wieder zeigte jedoch zwischen den beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied [Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,199; MZP1 p=0,593; MZP2 p=0,698; MZP3 p=0,579; MZP4 p=0,340; MZP5 p=0,442].

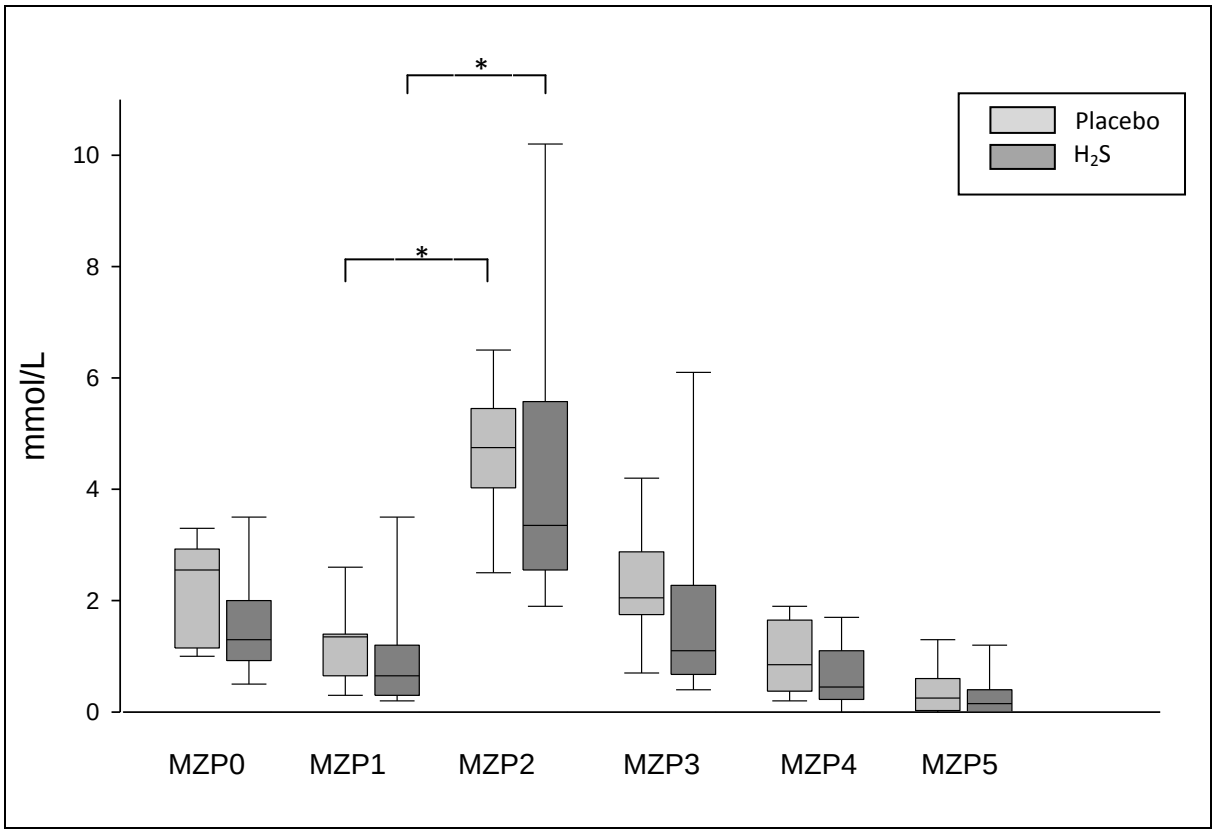

Abb. 15: Lactatkonzentration der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.2.7 Blutzucker

Die Blutzuckerwerte zeigten in beiden Gruppen ähnliche Werte ohne signifikanten Unterschied [Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,575; MZP1 p=0,655; MZP2 p=0,631; MZP3 p=0,826; MZP4 p=0,996; MZP5 p=0,537].

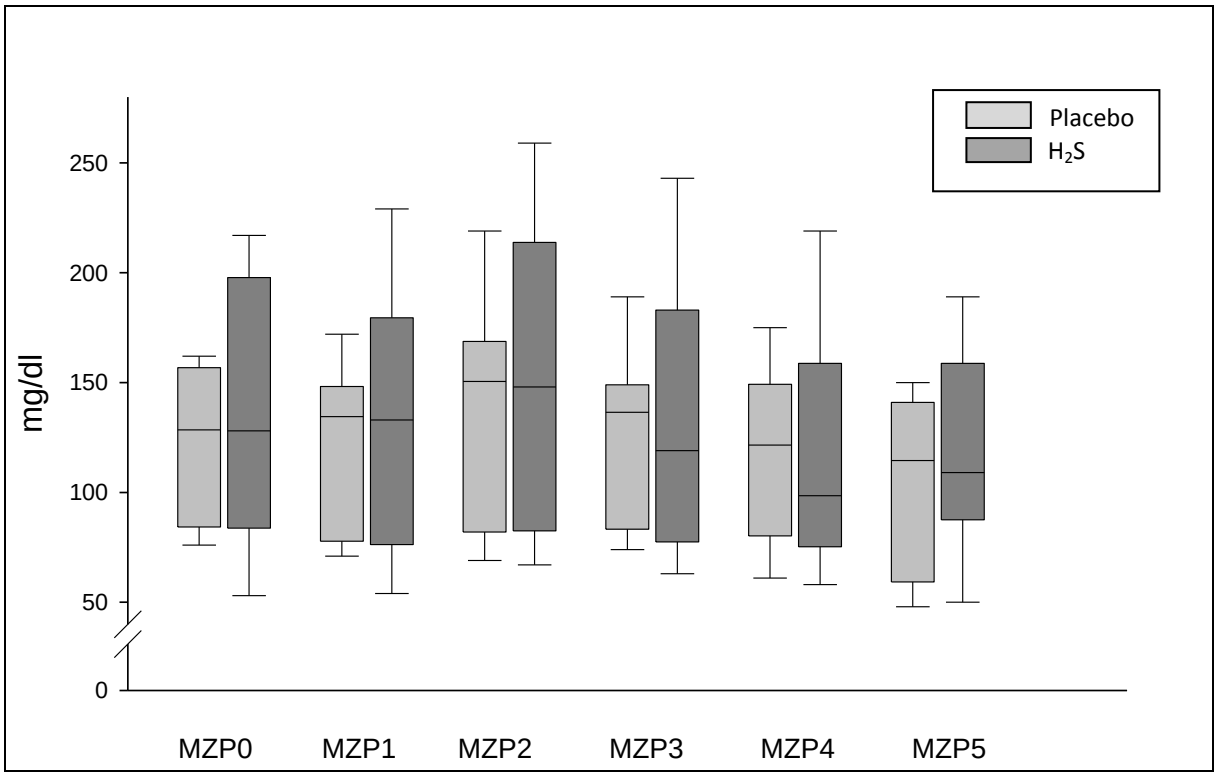

Abb. 16: Blutzucker der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.3 lokale Hämodynamik der rechten Niere und Nierenfunktion

3.3.1 Nierenperfusion

Die Nierenperfusion zeigte sich während der kompletten Versuchsdauer nahezu konstant. Es konnten keine signifikanten Unterschiede gemessen werden [Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,343; MZP1 p=0,243; MZP2 p=0,623; MZP3 p=0,501; MZP4 p=0,381; MZP5 p=0,472].

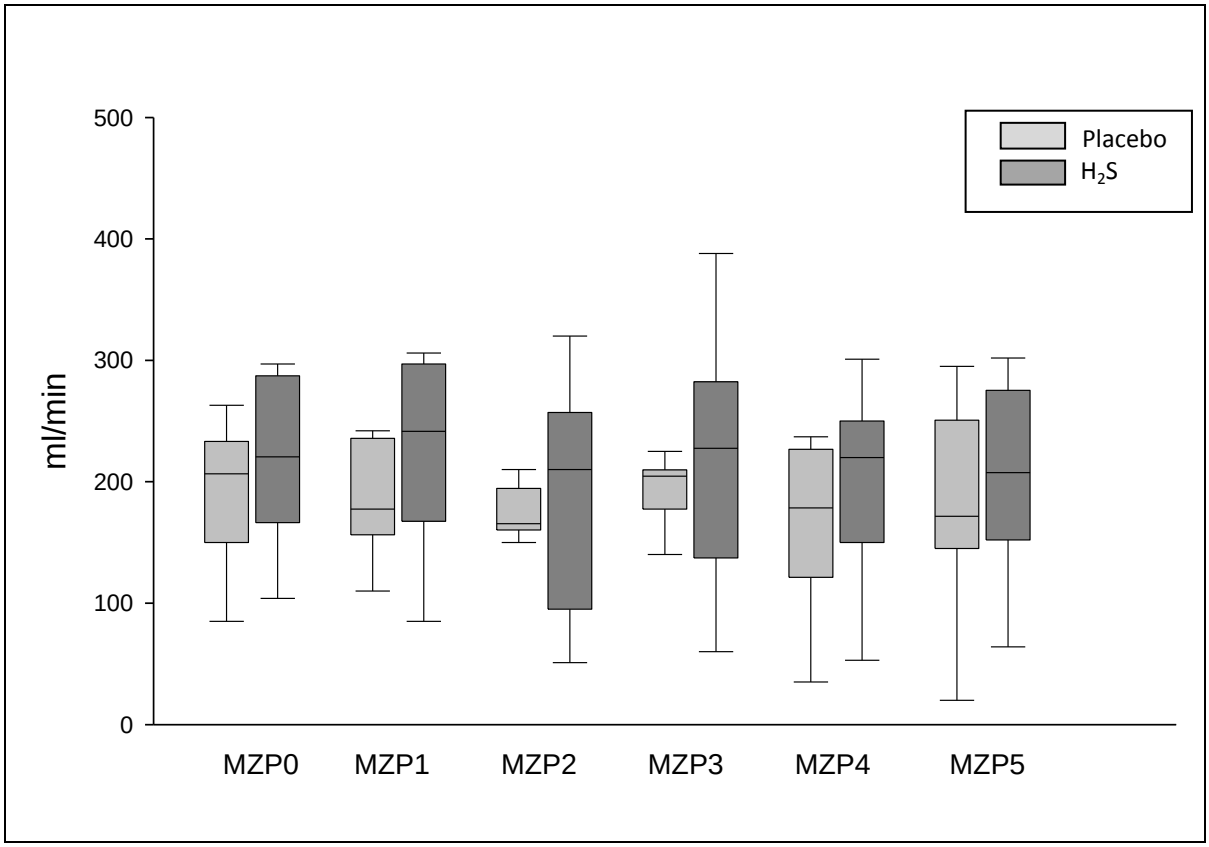

Abb. 17: Nierenperfusion der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.3.2 Mikrozirkulation

Die Mikrozirkulation in der rechten Nierenrinde zeigte gegenüber der Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg in der Verumgruppe zum Messzeitpunkt 1 [Kontrollgruppe: MZP1: 247 (115-296) Units. Verumgruppe: MZP1: 405 (160-578) Units. Kontrollgruppe vs. Verumgruppe: MZP0 p=0,387; MZP1 p=0,030; MZP2 p=0,783; MZP3 p=0,352; MZP4 p=0,882; MZP5 p=0,781].

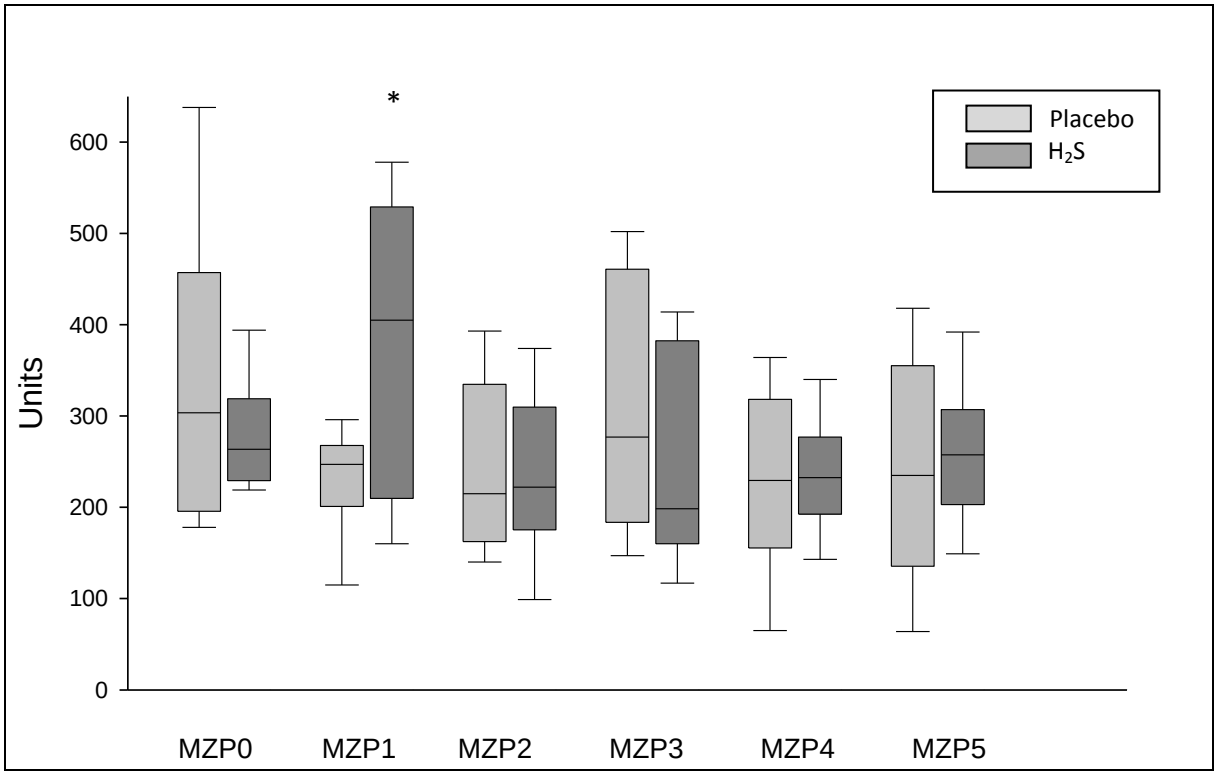

Abb. 18: Mikrozirkulation der Versuchstiere 8Schweine) Verum vs. Placebo zu den einzelnen Messzeitpunkten (MZP)

3.3.3 Kreatinin-Clearance

In beiden Gruppen konnte ein signifikanter Rückgang der Kreatinin-Clearance vom Ausgangswert (MZP1) vor Aortenokklusion zum Endwert (MZP5) 8h nach Wiedereröffnung festgestellt werden [Kontrollgruppe: MZP1: 68,8 (54,7-76,6) ml/min <> MZP5: 20,6 (0,6-37,1) ml/min p=<0,001. Verumgruppe: MZP1: 78,8 (61,5-164,5) ml/min <> MZP5: 8,0 (1,1-19,9) ml/min p=<0,001]. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen fielen jedoch nicht signifikant aus p=0,098.

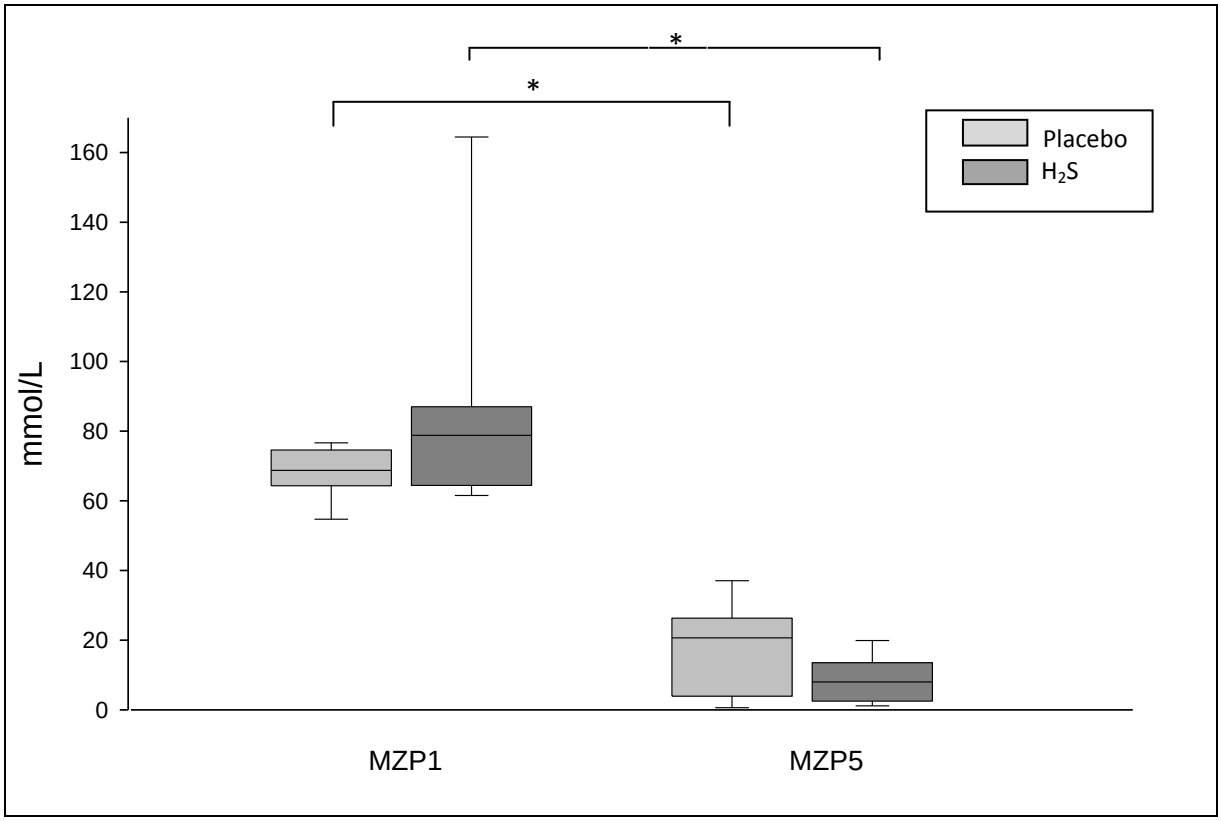

Abb. 19: Kreatinin-Clearane der Versuchstiere (Schweine) Verum vs. Placebo zu den Messzeitpunkten (MZP) 1 und 5

3.4 Histologie

3.4.1 Immunhistologische Tunel-Färbung

Die Auswertung der Tunel-Färbung erbrachte kein signifikantes Ergebnis. Die Anzahl der Apoptosen waren in beiden Gruppen annähernd gleich [Kontrollgruppe: 9,5 (2-29) Apoptosen/50 Gesichtsfelder. Verumgruppe: 11 (3-18) Apoptosen/50 Gesichtsfelder p=0,804].

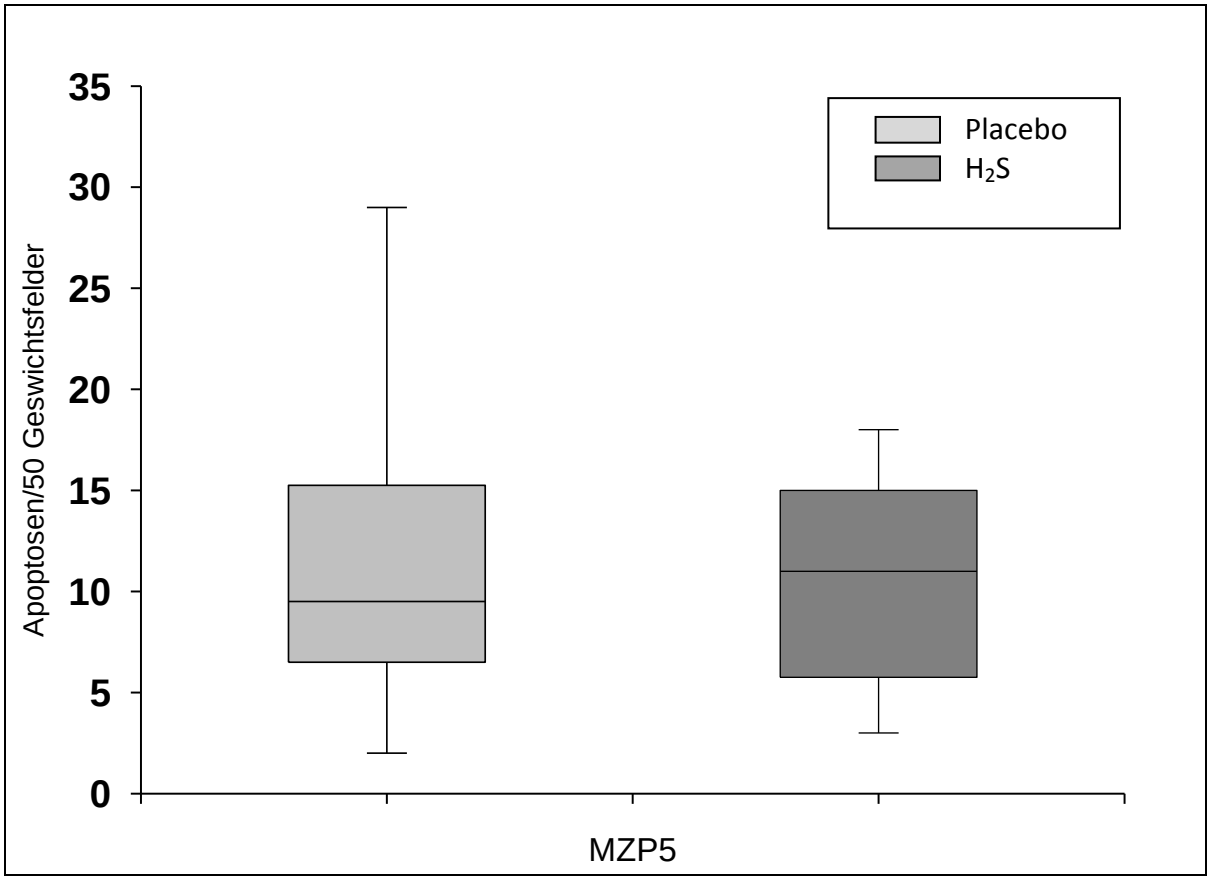

Abb. 20: Darstellung der Apoptosenzahl in den Nierenpräparaten der Versuchstiere (Schweine) pro 50 Gesichtsfelder bei 400facher Vergrößerung

3.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Präparate wurden durch eine erfahrene Neuropathologin (Fr. Dr. Scheuerle, Klinikum Günzburg) im Bezug auf morphologische Gesichtspunkte ausgewertet. Dabei zeigten sich keine auffälligen Unterschiede zwischen den Gruppen. Eine quantitative Beurteilung der Schädigung war nicht möglich. Vereinzelt zeigten sich Nekrosen und Abflachungen des Tubulusepithels, zusätzlich Zellbestandteile im Tubuluslumen und Atrophien der Glomeruli.

4 Diskussion

In der beschriebenen Studie wurde die Auswirkung von H_2S auf die Morphologie der Niere nach 120 minütiger Aortenokklusion untersucht. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob auch bei reduzierter H_2S-Dosis eine „Suspended Animation“ nachgewiesen werden kann. Im Vorversuch gelang dieser Nachweis (Simon et al. 2008), aber es zeigte sich eine Pneumotoxizität. Daher sollte in der Folge untersucht werden, ob sich in der aktuell untersuchten Versuchsanordnung die Pneumotoxizität verringern lässt.

4.1 Das Versuchsmodell

Im vorliegenden Versuch kam ein Tiermodell zur Anwendung, das bereits gut etabliert war (Hauser et al. 2005, Hauser et al. 2006, Annecke et al. 2007, Kick et al. 2007). Zur Vereinfachung der chirurgischen Präparation wurde an Stelle von zwei Ballonkathetern nur ein Ballon auf Höhe der Nierenarterienabgänge platziert. Dadurch konnte auf eine Thorakotomie zur Lagekontrolle des oberen Ballonkatheters verzichtet werden. Die Ergebnisse unseres Versuchs zeigen, dass auch durch diese Vereinfachung ein nahezu identischer Verlauf zu vorherigen Studien mit zwei Ballonkathetern beobachtet werden konnte. Der vereinfachte und somit technisch leichter realisierbare Versuchsaufbau scheint daher gleichwertig zu der deutlich komplexeren Zwei-Ballon-Technik zu sein.

Die im von uns durchgeführten Ein-Ballon-Versuch erhobenen Messdaten bezüglich Hämodynamik und Metabolismus werden im Folgenden ausführlich diskutiert:

Trotz anatomischer Varianten war es stets möglich, den Doppler-Ultraschall-Flusskopf auf der Nierenarterie zu platzieren und die Messung des renalen Blutflusses korrekt durchzuführen. Auch die Laser-Doppler-Remissions-Spektrophotometrie-Sonde zur Messung der Mikrozirkulation konnte immer auf der Nierenkapsel angenäht werden. Die Ausleitung der Kabel und Sonden durch die Bauchdecke war ebenso immer möglich. Anstelle der Ultraschallmessung kommt in anderen tierexperimentellen Studien die Messung der Nierendurchblutung mittels PAH-Clearance zur Anwendung (Alric et al. 2003). Dieses Messverfahren hat den Vorteil, dass es keinen operativen Eingriff erfordert. Zudem sind die Ergebnisse durch die analoge Messmethode besser mit menschlichen Daten vergleichbar.

Nachteil dieses Messverfahrens sind allerdings vielfältige Fehlerquellen durch Konzentrationsschwankungen der applizierten PAH-Lösung, laborchemische Messfehler sowie eine zu geringe Urinausscheidung. Auch ist mit diesem Verfahren keine kontinuierliche Flussmessung möglich.

H_2S als infundierbares Studienmedikament hat im Gegensatz zur gasförmigen, inhalativen Form entscheidende Vorteile: Die Anwendung ist einfacher, es kann auf ein Inhalationssystem verzichtet werden, das Risiko einer Exposition des Versuchspersonals wird minimiert und die Belästigung durch den charakteristischen Geruch von H_2S wird weitgehend verhindert. Darüber hinaus sollten die unerwünschten Nebenwirkungen von inhalativem H_2S, die bereits bei sehr geringen Mengen auftreten, bestmöglich vermieden werden (Couch et al. 2005, Szabo 2007). Wie sich im Vorversuch zeigte, gilt dies nicht für die beobachtete Pneumotoxizität (Simon et al. 2008). Allerdings ist in diesem Versuch keine Pneumotoxizität aufgetreten.

4.2 Systemische Hämodynamik

Eine durch H_2S induzierte „Suspended Animation“ ist in den meisten beschriebenen Versuchen durch einen signifikanten Abfall der Herzfrequenz gekennzeichnet (Blackstone et al. 2005, Szabo 2007, Simon et al. 2008). In unserem Versuch ist dieser Umstand nicht zu beobachten. Der Herzfrequenzverlauf zeigt sich in beiden Gruppen annähernd gleich. Einzig nach Ende der Aortenokklusion kommt es kurzzeitig zu einem nicht signifikanten Frequenzanstieg in beiden Gruppen. Dies deckt sich mit den Daten aus anderen Clamping-Versuchen (Meloche et al. 1977, Neglén et al. 1980). Auch der ZVD zeigt in beiden Gruppen den charakteristischen Verlauf eines Aortenclamping. Im Vorversuch wurde ein signifikant niedrigeres Herzminutenvolumen auf eine niedrigere Herzfrequenz zurückgeführt (Simon et al. 2008). Parallel zur sich nicht unterscheidenden Herzfrequenz zeigt auch der COI in unserem Versuch keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Nach Öffnen der Aortenstrombahn kommt es zu einem Anstieg des COI, was der allgemeinen Pathophysiologie entspricht (Brusoni et al. 1978, Perry 1968, Reiz et al. 1979). Der MAP zeigt nach Declamping deutlich höhere Werte in der Verumgruppe, welche nur knapp die Signifikanz verfehlen. Diese Beobachtung spiegelt sich wieder im signifikant niedrigeren

Noradrenalinverbrauch in der Verumgruppe, der schon im Vorversuch beobachtet werden konnte (Simon et al. 2008). Zunächst wurde davon ausgegangen, dass H_2S als Vasodilatator fungiert (Szabo 2007, Fiorucci et al. 2006, Bhatia 2005). In einigen Studien an Ratten konnte sogar ein blutdrucksenkender Effekt nachgewiesen werden (Geng et al. 2004, Zhao et al. 2001). Dies steht im Gegensatz zu unseren Beobachtungen. Der höhere MAP sowie der daraus resultierende niedrigere Noradrenalinverbrauch legen nahe, dass sich H_2S eher stabilisierend auf den Gefäßtonus auswirkt. Auch in weiteren Studien wurde dieser Effekt mittlerweile bestätigt (Simon et al. 2008, Koenitzer et al. 2007). Je nach H_2S -Konzentration und pO_2 scheint H_2S sowohl vasodilatatorische, bei niedriger H_2S-Konzentration und niedrigem pO_2, als auch vasokonstriktorische, bei hoher H_2S-Konzentration und hohem pO_2, Eigenschaften zu haben (Koenitzer et al. 2007, Ali et al. 2006). Dabei bleibt festzuhalten, dass der arterielle pO_2 unserer Versuchstiere nahezu immer über 100mmHg lag. Somit wurde ein pO_2-Wert verwendet, für den H_2S als Vasokonstriktor beschrieben wurde. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen.

4.3 Systemischer Metabolismus

In einigen anderen Versuchen mit H_2S zeigte sich ein Abfall der Körpertemperatur als Zeichen der induzierten „Suspended Animation“ (Blackstone et al. 2005, Aslami et al. 2009, Li et al. 2008). Dies konnte in diesem Versuch nicht beobachtet werden. Lediglich gegen Ende des Versuchs kam es zu einem signifikanten Abfall der Körpertemperatur. Dieser Vorgang konnte allerdings in beiden Gruppen gleichermaßen festgestellt werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt nicht durch H_2S hervorgerufenen wird, sondern vermutlich durch den Versuchsaufbau zustande kommt.

Zusätzlich zur erniedrigten Körpertemperatur zeigt sich in Studien mit H_2S ein erniedrigter Sauerstoffverbrauch, sowie eine reduzierte Kohlendioxidproduktion als Ausdruck eines reduzierten Metabolismus (Blackstone et al. 2005, Blackstone et al. 2007, Simon et al. 2008). In unserem Versuch konnte dieser Umstand nicht nachgewiesen werden. Auch die beschriebene Lactaterhöhung durch H_2S (Bhambhani et al. 1991) fiel bei uns nicht signifikant zur Kontrollgruppe aus. Der Effekt der Hemmung der Cytochrom Oxidase (Khan et al. 1990)

und somit die Hemmung der aeroben Glykolyse konnte nicht reproduziert werden. Lediglich in der frühen Reperfusionsphase kam es zum Anstieg der Lactatkonzentration. Als Zeichen des Wechsels von aerober zu anaerober Glykolyse geschah dies in beiden Gruppen und kann somit als Ausdruck des korrekt durchgeführten Aortenclampings aufgeführt werden. Durch den Sauerstoffmangel im betroffenen Gebiet kommt es zwangsläufig zu anaeroben Abbauprozessen. Die Erholung der Lactatkonzentration gegen Ende des Versuchs zeigt außerdem, dass die Leberfunktion weitestgehend intakt war und somit kein ischämischer Leberschaden durch zu hohes Aortenclamping gesetzt wurde. Der fehlende Effekt auf die Lactatkonzentration in der Verumgruppe zeigt sich auch in dem nahezu gleichen Verlauf der Blutzuckerspiegel. Bei gleichen Verläufen der Sauerstoffaufnahme, der Kohlendioxidproduktion, der Lactatkonzentration sowie des Blutzuckerspiegels in beiden Gruppen kann davon ausgegangen werden, dass sich bei der hier im Versuch eingesetzten Dosierung von H_2S keine Auswirkung auf den Metabolismus einstellt. Auch in einem Versuch an kleinen Schweinen und an Schafen konnte ein fehlendes Ansprechen des Metabolismus auf H_2S nachgewiesen werden (Li et al. 2008, Haouzi et al. 2008). Bei beiden Versuchen wurde allerdings auf inhalatives H_2S zurückgegriffen. In beiden Fällen wurde eine zu niedrige Dosierung als Ursache des fehlenden Effekts diskutiert. Simon et al. konnte zeigen, dass bei doppelter Dosierung als der hier angewandten sehr wohl ein metabolischer Effekt zu beobachten ist (Simon et al. 2008). Dabei kam es jedoch zu einem kontinuierlichen Abfall des Sauerstoffpartialdrucks, was als Zeichen einer pulmonalen Schädigung gedeutet wurde. In unserem Versuch hielt sich sowohl der pO_2 als auch der pCO_2 konstant bei gleichbleibender FiO_2 und gleichbleibendem Atemminutenvolumen (AMV). In der frühen Reperfusionsphase kommt es in beiden Gruppen gleichermaßen zu einem signifikanten Anstieg des pCO_2 sowie der Kohlendioxidproduktion, wobei davon ausgegangen werden kann, dass es sich hierbei um ein Phänomen der eingegangenen Sauerstoffschuld des ischämischen Gewebes handelt. Für eine Lungenschädigung gibt es somit keinen Anhalt. Vermutlich handelt es sich also bei der Pneumotoxizität von H_2S um eine Dosis abhängige Nebenwirkung.

4.4 Lokale Hämodynamik und Nierenfunktion

Zum ersten Meßzeitpunkt (MZP1) zeigt sich in der Verumgruppe ein deutlicher Anstieg der Mikrozirkulation in der Nierenkapsel. Gleichzeitig zeigt die Ultraschall-Flussmessung in der A. renalis keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe, so dass die gesteigerte Mikrozirkulation in der Nierenkapsel zu Beginn (MZP1) nicht durch einen erhöhten Fluss in der A. renalis erklärt werden kann. Schon zum ersten MZP nach Reperfusion zeigt sich die Mikrozirkulation in beiden Gruppen wieder nahezu identisch. Vermutlich spielt bei dieser Beobachtung der oben erwähnte gefäßstabilisierende Effekt eine Rolle.

Durch die annähernd gleichen hämodynamischen Parameter der Niere in beiden Gruppen kann sichergestellt werden, dass kein hämodynamischer Confounder vorliegt, der die histologischen Ergebnisse der Nierenschnitte verzerrt.

Die Kreatinin-Clearance spiegelt annähernd die GFR wieder, da Kreatinin vorwiegend glomerulär filtriert und nur zu einem sehr geringen Anteil sezerniert wird. Daher gilt die Kreatinin-Clearance als guter Marker für die Nierenfunktion (Bennett et al. 1971).

In der Literatur lassen sich viele unterschiedliche Ergebnisse zur Kreatinin-Clearance während und nach Aortenclamping finden. Schon 1983 konnte gezeigt werden, dass thorakales Aortenclamping ohne protektive Maßnahmen zu einer deutlich schlechteren Kreatinin-Clearance führt (Roberts et al. 1983). Verschiedenartigste Substanzen wurden seitdem getestet mit unterschiedlichem Erfolg. Der vorübergehende Abfall der Kreatinin-Clearance bei Aortenclamping muss jedoch nicht zwangsläufig in einem chronischen Nierenschaden enden. Ein Abfall der GFR und parallel dazu auch der Reabsorption kann zu einem reduzierten Sauerstoffbedarf führen, was als Schutzantwort auf die renale Hypoperfusion angesehen werden kann (Brezis et al. 1984, Brezis et al. 1989). In unserer Studie zeigt sich als Ausdruck eines Nierenschadens in beiden Gruppen ein signifikanter Abfall der Kreatinin-Clearance. Es konnte kein Einfluss von H_2S auf die Nierenfunktion nach Aortenclamping nachgewiesen werden.

4.5 Histologie

4.5.1 HE-Färbung

Eine quantitative Bestimmung der Schäden in der HE-Färbung war nicht möglich. Mit fachkundiger Hilfe einer erfahrenen Pathologin wurden die HE-Färbungen qualitativ beurteilt. Dabei zeigten sich typische ischämische Veränderungen in beiden Gruppen, darunter atrophische Glomeruli, abgeflachtes und nekrotisches Tubulusephithel und Zellbestandteile im Tubuluslumen. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen histologischen Begutachtungen nach Ischämie-Reperfusions-Versuchen. Dabei zeigen sich nach 45 Minuten Clamping der Nierenarterie und 24 Stunden Reperfusion Ephithelschwellungen, hyaline Zylinder, proteinöse Ablagerungen, medulläre Schädigungen, Hämorrhagien und tubuläre Nekrosen (Kaur et al. 2003).

4.5.2 Tunel-Färbung

Anders als bei der HE-Färbung ist bei der Tunel-Methode durchaus eine Quantifizierung der Ergebnisse möglich. Schwierig ist dabei die Detektion der richtigen Zellen. Während der I-R treten nämlich sowohl Apoptosen, als auch Nekrosen auf (Saikumar et al. 2003), die oftmals auf die gleiche Weise rot angefärbt werden. Daher war es wichtig, mit Hilfe einer erfahrenen Pathologin die Zellen anhand der Morphologie zu unterscheiden. Zusätzlich zur Anfärbung wird hierbei vor allem auf die Kondensation und Fragmentierung des Chromatins geachtet, was in dieser Form nur bei apoptotischen Zellen zu finden ist.

Wie ein Großteil der anderen untersuchten Parameter erwarten ließ, zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Apoptoseraten zwischen beiden Gruppen. Dabei konnten in der Vergangenheit durchaus positive Effekte von H_2S auf die Apoptoseanzahl gezeigt werden(Elrod et al. 2007, Sodha et al. 2008). Diese Studien beziehen sich zwar auf myocardiale Ischämien, jedoch wären bei ausreichend hohem Sulfid-Plasmaspiegel durchaus Effekte zu erwarten gewesen. Die fehlende Reduktion der Apoptoserate durch H_2S ist also vermutlich ebenfalls auf eine zu niedrige Medikamentendosierung zurückzuführen.

4.6 Schlussfolgerung

In der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten reduzierten Dosierung konnte kein Anhalt für die Induktion einer „Suspended Animation“ durch H_2S im Schweinemodell nachgewiesen werden. Es konnten keine Effekte im Bezug auf Herzfrequenz, zentralen Venendruck, Cardiac Output Index, Sauerstoffaufnahme, CO_2-Produktion, Temperatur, Sauerstoff- und Kohlendioxid-Partialdruck, Lactat, Blutzuckerspiegel, Nierenperfusion, Mikrozirkulation und Kreatinin-Clearance beobachtet werden. Zudem gab es keine morphologischen Unterschiede im Bezug auf die Nieren-Histologie. Lediglich ein Gefäß-stabilisierender Effekt durch H_2S kann vermutet werden.

5. Zusammenfassung

Dem ehemals als starkes Zellgift bekannten Hydrogensulfid (H_2S) kommt seit einigen Jahren höchste Aufmerksamkeit zu. Mehrfach konnte bereits gezeigt werden, dass durch Inhalation oder Injektion eine „Suspended Animation“ induziert werden kann. Dabei kommt es zu einer Reduktion fast aller lebenswichtigen Vorgänge im Körper und zur Aktivierung von Schutzmechanismen gegen oxidativen Stress.

Der aortale Clampingversuch am Schwein bietet eine gute und etablierte Methode, die durch H_2S induzierten Vorgänge zu untersuchen. Vor allem die Begrenzung der lokalen Schäden durch die Ischämie-Reperfusion-Sequenz an der Niere können gut untersucht werden.

Auf Basis dieses gut untersuchten Modells wurden die Versuche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Zum ersten Mal wurde mit Na_2S ein infundierbares Sulfid verwendet vor allem mit der Absicht, schwerwiegende pulmonale Nebenwirkungen zu reduzieren. Leider zeigte sich bereits im Vorversuch, dass die Pneumotoxizität nicht allein auf den inhalativen Applikationsweg zurückzuführen ist. Daher wurde in der anschließenden Versuchsplanung die Dosis und Dauer der H_2S-Gabe um die Hälfte reduziert.

Es sollte untersucht werden, ob eine induzierte „Suspended Animation“ nachgewiesen werden kann, und ob dadurch ein Einfluss auf die Morphologie der Niere zu beobachten ist. Des Weiteren sollte durch Halbierung der Dosis die Lungenschädigung reduziert werden.

An 18 deutschen Landschweinen wurde ein 120 minütiges Aortenclamping auf Höhe der Nierenarterien durchgeführt. Die Infusion des Studienmedikaments bzw. des Placebos wurde zwei Stunden vor Clamping begonnen und vier Stunden nach Reperfusion beendet. Anschließend folgte eine Beobachtungszeit von weiteren vier Stunden, welche mit Entnahme der rechten Niere endete.

Zeigten sich im Vorversuch noch einige vielversprechende Unterschiede zwischen der Verum- und der Placebo-Gruppe, so konnte in diesem Versuch lediglich ein verringerter Noradrenalinverbrauch festgestellt werden. Vermutlich ist für diesen reduzierten Noradrenalinverbrauch der gefäßtonusstabilisierende Effekt von H_2S verantwortlich. Im aktuellen Versuch konnte weder eine induzierte „Suspended Animation“ noch eine

Auswirkung auf die Nierenmorphologie nachgewiesen werden. In der Tunel-Färbung zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Apoptoseraten zwischen beiden Gruppen. Durch die geringere Dosis zeigte sich allerdings auch ein deutlich höherer arterieller Sauerstoffpartialdruck als im Vorversuch, was als Reduktion des Lungenschadens gedeutet werden kann.

Insgesamt legt der Versuch den Schluss nahe, dass die Dosierung zu niedrig gewählt wurde um Effekte einer „Suspended Animation“ nachzuweisen.

Dennoch stellt der Versuchsaufbau ein interessantes Vorgehen dar, um weiterhin die Auswirkung von H_2S zu testen. Andere Versuche zeigen, dass durch Dosisanpassung durchaus positive Ergebnisse zustande kommen können. Durch zusätzliche Färbemethoden könnte evtl. auch eine genauere Quantifizierung der Auswirkung auf die Morphologie der Niere möglich sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Ali M Y, Ping C Y, Mok Y, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore P K: Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? Br.J.Pharmacol., 149: 625-34 (2006)

2. Allison M A, Kwan K, Ditomasso D, Wright C M, Criqui M H: The epidemiology of abdominal aortic diameter. J.Vasc.Surg., 48: 121-127 (2008)

3. Alric P, Ryckwaert F, Branchereau P, Marty-Ané C, Mary H, Colson P: A porcine model of systemic and renal haemodynamic responses to infrarenal aortic cross-clamping. Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg., 25: 72-78 (2003)

4. Annecke T, Kubitz J C, Kahr S, Hilberath J M, Langer K, Kemming G I, Rehm M, Bittmann I, Conzen P F: Effects of sevoflurane and propofol on ischaemia-reperfusion injury after thoracic-aortic occlusion in pigs. Br.J.Anaesth., 98: 581-590 (2007)

5. Aslami H, Schultz M J, Juffermans N P: Potential applications of hydrogen sulfide-induced suspended animation. Curr.Med.Chem., 16: 1295-1303 (2009)

6. Behringer W, Prueckner S, Kentner R, Tisherman S A, Radovsky A, Clark R, Stezoski S W, Henchir J, Klein E, Safar P: Rapid hypothermic aortic flush can achieve survival without brain damage after 30 minutes cardiac arrest in dogs. Anesthesiology, 93: 1491-1499 (2000)

7. Behringer W, Safar P, Wu X, Kentner R, Radovsky A, Kochanek P M, Dixon C E, Tisherman S A: Survival without brain damage after clinical death of 60-120 mins in dogs using suspended animation by profound hypothermia. Crit.Care Med., 31: 1523-1531 (2003)

8. Bennett W M, Porter G A: Endogenous creatinine clearance as a clinical measure of glomerular filtration rate. Br.Med.J., 4: 84-86 (1971)

9. Bhambhani Y, Singh M: Physiological effects of hydrogen sulfide inhalation during exercise in healthy men. J.Appl.Physiol., 71: 1872-1877 (1991)

10. Bhatia M: Hydrogen sulfide as a vasodilator. IUBMB Life, 57: 603-606 (2005)

11. Blackstone E, Morrison M, Roth M B: H2S induces a suspended animation-like state in mice. Science, 308: 518 (2005)

12. Blackstone E, Roth M B: Suspended animation-like state protects mice from lethal hypoxia. Shock, 27: 370-372 (2007)

13. Bonamigo T P, Siqueira I: Screening for abdominal aortic aneurysms. Rev.Hosp.Clin.Fac.Med.Sao.Paulo., 58: 63-68 (2003)

14. Brezis M, Rosen S N, Epstein F H: The pathophysiological implications of medullary hypoxia. Am.J.Kidney Dis., 13: 253-258 (1989)

15. Brezis M, Rosen S, Silva P, Epstein F H: Renal ischemia: a new perspective. Kidney Int., 26: 375-383 (1984)

16. Brusoni B, Colombo A, Merlo L, Marchetti G, Longo T: Hemodynamic and metabolic changes induced by temporary clamping of the thoracic aorta. Eur.Surg.Res., 10: 206-216 (1978)

17. Carden D L, Granger D N: Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J.Pathol., 190: 255-266 (2000)

18. Coselli J S, Plestis K A, La Francesca S, Cohen S: Results of contemporary surgical treatment of descending thoracic aortic aneurysms: experience in 198 patients. Ann.Vasc.Surg., 10: 131-137 (1996)

19. Couch L, Martin L, Rankin N: Near death episode after exposure to toxic gases from liquid manure. N.Z.Med.J., 118: U1414 (2005)

20. Douglas W R: Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, sus scrofa, in human medical research. Space Life Sci., 3: 226-234 (1972)

21. Elrod J W, Calvert J W, Morrison J, Doeller J E, Kraus D W, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow C, Lefer D J: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104: 15560-15565 (2007)

22. Fadeel B, Orrenius S: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. J.Intern.Med., 258: 479-517 (2005)

23. Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace J L: The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. Gastroenterology, 131: 259-271 (2006)

24. Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C: H2S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. Biochem.Biophys.Res.Commun., 313: 362-368 (2004)

25. Giulini S M, Bonardelli S, Portolani N, Giovanetti M, Galvani G, Maffeis R, Coniglio A, Tiberio G A, Nodari F, De Lucia M, Lussardi L, Regina P, Scolari F, Tomasoni G: Suprarenal aortic cross-clamping in elective abdominal aortic aneurysm surgery. Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg., 20: 286-289 (2000)

26. Groner W, Winkelman J W, Harris A G, Ince C, Bouma G J, Messmer K, Nadeau R G: Orthogonal polarization spectral imaging: a new method for study of the microcirculation. Nat.Med., 5: 1209-1212 (1999)

27. Hannon J P, Bossone C A, Wade C E: Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. Lab.Anim.Sci., 40: 293-298 (1990)

28. Haouzi P, Notet V, Chenuel B, Chalon B, Sponne I, Ogier V, Bihain B: H2S induced hypometabolism in mice is missing in sedated sheep. Respir Physiol Neurobiol, 160: 109-115 (2008)

29. Haslett C, Savill J: Why is apoptosis important to clinicians? BMJ, 322: 1499-1500 (2001)

30. Hauser B, Froba G, Bracht H, Strater J, Chkhouta A B, Vassilev D, Schoaff M J, Huber-Lang M, Bruckner U B, 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)

31. Hauser B, Groger M, Ehrmann U, Albicini M, Bruckner U B, Schelzig H, Venkatesh B, Li H, Szabo C, Speit G, Radermacher P, Kick J: The parp-1 inhibitor ino-1001 facilitates hemodynamic stabilization without affecting DNA repair in porcine thoracic aortic cross-clamping-induced ischemia/reperfusion. Shock, 25: 633-640 (2006)

32. Kaur H, Satyanarayana P S, Chopra K: Effect of U-74500A, a 21-aminosteroid on renal ischemia-reperfusion injury in rats. Ren.Fail., 25: 157-171 (2003)

33. Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br.J.Cancer, 26: 239-257 (1972)

34. Khan A A, Schuler M M, Prior M G, Yong S, Coppock R W, Florence L Z, Lillie L E: Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. Toxicol.Appl.Pharmacol., 103: 482-490 (1990)

35. Kick J, Hauser B, Bracht H, Albicini M, Oter S, Simon F, Ehrmann U, Garrel C, Sträter J, Brückner U B, Leverve X M, Schelzig H, Speit G, Radermacher P, Muth C: Effects of a cantaloupe melon extract/wheat gliadin biopolymer during aortic cross-clamping. Intensive Care Med., 33: 694-702 (2007)

36. Koenitzer J R, Isbell T S, Patel H D, Benavides G A, Dickinson D A, Patel R P, Darley-Usmar V M, Lancaster J R (, Doeller J E, Kraus D W: Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O2-dependent manner. Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol., 292: H1953-1960 (2007)

37. Kudo F A, Nishibe T, Miyazaki K, Murashita T, Yasuda K, Ando M, Nishibe M: Postoperative renal function after elective abdominal aortic aneurysm repair requiring suprarenal aortic cross-clamping. Surg.Today, 34: 1010-1013 (2004)

38. Li J, Zhang G, Cai S, Redington A N: Effect of inhaled hydrogen sulfide on metabolic responses in anesthetized, paralyzed, and mechanically ventilated piglets. Pediatr Crit Care Med, 9: 110-112 (2008)

39. Lowicka E, Beltowski J: Hydrogen sulfide (H2S) - the third gas of interest for pharmacologists. Pharmacol.Rep., 59: 4-24 (2007)

40. Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am.J.Pathol., 146: 3-15 (1995)

41. Meloche R, Pottecher T, Audet J, Dufresne O, LePage C: Haemodynamic changes due to clamping of the abdominal aorta. Can.Anaesth.Soc.J., 24: 20-34 (1977)

42. Neglén P, Carlsson C, Eklöf B, Gustafson I, Thomson D: Skeletal muscle metabolism and central hemodynamics during temporary incomplete ischemia induced by aortic clamping in man. Acta Chir.Scand., 146: 323-331 (1980)

43. Nystul T G, Roth M B: Carbon monoxide-induced suspended animation protects against hypoxic damage in Caenorhabditis elegans. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 101: 9133-9136 (2004)

44. Oliveira J B, Gupta S: Disorders of apoptosis: mechanisms for autoimmunity in primary immunodeficiency diseases. J.Clin.Immunol., 28 Suppl 1: S20-28 (2008)

45. Parks D A, Granger D N: Ischemia-reperfusion injury: a radical view. Hepatology, 8: 680-682 (1988)

46. Perry M O: The hemodynamics of temporary abdominal aortic occlusion. Ann.Surg., 168: 193-200 (1968)

47. Reed J C: Mechanisms of apoptosis. Am.J.Pathol., 157: 1415-1430 (2000)

48. Reiz S, Peter T, Rais O: Hemodynamic and cardiometabolic effects of infrarenal aortic and common iliac artery declamping in man--an approach to optimal volume loading. Acta Anaesthesiol.Scand., 23: 579-586 (1979)

49. Renehan A G, Booth C, Potten C S: What is apoptosis, and why is it important? BMJ, 322: 1536-1538 (2001)

50. Rhee P, Talon E, Eifert S, Anderson D, Stanton K, Koustova E, Ling G, Burris D, Kaufmann C, Mongan P, Rich N M, Taylor M, Sun L: Induced hypothermia during emergency department thoracotomy: an animal model. J.Trauma, 48: 439-447; discussion 447-503 (2000)

51. Roberts A J, Nora J D, Hughes W A, Quintanilla A P, Ganote C E, Sanders J H (, Moran J M, Michaelis L L: Cardiac and renal responses to cross-clamping of the descending thoracic aorta. J.Thorac.Cardiovasc.Surg., 86: 732-741 (1983)

52. Roth M B, Nystul T: Buying time in suspended animation. Sci.Am., 292: 48-55 (2005)

53. Saikumar P, Venkatachalam M A: Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney. Semin.Nephrol., 23: 511-521 (2003)

54. Sasaki T, Ohsawa S, Ogawa M, Mukaida M, Nakajima T, Komoda K, Tachieda R, Niinuma H, Kawazoe K: Postoperative renal function after an abdominal aortic aneurysm repair requiring a suprarenal aortic cross-clamp. Surg.Today, 30: 33-36 (2000)

55. Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C: Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol.Today, 14: 131-136 (1993)

56. Simon F, Giudici R, Duy C N, Schelzig H, Oter S, Groger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabo C, Radermacher P, Calzia E: Hemodynamic and Metabolic Effects of Hydrogen Sulfide during Porcine Ischemia/reperfusion Injury. Shock,30: 359-364 (2008)

57. Singh K, Bonaa K H, Jacobsen B K, Bjork L, Solberg S: Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study : The Tromso Study. Am.J.Epidemiol., 154: 236-244 (2001)

58. Sodha N R, Clements R T, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath E M, Szabo C, Sellke F W: The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, 33: 906-913 (2008)

59. Szabo C: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. Nat.Rev.Drug Discov., 6: 917-935 (2007)

60. Truong D H, Eghbal M A, Hindmarsh W, Roth S H, O'Brien P J: Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity. Drug Metab.Rev., 38: 733-744 (2006)

61. Wang R: Two's company, three's a crowd: can H2S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J., 16: 1792-1798 (2002)

62. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R: The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. EMBO J., 20: 6008-6016 (2001)

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. P. Radermacher, sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. C.-M. Muth für die Überlassung des Promotionsthemas und die gute Betreuung. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. F. Simon für seine hilfreichen Ratschläge, Frau A. Söll für die Anleitung bei der TUNEL-Färbung, Frau C. Veneruso für die Anleitung zur Aufbereitung der Präparate und Frau Dr. A. Scheuerle für die Hilfe bei Auswertung der histologischen Präparate. Mein besonderer Dank gilt auch meiner Frau Anna für ihre großen Entbehrungen, die sie in der Zeit meiner Promotion auf sich nehmen musste.

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.