UNIVERSITÄTSKLINIKUM ULM

KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE

ÄRZTLICHER DIREKTOR: PROF. DR. MED. DR. MED. H. C. MICHAEL GEORGIEFF SEKTION ANÄSTHESIOLOGISCHE PATHOPHYSIOLOGIE UND VERFAHRENSENTWICKLUNG SEKTIONSLEITER: PROF. DR. MED. P. RADERMACHER

INTRAVENÖSE GABE VON NATRIUMSULFID BEIM STUMPFEN THORAXTRAUMA DER MAUS

DISSERTATION

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

> MICHAEL JÖRG TRITSCH GEBOREN IN KARLSRUHE 2015

AMTIERENDER DEKAN: PROF. DR. THOMAS WIRTH

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Radermacher

2. BERICHTERSTATTER: PROF. DR. MANFRED FRICK

TAG DER PROMOTION: 18.12.2015

Für Oswald Schindele und Hanna Fratton, die mir die Möglichkeiten und Grenzen der Medizin gezeigt haben.

INHALTSVERZEICHNIS:

ABKÜRZUNGSVERZEICHNISIV					
1.	1. EINLEITUNG				
	1.1	.1 Das stumpfe Thoraxtrauma1			
		1.1.1	Klinische Relevanz des Thoraxtraumas	1	
		1.1.2	Pathophysiologische Grundlagen	2	
	1.2	Schwei	felwasserstoff	5	
		1.2.1	Allgemeines	5	
		1.2.2	Zustand der "Suspended Animation"	6	
		1.2.3	Zytoprotektion	7	
		1.2.4	Vasodilatation	8	
		1.2.5	Lokale und systemische Immunreaktion	8	
	1.3	Fragest	tellung und Zielsetzung	9	
2.	MAT	FERIAL UN	ND METHODEN	11	
	2.1	Versuc	hstiere	11	
	2.2	Tierant	trag	11	
	2.3	"Blunt-	-Chest-Trauma Modell" der Maus	11	
	2.4	Mouse	e Intensive Care Unit (MICU)	13	
	2.5	Materi	ialgewinnung und Aufbereitung	16	
	2.6	Wester	rn Blot	17	
	2.7	Zytokir	n-Assay	21	
	2.8	Electro	phoretic Mobility Shift Assay (EMSA)	22	
	2.9	Immun	nhistochemische Gewebeaufbereitung	24	
	2.10	2.10 Histologie			
	2.11	L Softwa	are	27	
	2.12	2 Statisti	ische Analyse	27	
3.	ERG	EBNISSE .		28	
	3.1	Hämoo	dynamik	28	
	3.2	Metab	olische Effekte	28	
	3.3	Lunger	nfunktion	29	
	3.4	Diures	e 31		
	3.5	Lung W	Vet Weight	32	
	3.6	Lunger	ngewebsschädigung	32	
	3.7	Apopto	ose	33	
	3.8	Expres	sion von Stress-Proteinen	36	
	3.9	System	nische Entzündungsreaktion	40	
	3.10 Expression von Enzymen der endogenen H_2S -Synthese42				

4.	DISKUSSION	44
	4.1 Das stumpfe Thoraxtrauma-Modell der Maus	45
	4.2 "Suspended Animation"	46
	4.3 Lungenprotektive Beatmung	47
	4.4 Diurese und Säure-Base-Haushalt	48
	4.5 Endogene H ₂ S Synthese	48
	4.6 Stressreaktion	48
	4.7 Mikroskopische Schädigung des Lungengewebes	49
	4.8 Apoptose	50
	4.9 Inflammation	51
	4.10 Grenzen der Studie	53
	4.11 Schlussfolgerungen aus der Arbeit	54
5.	ZUSAMMENFASSUNG	56
6.	LITERATURVERZEICHNIS	58
7.	Danksagung	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

³² P	Phosphor Isotop
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Methode
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AMV	Atemminutenvolumen
АТР	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-Associated Death Promoter
Bax	"B-cell lymphoma-2 associated x-protein", B-Zell Lymphom-2 assoziiertes x-Protein
bcl-2	"B-cell lymphoma-2", B-Zell Lymphom-2
bcl-xL	B-cell lymphoma - extra large
BSA	Bovines Serum-Albumin
ca.	Circa
Casp 3	Caspase 3
CBS	Cystathionin-β-Synthase
Cl ⁻ Kanäle	Chlorit-Kanäle
CLP	"Cecal ligation and puncture"
cmH₂O	Zentimeter Wassersäule, physikalische Einheit
СО	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPL	Compliance
CSE	Cystathionin-γ-Lyase
Cyt. C	Cytochrom C
ds-	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
Fab	Fragment antigen binding
Fc	Crystallisable fragment
FiO2	Inspiratorische Sauerstofffraktion
H ₂ O	Wasser
H ₂ S	Schwefelwasserstoff
HCI	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIER	"Heat Induced Epitope Retrieval", Hitzeinduzierte Antigen Demaskierung
HO-1	Hämoxygenase-1
HR	Herzfrequenz
HS	Hydrosulfid-Anion
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
I/R	Ischämie-Reperfusion

I:E	Verhältnis von Inspiration zu Exspiration	
ICAM1 Intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1		
IL-	Interleukin	
iNOS	NO-Synthase	
ΙκΒ-α	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer	
K ⁺ _{ATP} -Kanal	ATP-abhängiger Kaliumkanal	
LPS	Lipopolysaccharid	
LWW	"Lung wet weight", Lungen Nassgewicht	
MAP	"Mean arterial pressure", mittlerer arterieller Blutdruck	
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein-Kinase	
MICU	"Mice Intensive Care Unit"	
min.	Minuten	
mmHg	Quecksilbermilimeter	
N ₂	Stickstoff	
N ₂ O	Lachgas	
Na ₂ S	Natriumsulfid	
NaCl	Natriumchlorid	
NaHS	Natriumhydrogensulfid	
NaOH	Natriumhydroxid	
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells	
NO	Stickstoffmonoxid	
O ₂	Sauerstoff	
0 ₂ OH-	Sauerstoff Hydroxid	
О ₂ ОН- р	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau	
O ₂ OH- P PAG	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin	
O ₂ OH- P PAG PaO ₂	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad	
O ₂ OH- PAG PaO ₂ PBad PBS	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck	
O ₂ OH- P PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK ppm	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK ppm PSL	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million Photostimulierte Lumineszenz	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK ppm PSL ROS	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million Photostimulierte Lumineszenz Reaktive Sauerstoffspezies	
O ₂ OH- P PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK PPM PSL ROS SDS-PAGE	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million Photostimulierte Lumineszenz Reaktive Sauerstoffspezies Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK ppm PSL ROS SDS-PAGE SH-Gruppe	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million Photostimulierte Lumineszenz Reaktive Sauerstoffspezies Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis Thiol-Gruppe einer chemischen Verbindung	
O ₂ OH- P PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK PPM PSL ROS SDS-PAGE SH-Gruppe TBS	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million Photostimulierte Lumineszenz Reaktive Sauerstoffspezies Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis Thiol-Gruppe einer chemischen Verbindung Tris buffered Saline	
O ₂ OH- P PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK PBS PACO ₂ PEEP PNK SDS-PAGE SDS-PAGE SH-Gruppe TBS TEMED	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million Photostimulierte Lumineszenz Reaktive Sauerstoffspezies Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis Thiol-Gruppe einer chemischen Verbindung Tris buffered Saline N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK ppm PSL ROS SDS-PAGE SH-Gruppe TBS TEMED TNF-α	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million Photostimulierte Lumineszenz Reaktive Sauerstoffspezies Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis Thiol-Gruppe einer chemischen Verbindung Tris buffered Saline N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin Tumor-Nekrose-Faktor-α	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK ppm PSL ROS SDS-PAGE SH-Gruppe TBS TEMED TNF-α TNF-α Tris	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million Photostimulierte Lumineszenz Reaktive Sauerstoffspezies Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis Thiol-Gruppe einer chemischen Verbindung Tris buffered Saline N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin Tumor-Nekrose-Faktor-α Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	
O ₂ OH- p PAG PaO ₂ pBad PBS PaCO ₂ PEEP PNK ppm PSL ROS SDS-PAGE SH-Gruppe TBS TEMED TNF-α TNF-α Tris TxT	Sauerstoff Hydroxid Signifikanzniveau DL-Propargylglyzin Arterieller Sauerstoff-Partialdruck Phosphorylierte Form von Bad Phosphate Buffered Saline Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck "Positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck Polynukleotidkinase Parts per million Photostimulierte Lumineszenz Reaktive Sauerstoffspezies Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis Thiol-Gruppe einer chemischen Verbindung Tris buffered Saline N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin Tumor-Nekrose-Faktor-α Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Thoraxtrauma	

vs.	Versus
V _T	Tidalvolumen
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. EINLEITUNG

1.1 DAS STUMPFE THORAXTRAUMA

1.1.1 KLINISCHE RELEVANZ DES THORAXTRAUMAS

Das spitze Thoraxtrauma, hervorgerufen durch Penetration der Brustwand durch einen spitzen Gegenstand, findet sich in Deutschland sehr selten, wohingegen es in Regionen mit hoher Inzidenz von Gewaltverbrechen durchaus häufiger im Rahmen von Messerstich-Verletzungen oder ähnlichem zu finden ist. Hierzulande ist im Wesentlichen das stumpfe Thoraxtrauma von Relevanz, das sich vom spitzen Brustwandtrauma durch die Art der Gewalteinwirkung unterscheidet. Hier sind vor allem Verkehrsunfälle als Hauptursache zu nennen, gefolgt von Stürzen aus großer Höhe [114]. Dies erklärt auch, wieso das Thoraxtrauma nur in weniger als 20% der Fälle isoliert vorkommt [114]. In diesen Fällen ist eine Mortalität von über 20%, bei über 60-jährigen Patienten sogar bis zu 40%, beschrieben [121]. Die überwiegende Mehrheit der Thoraxtraumata findet sich im Rahmen von Mehrfachverletzungen [114]. Hier liegt die Inzidenz für ein gleichzeitiges Auftreten eines stumpfen Thoraxtraumas bei 40 - 60% [9]. Die Prognose des Polytraumas verschlechtert sich dann dramatisch und findet Ausdruck in einem Mortalitätsanstieg von 27% auf 33%, bei gleichzeitiger Lungenkontusion sogar auf bis zu 56%, und ist damit ein wichtiger prognostischer Faktor. [42]. Dabei findet man in mehr als 80% der Fälle zusätzlich extrathorakale Begleitverletzungen wie Schädel-Hirn-Trauma, Extremitätenfrakturen oder abdominelle Begleitverletzungen [107, 114]. Häufigste thorakale Verletzungen sind Frakturen des knöchernen Thorax sowie Verletzungen ohne knöcherne Beteiligung wie Hämatopneumothorax und Lungenkontusion [114]. Letztere kann, je nach Ausmaß, mit oder ohne respiratorische Insuffizienz einhergehen [114].

Die Hauptursachen der *Frühletalität* nach Thoraxtrauma sind im Wesentlichen eine zerebrale Beteiligung in Form eines Schädel-Hirn-Traumas, sowie der nicht behandelbare hämorrhagische Schock durch Volumenverlust [9, 107, 121]. Im Gegensatz hierzu liegen der *Spätletalität* oft Komplikationen wie Sepsis oder Multiorganversagen zugrunde [115], bei dem das Thoraxtrauma als Ursache eine herausragende Position einnimmt und für 25% der Trauma-induzierten Todesfälle verantwortlich ist [114].

Obwohl das Thoraxtrauma normalerweise in Kombination mit anderen Verletzungen vorkommt ist die Untersuchung des isolierten stumpfen Thoraxtraumas aufgrund der Verschlechterung des Outcomes und des gehäuften Auftretens von Komplikationen also wichtig.

1.1.2 PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN

Die pathophysiologischen Vorgänge infolge der Lungenkontusion sind durch die direkte physikalische Schädigung zu erklären. Hierbei entstehen zum einen strukturelle Schäden: durch Schädigung der Gefäße und der Alveolarmembran kommt es zu Blutungen im Lungenparenchym und Alveolarraum. Die zudem gesteigerte Gefäßpermeabilität führt zu einer mehr oder weniger stark ausgeprägten Verdickung der Alveolarsepten durch Ödembildung [49], sowie zur Immigration neutrophiler Granulozyten ins Interstitium [49, 105, 141]. Die eingewanderten Granulozyten führen sowohl durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, aber auch durch direkte Aktivierung von Enzymen und Proteasen, zu einer Gewebedestruktion [50, 57, 140, 141]. Auch die vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6 TNF-α durch und ortsansässige Alveolarmakrophagen [105, 141], und die vermehrte Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle [95, 141] stoßen einen Teufelskreis an, der durch weitere Migration polymorphkerniger Granulozyten [49, 141] zu einer Exazerbation der Entzündungsreaktion führt. Durch die lokale Schädigung kommt es zu einer systemischen Beteiligung der Immunreaktion und somit zu einer systemischen Entzündungsreaktion die damit auch eine Exazerbation der lokalen inflammatorischen Reaktion auslöst. [68, 69, 105]. Die systemische Inflammation stellt also einen wesentlichen Punkt der pathophysiologischen Vorgänge nach Thoraxtrauma dar, welche in Abbildung 1 vereinfacht dargestellt sind.

Aus den strukturellen Veränderungen resultieren *funktionelle Schäden*, die durch atelektatische Lungenabschnitte zu einer Einschränkung der funktionellen Residualkapazität führen und durch verminderte Compliance und einer Ventilations-Perfusions-Störung eine Erhöhung des Shuntvolumens zur Folge haben [49].



ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER PATHOPHYSIOLOGISCHEN GRUNDLAGEN DER INFLAMMATION IM RAHMEN DES THORAXTRAUMAS: Durch das Thoraxtrauma (TxT) mit einhergehender Lungenkontusion kommt es zur mechanischen Schädigung des Lungengewebes. Nach Aktivierung (+) ortsansässiger Alveolarmakrophagen und Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren wie Interleukin (IL) -1 und Tumornekrosefaktor (TNF) – α , kommt es zur vermehrten Adhäsion polymorphkerniger Granulozyten am Endothel (z.B. vermittelt durch das intrazelluläre Adhäsionsmolekül ICAM1) und zu vermehrter Permeabilität des Endothels. Daraus resultiert neben einer Ödem-Entstehung auch eine Akkumulation inflammatorischer Zellen und Erythrozyten im Interstitium, was neben einer Hämorrhagie auch zu vermehrter Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie zur Aktivierung verschiedener Enzyme führt. Die Folge ist eine Gewebedestruktion, die zu einer Steigerung sowohl der lokalen, als auch durch Ausschwemmung proinflammatorischer Mediatoren, zu einer systemischen Entzündungsreaktion führt.

Sowohl durch die mechanische Wirkung, als auch durch die daraus resultierende Inflammation kommt es zum Zelltod im Lungengewebe. Bei der Induktion der Apoptose, dem programmierten Zelltod, unterscheidet man einen extrinsischen und intrinsischen Aktivierungsweg: Beim *extrinsischen* Weg der Apoptose-Einleitung bindet ein Ligand wie z.B. FAS-Ligand der zytotoxischen T-Zellen oder Zytokine, wie TNF-α, an den so genannten Todesrezeptor der Zellmembran und induziert somit über Aktivierung einer Signalkaskade den Zelltod (*Abbildung 2*) [18, 96]. Bei der Aktivierung über den *intrinsischen Weg* kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C aus der inneren Mitochondrienmembran [24, 79, 85, 88]. Die Regulation der Apoptose geschieht unter anderem durch Bax ("B-Cell Lymphoma-2 Associated X-Protein", B-Zell Lymphom-2 assoziiertes X-Protein), dem hier als Bax-Bax-*Homodimer* pro-apoptotische Funktion zukommt [46, 104, 149]. Reguliert wird Bax wiederum durch andere, anti-apoptotische Mitglieder der bcl-2-Familie wie bcl-2 ("B-Cell Lymphoma-2", B-Zell Lymphom-2) und bcl-xL (B-Cell Lymphoma - Extra Large), bei deren vermehrter Expression es zur Bildung von *Heterodimeren* kommt und somit die weitere Aktivierungskaskade unterbrochen wird [46, 67, 79, 104, 124]. Über die Initiator-Caspase 8 beim extrinsischen, bzw. Caspase 9 beim intrinsischen Weg, kommt es letztlich zur Aktivierung von Caspase 3, 6 und 7 [79, 85, 89, 110]. Diese bilden die gemeinsame Endstrecke beider Apoptose-Wege, was den Zerfall von strukturellen und regulatorischen Proteinen sowie die Fragmentierung von DNA durch Aktivierung von Endonukleasen zur Folge hat [79, 89].



ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHER ABLAUF DER APOPTOSE: Apoptose ist sowohl durch den intrinsischen, als auch durch den extrinsischen Weg induzierbar. Dabei sind diverse Regulatoren wie bcl-xL und Bad beteiligt. So ist Bad in seiner phosphorylierten ([®]) Form pBad als pro-apoptotischer Regulator funktionsunfähig und deshalb als anti-apoptotisch anzusehen. Die vermehrte Expression der Onkogene Bcl-2 und Bcl-xL verhindern ebenfalls die Aktivierung des intrinsischen Wegs über die Hemmung der Cytochrom C-Freisetzung aus der inneren Mitochondrienmembran. Der extrinsische Weg wird durch Ligandenbindung am Todesrezeptor ausgelöst. Die Aktivierung beider Wege startet eine Kaskade aus Initiator-Caspasen und mündet in eine gemeinsame Endstrecke durch Aktivierung der ausführenden Caspasen wie z.B. Casp 3. Dadurch erfolgen die Aktivierung von Endonukleasen und DNA-Fragmentierung, sowie der Abbau des Zytoskeletts. Bcl-2: B-Cell Lymphoma-2, Bcl-xL: B-Cell Lymphoma-Extra-Large, Casp 3: Caspase 3, Bad: Bcl-2-Associated Death Promoter, Cyt. C: Cytochrom C, pBad: Phosphorylierte Form von Bad, TNF: Tumor-Nekrose-Faktor, [®]: Phosphat

1.2 SCHWEFELWASSERSTOFF

1.2.1 ALLGEMEINES

Schwefelwasserstoff ist ein farbloses, wasserlösliches Gas mit dem charakteristischen Geruch fauler Eier [27, 101]. Es entsteht im Rahmen von Fäulnisprozessen, aber auch beim Verbrennen von Petroleum [45, 125] oder Tabak [48] und ist bekannt für seine Toxizität mit dosisabhängigen Symptomen wie Kopfschmerzen und Lungenödem bis hin zur Atemlähmung [27, 41, 101]. H₂S ist als Gas imstande ohne Beteiligung von spezifischen Transportern durch biologische Membranen zu diffundieren [58, 138]. Die Halbwertszeit von Schwefelwasserstoff im Plasma beträgt, speziesabhängig, meist weniger als 5 Minuten [148]. Der Katabolismus erfolgt über 3 verschiedene Systeme: über mitochondriale Oxidation zu Thiosulfat, über Methylierung im Zytosol zu Dimethylsulfid, sowie über die Bildung von Sulfhämoglobin durch Bindung an Hämoglobin [90, 52, 138]. Wie viele andere Säugetiere ist auch der Mensch in der Lage, H₂S selbst zu synthetisieren [90, 138]. Dies geschieht sowohl durch nicht-enzymatische Reduktion von Thiolen oder thiolhaltigen Molekülen [90] als auch enzymatisch aus der schwefelhaltigen Aminosäure L-Cystein durch Cystathionin- β -Synthase (CBS), hauptsächlich im ZNS [1], aber auch in Leber und Niere [125], sowie durch Cystathionin-y-Lyase (CSE) in Niere [81, 132], Dünndarm [53], Herz [33, 92, 151] und vor Allem der glatten Muskulatur und den Endothelien der Gefäße [44, 53, 151, 160]. H₂S wird deshalb, neben Kohlenmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO), oft als drittes Mitglied der Familie gasförmiger Transmitter bezeichnet [90, 138]. Dabei regulieren die Gasotransmitter ihre Expression und Wirksamkeit auch gegenseitig. So inhibiert sowohl NO als auch CO die an der H₂S-Synthese beteiligten Enzyme [108, 128]. Es wurde jedoch auch eine vermehrte endogene Produktion von H₂S und eine vermehrte Expression von CSE im Gefäßsystem nach NO-Inkubation beschrieben [159, 160]. Gleichermaßen reguliert auch H₂S die Bildung von NO, z.B. über die Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) [71, 104] und inaktiviert NO durch die Bildung von funktionslosem Nitrosothiol [4, 146].

Auch hier sind gegenteilige Effekte beschrieben [61, 53], so dass die genauen Mechanismen der Kommunikation der gasförmigen Transmitter noch weitestgehend im Dunkeln liegen.

1.2.2 ZUSTAND DER "SUSPENDED ANIMATION"

Die Reduktion der körpereigenen Stoffwechselaktivität und des Energiebedarfs ermöglicht es einigen Spezies wie Amphibien, Fischen, Reptilien, aber auch einigen Säugetieren, andernfalls letale Veränderungen wie Nahrungsmittelengpässe, Hypoxie oder kalte Umgebungstemperatur unbeschadet zu überstehen [16, 111]. Dieser Zustand wird als "Suspended Animation" bezeichnet und ist auch bei Spezies induzierbar, die unter physiologischen Bedingungen keinen Winterschlaf halten. Dieser "Suspended Animation"-ähnliche Zustand wurde z.B. bei Großtieren wie Hunden und Schweinen durch Infusion kalter kristalloider Lösung und einem daraus resultierendem Abfall der Körperkerntemperatur erreicht [3, 11]. Blackstone beschrieb 2005 in seiner aufsehenerregenden Arbeit erstmals die Möglichkeit der Induktion eines solchen Winterschlaf-ähnlichen Zustands durch Inhalation von Schwefelwasserstoff-Gas bei Mäusen, ohne zusätzliche Infusion kalter Lösungen oder gezielter Kühlung [15]. So äußerte sich ein Absinken des Metabolismus bei Blackstone neben einem Abfall der Körperkerntemperatur auf ca. 2°C über Raumtemperatur auch durch eine Senkung der Atem- und Herzfrequenz, sowie durch eine verminderte Sauerstoffaufnahme und CO₂ Produktion. Dabei waren alle Effekte nach Auswaschen des H₂S komplett reversibel und die Tiere zeigten keinerlei auffälliges Verhalten. Diese Beobachtungen konnten in einer Nachfolgestudie verifiziert und objektiviert werden: So zeigte sich, dass die Senkung der kardialen Auswurfleistung bei gleichbleibendem Schlagvolumen und Blutdruck lediglich der Frequenz geschuldet war [6, 117, 134]. Diese Effekte waren dabei teilweise abhängig von der Körpertemperatur [134]. Versuche, eine "Suspended Animation" auch bei Großtieren wie z.B. Schafen, Schweinen oder Ferkeln zu induzieren, erwiesen sich jedoch weitestgehend als erfolglos [47, 80, 117]. Letztlich erschwert die breite Varianz der Applikationsformen (i.v. vs. inhalativ), Dosierung und Dauer [Bolus vs. kontinuierliche Infusion) der Sulfid-Gabe, sowie Art der Sulfid-Freisetzung (H₂S, Na₂S, NaHS) den direkten Vergleich der einzelnen Veröffentlichungen und die Interpretation der Ergebnisse.

Die genauen molekularen Mechanismen die zu einer Sulfid-induzierten "Suspended Animation" führen sind bis heute nicht vollends geklärt. Zum einen besitzt H₂S die Eigenschaft die mitochondriale Atmungskette durch Hemmung der Cytochrom C Oxidase zu blockieren [26, 32, 65, 97, 98]. Ein Mechanismus, der auch für toxische Effekte von H₂S

verantwortlich gemacht wird [65]. Diesem Effekt wird in der Literatur bei der Auslösung einer "Suspended Animation" große Bedeutung zugeschrieben [16, 111, 135].

1.2.3 ZYTOPROTEKTION

Besonders in Ischämie-Reperfusions- (I/R-) Modellen der Lunge [41], der Leber [62], der Niere [132] und vor allem des Herzens [33, 56, 63, 64, 78, 118, 119, 162] wurden zytoprotektive Effekte von H₂S beschrieben. Die zugrunde liegenden Ursachen sind vermutlich vielfältig: Zum einen trägt Sulfid-Gabe zur gesteigerten Effizienz von Komplex I und II der inneren Mitochondrien-Membran sowie zur Aufrechterhaltung von Funktion und Struktur der Mitochondrien bei [33].

Auch die anti-apoptotische Wirkung ist vermutlich ein wichtiger Mechanismus der H₂Sinduzierten Zytoprotektion [36]. So wurde neben der verminderten Anzahl apoptotischer Zellen in der Histologie [36] auch eine verminderte Aktivität von cleaved Caspase 9 [118], Caspase 3 bzw. cleaved Caspase 3 [33, 119], eine vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen [17, 20], anti-apoptotischem Bcl-2 [118] und Bcl-xL [20], sowie eine Inaktivierung von pro-apoptotischem Bad [20], in *Abbildung 2* dargestellt, beschrieben. Es wird jedoch auch eine pro-apoptotische Wirkung von H₂S diskutiert [10, 91, 152].

Zum anderen erhöht Sulfid die Produktion endogener Antioxidantien [20, 66]. Dabei kommt wohl insbesondere der Induktion des Stressproteins HO-1 (Haemoxigenase-1) besondere Bedeutung zu [102, 109]. HO-1 wird neben seiner anti-oxidativen Funktion [112] sowohl zytoprotektive als auch anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben [102]. Die Expression von HO-1 steht dabei in engem Zusammenhang mit der Regulation des Transkriptionsfaktors NF-κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) [102] und wird unter Stressbedingungen vermehrt exprimiert [112]. Des Weiteren besitzt Schwefelwasserstoff aufgrund seiner reaktiven SH-Gruppe auch die Möglichkeit, durch Reduktion der Disulfidbrücken freie Radikale wie z.B. Peroxynitrit [144], Hypochlorit [145, 74], Superoxid [22, 41, 44] und Wasserstoffperoxid [22, 44] zu binden und zu eliminieren. H₂S wird anti-oxidative Funktion zugeschrieben, was auch eine mögliche Ursache der zytoprotektiven Wirkung darstellt [35, 41, 44, 66]. Auch der vasodilatatorischen Funktion von H₂S wird mit den zytoprotektiven Eigenschaften in Verbindung gebracht [138]. Obwohl die potentiell zytoprotektiven Effekte von H₂S also

vielfältig erscheinen bestehen weiterhin Zweifel ob und in welcher Dosierung oder Darreichungsform eine zytoprotektive Wirkung von Schwefelwasserstoff zu erreichen ist.

1.2.4 VASODILATATION

Im Allgemeinen wird Schwefelwasserstoff, wie den anderen gasförmigen Transmittern NO und CO auch, vasodilatative Eigenschaften zugeschrieben [4, 23, 31, 37, 53, 72, 84, 116, 127, 129, 160]. Jedoch wurden auch vereinzelt direkte oder indirekte vasokonstriktive Effekte durch H₂S beschrieben [4, 31, 70, 71, 103]. Diese Wirkung scheint allerdings von vielen Faktoren abhängig zu sein, wie z.B. von der lokalen Sauerstoffkonzentration [70, 117], der Art des Gefäßsystems (venös vs. arteriell) [103] oder der Konzentration von H₂S [4, 143]. Der zugrunde liegende Mechanismus beruht vermutlich zum einen auf der zuvor genannten Fähigkeit der direkten Öffnung von K⁺_{ATP}-Kanälen der glatten Gefäßmuskulatur [70, 71, 84, 93, 143, 160], was die Abmilderung dieses Effekts durch Glibenclamid erklärt [160], zum anderen auf dem weitaus komplexeren Zusammenspiel und der Regulation der zwei anderen gasförmigen Transmitter CO und vor allem NO, dessen vasodilatative Eigenschaften die von CO und H₂S bei weitem übertreffen [4, 53, 82].

Des Weiteren hat Sulfid die Fähigkeit ACE ("Angiotensin-Converting-Enzyme") in humanen Endothelzellen direkt zu hemmen [73], die Öffnung von spannungsabhängigen Calciumkanälen zu blockieren [123] und Veränderungen im intrazellulären pH-Wert der glatten Gefäßmuskulatur zu bewirken [77].

1.2.5 LOKALE UND SYSTEMISCHE IMMUNREAKTION

Die Wirkung von Schwefelwasserstoff auf die Entzündungsreaktion wird nach wie vor kontrovers diskutiert, weshalb sich diese Arbeit zu einem wesentlichen Teil mit der Fragestellung der pro- und antiinflammatorischen Wirkung von Schwefelwasserstoff beschäftigt. Es wird in zahlreichen Publikationen ein anti-inflammatorischer Effekt von H₂S beschrieben [5, 13, 33, 35, 36, 37, 43, 55, 102, 115, 137, 153]: So zeigte sich nach Sulfid-Gabe ein verminderter Anstieg pro-inflammatorischer Mediatoren wie IL-1ß [33, 36], IL-6 und verschiedener Chemokine [6] im Sinne einer abgeschwächten Entzündungsreaktion, sowie eine Hemmung der Leukozyten-Endothel-Interaktion und Transmigration [5, 33, 36, 115, 118, 153]. Außerdem zeigte sich eine Inhibition der NF-κB-Aktivität im Ischämie-Reperfusionsversuch [118] sowie nach LPS (Lipopolysaccharid)-Gabe

in vivo [83] und in vitro [102], was als abgeschwächte Entzündungsreaktion gewertet wurde.

Im Gegensatz dazu wird Schwefelwasserstoff andererseits jedoch auch eine proinflammatorische Funktion zugeschrieben [12, 14, 25, 81, 93, 126, 131, 154, 155, 156, 157, 158]: So zeigte sich durch Hemmung der CSE-vermittelten endogenen H₂S-Synthese durch PAG (DL-Propargylglyzin) [142] eine Reduktion von Gewebeschäden, eine verminderte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie eine Hemmung der Myeloperoxidase-Aktivität in Lunge und Leber. Des Weiteren wurde durch PAG-Gabe eine verminderte Leukozytenaktivierung und Transmigration im Rahmen einer LPS-induzierten Endotoxämie [81, 25] bzw. einer "cecal ligation and puncture" (CLP) induzierten Sepsis beschrieben [155, 157, 158]. Die Gabe eines H₂S Donors wie NaHS äußerte sich entsprechend in einer verstärkten systemischen Entzündungsreaktion [158, 157, 154]. Es konnte außerdem eine erhöhte endogene H₂S-Synthese im Tiermodell eines septischen Schocks [81], hämorrhagischen Schocks [93], sowie im tierischen Entzündungsmodell [14] nachgewiesen werden.

Auch in diesem Kontext scheint der Art der Dosierung, Applikation und Darreichungsform eine entscheidende Bedeutung zuzukommen: In niedriger Konzentration wurde antiinflammatorische Wirkung beschrieben [83], während hochdosiertes H₂S die Entzündungsreaktion förderte [81]. Inhalativ verabreichtes H₂S-Gas verursachte Lungenschäden im Ischämie-Reperfusionsversuch [120], während intravenöse Sulfid-Therapie die durch Feuer- und Rauchinhalation hervorgerufenen Schäden im Lungengewebe abmilderte [35]. Bisher gelang also noch kein Nachweis, unter welchen Konditionen ein pro- oder antiinflammatorischen Effekt durch Schwefelwasserstoff-Gabe zu erreichen ist.

1.3 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Die teils konträren Aussagen bezüglich der Auswirkungen einer Sulfid-Therapie unter *normothermen* Bedingungen, ohne eventuelle Maskierung durch Hypothermie-Effekte [51, 122], lassen bisher keine sicheren Rückschlüsse auf die alleinige Wirkung von H₂S ziehen. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb versucht, die Auswirkungen der Na₂S-Therapie ohne den Confounding-Faktor einer Hypothermie aufzuzeigen. Ein weiterer

Fokus der Arbeit soll auf den Daten der intensivmedizinischen Versorgung nach stumpfem Thoraxtrauma, wie z.B. der Vitalparameter und Beatmungsindizes sowie deren Beeinflussung durch H₂S, liegen.

So stellen sich im Wesentlichen folgende Fragen:

- Welche Konsequenzen hat die i.v. Applikation von Na₂S auf Vitalparameter und Beatmung im Rahmen der intensivmedizinischen Versorgung von Mäusen nach isoliertem Thoraxtrauma?
- Welche Auswirkungen hat die i.v. Sulfid-Therapie auf die Immunreaktion von *normothermen* Mäusen nach stumpfem Thoraxtrauma?
- Sind die bisher beschriebenen Effekte von H₂S wie zytoprotektive Wirkung und die Induktion eines "Suspended-Animation"-ähnlichen Zustands auch bei normothermen Mäusen nach Thoraxtrauma zu beobachten?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 VERSUCHSTIERE

Für die geplanten Versuche wurden insgesamt 36 männliche 10-16 Wochen alte C57BL/6J Wildtyp-Mäuse mit einem Gewicht von 23-30 g herangezogen (Bezug: Charles Rivers). Die Mäuse wurden im Tierforschungsbereich Safranberg des Tierforschungszentrums der Universität Ulm gehalten bis sie für die Versuche in das Labor transportiert wurden. Die Gruppenzuteilung erfolgte randomisiert (Kontrolloperation: n = 16 Mäuse, Thoraxtrauma: n = 20 Mäuse; davon erhielt je die Hälfte eine Sulfid-Behandlung, die andere Hälfte eine Applikation von Vehikel-Lösung).

2.2 TIERANTRAG

Alle erforderlichen Anträge für die Durchführung der Versuche an den oben genannten Mäusen wurden sowohl von den Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm als auch von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums in Tübingen genehmigt. Entsprechend der Richtlinien des Tierschutzgesetzes wurden die Mäuse artgerecht gehalten, gepflegt, für den Versuch vorbereitet und medikamentös behandelt. Dabei hatten sie freien Zugang zu Nahrung und Flüssigkeit ad libidum.

2.3 "Blunt-Chest-Trauma Modell" der Maus

Das stumpfe Thoraxtrauma am Modell der Maus wurde, wie im bereits von Jaffin et al. etablierten und durch Knöferl et al. modifizierten Modell [59, 60, 68], durch einen Druckwellengenerator (eigene Herstellung, Wissenschaftliche Werkstatt Feinwerkmechanik, Universität Ulm, Oberer Eselsberg, Ulm) ausgelöst. Dadurch war es Thoraxtrauma ohne knöcherne abdominelle möglich, ein isoliertes und Begleitverletzungen zu bewirken. Der Druckwellengenerator besteht aus zwei Zylindern: der obere Zylinder ist dabei, getrennt durch ein elektronisch auslösbares Hochgeschwindigkeitsventil (Hee-D-24, Festo, Esslingen, Deutschland) und einen Druckminderer (Flaschendruckminderer Zinser, Ebersbach, Deutschland), mit einer

Druckluftgasflasche (MIT, Esslingen, Deutschland) verbunden. Der untere Zylinder wurde in einem Abstand von 1,9 cm über dem zuvor markierten Xyphoid der Maus platziert. Getrennt sind die beiden Zylindern durch eine Polyestermembran (Du Pont de Nemur, Bad Homburg, Deutschland), die bei einem Druck von 13 bar berstet und somit die definierte Druckwelle erzeugt, die zur Auslösung des Traumas benötigt wird und die beim Auftreffen auf den Thorax der Maus noch einen Druckpegel von ca. 1 bar erreicht. Dadurch wurde eine isolierte Lungenkontusion ausgelöst.



ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHER AUFBAU DES DRUCKWELLENGENERATORS UND FOTO DER VERSUCHSVORBEREITUNG: Durch den Überdruck einer Gasflasche mit komprimierter Luft wurde über verschiedene Druckregulationsventile und -kontrollen letztlich eine Polyestermembran zwischen oberer und unterer Kammer zum Bersten gebracht, so dass eine Druckwelle mit dem erforderlichen Druck von ca. 1 bar (bei Auftreffen auf den Thorax der Maus) entstand (a). Die Maus ist fixiert und die untere Kammer 1,9 cm über dem Xyphoid der Maus platziert. Die Verabreichung des Gas-Narkosegemischs erfolgt unter einer Glashaube (b).

Um eine Schmerzfreiheit und maximal mögliche Stressreduktion der Maus zu gewährleisten, erfolgte die prätraumatische Narkoseeinleitung mit einem Gemisch aus 2.5 Vol% Sevofluran (Sevorane, Abbott, Wiesbaden, Germany) in 50% O₂ und 50% Luft (Flow: 1 l/min), sowie die intraperitoneale Injektion von 1 μ g · g⁻¹ Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma, Grünethal, Deutschland). Nach dem Thoraxtrauma erhielten die Tiere i.p. 95 μ g · g⁻¹ Ketamin (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland), 0.9 μ g · g⁻¹ Midazolam (Dormicum[®], Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und wurden zur Aufrechterhaltung der Temperatur auf einer Wärmeplatte fixiert. Je nach Gruppenzugehörigkeit erfolgte post-traumatisch die Injektion eines Na₂S-Bolus (Sulfid, 1.3 nmol · g⁻¹ ≈ 0.05 μ g · g⁻¹, Ikaria Inc, Seattle, WA) in die Penisvene bzw. einer kristalloiden

Vehikel-Lösung bei den Tieren ohne therapeutische Intervention. Zur Herstellung der Na₂S-Lösung durch die Firma *Ikaria* durchströmte gasförmiges H₂S eine flüssige Lösung aus NaOH und Salz (pH neutral, iso-osmolar) [33, 35]. In wässriger Lösung und bei physiologischem pH-Wert liegt Sulfid hauptsächlich in Form von Hydrosulfid-Anion (HS⁻) vor [90, 125]. Die Dosierung wurde bewusst so gewählt, da sich in früheren Studien bei dieser Dosierung ein maximal zytoprotektiver Effekt zeigte [33, 35].



ABBILDUNG 4: ZEITLICHER ABLAUF DES VERSUCHSAUFBAUS: Nach Narkoseeinleitung durch ein Sevofluran-Stickstoffgemisch sowie ausreichender Analgesie durch Buprenorphin erfolgte das Thoraxtrauma mittels Druckwellengenerator (*Abbildung 3*). Anschließend erfolgten die Instrumentierung sowie die intensivmedizinische Versorgung mit Gabe von Volumenersatz und, je nach Gruppenzugehörigkeit, Na₂S-Gabe über Perfussoren. Die Narkose wurde währenddessen durch intraperitoneale Applikation von Ketamin und Fentanyl aufrechterhalten. Für die spätere Auswertung ergaben sich insgesamt 2 Messzeitpunkte (Beginn, Ende). Nach vier Stunden erfolgte die Exsanguation durch terminale Blutentnahme. MICU: "Mice Intensive Care Unit", Na₂S: Sulfid

2.4 MOUSE INTENSIVE CARE UNIT (MICU)

Unmittelbar nach Auslösung des Thoraxtraumas begann die Vorbereitung des invasiven und nichtinvasiven Monitorings. Dabei wurde ab dem Zeitpunkt der Narkoseeinleitung bis zum Beginn der intensivmedizinischen Betreuung ein Zeitraum von 15 min. nicht überschritten. Eine konstante Körperkerntemperatur von 37-38°C wurde durch die Kombination einer Wärmematte und -lampe (TKM-0902 temperature Control, FMI, Seeheim/Oberbeerbach, Deutschland) mittels Feedback-Regulation durch Erfassung der Körperkerntemperatur (Rektalthermometer FMI, Seeheim/Ober-Beerbach, Deutschland) gewährleistet. Es erfolgte ein Halsschnitt mit Freilegung der Trachea, rechter Vena jugularis interna und rechter Arteria carotis. Nach anschließender Intubation (Intubationsschlauch: Selbstherstellung aus Kanüle 18 GA, B. Braun, Melsungen, Deutschland und Schlauch: Silcone tubing, VWR International, Darmstadt, Deutschland) konnte die lungenprotektive Beatmung mittels Respirator (Kleintier-Respirator FlexiVent, Scireq, Montreal, Kanada) begonnen werden. Die Einstellungen des Respirators (s. *Tabelle* 1) wurden bewusst gewählt, um beatmungsinduzierte Lungenschäden so effektiv wie möglich zu vermeiden.

TABELLE 1: EINSTELLUNG DES RESPIRATORS: Nach primärer Lungenblähung mit 18 cmH₂O für 5 Sekunden wurden die Mäuse mit einer Frequenz von 150 \cdot min⁻¹ (Anpassung nach pCO₂) und einem Tidalvolumen (V_T) von 8 μ L \cdot g⁻¹ bei einem inspiratorischen Sauerstoffgehalt (FiO₂) von 50% und einem Verhältnis Inspiration zu Exspiration (I:E) von 1:2. beatmet Der PEEP ("positive end-exspiratory pressure", positiver end-exspiratorischer Druck) wurde dem Quotienten aus PaO₂ und FiO₂ angepasst.

Parameter	Einstellung am Respirator
Blähung der Lunge	18 cm H₂O für 5 Sekunden
FiO ₂	0,5
V _T	8 μL \cdot g ⁻¹ (Anpassung nach pCO ₂ , Ziel: 30-40 mmHg)
Atemfrequenz	150 · min ⁻¹
I:E	1:2
PEEP	5 cmH ₂ O (Anpassung nach PaO ₂ · FiO ₂ ⁻¹ , Ziel 100-200 mmHg)

Die Narkose wurde durch kontinuierliche Infusion eines Narkosegemischs (100-150 μ g · g⁻¹ · h⁻¹ Ketamin und 1–1.5 μ g · g⁻¹ · h⁻¹ Fentanyl) über einen zentralvenösen Zugang (Selbstherstellung aus Kanüle 30 GA ½ und Schlauch BD Microlance, Heidelberg, Deutschland; Bohlender, Grünsfeld, Deutschland) in der Vena jugularis interna dextra aufrechterhalten. Zusätzlich wurde eine balancierte kolloidale Volumenersatzlösung (130/0,42, Vitafusal 6%; Serumwerk, Bernburg, Deutschland) mit Laufgeschwindigkeiten von 0.5-0.7 ml \cdot h⁻¹ durch Perfusoren substituiert, um in allen Gruppen einen mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) von >55 mmHg zu gewährleisten. Je nach Gruppenzugehörigkeit erfolgte zudem eine kontinuierliche Infusion von 6 nmol $\cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ $(\approx 0.2 \ \mu g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1})$ Sulfid (Ikaria Inc, Seattle, WA). Die Dosierung wurde ebenfalls bewusst gewählt, da durch Szabo et al. in dieser Dosis eine verminderte Konzentration proinflammatorisch wirkender Zytokine im Serum beschrieben wurde [125]. Für das invasive Monitoring wurde zur kontinuierlichen Erfassung der Herzfrequenz, des Blutdrucks (Brückenmessverstärker MIO-0501 DC-Bridge Amplifier, Firma FMI Deutschland, Seeheim), sowie zur stündlichen Entnahme von ca. 75 µl Blut zur Bestimmung des Säurebasenstatus und der Gaspartialdrücke durch arterielle Blutgasanalysen, die Arteria carotis communis dextra kanüliert. Die Beatmungsfrequenz wurde den Werten des arteriellen pCO₂ (Zielwert zwischen 30–40 mmHg), der PEEP dem arteriellen pO₂ angepasst (bei Werten von $P_AO_2 \cdot F_iO_2^{-1} > 300$ mmHg: Reduktion des PEEPs auf 3 cm H₂O;

wenn 100 mmHg < $P_AO_2 \cdot F_iO_2^{-1}$ < 200 mmHg: Erhöhung des PEEPs auf 8 cmH₂O). Die Ableitung des Urins erfolgte über die Anlage eines Blasenkatheters.

Die Gruppe der Kontrolleingriffe unterlief ebenfalls die komplette Instrumentierung und wurde nach den gleichen Vorgaben lungenschonend beatmet, wodurch auch die Mäuse mit Kontrolleingriff durch Intubation und Beatmung ebenfalls ein gewisses Trauma erlitten [69, 99] und deshalb als Referenzgruppen eine isolierte Betrachtung der Folgen des Thoraxtraumas, besonders im Rahmen der Regulation inflammatorischer Prozesse und der Apoptose, ermöglichen. Während der gesamten Dauer der Beatmung wurden jene Parameter der Lungenmechanik (Compliance und Beatmungs-Spitzendrücke) auch beim Menschen Durchführung einer automatisch registriert, die zur lungenprotektiven Beatmung herangezogen werden. Die intensivmedizinische Versorgung dauerte vier Stunden an. Es wurden zwei Messzeitpunkte, je zu Beginn und Ende des Versuchs, gewählt. Die anschließende Euthanasierung erfolgte mittels terminaler Blutentnahme.



ABBILDUNG 5: INSTRUMENTIERUNG DER MAUS: Foto und schematische Darstellung der post-traumatischen Versorgung und Instrumentierung durch Anlage eines zentralvenösen Zugangs in die Vena jugularis dextra (1), Intubation der Trachea (2), Kanülierung der Arteria carotis communis dextra (3), sowie Ableitung des Harns über Blasenkatheter (4) und rektale Temperaturmessung über Temperatur-Sonde (5).

2.5 MATERIALGEWINNUNG UND AUFBEREITUNG

Die Gewinnung von Plasma aus Blut erfolgte durch terminale Blutentnahme am Versuchsende und anschließender Zentrifugation bei 4°C mit 10.000 G für 10 Minuten (Eppendorf Centrifuge 5424 R). Das so gewonnene Plasma wurde unverzüglich bei -80°C kältekonserviert. Zur Beurteilung der lokal pulmonalen Auswirkungen des Thoraxtraumas und deren Modulation durch Na₂S, wurde nach sofortiger postmortaler Eröffnung der Brusthöhle zudem die Lunge entnommen und das Nassgewicht der Lunge bestimmt. Die *rechte* Lunge wurde unverzüglich zur Durchführung der Immunoblots und EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) in flüssigem Stickstoff gefroren und ebenfalls sofort bei -80°C kältekonserviert. Die *linke* Lunge wurde zur histologischen und immunhistochemischen Beurteilung in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Dies geschah in der Abteilung für Pathologie der Universitätsklinik UIm.

Die Aufbereitung erfolgte später aus dem so gewonnenen Lungengewebe durch Zugabe von 200-300 µl PBS (# 10010-015, Invitrogen, Auckland, Neuseeland) und anschließender Homogenisierung mit Ultra-Turrax T25 (Janke & Kunkel IKA Labortechnik). Durch Zugabe von 2x Lysepuffer (50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, ad 250 ml H_2O) und Proteinaseinhibitor zum Homogenisat-PBS-Gemisch wurden die Zellen lysiert und nach mehrfachem durchmischen bei 4°C und 20.000 G (Eppendorf Centrifuge 5424 R) für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, der alle Zytoplasma-Bestandteile und Proteine enthielt, wurde abpipettiert, aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren. Die anschließende Proteinbestimmung des Gesamtzelllysats fand photometrisch statt. Das Prinzip der photometrischen Proteinbestimmung beruht auf der Beobachtung, dass das Licht-Absorptionsspektrum einer sauren Lösung (Coomassie Brilliant Blue G-250) nach Proteinbindung von ursprünglich 465 nm auf 595 nm verschoben wird. In diesem Wellenlängenbereich ist die Amplitude der Absorption der Menge an gelöstem Protein in einem großen Bereich direkt proportional. Mit Hilfe des Bio-Rad Protein-Assays (500-0006)Bio-Rad, München, Deutschland) ist es somit möglich, die Proteinkonzentration einer unbekannten Lösung zu ermitteln und eine Lösung mit definierter Proteinkonzentration herzustellen. Das Gesamtzelllysat wurde unter Zugabe von EMSA Puffer auf eine Konzentration von 10 μ g / 5 μ l eingestellt bei einem Toleranzbereich von +/- 5% (GeneQuant pro RNA/DNA Calculator).

2.6 WESTERN BLOT

TABELLE 2: **HERSTELLUNG DER BENÖTIGTEN LÖSUNGEN UND GELE:** Die für die Western-Blots benötigten Lösungen und Gele wurden nach den unten aufgeführten Angaben hergestellt. SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, H₂O: reines Wasser, TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Tris: Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, HCI: Salzsäure, NaCI: Natriumchlorid, TBS: Tris buffered Saline, BSA: Bovines Serum-Albumin

Lösung / Gel	Zusammensetzung	Hersteller	
SDS-PAGE-Gel 10%	Sammelgel für 6 Gele		
(bcl-xL, IκB-α, HO-1)	3 ml Polyacrylamid	# 10687, Serva, Heidelberg, Deutschland	
	5 ml Sammelgel-Puffer	eigene Herstellung (s.u.)	
	11.78 ml H ₂ O		
	200 μL 10% Ammonium- Persulfat	# A7460-100G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
	20 μL TEMED	# 87689, Fluka Biochemika, Sigma- Aldrich, St. Louis, USA	
	Trenngel für 6 Gele		
	13.3 ml Polyacrylamid	# 10687, Serva, Heidelberg, Deutschland	
	10 ml Trenngel-Puffer	eigene Herstellung (s.u.)	
	16,48 ml H ₂ O		
	200 μL 10% Ammonium- Persulfat	# A7460-100G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
	20 μL TEMED	# 87689, Fluka Biochemika, Sigma- Aldrich, St. Louis, USA	
SDS-PAGE-Gel 15%	Sammelgel für 6 Gele		
(pBad)	3 ml Polyacrylamid	# 10687, Serva, Heidelberg, Deutschland	
	5 ml Sammelgel-Puffer	eigene Herstellung (s.u.)	
	11.78 ml H ₂ O		
	200 μL 10% Ammonium- Persulfat	# A7460-100G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
	20 μL TEMED	# 87689, Fluka Biochemika, Sigma- Aldrich, St. Louis, USA	
	Trenngel für 6 Gele		
	20 ml Polyacrylamid	# 10687, Serva, Heidelberg, Deutschland	
	10 ml Trenngel-Puffer	eigene Herstellung (s.u.)	
	9.78 ml H ₂ O		
	200 μL 10% Ammonium- Persulfat	# A7460-100G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
	20 μL TEMED	# 87689, Fluka Biochemika, Sigma- Aldrich, St. Louis, USA	
Sammelgel-Puffer	30.28 g Tris-Base	# 75825, USB Corporation, OH, USA	
	2 g SDS	SDS: # CN30.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	

	ad 500 ml H ₂ O	
	mit HCl auf pH 6.8 einstellen	# 1.09060.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland
Trenngel-Puffer	90.85 g Tris-Base	# 75825, USB Corporation, OH, USA
	2 g SDS	# CN30.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	ad 500 ml H ₂ O	
	mit HCl auf pH 8.8 einstellen	
"Sample Buffer"	6 g SDS	# CN30.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	12.5 ml Tris	# 75825, USB Corporation, OH, USA
	10 ml Bromphenol-Blau	# B8026, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	20 g Glycerol	# 7530.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	8 ml 2-Mercaptoethanol	# 63689, Fluka, Pasching, Österreich
	ad 100 ml H ₂ O	
	mit HCl auf pH 6.8 einstellen	# 1.09060.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland
10x TBS (Tris buffered Saline) pH = 7.6	24.2 g Tris Base pH 7,6	# 75825, USB Corporation, OH, USA
	80 g NaCl	# 31434-1KG-R, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	950 ml H₂O	
	mit HCl auf pH 7.6 einstellen	# 1.09060.1000, Merck, Darmstadt, Deutschland
	ad 1l H ₂ O	
1x TBS (Tris buffered Saline)	100 ml 10x TBS pH = 7.6	eigene Herstellung (s.o.)
	ad 1l H ₂ O	
Waschpuffer (1x TBS-T 0,1%)	100 ml 10x TBS pH 7.6	eigene Herstellung (s.o.)
	1 ml Tween	# P137-9, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	ad 1l H ₂ O	
10x Laufpuffer	712.2 g Glycin	# 33226, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	151.4 g Tris-Base pH 7,6	# 75825, USB Corporation, OH, USA
	50 g SDS	# CN30.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	ad 5I H ₂ O	
Blockier- Lösung	5 g Milchpulver	Milchpulver Blotting grade, Roth, T145.2
	5 g BSA (Bovines Serum- Albumin) - Pulver	# K41-001, PAA, Pasching, Österreich
	50 ml 10x TBS pH 7,6	eigene Herstellung (s.o.)
	500 μL Tween	# P137-9, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	ad 500 ml H ₂ O	

Milch (5%)	25 g Milchpulver	Milchpulver Blotting grade, Roth, T145.2	
	50 ml 10x TBS	eigene Herstellung (s.o.)	
	500 μL Tween	# P137-9, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
	ad 500 ml H ₂ O		
10x Transfer Puffer (Blotting-Puffer)	1454 g Tris-Base pH 7,6	# 75825, USB Corporation, OH, USA	
	713 g Glycin	# 33226, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
	92.5 g SDS	# CN30.2, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland	
	ad 5I H ₂ O		
1x Transfer Puffer (Blotting-Puffer)	100 ml 10x Blotting-Puffer	eigene Herstellung (s.o.)	
	200 ml Methanol	# 32213, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
	ad 1l H ₂ 0		
Erst-Antikörper Lösung	5 g BSA (Bovines Serum- Albumin) - Pulver	# K41-001, PAA, Pasching, Österreich	
	90 ml H₂O		
	10 ml 10x TBS	eigene Herstellung (s.o.)	
	100 μL Tween	# P137-9, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	

Der Nachweismethode zugrunde liegt die Eigenschaft von Proteinen, bei einer Gel-Elektrophorese eine Trägermatrix unterschiedlich schnell zu durchlaufen. Dabei wandern die Proteine entsprechend ihrer molaren Masse, Ladung und anderer physikalischer Eigenschaften in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. So lassen sich die unterschiedlichen Proteine auftrennen und durch verschiedene Markierungsmethoden differenziert darstellen. Zur Bestimmung der Marker bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large), HO-1 (Häm-Oxygenase-1), $I\kappa B - \alpha$ (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha) und *pBad* (phosphorylierte Form des Bcl-2-associated death promoter) wurden die Western Blots nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach Herstellung der Gele (siehe Tabelle 2) wurden die Taschen mit den aufbereiteten und gekochten (mit MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler) Gewebeproben (5-20 µl), Gewebe von Nativtieren als Referenz, einer antikörperabhängigen Positivkontrolle (Lungenalveolarmakrophagen aus Zellkultur, stimuliert durch LPS / Staurosporin / Peroxinitrit) und einem Farbmarker (Bio-Rad Precision Plus Protein Standards, München, Deutschland) mittels Hamilton Pipette beladen. Die Auftrennung der Proteine fand in einer mit Laufpuffer gefüllten Gelelektrophoresekammer (Bio-Rad Mini PROTEAN Tetra

System, mit Bio-Rad Power PAC-3000, München, Deutschland) statt. Anschließend erfolgte die Übertragung auf Nitro-Zellulose-Membran (# 162-0115, Bio-Rad Trans-Blot Transfer Medium 0,45 µm, München, Deutschland). Dabei wurde das Gel zwischen Blotting-Puffer getränkten Filterpapieren (# 3030690, Whatman, Kent, England) im Blotting Gerät (Bio-Rad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, München, Deutschland) für 60 Minuten bei 20 Volt und 0,6 – 0,7 Ampere elektrotransferiert. Nach unspezifischer Protein-Anfärbung mit Ponceau-Lösung (Ponceau S Solution, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurde die Nitro-Zellulose-Membran in antikörperspezifischer Blockierlösung für eine Stunde blockiert um unspezifische Bindungen zu verhindern und anschließend dreimal je fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden Erstantikörpern (siehe Tabelle 3) in Erstantikörperlösung (siehe Tabelle 2) bei 4°C auf einem Wiegetisch. Nach dreimaligem Waschen wurde zur Markierung des Erstantikörpers ein speziesspezifischer Zweitantikörper (# SC2004, Rabbit Santa-Cruz, CA, USA) 1:15.000 mit Blockierlösung bzw. Milch verdünnt und die Nitro-Zellulose für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wiegetisch inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Zweitantikörperlösung für je fünf Minuten mit Waschpuffer und TBS-Lösung konnte die Nitro-Zellulose für weitere fünf Minuten in Entwicklersubstanz (# 34095, Thermo Scientific SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Rockford, USA) getaucht und anschließend nach kurzem Abwaschen mit destilliertem H₂O in der Entwicklerkasette platziert werden. Die Dauer der Filmexposition (# 2012.11, Agfa Medical X-Ray, Agfa, Mortsel, Belgien) wurde den verschiedenen Antikörpern angepasst. Die Entwicklung erfolgte in der institutseigenen Dunkelkammer des Fotolabors (Optimax 2010, Protec GmbH, Oberstenfeld, Deutschland). Die Filme wurden mit einem kommerziellen Scanner digitalisiert und die Intensität der Banden in Relation zu den Nativtieren, die weder Trauma, Instrumentierung noch intensivmedizinische Versorgung sowie Beatmung erhielten, als Vergleichsgruppe mit NIH ImageJ (http://rsb.info.nih.gov/nih-image) Software ausgewertet.

TABELLE 3: VERWENDETE ANTIKÖRPER: Die Antikörper wurden nach Herstellerangaben verarbeitet und verwendet. *bcl-xL*: B-cell lymphoma-extra large *HO-1*: Häm-Oxygenase-1, , $I\kappa B-\alpha$: Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha, *pBad*: phosphorylierte Form des Bcl-2-associated death promoter

Antikörper	Verdünnung	Herstellerangaben / Bezug	Zweit-Antikörper
Bcl-xL	1:1000 in 5% Milch	#2764, Cell Signalling Technology, Danvers, USA	#sc-2004, Santa Cruz, Santa Cruz, USA
HO-1	1:2000 in Erstantikörperlösung	#1922-1, Epitomics, Burlingame, USA	#sc-2004, Santa Cruz, Santa Cruz, USA
ΙκΒ-α	1:2500 in Erstantikörperlösung	#sc-371, Santa Cruz, Santa Cruz, USA	#sc-2004, Santa Cruz, Santa Cruz, USA
pBad	1:500 in Erstantikörperlösung	#5286, Cell Signalling Technology, Danvers, USA	#sc-2004, Santa Cruz, Santa Cruz, USA

2.7 ZYTOKIN-ASSAY

Die Konzentrationen von Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-6 und -10 im Plasma wurden mittels "Mouse Multiplex Cytokine Kit" (Bio-Plex Pro Cytokine Assay, Bio-Rad, Hercules, CA) bestimmt und durch das "Bio-Plex Suspension Array System" nach Herstellerangaben analysiert: dazu wurden die Proben mit passenden Zytokin-Standards auf einen Filter aufgetragen und mit magnetischen Fluoreszenz-Beads inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Detektions-Antikörpern und darauffolgend Streptavidin-Phycoerythrin. Die Quantifikation der Zytokinreaktion wurde mit Hilfe des "Bio-Plex Protein Array Reader" durchgeführt. Dadurch ist es möglich, gleichzeitig unterschiedliche Zytokine in einer Probe zu bestimmen. Es erfolgte die automatisierte Verarbeitung und Analyse der Daten durch Bio-Plex Manager Software 4.1 (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) unter Verwendung der Standard-Kurve der rekombinanten Zytokin-Standards. Dabei wurden alle Konzentrationen unterhalb des Messbereichs als Null gewertet.

2.8 ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)

TABELLE 4: HERSTELLUNG DER BENÖTIGTEN LÖSUNGEN UND GELE FÜR EMSA: Die für die Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) benötigten Lösungen und Gele wurden nach den aufgeführten Angaben hergestellt. DTT: Dithiothreitol, NaCl: Natrium-Chlorid, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, BSA: Bovines Serum Albumin, Poly dI/dC: Polydeoxyinosinate / -deoxycytidylate, H₂O: Wasser, EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure, APS: Ammonium-Persulfat, TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Lösung / Gel	Zusammensetzung	Hersteller
10x EMSA Puffer	100 mM Tris-HCl pH 7.9	# 75825, USB Corporation, OH, USA
	500 mM NaCl	# 31434-1kg-R, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	10 mM EDTA	# 15575 Ultra Pure, Invitrogen, Auckland, Neuseeland
	10 mM DTT	# D/9779, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	20% Glycerol	# 7530.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
	5 g BSA (Bovines Serum-Albumin) - Pulver	# K41-001, PAA, Pasching, Österreich
Gelshift-Mix	50.000 cpm NF-кВ p65 Oligonukleotid	Biomers, Ulm, Deutschland
	0,5 μl 20 mM DTT	# D/9779, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	1µl 10x EMSA Puffer	eigene Herstellung (s.o.)
	1 μl Poly dl/dC	# 11219847001, Roche, Mannheim, Deutschland
	ad 10 μ l H ₂ O	
EMSA-Ansatz	10 μg Proteinüberstand	
	ad 5 μl 1x EMSA-Puffer	eigene Herstellung (s.o.)
	+ 5 μl Gelshift-Mix	eigene Herstellung (s.o.)
10x TBE	108 g Tris-Base	# 75825, USB Corporation, OH, USA
	55g Borsäure	#0055, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
	40 ml 0,5 M EDTA Lösung pH 8.0	# 15575 Ultra Pure, Invitrogen, Auckland, Neuseeland
	ad 1l H ₂ 0	
7%- Polyacrylamid Gel	5 ml 10x TBE	eigene Herstellung (s.o.)
	8.75 ml Polyacrylamid 40%	# 10687, Serva, Heidelberg, Deutschland
	50 μl TEMED	# 87689, Fluka Biochemika, Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
	500 μl APS	# A7460-100G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	36.25 ml H₂O	
Fixierlösung	15 % Methanol	# 32213, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	5 % Essigsäure	1.00063.1011, Merck, Darmstadt, Deutschland
	5 % Glycerol	# 7530.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

 $75 \% H_2O$

Durch Electrophoretic Mobility Shift Assay ist es möglich, Transkriptionsfaktoren wie z.B. den nukleären Transkriptions-Faktor (NF-) KB, der mit seiner spezifischen Sequenz an ein bestimmtes DNA-Motiv bindet, zu identifizieren. Die Methode macht sich zunutze, dass Komplexe aus DNA und sequenzspezifisch gekoppeltem, radioaktiv markiertem Protein nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Polacrylamid-Gel langsamer wandern als freie DNA. Zunächst erfolgte hierzu die radioaktive Markierung der Oligonukleotid-Sonde. Dabei wurden die Oligonukleotide, die die HIV-kB-Site (sense site: 5'-GGATCCTCAACA GAGGGGACTTTCCGAGGCCA-3') des NF-kB -repräsentieren, mit ihren entsprechend komplementären Oligonukleotiden (reverse: 5´-GGATCCTGGCCTCGGAAAGTCCCCTCT-GTTGA-3') aneinandergelagert. Dazu wurden die ursprünglichen Oligonukleotide $(1 \ \mu g \cdot \mu)^{-1}$ in 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) angelöst und jeweils 10 μ l der "sense-" bzw. "reverse" Oligonukleotid-Einzelstränge auf 100 μl mit destilliertem H₂O aufgefüllt. Nach zehnminütigem Erhitzen im Wasserbad auf 94°C kühlte die Mischung auf Raumtemperatur ab. Durch das Enzym T4-Polynukleotidkinase, das an freie OH-Gruppen am 5'-Ende der Oligonukleotide Phosphatgruppen überträgt, wurden die nun Oligonukleotide markiert, indem Phosphor (P) doppelsträngigen das in Adenosintriphosphat durch das radioaktive Isotop γ^{32} P ersetzt wurde. Dabei wurden 5 pmol Doppelstrang (ds-) NF-κB mit 5 μ l y ³²P-ATP, 1 μ l T4-Polynukleotidkinase (PNK), 2 μ l 10x PNK-Reaktions-Puffer und 11 µl Wasser versetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung durch "QIAquick Nucleotide Removal Kit" (Quiagen) nach Herstellerangaben. Darauffolgend wurden 10 μg Proteinlysat ad 5 μl mit EMSA-Puffer und 5 µl Gelshift-Mix (siehe Tabelle 4) vermischt. Dabei diente die Zugabe des synthetischen Kompetitors "poly-dl/dC" im Überschuss der Absättigung unerwünschter unspezifischer DNA-Bindungen. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Equilibrierung der Gele fand durch 30-minütigem Vorlauf (100 Volt) statt. Die Auftrennung erfolgte in 7% igem Polyacrylamid-Gel für 2h bei 200 Volt in 0.5x TBE-Laufpuffer. Nachdem das Gel für 30 Minuten fixiert (Fixierlösung, siehe Tabelle 4) und anschließend 10 Minuten in H₂O gewässert wurde, erfolgte die Trocknung auf Whatman-Papier bei 80°C über einen Zeitraum von einer Stunde im Vakuum-Geltrockner (Unigeldryer 3545 D, Montreal-Biotech, Dorval, Kanada). Nach der Trocknung

(Unigeldryer 3545 D) wurde ein Agfa Cronex-5-Film bei -80°C für 2-3 Tage exponiert, um Störungen zu vermeiden. Zur quantitativen Analyse des radioaktiv markierten NF-κB nach Auftrennung der Proteine wurde ein Phosphorimager (FLA-3000, Fuji-Film, Tokio, Japan) verwendet und mit Hilfe der Bildanalysesoftware AIDA Image Analyzer (Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland) ausgewertet. Dazu wurden die getrockneten Acrylamid-Gele über Nacht auf Imaging Plates exponiert. Durch Exposition gegenüber radioaktiv markierter Proteine, wurden die Elektronen in der Phosphor-Kristallstruktur der Bildplatte festgehalten und veränderten somit deren Absorptionsverhalten. Nach Stimulation des Elektrons mit einer Wellenlänge von ca. 600 nm durch Laser, wurde dieses Licht mit einer Wellenlänge von ca. 400 nm emittiert. Dies konnte nun detektiert und analysiert werden. Die gemessene Signalintensität wird in der Einheit PSL (photostimulierte Lumineszenz) angegeben und das Verhältnis der Intensität der Proben zu Gewebeproben von Nativtieren bestimmt, um die Vergleichbarkeit verschiedener Gele zu gewährleisten. Dementsprechend wird die NF-κB Aktivität hier als ein Vielfaches der Kontrollwerte angegeben.

2.9 IMMUNHISTOCHEMISCHE GEWEBEAUFBEREITUNG

Durch Immunhistochemie ist es möglich, Antigene im Gewebeschnitt lichtmikroskopisch nachzuweisen. Dabei ist auch eine Aussage darüber möglich, in welchem Kompartiment der Zelle sich das entsprechende Epitop befindet. Die Anfärbung des gesuchten Epitops wird durch die Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) erreicht. Dabei wird das Antigen durch einen Erst-Antikörper gebunden. Nach Zugabe eines speziesspezifischen biotinylierten Zweit-Antikörpers bindet dieser mit seinem Fab-Teil an die Fc-Bindungsstelle des Erst-Antikörpers. Anschließend bindet Streptavidin, an das eine alkalische Phosphatase kovalent gebunden ist, den biotinylierten Zweit-Antikörper. Nach Zugabe eines Chromagens ist das gefärbte Antigen zu identifizieren. Nach Entnahme der linken Lunge direkt nach Euthanasierung der Maus, wurde das Lungengewebe sofort auf -80°C gekühlt, um eine Gewebezerstörung zu vermeiden Die Fixierung in Formalin, Einbettung in Paraffin sowie die Anfertigung der Schnitte erfolgte im Institut für Pathologie Ulm (Albert-Einstein-Allee 23, 89070 Ulm). Um die Parafineinbettung zu ermöglichen, wurde das Präparat durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, der

Alkohol anschließend durch Xylol als Zwischenmedium entfernt und dieses letztlich durch heißes Paraffinwachs ersetzt. Der so entstandene Paraffinblock ermöglichte die Durchführung der Gewebeschnitte unter Aufrechterhaltung deren Struktur, sowie die Platzierung der Gewebeschnitte auf Adhäsionsobjektträgern (Super Frost Plus, Gerhard Menzel GmbH). Es erfolgte dann die Entparaffinisierung im Intermedium Xylol (# 28975.325, VWR Prolabo, Darmstadt, Deutschland) und die anschließende Re-Hydrierung in absteigender Ethanolreihe (2x 100% Ethanol für je 5 min., 90% Ethanol für 5 min, 70% Ethanol für 5 min, 40% Ethanol für 5 min). Nach Auswaschen des Ethanols durch reines H₂O für abermals 5 min., konnte eine hitzeinduzierte Antigen Demaskierung (HIER = Heat Induced Epitope Retrieval) durchgeführt werden. Dies ist notwendig, da sich durch die Formalinfixierung Aldehydvernetzungen im Gewebe gebildet haben und sich evtl. die Konformation des Antigens verändert haben könnte, welches somit "maskiert" wäre und der Erst-Antikörper nicht imstande wäre, das entsprechende Epitop zu binden. Möglich wird die Demaskierung z.B. durch Hitze, wie sie in einer haushaltsüblichen Mikrowelle (2x 5 min.) entsteht. Verbessert wird das Ergebnis und damit die Intensität der Färbung zusätzlich durch Verwendung von 10 mM Zitratpuffer pH 6.0 (# C0759-550G Cirtric acid, Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Nach erneutem Waschen in destilliertem H₂O und Spülen in TBS pH 8.0 wurde das Präparat durch Super PAP-Pen gegen Feuchtigkeit geschützt. Die 15-minütige Inkubation mit 10% igem Ziegenserum diente der Minimierung unspezifischer Hintergrundfärbung. Nun erfolgte die Inkubation des Präparats mit dem entsprechenden Erstantiköper (s. Tabelle 5) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Detektion des Erst-Antikörpers erfolgte mit Hilfe des Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse (Dako Denmark A/S Glostrup, Dänemark) nach Herstellerangaben. Letztlich wurde eine Kernfärbung mit Mayers Hämatoxylin (# 51275, Sigma, St. Louis, USA) als Gegenfärbung durchgeführt (s. 2.10 zur Erklärung der Methodik) und nach Waschen in H₂O eine Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (70% Ethanol für 2 min., 90% Ethanol für 2 min. 100% Ethanol für 4 min.) mit Überführung in Xylol (2 x 5 min.) durchgeführt.

TABELLE 5: VERWENDETE PRIMÄR-ANTIKÖRPER: Antikörper, Anwendung und Herstellerangaben wie in der Tabelle angegeben. TBS: Tris-buffered Saline, CBS: Cystathionin-β-Synthase, CSE: Cystathionin-γ Lyase

Erst-Antikörper	Herstellerangaben
Cleaved Caspase 3: 1:100 in TBS pH 8,0 mit 0.001% Tween 20 und 0.01% Ziegen-Serum	# 9661, Cell Signalling Technology. Inc., Danvers, USA
CBS : 1:100 in TBS pH 8,0 mit 0.001% Tween 20 und 0.01% Ziegen-Serum	# sc-100519, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
CSE: 1:100 in TBS pH 8,0 mit 0.001% Tween 20 und 0.01% Ziegen-Serum	# H00001491-M01, Abnova, Taipei City, Taiwan

Die Beurteilung der Chromogen-Rot-gefärbten Präparate erfolgte unter Verwendung eines Zeiss Axio Imager A1 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) mit 10x Objektiv (EC Plan-NEOFLUA, Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Mit Hilfe von AxioVision Software (rel. 4.8, Zeiss, Jena, Deutschland) wurden jeweils vier zufällig ausgewählte 800 µm² quadratische Bereiche nach ihrer Intensität und prozentualer immunoreaktiver Regionen beurteilt.

2.10 HISTOLOGIE

Die mikroskopische Beurteilung der pulmonalen Schädigung im Rahmen des Thoraxtraumas bzw. der Sulfid-Gabe erfolgte nach Hämatoxylin-Eosin- (HE-) Anfärbung. Die HE-Färbung stellt eine in der Pathologie gängige Doppelfärbung histologischer Schnitte dar. Nach Einbettung in Paraffin, Anfertigung der Schnitte und anschließender Überführung in wässriges Medium (s.o.) gelingt es somit, unterschiedliche Strukturen der Zelle darzustellen. Dabei färbt das basische *Hämatoxylin* bzw. *Hämalaun* die sauren zellulären Bestandteile, also vor allem das Chromatin des Zellkerns, *blau*, während der saure Farbstoff *Eosin* die basischen Zellbestandteile, vor allem Proteine im Zytoplasma, *rot* färbt. Nach primärer Hämatoxylin-Färbung und anschließender pH-Erhöhung durch Puffersubstanzen zur besseren farblichen Darstellung, erfolgt die Zweitfärbung in einer Eosin-Lösung. Nach anschließender Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe wird das Präparat in Xylol überführt und steht somit der mikroskopischen Begutachtung zur Verfügung. Diese fand nach Bereits etablierten Bewertungsmaßstäben [6, 36] statt. Dabei spiegelte sich das Ausmaß der Schädigung in Form von 1. Kollaps der Lungenalveolen, 2. Ödembildung, 3. Einwanderung von Leukozyten sowie Verdickung der Alveolarmembran wider. Diese Faktoren wurden auf einer Skala von 0 (normale Histologie ohne pathologisch sichtbare Veränderungen), über 0.5 (geringe histologisch feststellbare Schäden), 1 (leichte, herdförmige histologische Schädigung, <10%), 1.5 (deutliche histologische Veränderungen, von dem jedoch weniger als 25% des Lungengewebes betroffen ist), bis 2 (größerer histologischer Schaden, von dem 25-50% des Lungengewebes betroffen ist) beurteilt. Die sich aus diesen Einzelwerten ergebende Summe stellt den histologischen Gesamt-Score ("Total Lung Injury Score") dar.

2.11 SOFTWARE

Die Fotofilme wurden eingescannt und die Intensität der Banden durch NIH ImageJ-Software (<u>http://rsb.info.nih.gov/nih-image</u>) ausgewertet.

2.12 STATISTISCHE ANALYSE

Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Grafiken erfolgten mit Hilfe von SigmaStat 3.0 (Ashburn, USA) und Microsoft Excel 2010 (Redmond, USA). Alle Daten sind, soweit nicht anders vermerkt, als Median angegeben. Die Darstellung als Box-Plots erfolgte durch SigmaPlot 8.0 (Ashburn, USA). Nach Prüfung auf Normalverteilung wurde zur Ermittlung der Signifikanz zwischen zwei Messzeitpunkten innerhalb einer Gruppe ein Wilcoxon Rangsummen-Test durchgeführt. Zum Vergleich verschiedener Gruppen wurde ebenfalls ein Test auf Normalverteilung durchgeführt. Bei erfolgreichem Test erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) und eine anschließende paarweise post-HOC Analyse durch Holm Sidak-Test. Bei nicht normal verteilten Daten erfolgte ein Rangplatzsummentest (ANOVA on ranks, Kruskal-Wallis-Test) mit anschließender paarweise post-HOC Analyse mittels Dunn's Test. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde auf 5% festgelegt, wodurch eine statistische Signifikanz bei einem p-Wert \leq 0,05 erreicht wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1 HÄMODYNAMIK

Die Kanülierung der Arteria carotis erlaubte eine kontinuierliche Messung wichtiger Parameter der Hämodynamik während der vierstündigen intensivmedizinischen Versorgung. Durch die i.v. Applikation von Na₂S kam es in der Kontrolleingriffsgruppe zu keiner relevanten Änderung der Herzfrequenz. Jedoch zeigte sich nach Thoraxtrauma in der Gruppe ohne Sulfid-Therapie gegen Ende des Beobachtungszeitraums ein signifikanter Anstieg der Herzfrequenz, der unter Na₂S-Behandlung ausblieb. Außerdem senkte die Sulfid-Therapie den mittleren arteriellen Druck (Mean Arterial Pressure, MAP) signifikant sowohl nach Thoraxtrauma, als auch bei Mäusen mit Kontrolleingriff. Dies veranschaulicht *Tabelle 6*.

TABELLE 6: HÄMODYNAMISCHE PARAMETER ZUM ZEITPUNKT DES VERSUCHSBEGINNS UND -ENDE: Nach Thoraxtrauma stieg die Herzfrequenz in der Gruppe ohne Sulfid-Therapie am Ende des vierstündigen Beobachtungszeitraums signifikant an. Dieser Anstieg war bei kombinierter Na₂S-Therapie nicht zu beobachten. Außerdem zeigte sich unter Sulfid-Gabe ein signifikant verminderter mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) sowohl in der Gruppe der Mäuse mit Kontrolleingriff als auch nach Thoraxtrauma. Alle Daten sind als Median dargestellt (25. Perzentile, 75. Perzentile). Sham: Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT: Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle: reine Volumensubstitution, Na₂S: zusätzlich Sulfid-Gabe, HR: Herzfrequenz, MAP: "mean arterial pressure", Beginn: Erster Messzeitpunkt nach Instrumentierung, Ende: Messzeitpunkt vier Stunden nach Instrumentierung, * p = 0.008 vs. Beginn der intensivmedizinischen Versorgung in der gleichen Gruppe, # p = 0.015 vs. entsprechender-Gruppe ohne Sulfid-Gabe am Versuchsende

	HR (min ⁻¹)		MAP (mmHg)	
	Beginn	Ende	Beginn	Ende
Sham vehicle	423 (270, 550)	395 (317, 593)	69 (59 <i>,</i> 78)	78 (67, 84)
Sham Na ₂ S	300 (300, 316)	295 (284, 363)	64 (59 <i>,</i> 65)	65 (59 <i>,</i> 70)#
TxT vehicle	325 (311, 350)	370 (340, 441)*	60 (58 <i>,</i> 71)	72 (66, 78)
TxT Na₂S	314 (301, 320)	340 (310, 360)	55 (53 <i>,</i> 60)	63 (58 <i>,</i> 67)#

3.2 METABOLISCHE EFFEKTE

Es zeigte sich weder durch Thoraxtrauma, noch durch Sulfid-Gabe im Verlauf eine signifikante Änderung der Säure-Basen-Homöostase in Form einer Abweichung des pH-Wertes oder der Laktatkonzentration in den arteriellen Blutgasanalysen, wie aus *Tabelle 7* hervorgeht.
TABELLE 7: ÄNDERUNG DER ARTERIELLEN SÄURE-BASE-HOMÖOSTASE: Keine Änderung des pH Wertes durch Thoraxtrauma oder Sulfid-Gabe. Die Messung erfolgte durch arterielle Blutgasanalysen. Alle Daten sind als Median dargestellt (25. Perzentile, 75. Perzentile). Sham: Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT: Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle: reine Volumensubstitution, Na₂S: zusätzlich Sulfid-Gabe, Beginn: Erster Messzeitpunkt nach Instrumentierung, Ende: Messzeitpunkt vier Stunden nach Instrumentierung

	рН		
	Beginn	Ende	
Sham vehicle	7.31 (7.24, 7.34)	7.36 (7.32, 7.4)	
Sham Na₂S	7.32 (7.31, 7.33)	7.29 (7.27, 7.36)	
TxT vehicle	7.31 (7.27, 7.33)	7.38 (7.35, 7.42)	
TxT Na₂S	7.35 (7.31, 7.38)	7.28 (7.26, 7.34)	



ABBILDUNG 6: LAKTATKONZENTRATION IM BLUT: Keine signifikante Änderung durch Thoraxtrauma oder Sulfid-Therapie. Die Messung erfolgte durch arterielle Blutgasanalysen. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind in mmol/l angegeben. Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe.

3.3 LUNGENFUNKTION

Zur Beurteilung der pulmonalen Leistungsfähigkeit wurden sowohl die thorako-pulmonale Compliance (CPL) und Beatmungs-Spitzendrücke gemessen, als auch die Gaspartialdrücke durch arterielle Blutgasanalysen bestimmt. Die deutliche Einschränkung der Lungenmechanik nach Thoraxtrauma zeigte sich in einer signifikant verminderten Compliance, also Dehnbarkeit, der Lunge und des knöchernen Thorax. Nach vierstündiger Sulfid-Therapie erholte sich die Compliance jedoch wieder und erreichte Werte der Vergleichsgruppe mit Kontrolleingriff. Außerdem waren zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Oxygenierung des Blutes über den kompletten Zeitraum der Ventilation deutlich höhere Beatmungsspitzendrücke nötig. Durch Na₂S-Gabe zeigte sich hier lediglich eine Tendenz zu niedrigeren Beatmungsdrücken im Vergleich zu den Gruppen ohne Sulfid-Therapie. Zieht man den Horovitz-Quotienten als Maß für die Integrität des pulmonalen Gasaustauschs heran, so erkennt man eine deutliche Einschränkung nach Thoraxtrauma zu Beginn der Ventilationsphase. Durch lungenprotektive Beatmung erholte sich die Lungenfunktion gegen Ende des Beobachtungszeitraums jedoch wieder, während sie in Kombination mit einer Sulfid-Therapie jedoch weiterhin deutlich eingeschränkt blieb. Aus Tabelle 8 ist ersichtlich, in welchem Ausmaß die Compliance der Lunge durch das Thoraxtrauma eingeschränkt war. Tabelle 9 zeigt die für eine Sauerstoffsättigung Aufrechterhaltung einer adäquaten arteriellen nötigen Beatmungsspitzendrücke, während Abbildung 7 die Beeinflussung des Horovitz-Quotienten veranschaulicht.

TABELLE 8: ÄNDERUNG DER THORAKAL-PULMONALEN COMPLIANCE (CPL): Es zeigte sich eine Einschränkung derCompliance nach Thoraxtrauma, die sich unter Na2S-Therapie jedoch gegen Ende des Messzeitraums wiederden Werten der Kontrolleingriff-Gruppe anglich. Die Messung der CPL erfolgte automatisch. Alle Daten sindals Median dargestellt (25. Perzentile, 75. Perzentile). Sham: Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT: Mäuse mitThoraxtrauma, Vehicle: reine Volumensubstitution, Na2S: zusätzlich Sulfid-Gabe, Beginn: ErsterMesszeitpunkt zu Beginn der Beatmung, Ende: Messzeitpunkt 4 Stunden nach Beginn der Beatmung, * p <</td>0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff.

	CPL (μL · cmH₂O ⁻¹)		
	Beginn	Ende	
Sham vehicle	79 (70, 80)	87 (80, 98)	
Sham Na₂S	86 (80, 89)	94 (91, 95)	
TxT vehicle	64 (60, 71)*	70 (64, 81)*	
TxT Na₂S	73 (66, 77)*	84 (77, 87)	



ABBILDUNG 7: DARSTELLUNG DES HOROVITZ-QUOTIENTEN ($P_AO_2 \cdot F_iO_2^{-1}$ **):** Der Horovitz-Quotient, repräsentativ für die Integrität des pulmonalen Gasaustauschs, zeigt nach Thoraxtrauma eine signifikante Einschränkung die sich nach lungenprotektiver Beatmung in der Gruppe ohne Sulfid-Therapie wieder normalisierte. In der Sulfid-Gruppe blieb sie eingeschränkt. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind in mmHg angegeben. P_AO_2 : arterieller Sauerstoffpartialdruck, F_iO_2 : inspiratorische Sauerstoff-Fraktion, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe, * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff, # p < 0.05 vs. gleicher Gruppe zu Beginn der Beatmung

TABELLE 9: BEATMUNGS-SPITZENDRÜCKE: Nach Thoraxtrauma wurden, zur Aufrechterhaltung einer adäquaten Sauerstoffsättigung des Blutes, über den gesamten Versuchszeitraum höhere Beatmungs-Spitzendrücke benötigt. Alle Daten sind als Median dargestellt (25. Perzentile, 75. Perzentile). Sham: Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT: Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle: reine Volumensubstitution, Na₂S: zusätzlich Sulfid-Gabe, Beginn: Erster Messzeitpunkt zu Beginn der Beatmung, Ende: Messzeitpunkt 4 Stunden nach Beginn der Beatmung, * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff.

	Beatmungs-Spitzendruck (mmHg)		
	Beginn	Ende	
Sham vehicle	11.5 (11.0, 12.8)	10.7 (9.3, 11.1)	
Sham Na₂S	10.0 (10.0, 10.8)	8.7 (8.3, 9.7)	
TxT vehicle	18.1 (15.5, 19.7)*	12.8 (11.3, 14.0)*	
TxT Na₂S	12.1 (11.9, 14.0)*	14.0 (9.0, 14.3)*	

3.4 DIURESE

Die Diurese als Parameter der Nierenfunktion wurde durch Ableitung des Harns über einen Blasenkatheter bestimmt. Dabei senkte Sulfid-Therapie die Diurese signifikant. Diese Wirkung war in Kombination mit Thoraxtrauma besonders ausgeprägt wie aus *Tabelle 10* ersichtlich ist. **TABELLE 10: VERGLEICH DER DIURESE:** Sulfid-Gabe senkte signifikant die Urin-Produktion. Alle Daten sind alsMedian dargestellt (25. Perzentile, 75. Perzentile). Sham: Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT: Mäuse mitThoraxtrauma, Vehicle: reine Volumensubstitution, Na2S: zusätzlich Sulfid-Gabe * p < 0.05 vs.</td>entsprechender Vehicle-Gruppe, # p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff.</td>

	Diurese (ml)	
Sham vehicle	2.9 (2.7, 3.3)	
Sham Na₂S	2.4 (1.9, 2.5)*	
TxT vehicle	2.5 (2.4, 2.7)	
TxT Na₂S	1.3 (0.9, 2.0)*#	

3.5 LUNG WET WEIGHT

Das post-mortem gemessene Lungen-Nass-Gewicht zeigte trotz Sulfid-induzierter verminderter Diurese keine signifikante Abweichung im Gruppenvergleich. Dies wird in *Tabelle 11* deutlich.

TABELLE 11: VERGLEICH DES LUNGEN-NASS-GEWICHTS: Keine Änderung des LWW durch Thoraxtrauma oder Sulfid-Gabe. Alle Daten sind als Median dargestellt (25. Perzentile, 75. Perzentile). LWW: Lungen-Nassgewicht ("Lung wet weight"), Sham: Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT: Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle: reine Volumensubstitution, Na₂S: zusätzlich Sulfid-Gabe.

	LWW (g · g ⁻¹)
Sham vehicle	5.9 (5.6, 6.2)
Sham Na₂S	6.7 (6.2, 7.1)
TxT vehicle	6.1 (6.0, 6.2)
TxT Na ₂ S	7.5 (6.7, 9.3)

3.6 LUNGENGEWEBSSCHÄDIGUNG

Durch eine mikroskopische Analyse histologischer Veränderungen ("total lung injury score": Summe der Gesamtpunktzahlen der einzelnen Bewertungskriterien für Dystelektasen/Atelektasen, Ödem/Blutung, Leukozyten-Infiltration und, wenn vorhanden, Verdickungen der Alveolarmembranen) war es möglich, strukturelle Schäden des Lungengewebes qualitativ beurteilen zu können. Hier zeigte sich histologisch eine signifikant stärkere Schädigung des Lungenparenchyms nach Thoraxtrauma, welche jedoch in Kombination mit Sulfid-Gabe nicht nachweisbar war (*Tabelle 12, Abbildung 8*).



Abbildung 8: Hämatoxylin/Eosin-Färbung des Lungengewebes mit typischen Veränderungen ausgelöst durch das Thoraxtrauma. a) Sham vehicle, b) Thoraxtrauma vehicle, c) Thoraxtrauma Na₂S.

TABELLE 12: QUALITATIVE ANALYSE DER HISTOLOGISCHEN LUNGENGEWEBSPRÄPARATE: Nach Thoraxtrauma deutlichehistologische Schäden, jedoch in der Na2S-Gruppe weniger stark ausgeprägt. Angabe der Summe des "Totallung injury scores". Alle Daten sind als Median dargestellt (25. Perzentile, 75. Perzentile). Sham: Mäuse mitKontrolleingriff, TxT: Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle: reine Volumensubstitution, Na2S: zusätzlich Sulfid-Gabe * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff</td>

Sham vehicle	Sham Na ₂ S	TxT vehicle	TxT Na ₂ S
1.5 (1.5, 2.25)	1.25 (1.0, 5.0)	4.5 (3.0, 5.0)*	2.5 (0.5, 4.0)

3.7 APOPTOSE

Zur Beurteilung der Auswirkungen der Na₂S-Gabe auf die Regulation bzw. Induktion von Apoptose im Lungengewebe wurden zum einen die Marker Bcl-xL (Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large) und pBad (phosphoryliertes Bcl-2-associated death promoter), die direkt oder indirekt an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, durch Western Blots quantifiziert. Zum anderen wurde cleaved Caspase 3, ein Spaltprodukt das bei der Aktivierung von Caspase 3 und damit der Einleitung der gemeinsamen Effektorkaskade von intrinsischem und extrinsischem Weg der Apoptose entsteht, bestimmt. Dies geschah durch eine immunhistochemische Aufbereitung des Gewebes der linken Lunge mit Fluoreszenzmarkierung der cleaved Caspase 3. Hier zeigte sich in der immunhistochemischen Färbung eine signifikant verminderte Fluoreszenz-Intensität aktivierter Caspase-3 nach Sulfid-Gabe (Abbildung 9 und 10) im Sinne einer Abmilderung der durch Thoraxtrauma induzierten, gesteigerten cleaved-Caspase-3-Aktivität. In den Western-Blots zeigte sich im Einklang mit dieser Beobachtung durch Sulfid-Gabe eine Erhöhung des anti-apoptotischen pBad nach Thoraxtrauma (*Abbildung 12*). Außerdem war die Expression von funktionell anti-apoptotisch wirksamen Bcl-xL durch Thoraxtrauma vermindert. Dies erreichte jedoch nur in der Sulfid-Gruppe signifikante Werte (*Abbildung 11*).



ABBILDUNG 9: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG DER "CLEAVED CASPASE 3": Die Abbildung zeigt die Abmilderung der erhöhten cleaved Caspase 3 Expression nach Thoraxtrauma durch Na₂S im direkten Vergleich. Die Detektion des Erst-Antikörpers erfolgte mit Hilfe des Dako REAL Detection System nach Herstellerangaben mit anschließender Gegenfärbung mit Hämatoxylin-Eosin. Na₂S: Sulfid-Gabe, vehicle: reine Volumensubstitution

the main states



ABBILDUNG 10: AKTIVITÄT VON CLEAVED CASPASE-3 IM LUNGENGEWEBE: Es zeigte sich eine erhöhte Aktivität von cleaved Caspase 3 nach Thoraxtrauma, die durch Sulfid-Gabe in dieser Gruppe signifikant reduziert werden konnte. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind densimetrisch bestimmt und beschreiben die Intensität der Rot-Fluoreszenz nach Anfärbung. Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe, # p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff, * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe ohne Sulfid-Gabe.



ABBILDUNG 11: EXPRESSION VON BCL-XL IM LUNGENGEWEBE: Signifikant verminderte Expression von antiapoptotischem Bcl-xL nach Thoraxtrauma, was jedoch nur in der Sulfid-Gruppe signifikante Werte erreichte. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind als Vielfaches der Expression von Bcl-xL in Nativtieren angegeben. Bcl-xL: Bcell lymphoma-extra large, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe, * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff.



ABBILDUNG 12: EXPRESSION VON PBAD IM LUNGENGEWEBE: Signifikante Erhöhung des funktionell anti-apoptotisch wirksamen phosphorylierten Bad nach Thoraxtrauma bei gleichzeitiger Sulfid-Gabe. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind als Vielfaches der Expression von pBad in Nativtieren angegeben. pBad: phosphoryliertes Bad, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe, * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe ohne Sulfid-Gabe.

3.8 EXPRESSION VON STRESS-PROTEINEN

Das Stressprotein HO-1 zeigte nach Thoraxtrauma eine deutlich vermehrte Expression im Lungengewebe. Diese deutliche Erhöhung war in Kombination mit Sulfid-Gabe weniger stark ausgeprägt, so dass die Therapie hier eine verminderte Produktion des Stressproteins nach sich zog.



ABBILDUNG 13: EXPRESSION VON HO-1 IM LUNGENGEWEBE: Signifikant erhöhte Expression des Stressproteins HO-1 nach Thoraxtrauma, welche durch Sulfid-Gabe signifikant weniger stark ausgeprägt ist. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind als Vielfaches der Expression von HO-1 in Nativtieren angegeben. HO-1: Häm-Oxygenase-1, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe, * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff, # p < 0.05 versus entsprechender Gruppe ohne Sulfid-Gabe.

Eine signifikante Aktivitätssteigerung von NF- κ B im Lungengewebe, das unter anderem im Rahmen von Stress-Situationen vermehrt exprimiert wird, zeigte sich lediglich nach Thoraxtrauma ohne simultane Sulfid-Therapie. Jedoch war auch in Kombination mit Na₂S ein tendenzieller Anstieg der Aktivität zu beobachten. Der NF- κ B-Inhibitor I κ B- α , der NF- κ B inaktiv im Zytoplasma hält und die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA und somit dessen Wirkung verhindert, zeigte entsprechend eine, durch das Thoraxtrauma ausgelöste, deutlich signifikante Verminderung. Eine Modulation durch Na₂S-Gabe war hier nicht ersichtlich.



ABBILDUNG 14: AKTIVITÄT VON NF-KB IM LUNGENGEWEBE: Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung von NF-KB durch Thoraxtrauma ohne kombinierte Sulfid-Gabe. In Kombination mit Na₂S-Therapie war lediglich ein tendenzieller Anstieg zu beobachten, ohne dass dies jedoch signifikante Werte erreichte. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind als Vielfaches der Aktivität von NF-κB in Nativtieren angegeben. NF-κB: Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe, * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff



ABBILDUNG 15: KONZENTRATION VON IKB- α IM LUNGENGEWEBE: Deutliche Senkung der Konzentration des NF-KB-Inhibitors IKB- α nach Thoraxtrauma. Sulfid-Gabe zeigte keine zusätzliche Beeinflussung der Expression von IKB- α im Lungengewebe. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind als Vielfaches der Aktivität von IKB- α in Nativtieren angegeben. IKB- α : nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe, * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff

3.9 Systemische Entzündungsreaktion

Der Einfluss von Schwefelwasserstoff auf die systemische Entzündungsreaktion wurde durch Bestimmung der Konzentration von Entzündungsmediatoren (IL-6 und IL-10) quantifiziert. Es zeigte sich weder durch Thoraxtrauma, noch durch Sulfid-Gabe eine signifikante Beeinflussung der Konzentration des pro-inflammatorischen IL-6 im Plasma.



Plasma IL-6

ABBILDUNG 16: PLASMA-KONZENTRATION VON IL-6: Keine signifikanten Unterschiede der Plasmakonzentration von IL-6 in den dargestellten Gruppen. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Daten sind als quantitative Konzentrationsbestimmungen in pg · ml⁻¹ dargestellt. IL-6: Interleukin 6, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe.

Auch die Konzentration von funktionell anti-inflammatorischem plasmatischem IL-10 zeigte weder durch Thoraxtrauma, noch durch Sulfid-Therapie eine signifikante Änderung.



Plasma IL-10

ABBILDUNG 17: PLASMA-KONZENTRATION VON IL-10: Keine signifikanten Unterschiede der Plasmakonzentration von IL-10 in den dargestellten Gruppen. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Daten sind als quantitative Konzentrationsbestimmungen in pg · ml-1 dargestellt. IL-10: Interleukin 10, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe.

3.10 EXPRESSION VON ENZYMEN DER ENDOGENEN H₂S-Synthese

Die endogene Synthese von H_2S im Körper von Säugetieren erfolgt durch die Enzyme CBS und CSE. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der CBS und CSE-Expression nach Thoraxtrauma. Die Expression dieser beiden Enzyme blieb jedoch unbeeinflusst durch Sulfid-Gabe.



ABBILDUNG 18: EXPRESSION VON CBS IM LUNGENGEWEBE: Signifikante Erhöhung der CBS-Expression im Lungengewebe nach Thoraxtrauma. Alle Daten werden als Median angegeben. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind als densinometrische Quantifizierung der Rot-Intensität angegeben. CBS: Cystathionin-ß-Synthase, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe, * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff.

Lung tissue Cystathionine-₇-lyase



ABBILDUNG 19: EXPRESSION VON CSE IM LUNGENGEWEBE: Signifikante Erhöhung der CSE-Expression im Lungengewebe nach Thoraxtrauma. Alle Daten werden als Median angegeben, der obere Strich kennzeichnet die maximale, der untere die minimale Konzentration. Die obere Boxbegrenzung stellt die 75% Perzentile, die untere Begrenzung die 25% Perzentile dar. Die Werte sind als densinometrische Quantifizierung der Rot-Intensität angegeben. CSE: Cystathionin- γ -Lyase, Sham (*grau*): Mäuse mit Kontrolleingriff, TxT (*rot*): Mäuse mit Thoraxtrauma, Vehicle (*unschraffiert*): reine Volumensubstitution, Na₂S (*schraffiert*): zusätzlich Sulfid-Gabe. * p < 0.05 versus entsprechender Gruppe mit Kontrolleingriff.

4. DISKUSSION

Seit *Blackstones* aufsehenerregender Arbeit zur Induktion eines Winterschlaf-ähnlichen Zustands bei spontan atmenden Mäusen in einer H₂S-haltigen Atmosphäre [15], wurden sowohl die klinischen Auswirkungen der Schwefelwasserstoff-Gabe als auch die molekularen Wirkmechanismen von Sulfid an verschiedenen Spezies erforscht. Trotz, oder gerade wegen der starken Zuwendung der Forschung zu diesem Thema, gelang es bisher nur unzureichend, zu stimmigen und reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen. Denn so vielfältig die Wirkungen von H₂S zu sein scheinen, so unterschiedlich gestaltet sich auch der Studienaufbau und die verwendeten Modelle.

Mit dem beatmeten stumpfen Thoraxtrauma-Modell der Maus sollte hier versucht werden, die bisherigen Erkenntnisse über die Sulfid-Gabe auf ein Modell von klinischer Relevanz unter *normothermen* Bedingungen zu übertragen. Deshalb ist ein wesentlicher Fokus dieser Arbeit auf die klinischen Parameter und deren Beeinflussung durch Na₂S und das Thoraxtrauma gerichtet. Zudem sollen die Erkenntnisse aus der Auswertung dieser klinischen Einflussgrößen durch Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen untermauert werden.

Die Haupterkenntnisse dieser Arbeit sind im Wesentlichen:

Na₂S-Gabe ...

- verbessert nicht die durch Thoraxtrauma eingeschränkte Lungenfunktion und den pulmonalen Gasaustausch
- senkt den mittleren arteriellen Blutdruck ohne wesentliche Beeinflussung der Herzfrequenz
- hat keine Auswirkungen auf die systemische Entzündungsreaktion
- hemmt die durch das Thoraxtrauma induzierte Apoptose im Lungengewebe
- senkt die Expression von Stressproteinen
- hat keinen Einfluss auf die durch Trauma erhöhte Expression der endogenen H₂S produzierenden Enzyme CBS und CSE

4.1 DAS STUMPFE THORAXTRAUMA-MODELL DER MAUS

Um die Konsequenzen einer H₂S-Therapie unter klinisch relevanten Bedingungen nachvollziehen zu können, wurde das durch Knöferl et al. [68] etablierte Modell des stumpfen Thoraxtraumas der Maus klinischen Bedingungen angenähert. So erfolgte neben einem post-traumatisches Monitoring unter Narkose auch eine lungenprotektive Beatmung, was ebenfalls den realen klinischen Bedingungen nachempfunden ist [5]. Aus naheliegenden Gründen fand deshalb auch eine post-traumatische Applikation von Sulfid statt. Bisher wurde vor allem in Ischämie-Reperfusions-Versuchen ein zytoprotektiver Effekt von H₂S oder einem H₂S-Donor beschrieben, jedoch meist in Modellen, in denen eine Vorbehandlung [19, 92] oder eine Gabe zum Zeitpunkt der Reperfusion [19, 33] stattfand. Außerdem stellte sich die Frage nach der Art der Applikation. Trotz der ursprünglich von Blackstone et al. und vielen anderen [15, 36, 80, 120, 134] verwendeten Möglichkeit der inhalativen Verabreichung, wurde in der vorliegenden Studie eine intravenöse Darreichungsform bevorzugt. Diese hat vor allem den Vorteil, dass die lokale Schädigung der Lunge und Atemwege sowie die dadurch resultierende vermehrte Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen und damit verbunden eine vermehrte Leukozyten-Transmigration ins Lungengewebe, durch das toxische Gas vermieden werden kann [27, 39, 101, 120]. Als intravenöse Verabreichungsformen bieten sich im Wesentlichen die Substanzen Na₂S [30, 33, 34, 92, 117] und NaHS [21, 81, 87, 118, 132, 156] an, die in Wasser gelöst hauptsächlich als Hydrosulfid-Anion vorliegen [58]. Diese wasserlöslichen Salzverbindungen setzen jedoch große Mengen H₂S als "Bolus" innerhalb kürzester Zeit frei, was nicht der physiologischen endogenen H₂S-Synthese durch CSE oder CBS entspricht. So scheint der Freisetzungsrate oft größere Bedeutung zuzukommen als der kumulativen Konzentration, denn durch eine rapide Freisetzung können eventuell kurzzeitig toxische Konzentrationen erreicht werden [115, 147].

Im Gegensatz zur inhalativen Verabreichung von H₂S, bei der eine konstante Konzentration in Alveolen und Blut ohne weiteres zu gewährleisten ist, gestaltet sich das Monitoring bei der i.v.-Sulfid-Therapie schwierig. Neben der kurzen Halbwertszeit von H₂S im Plasma [148] war dies ein Grund für die Entscheidung einer Kombination aus Bolus-Gabe und kontinuierlicher Infusion von Na₂S, in einer etablierten Dosierung von 0.5 mg \cdot kg⁻¹ als einmalige Bolus-Applikation sowie einer Infusionsrate von 0.2 mg \cdot kg⁻¹ (34].

Jedoch zeichnen sich in bisherigen Studien verwendeten Sulfid-Dosierungen durch eine breite Varianz aus. Dies zeigt sich gut im Tiermodell der Ratte, bei der die mediane letale Sulfid-Dosis mit ca. 3 mg \cdot kg⁻¹ i.v. angegeben wird. Die Dosierungen in verschiedenen Studien variierten jedoch von 0.05 mg \cdot kg⁻¹ bis 5 mg \cdot kg⁻¹ [135].

Die intravenöse Gabe als Bolus-Applikation in Kombination mit einer kontinuierlichen Infusion von Na₂S bietet also diverse Vorteile, die insbesondere in dem vorliegenden Modell zum tragen kommen.

Fraglich ist, ob mit der Wahl des isolierten Thoraxtraumas dem klinischen Anspruch Folge getragen wurde, da das Thoraxtrauma lediglich in weniger als 20% der Fälle isoliert vorkommt [114]. So würde sich eventuell die Kombination mit einem hämorrhagischen Schock anbieten [93], was vermutlich auch das Ausmaß der systemischen Entzündungsreaktion beeinflussen würde. Dennoch würde die Interpretation der Daten mit der Vielzahl der Einflussgrößen zunehmend komplexer werden und eine differenzierte Darstellung erschweren.

4.2 "SUSPENDED ANIMATION"

Da der Versuch, eine Suspended Animation auch beim Großtier zu induzieren, oft nicht gelang [47, 80], vermuten einige Arbeitsgruppen die gleichzeitig einhergehende Hypothermie, die bei der Maus durch deren verhältnismäßig große Körperoberfläche wesentlich schneller zu erreichen ist, als mitursächlich an der Auslösung einer "Suspended Animation" [30]. *Volpato et. al.* zeigten bereits, dass viele Effekte der "Suspended Animation" teilweise abhängig von der Körpertemperatur zu beobachten sind [134]. Durch die temperaturregulatorischen Maßnahmen konnten wir eine eventuelle Beeinflussung der Ergebnisse durch die Effekte der Hypothermie ausschließen.

Durch invasive Messung von Blutdruck und Herzfrequenz zeigte sich eine klare Absenkung des mittleren arteriellen Drucks durch Sulfid-Gabe, sowohl nach Thoraxtrauma als auch nach Kontrolleingriff. Die Herzfrequenz blieb jedoch weitestgehend unbeeinflusst. Diese Ergebnisse verhalten sich konträr zu den ursprünglichen Ergebnissen von *Blackstone* und *Volpato* [15, 134], die durch H₂S-Gabe eine verminderte Herzfrequenz bei konstantem Blutdruck feststellten. Dies wurde bei *Blackstone* als Ausdruck einer "Suspended Animation" angesehen. Allerdings wurde auch ein Absinken des MAP beschrieben [29,

160], was am ehesten als temperaturabhängiger Effekt bei gleichzeitig einhergehender Hypothermie zu werten ist. Da dem Confounding-Faktor Hypothermie in der vorliegenden Arbeit jedoch entgegengewirkt wurde und die Herzfrequenz unbeeinflusst blieb, käme auch ein zentraler Effekt, z.B. durch Aktivierung des Hypothalamus [29, 133] oder eine Beeinflussung der Barorezeptoren im Carotis-Sinus [150] in Frage. Eine verminderte Hyperlaktatämie durch Sulfid-Gabe als Zeichen einer verminderten anaeroben ATP-Gewinnung [117], konnte bei Ausbleiben eines post-traumatischen Laktatanstiegs nicht festgestellt werden.

Letztlich lässt sich zusammenfassend feststellen, dass ein "Suspended-animation"ähnlicher Zustand in der vorliegenden Arbeit unter *normothermen* Bedingungen nicht zu erreichen war.

4.3 LUNGENPROTEKTIVE BEATMUNG

Die Auswirkungen des Thoraxtraumas auf die Lungenfunktion und den pulmonalen Gasaustausch werden in der vorliegenden Untersuchung besonders deutlich. So sind nach Thoraxtrauma über den gesamten Zeitraum der invasiven Beatmung höhere Spitzendrücke nötig, da auch die Lungen-Compliance posttraumatisch signifikant eingeschränkt ist. Dies erklärt sich aus den pathophysiologischen Veränderungen im Lungenparenchym nach Trauma. So entstehen durch die Lungenkontusion, die durch Kompression mit folgender Dekompression des Gewebes gekennzeichnet ist, vermehrt atelektatische Lungenabschnitte sowie ein zunehmendes Ödem [49]. Durch kontinuierliche Na₂S-Infusion während der vierstündigen Beatmungsphase erholte sich die Compliance jedoch wieder. Eine mögliche Erklärung hierfür findet sich in der Regulation der Beatmung, die auch durch den arteriellen CO₂-Partialdruck geregelt wurde. Durch die beschriebene verminderte Stoffwechselaktivität und eine eventuell weniger ausgeprägte CO₂-Produktion, war eine weniger traumatische Beatmung als in der Vergleichsgruppe möglich [5]. Auch Hotchkiss et al. beschrieb die Abmilderung beatmungsinduzierter Lungenschäden und deren pathologischen Veränderungen im Lungengewebe durch niederfrequente Beatmung [54].

4.4 DIURESE UND SÄURE-BASE-HAUSHALT

Sulfid-Gabe senkt signifikant die Urin-Ausscheidung der Maus. Dies ist vermutlich am ehesten auf den Sulfid-bedingten Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks zurückzuführen. Dadurch sinken die renale Perfusion und konsekutiv auch die Urinproduktion. Vollkommen unbeeinflusst von den Auswirkungen des Thoraxtraumas oder der Sulfid-Therapie zeigte sich der Säure-Base-Status. Es konnte keine Veränderung des arteriellen pH-Wertes durch Thoraxtrauma oder Na₂S-Therapie festgestellt werden. Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von *Simon et al.* [117], deren Schweine bei verminderter CO₂-Produktion einen unveränderten pH-Wert aufwiesen. Auch andere Arbeitsgruppen sahen den pH-Wert unbeeinflusst von H₂S [36, 43].

Ein post-traumatischer Laktatanstieg konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden weshalb eine etwaige Beeinflussung durch Sulfid-Therapie nicht beurteilt werden kann.

4.5 ENDOGENE H₂S Synthese

In vielen Tiermodellen wurde im Rahmen von Stresssituationen eine erhöhte plasmatische Konzentration von H₂S oder eine vermehrte Expression der Enzyme CBS und CSE, die für die endogene Synthese von H₂S verantwortlich sind , festgestellt [1, 33, 44, 53, 81, 92, 151, 160]. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die vermehrte Expression ein Anpassungsmechanismus auf Schädigung verschiedenster Art darstellt.

Nach Thoraxtrauma zeigten die Mäuse ebenfalls eine erhöhte Expression von CBS und CSE, vermutlich als Adaption auf den Thoraxtrauma-induzierten Stress.

4.6 STRESSREAKTION

Na₂S-Gabe senkte signifikant die durch Thoraxtrauma erhöhte Expression von HO-1 im Lungengewebe, welches hier, in Zusammenschau mit anderen Befunden, am ehesten als "Stressprotein" anzusehen ist [112]. Für diese spezifische Wirkung von Sulfid wird oft eine Hemmung von iNOS [72, 82, 102] verantwortlich gemacht. So wurde durch Inhibition von iNOS eine verminderte Expression von HO-1 beobachtet, während eine Induktion von iNOS eine vermehrte HO-1-Produktion zur Folge hatte [94]. Die Funktion von HO-1 als

Stressprotein wurde auch durch die signifikant verminderte Expression von IκB-α, sowie durch eine tendenzielle Erhöhung des Transkriptionsfaktors NF-κB nach Thoraxtrauma verdeutlicht. Dem Nukleären Faktor-κB werden neben der vermehrten Aktivität in Stresssituationen auch diverse andere Eigenschaften zugeschrieben: proinflammatorische und –apoptotische Funktion [154, 155, 156, 157] ebenso wie antiinflammatorische [76, 136] und anti-apoptotische [8] Wirkung. Dabei steht die Regulation der HO-1-Expression in engem Zusammenhang mit der Aktivität von NF-κB: So äußert sich eine Hemmung von NF-κB durch eine verminderte Aktivität von iNOS [83, 102, 132], welche, wie oben erwähnt, auch eine verminderte Expression von HO-1 zur Folge hat.

Obwohl in zahlreichen Veröffentlichungen eine vermehrte [147, 161] oder abgeschwächte [38, 83, 102, 132, 147] Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB, bzw. dessen Inhibitors IκB-α [156] durch H₂S beschrieben wird, konnte hier jedoch keine wesentliche Beeinflussung durch Sulfid-Gabe aufgezeigt werden.

Letztlich ist aufgrund der komplementären Wirkung von NF-κB jedoch eine Interpretation einer erhöhten oder verminderten Expression des Transkriptionsfaktors schwierig, da dieser nicht nur an der Auslösung einer Entzündungsantwort, sondern im selben Gewebe auch an der Beendigung des inflammatorischen Prozesses beteiligt ist, bestimmt also die Dauer der Entzündungsreaktion [75].

4.7 MIKROSKOPISCHE SCHÄDIGUNG DES LUNGENGEWEBES

Durch mikroskopische Betrachtung der histologischen Gewebeschnitte konnte eine vermehrte Gewebedestruktion der Lunge nach Thoraxtrauma festgestellt werden. Dies erscheint durch den Traumamechanismus mit einhergehender Lungenkontusion als plausibel. Typischerweise findet man hier vermehrte Ödembildung, Verdickung der Alveolarsepten und vermehrte Infiltration von polymorphkernigen Granulozyten [49, 105], was sich hier in einem erhöhten "total-lung-injury-score" wiederspiegelte. Interessanterweise konnte diese ausgeprägte Form der Gewebsschädigung bei Thoraxtrauma mit kombinierter Sulfid-Gabe nicht feststellt werden. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu Vergleichsgruppen mit Kontrolleingriff. Dies ließe sich in Zusammenschau mit anderen Befunden, wie der verminderten Apoptose-Aktivität und Expression von Stressproteinen wie HO-1, als protektiver Effekt von H₂S interpretieren.

Durch die druckkontrollierte, lungenprotektive Ventilation konnten beatmungsinduzierte Lungenschäden soweit wie möglich vermieden werden, so dass hier lediglich die direkten und indirekten, z.B. über Entzündungsprozesse ausgelösten, Folgen des Thoraxtraumas von Relevanz sind [5].

4.8 APOPTOSE

Die Auswirkungen von H₂S [19, 36, 119] sowie der Donor-Salze NaHS [10, 118, 132S] und Na₂S [33, 92] auf die Apoptose werden nach wie vor widersprüchlich gesehen. Obwohl Sulfid-Gabe meist anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben wird [19, 20, 36, 92, 118, 132], wurden auch gegenteilige Effekte beschrieben [10, 21, 91, 152]. Dabei scheint dem Zeitpunkt der Sulfid-Applikation wesentliche Bedeutung als Weichensteller für pro- oder anti-apoptotische Wirkung zuzukommen: So entfaltet sich die anti-apoptotische Wirkung von H₂S vor allem, wenn es im Rahmen einer Vorbehandlung [19, 92, 119] oder zumindest zum Zeitpunkt der Schädigung [36] oder der Reperfusion in Ischämie-Reperfusions-Versuchen [33] verabreicht wird. Auch in unserem klinischen Modell konnte die antiapoptotische Wirkung von Na₂S bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass auch die post-traumatische Bolus-Gabe in Kombination mit einer kontinuierlichen Infusion zu einer Abmilderung der durch Trauma erhöhten Apoptose-Aktivität führt. Dies äußerte sich durch eine verminderte cleaved Caspase 3-Aktivität nach Na₂S-Gabe, wie auch von *Elrod* durch Na₂S-Applikation zum Zeitpunkt der Reperfusion beschrieben [33]. Außerdem zeigte sich, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Calvert et al. [20], eine Erhöhung des phosphorylierten und somit anti-apoptotischen Bad.

Die genauen Mechanismen, durch die Sulfid den programmierten Zelltod verhindert, sind aus den vorliegenden Ergebnissen nicht ersichtlich. Es ist jedoch bekannt, dass H₂S eine mitochondriale Dysfunktion verhindern und zur Aufrechterhaltung der Mitochondrien-Struktur beitragen kann [33]. Außerdem wird vermutet, dass die Gabe des Sulfid-Donors NaHS die Kommunikation zwischen MAP-Kinasen und Apoptose-auslösenden Faktoren beeinflusst [118]. Die Freisetzung radikaler Sauerstoff-Spezies nach Thoraxtrauma [50, 57, 140, 141] kann zu einer Aktivierung des intrinsischen Wegs führen. Durch die direkte Öffnung von K⁺_{ATP}-Kanälen kann jedoch die durch oxidativem Stress induzierte Apoptose-Aktivität gesenkt werden [2]. Außerdem hat Sulfid neben der oben beschriebenen

Erhöhung der Expression endogener Antioxidantien [20, 102, 109] die Möglichkeit, durch seine SH-Gruppe direkt freie Radikale zu binden und zu neutralisieren [19, 22, 44, 74, 144, 145]. Auch eine Modulation der lokalen Entzündungsreaktion könnte sekundär zu antiapoptotischen Effekten beitragen [33, 118]. So ist eine verminderte Expression von TNF- α durch H₂S beschrieben [37, 83], was zu einer Hemmung der Aktivierung des extrinsischen Wegs durch Bindung an den Todes-Rezeptor, und somit zu einer verminderten Apoptose-Aktivität, führen kann [139]. Es ist auch möglich, dass unterschiedliche Gewebearten auf Sulfid-Exposition in verschiedener Weise reagieren. So könnte H₂S je nach Gewebe, sowohl pro- als auch anti-apoptotische Wirkung haben, unabhängig von lokaler Konzentration oder ähnlichen Einflussfaktoren.

4.9 INFLAMMATION

Die Folge der H₂S-Gabe auf die Entzündungsreaktion ist ein, seit jeher, kontrovers diskutiertes Thema [147]. Da sich die gewählten Modelle in vielerlei Hinsicht unterscheiden (in Applikationsform, Konzentration, Zeitpunkt der Applikation, dem verwendeten Modell und der Art der Schädigung), fällt ein direkter Vergleich der verschiedenen Studien schwer. Am besten veranschaulichen lässt sich dieses Problem am Maus-Modell einer Lungenschädigung: so wurde nach inhalativ verabreichtem H₂S oder i.v. Applikation von NaHS bzw. Na₂S sowohl eine verstärkte als auch eine abgeschwächte Schädigung beschrieben [35, 39, 120]. Hier scheint auch der Dosierung wesentliche Bedeutung zuzukommen: so zeigte sich in einem identischen Modell bei einer Dosierung von 10 mg · kg⁻¹ NaHS eine verminderte inflammatorische Reaktion nach Pankreatitisinduzierter Lungenschädigung, während sich weder bei einer Dosierung von 5 mg \cdot kg⁻¹ eine ähnliche Wirkung einstellte noch eine gesteigerte anti-inflammatorische Wirkung bei einer Erhöhung der Dosierung auf 15 mg \cdot kg⁻¹ zu beobachten war [115]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Studien: so führte die Gabe von 3.1 mg \cdot kg⁻¹ NaHS sowohl zu einer verminderten Produktion des pro-inflammatorischen IL-6 und IL-8, als auch zu einer Erhöhung des anti-inflammatorischen IL-10 in Plasma und Lungengewebe [87], während durch die Gabe von 10 mg \cdot kg⁻¹ NaHS hier pro-inflammatorische Wirkung beobachtet wurde [156]. Dabei scheinen die anti-inflammatorischen Effekte zumindest zu einem Teil auch temperaturunabhängig zu sein [35, 36, 115, 136]. Eine Erklärung für die

beschriebene entzündungsfördernde Wirkung könnte auch ein, durch Vasodilatation bedingter, verstärkter Leukozyten Influx ins Gewebe sein [83]. Auch der Stellenwert des Transkriptionsfaktors NF-κB und seine Rolle in der Regulation der Entzündungsreaktion sind bisher umstritten. So wurde auf der einen Seite durch vermehrte NF-κB-Aktivierung sowohl lokal pulmonal als auch systemisch eine exazerbierte Entzündungsreaktion beobachtet [156, 157]. Auf der anderen Seite wurde auch eine vermehrte NF-κB-Aktivierung bei gleichzeitig abgeschwächter Entzündungsreaktion im Rahmen eines septischen Schocks beschrieben [136]. Es ist bekannt, dass NF-κB nicht nur die Entzündungsreaktion verstärkt, sondern auch zu deren Beendigung beiträgt [76].

In der vorliegenden Studie konnte weder durch Thoraxtrauma, noch durch Sulfid-Therapie eine signifikante Änderung des Plasma-Entzündungsparameters IL-6 und des anti-inflammatorisch wirksamen IL-10 festgestellt werden. Die tendenziell erhöhte Aktivität von NF-κB im Lungengewebe und die signifikant verminderte Aktivität von ΙκB-lphanach Thoraxtrauma wurden in der vorliegenden Studie, aufgrund der Stimmigkeit der Ergebnisse, als Ausdruck einer Stressreaktion gewertet, da sich sonst keinerlei Beeinflussung der systemischen Entzündungsreaktion durch Thoraxtrauma zeigte. Ebenso wenig zeigte Na₂S hier immunmodulatorische Effekte. Durch den fehlenden Anstieg der systemischen Entzündungsmediatoren nach Thoraxtrauma ist eine eventuelle Modulation von Entzündungsprozessen durch Sulfid-Gabe nicht zu ermitteln. Die Ursache hierfür könnte jedoch auch in der Festlegung des zeitlichen Rahmens liegen [106]. So findet man nach LPS-Stimulation von Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelzellen vom Typ II einen konzentrations- und zeitabhängigen Anstieg von pro-inflammatorischem IL-1ß, IL-6 und TNF- α , mit Konzentrationsgipfeln nach sechs Stunden und später [130]. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für einen fehlenden Anstieg von Entzündungsmediatoren im Plasma könnte eine durch Perl et al. beschriebene Immunodysfunktion nach Lungenkontusion sein. Diese findet Ausdruck in einer signifikant verminderten Zytokin-Freisetzung durch Peritoneal- und Milzmakrophagen sowie Splenozyten nach 24 Stunden, teilweise jedoch bereits nach zwei Stunden [105]. Außerdem ist es möglich, dass ein Plasma-Entzündungsmediatoren primärer Anstieg der vier Stunden nach lungenprotektiver Beatmung nicht mehr nachweisbar war. Alle anderen vergleichbaren, bisher verwendeten Lungenschädigungs-Modelle verzichteten auf diese Form der Ventilation und beatmeten entweder mit hohen Spitzendrücken, mit den typischen

Konsequenzen von Überdehnung und repetitiver Öffnung und Verschluss der Alveolen, was zu gesteigerter Inflammation führen kann [5, 36, 40], oder ließen die Tiere spontan atmen, was eine Hypoxie des Lungengewebes zur Folge haben kann und somit ebenfalls zu einer gesteigerten inflammatorischen Reaktion beitragen könnte [69].

4.10 GRENZEN DER STUDIE

In wie weit sich die Ergebnisse der H₂S-Gabe im Maus-Modell auch beim Menschen wiederspiegeln, ist aufgrund wesentlicher Unterschiede in der Physiologie von Maus und Mensch nicht klar. Besonders die Möglichkeit der rapiden Absenkung der Körpertemperatur, vor allem bedingt durch die verhältnismäßig große Körperoberfläche im Vergleich zum Körpergewicht, erschwert die Übertragung der Erkenntnisse aus Maus-Versuchen auf Großtiere und Menschen [125]. Auch wenn diesem Effekt in der vorliegenden Untersuchung durch temperaturregulatorische Maßnahmen entgegen gewirkt wurde, bleiben andere Problempunkte weiterhin bestehen: während der Sauerstoffbedarf eines Menschen in Ruhe bei ca. 3 ml \cdot min⁻¹ \cdot kg⁻¹ liegt, ist dieser bei der Maus 10x höher. Dabei wird ein Großteil des Sauerstoffbedarfs der Maus zur Wärmeproduktion benötigt. So ist es möglich, dass eine Reduktion des O₂-Verbrauchs um 90% durch H₂S-Gabe [15] keine wesentliche Einschränkung von ATP-abhängigen Vorgängen im Körper zur Folge hat [125]. Zudem ist bekannt, dass Maus-Modelle nur unzureichend die Entzündungsantwort des Menschen wiederspiegeln. So variiert z.B. die Zeitspanne der Erholung zwischen Patienten und Mäusen im Rahmen einer Krankheit mit Entzündungsreaktion stark, so dass Spät-Reaktionen des menschlichen Körpers oft kein Korrelat in Maus-Modellen finden [113]. Ferner ist die Widerstandsfähigkeit bezüglich inflammatorischem Stress bei der Maus mitunter sehr viel höher als beim Menschen. So liegt die letale Konzentration von Endotoxin beim Menschen um ein 1.000.000-faches geringer als bei der Maus [113]. Die Schwefelwasserstoff-Gabe im Maus-Modell ist jedoch eine bereits vielfach etablierte Methode [35, 120], während sich die Induktion eines ",Suspended Animation"-ähnlichen Zustands beim Großtier als problematisch erwies [47, 80].

Durch die Wahl eines *isolierten* Thoraxtrauma-Modells ist es fraglich, ob sich unsere Beobachtungen auch bei klinisch relevanteren, komplexen Verletzungsmustern mit

kombiniertem Thoraxtrauma wiederspiegeln. Auch eine Ergebnisverzerrung aufgrund der Narkose ist möglich. So ist bekannt, dass auch Sevofluran, ähnlich wie H₂S, die Möglichkeit besitzt, Komplexe der Atmungskette zu hemmen [86] und somit die Effekte von H₂S teilweise zu "imitieren".

Aufgrund des fehlenden Anstiegs systemischer Entzündungsmediatoren nach Thoraxtrauma kann die eventuell entzündungshemmende Auswirkung der Sulfid-Therapie nicht zufriedenstellend beurteilt werden.

Letztlich war es uns durch den hier verwendeten Studienaufbau unter *normothermen* Bedingungen nicht möglich, überhaupt eine "Suspended Animation" oder einen vergleichbaren Zustand zu erreichen. Wesentliche typische Merkmale wie z.B. Senkung der Herzfrequenz, ließen sich nicht beobachten [15, 134]. *Faller et al.* zeigten jedoch bereits, dass viele Effekte von H₂S, wie z.B. anti-apoptotische und auch antiinflammatorische Effekte, temperaturunabhängig sind [36]. Diese Effekte konnten jedoch teils in der vorliegenden Studie unter *normothermen* Bedingungen reproduziert werden.

4.11 SCHLUSSFOLGERUNGEN AUS DER ARBEIT

Durch diese Studie war es möglich, die alleinige Wirkung von Sulfid bei normothermen Mäusen auf diverse klinische Parameter, Zytoprotektion, sowie auf die oft beschriebene Beeinflussung der Inflammation differenziert darzustellen.

So senkt H₂S signifikant den mittleren arteriellen Druck und die Diurese, ohne die Herzfrequenz wesentlich zu beeinflussen.

Eine Verbesserung des Gasaustauschs und der Lungenmechanik nach Thoraxtrauma ist durch H₂S-Gabe nicht zu erreichen.

Es zeigte sich eine klare anti-apoptotische Sulfid-Wirkung nach Thoraxtrauma, ebenso wie ein allgemein zytoprotektiver Effekt durch Senkung des Stressproteins HO-1. Dies findet Ausdruck in einer vermindert ausgeprägten histologischen Lungenschädigung nach Thoraxtrauma.

Eine Beeinflussung der systemischen Entzündungsreaktion ist in diesem Modell nicht ersichtlich.

Das Thoraxtrauma äußerte sich in einer vermehrten Expression der Enzyme CBS und CSE, die für die endogene H₂S-Synthese verantwortlich sind. Sulfid-Gabe hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Enzym-Expression.

Letztlich war es in dem hier verwendeten Studienaufbau unter *normothermen* Bedingungen nicht möglich, einen "Suspended Animation"-ähnlichen Zustand zu erreichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Schwefelwasserstoff besitzt neben seiner physiologischen Funktion als Gasotransmitter zudem die Möglichkeit, einen Winterschlaf-ähnlichen Zustand bei Tieren auszulösen, die sonst keinen Winterschlaf halten. Dieser "Suspended-Animation"-ähnliche Zustand geht sowohl mit einer Reduktion der Stoffwechselaktivität und der Herzfrequenz als auch einem Abfall der Körpertemperatur einher. Dies hat neben einer erhöhten Hypoxietoleranz auch weitere Effekte: So wird Schwefelwasserstoff (H₂S) im Allgemeinen zytoprotektive und anti-apoptotische Wirkung zugesprochen, jedoch wurden auch gegenteilige Effekte beschrieben. Unklarheit herrscht vor allem bezüglich der immunmodulatorischen Funktion von H₂S. An verschiedenen Modellen wurden sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Effekte beschrieben. Diese Effekte scheinen auch temperaturabhängig zu sein, so dass die alleinigen Auswirkungen von H₂S, ohne Verzerrung durch die einhergehende Hypothermie, bisher nicht ausreichend geklärt sind.

Die Gabe des Sulfid-Donorsalzes Natriumsulfid (Na₂S) in einem stumpfen Thoraxtrauma-Modell der Maus zeigt die Auswirkungen einer H₂S-Therapie in einem Modell klinischer Relevanz unter *normothermen* Bedingungen. So erfolgte die Sulfid-Gabe posttraumatisch mit anschließender kontinuierlicher Infusion bei typisch intensivmedizinischer Versorgung und lungenprotektiver Beatmung, sowie invasivem und nicht invasivem Monitoring.

Dabei zeigte sich durch Sulfid-Therapie ein signifikant niedrigerer mittlerer arterieller Blutdruck, ohne Beeinflussung der Herzfrequenz. Dies war verbunden mit einer verminderten Diurese, wobei jedoch keine Entgleisungen des Säure-Base-Haushalts beobachtet wurden.

Sowohl Lungenmechanik als auch pulmonaler Gasaustausch, durch Thoraxtrauma deutlich eingeschränkt, zeigte sich von der Na₂S-Gabe im Wesentlichen unbeeinflusst.

Eine Beeinflussung der Entzündungsmediatoren Interleukin (IL) -6 und -10 im Plasma, im Sinne einer Modulation der systemischen Entzündungsreaktion, war nicht zu beobachten.

Allerdings zeigte sich ein zytoprotektiver Effekt der Sulfid-Therapie, was sich in einer verminderten Expression von Stressproteinen sowie verminderter Apoptoseaktivität äußert. Auch die durch das Thoraxtrauma ausgelösten histologischen Schädigungen zeigten sich in Kombination mit Na₂S-Gabe nicht nachweisbar.

Bezüglich der Expression der für die endogene H_2S -Synthese verantwortlichen Enzyme Cystathionin- β -Synthase (CBS) und Cystathionin- γ -Lyase (CSE) zeigte sich eine erhöhte Expression nach Thoraxtrauma , wobei die Sulfid-Gabe keinen Einfluss hatte.

Letztlich war es uns in dem hier verwendeten Studienaufbau unter normothermen Bedingungen jedoch nicht möglich, einen Zustand der "Suspended Animation" zu erreichen.

Zusammenfassend ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit folgende Erkenntnisse:

- Sulfid-Gabe im Thoraxtrauma-Modell der Maus senkt den mittleren arteriellen Blutdruck ohne Beeinflussung der Herzfrequenz
- Durch Na₂S-Gabe ist keine Verbesserung der Lungenmechanik und des pulmonalen Gasaustauschs zu erreichen
- In der vorliegenden Arbeit zeigt sich keine Beeinflussung der systemischen Entzündungsreaktion durch Sulfid-Gabe
- Na₂S-Therapie führt zu einer verminderten Schädigung des Lungengewebes nach Thoraxtrauma
- Nach intravenöser Na₂S-Gabe kann ein allgemein zytoprotektiver Effekt durch verminderte Expression von Stressproteinen wie HO-1 beobachtet werden
- Die anti-apoptotische Wirkung von Sulfid wird hier in einem Modell von klinischer Relevanz bestätigt
- Als Reaktion auf das Thoraxtrauma der Maus ist eine erhöhte Expression der an der endogenen H₂S-Synthese beteiligten Enzyme CSE und CBS zu beobachten
- In dem hier verwendeten Studienaufbau unter *normothermen* Bedingungen war es nicht möglich, einen "Suspended Animation"-ähnlichen Zustand zu erreichen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe K, Kimura H: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J.Neurosci., 16: 1066-1071(1996)

2. Akao M, Ohler A, O'Rourke B, Marban E: Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells. Circ.Res., 88: 1267-1275(2001)

3. Alam H B, Chen Z, Ahuja N, Chen H, Conran R, Ayuste E C, Toruno K, Ariaban N, Rhee P, Nadel A, Koustova E: Profound hypothermia protects neurons and astrocytes, and preserves cognitive functions in a Swine model of lethal hemorrhage. J.Surg.Res., 126: 172-181(2005)

4. Ali M Y, Ping C Y, Mok Y Y, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore P K: Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulphide? Br.J.Pharmacol., 149: 625-634(2006)

5. Aslami H, Heinen A, Roelofs J J, Zuurbier C J, Schultz M J, Juffermans N P: Suspended animation inducer hydrogen sulfide is protective in an in vivo model of ventilator-induced lung injury. Intensive Care Med., 36: 1946-1952(2010)

Aslami H, Juffermans N P: Induction of a hypometabolic state during critical illness
a new concept in the ICU? Neth.J.Med., 68: 190-198(2010)

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

8. Baldwin A S: Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF-kappaB: critical mechanisms in immune function and cancer. Immunol.Rev., 246: 327-345(2012)

9. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D: Epidemiology of the severely injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU. Unfallchirurg, 103: 355-363(2000)

10. Baskar R, Li L, Moore P K: Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. FASEB J., 21: 247-255(2007)

11. Behringer W, Safar P, Wu X, Kentner R, Radovsky A, Kochanek P M, Dixon C E, Tisherman S A: Survival without brain damage after clinical death of 60-120 mins in dogs

using suspended animation by profound hypothermia. Crit.Care Med., 31: 1523-1531(2003)

12. Bhatia M, Sidhapuriwala J N, Ng S W, Tamizhselvi R, Moochhala S M: Proinflammatory effects of hydrogen sulphide on substance P in caerulein-induced acute pancreatitis. J.Cell.Mol.Med., 12: 580-590(2008)

13. Bhatia M, Sidhapuriwala J N, Sparatore A, Moore P K: Treatment with H2Sreleasing diclofenac protects mice against acute pancreatitis-associated lung injury. Shock, 29: 84-88(2008)

14. Bhatia M, Wong F L, Fu D, Lau H Y, Moochhala S M, Moore P K: Role of hydrogen sulfide in acute pancreatitis and associated lung injury. FASEB J., 19: 623-625(2005)

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

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

17. Bliksoen M, Kaljusto M L, Vaage J, Stenslokken K O: Effects of hydrogen sulphide on ischaemia-reperfusion injury and ischaemic preconditioning in the isolated, perfused rat heart. Eur.J.Cardiothorac.Surg., 34: 344-349(2008)

18. Boldin M P, Goncharov T M, Goltsev Y V, Wallach D: Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. Cell, 85: 803-815(1996)

19. Bos E M, Leuvenink H G, Snijder P M, Kloosterhuis N J, Hillebrands J L, Leemans J C, Florquin S, van Goor H: Hydrogen sulfide-induced hypometabolism prevents renal ischemia/reperfusion injury. J.Am.Soc.Nephrol., 20: 1901-1905(2009)

20. Calvert J W, Jha S, Gundewar S, Elrod J W, Ramachandran A, Pattillo C B, Kevil C G, Lefer D J: Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling. Circ.Res., 105: 365-374(2009)

21. Cao Y, Adhikari S, Ang A D, Moore P K, Bhatia M: Mechanism of induction of pancreatic acinar cell apoptosis by hydrogen sulfide. Am.J.Physiol.Cell.Physiol., 291: C503-10(2006)

22. Chang L, Geng B, Yu F, Zhao J, Jiang H, Du J, Tang C: Hydrogen sulfide inhibits myocardial injury induced by homocysteine in rats. Amino Acids, 34: 573-585(2008)

23. Cheng Y, Ndisang J F, Tang G, Cao K, Wang R: Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol., 287: H2316-23(2004)

24. Chertkova R V, Sharonov G V, Feofanov A V, Bocharova O V, Latypov R F, Chernyak B V, Arseniev A S, Dolgikh D A, Kirpichnikov M P: Proapoptotic activity of cytochrome c in living cells: effect of K72 substitutions and species differences. Mol.Cell.Biochem., 314: 85-93(2008)

25. Collin M, Anuar F B, Murch O, Bhatia M, Moore P K, Thiemermann C: Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. Br.J.Pharmacol., 146: 498-505(2005)

26. Cooper C E, Brown G C: The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. J.Bioenerg.Biomembr., 40: 533-539(2008)

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

28. Davis K A, Fabian T C, Croce M A, Proctor K G: Prostanoids: early mediators in the secondary injury that develops after unilateral pulmonary contusion. J.Trauma, 46: 824-31; discussion 831-2(1999)

29. Dawe G S, Han S P, Bian J S, Moore P K: Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K+ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. Neuroscience, 152: 169-177(2008)

30. Derwall M, Westerkamp M, Lower C, Deike-Glindemann J, Schnorrenberger N K, Coburn M, Nolte K W, Gaisa N, Weis J, Siepmann K, Hausler M, Rossaint R, Fries M: Hydrogen sulfide does not increase resuscitability in a porcine model of prolonged cardiac arrest. Shock, 34: 190-195(2010)

Dombkowski R A, Russell M J, Olson K R: Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout.
 Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol., 286: R678-85(2004)

32. Dorman D C, Moulin F J, McManus B E, Mahle K C, James R A, Struve M F: Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. Toxicol.Sci., 65: 18-25(2002)

33. 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)

34. Esechie A, Enkhbaatar P, Traber D L, Jonkam C, Lange M, Hamahata A, Djukom C, Whorton E B, Hawkins H K, Traber L D, Szabo C: Beneficial effect of a hydrogen sulphide donor (sodium sulphide) in an ovine model of burn- and smoke-induced acute lung injury. Br.J.Pharmacol., 158: 1442-1453(2009)

35. Esechie A, Kiss L, Olah G, Horvath E M, Hawkins H, Szabo C, Traber D L: Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. Clin.Sci.(Lond), 115: 91-97(2008)

36. Faller S, Ryter S W, Choi A M, Loop T, Schmidt R, Hoetzel A: Inhaled hydrogen sulfide protects against ventilator-induced lung injury. Anesthesiology, 113: 104-115(2010)

37. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sante M, Morelli A, Cirino G, Wallace J L: Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. Gastroenterology, 129: 1210-1224(2005)

38. Florian B, Vintilescu R, Balseanu A T, Buga A M, Grisk O, Walker L C, Kessler C, Popa-Wagner A: Long-term hypothermia reduces infarct volume in aged rats after focal ischemia. Neurosci.Lett., 438: 180-185(2008)

39. Francis RC, Vaporidi K, Bloch KD, Ichinose F, Zapol WM: Protective and Detrimental Effects of Sodium Sulfide and Hydrogen Sulfide in Murine Ventilator-induced Lung Injury. Anesthesiology ,115(5):1012-21(2011)

40. Frank J A, Matthay M A: Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. Crit.Care, 7: 233-241(2003)

41. Fu Z, Liu X, Geng B, Fang L, Tang C: Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury. Life Sci., 82: 1196-1202(2008)

42. Gaillard M, Herve C, Mandin L, Raynaud P: Mortality prognostic factors in chest injury. J.Trauma, 30: 93-96(1990)

43. Ganster F, Burban M, de la Bourdonnaye M, Fizanne L, Douay O, Loufrani L, Mercat A, Cales P, Radermacher P, Henrion D, Asfar P, Meziani F: Effects of hydrogen sulfide on hemodynamics, inflammatory response and oxidative stress during resuscitated hemorrhagic shock in rats. Crit.Care, 14: R165(2010)

44. 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)

45. Guidotti T L: Hydrogen sulphide. Occup.Med.(Lond), 46: 367-371(1996)

46. Guinee D,Jr, Brambilla E, Fleming M, Hayashi T, Rahn M, Koss M, Ferrans V, Travis W: The potential role of BAX and BCL-2 expression in diffuse alveolar damage. Am.J.Pathol., 151: 999-1007(1997)

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

48. Hatzinikolaou D G, Lagesson V, Stavridou A J, Pouli A E, Lagesson-Andrasko L, Stavrides J C: Analysis of the gas phase of cigarette smoke by gas chromatography coupled with UV-diode array detection. Anal.Chem., 78: 4509-4516(2006)

49. Hellinger A, Konerding M A, Malkusch W, Obertacke U, Redl H, Bruch J, Schlag G: Does lung contusion affect both the traumatized and the noninjured lung parenchyma? A morphological and morphometric study in the pig. J.Trauma, 39: 712-719(1995)

50. Henson P M, Johnston R B,Jr: Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. J.Clin.Invest., 79: 669-674(1987)

51. Hildebrand F, van Griensven M, Giannoudis P, Schreiber T, Frink M, Probst C, Grotz M, Krettek C, Pape H C: Impact of hypothermia on the immunologic response after trauma and elective surgery. Surg. Technol. Int., 14: 41-50(2005)

52. Hildebrandt T M, Grieshaber M K: Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. FEBS J., 275: 3352-3361(2008)

53. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H: The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. Biochem.Biophys.Res.Commun., 237: 527-531(1997)

54. Hotchkiss J R,Jr, Blanch L, Murias G, Adams A B, Olson D A, Wangensteen O D, Leo P H, Marini J J: Effects of decreased respiratory frequency on ventilator-induced lung injury. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 161: 463-468(2000)

55. Hu L F, Pan T T, Neo K L, Yong Q C, Bian J S: Cyclooxygenase-2 mediates the delayed cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning in isolated rat cardiomyocytes. Pflugers Arch., 455: 971-978(2008)

56. Hu Y, Chen X, Pan T T, Neo K L, Lee S W, Khin E S, Moore P K, Bian J S: Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. Pflugers Arch., 455: 607-616(2008)

57. Huber-Lang M, Sarma V J, Lu K T, McGuire S R, Padgaonkar V A, Guo R F, Younkin E M, Kunkel R G, Ding J, Erickson R, Curnutte J T, Ward P A: Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. J.Immunol., 166: 1193-1199(2001)

58. Hughes M N, Centelles M N, Moore K P: Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. Free Radic.Biol.Med., 47: 1346-1353(2009)

59. Irwin R J, Lerner M R, Bealer J F, Lightfoot S A, Brackett D J, Tuggle D W: Global primary blast injury: a rat model. J.Okla.State Med.Assoc., 91: 387-392(1998)

60. Jaffin J H, McKinney L, Kinney R C, Cunningham J A, Moritz D M, Kraimer J M, Graeber G M, Moe J B, Salander J M, Harmon J W: A laboratory model for studying blast overpressure injury. J.Trauma, 27: 349-356(1987)

61. Jeong S O, Pae H O, Oh G S, Jeong G S, Lee B S, Lee S, Kim du Y, Rhew H Y, Lee K M, Chung H T: Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1beta-induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. Biochem.Biophys.Res.Commun., 345: 938-944(2006)

62. Jha S, Calvert J W, Duranski M R, Ramachandran A, Lefer D J: Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol., 295: H801-6(2008)

63. Ji Y, Pang Q F, Xu G, Wang L, Wang J K, Zeng Y M: Exogenous hydrogen sulfide postconditioning protects isolated rat hearts against ischemia-reperfusion injury. Eur.J.Pharmacol., 587: 1-7(2008)

64. Johansen D, Ytrehus K, Baxter G F: Exogenous hydrogen sulfide (H2S) protects against regional myocardial ischemia-reperfusion injury--Evidence for a role of K ATP channels. Basic Res.Cardiol., 101: 53-60(2006)

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

66. Kimura Y, Kimura H: Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. FASEB J., 18: 1165-1167(2004)

67. Kluck R M, Bossy-Wetzel E, Green D R, Newmeyer D D: The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. Science, 275: 1132-1136(1997)

68. Knoferl M W, Liener U C, Perl M, Bruckner U B, Kinzl L, Gebhard F: Blunt chest trauma induces delayed splenic immunosuppression. Shock, 22: 51-56(2004)

69. Knoferl M W, Liener U C, Seitz D H, Perl M, Bruckner U B, Kinzl L, Gebhard F: Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. Shock, 19: 519-525(2003)

70. Koenitzer J R, Isbell T S, Patel H D, Benavides G A, Dickinson D A, Patel R P, Darley-Usmar V M, Lancaster J R,Jr, Doeller J E, Kraus D W: Hydrogen sulfide mediates vasoactivity in an O2-dependent manner. Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol., 292: H1953-60(2007)

71. Kubo S, Kajiwara M, Kawabata A: Dual modulation of the tension of isolated gastric artery and gastric mucosal circulation by hydrogen sulfide in rats. Inflammopharmacology, 15: 288-292(2007)
72. Kubo S, Kurokawa Y, Doe I, Masuko T, Sekiguchi F, Kawabata A: Hydrogen sulfide inhibits activity of three isoforms of recombinant nitric oxide synthase. Toxicology, 241: 92-97(2007)

73. Laggner H, Hermann M, Esterbauer H, Muellner M K, Exner M, Gmeiner B M, Kapiotis S: The novel gaseous vasorelaxant hydrogen sulfide inhibits angiotensinconverting enzyme activity of endothelial cells. J.Hypertens., 25: 2100-2104(2007)

74. Laggner H, Muellner M K, Schreier S, Sturm B, Hermann M, Exner M, Gmeiner B M, Kapiotis S: Hydrogen sulphide: a novel physiological inhibitor of LDL atherogenic modification by HOCI. Free Radic.Res., 41: 741-747(2007)

75. Lawrence T: The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect Biol., a001651(2009)

76. Lawrence T, Bebien M, Liu G Y, Nizet V, Karin M: IKKalpha limits macrophage NFkappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. Nature, 434: 1138-1143(2005)

77. Lee S W, Cheng Y, Moore P K, Bian J S: Hydrogen sulphide regulates intracellular pH in vascular smooth muscle cells. Biochem.Biophys.Res.Commun., 358: 1142-1147(2007)

78. Lefer D J: A new gaseous signaling molecule emerges: cardioprotective role of hydrogen sulfide. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 104: 17907-17908(2007)

79. Li H, Zhu H, Xu C J, Yuan J: Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. Cell, 94: 491-501(1998)

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

81. Li L, Bhatia M, Zhu Y Z, Zhu Y C, Ramnath R D, Wang Z J, Anuar F B, Whiteman M, Salto-Tellez M, Moore P K: Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharideinduced inflammation in the mouse. FASEB J., 19: 1196-1198(2005)

82. Li L, Moore P K: An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. Biochem.Soc.Trans., 35: 1138-1141(2007)

83. Li L, Rossoni G, Sparatore A, Lee L C, Del Soldato P, Moore P K: Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. Free Radic.Biol.Med., 42: 706-719(2007)

84. Li L, Whiteman M, Guan Y Y, Neo K L, Cheng Y, Lee S W, Zhao Y, Baskar R, Tan C H, Moore P K: Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137): new insights into the biology of hydrogen sulfide. Circulation, 117: 2351-2360(2008)

85. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula S M, Ahmad M, Alnemri E S, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell, 91: 479-489(1997)

86. Li R Q, McKinstry A R, Moore J T, Caltagarone B M, Eckenhoff M F, Eckenoff R G, Kelz M B: Is hydrogen sulfide induced suspended animation general anesthesia? J.Pharmacol.Exp.Ther., (2012)

87. Li T, Zhao B, Wang C, Wang H, Liu Z, Li W, Jin H, Tang C, Du J: Regulatory effects of hydrogen sulfide on IL-6, IL-8 and IL-10 levels in the plasma and pulmonary tissue of rats with acute lung injury. Exp.Biol.Med.(Maywood), 233: 1081-1087(2008)

88. Liu X, Kim C N, Yang J, Jemmerson R, Wang X: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. Cell, 86: 147-157(1996)

89. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. Cell, 89: 175-184(1997)

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

91. Mariggio M A, Minunno V, Riccardi S, Santacroce R, De Rinaldis P, Fumarulo R: Sulfide enhancement of PMN apoptosis. Immunopharmacol.Immunotoxicol., 20: 399-408(1998)

92. Minamishima S, Bougaki M, Sips P Y, Yu J D, Minamishima Y A, Elrod J W, Lefer D J, Bloch K D, Ichinose F: Hydrogen sulfide improves survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation via a nitric oxide synthase 3-dependent mechanism in mice. Circulation, 120: 888-896(2009)

93. Mok Y Y, Atan M S, Yoke Ping C, Zhong Jing W, Bhatia M, Moochhala S, Moore P K: Role of hydrogen sulphide in haemorrhagic shock in the rat: protective effect of inhibitors of hydrogen sulphide biosynthesis. Br.J.Pharmacol., 143: 881-889(2004)

94. Motterlini R, Foresti R, Bassi R, Calabrese V, Clark J E, Green C J: Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols. J.Biol.Chem., 275: 13613-13620(2000)

95. Mulligan M S, Schmid E, Beck-Schimmer B, Till G O, Friedl H P, Brauer R B, Hugli T E, Miyasaka M, Warner R L, Johnson K J, Ward P A: Requirement and role of C5a in acute lung inflammatory injury in rats. J.Clin.Invest., 98: 503-512(1996)

96. Nagata S, Suda T: Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. Immunol.Today, 16: 39-43(1995)

97. Nicholls P: The effect of sulphide on cytochrome aa3. Isosteric and allosteric shifts of the reduced alpha-peak. Biochim.Biophys.Acta, 396: 24-35(1975)

98. Nicholls P, Kim J K: Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system. Can.J.Biochem., 60: 613-623(1982)

99. Nichols R T, Pearce H J, Greenfield L J: Effects of experimental pulmonary contusion on respiratory exchange and lung mechanics. Arch.Surg., 96: 723-730(1968)

100. Nozari A, Safar P, Wu X, Stezoski W S, Henchir J, Kochanek P, Klain M, Radovsky A, Tisherman S A: Suspended animation can allow survival without brain damage after traumatic exsanguination cardiac arrest of 60 minutes in dogs. J.Trauma, 57: 1266-1275(2004)

101. Oesterhelweg L, Puschel K: "Death may come on like a stroke of lightening": phenomenological and morphological aspects of fatalities caused by manure gas. Int.J.Legal Med., 122: 101-107(2008)

102. Oh G S, Pae H O, Lee B S, Kim B N, Kim J M, Kim H R, Jeon S B, Jeon W K, Chae H J, Chung H T: Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Free Radic.Biol.Med., 41: 106-119(2006)

103. Olson K R, Dombkowski R A, Russell M J, Doellman M M, Head S K, Whitfield N L, Madden J A: Hydrogen sulfide as an oxygen sensor/transducer in vertebrate hypoxic vasoconstriction and hypoxic vasodilation. J.Exp.Biol., 209: 4011-4023(2006)

104. Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. Cell, 74: 609-619(1993)

105. Perl M, Gebhard F, Bruckner U B, Ayala A, Braumuller S, Buttner C, Kinzl L, Knoferl M W: Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge. Crit.Care Med., 33: 1351-1358(2005)

106. Perl M, Gebhard F, Knoferl M W, Bachem M, Gross H J, Kinzl L, Strecker W: The pattern of preformed cytokines in tissues frequently affected by blunt trauma. Shock, 19: 299-304(2003)

107. Pinilla J C: Acute respiratory failure in severe blunt chest trauma. J.Trauma, 22: 221-226(1982)

108. Puranik M, Weeks C L, Lahaye D, Kabil O, Taoka S, Nielsen S B, Groves J T, Banerjee R, Spiro T G: Dynamics of carbon monoxide binding to cystathionine beta-synthase. J.Biol.Chem., 281: 13433-13438(2006)

109. Qingyou Z, Junbao D, Weijin Z, Hui Y, Chaoshu T, Chunyu Z: Impact of hydrogen sulfide on carbon monoxide/heme oxygenase pathway in the pathogenesis of hypoxic pulmonary hypertension. Biochem.Biophys.Res.Commun., 317: 30-37(2004)

110. Riedl S J, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik S W, Liddington R C, Salvesen G S: Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. Cell, 104: 791-800(2001)

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

112. Ryter S W, Choi A M: Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. Antioxid.Redox Signal., 7: 80-91(2005)

113. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN: Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci U S A., 3507-12(2013)

114. Shorr R M, Crittenden M, Indeck M, Hartunian S L, Rodriguez A: Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. Ann.Surg., 206: 200-205(1987)

115. Sidhapuriwala J N, Ng S W, Bhatia M: Effects of hydrogen sulfide on inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. J.Inflamm.(Lond), 6: 35(2009)

116. Siebert N, Cantre D, Eipel C, Vollmar B: H2S contributes to the hepatic arterial buffer response and mediates vasorelaxation of the hepatic artery via activation of K(ATP) channels. Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol., 295: G1266-73(2008)

117. Simon F, Giudici R, Duy C N, Schelzig H, Oter S, Groger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabo C, Radermacher P, Calzia E: Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide during porcine ischemia/reperfusion injury. Shock, 30: 359-364(2008)

118. Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E, Cuzzocrea S, Fantozzi R, Thiemermann C: Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. Shock, 31: 267-274(2009)

119. Sodha N R, Clements R T, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath E M, Szabo C, Sellke F W: The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemiareperfusion injury. Eur.J.Cardiothorac.Surg., 33: 906-913(2008)

120. Stein A, Mao Z, Morrison J P, Fanucchi M V, Postlethwait E M, Patel R P, Kraus D W, Doeller J E, Bailey S M: Metabolic and cardiac signaling effects of inhaled hydrogen sulfide and low oxygen in male rats. J.Appl.Physiol., (2012)

121. Stellin G: Survival in trauma victims with pulmonary contusion. Am.Surg., 57: 780-784(1991)

122. Stewart C R, Landseadel J P, Gurka M J, Fairchild K D: Hypothermia increases interleukin-6 and interleukin-10 in juvenile endotoxemic mice. Pediatr.Crit.Care.Med., 11: 109-116(2010)

123. Sun Y G, Cao Y X, Wang W W, Ma S F, Yao T, Zhu Y C: Hydrogen sulphide is an inhibitor of L-type calcium channels and mechanical contraction in rat cardiomyocytes. Cardiovasc.Res., 79: 632-641(2008)

124. Suzuki M, Youle R J, Tjandra N: Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. Cell, 103: 645-654(2000)

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

126. Tamizhselvi R, Moore P K, Bhatia M: Inhibition of hydrogen sulfide synthesis attenuates chemokine production and protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. Pancreas, 36: e24-31(2008)

127. Tang G, Wu L, Liang W, Wang R: Direct stimulation of K(ATP) channels by exogenous and endogenous hydrogen sulfide in vascular smooth muscle cells. Mol.Pharmacol., 68: 1757-1764(2005)

128. Taoka S, Banerjee R: Characterization of NO binding to human cystathionine betasynthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. J.Inorg.Biochem., 87: 245-251(2001)

129. Teague B, Asiedu S, Moore P K: The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. Br.J.Pharmacol., 137: 139-145(2002)

130. Thorley A J, Ford P A, Giembycz M A, Goldstraw P, Young A, Tetley T D: Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. J.Immunol., 178: 463-473(2007)

131. Trevisani M, Patacchini R, Nicoletti P, Gatti R, Gazzieri D, Lissi N, Zagli G, Creminon C, Geppetti P, Harrison S: Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. Br.J.Pharmacol., 145: 1123-1131(2005)

132. Tripatara P, Patel N S, Collino M, Gallicchio M, Kieswich J, Castiglia S, Benetti E, Stewart K N, Brown P A, Yaqoob M M, Fantozzi R, Thiemermann C: Generation of endogenous hydrogen sulfide by cystathionine gamma-lyase limits renal ischemia/reperfusion injury and dysfunction. Lab.Invest., 88: 1038-1048(2008)

133. Ufnal M, Sikora M, Dudek M: Exogenous hydrogen sulfide produces hemodynamic effects by triggering central neuroregulatory mechanisms. Acta Neurobiol.Exp.(Wars), 68: 382-388(2008)

134. 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)

135. Wagner F, Asfar P, Calzia E, Radermacher P, Szabo C: Bench-to-bedside review: Hydrogen sulfide--the third gaseous transmitter: applications for critical care. Crit.Care, 13: 213(2009)

136. Wagner F, Wagner K, Weber S, Stahl B, Knoferl M W, Huber-Lang M, Seitz D H, Asfar P, Calzia E, Senftleben U, Gebhard F, Georgieff M, Radermacher P, Hysa V: Inflammatory effects of hypothermia and inhaled H2S during resuscitated, hyperdynamic murine septic shock. Shock, 35: 396-402(2011)

137. Wallace J L, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Fiorucci S: Gastrointestinal safety and anti-inflammatory effects of a hydrogen sulfide-releasing diclofenac derivative in the rat. Gastroenterology, 132: 261-271(2007)

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

139. Wang S, El-Deiry W S: TRAIL and apoptosis induction by TNF-family death receptors. Oncogene, 22: 8628-8633(2003)

140. Ward P A: Role of complement, chemokines, and regulatory cytokines in acute lung injury. Ann.N.Y.Acad.Sci., 796: 104-112(1996)

141. Ward P A, Lentsch A B: The acute inflammatory response and its regulation. Arch.Surg., 134: 666-669(1999)

142. Washtien W, Abeles R H: Mechanism of inactivation of gamma-cystathionase by the acetylenic substrate analogue propargylglycine. Biochemistry, 16: 2485-2491(1977)

143. Webb G D, Lim L H, Oh V M, Yeo S B, Cheong Y P, Ali M Y, El Oakley R, Lee C N, Wong P S, Caleb M G, Salto-Tellez M, Bhatia M, Chan E S, Taylor E A, Moore P K: Contractile and vasorelaxant effects of hydrogen sulfide and its biosynthesis in the human internal mammary artery. J.Pharmacol.Exp.Ther., 324: 876-882(2008)

144. 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)

145. Whiteman M, Cheung N S, Zhu Y Z, Chu S H, Siau J L, Wong B S, Armstrong J S, Moore P K: Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? Biochem.Biophys.Res.Commun., 326: 794-798(2005)

146. Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu S H, Siau J L, Bhatia M, Moore P K: Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide. Biochem.Biophys.Res.Commun., 343: 303-310(2006)

147. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan C H, Parkinson D B, Moore P K: The effect of hydrogen sulfide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. Antioxid.Redox Signal., 12: 1147-1154(2010)

148. Whitfield N L, Kreimier E L, Verdial F C, Skovgaard N, Olson K R: Reappraisal of H2S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol., 294: R1930-7(2008)

149. Wong W W, Puthalakath H: Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. IUBMB Life, 60: 390-397(2008)

150. Xiao L, Wu Y M, Zhang H, Liu Y X, He R R: Hydrogen sulfide facilitates carotid sinus baroreflex in anesthetized rats. Acta Pharmacol.Sin., 27: 294-298(2006)

151. Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa A K, Mu W, Zhang S, Snyder S H, Wang R: H2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase. Science, 322: 587-590(2008)

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

153. Zanardo R C, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace J L: Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. FASEB J., 20: 2118-2120(2006)

154. Zhang H, Bhatia M: Hydrogen sulfide: a novel mediator of leukocyte activation. Immunopharmacol.Immunotoxicol., 30: 631-645(2008)

155. Zhang H, Hegde A, Ng S W, Adhikari S, Moochhala S M, Bhatia M: Hydrogen sulfide up-regulates substance P in polymicrobial sepsis-associated lung injury. J.Immunol., 179: 4153-4160(2007)

156. Zhang H, Moochhala S M, Bhatia M: Endogenous hydrogen sulfide regulates inflammatory response by activating the ERK pathway in polymicrobial sepsis. J.Immunol., 181: 4320-4331(2008)

157. Zhang H, Zhi L, Moochhala S, Moore P K, Bhatia M: Hydrogen sulfide acts as an inflammatory mediator in cecal ligation and puncture-induced sepsis in mice by upregulating the production of cytokines and chemokines via NF-kappaB. Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol., 292: L960-71(2007)

158. Zhang H, Zhi L, Moore P K, Bhatia M: Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol., 290: L1193-201(2006)

159. Zhao W, Ndisang J F, Wang R: Modulation of endogenous production of H2S in rat tissues. Can.J.Physiol.Pharmacol., 81: 848-853(2003)

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

161. Zhi L, Ang A D, Zhang H, Moore P K, Bhatia M: Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-kappaB pathway. J.Leukoc.Biol., 81: 1322-1332(2007)

162. Zhu X Y, Yan X H, Chen S J: H2S protects myocardium against ischemia/reperfusion injury and its effect on c-Fos protein expression in rats. Sheng Li Xue Bao, 60: 221-227(2008)

163. Zhu Y Z, Wang Z J, Ho P, Loke Y Y, Zhu Y C, Huang S H, Tan C S, Whiteman M, Lu J, Moore P K: Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats. J.Appl.Physiol., 102: 261-268(2007)

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung der Universität Ulm und allen Mitarbeitern des Labors bedanken.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Dr. med. h. c. Peter Radermacher, der mir diese spannende Promotion zur Verfügung stellte und mir in seiner Funktion als Doktorvater mit Rat und Tat zur Seite stand.

Auch möchte ich gegenüber Herrn PD Dr. med. Florian Wagner meinen Dank für die stets freundliche und über die Maßen hilfreiche Betreuung aussprechen.

Mein Dank gilt auch insbesondere allen medizinisch-technischen Assistenten und Assistentinnen, insbesondere Bettina Stahl und Rosemarie Mayer, die mich während meiner Labortätigkeit unterstützten und aufmunterten. Sie sind weit mehr als man als Doktorand von wissenschaftlichen Mitarbeitern erwarten kann.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die nie die Geduld mit mir verloren haben und auf vieles verzichteten, damit ich meine Zukunft nach meinen eigenen Vorstellungen gestalten konnte. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung auf allen nur denkbaren Ebenen wäre das Medizin-Studium ein Traum geblieben. Sie haben so vieles möglich gemacht.

LEBENSLAUF:

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.