Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Michael Georgieff

Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung (APV)

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

Die kardiale Funktion bei Mäusen unter Suspended Animation mit H_2S

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Benedikt Steif
aus Augsburg

2012

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

1. Berichterstatter: **Prof. Dr. Dr. Peter Radermacher**

2. Berichterstatter: **Prof. Dr. Wolfgang König**

Tag der Promotion: **11.07.2013**

Gewidmet meinem

geliebten Bruder Christian

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis V

1 Einleitung 1
1.1 H_2S – Schwefelwasserstoff 1
1.2 Wirkung von H_2S 2
1.2.1 DNA-Strangbrüche 3
1.3 Suspended animation 4
1.3.1 Suspended animation-ähnliche Zustände durch H_2S 4
1.4 Zielsetzung der Arbeit 6

2 Material und Methoden 7
2.1 Verwendete Geräte und Materialien 7
2.1.1 Operationsmaterialien 7
2.1.2 Operations- und Laborgeräte 7
2.1.3 Pipetten 8
2.1.4 Chemikalien, Reagenzien 8
2.1.5 Medien, Standartlösungen und Puffer für den Comet Assay 9
2.1.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien 9
2.1.7 Software 10
2.1.8 Versuchstiere 10
2.2 Der Versuchsablauf am Kleintiermodell 11
2.2.1 Versuchsaufbau 11
2.2.2 Die sham-Operation 12
2.2.3 Intensivmedizinisches Monitoring und physiologische Messungen 13
2.3 Hämodynamische Messung und linksventrikuläre Funktion 14
2.3.1 Hämodynamik-Messung 14
2.3.2 Technik des Konduktanz-Katheters 15
2.3.3 Aufzeichnung der Hämodynamik 16
2.4 Comet Assay der Kardiomyozyten 19
2.4.1 Methodischer Ablauf des Comet Assays 19
2.4.2 Herstellung der Agarose beschichteten Objektträger 19
2.4.3 Präparation und Lyse der Kardiomyozyten 20
2.4.4 Alkalidenaturierung und anschließende Elektrophorese 21
2.4.5 Anfärbung der DNA und fluoreszenzmikroskopische Auswertung 22
2.5 Statistische Auswertung 24

3 Ergebnisse 25
3.1 Allgemeine Anmerkungen 25
3.2 Hämodynamik und linksventrikuläre Funktion 25
3.3 Comet Assay der Kardiomyozyten 32

4 Diskussion 33
4.1 Das Studienmodell 33
4.2 Die Hämodynamik 34
4.3 Effekte einer Allgemeinanästhesie 36
4.4 Der Comet Assay 38
4.5 Grenzen der Studie 40
4.6 Schlussfolgerung 41

5 Zusammenfassung 43

6 Literaturverzeichnis 45

7 Danksagung 50

8 Lebenslauf 51

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
℃	Grad Celsius
A.	Arteria (Arterie)
AAT	Aspartataminotransferase
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Arbitrary Units (willkürliche Einheit)
ca.	circa
CBS	Cystathione-β-Syntethase
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CO	Kohlenmonoxid
CSE	Cystathione-γ-Lyase
Cys	Cystein
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinacid (DNS - Desoxyribonucleinsäure)
dP/dt_{max}	linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt_{min}	linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit
Ea	Nachlast
EDPVR	Enddiastolisches-Druck-Volumen-Verhältnis
EF	Ejektionsfraktion
ERK	Extrazelluläre regulierte Kinase
ESPVR	Endsystolisches-Druck-Volumen-Verhältnis
et al.	et altera (und die Anderen)
F	Franc/French (Größenangabe für Katheter)
FiO_2	Sauerstoffffluss

F/min	Frequenz/Minute
Fa.	Firma
G	Gauge (Größenangabe für Tuben und Venenverweilkanülen)
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GNMT	Glycin-N-Methyltransferase
GSH	Glutathion
h	Stunden
H_2O	Wasser
HS^-	Hydrogensulfid Anion
H_2S	Schwefelwasserstoff
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
K^+	Kalium
K_{ATP}	Adenosintriphosphat abhängiger Kalium-kanal
kg	Kilogramm
i. v.	intravenös
LDH	Lactatdehydrogenase
LMP	low melting point (Niedriger Schmelzpunkt)
LV EDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LV EDV	linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LV ESP	linksventrikulärer endsystolischer Druck
LV ESV	linksventrikuläres endsystolisches Volumen
mA	milli-Ampère
MAP	mittlerer arterieller Druck
MAT	Methioninadenyltransferase
MEEO	medium-electro-endoosmosis
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
µl	Mikroliter

mM	Millimolar
µM	Mikromolar
min	Minuten
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPST	3-Mercaptopyruvat-Sulfur-Transferase
MZP	Messzeitpunkt
Na_2EDTA	Dinatriumethylendiamintetraessigsäure
NaOH	Natronlauge
Na_2S	Natriumsulfid
NaCl	Natriumchlorid
NaHS	Natriumhydrogensulfid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p38 MAP	p 38 Mitogenaktiviertes Protein
PBS	Phosphat basierte Saline, Phosphat gepufferte Saline
pCO_2	Partialdruck des Kohlenstoffdioxid
PEEP	positive endexspiratory pressure (Positiver Endexpiratorischer Druck)
pH	pondus Hydrogenium
ppm	parts per million (Teile pro Million)
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis (Einzelzellgelelektrophorese)
s	Sekunde
S^{2-}	Sulfid
s. c.	sub cutan (unter die Haut)
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
sup.	superior (oberhalb)
SV	Schlagvolumen

u. a.	unter anderem
V	Volt
V.	Vena (Vene)
v. a.	vor allem
vs.	versus (gegenüber)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

In den vergangenen Jahren rückte eine ehemals nur als toxische Substanz betrachtete chemische Verbindung immer mehr in den Fokus der Forschung, Schwefelwasserstoff. Das auch als Dihydrogensulfid, kurz H_2S, bekannte Gas ist farblos, entzündlich und wirkt in hohen Dosen tödlich. Der äußerst charakteristische Geruch nach faulenden Eiern ist wohl bekannt.

Normalerweise entsteht Schwefelwasserstoff bei der Zersetzung von schwefelhaltigen Aminosäuren durch Fäulnis- und Schwefelbakterien. Es wird aber auch in Säugern synthetisiert und kann nachgewiesen werden [14, 22, 48]. H_2S scheint eine große Bedeutung sowohl bei physiologischen, aber auch pathophysiologischen Prozessen zuzukommen. So kann Schwefelwasserstoff zu Vasodilatation führen, im zentralen Nervensystem (ZNS) als Neurotransmitter wirken und sowohl zytoprotektive, als auch zytotoxische Eigenschaften erzielen [43]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass H_2S bei Mäusen einen reversiblen, Winterschlaf-ähnlichen Zustand, eine sogenannte „suspended animation“ hervorrufen kann [8].

1.1 H_2S – Schwefelwasserstoff

Zwei Enzyme, die Cystathion-γ-Lyase (CSE) und die Cystathion-β-Synthase (CBS), sind für die endogene Produktion von H_2S aus L-Cystein verantwortlich. Methionin und Cystein stellen als einzige schwefelhaltige, proteinogene Aminosäuren die Hauptdonoren für Schwefel im Körper von Säugetieren dar. Methionin wird im Körper durch eine Reaktionsfolge unter der Beteiligung folgender Enzyme und Zwischenprodukte in Cystein umgewandelt: die Methionin-Adenosyltransferase (MAT) und die Glycin-N-Methyltransferase (GNMT) führen Methionin in Homocystein über, welches durch die Cystathion-β-Synthase (CBS) in Cystathion umgewandelt wird. Die Cystathion-γ-Lyase (CSE) katalysiert den Schritt von Cystathion zu Cystein. Cystein reagiert unter der Katalisation von CSE und CBS weiter zum Anion Sulfid (S^{2-}), welches letztendlich mit Wasserstoff zu Schwefelwasserstoff H_2S reagiert (siehe Abbildung 1) [43].

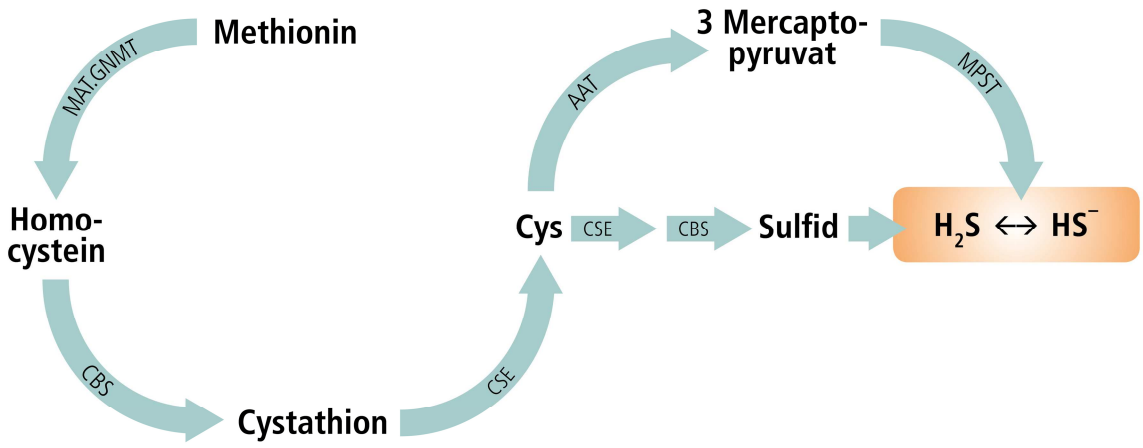

Abbildung 1: Enzymatische Verstoffwechselung von H_2S in Säugetierzellen (modifiziert nach Szabó [43]; GNMT: Glycin-N-Methyltransferase, MAT: Methioninadenyltransferase, CBS: Cystathion-β-Synthase, CSE: Cystathion-γ-Lyase, Cys: Cystein, AAT: Aspartataminotransferase, MPST: 3-Mercaptopyruvat-Sulfur-Transferase, H_2S: Schwefelwasserstoff, HS^-: Schwefelwasserstoff-Anion)

H_2S gehört, ebenso wie CO und NO zu den sogenannten Gasotransmittern, die eine Gruppe sehr labiler biologischer Mediatoren darstellen. H_2S diffundiert frei durch Zellmembranen ohne hierbei spezifische Transporter zu nutzen.

1.2 Wirkung von H_2S

Es gibt jedoch widersprüchliche Aussagen über H_2S im Bezug auf seine Effekte: so werden in der Literatur einerseits zytoprotektive und andererseits zytotoxische Effekte beschrieben [32, 42, 50]. Den oben bereits angesprochenen vasodilatatorischen Effekt erreicht H_2S durch seine Fähigkeit ATP-abhängige K^+ Kanäle (K_{ATP}) zu öffnen [43].

In mikromolaren Konzentrationen kann H_2S einen zytoprotektiven (antinekrotischen oder antiapoptotischen) Effekt haben. Dieser lässt sich auf die Fähigkeit von H_2S reaktive Spezies wie Sauerstoffradikale [15] oder Peroxynitrit [50] zu neutralisieren, zurückführen. So konnten Szabó et al. in Maus Makrophagen nachweisen, dass H_2S vor einer Verringerung der Widerstandsfähigkeit gegenüber Stickoxid- oder Peroxynitrit-induzierten Zellschäden schützen kann [42].

Des Weiteren konnten Yan et al. zeigen, dass H_2S in mikromolarer Konzentration in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten zu einem Schutz gegenüber Homocystein-induzierter Zelltoxizität führte und gleichzeitig eine geringere endogene Produktion von Wasserstoffperoxid zur Folge hatte. So wurde auch eine

Verbesserung des zytoprotektiven Effekts von N-Acetylcystein und Glutathion erzielt [53].

Elrod et al. konnten in einem Mausmodell zeigen, dass H_2S positiv auf Kardiomyozyten wirken kann. In einem Reperfusionsmodell konnten sie sowohl in vivo als auch in vitro nachweisen, dass sowohl exogenes als auch endogenes H_2S fähig war, ein Voranschreiten der Apoptose zu verhindern und so die myokardiale Infarktgröße limitieren konnte [13].

Andererseits konnten Yang et al. zeigen, dass H_2S ebenfalls in mikromolarer Konzentration bei menschlichen aortalen glatten Muskelzellen zu einer Kaspasenaktivierung führte und so DNA-Strangbrüche induzieren konnte, was einen apoptotischen Phänotyp zur Folge hatte. In ihrem Experiment zeigten sie, dass sowohl eine endogene Überproduktion, erreicht durch Überexpression der CSE, als auch exogen zugeführtes H_2S eine Veränderung verschiedener Zellregulationsmechanismen zur Folge hatte und Einfluss auf DNA-Reparaturmechanismen nahm. Die untersuchten Zellen zeigten neben den DNA-Strangbrüchen, weniger Wachstum und vermehrt Apoptose [54].

1.2.1 DNA-Strangbrüche

Wie oben beschrieben kann H_2S zur Entstehung von DNA-Strangbrüchen führen. Generell gilt, dass eine zu starke DNA-Schädigung zu einem Zelluntergang führt. Bis zu einem gewissen Ausmaß können Schäden an der DNA durch Reparaturmechanismen kompensiert werden. Zu DNA-Strangbrüchen kann es durch oxidativen Stress kommen. Zu einem solchen führen reaktive Sauerstoffspezies, die in bestimmten Situationen wie zum Beispiel bei einer Sepsis [45] oder bei bestimmten operativen Eingriffen [1] vermehrt anfallen. Ebenso weisen Ergebnisse verschiedener Studien daraufhin, dass H_2S zu einer vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führen kann [12], welche DNA-Schäden verursachen könnten. Dies konnte in zwei Studien in vitro an Hamsterovarzellen nachgewiesen werden. Hier führte H_2S zur Bildung von freien Radikalen, die die DNA signifikant schädigten [3, 4].

H_2S wirkt auch auf die Zellatmung. Indem es als Inhibitor der Cytochrom-C-Oxidase auftritt, kann H_2S die Zellatmung blockieren. H_2S reagiert hierbei mit dem Kupferzentrum der Cytochrom-C-Oxidase [19]. Diese Inhibierung wird als Mechanismus zur Regulation des zellulären Sauerstoffverbrauches durch H_2S

angesehen [25, 27]. Blackstone, Morrison und Roth sehen dies als einen möglichen Auslöser eines H_2S induzierten „suspended animation“-ähnlichen Zustandes [8], auf den im Folgenden eingegangen wird.

1.3 Suspended animation

Unter suspended animation versteht man einen Zustand eines Organismus’ der auch als „hibernation-like“, also Winterschlaf-ähnlich bezeichnet wird. In der Tierwelt ist der Winterschlaf weit verbreitet. Unter anderen machen ihn sich Amphibien und Reptilien, aber auch Säugetiere wie Bären zu Nutzen. Der Winterschlaf ermöglicht es ihnen extreme Umweltbedingungen zu überleben. Ähnlich wie bei einem echten Winterschlaf ist ein solcher künstlicher, induzierter Winterschlaf durch eine Herabregulierung von verschiedenen Körperfunktionen gekennzeichnet. So kommt es zu einer Absenkung der Atem- und Herzfrequenz, der Stoffwechsel läuft stark verlangsamt.

Einen möglichen Weg in einen „suspended animation“-ähnlichen Zustand kann die Hypothermie und ihre therapeutische Anwendung zur Organprotektion darstellen.

Mitte der 1980er Jahre wurde erstmals der Benefit einer milden zerebralen Hypothermie, mit Temperaturen zwischen 33 und 36 Grad Celsius für ein besseres neurologisches Outcome nach einem Herzstillstand [33, 34] beschrieben. Dieses verbesserte neurologische Outcome konnte ebenfalls bei reanimierten Hunden [24, 35], die einen normothermen Herzstillstand erlitten hatten, Ratten [9] und beim Menschen [7, 36] gezeigt werden.

1.3.1 Suspended animation-ähnliche Zustände durch H_2S

In einem Tierversuch mit Mäusen konnten Blackstone et al. zeigen, dass die Inhalation von H_2S in einer niedrigen Konzentration von 20 bis 80 ppm einen suspended animation-ähnlichen Zustand hervorrufen kann [8]. Interessant ist hierbei jedoch, dass Mäuse Tiere sind, die von Natur aus keinen Winterschlaf halten.

Die Gruppe um Blackstone stellte hierbei die Hypothese auf, dass H_2S durch die reversible Hemmung des Komplex IV der Atmungskette zu einer Reduzierung der metabolischen Rate und einer konsekutiven Absenkung der Körperkerntemperatur führe. Die Mäuse wurden einer Atmosphäre mit bis zu 80 ppm H_2S ausgesetzt. Nach sechs Stunden war ihre metabolische Rate um bis zu 90% vom Ausgangswert gefallen. Die Körperkerntemperatur war hierbei ebenfalls gefallen

und die durchschnittliche Körperkerntemperatur der Mäuse betrug 15℃ (Ausgangswert ca. 37℃) und lag dann bei 2℃ über d er Umgebungstemperatur (13℃). Nach Beendigung des Versuches erlangten die Mäuse unter Raumluft und Raumtemperatur wieder die Ausgangswerte ihrer metabolischen Rate und ihrer Körperkerntemperatur. In dem beschriebenen Versuch konnte ebenfalls eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration von H_2S und der Körperkerntemperatur gezeigt werden, was zu der Annahme führt, dass die Effekte von H_2S dosisabhängig sind [8].

Die Gruppe um Volpato untersuchte in einem folgenden Experiment die kardiovaskulären Effekte von H_2S in einem Mausmodell [47]. Während die Mäuse hier H_2S (ebenfalls 80 ppm) bei einer Umgebungstemperatur von 27℃ atmeten, fiel ihre Körperkerntemperatur bei einer Ausgangstemperatur von ca. 37℃ ebenfalls wie im oben beschriebenen Versuch auf bis zu ca. 29℃ ab. Im Gegensatz hierzu änderte sich die Körperkerntemperatur der Mäuse nicht, wenn sie H_2S bei 35℃ Umgebungstemperatur atmeten. Ebenfalls konnte hierbei nachgewiesen werden, dass spontan eingeatmetes H_2S, egal ob bei 27℃ oder 35℃ Umgebungstemperatur, die Herzfrequenz innerhal b von zwei Stunden um die Hälfte reduzierte und solange auf diesem Niveau blieb wie die H_2S-Exposition andauerte. Der mittlere arterielle Blutdruck änderte sich bei 27℃ Umgebungstemperatur nicht signifikant im Vergleich zu den Ausgangswerten. Bei 35℃ waren die mittleren arteriellen Blutdrücke lei cht höher im Vergleich zum Ausgangsniveau. Bei gleichbleibendem Schlagvolumen verminderte sich so das Herzzeitvolumen um bis zu 60% in beiden Gruppen [47].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Wie aus den Studien beider Gruppen hervorgeht, hat die H_2S-Exposition einen Einfluss auf die Herzfunktion und Hämodynamik der Versuchstiere.
Des Weiteren wurden, wie oben bereits beschrieben, für H_2S widersprüchliche Aussagen im Bezug auf die Wirkung auf zellulärer Ebene gefunden. So ließen sich sowohl protektive wie auch toxische Effekte nachweisen. Einerseits führte Kaspasenaktivierung in menschlichen aortalen glatten Muskelzellen in vitro zu DNA-Strangbrüchen und so zu einem apoptotischen Phänotyp [54], andererseits konnte in Mäusen bei Reperfusion nach myokardialer Ischämie ein positiver Effekt durch Limitierung von Apoptose durch H_2S gezeigt werden [13].
Sowohl die Ergebnisse beider Gruppen im Bezug auf die Hämodynamik, als auch die widersprüchlichen Aussagen über H_2S und seine Wirkung auf einzelne Zellen und deren DNA, legen nahe die Effekte von H_2S auf diesen beiden Ebenen genauer zu untersuchen.
Da die bisherigen Daten zu einer mit H_2S induzierten suspended animation, wie auch die Angaben zur anti-/apoptotischen Wirkung aus Studien an wachen, spontan atmenden Mäusen stammten, wurde hier ein neues Versuchssetting mit anästhesierten Mäusen gewählt.

Im Rahmen dieser kontrollierten, randomisierten, prospektiven Studie sollten bei Mäusen folgende Fragen untersucht werden:

1. Erlaubt die Inhalation von H_2S bei anästhesierten und beatmeten Versuchstieren die Induktion eines „*suspended animation*“-ähnlichen Zustandes ähnlich wie bei wachen Mäusen?

2. Ist die Inhalation von H_2S auch bei anästhesierten und beatmeten Mäusen mit einer Aufrechterhaltung der linksventrikulären Funktion verbunden?

3. Reduziert die Inhalation von H_2S die Entstehung von oxidativen DNA-Schäden in Kardiomyozyten?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte und Materialien

2.1.1 Operationsmaterialien

Ketamin	Ketavet®, Pharmacia & Upjohn, Erlangen
Midazolam	Dormicum®, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen
Fentanyl	Fentanyl-Janssen®, Janssen-Cilag, Neuss
Ringerlaktat	Ringerlösung Fresenius®, Fresenius Kabi, Erlangen
Glukose	Glucose 40 Fresenius®, Fresnius Kabi, Erlangen
Buprenorphin	Temgesic®, Boehringer, Mannheim
Isoflurane	Forene®, Abbott, Wiesbaden
Ceftriaxon	Rocephin®, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Whylen
Clindamycin	Sobelin®, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen
Volumenersatzlösung	Hextend®, Abbott, Chicago, IL, USA
Noradrenalin	Arterenol® 25 ml, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt

2.1.2 Operations- und Laborgeräte

Wärmematte und -lampe	TKM-0902 Temperaturkontrolleur, FMI
Tierbeatmungsgerät	SAR-830/p, CWE, Ardmore, PA, USA
Perfusor	Syringe pump 11, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA

Mikromanometrie-Katheter 1,4 F	
	Millar Instruments, Houston, TX, USA
Hämodynamik-Analysesystem ARIA^{TM}1	
	Millar Instruments, Houston, TX, USA
Eismaschiene Scotsman AF 80	Frimont, Mailand, Italien
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT Basic	
	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Heizblock Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Kühlschrank Glass Line	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop Olympus XY	Olympus, Tokyo, Japan
Bosch Mikrowellenherd 842 C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen

2.1.3 Pipetten

Eppendorf Reference	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Multipette (große)	Eppendorf, Hamburg

2.1.4 Chemikalien, Reagenzien

DMSO	Merck, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Gasgemisch Luft, H_2S, O_2	Westfalen AG Münster
LMP-Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
MEEO-Agarose	Merck, Darmstadt
PBS-Puffer	Invitrogen Cooperation, Paisley, Schottland

Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.5 Medien, Standartlösungen und Puffer für den Comet Assay

Lyse-Stammlösung

NaCl:	2,5 M
Na_2EDTA:	100 mM
Tris-Base:	10 mM

Lysepufferlösung

Triton X-100:	42,5 mM in Lyse-Stammlösung
DMSO:	1,41 M in Lyse-Stammlösung

Alkali-Elektrophoresepuffer

NaOH:	300 mM
Na_2EDTA:	1 mM

Neutralisationspuffer

Tris-Base:	48,5 mg/ml

Färbelösung

Ethidiumbromid:	20 µg/ml

LMP-Agarose

LMP-Agarose:	5 mg/ml PBS

2.1.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Adapter für Monovette	Sarstedt, Nürmbrecht
Aluminiumfolie	Melitta, Minden
Bechergläser	Schott Glas, Mainz
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einmalpasteurpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nürmbrecht

Erlenmeyerkolben	Schott Glas, Mainz
Glastrichter	Schott Glas, Mainz
Micro Test Tubes 1,5 ml (Eppis)	Eppendorf, Hamburg
Objektträger mit Mattrand	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Perfusor-Spritzen 50 ml	Braun, Melsungen
Spritzen	BD, Franklin Lakes, NJ, USA

2.1.7 Software

Comet Assay II 2.11	Perceptive Instruments, Haverhill, UK
Microsoft® Excel® 2008 für Mac Version 12.0	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft® Word 2008 für Mac Version 12.0.0	Microsoft, Redmond, WA, USA
Sigmastat 8.0	Systat Software Inc. (SSI), Richmond, CA, USA
Sigmaplot 2002 2.03	Systat Software Inc. (SSI), Richmond, CA, USA

2.1.8 Versuchstiere

Für die Studie wurden Mäuse (C57BI/6), männlichen Geschlechts verwendet. Ihr Alter lag zwischen 10 und 12 Wochen und sie hatten ein Körpergewicht von ca. 22-27g. Bei den Mäusen handelte es sich um eigens für Versuchszwecke im Tierforschungszentrum Oberberghof der Universität Ulm gezüchtete Tiere. Für die Versuchsreihe wurden insgesamt 38 Mäuse (C57BI/6) männlichen Geschlechts verwendet. Die Versuchstiere wurden nach dem Transfer vom Tierforschungszentrum Oberberghof der Universität Ulm zu den Räumlichkeiten der Versuchsdurchführung kontinuierlich betreut.

2.2 Der Versuchsablauf am Kleintiermodell

2.2.1 Versuchsaufbau

Alle Versuche wurden im Rahmen der Deutschen und Europäischen Richtlinien zum „Umgang mit Labortieren“ durchgeführt. Das Versuchsprotokoll wurde sowohl von dem Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm als auch vom Regierungspräsidium Tübingen (Baden-Württemberg, Reg.-Nr. 887) genehmigt.

Zwischen dem ersten (*sham*- Operation) und zweiten Versuchsteil (Messphase) erhielten die Tiere freien Zugang zu Nahrung und Trinkwasser.

Es handelt sich um eine randomisierte, prospektive Studie. Insgesamt wurden die Versuchstiere in vier Gruppen unterteilt, die sich durch Körperkerntemperatur und Zusammensetzung des Beatmungsgemisches unterschieden. Die normothermen Gruppen wurden mittels Wärmematte und Wärmelampe konstant bei einer Körperkerntemperatur von 38℃ gehalten. Bei den hyp othermen Versuchsgruppen wurde nicht gegenreguliert und die Hypothermie durch die kombinierten Effekte von Narkose, Laparotomie, sowie Umgebungstemperatur erreicht. Je eine der Gruppen aus Normothermie und Hypothermie wurde nun als Kontrollgruppe behandelt und erhielt eine Beatmung mit einem FiO_2 von 50%. Die jeweils anderen erhielten zusätzlich zu ihrem FiO_2 von 50% 100 ppm H_2S.

Tabelle 1: Aufteilung der 4 Versuchsgruppen in je zwei Normo- und Hypotherme (in Grad Celsius) Versuchsgruppen sowie die Eigenschaften des Beatmungsgemisches. n ist die Anzahl der Versuchstiere je Gruppe.

Gruppe	Beatmung
Normotherme (38℃) Tiere (n=8)	Kontrollgruppe (FiO_2 50%)
Hypotherme (27℃) Tiere (n=11)	Kontrollgruppe (FiO_2 50%)
Normotherme (38℃) Tiere (n=8)	100 ppm H_2S
Hypotherme (27℃) Tiere (n=11)	100 ppm H_2S

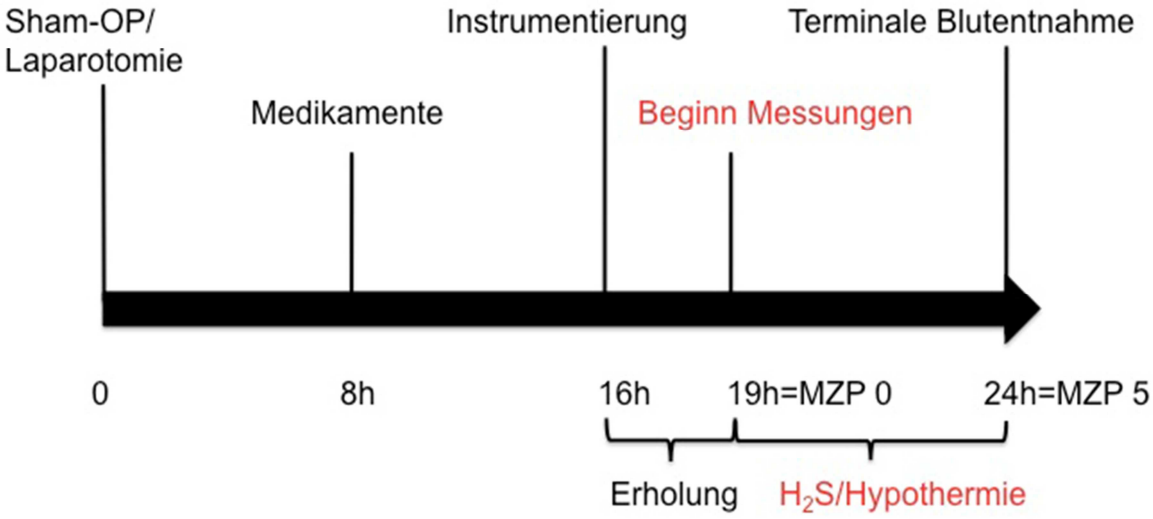

Abbildung 2: grafische Darstellung des Versuchs (h= Stunden; MZP= Messzeitpunkt)

2.2.2 Die sham-Operation

Den ersten Teil des Versuches stellte die sham-Operation dar. Die Versuchstiere, die in dieser Arbeit besprochen werden, dienten als Kontrolle für spätere Versuche.

Hierbei wurde folgendermaßen vorgegangen: Die Mäuse wurden aus ihrem Käfig genommen, gewogen und das Gewicht dokumentiert. Anschließend wurden sie in ein geschlossenes Glasgefäß gesetzt und durch Sevoflurane in Kurznarkose gesetzt. Es folgte eine intraperitoneale Injektion von 120 µg/g Ketamin 1,25 µg/g Midazolam und 0,25 µg/g Fentanyl mit welcher die Anästhesie induziert wurde (Gesamtvolumen: ca. 180-250 µl). Anschließend wurde das Versuchstier auf einer Platte fixiert und die Körperkerntemperatur rektal gemessen, um über eine feedback-Regulation der Wärmematte und -lampe eine Konstanthaltung der Temperatur von 37-38℃ zu gewährleisten. Um den perioperativen Flüssigkeitsverlust zu kompensieren und um die Gleichheit zu später folgenden Versuchstieren (siehe oben) zu gewährleisten, wurde 1 ml Ringerlaktat, in dem 4 µg/g Glukose gelöst waren, s.c. (Nacken) injiziert. Eine mediane Laparotomie über ca. 1 cm, mit Darstellung des Zökums wurde durchgeführt. Anschließend wurde die Bauchdecke durch eine 4,0 Naht in zwei Schritten geschlossen. Das Versuchstier wurde in den gewärmten Käfig zurückgegeben. Zur postoperativen Analgesie erhielten die Mäuse 1 µg/g Buprenorphin. Acht Stunden post OP erhielten die Tiere eine erneute s. c. Injektion von Ringerlaktat, Glucose und Buprenorphin, wie oben beschrieben, nachdem per Sevoflurane eine Kurznarkose

eingeleitet worden war. Ebenfalls erhielten die Versuchstiere (analog zu den oben angesprochenen späteren Versuchstieren) 30 µg/g Rocephin und 30 µg/g Clindamycin, s.c. appliziert.

2.2.3 Intensivmedizinisches Monitoring und physiologische Messungen

Analog zum ersten Versuchsteil wurde per Sevofluran eine Kurznarkose erzielt. Anschließend wurde durch intraperitoneale Injektion von 120 µg/g Ketamin 1,25 µg/g Midazolam und 0,25 µg/g Fentanyl die Anästhesie induziert (Gesamtvolumen: ca. 180-250 µl). Die Körperkerntemperatur wurde rektal gemessen, um über eine feedback-Regulation der Wärmematte und-lampe eine Konstanthaltung der Körperkerntemperatur in gewünschter Höhe (38℃/27℃) zu gewährleisten. Nun schloss sich eine Tracheotomie mit einer 20-G-Kanüle an. Die maschinelle Beatmung wurde mit einem speziellen Tierbeatmungsgerät (SAR-830/p) durchgeführt. Die Beatmung erfolgte volumenkontrolliert, drucklimitiert mit einem FiO_2 von 50%, PEEP 3 cm H_2O, bei einem Atemzugvolumen von 8-10 $ml*kg^{-1}$, titriert nach dem expiratorischen pCO_2. Wie oben beschrieben, wurden zwei Gruppen zusätzlich zum Atemgas mit 100 ppm H_2S beatmet. Die Vena jugularis externa dextra wurde zur i. v. Applikation der Narkose kanüliert. Hierzu wurde kontinuierlich 30 µg/g*h Ketamin und 0,3 µg/g*h Fetanyl zur Aufrechterhaltung der Anästhesie über automatische Perfusoren infundiert. Anschließend wurde die rechtsseitige A. carotis interna kanüliert und der 1,4 Fr. Linksherzminiaturkatheter in den linken Herzventrikel eingeführt um die myokardiale Hämodynamik zu erfassen. An die Kanülierung der A. carotis interna schloss sich die Relaparotomie an. Alle zwei Stunden wurden ca. 75 µl Blut aus der seitlichen Schwanzvene zur Evaluation des Säurenbasenstatus und Gaspartialdrücken mittels Blutgasanalysator entnommen. Zu jeder vollen Stunde nach Beginn der Instrumentierung schlossen sich die Messzeitpunkte an, für die die Hämodynamikparameter dokumentiert wurden und welche zur Auswertung herangezogen wurden.

Am Ende des Versuchs fand eine terminale Blutentnahme aus der Vena cava inferior mit anschließender Eröffnung des Thorax statt. Es wurden Gewebeproben des Herzens entnommen, um sie auf oxidativen Stress zu untersuchen. Sämtliche Flüssigkeitsbilanzen inkl. Volumensubstitution, Blutentnahmen und Urinproduktion

wurden protokolliert. Die operativen Eingriffe erfolgten gänzlich unter sterilen Kautelen.

2.3 Hämodynamische Messung und linksventrikuläre Funktion

2.3.1 Hämodynamik-Messung

Die genaueste Methode um die linksventrikuläre systolische und diastolische Funktion des Herzens zu beschreiben, ist die Aufzeichnung des Herzzyklus in Form einer Druck-Volumen-Kurve (Abbildung 3). Diese Druck-Volumen-Kurven lassen sowohl die Volumina (Endsystolisches und – diastolisches Volumen des linken Ventrikels, sowie das Schlagvolumen), als auch die maximale Druckanstiegs- und –abfallgeschwindigkeit im linken Ventrikel (Verlauf der Kurve nach dem EDPVR, bzw. nach ESPVR) erkennen. Ebenso sind die Elastanzlinien der Systole und Diastole (in Abbildung 3 gestrichelte Linien) erkennbar. Sie stehen für die Compliance, d. h. für die Dehnbarkeit des linken Ventrikels. Die beiden Punkte ESPVR (Endsystolisches-Druck-Volumen-Verhältnis) und EDPVR (Enddiastolisches-Druck-Volumen-Verhältnis) sind zwei Vor- und Nachlast-unabhängige Parameter (für die nähere Erklärung s. u.). Durch diese Methode lässt sich eine große Anzahl von volumenun- und abhängigen Parametern ermitteln und es lassen sich somit Rückschlüsse auf die kardiale Funktion ziehen. Das ARIA^{TM}1 Hämodynamik-Analysesystem ermöglicht eine simultane Druck-/Volumenmessung und somit die Evaluierung differenzierter Ventrikel-Funktionsparameter der Maus bei geschlossenem Brustkorb *in situ*. Die kontinuierliche Erfassung systolischer und diastolischer Funktionsparameter beinhaltet u. a. die Messung von HZV, Ventrikelvolumina, Ejektionsfraktion und Schlagvolumen. Neben der myokardialen Funktion werden auch Herzfrequenz und systemarterieller Blutdruck erfasst.

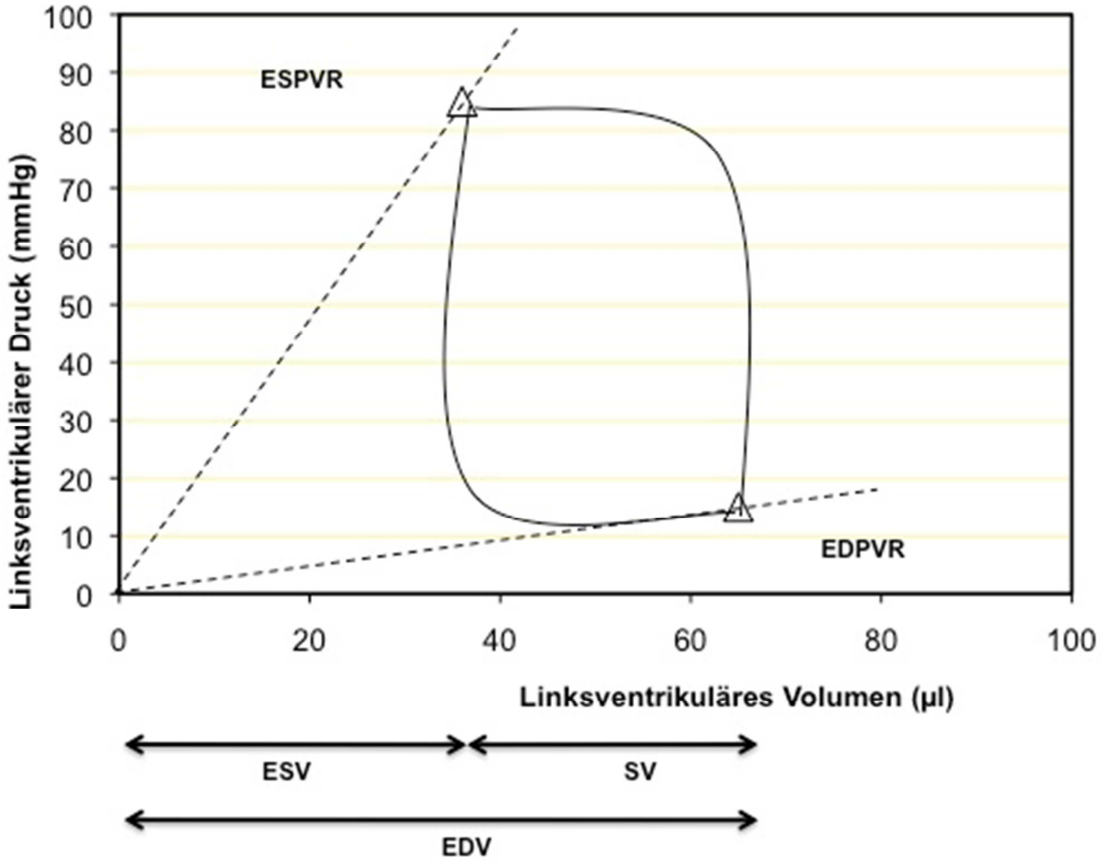

Abbildung 3: Beispiel einer Druck-Volumen-Kurve. ESPVR= endsystolisches Druck-Volumen-Verhältnis, EDPVR= enddiastolisches Druck-Volumen-Verhältnis, ESV= endsystolisches Volumen, SV= Schlagvolumen, EDV= enddiastolisches Volumen

2.3.2 Technik des Konduktanz-Katheters

Der Druck-Volumen-Katheter kann durch Messung der Konduktanz, also der Leitfähigkeit des Blutes, das Volumen im linken Ventrikel bestimmen. Der Katheter besteht aus vier Elektroden und einem Drucksensor. Die Elektroden sind paarweise über und unter dem Drucksensor angebracht. Die Messung von kardialen Blutvolumina mittels dieser Elektroden beruht auf einem elektrischen Feld, welches durch die äußeren Elektroden im linken Ventrikel aufgebaut wird. Die Potentialunterschiede an den inneren Elektroden werden kontinuierlich aufgezeichnet um so die Konduktanz zwischen den Elektroden im Ventrikel zu messen.

Durch die Formel:

$V_i(t) = (1/\alpha)(pL^2)\{G_i(t)-G_{pi}\}$

wird nun das intraventrikuläre Volumen V_i errechnet. Hierbei ist α ein Volumenkalibrationsfaktor, p der elektrische Widerstand des Blutes, L der Abstand zwischen den Elektroden, G_i beschreibt die Gesamt-Konduktanz und G_{pi} die Konduktanz des umgebenden Gewebes, die so genannte „parallele Konduktanz". Durch diese Berechnung ist es möglich, in Echtzeit und in vivo Druck und Volumen aufzuzeichnen, um so Druck-Volumen-Kurven zu erstellen. Um die parallele Konduktanz zu ermitteln und so das reale Blutvolumen errechnen zu können, muss das Konduktanz-Volumen-Signal kalibriert werden. Hierbei wird folgendermaßen vorgegangen: über die linke Vena jugularis werden 5 µl 10%-NaCl Lösung infundiert. Das Konduktanzsignal im linken Ventrikel nimmt durch den Einstrom der hypertonen NaCl-Lösung rapide zu, obwohl das Volumen unverändert bleibt. Dies zeigt, dass das Konduktanzsignal die Osmolarität des Volumens im linken Ventrikel angibt und daraus das Blutvolumen errechnet werden kann.

2.3.3 Aufzeichnung der Hämodynamik

Als Maß für die systolische Funktion wurden folgende Werte aufgezeichnet:

Herzfrequenz (HF; F/min): Die Herzfrequenz gibt die Herzschläge pro Minute an und wird in Schläge pro Minute angegeben.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAD; mmHg): Der mittlere arterielle Blutdruck ist für die Organperfusion von entscheidender Bedeutung. Er kann mit folgender Formel berechnet werden: Diastole + 1/3(Systole-Diastole). Seine Einheit sind Millimeter Quecksilbersäule.

Schlagvolumen (SV; µl): Das Schlagvolumen ist das Volumen, das während der Ejektion aus dem Ventrikel in die Aorta ausgeworfen wird. Man errechnet es, indem man das enddiastolische Volumen vom endsystolischen Volumen subtrahiert. Angegeben wird das Schlagvolumen in µl.

Herzzeitvolumen (HZV; ml/min): Das Herzminutenvolumen ist das Volumen, das das Herz in einer Minute auswirft. Es errechnet sich aus der Herzfrequenz multipliziert mit dem Schlagvolumen. Es wird in mL pro Minute angegeben.

Ejektionsfraktion (EF; %): Die Ejektionsfraktion ist die prozentuale Auswurfsfraktion vom maximalen, also dem enddiastolischen Volumen des linken

Ventrikels. Es wird durch folgende Formel (maximales Volumen – minimales Volumen) / (maximales Volumen * 100) = EF errechnet und stellt einen in der Klinik wichtigen Faktor der systolischen Funktion dar. Dabei ist es wichtig zu wissen, dass die Ejektionsfraktion von der Vor- und Nachlast und somit vom Volumen abhängig ist. Angegeben wird die EF in %.

Linksventrikuläres endsystolisches Volumen (LV ESV; µl): das linksventrikuläre endsystolische Volumen ist das minimale Volumen, das nach dem Auswurf des Blutes im linken Ventrikel verbleibt. Es wird in µl angegeben.

Linksventrikulärer endsystolischer Druck (LV ESP; mmHg): Dies ist der maximale linksventrikuläre Druck und somit ein Parameter der systolischen Herzfunktion. Er wird in mmHg angegeben.

Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt max; mmHg/s): Die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ist ein Parameter der systolischen Funktion und insbesondere der Kontraktilität des linken Ventrikels. Er wird mathematisch aus der ersten Ableitung der linksventrikulären Druckkurve errechnet und stellt daher die Geschwindigkeit der Veränderungen des Drucks im Ventrikel dar. Er wird durch die Einheit mmHg pro Sekunde beschrieben.

Ea (Nachlast; mmHg/µl): Die Nachlast errechnet sich aus dem LV ESP geteilt durch das Schlagvolumen, also Ea = LV ESP/SV. Entsprechend dieser Formel stellt sie den Widerstand der arteriellen Gefäße dar. Die Nachlast ist damit direkt an der Regulierung der kardialen Pumpfunktion beteiligt. Ihre Einheit wird in mmHg pro µl angegeben.

ESPVR (Endsystolisches-Druck-Volumen-Verhältnis; mmHg/µL): Das ESPVR gibt die Kontraktilität des linken Ventrikels wieder und wird aus der Steigung der linearen Gleichung durch die endsystolischen Druck-Volumen-Punkte errechnet. Es ist ein Vor- und Nachlast-unabhängiger Parameter. Es wird in mmHg pro µl angegeben.

Als Maß für die diastolische Funktion wurden folgende Werte aufgezeichnet:

Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LV EDP; mmHg): Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist einer der wichtigsten konventionellen Parameter der

diastolischen Funktion. Er ist der Druck, der am Ende der Diastole kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion im linken Ventrikel gemessen wird.

Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen (LV EDV; µl): Das linksventrikuläre enddiastolische Volumen ist das maximale Volumen an Blut im linken Ventrikel kurz vor Beginn der Systole. Es wird in µl angegeben.

Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt min; mmHg/s): die minimale Druckabfallsgeschwindigkeit ist ein Parameter der frühen diastolischen Relaxation. Sie wird analog zur maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit aus der 1. Ableitung der Druckkurve errechnet und daher in mmHg pro s angegeben.

Tau (ms): Tau ist ein Parameter der frühen diastolischen Funktion. Es bezeichnet den Zeitraum vom Punkt der minimalen Druckabfallsgeschwindigkeit bis kurz vor Ende der Relaxation, wenn der Druck noch 10 % des LV ESP beträgt. Die Einheit lautet Millisekunden.

EDPVR (Enddiastolisches-Druck-Volumen-Verhältnis; mmHg/µl): Dieser Parameter gibt die intrinsische Steifigkeit des Ventrikels während der Diastole wieder. Man erhält ihn durch die Bildung einer linearen oder exponentiellen Funktion durch die enddiastolischen Druck-Volumen-Kurven. Die Steigung oder exponentielle Steilheit dient als Wert für das EDPVR. Im Mausmodell findet vor allem die exponentielle Funktion Anwendung, da sich das EDPVR so genauer ausdrücken lässt. Es wird in mmHg pro µl angegeben.

2.4 Comet Assay der Kardiomyozyten

2.4.1 Methodischer Ablauf des Comet Assays

Eine besonders geeignete Methode um DNA-Schäden auf Ebene einzelner Zellen zu charakterisieren, stellt der Comet Assay dar [40]. Zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen wurde in der hier vorliegenden Arbeit die alkalische Version des Comet Assays verwendet (Speit und Hartmann).

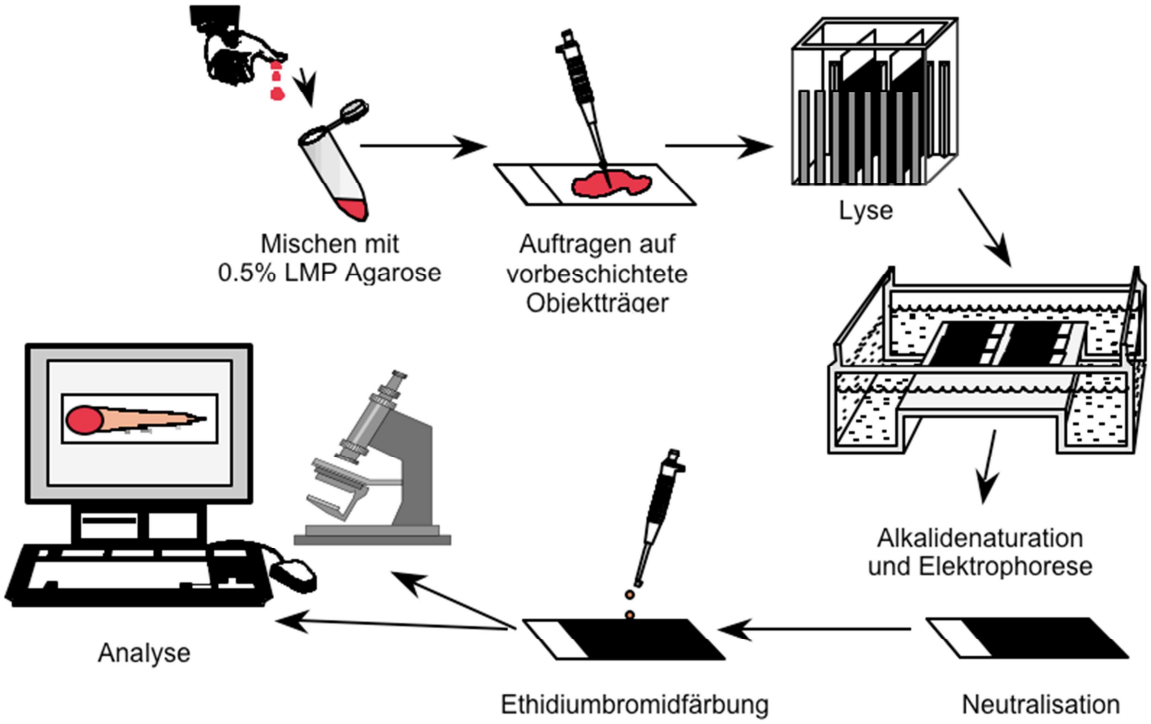

Abbildung 4: schematischer Ablauf des Comet Assays (Einzelzell-Gelelektrophorese in der alkalischen Version (verändert nach Speit und Hartmann). LMP-Agarose: low melting point Agarose

2.4.2 Herstellung der Agarose beschichteten Objektträger

Zum Einsatz kamen Objektträger mit Mattrand, bei denen die Oberseite durch eine Bleistiftmarkierung definiert wurde. Nachdem die Objektträger mit 70% Ethanol gereinigt worden waren und dieser getrocknet war, wurden sie in 1,5%iger MEEO-Agarose (mediumelectroendoosmosis) eingetaucht. Die Agarose wurde wie folgt hergestellt: je 1,5 g MEEO-Agarose wurde in 100 ml PBS-Puffer in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle zweimal sprudelnd aufgekocht und anschließend in einem Becher mit temperierten Wasser auf 60℃ abgekühlt.

Die Objektträger (etwa 100 Stück je 100 ml vorbereiteter MEEO-Agarose) wurden einzeln, mit dem klaren Ende voran in die MEEO-Agarose eingetaucht, wobei das Beschriftungsfeld etwa bis zur Mitte benetzt wurde, um so eine bessere Haftung

der MEEO-Agarose sicherzustellen. Nach Abwischen der Unterseite wurden die Objektträger zur Trocknung auf Ablageplatten gelegt und konnten dann über mehrere Monate hinweg bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

2.4.3 Präparation und Lyse der Kardiomyozyten

Die zur Untersuchung der Kardiomyozyten benötigten LMP-Agarose-Aliquote wurden in Eppendorf Micro-Test-Tubes (Eppis) vorbereitet. Jeweils 100 mg LMP-Agarose wurden hierfür in 20 ml PBS zweimal aufgekocht und in Aliquoten zu 125 µl in die Eppis pipettiert. Diese Aliquote konnten mehrere Monate im Kühlschrank bei 4℃ gelagert werden.

Zur Vorbereitung für die Probenentnahme wurden die Eppis zur Verflüssigung der Agarose im Wasserbad aufgekocht und anschließend bis zur Organentnahme im Heizblock auf die gewünschten 37℃ temperiert. Nach der terminalen Blutentnahme wurde das Herz entnommen und ein kleines Stück in einer Petrischale mit 0,5 ml 20m EDTA 1xPBS auf Eis mit Hilfe von zwei spitzen Pinzetten weiter zerkleinert. Diese Suspension wurde mit Hilfe einer Pipette in ein Reagenzglas mit 0,5 ml 20m EDTA 1xPBS übertragen, in welchem die Zerkleinerung mit einem Potterhomogenisator fortgeführt wurde. Von dieser Suspension wurden 5 µl in die 37℃ warme LMP-Agarose pipettiert, vermisc ht und gleichmäßig auf die präparierten Objektträger aufgetragen. Zum Ausgelieren der Agarose wurden diese mit einem Deckglas versehen und für zwei Minuten bei 4℃ in den Kühlschrank gelegt. Die Deckgläser wurden im rechten Winkel zur späteren Migrationsrichtung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld von den Objektträgern abgezogen, um eventuell dabei entstehende Artefakte als solche zu erkennen und aus der Auswertung ausschließen zu können. Die so behandelten Objektträger wurden für einen Zeitraum von mindestens einer Stunde, maximal jedoch nicht länger als 48 Stunden, in eine lichtgeschützte Küvette mit 4℃ kalter, gebrauchsfertiger Lysepufferlösung gestellt. Hierbei werden sämtliche Zellmembranen abgebaut, die DNA wird freigesetzt, während sie aber noch in der Form des ehemaligen Zellkerns in der Agarose fixiert bleibt. Um eine zusätzliche DNA-Schädigung zu verhindern, wurde die Lyse unter Lichtabschluss durchgeführt. Die Herstellung der Lysepufferlösung erfolgte folgendermaßen: zu 89 ml Lyse- Stammlösung wurde 1 ml Triton X-100 und 10 ml DMSO zugegeben und vermischt. Vor Gebrauch wurde sie für mindestens eine Stunde bei 4℃

gekühlt. Bei der Verarbeitungszeit der Kardiomyozyten wurde darauf geachtet, dass 10 Minuten nicht überschritten wurden, um so eine Reparatur möglicher DNA-Schäden zu vermeiden.

2.4.4 Alkalidenaturierung und anschließende Elektrophorese

Nach der Lyse wurde eine Elektrophoresekammer in der Objektträger horizontal positioniert werden können (siehe Abbildung) in ein Eisbad gestellt. Die Objektträger wurden darin mit auf 4℃ temperierten Alkali-Elektrophoresepuffer (pH-Wert > 13) bedeckt und für 40 Minuten unter Schutz vor direkter Lichteinstrahlung zur sogenannten Alkalidenaturierung ruhen gelassen. Hierbei entspiralisiert sich die DNA und alkalilabile Stellen werden in DNA-Strangbrüche überführt. Dieser Schritt ist notwendig, da der Comet Assay nur DNA-Strangbrüche quantifiziert und so auch alkalilabile Stellen erfasst werden können. Somit erhält man mehr Information über vorhandene DNA-Schädigungen. Diese sinnvolle Modifikation des Comet Assays ermöglicht ebenfalls Basenmodifikationen, sowie Veränderungen am Zuckerphosphatgerüst der DNA aufzuzeigen, die ebenfalls auf oxidative DNA-Schäden hinweisen. Schäden dieser Art führen zwar nicht direkt zu Strangbrüchen, werden aber durch die Alkalidenaturierung in solche überführt.

Im Anschluss an die Alkalibehandlung wurde eine 40-minütige Elektrophorese im selben Puffer durchgeführt. Um einen stetigen Stromfluss von 300 mA bei einer angelegten Spannung von 25 V zu gewährleisten, wurde die Füllhöhe durch die Zugabe oder Abpipettieren von Puffer reguliert.

Abbildung 5: Elektrophoresekammer mit Spannungsquelle

Zur Neutralisierung wurden die Objektträger nach der Elektrophorese aus der Elektrophoresekammer entnommen und dreimal für fünf Minuten mit Neutralisationpuffer überschichtet. Es schloss sich eine Spülung mit destillierten Wasser an, sowie eine Dehydrierung für fünf Minuten in einer Küvette mit 99,8%igem Ethanol. Zuletzt wurden sie horizontal für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss getrocknet. Von allen entnommenen Herzproben wurden je zwei Objektträger angefertigt um bei einem Verlust eines Objektträgers, beispielsweise durch Glasbruch, Verunreinigungen oder einem Ablösen der Agarosebeschichtung während der Verarbeitung, noch einen auswertbaren Objektträger zur Verfügung zu haben. Zur späteren Unterscheidung wurden die beiden Objektträger mit der fortlaufenden Versuchsnummer einem H oder H’ bezeichnet.

2.4.5 Anfärbung der DNA und fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Zur Anfärbung der DNA wurden die Proben unmittelbar vor der Auswertung mit 50 µl Ethidiumbromidfärbelösung (20 µg/ml) überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Das Fluoreszenzmikroskop arbeitet bei einer 400-fachen Vergrößerung mit einer Anregungswellenlänge von 515 nm – 560 nm und einem Sperrfilter bei

590 nm. Mit Hilfe einer Digitalkamera wurde das mikroskopische Bild auf einen PC übertragen (siehe Abbildung) und es wurde mit dem Bildanalyseprogramm Comet Assay II V2.11 das „Tailmoment“ jeder einzelnen untersuchten Zelle ermittelt. Hierbei wird das Produkt aus der relativen Fluoreszenzintensität des Kometenschweifes gegenüber dem Kometenkopf und der auf den Schwerpunkt des Kopfes korrigierten Wanderungslänge der DNA Tailmoment genannt. Hierzu berechnet das Programm folgende Messgrößen: Schweiflänge, Kopfdurchmesser und Leuchtintensität von Schweif und Kopf. Durch Wanderung der chromosomalen DNA aus dem Bereich des ehemaligen Zellkerns in Richtung Anode, entsteht so der Kometenschweif. Für jedes Versuchstier wurden beide Objektträger ausgewertet. Die Vorgehensweise war dabei folgende: auf jedem Objektträger wurden 100 Zellkerne zufällig ausgewählt. Berücksichtigt wurden aber nur solche Kerne, die eine runde Form aufwiesen und die sich nicht in den Randregionen des Objektträgers befanden, da sie erfahrungsgemäß unspezifische DNA-Effekte aufweisen. Des Weiteren wurden Kerne nicht ausgewertet, wenn sie so nahe beieinander lagen, dass sie nicht mehr einzeln ins Auswerteraster der Software passten, beziehungsweise wenn sich ihr Abbild mit einem benachbarten Kometen überschnitt. Dies wurde in der Praxis erreicht, in dem der Objektträger in einem vorgegebenem, rechteckigem Muster betrachtet wurde und jeder Zellkern, der nicht unter die Ausschlusskriterien fiel, ausgewertet wurde.

Die Auswertung erfolgte unter Verblindung des Experimentators, der während der Auswertung der Objektträger nicht über die Gruppenzugehörigkeit der Tiere informiert war.

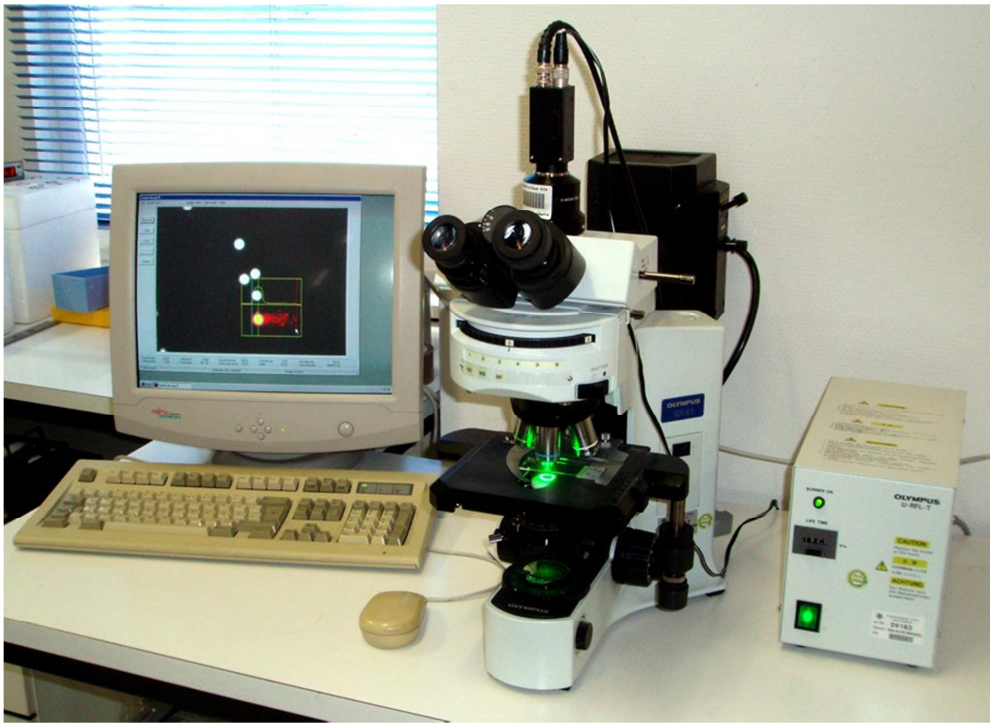

Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskop mit Digitalkamera und PC-Bildanalysesoftware zur Auswertung der mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Präparate.

2.5 Statistische Auswertung

Im Rahmen einer deskriptiven Statistik wurden für die Messergebnisse der verschiedenen Versuchsgruppen und der verschiedenen Messzeitpunkte der Median, Minimum und Maximum, sowie die Quartilen (soweit nicht anders angegeben) ermittelt und Boxplots erstellt. Ergebnisse, bei denen signifikante Unterschiede vorliegen, sind in den Diagrammen und Tabellen als solche gekennzeichnet. Nachdem durch Einsatz des Kolmogorov-Smirnov-Test ausgeschlossen worden war, dass es sich bei den ermittelten Messwerten um normalverteilte Ergebnisse handelt, wurden zeitabhängige Änderungen innerhalb jeder Gruppe getestet. Hierbei führten wir einen "Friedman repeated measures ANOVA on ranks - Test" und einen folgenden "Dunn's Test für multiple Vergleiche" durch. Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden durch einen "Kruskal-Wallis ANOVA on ranks" überprüft. Bei allen Tests wurde ein p-Wert von kleiner als 0,05 als signifikant erachtet.

Zur Berechnung und statistischen Auswertung kam das Programm Sigmastat® in der Version 2.03 zur Anwendung.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Anmerkungen

In der warmen Gruppe der mit H_2S beatmeten Tiere verstarben einige Tiere vor dem Messzeitpunkt 4, sodass zur Auswertung der Wert von Messzeitpunkt 3 in allen Gruppen herangezogen wurde.

3.2 Hämodynamik und linksventrikuläre Funktion

Die Ausgangswerte der hämodynamischen Parameter und die der Körperkerntemperatur waren in allen vier Gruppen vergleichbar (Tabelle 2).

Die Hypothermie wurde innerhalb von 30 Minuten nach der Erholungsphase erreicht. Die Flüssigkeitssubstitution war während der Hypothermie signifikant geringer, wobei zu sagen ist, dass H_2S den Flüssigkeitsbedarf nicht beeinflusste (Normotherme (38 °C) Gruppe: 0,95 (0,92; 1,10), Hypotherme (27 °C) Gruppe: 0,50(0,42; 0,58) $ml \cdot h^{-1}$, $p < 0,001$; Normotherme (38 °C) Gruppe mit H_2S: 0,84 (0,73; 0,97), Hypotherme (27 °C) Gruppe mit H_2S: 0,58 (0,53; 0,65) $ml \cdot h^{-1}$, $p = 0,004$).

Tabelle 2: Ausgangswerte bei Mäusen zu Versuchsbeginn. Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dtmax) und linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dtmin) sind die maximale systolische Kontraktion und diastolisches Relaxation. Alle Daten sind als Median (Range) angegeben. n=8 während Normothermie und n=11 während Hypothermie.

	Kontrolle/ 38 ℃	**H_2S/38 ℃**	**Kontrolle/ 27 ℃**	**H_2S/27 ℃**
Mittlerer arterieller Druck [mm Hg]	71 (65;73)	75 (70;85)	72 (63;77)	69 (61;78)
Herzzeitvolumen [ml x min^{-1}]	9,7 (5,5;14,8)	8,4 (5,8;16,9)	9,3 (3,7;16,2)	6,8 (4,9;13,7)
Herzfrequenz [min^{-1}]	351 (321;449)	372 (338;411)	355 (300;392)	358 (310:414)
Schlagvolumen [µl]	27 (17;49)	27 (17;43)	27 (12;46)	25 (17;38)
Ejektionsfraktion [%]	49 (41;57)	44 (38;48)	48 (41;55)	48 (37;61)
Enddiastolisches Volumen [µl]	51 (28;86)	59 (38;87)	54 (24;82)	41 (20;73)
Endsystolisches Volumen [µl]	31 (20;51)	36 (27;49)	34 (17;45)	29 (11;37)
Enddiastolischer Druck [mmHg]	18 (11;22)	15 (12;18)	16 (14;16)	17 (14;19)
Endsystolischer Druck [mmHg]	91 (87;95)	91 (85;99)	94 (84;103)	84 (75;101)
dP/dt max [mm Hg x s^{-1}]	6479 (6208;6846)	7277 (6671;8187)	6615 (5554;7740)	5953 (4947;7341)
dP/dt min [mm Hg x s^{-1}]	-5610 (-6096;-5123)	-6480 (-8000;-5857)	-5865 (-7118;-5474)	-5298 (-6735;-4035)

Inhaliertes H_2S beeinflusste weder Herzfrequenz noch Blutdruck in der Normothermie (Abbildung 6 und 7). Im Gegensatz hierzu senkte Hypothermie sowohl Herzschlag als auch Blutdruck signifikant, unabhängig von der Anwesenheit von H_2S. Da das Schlagvolumen in allen Gruppen ähnlich war

(Abbildung 8), rührte das verminderte Herzzeitvolumen (Abbildung 9) der Hypothermiegruppen ausschließlich von der verminderten Herzfrequenz her.

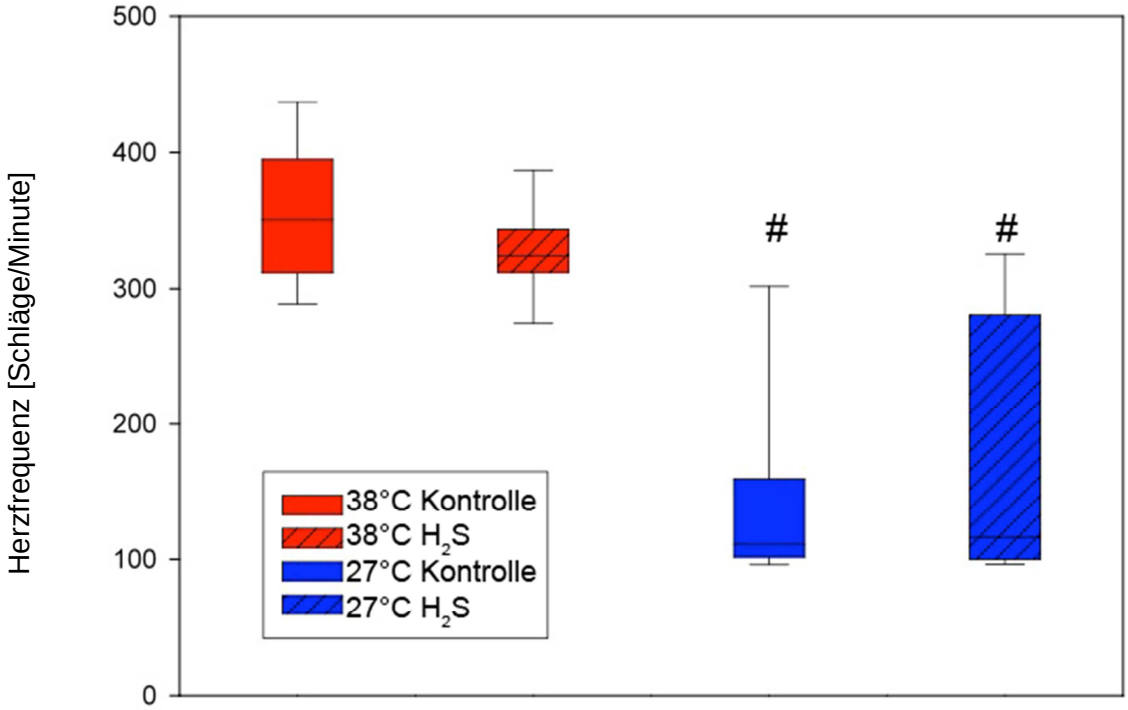

Abbildung 7: Effekt des inhalierten H_2S (100 ppm über drei Stunden) auf den Herzschlag (in Schlägen/Minute) bei Mäusen während Normo- (38 ℃) und Hypothermie (27 ℃). Alle Daten sind als Median (Quartilen) angegeben. n=8 während Normothermie und n=11 während Hypothermie. # p<0,05 vs. 38 ℃ Kontrolle

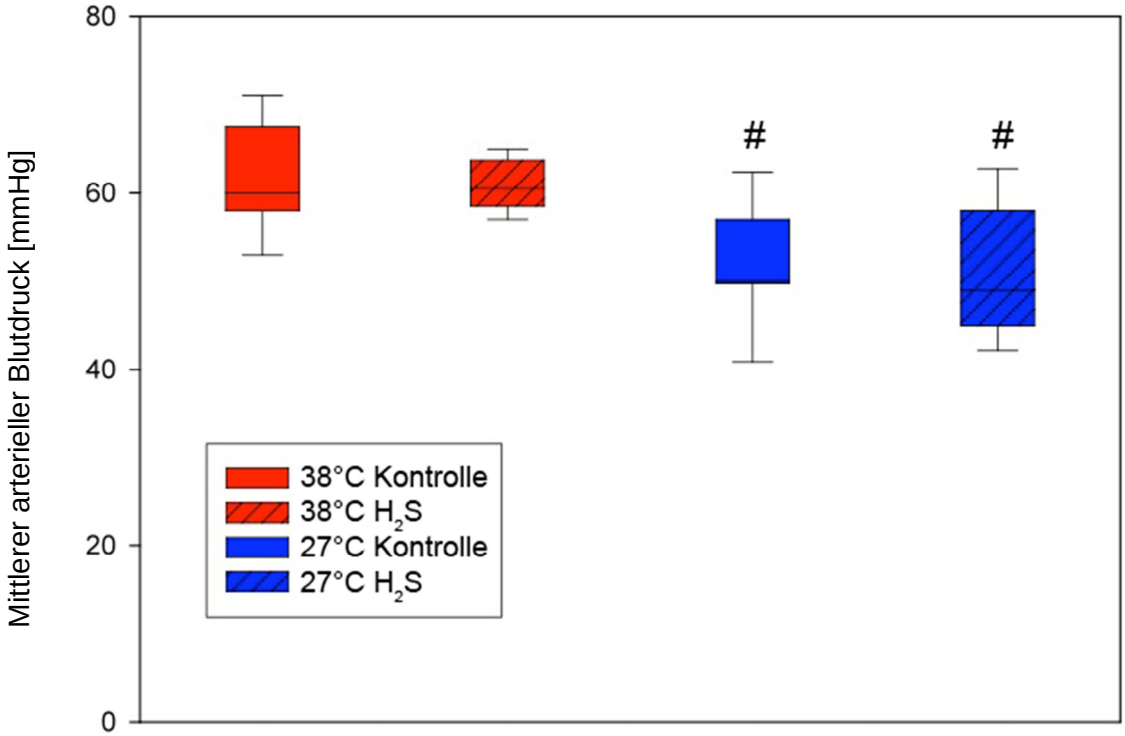

Abbildung 8: Effekt des inhalierten H_2S (100 ppm über drei Stunden) auf den mittleren arteriellen Blutdruck (in mmHg) bei Mäusen während Normo- (38 °C) und Hypothermie (27 ℃). Alle Daten sind als Median (Quartilen) angegeben. n=8 während Normothermie und n=11 während Hypothermie. # p<0,05 vs. 38 ℃ Kontrolle

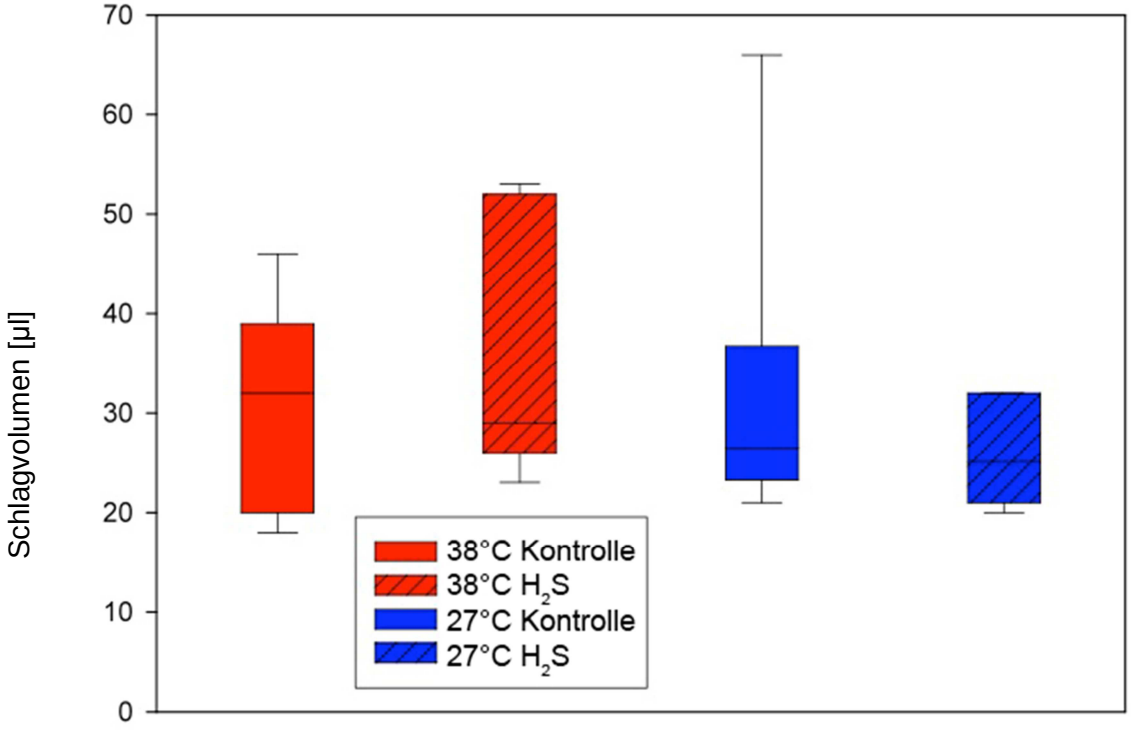

Abbildung 9: Effekt des inhalierten H_2S (100 ppm über drei Stunden) auf das Schlagvolumen (in µl) bei Mäusen während Normo- (38 ℃) und Hypothermie (27 ° C). Alle Daten sind als Median (Quartilen) angegeben. n=8 während Normothermie und n=11 während Hypothermie.

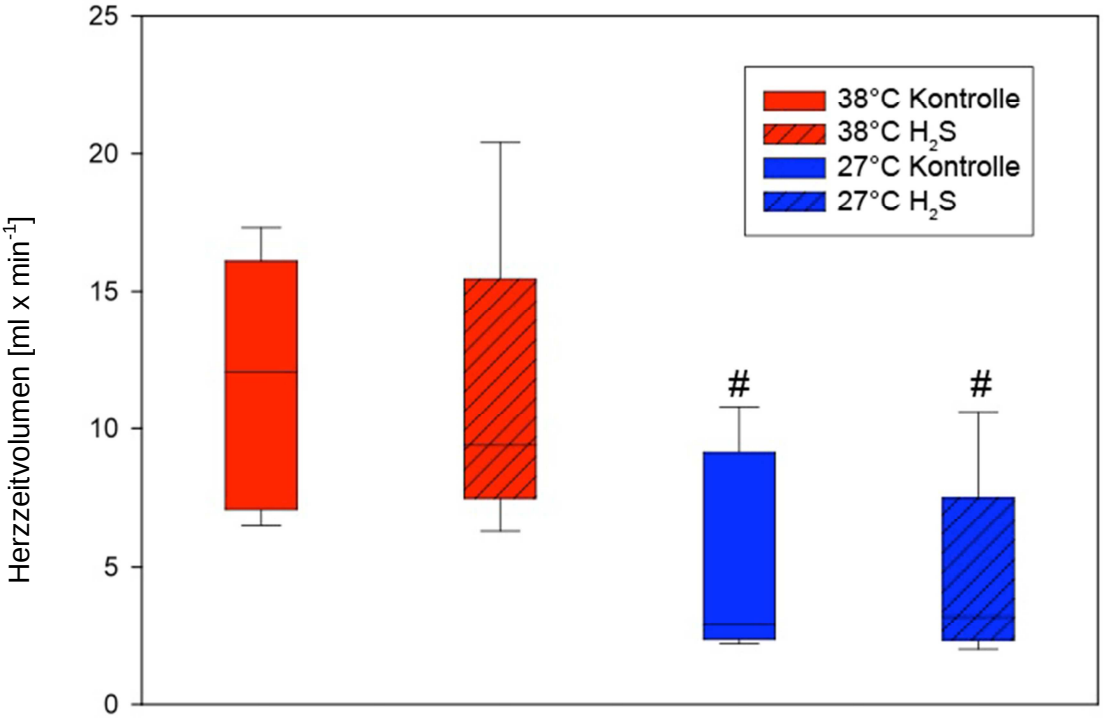

Abbildung 10: Effekt des inhalierten H_2S (100 ppm über drei Stunden) auf das Herzzeitvolumen (in ml x min^{-1}) bei Mäusen während Normo- (38 ℃) und Hypothermie (27 ℃). Alle Daten sind als Median (Quartilen) angegeben. n=8 während Normothermie und n=11 während Hypothermie. # p<0,05 vs. 38 ℃ Kontrolle

Die linksventrikuläre EF und der linksventrikuläre enddiastolische Druck blieben unverändert, während die verminderten Drücke in der Hypothermie mit verringerten dP/dt_{max} und dP/dt_{min} einhergingen.

Tabelle 3: Effekt des inhalierten H_2S (100 ppm über drei Stunden) auf Linksherzparameter bei Mäusen während Normo- (38 ℃) und Hypothermie (27 ℃). Lin ksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dtmax) und linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dtmin) sind die maximale systolische Kontraktion und diastolisches Relaxation. Alle Daten sind als Median (Quartilen) angegeben. n=8 während Normothermie und n=11 während Hypothermie. # p<0,05 vs. Kontrolle/38 ℃

	Kontrolle/ 38 ℃	**H_2S/38 ℃**	**Kontrolle/ 27 ℃**	**H_2S/27 ℃**
dP/dt max [mm Hg x s^{-1}]	6535 (6001;7054)	6176 (5769;6519) #	2777 (2330;4077) #	2505 (2226;5258) #
dP/dt min [mm Hg x s^{-1}]	-5530 (-5266;-5713)	-4963 (-4843;-5298)	-1747 (-1516;-2976) #	-1963 (-1587;-4181) #

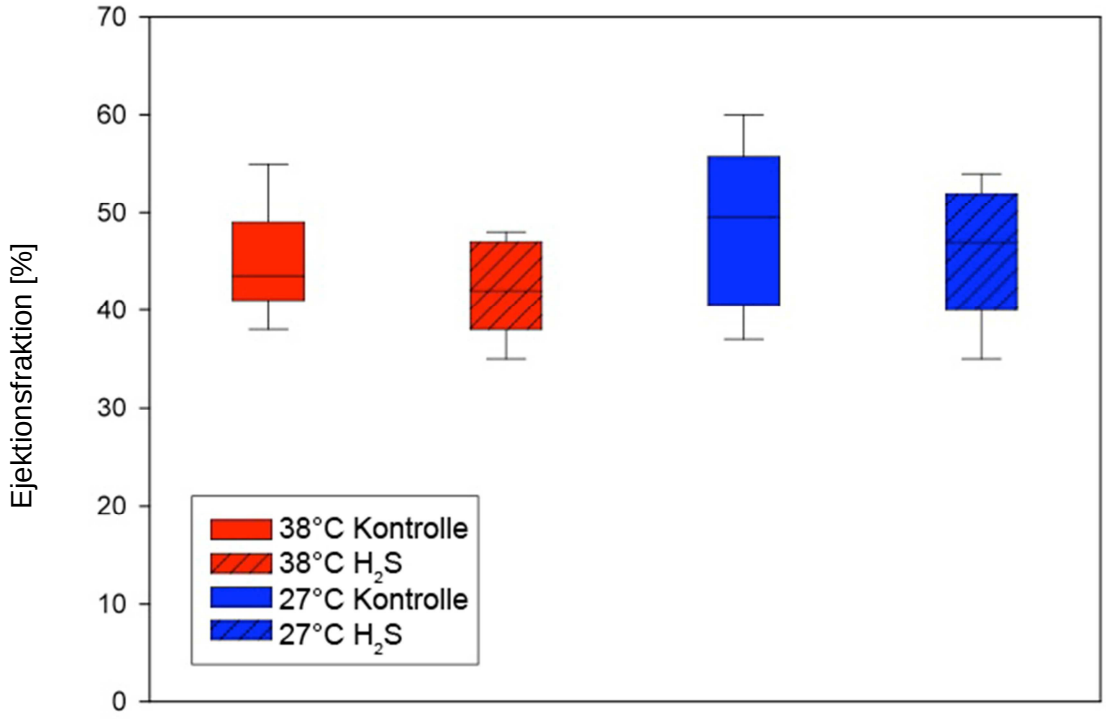

Abbildung 11: Effekt des inhalierten H_2S (100 ppm über drei Stunden) auf die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels bei Mäusen während Normo- (38℃) und Hypothermie (27℃). Alle Daten sind als Median (Quatrilen) angegeben. n=8 während Normothermie und n=11 während Hypothermie.

Die folgende Tabelle (Tabelle 4) stellt die linksventrikulären Drücke und Volumina dar. Ergänzend zeigt die Abbildung die linksventrikulären Druck-Volumen-Kurven. Hierbei ist anzumerken, dass die Diagramme auf den Medianen aller Einzelmessungen des enddiastolischen und endsystolischen Druck-Volumenverhältnisses beruhen, da es sich um einen Ansatz bei geschlossenem Thorax handelt. Voraussetzung bleibt, dass es keinen Volumen und Druckverlust gibt.

Tabelle 4: Effekt des inhalierten H_2S (100 ppm über drei Stunden) auf Linksherzparameter bei Mäusen während Normo- (38 ℃) und Hypothermie (27 ℃). All e Daten sind als Median (Quartilen) angegeben. n=8 während Normothermie und n=11 während Hypothermie. # p<0,05 vs. 0/38 ℃

	Kontrolle/ 38 ℃	**H_2S/38 ℃**	**Kontrolle/ 27 ℃**	**H_2S/27 ℃**
Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen [µl]	50 (44;84)	67 (63;91)	60 (48;68)	53 (47;56)
Linksventrikuläres endsystolisches Volumen [µl]	40 (31;50)	49 (43;56)	38 (33;41)	37 (32;40)
Linksventrikulärer enddiastolischer Druck [mmHg]	16 (13;16)	15 (13;16)	15 (14;19)	15 (13;16)
Linksventrikulärer endsystolischer Druck [mmHg]	84 (81;88)	80 (79;82)	69 (67;73)	67 (64;72)

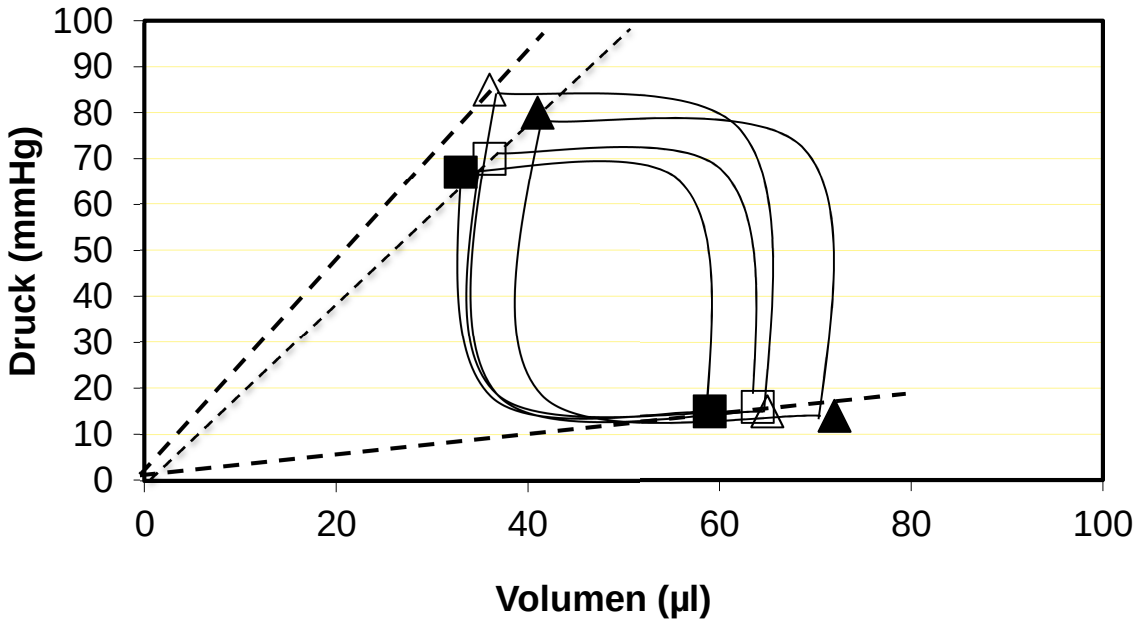

Abbildung 12: Linksventrikuläre Druck-Volumen-Kurven der Normo- (Dreiecke n=8 je Gruppe) und Hypothermie Mäuse (Vierecke n=11 je Gruppe) nach 3h ohne (Symbol offen) oder mit H_2S (Symbol gefüllt) Beatmung. Die Linien stehen für die systolischen und diastolischen Elastanzlinien.

Abgesehen von den niedrigeren linksventrikulären endsystolischen Drücken der Mäuse während einer Hypothermie, präsentierten sich die vier Gruppen mit ähnlichen Verläufen der systolischen und diastolischen Elastanz.

3.3 Comet Assay der Kardiomyozyten

Der oxidative Schaden der DNA bei Kardiomyozyten war unabhängig von der Beatmung mit H_2S in der kalten Gruppe gleich der warmen Gruppe.

Die folgenden Boxplots stellen den oxidativen DNA-Schaden (Tailmoment im Comet Assay) der Kardiomyozyten dar.

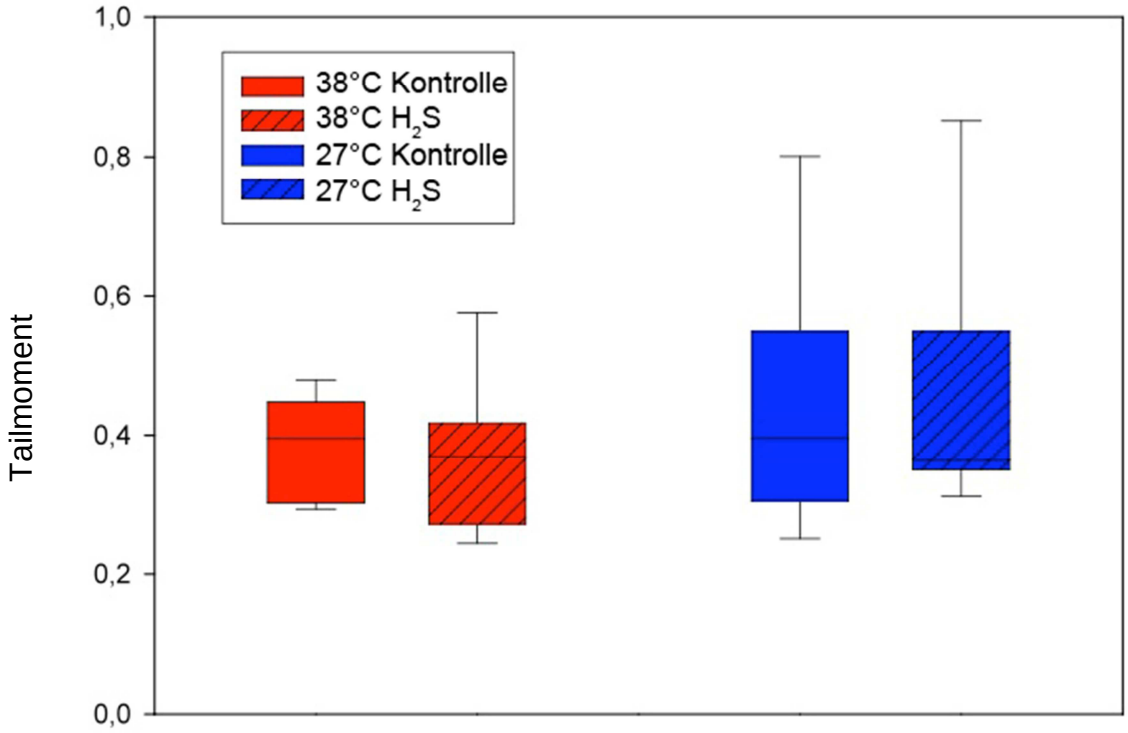

Abbildung 13: Oxidativer DNA-Schaden (Tailmoment im Comet Assay) der post mortem Organbiopsien von Mäusen. n=8 während Normothermie und n=11 während Hypothermie.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, in einem klinisch relevanten Modell zu untersuchen, ob die Inhalation von H_2S bei anästhesierten und beatmeten Mäusen ähnlich wie bei wachen, spontan atmenden Mäusen zu einem „*suspended animation*“-ähnlichen Zustand führen kann. Außerdem sollte die Studie Aufschluss geben, ob eine H_2S-Inhalation ebenfalls mit einer Aufrechterhaltung der linksventrikulären Funktion verbunden ist. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei darauf, ob H_2S einen zusätzlichen Einfluss auf die kardiale Funktion während einer Hypothermie hat.
Des Weiteren sollten die Auswirkungen der H_2S-Inhalation auf Einzelzellebene untersucht werden, genauer ob durch H_2S eine Protektion der DNA der Kardiomyozyten erreicht werden konnte oder ob diese durch H_2S-induzierten oxidativen Stress geschädigt wurde.
Zum Einsatz kamen hierbei einerseits der Linksherzkatheter zur kardialen Funktionsdiagnostik, sowie der Comet Assay zum Nachweis oxidativen Stresses auf Einzelzellebene.

Die Hauptergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Hypothermie per se führte zu einem Abfall des Herzminutenvolumens, sowie zu einem verminderten mittleren arteriellen Blutdruck.
- Die H_2S-Inhalation per se führte nicht zu einem „*suspended-animation*“-ähnlichen Zustand.
- Inhaliertes H_2S führte unabhängig von der Körperkerntemperatur nicht zu einer weiteren Veränderung der Hämodynamik.
- Weder die Temperatur noch die Inhalation von H_2S beeinflusste den Grad der DNA-Schädigung.

4.1 Das Studienmodell

Die Maus war für diese Studie sehr gut geeignet, da sie durch ihre ca. 10-fach höhere metabolische Rate im Vergleich zum Menschen die Möglichkeit bietet unspezifische Effekte der Reduktion der Körperkerntemperatur *per se* von den spezifischen Wirkungen der Substanz H_2S zu unterscheiden. Außerdem ist das hier verwendete Studienmodell bereits seit längerem in der Sektion für

Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung etabliert [2, 5, 6, 39]. Gleichzeitig stellte das hier gewählte Verfahren, nämlich eine H_2S-Inhalation kombiniert mit einer Allgemeinanästhesie, ein noch nicht untersuchtes Setting dar. Des Weiteren lagen aus den Versuchen und Ergebnissen anderer Gruppen [8, 46] die benötigten Dosen für die H_2S-Inhalation bereits vor und konnten so einfach dem Beatmungsgemisch zugefügt werden.

4.2 Die Hämodynamik

In der hier vorliegenden Studie beeinflusste weder die Hypothermie noch die Inhalation von H_2S das Schlagvolumen, die linksventrikuläre Ejektionsfraktion oder die endsystolischen und enddiastolischen Druck-Volumenverhältnisse. Diese Ergebnisse weisen auf eine unveränderte Kontraktilität des Herzens hin. Im Hinblick auf den Einfluss einer Hypothermie auf die Kontraktilität des Herzens steht diese Tatsache im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Ergebnissen, bei denen sowohl Angaben über eine Steigerung, sowie eine Abschwächung der myokardialen Kontraktilität zu finden sind, wobei darauf hinzuweisen ist, dass hier in den meisten Studien nicht mit Mäusen gearbeitet wurde. So konnte bereits 1958 während einer Hypothermie bei Hunden ein Anstieg der Kontraktionskraft des Myokards nachgewiesen werden [17]. Eine Gruppe um Weisser untersuchte den Einfluss einer milden Hypothermie (37 bis 31° C) auf menschliche Herzmuskelanteile und derer von Schweinen *in vitro*, sowie auf hämodynamische Parameter im Schwein *in vivo*. Sie konnten nachweisen, dass die Hypothermie die isometrische Kontraktionskraft bei den humanen in vitro Proben um 16% und in den Proben der Schweine um 9% steigern konnte. Ebenso konnten sie einen Anstieg der Kontraktilität in vivo nachweisen, wo sich das Minutenvolumen von 2,4 +/- 0,1 l/min auf 3,1 +/- 0,31 l/min, das Schlagvolumen von 21 +/- 1 auf 41 +/- 3 ml veränderte und dP/dt_{max} um 8% anstieg, während die Herzfrequenz von 111 +/-3 auf 73 +/-1 pro Minute abfiel. Die Autoren beschrieben weiterhin, dass sie diesen positiv inotropen Effekt einer Hypothermie nachweisen konnten, obwohl es zu keinem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Ströme oder einer erhöhten Ca^{2+}-Konzentration des sarkoplasmatischen Retikulums kam [49]. Bei Kaninchen, Ratten und Igeln konnte ebenfalls eine gesteigerte myokardiale Kontraktilität *in vitro* während einer Hypothermie nachgewiesen werden. Jedoch waren hier wesentlich tiefere Temperaturen untersucht worden. So lagen die Maxima der

Kontraktionskraft bei Kaninchen bei 20℃, für Ratte n bei 15℃ und bei Igeln sogar bei 10℃ [26].

In der hier vorliegenden Studie lagen bereits zu Versuchsbeginn unter Narkose mit durchschnittlichen 359 Schlägen/Minute relative niedrige Herzfrequenzen vor, während für die wache Maus im physiologischen Mittel eine Frequenz zwischen 550 und 620 Schläge die Minute als normal [23] gilt. Diese wurden v. a. in der Hypothermie von einer noch ausgeprägteren Bradykardie gefolgt. Diese Bradykardie könnte kälteinduzierte Anstiege der systolischen Kontraktilität verschleiert haben: es gilt die Kraft-Frequenz-Beziehung des Myokards in Betracht zu ziehen. Diese Beziehung, auch als Bowditch Effekt bekannt, besagt, dass mit ansteigender Herzfrequenz auch die myokardiale Kontraktilität ansteigt. Für Mäuse gilt diese Beobachtung aber nur eingeschränkt. So konnten Georgakopoulos und Kass zeigen, dass bei Herzfrequenzen zwischen 500 und 700 Schlägen pro Minute keine signifikanten Änderungen von dP/dt_{max} vorlagen [16]. Dies deckt sich mit einer anderen Studie von Nemoto et al. die ebenfalls zeigen konnten, dass die Kraft-Fequenz Beziehung bei Mäusen zu keinen signifikanten Änderungen der kardialen Kontraktilität im physiologischen Bereich des Herzschlags führte [29]. Für Frequenzen (<400/min), wie sie in unserer Studie vorlagen, konnten verschiedene Gruppen aber eine verminderte Kontraktilität nachweisen [20, 29], die zur Maskierung einer Hypothermie-induzierten systolischen Kontraktilitätssteigerung geführt haben könnte.

Nach der systolischen, sollte auch die diastolische Funktion näher betrachtet werden. Verschiedene Gruppen konnten für die diastolische Funktion bei Hunden [18, 28], sowie bei Menschen und Schweinen [49] zeigen, dass eine Hypothermie zwischen 28℃ und 32℃ zu keiner signifikanten Verä nderung des enddiastolischen Druck-Volumenverhältnisses führte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie, in der es ebenfalls keine signifikanten Veränderungen des enddiastolischen Druck-Volumenverhältnisses gab.

Volpato et al. [47] untersuchten in ihrer Studie zwar Mäuse, aber nicht ausschließlich eine Hypothermie. Sie berichteten, dass die Inhalation von H_2S in wachen, spontan atmenden, normothermen Mäusen zu einer Verringerung der Herzfrequenz, sowie zu einem verminderten Herzzeitvolumen führte. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen von Volpato et al. hatte H_2S unabhängig von

der Körperkerntemperatur in unserem Experiment keinen Einfluss auf die Systemhämodynamik oder die linksventrikuläre Herzfunktion. Einen entscheidenden Faktor könnte hierbei das gewählte Versuchssetting mit Vollnarkose und maschineller Beatmung eingenommen haben. Sprung et al. beschäftigten sich in einer Studie mit der Kontraktilität und dem Fluss von Ca^{2+} Ionen in caninen Purkinjefasern [41]. Sie griffen hierbei auf vorliegende Daten zurück, die zeigten, dass eine Hypothermie eine Steigerung der Kontraktilität von Papillarmuskeln bewirkte [17, 26, 28]. Sprung et al. konnten nachweisen, dass Halothan und Isofluran durch eine Herabsetzung der myofibrillären Ca^{2+}-Sensitivität den kontraktilitätssteigernden Effekt einer Hypothermie aufheben konnten [41]. Zwar wurde in der hier vorliegenden Arbeit, während der Messphase nicht mit volatilen Anästhetika gearbeitet, dennoch könnte die kontinuierliche i. v. Substitution von Ketamin und Fentanyl einen vasodilatativen Effekt von H_2S maskiert haben und somit auf die Systemhämodynamik und rückwirkend auf die linksventrikuläre Herzfunktion Einfluss genommen haben: während H_2S ein bekannter Vasodilatator [37] ist, führt Ketamin durch eine periphere Wiederaufnahmehemmung von Katecholaminen zur Wirkungsverstärkung selbiger und so zu einem Anstieg der Herzfrequenz und des Blutdrucks.

4.3 Effekte einer Allgemeinanästhesie

Wie oben bereits erwähnt, handelt es sich bei dem hier gewählten Versuchssetting um ein noch nicht untersuchtes Verfahren, nämlich einer Vollnarkose mit maschineller Beatmung in Kombination mit H_2S-Inhalation. Daher gilt es auch allgemein Effekte einer Anästhesie genauer zu betrachten. Während Blackstone et al. in ihrer Studie die Hypothese aufstellten, dass eine H_2S-Inhalation zu einer Hypothermie führt [8], ist bei einer Vollnarkose mit maschineller Beatmung seit längerem bekannt, dass Mäuse aufgrund ihres hohen Körperoberfläche-zu-Masse-Verhältnisses während einer Anästhesie besonders anfällig für eine Hypothermie sind [44].

Allgemein wird die Temperatur hauptsächlich durch den Vasotonus der peripheren Gefäße reguliert: erhöhter peripherer Gefäßwiderstand führt zu einer geringeren Wärmeabgabe aus dem Körperkern an die Umgebung, während ein geringer peripherer Widerstand zu vermehrtem Wärmeverlust führt.

Eine Anästhesie greift in die Thermoregulierung des Körpers ein und kann die thermoregulatorischen Antworten des Körpers beeinträchtigen [38]. Sessler et al.

konnten nachweisen, dass verschiedene Narkotika, darunter Halothan und eine Kombination aus Fentanyl und NO, den Startpunkt einer peripheren Vasokonstriktion während einer Narkose beim Menschen von 37℃ auf 34,5℃ senken konnte. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass eine normalerweise bei ca. 37℃ beginnende thermoregulatorische Vasokonstriktion, unter typischen klinischen Dosen von Isoflurane, erst bei 34℃ Körperkerntemperatur einsetzte [38]. In der hier vorliegenden Arbeit führte eine H_2S-Inhalation bei der hypothermen Versuchsgruppe nicht zu einer weiteren Unterkühlung, da hier gegen reguliert wurde. Die Frage, ob die in der vorliegenden Arbeit erreichte Hypothermie nun durch die Inhalation von H_2S erreicht wurde oder der Vollnarkose und dem hohen Körperoberfläche-zu-Masse-Verhältnis geschuldet war, lässt sich nicht genau klären. Am wahrscheinlichsten kann man von einer Addition der Effekte ausgehen.

Den zweiten zu betrachtenden Part während einer Narkose stellt die maschinelle Beatmung dar. Im vorliegenden Experiment wurden die Tiere mit einem volumenkontrollierten, drucklimitierten Regime beatmet. Der Erfolg der Beatmung wurde kontinuierlich durch Messung des expiratorischen CO_2 kontrolliert, sowie durch regelmäßige Gaspartialdruckmessungen im Blut. Hierbei zeigten sich keine Auffälligkeiten. Eine Gruppe um Wolthuis konnte in einem Versuch, bei dem verschiedene Beatmungsregime und ihr Einfluss auf Lungenverletzungen getestet werden sollten, keinen Einfluss der verschiedenen Regime auf den systolischen Blutdruck und die Herzfrequenz bei Mäusen feststellen [52]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Wilson et al. Sie konnten nur in den letzten Minuten eines Experiments, bei sehr hohem Tidalvolumen der maschinellen Beatmung, bei Mäusen einen signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes nachweisen. Zuvor hatten die Beatmungsregime weder einen Einfluss auf die Systemhämodynamik noch auf die Herzfrequenz [51]. Dies führt zu der Annahme, dass auch im hier vorliegenden Experiment, da nicht mit extrem hohen Tidalvolumina gearbeitet worden war, die maschinelle Beatmung der Mäuse keinen Einfluss auf die Systemhämodynamik und die Herzfunktion genommen hat. Wie bereits oben beschrieben, könnte das genutzte Medikamentenregime, welches Ketamin beinhaltete, Einfluss genommen haben und somit Effekte von H_2S verschleiert haben. Zuurbier et al. untersuchten in einer Studie den Einfluss verschiedener Anästhetikaregime auf den mittleren arteriellen Blutdruck und die

Herzfreqzenz u. a. für den Mausstamm C57Bl/6, der auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. In ihrem Experiment konnten sie für die Ketamin-beinhaltende Narkose vergleichbare Herzfrequenzen zu den in der vorliegenden Arbeit als Normotherm gekennzeichneten Gruppen zeigen. Die mittleren arteriellen Drücke lagen in der Arbeit bei circa 70 mmHg und somit etwas über den der Normothermen Gruppen dieser Arbeit, die bei 60 mmHg lagen [55]. Diese Druckdifferenz lässt sich allerdings durch das unterschiedliche Versuchssetting erklären, da die Mäuse der hier vorliegenden Arbeit laparotomiert waren. Kass et al. sprechen sich sogar gegen einen Einsatz von Ketamin-beinhaltenden Anästhesien bei Mäusen aus, da diese häufig zu Ergebnissen mit niedrigen systolischen Drücken und Bradykardie führten [23]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde Ketamin nicht wie durch Kass kritisiert mit Xylazin, einem gebräulichen veterinären Sedativum, kombiniert, sondern mit Fentanyl, einem hochwirksamen Opiod. Diese führen zu einer zentralen Sympathikolyse, sowie einem erhöhten Vagotonus und können Bradykardie, Hypotonus und ein vermindertes Herzzeitvolumen auslösen. In therapeutisch üblichen Dosen ist eine solche Suppression allerdings untypisch.

4.4 Der Comet Assay

Der Comet Assay ermöglichte es in dieser Arbeit DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche zu quantifizieren. Er ist ein bekannter und etablierter Genotoxizitätstest. In der vorliegenden Studie wurde die alkalische Version des Comet Assay angewandt. Diese bietet zusätzlich die Möglichkeit neben den DNA-Strangbrüchen und den unvollständigen Exzisionsreperaturstellen auch alkali-labile Stellen zu erfassen und diese durch eine Steigerung der DNA-Migration zu detektieren [40]. Frühere Studien haben gezeigt, dass sich der Comet Assay gut zum Nachweis von Chirurgie- oder Sepsis-induziertem oxidativem Stress eignet [39].

Mögliche Fehlerquellen bei der Anwendung des Comet Assays können an verschiedenen Punkten auftreten. So kann es bei der Verarbeitung des Materials nach der Entnahme des Organs zu Verzögerungen kommen und die DNA-Reperaturmechanismen der Zelle könnten einsetzen und so mögliche Schäden beheben. Ebenso können bei der Elektrophorese die Ergebnisse verfälscht werden, indem durch zu hohen oder tiefen Füllstand der Elektrophoresekammer

ein falscher pH-Wert herrscht oder nicht stets der gleiche Strom fließen kann. Ein weiterer Fehler könnte bei der mikroskopischen Auswertung durch die Auswahl „falscher“ Kometen entstehen.

Das Tailmoment der vier untersuchten Gruppen lag ungefähr gleich bei ca. 0,4 was generell für eine nur schwach geschädigte DNA spricht. In der vorliegenden Studie konnte also nicht nachgewiesen werden, dass weder die Inhalation von H_2S noch die Hypothermie oder beide in Kombination zu einem protektiven Effekt für die DNA der Kardiomyozyten führte. Ebenso konnte aber auch keine Toxizität von H_2S nachgewiesen werden.

Der Effekt einer Substanz, in der vorliegenden Studie H_2S, egal ob zytotoxischer oder zytoprotektiver Natur, ist stets dosisabhängig. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass die Toxizität von H_2S abhängig von der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies ist. Dies gelang durch den Nachweis der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies *in vitro* in Hepatozyten mit Hilfe der Dichlorfluoreszin-Methode. Ihre Bildung war hierbei abhängig von der Konzentration von H_2S, das in Form von NaHS appliziert wurde. In dieser Studie von Eghbal et al. lagen die Konzentrationen, die zur toxischen Wirkung von H_2S führten im geringen millimolaren Bereich (NaHS 0,5 mM) [12]. Eine Gruppe aus Singapore konnte in einer Studie im Rahmen der Parkinsonforschung nachweisen, dass H_2S, ebenfalls in Form von NaHS appliziert, in mikromolaren Konzentrationen (1-100 µM) zu einem Schutz vor Zellschäden durch das Derriswurzelextrakt (Rotenon), einem häufig verwendetem Toxin zur *in vivo* oder *in vitro* Induktion von Morbus Parkinson-Modellen, führt [21]. In der hier vorliegenden Studie betrugen die freien Sulfidwerte im Blut zwischen 0,7 und 0,9 µM, was darauf zurückschließen lässt, dass die H_2S-Gewebekonzentrationen keine möglicherweise zytotoxischen Bereiche erreichten und somit eher im Bereich der als protektiv angenommenen Konzentration [21] lagen. Dies deckt sich mit der Annahme, dass bei Ratten normale Herzgewebekonzentrationen von H_2S von 130 µM nachgewiesen werden konnten [30]. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, einer nur geringen Schädigung der DNA, unabhängig von der H_2S-Behandlung, stehen Ergebnisse über die genotoxische Wirkung selbst bei geringen mikromolaren Konzentrationen von H_2S, die mit derselben Methode, dem Comet Assay, nachgewiesen werden konnten. Während in diesem Experiment freie Sulfidwerte von bis zu 0,9 µM H_2S

zu keinerlei weiteren Schädigung der DNA im Vergleich zu den Kontrollgruppen führte, konnte für H_2S, appliziert durch den Donor Na_2S, selbst bei geringsten Konzentrationen von 1 µM H_2S bereits eine signifikante DNA-Schädigung, quantifiziert anhand des Tailmomentes, nachgewiesen werden [3]. Ebenfalls konnte die gleiche Gruppe nachweisen, dass die genotoxische Wirkung von H_2S mit der Bildung von freien Radikalen zusammenhängt, da eine Vorbehandlung der untersuchten Zellen mit dem Radikalfänger Buthylhydroxyanisol zu einer deutlich geringeren DNA-Schädigung führte [3]. Allerdings wurde diese Untersuchung in vitro an nackten Zellkernen durchgeführt; in einem vorhergehenden Experiment derselben Gruppe gelang der Nachweis einer genotoxischen Wirkung von H_2S allerdings erst nach einer Unterbindung der DNA-Reperaturmechanismen der Zellen [4]. Diese Erkenntnis könnte auch auf die hier vorliegende Studie anwendbar sein. In dem vorliegenden Experiment handelte es sich um eine *in vivo* Studie, in der die untersuchten Kardiomyozyten während des Experimentes durch keine weiteren Einflüsse kompromittiert waren. Abgesehen von der operativen Instrumentierung lagen keine weiteren oxidativen Stress begünstigende Faktoren wie zum Beispiel eine Sepsis vor. Man kann daher davon ausgehen, dass die DNA-Reperaturmechanismen während der H_2S-Exposition in gewohntem Umfang abliefen. Die Frage, ob H_2S auf Herzmuskelzellen einen protektiven Effekt haben kann, müssen weitere Studien klären. Ein negativer Einfluss des inhalativen Schwefelwasserstoffes konnte aber ausgeschlossen werden.

4.5 Grenzen der Studie

In dieser Arbeit müssen auch Aspekte des Experimentes besprochen werden, die Teile der Auswertung hätten verbessern können. Ebenso sollte die klinische Übertragbarkeit auf Studien an anderen Spezies überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden nach der Organentnahme keine direkten Konzentrationsbestimmungen von H_2S in den Kardiomyozyten durchgeführt, da ein direkter Nachweis extrem schwierig zu führen ist. Es wurden freie Sulfidwerte im Blut nachgewiesen und anhand dieser Rückschlüsse auf die Gewebekonzentration gezogen. Der tatsächliche Wert könnte also in den Kardiomyozyten höher oder niedriger gewesen sein.

Des Weiteren sollte man beachten, dass die gemessenen kardialen und hämodynamischen Werte bereits zu Beginn der Studie nicht im für Mäuse physiologischen Bereich lagen, sondern in allen Gruppen deutlich unter dem

Normalbereich. Wie oben bereits beschrieben, könnte dies am gewählten Versuchssetting liegen: während Volpato et al. in ihrer Studie mit wachen Mäusen arbeiteten und zu Versuchsbeginn physiologische Verhältnisse der Hämodynamik vorlagen [47], wurden die Tiere im hier vorliegenden Experiment narkotisiert und maschinell beatmet. Kass et al. stellten schon 1998 in Frage, ob solche nicht im physiologischen Bereich liegenden Ausgangswerte, die hauptsächlich bei Studien mit Vollnarkosen gemessen werden, tatsächlich Rückschlüsse auf den Einfluss der zu untersuchenden Größe zulassen oder ob sie das tatsächliche Ergebnis zu stark verzerren [23].

Ebenfalls sollte die Übertragbarkeit der Ergebnisse einer H_2S-induzierten Hypothermie, sowie die kardiale Beeinflussung durch H_2S auf größere Tierspezies überprüft werden. Ein solcher Beweis gelang für einen Hypothermie-induzierenden Effekt noch nicht [11], während es über den Einfluss auf die kardiale Funktion, sowie die Hämodynamik in der Literatur widersprüchliche Angaben gibt: während Osipov et al. in einer Studie an Schweinen keine hämodynamischen Veränderungen unter H_2S-Gabe nachweisen konnten [31], zeigten Derwall et al. bei Schafen einen durch periphere Vasodilatation induzierten starken Abfalls des mittleren arteriellen Blutdrucks [10].

Um die genotoxische Wirkung von H_2S bei einem *in vivo* Modell genauer zu quantifizieren, müssten wie oben bereits angesprochen genaue Gewebekonzentrationen nach Versuchende bestimmt werden. Ebenso müsste nachgewiesen werden, ob H_2S auch *in vivo* bei Kompromittierung von DNA-Reperaturmechanismen zu DNA-Schädigung führen kann.

4.6 Schlussfolgerung

Bei Mäusen in Vollnarkose unter mechanischer Beatmung hat inhaliertes H_2S unabhängig von der Körperkerntemperatur weder Einfluss auf die systemische Hämodynamik noch auf die kardiale Funktion. H_2S verstärkt also nicht die hämodynamischen Effekte einer vorsätzlichen Hypothermie.

Ebenso führte die Inhalation von H_2S zu keiner Organprotektion des Herzens, aber auch nicht zu einer nennenswerten Steigerung des oxidativen Stress' für Kardiomyozyten.

Ob H_2S dennoch Einfluss auf die kardiale Funktion genommen hat, gilt es in weiteren Studien zu überprüfen.

Schwefelwasserstoff bleibt ein verfolgenswerter Ansatz, da in unserem Experiment keine negativen Folgen für die kardiale Funktion und die Hämodynamik nachgewiesen werden konnten und vorhergehende Studien einen positiven Effekt, sowie einen suspended animation-ähnlichen Zustand nachweisen konnten [8, 47].

5 Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren wurde Schwefelwasserstoff, kurz H_2S als einer der drei großen Gasotransmitter neben Kohlenmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO) erkannt. Während ihm zuvor nur toxische Wirkungen zugeschrieben wurden, ist heute bekannt, dass H_2S auch in Säugetierzellen in signifikant nachweisbaren Mengen gebildet wird und sowohl im kardiovaskulären- als auch im Zentralen Nerven-System als wichtiger Botenstoff fungiert. Für die hier vorliegende Arbeit waren zwei Punkte ausschlaggebend: einerseits das Potential von Schwefelwasserstoff einen Zustand der reversiblen Hypothermie, sowie eine *Suspended Animation* hervorzurufen, wobei hier das Augenmerk auf der kardialen Funktion lag, und andererseits die immer noch widersprüchlichen Aussagen über mögliche toxische oder im Gegensatz dazu protektive Wirkungen von H_2S auf Ebene der Desoxyribonucleinacid (DNA). Während es in einigen Studien Hinweise gibt, dass H_2S einen zytoprotektiven Effekt besitzt und bei Kardiomyozyten in einem Reperfusionsmodell einen limitierenden Einfluss auf die Infarktgröße hatte, so gibt es auch Gruppen, die eindeutige negative Effekte von H_2S nachweisen konnten, nämlich Kaspasenaktivierung mit konsekutiven DNA-Strangbrüchen, sowie Schädigung der DNA durch die Bildung freier Radikale.

Es wird vermutet, dass die Fähigkeit von H_2S mit der Cytochrom C Oxidase zu interagieren und so den zellulären Sauerstoffverbrauch zu regulieren, den entscheidenden Faktor für die Induktion einer *Suspended Animation* darstellt. Allgemein versteht man unter einer *Suspended Animation* einen Winterschlaf-ähnlichen Zustand mit der Herabregulierung verschiedener Körperfunktionen wie z. B. der Atem- und Herzfrequenz, die es dem Organismus erleichtert extreme Belastungssituationen besser zu überleben. Zwei wegweisende Experimente zeigten, dass H_2S bei Mäusen, einer Spezies die normalerweise keinen Winterschlaf hält, eine Hypothermie und eine *Suspended Animation* induzierte, sowie deutlich Einfluss auf die kardiale Funktion nahm. Im Rahmen dieser Studie sollte nun untersucht werden, ob H_2S bei Mäusen unter Vollnarkose ähnliche Effekte auf die Körperkerntemperatur und die Hämodynamik wie bei wachen Mäusen hat und ob H_2S in diesem Setting auf die Kardiomyozyten protektiv oder genotoxisch wirkt.

Für die Durchführung der Studie wurden 38 Mäuse vom Typ C57Bl/6 männlichen Geschlechts verwendet. Sie wurden randomisiert in vier Gruppen unterteilt, von

denen jeweils zwei Gruppen während des Versuches bei einer Körperkerntemperatur von 38℃ und je zwei Gruppen bei 27℃ gehalten wurden. Jeweils eine der warmen und eine der kalten Gruppen wurde mit 100 ppm (Parts per million) H_2S beatmet. Den ersten Versuchsteil stellte die sham-Operation dar, in der bei den narkotisierten und maschinell beatmeten Tieren eine mediane Laparotomie mit Darstellung des Zökums durchgeführt wurde. Nach einer Pause von 24 Stunden schloss sich der eigentliche Versuchsteil an. Hierbei wurde ein hämodynamisches Monitoring mit stündlichen Messzeitpunkten durchgeführt und nach der terminalen Blutentnahme schloss sich die Organentnahme an. Eine kleine Probe des Herzens wurde zu Comet Assays weiterverarbeitet.

Die Untersuchungen zeigten, dass eine Hypothermie sowohl den Herzschlag als auch den mittleren arteriellen Blutdruck signifikant senkte. Die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, sowie die enddiastolischen ventrikulären Drücke blieben unverändert, während der verminderte Blutdruck in der Hypothermie durch verminderte Blutdruckanstieggeschwindigkeit (dP/dt_{max}) und Blutdruckabfallgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) imponierte. Die Bradykardie führte zu einem verminderten Herzzeitvolumen. H_2S hatte überdies hinaus keinen weiteren Einfluss auf die Hämodynamik. Ebenso litten die Kardiomyozyten unter keinem verminderten oder vermehrten oxidativen Stress.

Bei Mäusen in Vollnarkose unter maschineller Beatmung hat inhaliertes H_2S, anders als bei wachen Mäusen, unabhängig von der Körperkerntemperatur weder Einfluss auf die systemische Hämodynamik noch auf die kardiale Funktion. In der vorliegenden Studie konnte nicht nachgewiesen werden, dass H_2S die hämodynamischen Effekte einer vorsätzlichen Hypothermie verstärkt.

Ebenso führte die Inhalation von H_2S zu keiner Steigerung des oxidativen Stress' für Kardiomyozyten. Es konnte kein protektiver Effekt für H_2S an Kardiomyozyten nachgewiesen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Aivatidi C, Vourliotakis G, Georgopoulos S, Sigala F, Bastounis E, Papalambros E: Oxidative stress during abdominal aortic aneurysm repair-biomarkers and antioxidant's protective effect: a review. Eur.Rev.Med.Pharmacol.Sci., 15: 245-252 (2011)

2. Albuszies G, Vogt J, Wachter U, Thiemermann C, Leverve X M, Weber S, Georgieff M, Radermacher P, Barth E: The effect of iNOS deletion on hepatic gluconeogenesis in hyperdynamic murine septic shock. Intensive Care Med., 33: 1094-1101 (2007)

3. Attene-Ramos M S, Wagner E D, Gaskins H R, Plewa M J: Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. Mol.Cancer.Res., 5: 455-459 (2007)

4. Attene-Ramos M S, Wagner E D, Plewa M J, Gaskins H R: Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. Mol.Cancer.Res., 4: 9-14 (2006)

5. Barth E, Radermacher P, Thiemermann C, Weber S, Georgieff M, Albuszies G: Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. Crit.Care Med., 34: 307-313 (2006)

6. Baumgart K, Simkova V, Wagner F, Weber S, Georgieff M, Radermacher P, Albuszies G, Barth E: Effect of SOD-1 over-expression on myocardial function during resuscitated murine septic shock. Intensive Care Med., 35: 344-349 (2009)

7. Bernard S A, Gray T W, Buist M D, Jones B M, Silvester W, Gutteridge G, Smith K: Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. N.Engl.J.Med., 346: 557-563 (2002)

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

9. Busto R, Dietrich W D, Globus M Y, Ginsberg M D: Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. Neurosci.Lett., 101: 299-304 (1989)

10. Derwall M, Francis R C, Kida K, Bougaki M, Crimi E, Adrie C, Zapol W M, Ichinose F: Administration of hydrogen sulfide via extracorporeal membrane lung ventilation in sheep with partial cardiopulmonary bypass perfusion: a proof of concept study on metabolic and vasomotor effects. Crit.Care, 15: R51 (2011)

11. Drabek T, Kochanek P M, Stezoski J, Wu X, Bayir H, Morhard R C, Stezoski S W, Tisherman S A: Intravenous hydrogen sulfide does not induce hypothermia or improve survival from hemorrhagic shock in pigs. Shock, 35: 67-73 (2011)

12. Eghbal M A, Pennefather P S, O'Brien P J: H2S cytotoxicity mechanism involves reactive oxygen species formation and mitochondrial depolarisation. Toxicology, 203: 69-76 (2004)

13. Elrod J W, Calvert J W, Morrison J, Doeller J E, Kraus D W, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow C W, Lefer D J: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 104: 15560-15565 (2007)

14. 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)

15. Geng B, Chang L, Pan C, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C: Endogenous hydrogen sulfide regulation of myocardial injury induced by isoproterenol. Biochem.Biophys.Res.Commun., 318: 756-763 (2004)

16. Georgakopoulos D, Kass D: Minimal force-frequency modulation of inotropy and relaxation of in situ murine heart. J.Physiol., 534: 535-545 (2001)

17. Goldberg L I: Effects of hypothermia on contractility of the intact dog heart. Am.J.Physiol., 194: 92-98 (1958)

18. Haasler G B, Rodigas P C, Spotnitz H M: The absence of temperature effects on end-diastolic pressure-volume relations in the canine left ventricle determined by two-dimensional echocardiography. J.Thorac.Cardiovasc.Surg., 83: 878-890 (1982)

19. Hill B C, Woon T C, Nicholls P, Peterson J, Greenwood C, Thomson A J: Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. Biochem.J., 224: 591-600 (1984)

20. Hoit B D, Ball N, Walsh R A: Invasive hemodynamics and force-frequency relationships in open- versus closed-chest mice. Am.J.Physiol., 273: H2528-335 (1997)

21. Hu L F, Lu M, Wu Z Y, Wong P T, Bian J S: Hydrogen sulfide inhibits rotenone-induced apoptosis via preservation of mitochondrial function. Mol.Pharmacol., 75: 27-34 (2009)

22. Kamoun P: Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. Amino Acids, 26: 243-254 (2004)

23. Kass D A, Hare J M, Georgakopoulos D: Murine cardiac function: a cautionary tail. Circ.Res., 82: 519-522 (1998)

24. Leonov Y, Sterz F, Safar P, Radovsky A, Oku K, Tisherman S, Stezoski S W: Mild cerebral hypothermia during and after cardiac arrest improves neurologic outcome in dogs. J.Cereb.Blood Flow Metab., 10: 57-70 (1990)

25. Leschelle X, Goubern M, Andriamihaja M, Blottiere H M, Couplan E, Gonzalez-Barroso M D, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, Mignotte B, Bouillaud F, Blachier F: Adaptative metabolic response of human colonic

epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. Biochim.Biophys.Acta, 1725: 201-212 (2005)

26. Liu B, Wohlfart B, Johansson B W: Effects of low temperature on contraction in papillary muscles from rabbit, rat, and hedgehog. Cryobiology, 27: 539-546 (1990)

27. Mason M G, Nicholls P, Wilson M T, Cooper C E: Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 103: 708-713 (2006)

28. Monroe R G, Strang R H, Lafarge C G, Levy J: Ventricular Performance, Pressure-Volume Relationships, and O2 Consumption during Hypothermia. Am.J.Physiol., 206: 67-73 (1964)

29. Nemoto S, DeFreitas G, Mann D L, Carabello B A: Effects of changes in left ventricular contractility on indexes of contractility in mice. Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol., 283: H2504-106 (2002)

30. Ogasawara Y, Isoda S, Tanabe S: Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. Biol.Pharm.Bull., 17: 1535-1542 (1994)

31. Osipov R M, Robich M P, Feng J, Liu Y, Clements R T, Glazer H P, Sodha N R, Szabo C, Bianchi C, Sellke F W: Effect of hydrogen sulfide in a porcine model of myocardial ischemia-reperfusion: comparison of different administration regimens and characterization of the cellular mechanisms of protection. J.Cardiovasc.Pharmacol., 54: 287-297 (2009)

32. Rose P, Moore P K, Ming S H, Nam O C, Armstrong J S, Whiteman M: Hydrogen sulfide protects colon cancer cells from chemopreventative agent beta-phenylethyl isothiocyanate induced apoptosis. World J.Gastroenterol., 11: 3990-3997 (2005)

33. Safar P: Resuscitation from clinical death: pathophysiologic limits and therapeutic potentials. Crit.Care Med., 16: 923-941 (1988)

34. Safar P, Abramson N S, Angelos M, Cantadore R, Leonov Y, Levine R, Pretto E, Reich H, Sterz F, Stezoski S W: Emergency cardiopulmonary bypass for resuscitation from prolonged cardiac arrest. Am.J.Emerg.Med., 8: 55-67 (1990)

35. Safar P, Xiao F, Radovsky A, Tanigawa K, Ebmeyer U, Bircher N, Alexander H, Stezoski S W: Improved cerebral resuscitation from cardiac arrest in dogs with mild hypothermia plus blood flow promotion. Stroke, 27: 105-113 (1996)

36. Safar P J, Kochanek P M: Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. N.Engl.J.Med., 346: 612-613 (2002)

37. Schleifenbaum J, Kohn C, Voblova N, Dubrovska G, Zavarirskaya O, Gloe T, Crean C S, Luft F C, Huang Y, Schubert R, Gollasch M: Systemic peripheral artery relaxation by KCNQ channel openers and hydrogen sulfide. J.Hypertens., 28: 1875-1882 (2010)

38. Sessler D I: Perianesthetic thermoregulation and heat balance in humans. FASEB J., 7: 638-644 (1993)

39. Simkova V, Baumgart K, Vogt J, Wachter U, Weber S, Groger M, Speit G, Radermacher P, Albuszies G, Barth E: The effect of superoxide dismutase overexpression on hepatic gluconeogenesis and whole-body glucose oxidation during resuscitated normotensive murine septic shock. Shock, 30: 578-584 (2008)

40. Speit G, Hartmann A: The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. Methods Mol.Biol., 113: 203-212 (1999)

41. Sprung J, Stowe D F, Kampine J P, Bosnjak Z J: Hypothermia modifies anesthetic effect on contractile force and Ca2+ transients in cardiac Purkinje fibers. Am.J.Physiol., 267: H725-33 (1994)

42. Szabó C, Kiss L, Pankotai E: Cytoprotective and antiinflammatory effects of hydrogen sulfide in macrophages and in mice. Crit. Care, 11 (Suppl 2) (2007)

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

44. Taylor D K: Study of two devices used to maintain normothermia in rats and mice during general anesthesia. J.Am.Assoc.Lab.Anim.Sci., 46: 37-41 (2007)

45. Victor V M, Rocha M, Esplugues J V, De la Fuente M: Role of free radicals in sepsis: antioxidant therapy. Curr.Pharm.Des., 11: 3141-3158 (2005)

46. Volpato, G. P. et al.: , Cardiovascular response to breathing hydrogen sulfide in a murine model: separating the effects of body temperature. [Homepage of APS Intersociety Meeting web site], [Online] 21.09.2006, 2006-last update. Available: <http://www.the-aps.org/meetings/ aps/vabeach/fullprogram.pdf [05/2010, 2010]

47. Volpato G P, Searles R, Yu B, Scherrer-Crosbie M, Bloch K D, Ichinose F, Zapol W M: Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic function in the mouse. Anesthesiology, 108: 659-668 (2008)

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

49. Weisser J, Martin J, Bisping E, Maier L S, Beyersdorf F, Hasenfuss G, Pieske B: Influence of mild hypothermia on myocardial contractility and circulatory function. Basic Res.Cardiol., 96: 198-205 (2001)

50. Whiteman M, Armstrong J S, Chu S H, Jia-Ling S, Wong B S, Cheung N S, Halliwell B, Moore P K: The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrite 'scavenger'? J.Neurochem., 90: 765-768 (2004)

51. Wilson M R, Choudhury S, Goddard M E, O'Dea K P, Nicholson A G, Takata M: High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in

vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. J.Appl.Physiol., 95: 1385-1393 (2003)

52. Wolthuis E K, Vlaar A P, Choi G, Roelofs J J, Juffermans N P, Schultz M J: Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. Crit.Care, 13: R11 (2009)

53. Yan S K, Chang T, Wang H, Wu L, Wang R, Meng Q H: Effects of hydrogen sulfide on homocysteine-induced oxidative stress in vascular smooth muscle cells. Biochem.Biophys.Res.Commun., 351: 485-491 (2006)

54. Yang G, Wu L, Wang R: Pro-apoptotic effect of endogenous H2S on human aorta smooth muscle cells. FASEB J., 20: 553-555 (2006)

55. Zuurbier C J, Emons V M, Ince C: Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol., 282: H2099-105 (2002)

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. Dr. Radermacher bedanken, der mir diese Doktorarbeit ermöglichte. Ich konnte während meiner Versuche sehr selbstständig im Labor arbeiten und für Fragen hatte er stets ein offenes Ohr. Des Weiteren durfte ich ihn auch als Tutor in dem von ihm betreuten Wahlfach Expeditionsmedizin unterstützen, da uns auch die gemeinsame Leidenschaft für das Tauchen verbindet. Herzlichen Dank für diese Möglichkeit!

Ein weiterer Dank geht an meine Betreuerin Frau Dr. Katja Wagner, die mir sehr geduldig immer wieder nützliche Hinweise gab und mir das wissenschaftliche Schreiben nahe brachte.

Danke auch an Herr Dr. Michael Gröger, der mir im Labor tatkräftig zur Seite stand, mich vor allem beim Comet Assay Teil dieser Arbeit unterstützte und beim Tauchen für die nötige Ablenkung sorgte. Ebenfalls gebührt Frau MUDr. Vladislava Hysa Dank für ihre Hilfe bei manch kniffligen Problem, sowie Frau Sandra Weber für ihre Unterstützung bei den Versuchen.

Natürlich möchte ich mich zum Schluss noch bei meinen lieben Eltern Brigitte und Johannes herzlich bedanken, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mir stets eine Stütze waren. Sie gaben mir die nötigen Freiräume, hatten Verständnis für das was ich brauchte und für das was ich tat. Ohne sie wäre ich nicht so weit gekommen!

Vielen Dank!

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name und Anschrift:	Benedikt Steif, wohnhaft in Erlangen
Geburtsjahr	*1984*
Geburtsort:	Augsburg

Schulausbildung

1991 bis 1995	Anton-Höfer-Volksschule, Thannhausen
1995 bis 2004	Ringeisen-Gymnasiums der St. Josefskongregation, Ursberg
2001	3-monatiger Aufenthalt an der Blackwood High School (Adelaide, Australien) als Austauschschüler

Grundwehrdienst

2004 bis 2005	Grundwehrdienst im Gebirgssanitätsregiment Kempten und Bundeswehrkrankenhaus Ulm

Studium

2005 bis 2010	Studium der Humanmedizin, Universität Ulm
2010 bis 2011	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Ulm (Innere Medizin und Pädiatrie 50%), Spitalzentrum Biel (Chirurgie), Royal Children's Hospital Melbourne (Pädiatrie 50%)
Dezember 2011	Staatsexamen Humanmedizin und Approbation als Arzt
Seit 1.10.2008	Stipendiat der Hanns-Seidel-Stiftung e. V.

Derzeit

Seit 1.03.2012	Assistenzarzt an der Klinik für Kinder und Jugendliche der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen