

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. M. Georgieff

Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. Peter Radermacher

Die Auswirkungen
von Hypothermie und H₂S auf die lokale
Entzündungsreaktion
in der Lunge

Dissertation

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

vorgelegt von
Nadine Gallo
aus Augsburg

2012

amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 13.07.2012

Für meine Eltern

Christine und Giovanni Gallo

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----|
| II. Abkürzungsverzeichnis..... | III |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1. Suspended animation..... | 1 |
| 1.2. Hypothermie..... | 3 |
| 1.2.1. Definition | 3 |
| 1.2.2. Mechanismen und Wirkung..... | 4 |
| 1.3. Schwefelwasserstoff..... | 6 |
| 1.3.1. Biosynthese..... | 6 |
| 1.3.2. Wirkung..... | 8 |
| 1.3.3. Experimentelle Anwendung bei entzündlichen Geschehen..... | 9 |
| 1.4. Zielsetzung der Arbeit..... | 12 |
| 2. Material und Methodik..... | 13 |
| 2.1. Geräte und Materialien..... | 13 |
| 2.1.1. Operationsmaterialien..... | 13 |
| 2.1.2. Operationsgeräte..... | 13 |
| 2.1.3. Laborgeräte und Materialien..... | 14 |
| 2.1.4. Chemikalien und Reagenzien..... | 15 |
| 2.1.5. Lösungen, Puffer..... | 15 |
| 2.1.6. Antikörper..... | 17 |
| 2.1.7. Software..... | 18 |
| 2.2. Methodik..... | 18 |
| 2.2.1. Der Versuchsaufbau am Kleintiermodell..... | 18 |
| 2.2.2. Erstellen eines Lungenhomogenats..... | 23 |
| 2.2.3. Proteinkonzentrationsbestimmung..... | 23 |
| 2.2.4. Western Blotting..... | 23 |
| 2.2.5. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)..... | 25 |

| | |
|--|----|
| 2.2.6. ELISA..... | 26 |
| 2.3. Statistik..... | 26 |
| 3. Ergebnisse..... | 28 |
| 3.1. NF- κ B..... | 29 |
| 3.2. Zytokine..... | 30 |
| 3.2.1. TNF- α | 30 |
| 3.2.2. MCP-1..... | 31 |
| 3.2.3. IL-6..... | 32 |
| 3.3. Proteine..... | 33 |
| 3.3.1. Caspase-3..... | 33 |
| 3.3.2. Bcl-xL..... | 34 |
| 3.3.3. Bcl-2..... | 35 |
| 3.3.4. pAkt..... | 36 |
| 3.3.5. Einfluss auf das Stressprotein HO-1..... | 37 |
| 4. Diskussion..... | 38 |
| 4.1. Methodik..... | 38 |
| 4.2. Hypothermie und Inflammation..... | 40 |
| 4.3. H ₂ S und Inflammation..... | 42 |
| 4.4. Auswirkungen von H ₂ S und Hypothermie auf NF- κ B..... | 44 |
| 4.5. Auswirkungen auf Stressproteine und Apoptoseparameter..... | 45 |
| 4.6. Messzeitpunkt..... | 48 |
| 5. Zusammenfassung..... | 49 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 51 |
| 7. Danksagung..... | 62 |
| 8. Lebenslauf..... | 63 |

II. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| A. | Arterie |
| AAT | Aspartataminotransferase |
| Abb. | Abbildung |
| ACE | Angiotensin converting enzyme |
| APC | Atom Percent Excess |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ARDS | Acute respiratory distress syndrome |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| BCA | β -Cyanoalanin |
| Bcl-2 | B-cell lymphoma 2 |
| Bcl-xL | Basal cell lymphoma-extra large |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| CBS | Cystathion- β -Synthase |
| CDO | Cysteindeoxygenase |
| CLP | Zäkumligatur mit anschließender Punktion (engl.: caecum ligation and puncture) |
| cpm | Zählungen pro Minute (engl.: counts per minute) |
| CSD | Cysteinsulfonatdecarboxylase |
| CSE | Cystathion- γ -Lyase |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure |
| ELISA | Enzymimmunoassay (engl.: Enzyme-linked immunosorbent assay“) |
| EMSA | Electro mobility shift assay |
| ERC | European Resuscitation Council |
| ERK | extracellular signal-regulated kinases |
| FBS | fetales Rinderserum (engl.: Fetal bovine serum) |
| FIO ₂ | Inspiratorische Sauerstoffkonzentration |
| g | Gramm |
| g _e | Erdbeschleunigung |

| | |
|-------------------|--|
| GLMT | Glycin-N-Methyltransferase |
| GSH | Glutathion |
| GSSG | Glutathiondisulfid |
| h | Stunde |
| HDH | Hypotaurindehydrogenase |
| HO-1 | Hämoxygenase-1 |
| i.e. | das heißt (lat.: id est) |
| i.p. | intraperitoneal |
| i.v. | intravenös |
| IL | Interleukin |
| ILCOR | International Liaison Committee on Resuscitation |
| INOS | induzierbare NO-Synthase |
| JNK | Januskinase |
| K ⁺ | Kalium |
| K _{ATP} | ATP-sensitiver K ⁺ -Kanal |
| KG | Körpergewicht |
| LD ₅₀ | letale Dosis (bei der 50% der Tiere sterben) |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MAD | mittlerer arterieller Druck |
| MAPK | mitogenaktivierte Proteinkinase |
| MAT | Methioninadenosyltransferase |
| Mg | Milligramm |
| min | Minute |
| mm | Millimeter |
| MPO | Myeloperoxidase |
| MPST | 3-Mercapto-Pyruvat-Sulfurtransferase |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger RNA) |
| Na ₂ S | Natriumsulfat |
| NADP | Nikotinamidadenindinukleotidphosphat |
| NaHS | Natriumdisulfat |
| NF-κB | Nuklearfaktor-kappa-B |
| nm | Nanometer |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NP40 | Nonyl Phenoxypropylpolyethoxyethanol |
| p.o. | Gabe von Medikamenten über den Mund (lat.: per os) |

| | |
|-----------------|--|
| PAG | Propargylglycin |
| PBS | Phosphatgepufferte Natriumchloridlösung |
| PEEP | Positiver endexpiratorischer Druck |
| pO ₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| poly-dldc | Poly-doxy-inosinic-deoxy-cytidylic acid |
| s.c. | subkutan (lat.: subcutaneus) |
| SDS | Sodiumdodecylsulfate |
| SIRS | Systemisch inflammatorisches Response-Syndrom |
| SO | Sulfitoxidase |
| TBS | Tris-Puffer-Lösung (engl.: tris buffer solution) |
| TEMED | Tetramethylethylenediamin |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor α |
| Tris | Tris(hydroxymethol)-aminomethan |
| TSR | Thiosulfatreduktase |
| TSST | Thiosulfatsulfurtransferase |
| TSST-1 | Toxic shock syndrome toxin-1 |
| Tween 20 | Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat |
| TX-100 | T-Octylphenoxypolyethoxyethanol |
| μ | Mikro |
| V. | Vene |
| VILI | ventilator-induced lung injury |

1. Einleitung

1.1. Suspended animation

Unter *Suspended animation* versteht man eine vorübergehende Verlangsamung der Vitalfunktionen durch äußere Einflüsse. Wörtlich übersetzt bedeutet das Schlagwort „ausgesetzte Belebung“ und beinhaltet eine drastische Reduktion zellulärer Aktivität des Organismus und damit eine Verminderung von Energieproduktion und -verbrauch.

In der Natur sind einige Beispiele von Organismen vorhanden, die ihre essenziellen Körperfunktionen verlangsamen oder anhalten können, teils sogar über mehrere Jahre hinweg. Es werden diverse solcher Zustände unterschieden, zu denen unter anderem der Winterschlaf zählt.

Verschiedene Spezies, einschließlich auch höher entwickelter Säugetierarten, besitzen diese Möglichkeit, ihre vitalen Funktionen zu verlangsamen oder beinahe komplett zu unterbrechen. Dieser Zustand ermöglicht es ihnen, letale Veränderungen der Umweltbedingungen, wie prolongierten Sauerstoffmangel oder Temperaturextrema, zu überstehen [43]. Interessanterweise gelang die gezielte Induktion einer *suspended animation* bei Spezies, die von Natur aus keinen Winterschlaf halten. Dieses Konzept wurde bereits vor ca. 40 Jahren erstmals beschrieben [41] und erlangte besondere Aufmerksamkeit in der Notfallmedizin [5]. Gelänge es, einen solchen Zustand beim Menschen hervorzurufen, wäre ein Profit für die Intensiv- und Notfallmedizin denkbar. Zahlreiche Krankheitsbilder in der Intensivmedizin sind mit einem erhöhten Sauerstoffbedarf oder hypoxischen Zuständen vergesellschaftet. Dazu gehören sowohl primär ischämische Ereignisse wie der Herzinfarkt, als auch entzündliche Geschehen wie Sepsis und Multiorganversagen. Trotz zahlreicher Untersuchungen und Forschung auf diesem Gebiet ist die Mortalität dieser Krankheitsbilder nach wie vor sehr hoch. Eine neue Betrachtungsweise findet sich in dem Konzept, welches über eine Reduktion des Energieumsatzes auf zellulärer Ebene zu einem therapeutischen Benefit führen könnte.

Tatsächlich gelang es in Experimenten einen Zustand herzustellen, der mit verminderter Stoffwechselaktivität einherging und protektive Effekte, insbesondere für das Zentrale Nervensystem, hatte. Dies gelang zunächst durch Infusion eiskalter Kristalloidlösungen und einer damit verbundenen Reduktion der Körperkerntemperatur [57]. Der Arbeitsgruppe von Safar, der als Vater der modernen Wiederbelebung gilt, gelang ein solcher Ansatz bei Hunden. Nach Einleitung eines Herzstillstandes bei den Versuchstieren tauschten die Forscher deren Blut gegen kalte Kristalloide aus und reduzierten somit den Sauerstoffgehalt im Gewebe. Die Tiere waren anschließend für eine Stunde ohne Atmung und Puls klinisch tot. Im Anschluss wurden die Tiere reanimiert und bekamen Blut retransfundiert. Drei Tage später waren alle 14 Tiere noch am Leben, davon vier mit gewissem neurologischen Defizit [35].

Neben der Induktion einer *suspended animation* durch Hypothermie wurde auch ein pharmakologischer Ansatz gefunden. Blackstone *et al.* konnten erstmals bei spontan atmenden Mäusen zeigen, dass die Inhalation von Schwefelwasserstoff ohne zusätzliche Infusion kalter Lösungen die Induktion eines derartigen Zustands einer *suspended animation* gestattet [8]. Die Autoren beschrieben, dass steigende H₂S-Konzentrationen in der Atemluft (20-80 ppm) eine dosisabhängige Verringerung der Stoffwechselrate und folglich der Körperkerntemperatur bis auf Werte knapp oberhalb der Umgebungstemperatur auslöste. Weitere Studien belegten, dass dieser Effekt mit einem entsprechenden Abfall der Atemfrequenz und des Herzminutenvolumens verbunden war, wobei jedoch der Blutdruck und das Schlagvolumen des linken Ventrikels unverändert blieben [55]. All diese Effekte waren nach Ende der H₂S-Exposition vollständig reversibel. Neben positiven Auswirkungen, die die Applikation von Hypothermie und H₂S brachten, werden jedoch auch schädliche Mechanismen auf den Körper diskutiert.

1.2. Hypothermie

1.2.1. Definition

Die Hypothermie beim Menschen ist definiert als ein Abfall der Körperkerntemperatur unter 36°C. Dabei wird zwischen akzidenteller und induzierter Hypothermie unterschieden. Erstere wird unbeabsichtigt durch Kälteexposition herbeigeführt, während die induzierte Hypothermie beabsichtigt ist und mit therapeutischer oder prophylaktischer Indikation angewandt wird. Klinisch werden nach der Körperkerntemperatur die Stadien der milden, moderaten, tiefen und profunden Hypothermie eingeteilt. Hierbei unterscheidet sich die Klassifizierung der akzidentiellen Hypothermie von der kontrollierten therapeutischen Hypothermie. Im Rahmen der kontrollierten klinischen Anwendung bezeichnet man beim Menschen demnach eine Körperkerntemperatur von 33-36°C als milde Hypothermie, eine Körperkerntemperatur von 28-32°C als moderate, 15-27°C als tiefe und eine Körperkerntemperatur von 5-14°C als profunde Hypothermie.

Tabelle 1: Einteilung der Grade kontrollierter Hypothermie nach Safar [63]

| Hypothermie | Temperatur |
|--------------------|-------------------|
| mild | 33-36°C |
| moderat | 28-32°C |
| tief | 15-27°C |
| profund | 5-14°C |

1.2.2. Mechanismen und Wirkung

In den vergangenen Jahren wurden wichtige Erkenntnisse gewonnen, was die zugrunde liegenden Mechanismen der protektiven Effekte von Hypothermie angeht. Der am besten erforschte Effekt auf den Organismus besteht in der generellen Reduktion sowohl der funktionellen als auch der strukturellen Metabolisierungsrate der Zelle und damit in einer Verringerung des Glukose- und Sauerstoffverbrauchs. Dies führt in Situationen der Minderperfusion zu einer Zellprotektion, was man sich beispielsweise in der Postreanimationsphase zunutze macht. Die ständige Weiterentwicklung der Anwendungsmöglichkeiten von Hypothermie führte schließlich zu einer Aufnahme der therapeutischen Hypothermie in die ILCOR-Guidelines [6]. Die aktuellen Leitlinien von ILCOR (International Liaison Committee on Resuscitation) und ERC (European Resuscitation Council) empfehlen die milde Hypothermie mit einer Zieltemperatur von 32-34°C über 12-24 h bei bewusstlosen Patienten nach erfolgreicher Reanimation bei Kammerflimmern (Evidence Grad A) [34].

Nachdem neue Erkenntnisse hinsichtlich der Pathophysiologie gefunden wurden, wird die Hypothermie nun auch in anderen klinischen Zusammenhängen untersucht, bei denen sie noch nicht als Standard gilt. In den vergangenen Jahren ist immer deutlicher geworden, dass die sogenannte Postreanimationsphase mit dem Krankheitsbild einer Sepsis vergleichbar ist und somit inflammatorische Prozesse nach einem Herz-Kreislauf-Stillstand eine bedeutende Rolle spielen [1] [19]. Ebenso stellen elektive Operationen und Polytraumata Situationen dar, in denen es zu einer Aktivierung des Immunsystems kommt. Ein schweres Trauma induziert eine posttraumatische Inflammation, die in einem *systemic inflammatory response syndrom* (SIRS) mit multiplem Organversagen münden kann. Gerade im Hinblick auf die Immunreaktion werden die Auswirkungen von Hypothermie jedoch sehr kontrovers diskutiert. Es geht vor allem um die Frage, ob pro- oder antiinflammatorische Effekte überwiegen und wie diese zustande kommen. Experimentelle und klinische Studien kamen mit unterschiedlichen Modellen zu

dem Ergebnis, Hypothermie habe einen antiinflammatorischen Effekt. Eine Suppression der proinflammatorischen Zytokinsynthese konnte im Rahmen elektiver Eingriffe und nach verschiedenen traumatischen Insulten wie Schädel-Hirn-Trauma oder Hämorrhagie nachgewiesen werden [27,67]. Protektive Effekte konnten ebenso Meybohm *et al.* in einer Studie zeigen, die kardiale Ischämien an Schweinen untersuchten. Die Auswirkungen der Hypothermie auf die Inflammation wurden hierbei anhand von Entzündungs- und Apoptoseparametern untersucht. Die Hypothermie war assoziiert mit einer verringerten Einwanderung von Immunzellen, erniedrigter Apoptoserate und geringeren IL-1 β und IL-6-mRNA-Spiegeln im ischämischen Myokard. Somit konnte gezeigt werden, dass die Hypothermiebehandlung den myokardialen Schaden nach kardiopulmonaler Wiederbelebung durch eine reduzierte Apoptoserate und verringerte Expression proinflammatorischer Zytokine vermindert [32]. Eine randomisierte Studie an Ratten konnte ebenfalls antiinflammatorische Effekte von H₂S nach erhöhter Entzündungsaktivität durch ein Ischämie-Reperfusionereignis nachweisen [46].

In der Vergangenheit gab es allerdings auch Studien, die für einen proinflammatorischen Effekt von H₂S sprachen. Anhand von *In-vitro*-Studien an humanen Zellen, die durch LPS beziehungsweise TSST-1 stimuliert waren, wurde gezeigt, dass Hypothermie die Aktivität von NF- κ B verlängert und die Produktion proinflammatorischer Zytokine steigert [54]. Auch in Tierversuchen mit experimenteller Sepsis erwies sich eine Hypothermie als zusätzliche Noxe. Hypotherme Ratten mit peritonealer Kontamination und präseptischer Infektion wiesen eine signifikant niedrigere Überlebensrate im Vergleich zu normothermen Tieren auf. [53].

Diese teils widersprüchlichen Ergebnisse zu Auswirkungen der Hypothermie bei inflammatorischen Prozessen gilt es näher zu untersuchen um herauszufinden, ob Hypothermie per se protektive oder eher schädliche Auswirkungen hat und ob demnach für die Anwendung bei *suspended animation* mit positivem Outcome zu rechnen ist.

1.3. Schwefelwasserstoff

Neben der Induktion einer *suspended animation* mit Hilfe von kalten kristallinen Lösungen wurde ein pharmakologischer Weg mit H₂S erprobt, der ebenfalls eine Reduktion der Körpertemperatur herbeiführt.

Schwefelwasserstoff (H₂S) ist ein farbloses, entzündliches Gas mit einem charakteristischen Geruch, der an faule Eier erinnert. H₂S entsteht in größeren Mengen bei biologischen Fäulnisprozessen. In der Vergangenheit wurde es vor allem aufgrund seiner Toxizität und umweltschädigender Wirkung erforscht [49]. In letzter Zeit jedoch wird H₂S vor allem wegen seiner Eigenschaften bezüglich Cytoprotektion kontrovers diskutiert.

1.3.1. Biosynthese

Im menschlichen Körper entsteht H₂S endogen aus L-Cystein, eine Reaktion, die durch die Enzyme *Cystathione-γ-lyase* (CSE) und *Cystathione-β-synthetase* (CBS) katalysiert wird. Während die CBS vor allem für die Freisetzung von H₂S in Zentralnervensystem und Niere verantwortlich ist, wird die CSE hauptsächlich in der Leber und in glatten Muskelzellen exprimiert. Wie die beiden anderen im Körper vorkommenden gasförmigen Moleküle Stickstoffmonoxid (NO) und Kohlenmonoxid (CO), kann auch H₂S schnell durch Zellmembranen diffundieren, ohne ein Transportsystem zu benötigen. Deshalb wird H₂S auch als der „Dritte endogene gasförmige Transmitter“ bezeichnet [49].

1.3.2. Wirkung

Schwefelwasserstoff scheint eine Vielzahl von biologischen Prozessen zu beeinflussen. In Studien wurden, ähnlich wie bei NO, in niedrigen Konzentrationen zytoprotektive Eigenschaften wie antinekrotische oder antiapoptotische Wirkungen gefunden [11]. Höhere Konzentrationen im millimolaren Bereich waren hingegen mit zytotoxischen Effekten assoziiert. Dazu zählten die Entstehung freier Radikale, eine Hemmung der Cytochrom c-Oxidase [12,31], Verarmung an Glutathion, intrazelluläre Eisenfreisetzung und proapoptotische Vorgänge [60]. Der endogenen H₂S-Freisetzung kommt weiterhin eine besondere Funktion bei der Aufrechterhaltung der Integrität und Durchblutung der Organe des Hepato-Splanchnikus-Systems zu [17,18], deren besondere Bedeutung in der Entwicklung eines Multiorganversagens seit mehreren Jahren postuliert wird [18]. Diese protektiven Effekte beruhen zum einen auf einer Vasodilatation, die durch die Aktivierung ATP-sensitiver K⁺-Kanäle (K_{ATP}) verursacht wird [66]. Zum Anderen wird der Hemmung von Leukozyten-Endothel-Interaktionen und der damit verbesserten mikrozirkulatorischen Perfusion ein positiver Effekt zugeschrieben [61]. Darüber hinaus wird die durch NO herbeigeführte Vasodilatation gefördert. Die Interaktionen zwischen H₂S und NO scheinen jedoch sehr komplex zu sein. Niedrige Dosen H₂S scheinen den vasodilatatorischen Effekt von NO zu mindern, indem NO verdrängt wird und es zu Bildung von Nitrosothiol kommt [2]. Schließlich scheint auch die lokale Sauerstoffkonzentration Einfluss auf die vasomotorischen Effekte von H₂S zu haben: Während bei 40 µM O₂-Konzentration (entspricht pO₂ von 30 mmHg) eine Vasodilatation beobachtet wurde, zeigte sich bei 200 µM (entspricht pO₂ von 150 mmHg) eine Vasokonstriktion [7].

Es ist jedoch festzuhalten, dass H₂S ebenfalls toxische Eigenschaften besitzt. Eine der Ursachen für die Toxizität von Schwefelwasserstoff liegt in der Inhibition der Cytochrom c-Oxidase begründet [25]. Diese stellt als der terminale Enzymkomplex der Elektronentransportkette einen Schlüsselfaktor für die mitochondriale Zellatmung dar [31]. H₂S kann mit dem aktiven Zentrum der Cytochrom c-Oxidase interagieren und sie dadurch zumindest teilweise hemmen. Somit ist H₂S ein stärkerer Inhibitor mitochondrialer Respiration als Zyanid. Durch derartige

Hemmung der mitochondrialen Zellatmung werden zum einen die toxischen Effekte von H₂S und die Regulation zellulären Sauerstoffverbrauchs erklärt, aber auch eine Reduktion der Stoffwechselrate und der Körpertemperatur, was zu der Induktion einer *suspended animation* genutzt wird.

1.3.3. Experimentelle Anwendung bei entzündlichen Geschehen

Aufgrund seiner Eigenschaften war H₂S Forschungsschwerpunkt zahlreicher Studien, welche pathologische Zustände simulierten, die von einer Reduktion der Stoffwechselrate profitieren könnten. Dabei wurden in zahlreichen Studien antiinflammatorische Effekte gefunden. Ein Beispiel stellen Ischämie-Reperfusionseignisse dar. Auf zellulärer Ebene wird unter anderem die Freisetzung reaktiver Sauerstoff- und Nitrogenspezies, sowie eine Schädigung des intrazellulären Energiemetabolismus bei mitochondrialem Schaden als ursächlich für einen Reperfusionsschaden angesehen. Neben der H₂S-induzierten Inhibition der mitochondrialen Atmung als Schutz bei solchen Ereignissen und der Reduktion der Bildung von Sauerstoffradikalen, spielen antiinflammatorische Eigenschaften eine Rolle [39]. Studien belegen, dass Ischämie-Reperfusionsschäden am Herzen [12], der Lunge [16], der Leber [24], sowie nach aortaler Okklusion [45] verhindert werden konnten. Vor allem am Herzen konnte gezeigt werden, dass exogen zugeführtes H₂S vor dem Koronarverschluss, bzw. vor der Reperfusionphase die Infarktgröße minderte und die linksventrikuläre Struktur und Funktion erhielt [11]. Der protektive Effekt wurde der Inhibition der myokardialen Inflammationsreaktion zugeschrieben. Dazu führten eine reduzierte Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität, physiologische IL-1 β -Spiegel 4 Stunden nach Reperfusion, sowie eine komplette Inhibition der Leukozyten-Endothel-Interaktion. Außerdem konnte die normalerweise erhöhte Aktivität von p38-MAPK, JNK und NF- κ B durch eine Vorbehandlung mit NaHS verhindert werden [46]. Antiapoptotische Effekte zeigten sich unter anderem durch eine verringerte Expression von Caspase-3 nach H₂S-Behandlung. [11]

Die Frage, ob die Induktion einer *suspended animation* im Rahmen einer Sepsis organprotektive Qualitäten aufweist, wird derzeit ebenfalls untersucht. Neuere Daten zeigen, dass eine nur 20-minütige Vorbehandlung mit inhaliertem H₂S (150 ppm), ähnlich der Wirkung von inhaliertem Stickstoffmonoxid (NO), die Hypoxietoleranz von Mäusen dramatisch verbesserte [8]. Darüber hinaus kann H₂S offensichtlich als Antioxidans und insbesondere als *scavenger* von Peroxynitrit wirken, dessen zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis durch die konsekutive Aktivierung der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase als weitestgehend etabliert gilt [3].

Ein weiteres häufiges Krankheitsbild auf Intensivstationen, bei dem die Anwendung von H₂S eine Therapiestrategie darstellen könnte, ist die ventilator-induced lung injury (VILI) [14]. Die maschinelle Beatmung ist eine unverzichtbare Maßnahme bei der Therapie kritisch kranker Patienten. Neben der lebenserhaltenden Qualitäten kann maschinelle Ventilation jedoch auch einen Lungenschaden in der gesunden Lunge induzieren beziehungsweise eine akute Pneumonie verschlimmern, was zu einer VILI führen kann. Bei diesem Krankheitsbild kommt es durch zyklisches Dehnen der Lunge zu einem Gewebeschaden. Es folgen Lungenödem, Einwanderung von Neutrophilen und die Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren [29]. Die inflammatorische Antwort auf maschinelle Ventilation ist dabei nicht auf die Lunge begrenzt, sondern kann auf extrapulmonale Organe übergreifen und zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit lebensbedrohlichem Organversagen führen. Obwohl die Anwendung niedriger Tidalvolumina den Lungenschaden bei Patienten mit *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) verbessern kann, bleibt VILI ein Hauptproblem auf Intensivstationen mit inakzeptabel hoher Morbiditäts- und Mortalitätsrate. Kürzlich durchgeführte Studien, welche die Anwendung von H₂S bei VILI untersuchten, postulierten erstmals einen protektiven Effekt bei diesem Krankheitsbild. Durch Anwendung von H₂S konnte im Wesentlichen die Zytokinfreisetzung, das Einwandern von Neutrophilen und die alveoläre Wandverdickung reduziert werden [14].

Nichtsdestoweniger hat die Inhalation von H₂S auch potenziell schädliche und proinflammatorische Effekte: Neben vasodilatatorischen Eigenschaften mit

Hypotension, die unter anderem eine Rolle beim septischen Kreislaufversagen spielen [9], werden ebenso negative Auswirkungen auf entzündliche Geschehen beschrieben. Die Hemmung der endogenen H₂S-Produktion war mit einer verminderten Organschädigung in Kleintiermodellen mit Endotoxinämie, Pankreatitis und abdomineller Sepsis verbunden [10,32], wohingegen die Injektion von H₂S-Donatoren Organschäden potenzierte. Diese Effekte wurden auf eine Aktivierung von NF-κB und die konsekutive Verstärkung einer proinflammatorischen Antwort mit erhöhter Apoptoserate [4] zurückgeführt. Zuletzt muss bedacht werden, dass nicht nur Schwefelwasserstoff, sondern auch die H₂S-bedingte Hypothermie *per se* die Prognose eines septischen Schocks verschlechtern kann [40].

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Suspended animation, ein Zustand, der aufgrund der Verlangsamung der Vitalfunktionen protektive Eigenschaften haben könnte und deshalb Gegenstand der Forschung ist, kann sowohl durch Hypothermie als auch durch H₂S induziert werden. Von beiden Substanzen werden in experimentellen *in vitro*- wie *in vivo*-Studien derzeit die Auswirkungen auf die Entzündungsreaktion untersucht. Die Ergebnisse werden kontrovers diskutiert, da beide Substanzen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften aufwiesen. In vorangegangenen Untersuchungen kamen die unterschiedlichsten Zellreihen und Versuchsanordnungen zur Anwendung.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Auswirkungen von Hypothermie und H₂S auf die Entzündungsreaktion in der Lunge unter möglichst realistischen Bedingungen zu untersuchen. Damit soll eine höhere Übertragbarkeit auf eine reale Situation im Operationssaal oder auf einer Intensivstation gewährleistet werden. Es wurde weiterhin Wert darauf gelegt, die Effekte von Hypothermie und H₂S jeweils getrennt und in Kombination zu betrachten. Hierzu diene die Bestimmung wichtiger Zytokine und Proteine im postmortalen Lungengewebe bei maschinell beatmeten und *sham*-operierten Mäusen. Im Einzelnen sollen folgende Fragen geklärt werden:

- Welche immunologischen Effekte zeigt eine induzierte Hypothermie bei anästhesierten, beatmeten Mäusen?
- Ist die immunologische Antwort abhängig von NF-κB?
- Hat H₂S alleine einen Effekt beziehungsweise kann H₂S den temperaturbedingten Effekt potenzieren?

2. Material und Methodik

2.1. Geräte und Materialien

2.1.1. Operationsmaterialien

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

2.1.2. Operationsgeräte

| | |
|---------------------------------|--|
| Flussköpfe | Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA |
| Mikromanometrie-Katheter 1,4 Fr | SPR 864, Millar Instruments, Houston, |

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

2.1.3. Laborgeräte und Materialien

| | |
|--------------------------------|--------------------------|
| Combitips | Eppendorf |
| Elektrophoresekammer | Bio- Rad |
| Entwicklergerät | Kodak |
| Gel-Blotting-Paper | Schleicher-Schuell |
| Hypercassette | Amersham Bioscience |
| Konisches Röhrchen 15ml, 50ml | Becton Dickinson Labware |
| Magnetrührer MR 2002 | Heidolph |
| Magnetrührstäbchen | PTFE Labware |
| Medical x-Ray film Cronex 5 | Agfa |
| Messzylinder | Hirschmann |
| Mikroliter Syringes | Hamilton |
| Multipipette | Eppendorf |
| Multiply μ Strip | Sarstedt |
| Nitrozellulose Membran | Bio- Rad |
| Parafilm PM 996 | Pechiney |
| Pasteur Pipetten | VWR International |
| Peltier Thermal Cycler PTC-200 | MJ Research |
| Pinzette | Millipore |
| Pipetboy | Biosciences |
| Pipetten | Eppendorf |
| Präzisionswaage | Sartorius AG Göttingen |
| Semi-Dry-Blotter | Bio- Rad |
| Shaker | ELMI |
| Spacer | Bio- Rad |

| | |
|----------------------------|-----------|
| Stripette 5ml, 10ml, 25ml | Corning |
| Trans-Blot Transfer Medium | Bio- Rad |
| Zentrifuge | Eppendorf |

2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

| | |
|-----------------------------------|-----------------------|
| ³² Pγ-ATP | Hartmann |
| Acrylamide-Bis solution 29:1, 30% | Serva |
| APS 10% | SIGMA |
| Aqua B. Braun | Braun |
| Bovine Serum Albumin Fraction V | PAA Laboratories GmbH |
| Eco Pol- Puffer | New England Biolabs |
| Milchpulver T145.2 | Roth |
| NF-kB p65 Oligo | Biomers Ulm |
| PBS | GIBCO |
| Poly(dI-dC) | Roche |
| Ponceau | Sigma |
| Precision Plus Protein | Biorad |
| Standards Kaleidoscope | |
| Protein Assay | Biorad |
| Super Signal West Femto | Pierce |
| Luminol Enhancer Solution | |
| Super Signal West Femto | Pierce |
| Stable Peroxide Buffer | |
| T4 Polynukleotidkinase | New England Biolabs |
| TEMED 99% | SIGMA |

2.1.5. Lösungen, Puffer

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 1% Tx- 100, 0,5% NP40, 10% Glycerol, 0,1 mM Na-Vandat, 2 mM PNPP, 2 mM DTT, 1 mM β-Glycerophosphat, 10 μM Leupeptin

SDS Probenpuffer: 62,5 mM Tris HCl (pH 6,8 bei 25°C), 2% w/v SDS, 10% Glycerol, 50 mM DTT, 0,01% w/v Bromphenolblau

TBS 10fach: 0,1 M TrisHCl pH 8; 87,7 g NaCl add 1 l Aqua dest.

Blotto A: 5% Milchpulver, 0,05% Tween- 20 in 1x TBS

Blotto B: 1% Milchpulver, 1% BSA, 0,1% Tween- 20 in 1x TBS

Lower Buffer: 1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4% SDS add 1 l Aqua dest.

Upper Buffer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4% SDS add 1 l Aqua dest.

Blotting Buffer: 25 mM Tris; 0,2 M Glycin; 20% Methanol pH 8,5

Running Gel: Lower Buffer, Aqua dest., Acrylamide, Temed, APS

Stacking Gel: Upper Buffer, Aqua dest., Acrylamide, Temed, APS

Endmarkierungsansatz: 1 µl NF-κB-1 (5 pmol/µl), 2 µl PNK-Puffer, 5 µl ³²Pγ-ATP 50 µCi, 11 µl H₂O, 1 µl T4-Polynukleotidkinase

Polynukleotidkinase- Puffer: 70 mM Tris Hcl, 5 mM DDT, 10 mM MgCl₂ pH 7,6; 25°C

10x EMSA Puffer: 100 mM Tris-Hcl pH7,9, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 20% Glycerol, 100 µg BSA

Gelshift- Mix: 50 000 cpm NfκB p65 Oligo, 0,5 µl 20 mM DTT, 1 µl 10x EMSA-Puffer, 1 µl Poly(dI-dC), 5 µl Aq bidest

2.1.6. Antikörper

Tabelle 2: Primärantikörper

| Primär-antikörper | Hersteller | Verdünnung | Dilutionspuffer | Gel |
|--------------------------|----------------------|-------------------|---------------------------|------------|
| Cleaved Caspase 3 | Cell signaling #9665 | 1:1000 | Primary Antibody Dilution | 15% |
| Bcl-xL | Cell signaling #2764 | 1:2500 | Primary Antibody Dilution | 15% |
| Bcl-2 | Cell signaling #2876 | 1:1000 | Primary Antibody Dilution | 12% |
| pAkt | Cell signaling #9215 | 1:1000 | Blotto B | 7,5% |
| HO-1 | Epitomics #1922 | 1: 2000 | Primary Antibody Dilution | 7,5% |

Tabelle 3: Sekundärantikörper

| Sekundärantikörper | Hersteller | Verdünnung | Dilutionspuffer |
|---------------------------|---------------------|-------------------|------------------------|
| Goat anti-rabbit | Santa Cruz #sc-2004 | 1:15000 | 5% Milch |

Tabelle 4: Ladungskontrolle

| Ladungskontrolle | Hersteller | Verdünnung |
|-------------------------|----------------------|-------------------|
| Aktin | Cell signaling #1615 | 1:20000 |
| Tubulin | Cell signaling #2148 | 1:5000 |

2.1.7. Software

- Excel 12.0 (Microsoft, Redmond, WA, USA)
- Powerpoint 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA)
- Open Office 3.1
- Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)
- Sigmastat (Systat Software Inc. (SSI), Richmond, CA, USA)
- Sigmaplot (Systat Software Inc. (SSI), Richmond, CA, USA)

2.2. Methodik

2.2.1. Der Versuchsaufbau am Kleintiermodell

Alle Versuche fanden im Rahmen der Deutschen und Europäischen Richtlinien zum „Umgang mit Labortieren“ statt. Das Versuchsprotokoll wurde sowohl von dem Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm als auch vom Regierungspräsidium Tübingen (Baden-Württemberg) genehmigt. Für die Versuchsreihe bot sich die Spezies Maus insbesondere an, da bereits Daten im Sinne einer Dosis-Wirkungsbeziehung vorlagen. Für die Versuche wurden Mäuse (C57Bl/6) männlichen Geschlechts, im Alter von 10-12 Wochen, mit einem Körpergewicht von 22-27 g verwendet.

Die Versuchstiere wurden nach Transfer vom Tierforschungszentrum Oberberghof der Universität Ulm zu den Räumlichkeiten der Versuchsdurchführung kontinuierlich betreut. Zwischen dem ersten (*sham*-Operation) und zweiten Versuchsteil (Instrumentierung) erhielten die Tiere freien Zugang zu Nahrung und Trinkwasser. Einer Erniedrigung der Körpertemperatur konnte mithilfe einer Wärmematte vorgebeugt werden. Die s.c.-Gabe von Flüssigkeit diente der Kompensation eines intravasalen Volumenmangels. Die Zuordnung zu den jeweiligen Operationsgruppen erfolgte nach einem Randomisierungsplan.

- Kontrollgruppe *sham*-Operation, 38°C
- Kontrollgruppe *sham*-Operation, 27°C
- H₂S (inhalativ), *sham*-Operation, 38°C
- H₂S (inhalativ), *sham*-Operation, 27°C
- Native Tiere

Bei den mit „27°C“ bezeichneten Versuchsgruppen handelt es sich um Versuchstiere, bei denen der durch die H₂S-Inhalation zu erwartende Abfall der Körperkerntemperatur nicht korrigiert, sondern auf einem Sollwert von 27°C gehalten wurde. In den anderen Versuchsgruppen hingegen war die Konstanthaltung der Körpertemperatur bei 38°C mit Hilfe eines *closed-loop*-Wärmesystems garantiert.

Bei der Gruppe der sogenannten Nativtiere handelt es sich um Mäuse, bei denen keine Laparo- und Tracheotomie und maschinelle Beatmung vorgenommen wurde. Es erfolgte lediglich die Entnahme von Blut- und Organproben um die gleichen Parameter wie bei den Versuchsgruppen zu erheben und mit ihnen in Relation zu setzen.

2.2.1.1. Die *sham*-Operation

Der Versuch stellte eine sogenannte *sham*-Operation dar. Diese Gruppe sollte als Kontrolle für eine später geplante Gruppe von Tieren mit Sepsis, ausgelöst durch zökale Ligatur und Punktion, dienen. Nach Wiegen des Versuchstieres erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 120 µg/g Ketamin, 1,25 µg/g Midazolam und 0,25 µg/g Fentanyl zur Anästhesie-Induktion (Gesamtvolumen ca. 180-250 µl). Die rektale Körperkerntemperatur wurde gemessen und durch *feedback*-Regulation mit Wärmematte und -lampe bei einer Temperatur von 37-38°C konstant gehalten. Die Bauchdecke wurde median über ca. 1 cm eröffnet und anschließend in zwei Schritten wieder verschlossen (4.0 Naht). Zur Kompensation des perioperativen Flüssigkeitsverlustes diente die Injektion von 1 ml Ringerlaktat-Lösung subkutan in

den Rücken. Auch nach Rückgabe des Tieres in den gewärmten Käfig erfolgten in den Rücken repetitive subkutane Gaben von 1 ml Ringerlaktat, in dem 4 µg/g Glukose gelöst waren. Dies sollte die postoperativ unzureichende Trinkwasseraufnahme kompensieren. Zusätzlich diente Buprenorphin 1 µg/g der postoperativen Analgesie sowie erneut nach 8 Stunden. Ebenso wurden unmittelbar nach der Operation sowie nach 8 und 16 h in inhalativer Kurznarkose mit Isofluran s.c. Antibiotika (Ceftriaxon 30 µg/g und Clindamycin 30 µg/g) appliziert.

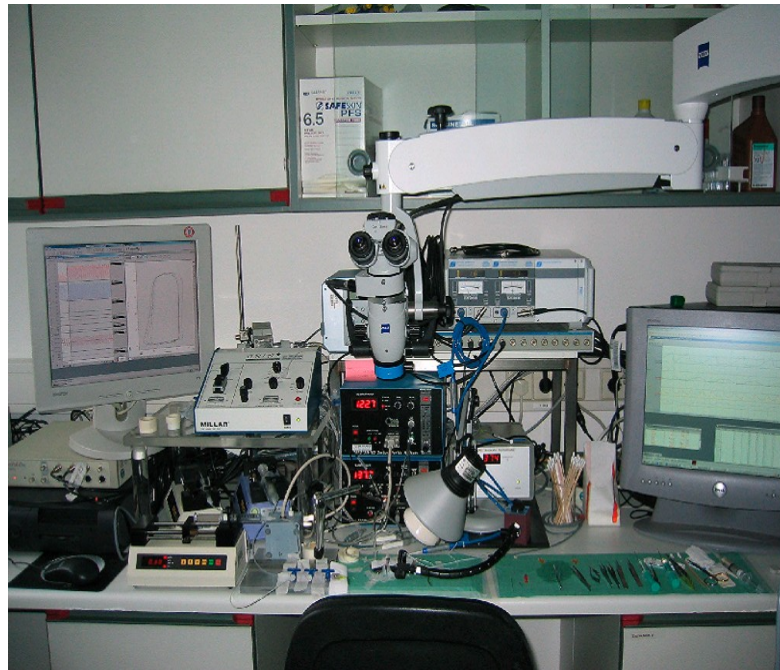


Abbildung 2: Operationsplatz



Abbildung 3: Maus während intensivmedizinischer Instrumentierung und maschineller Beatmung mit Trachelakanüle sowie Kanülierung der Vena jugularis externa dextra und Arteria Carotis comunis dextra

2.2.1.2. Intensivmedizinisches Monitoring

Der zweite Teil des Versuches, die Implantation des intensivmedizinischen Monitorings für die physiologischen Messungen, erfolgte nach 15 Stunden. Wie zu Beginn des ersten Versuchsteils wurde das Versuchstier gewogen und das Gewicht dokumentiert. Anschließend wurde durch intraperitoneale Injektion von 120 µg/g Ketamin 1,25 µg/g Midazolam und 0,25 µg/g Fentanyl die Anästhesie induziert (Gesamtvolumen: ca 180-250 µL). Durch eine *feedback*-Regulation konnte die rektal gemessene Körpertemperatur über eine Wärmematte und -lampe in gewünschter Höhe (38°C/27°C) konstant gehalten werden. Über eine Inzision am Hals wurden die Tiere tracheotomiert und intubiert. Die maschinelle Beatmung erfolgte mit Tidalvolumina von 8-10 ml/kg KG, angepasst an das endexpiratorische CO₂, Atemfrequenz von 135 pro Minute, FiO₂ von 0.5 und einem PEEP von 3 cm H₂O. Direkt nach Anschluss an die maschinelle Beatmung wurde einem Teil der Tiere 100 ppm H₂S über das Inspirationsgemisch zugeführt. Die *V. jugularis externa dextra* wurde zur Infusion von 80 µl/g*h einer balancierten kolloidalen Volumenersatzlösung (Hextend®) kanüliert. Der Aufrechterhaltung der Anästhesie diente eine kontinuierliche Infusion von Ketamin 30 µg/g*h und Fentanyl 0,3 µg/g*h.

Für die Überwachung hämodynamischer Parameter wurden neben Herzfrequenz und systemarteriellem Blutdruck auch HZV, Ventrikelvolumina, Ejektionsfraktion und -volumen erfasst. Kontrollen von Säure-Basen-Status und Gaspartialdrücken mittels Blutgasanalysator erfolgten ebenfalls in regelmäßigen Abständen.

Am Versuchsende nach 8 Stunden erfolgte eine terminale Blutentnahme aus der *V. cava inferior* und die anschließende Eröffnung des Thorax. Daran schloss sich die Beendigung der maschinellen Beatmung an. Flüssigkeitsbilanzen inkl. Volumensubstitution, Blutentnahmen und Urinproduktion wurden protokolliert. Sämtliche operativen Eingriffe erfolgten unter sterilen Kautelen.

Neben den sham-operierten Versuchstieren dienten weitere Tiere, bei denen keine Laparo- und Tracheostomie und maschinelle Beatmung vorgenommen wurde als Kontrollgruppe für Blut- und Organproben.

2.2.2. Erstellen eines Lungenhomogenats

Nach Entnahme der Lunge nach insgesamt fünfstündiger H₂S-Inhalation wurde diese bei -80°C eingefroren. Auf Trockeneis gelagert wurden die Proben nach Zugabe von 100 µl PBS mit einem Homogenisator zerkleinert. In das Homogenisat wurden 100 µl 2-fach Lysepuffer pipettiert, für 30 min inkubiert und anschließend weitere 30 min bei 10000g_e zentrifugiert. Der Überstand wurde auf vier Eppendorfgefäße aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Bio-Rad Protein-Assay Dye Reagent Concentrate (450ml, Bio-Rad Laboratories GmbH). Der Assay beruht auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford (1976), bei dem verschiedene Proteinkonzentrationen durch Bindung von Proteinen an einen Farbstoff zu proportionalen Farbveränderungen führen. Das eingesetzte Coomassie-Brilliantblau G-250 verlagert bei Proteinbindung sein Absorptionsmaximum von 465nm zu 595nm. Als Proteinstandard diente bovines Serumalbumin. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Herstellerangaben und ermöglichte die Konzentrationsbestimmung im linearen Bereich einer Eichgeraden. Die Messung wurde am Spektrophotometer GeneQuant pro durchgeführt.

2.2.4. Western Blotting

2.2.4.1. *Proteinauftrennung und Transfer*

Zum Auftrennen der Proteine dienten Polyacrylamid-Trenngele (29:1). Diese enthielten je nach Größe des zu untersuchenden Proteins eine Acrylamidkonzentration von 7,5% bis 15%. Dem eigentlichen Trenngel war nach der Methode nach Lämmli ein Sammelgel vorgeschaltet, dessen pH-Wert um zwei

Einheiten tiefer liegt als im Trenngel. Dies führt zu einer Verschärfung der Proteinbanden und somit zu einer besseren Trennung. Für die Proteinauftrennung wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:1 mit zweifach Probenpuffer (2% SDS; 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 10% Glycerol, 50 mM DTT, 0,01% Bromphenolblau) gemischt und anschließend bei 95°C gekocht. Dadurch konnte eine vollständige Denaturierung der Proteine gewährleistet werden und sie lagen gleichmäßig negativ geladen vor. Somit erfolgte ausschließlich eine Trennung anhand der Molekülgröße. Die Menge an Proteinlösung pro Tasche betrug 10 µl. Als Marker wurden 8 µl Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (Bio-Rad) aufgetragen. Die Proteintrennung erfolgte für 15 min bei 90 V und für ca. 35 min bei 180 V. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Halbtrockenverfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu wurde das Gel auf eine mit Blottpuffer getränkte Nitrozellulose-Membran gelegt. Der Transfer fand bei 20 V für 60 min statt. Die Gleichmäßigkeit der Proteinladung wurde anschließend mithilfe der Ponceau-Färbung überprüft.

2.2.4.2. Antikörperinkubation

Die Blots wurden eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockpuffer blockiert. Dies diente der Absättigung der Membran um unspezifisches Binden zu verhindern. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Blots gewaschen. Um den entstandenen Antigen-Antikörperkomplex sichtbar zu machen, erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper goat anti-rabbit für eine Stunde bei Raumtemperatur. Wieder wurde 6x7 bzw. 3x5 min gewaschen. Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte mit dem Chemilumineszenz-Reagenz Supersignal (Pierce) nach Herstellerangaben. Die Exposition erfolgte auf Agfa Cronex-5-Filmen. Die Auswertung der Western Blots erfolgte mit Hilfe des Programms Image J nach Herstellerangaben.

2.2.5. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis DNA-bindender Proteine. Hierzu wurden komplementäre NF-κB-Oligonukleotide in einer Konzentration von 1 µg/µl in Aqua bidest gelöst und für 10 min bei 80°C im Heizblock erhitzt um die DNA zu denaturieren. Anschließend wurde der Ansatz langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Der entstandene Doppelstrang wurde mittels T4-Polynukleotidkinase einer Endmarkierung mit radioaktivem ³²P unterzogen und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Qi Aquick Nucleotide Removal Kit Protocol von Qiagen®. Am Ende erfolgte die Elution in 50 µl Aqua dest. Für die Bindungsreaktion wurden 10 µg Proteinlysate in 10 µl EMSA-Puffer mit 50.000 cpm ³²P-markiertem Oligonukleotid (HIV-κB-Sequenz) 30 min bei Raumtemperatur unter Zugabe von 1 mM DTT und 1 µg poly dIdc in einem Gesamtvolumen von 10 µl inkubiert:

Oligosequenz (HIV-κB-Site):

sense: 5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C- 3'

reverse: 5'- GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T- 3'

Die Proben wurden auf einem 7%igen nativen Polyacrylamidgel in 0,5xTBE-Laufpuffer aufgetrennt (3 h, 200 Volt). Zuvor musste das Gel bei 100 Volt 30 min äquilibriert werden. Nach dem Lauf wurde das Gel für 30 min fixiert (5% Eisessig; 5% Glycerol; 15% Methanol in Aqua bidest) und anschließend 10 bis 15 min gewässert. Zum Trocknen wurde es eine Stunde bei 80°C auf Whatmanpapier in einen Vakuumgeltrockner gegeben. Getrocknete Gele wurden ca. 24 h mit Agfa Cronex-5-Film bei -80°C exponiert.

2.2.6. ELISA

Die Konzentrationen von Zytokinen und Chemokinen im Lungengewebe wurden mittels kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassays bestimmt. Sämtliche Schritte sowie die Vorbereitung und Verdünnung der Proben erfolgten nach den Vorgaben des Herstellerprotokolls in der klassischen „Sandwich-ELISA“-Technik. Dies beinhaltete die Inkubation der ELISA-Platten mit einem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C, das sogenannte „*Coating*“. Es folgten mehrere Waschstschritte und das Blockieren mit PBS/10% FBS für die Dauer von zwei Stunden. Nach erneutem Waschen wurden im Anschluss die Proben bzw. die Verdünnungen des Standards jeweils als Doppelbestimmung hinzugegeben und wieder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde der mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Erkennungs-Antikörper aufgebracht, der, nach erneuter Inkubation bei Raumtemperatur und Waschen, das zugehörige Substrat umsetzte. Direkt im Anschluß wurden die Extinktionswerte photometrisch bei 450 nm gemessen („Cytofluor Series 4000“, Perspective Biosystems, Framingham, USA). Die entsprechenden Konzentrationen wurden mittels der parallel durchgeführten Standardkurve berechnet.

2.3. Statistik

Im Rahmen einer deskriptiven Statistik wurden für die Messergebnisse der verschiedenen Versuchsgruppen der Median, die 25. und 75. Perzentile sowie Minimum und Maximum ermittelt. Ergebnisse, bei denen signifikante Unterschiede vorliegen, sind in den Diagrammen als solche gekennzeichnet. Die statistische Auswertung wurde durchgeführt, indem zunächst durch Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests überprüft wurde, ob es sich bei den ermittelten Messwerten um normalverteilte Ergebnisse handelt. War dies der Fall, so wurde anschließend unter Verwendung des univariaten ANOVA-Tests untersucht, ob durch den Einfluss der Maßnahmen (Hypothermie und H₂S) sich die

verschiedenen Versuchsgruppen signifikant voneinander unterscheiden. Bei Signifikanz kam als post-Hoc-Test der Student-Newman-Keuls-Test zum Einsatz. Waren die Ergebnisse im Kolmogorov-Smirnov-Test nicht normalverteilt, wurde die Varianzanalyse mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bei Signifikanz wurde anschließend der Dunn's-Test angewandt. Bei den Tests wurde ein p-Wert kleiner als 0,05 als signifikant erachtet. Zur Berechnung und statistischen Auswertung kam das Programm Sigmastat® in der Version 2.03, für die graphische Darstellung der Ergebnisse das Programm Sigma Plot® in der Version 8.0 zur Anwendung.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den Untersuchungen zum Einfluss von Hypothermie und H₂S auf die Entzündungsreaktion in der Lunge bei maschinell ventilerten, *sham*-operierten Mäusen vorgestellt.

Dabei wird zunächst in Kapitel 3.1 die Einflussnahme auf die NF-κB-Aktivität behandelt, die mit Hilfe des EMSA-Verfahrens gemessen wurde. Kapitel 3.2 beschreibt vergleichend die Auswirkungen auf die Zytokine TNF-α, IL-6 und MCP-1 in den verschiedenen Versuchsgruppen, die das ELISA-Verfahren hervorbrachte. Die Auswirkungen von Hypothermie und H₂S auf Cleaved Caspase-3, Bcl-2, Bcl-xL, pAkt und HO-1 werden in Kapitel 3.3 beschrieben. Gemessen wurde dabei der Proteingehalt in der postmortalen Lunge mithilfe des Westernblot-Verfahrens. Die gemessenen Werte werden relativ zu einem nativen Tier angegeben. Zur Ladungskontrolle der Westernblots sind jeweils die Banden mit Aktin- bzw. Tubulin-Kontrolle abgebildet.

3.1. NF- κ B

Abb. 5 zeigt die NF- κ B- Aktivierung in der Lunge bei maschinell ventilerten und sham-operierten Mäusen im Vergleich zu einem nicht behandelten, nativen Tier. Dabei zeigt sich, dass NF- κ B durch die Manipulation hochreguliert wurde. Bei der hypothermen Gruppe erreicht der Unterschied dabei keine statistische Signifikanz. Die Beatmung mit H₂S bei normothermen Tieren verringerte den Medianwert ebenfalls nicht signifikant im Vergleich zu Tieren, die nicht mit H₂S behandelt wurden. In der Versuchsgruppe hingegen, bei denen der durch H₂S herbeigeführte Temperaturabfall nicht behoben, sondern auf 27°C konstant gehalten wurde, zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der NF- κ B-Aktivität.

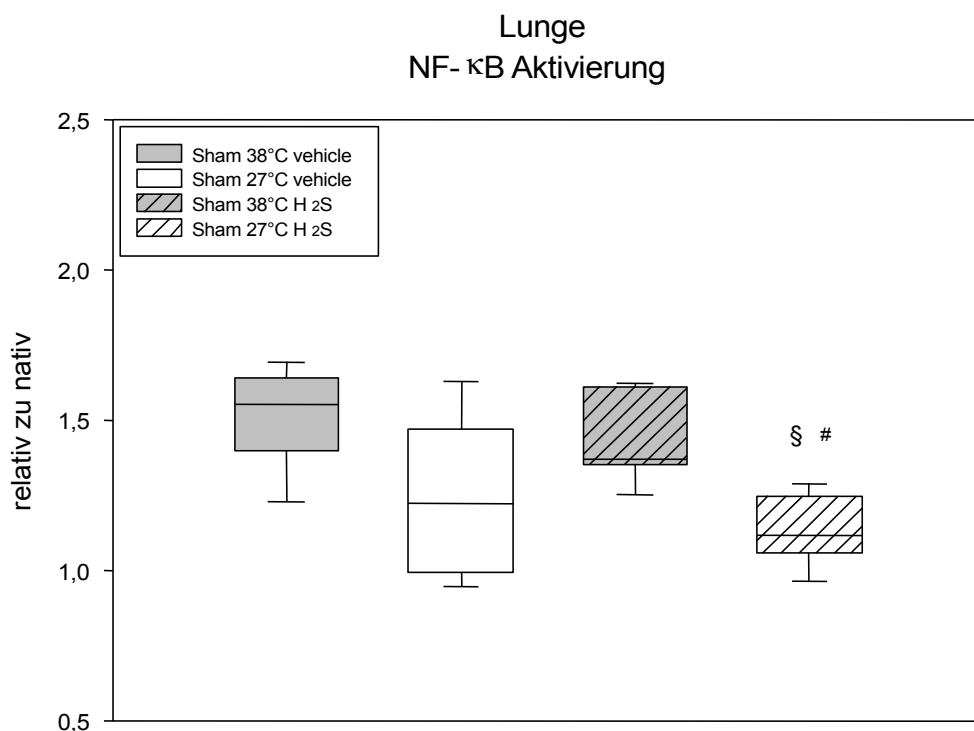


Abbildung 4: Nuklearfaktor-kappa-B-Aktivierung in der Lunge bei sham-operierten Versuchstieren verschiedener Körpertemperatur und unterschiedlicher Atemgaszufuhr relativ zu nativen Tieren. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum. # $p < 0,05$ vs sham 38°C H₂S; § $p < 0,05$ vs sham 38°C

3.2. Zytokine

Die Abbildungen 6-8 zeigen die Quantität ausgeschütteter Zytokine im Lungengewebe in den verschiedenen Versuchsgruppen.

3.2.1. TNF- α

Dabei zeigten sich bei der TNF- α -Aktivität keine statistisch signifikanten Unterschiede der einzelnen Versuchsgruppen. Die Ausschüttung erreichte weder bei der hypothermen, noch bei der H₂S-Gruppe das Signifikanzniveau.

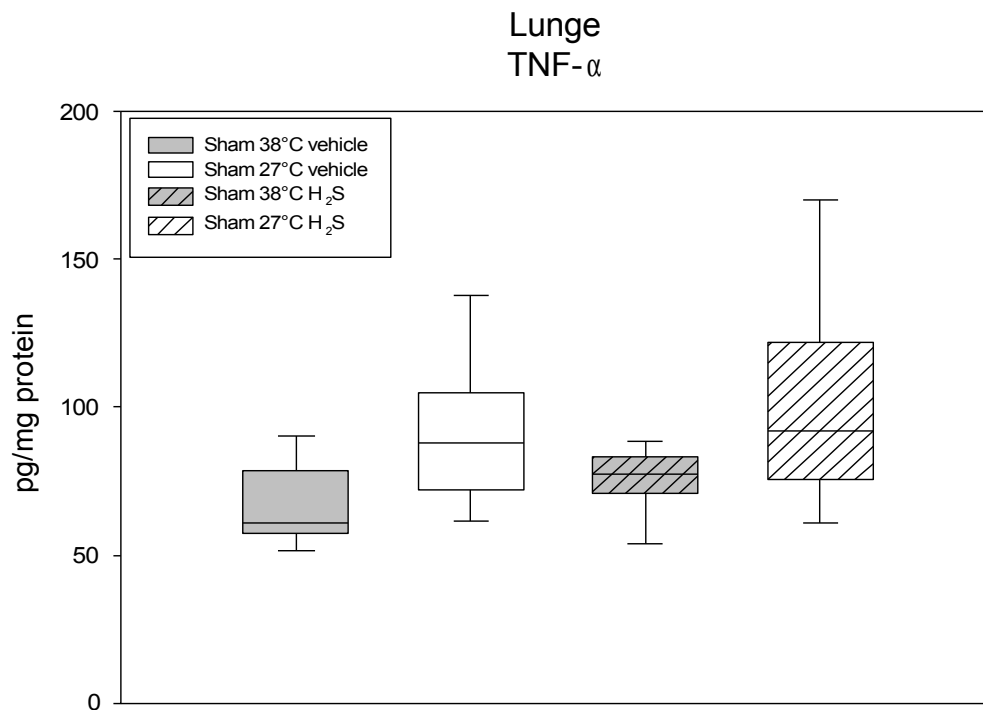


Abbildung 5: Menge an Tumornekrosefaktor- α in pg/mg Protein bei sham-operierten Versuchstieren verschiedener Körpertemperatur und unterschiedlicher Atemgaszufuhr. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum.

3.2.2. MCP-1

Abbildung 6 zeigt die MCP-1-Aktivität der Versuchsgruppen unterschiedlicher Atemgaszufuhr. Tiere, die einer sham-Operation und maschineller Ventilation unterzogen wurden zeigten dabei erhöhte Werte auf. Durch Induktion von Hypothermie konnte die Aktivität im Vergleich zu 38°C warmen Tieren signifikant verringert werden. Die Applikation von H₂S führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduzierung ähnlichen Ausmaßes. In der Gruppe, in der beide Maßnahmen kombiniert wurden, konnte ein ähnlicher, jedoch kein zusätzlicher Effekt beobachtet werden.

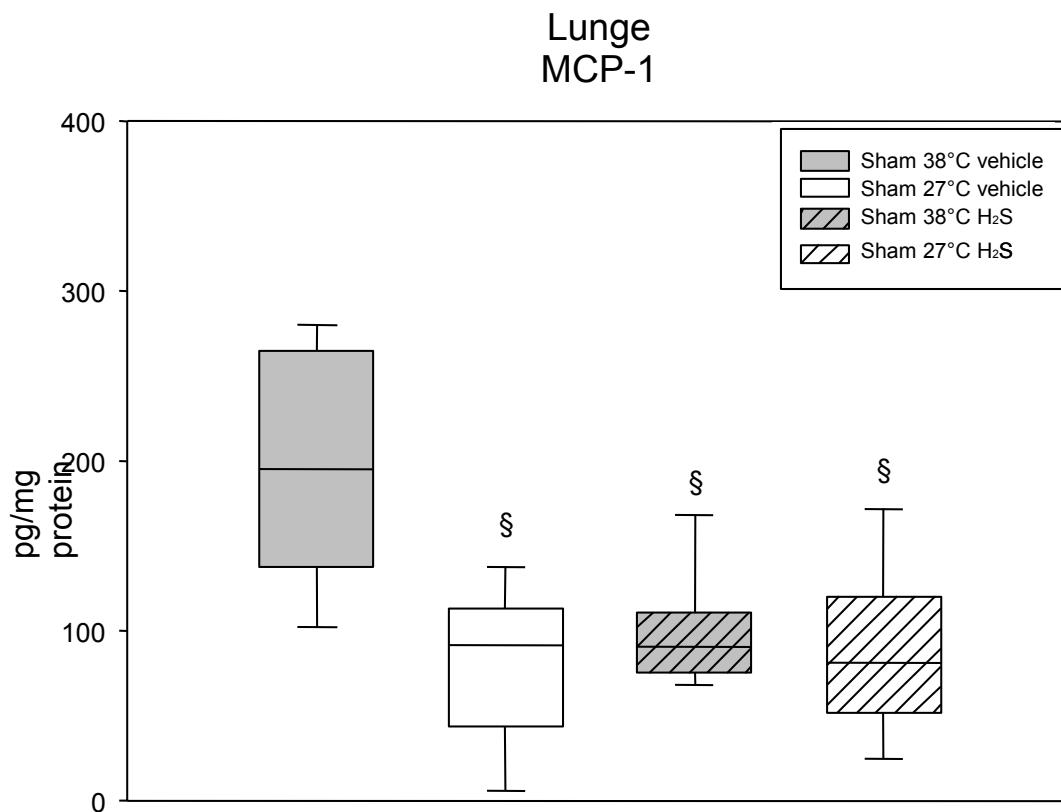


Abbildung 6: Menge an monocyte chemotactic protein-1 in pg/mg Protein bei sham-operierten Versuchstieren verschiedener Körpertemperatur und unterschiedlicher Atemgaszufuhr. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum. § $p < 0,05$ vs sham 38°C

3.2.3. IL-6

Bei Betrachtung von IL-6 erkennt man, dass die Anwendung von Hypothermie im Vergleich zu der warmen Versuchsgruppe keine statistische Signifikanz erreicht. Ähnlich verhält es sich bei der Anwendung von H₂S auf normotherme Tiere. H₂S konnte jedoch den Effekt der Hypothermie in der letzten Versuchsgruppe soweit potenzieren, dass das Ergebnis statistische Signifikanz erlangte.

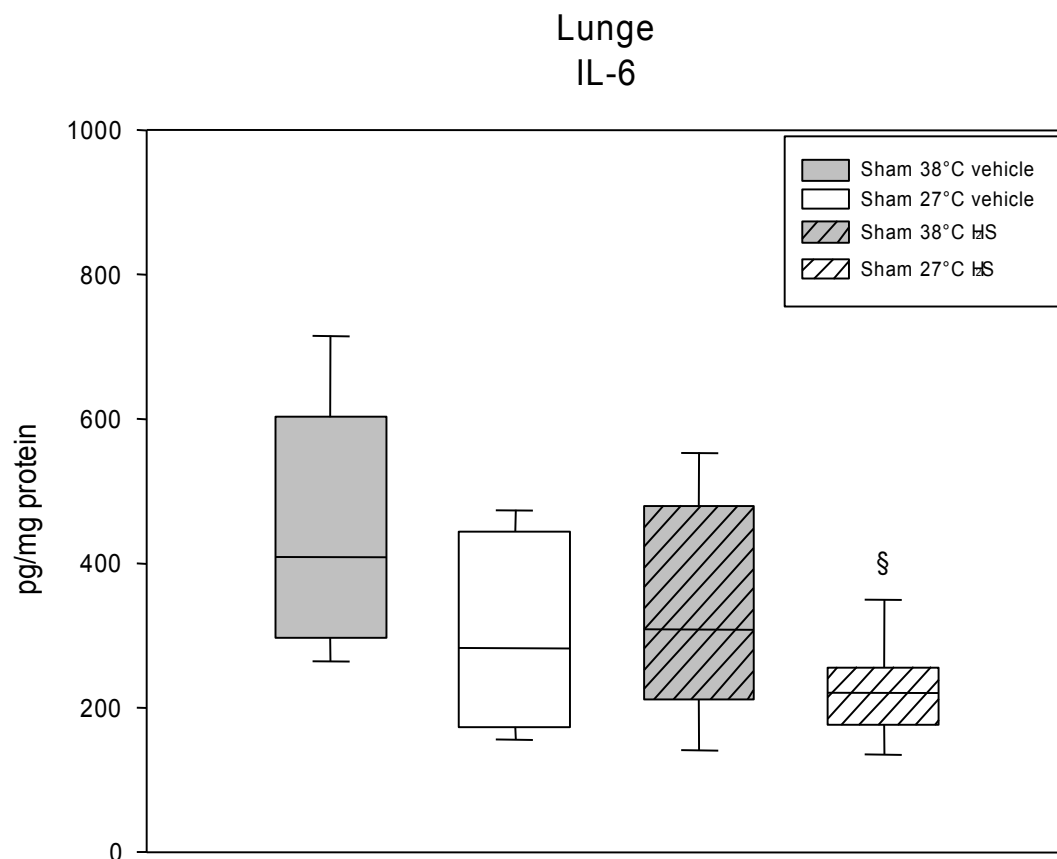


Abbildung 7: Menge an Interleukin-6 in pg/mg Protein bei sham-operierten Versuchstieren verschiedener Körpertemperatur und unterschiedlicher Atemgaszufuhr. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum. § $p < 0,05$ vs sham 38°C

3.3. Proteine

3.3.1. Caspase-3

Die Caspase-3-Aktivität führte in den verschiedenen Versuchsgruppen zu keiner signifikanten Veränderung.

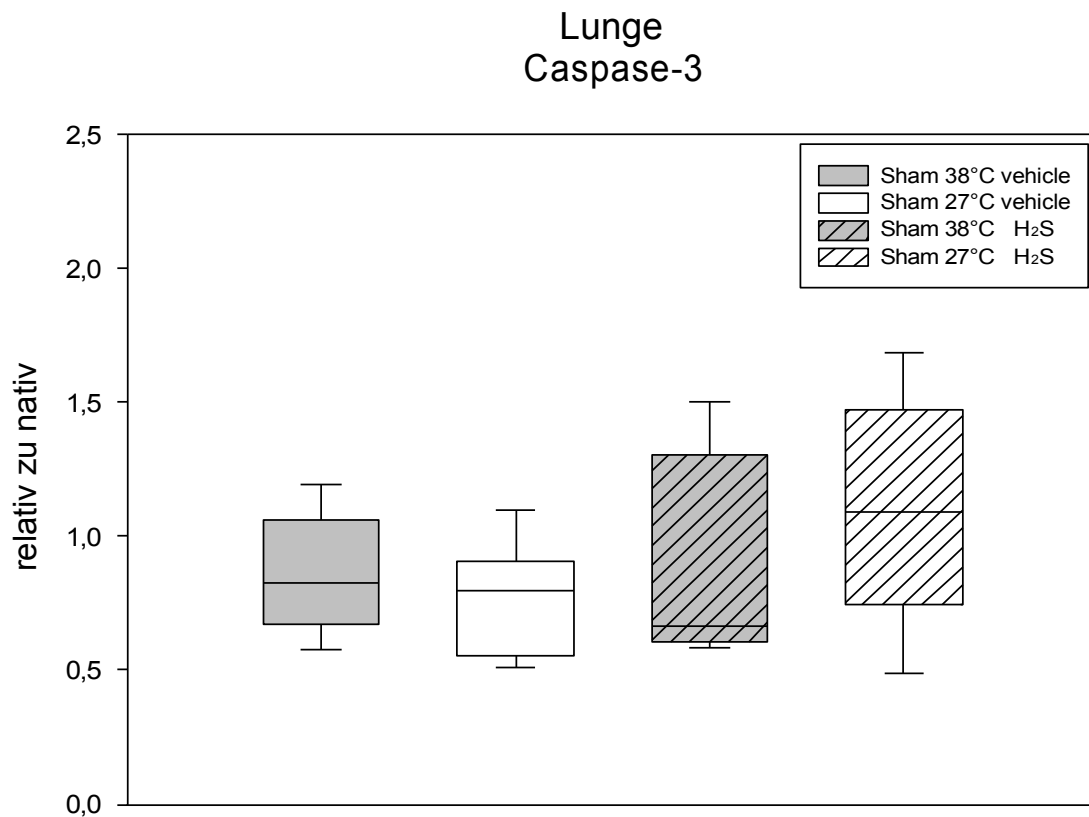


Abbildung 8: Proteingehalt in der Lunge bei sham-operierten Versuchstieren verschiedener Körpertemperatur und unterschiedlicher Atemgaszufuhr. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum.

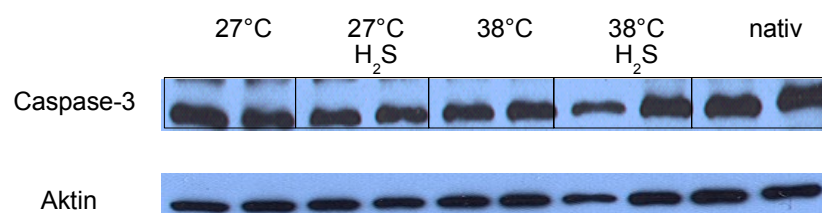


Abbildung 9: Proteinnachweis von Caspase-3 im Westernblot-Verfahren mit Aktin-Kontrolle

3.3.2. Bcl-xL

Bei Bcl-xL zeigt sich weder durch die Behandlung durch H₂S noch durch Kälte eine deutliche Änderung des Proteingehalts.

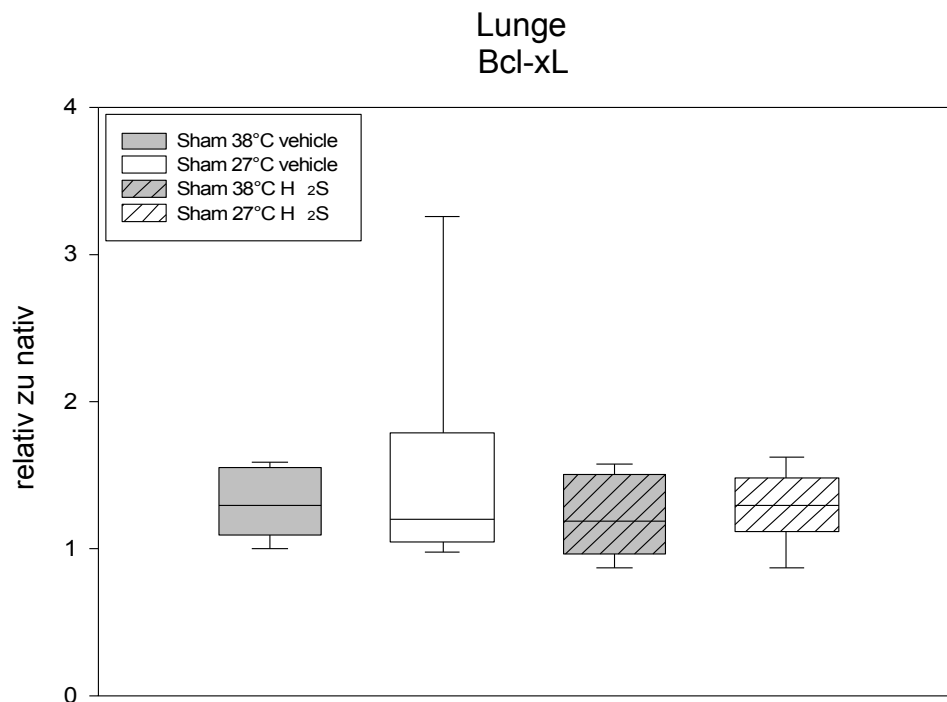


Abbildung 10: Proteingehalt in der Lunge bei sham-operierten Versuchstieren verschiedener Körpertemperatur und unterschiedlicher Atemgaszufuhr. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum.

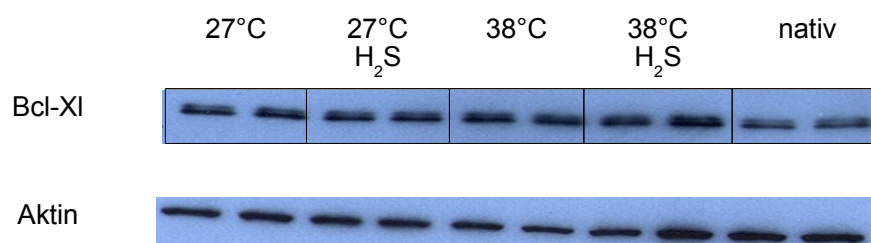


Abbildung 11: Proteinnachweis von B-cell lymphoma extra large im Westernblot-Verfahren mit Aktin-Kontrolle

3.3.3. Bcl-2

Der Gehalt an Bcl-2 im Lungengewebe der Versuchstiere ließ sich weder durch H₂S noch durch Hypothermie signifikant senken.

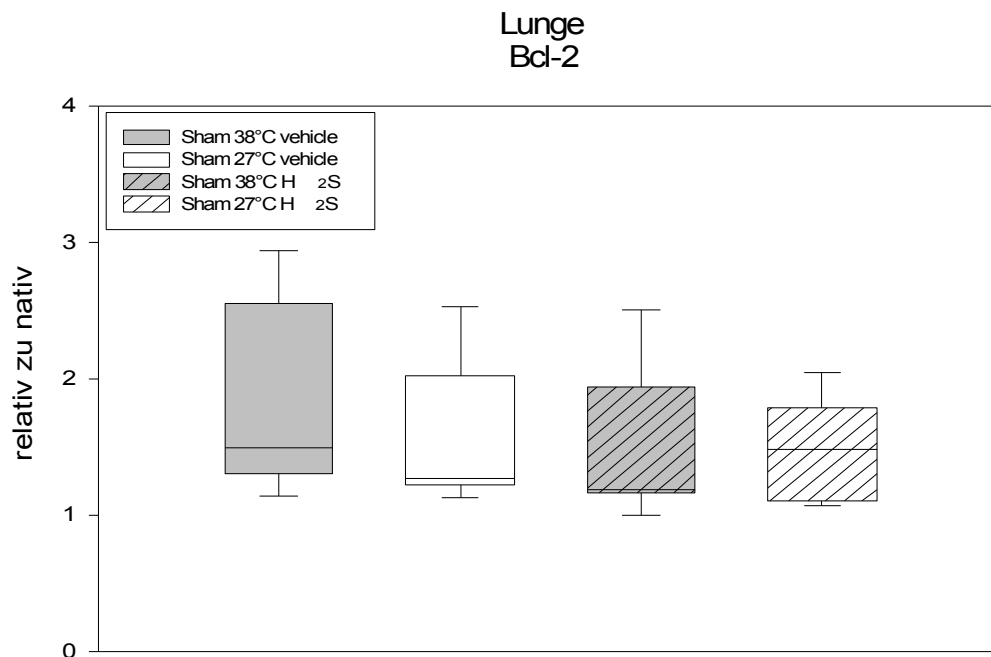


Abbildung 12: Proteingehalt in der Lunge bei sham-operierten Versuchstieren verschiedener Körpertemperatur und unterschiedlicher Atemgaszufuhr. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum.

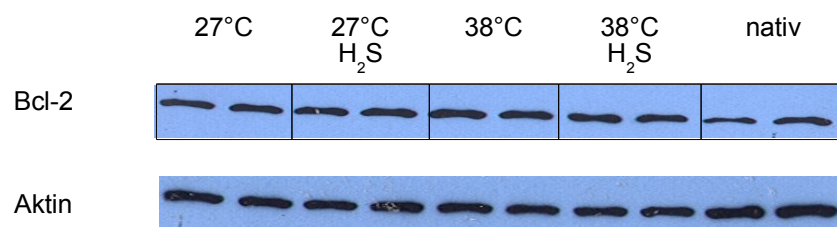


Abbildung 13: Proteinnachweis von B-cell lymphoma 2 im Westernblot-Verfahren mit Aktin-Kontrolle

3.3.4. pAkt

Im Vergleich zu einem warmen, nicht behandelten Tier war der Proteingehalt an pAkt sowohl durch H₂S- und mehr noch durch Kälteeinwirkung verringert. Bei der Kombination beider Einflüsse erreichten die Werte eine mathematische Signifikanz auf dem Niveau $p < 0,05$

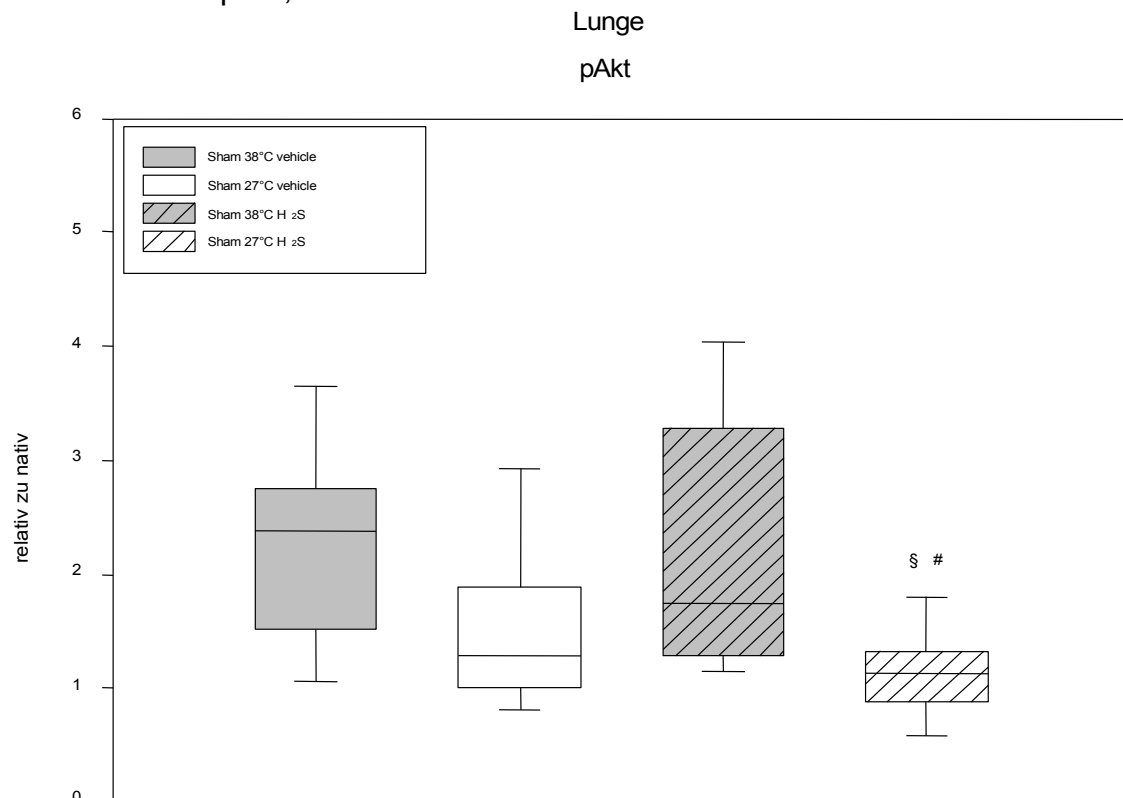


Abbildung 14: Proteingehalt in der Lunge bei sham-operierten Versuchstieren verschiedener Körpertemperatur und unterschiedlicher Atemgaszufuhr. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum. § $p < 0,05$ vs sham 38°C; # $p < 0,05$ vs sham 38°C H₂S

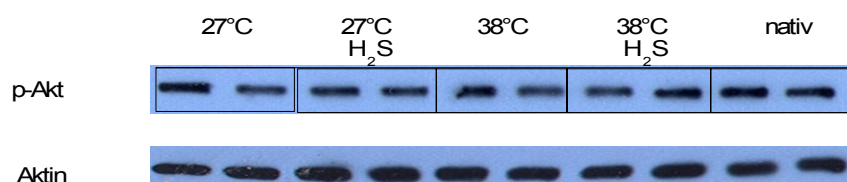


Abbildung 15: Proteinnachweis von p-Akt im Westernblot-Verfahren mit Aktin-Kontrolle

3.3.5. Einfluss auf das Stressprotein HO-1

HO-1 zeigte sich in der 38°C warmen, normoventilierten Gruppe hochreguliert. Dieser Effekt konnte durch Hypothermie nicht gesenkt werden. Die Anwendung von H₂S konnte die Aktivität im Vergleich zu 38°C warmen Tieren unabhängig von der Temperatur senken.

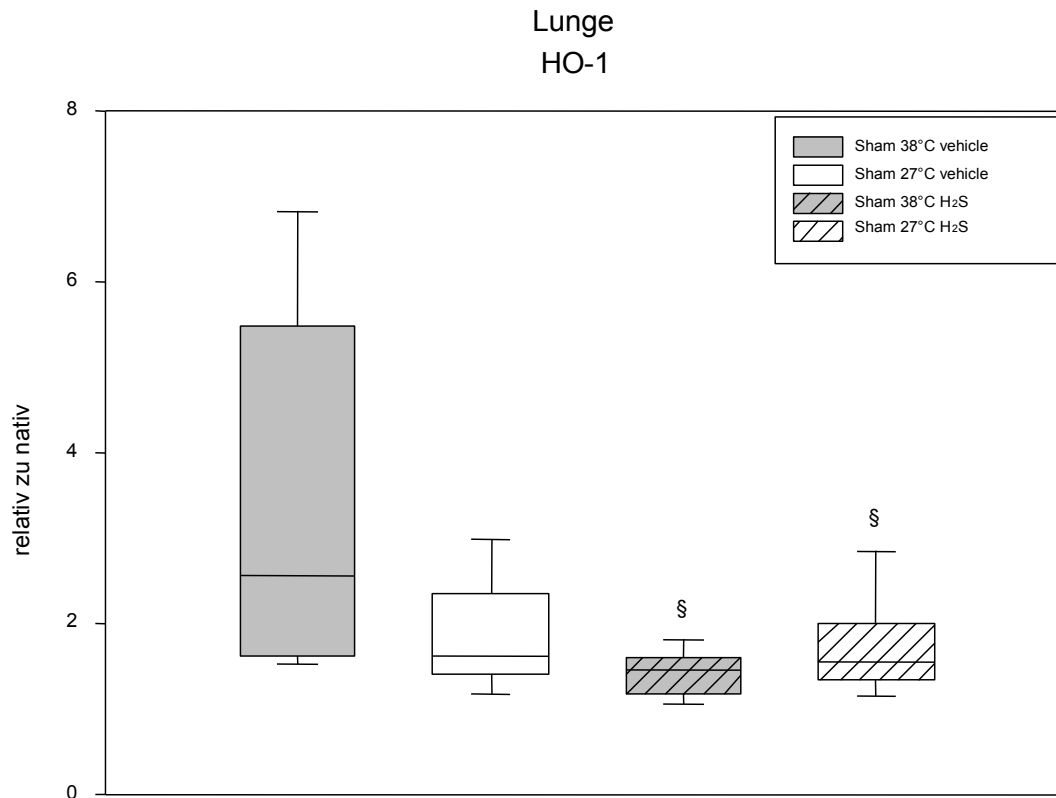


Abbildung 16: Proteingehalt in der Lunge bei sham-operierten Versuchstieren verschiedener Körpertemperatur und unterschiedlicher Atemgaszufuhr. Dargestellt sind jeweils der Median, die Quartile sowie Minimum und Maximum. § $p < 0,05$ vs sham 38°C

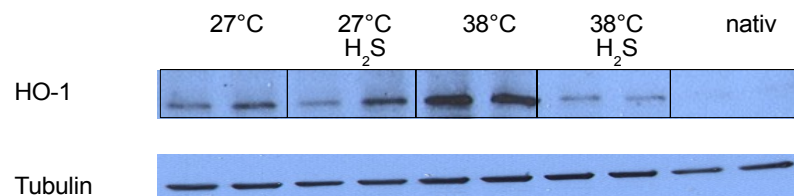


Abbildung 17: Proteinnachweis der Hämoxigenase im Westernblot-Verfahren mit Tubulin-Kontrolle

4. Diskussion

Die Hypothermie wird als anerkannte Methode weltweit bei verschiedenen Zuständen, wie beispielsweise nach Reanimation im Rahmen der Organprotektion, eingesetzt. In experimentellen Untersuchungen wird nun erforscht, ob das Verfahren auch in anderen Bereichen der Medizin protektive Auswirkungen haben könnte. Dazu zählt unter anderem das Krankheitsbild der Sepsis. Ein ähnlich protektiver Effekt wird von der Applikation von H₂S erwartet. Völlig unklar ist jedoch, welche Veränderungen der Immunfunktion die Anwendung von Hypothermie oder H₂S hervorrufen bzw. wie die beiden Einflüsse zusammenwirken. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Effekte betrachtet werden, die H₂S und Hypothermie auf das Entzündungsgeschehen in der Lunge bei maschinell ventilerten Mäusen haben. Dabei wurde vor allem Wert darauf gelegt, diese beiden Parameter sowohl getrennt, als auch in Kombination zu betrachten, um etwaige unspezifische Effekte der Reduktion der Körperkerntemperatur *per se* von den spezifischen Wirkungen der Substanz H₂S zu differenzieren. Die Ergebnisse der Bestimmung einzelner Parameter sollen Antworten auf die Fragen geben, welche immunologische Effekte die Behandlung mit H₂S bei anästhesierten, beatmeten Mäusen hat und ob H₂S alleine wirkt bzw. die Effekte der Hypothermie potenzieren kann.

4.1. Methodik

Im hier vorliegenden Versuch wurde ein Tiermodell gewählt, welches die Bedingungen auf einer Intensivstation bzw. im OP simulieren sollte. Der Versuchsaufbau erfüllte dabei die Kriterien um als klinisch relevant angesehen zu werden. Intensivmedizinische Bedingungen waren durch maschinelle Beatmung, Volumensubstitution und ein kontinuierliches hämodynamisches Monitoring gegeben. Bei der Verwendung muriner Modelle muss die unterschiedliche

Stoffwechsellage berücksichtigt werden. Mit abnehmender Körpergröße nimmt bei Lebewesen der Stoffumsatz pro kg Körpergewicht zu. Bezogen auf die Körperoberfläche erweist sich der Energieverbrauch jedoch als annähernd konstant. Die Verwendung der Spezies Maus gestattet hierbei aufgrund der im Vergleich zum Menschen um ca. 10fach höheren metabolischen Rate eine Differenzierung zwischen unspezifischen Effekten der Reduktion der Körperkerntemperatur an sich und der spezifischen Wirkung von H₂S. Die Übertragbarkeit muriner Modelle auf den Menschen ist jedoch kritisch zu bewerten. Das größere Verhältnis der Körperoberfläche zur -masse führt bei Mäusen zu einer höheren Stoffwechselrate, bringt aber ebenso mit sich, dass die Körpertemperatur schneller sinkt [27].

Ein wichtiger Effekt, den zahlreiche vorausgegangene Studien nicht berücksichtigt haben, ist die Unterscheidung der Wirkung der Reduktion der Körperkerntemperatur *per se* von den spezifischen Wirkungen der Substanz H₂S. Wie beschrieben, löst Hypothermie bei Mäusen einen Zustand der *suspended animation* aus. Dabei konnte noch nicht abschließend geklärt werden, welche immunologischen Faktoren davon beeinflusst werden. Die Anwendung von H₂S zur Induktion eines solchen Zustandes ist ebenfalls Gegenstand der Forschung und wird kontrovers diskutiert. Zahlreiche Studienmodelle berücksichtigten jedoch nicht, dass eine H₂S-Applikation immer auch eine Hypothermie hervorrief. Ergebnisse aus Studien zu H₂S können daher nie eindeutig der H₂S-Wirkung zugeschrieben werden. In diesem Studienmodell war es deshalb von entscheidender Bedeutung, in vier Versuchsgruppen den Temperatureffekt von H₂S von dem der Hypothermie getrennt zu betrachten.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt in dieser Untersuchung war die Applikationsform von H₂S. Während in früheren Untersuchungen oft intravenöse Boli verabreicht wurden, war in diesem Fall eine kontinuierliche Wirkung durch die inhalative Anflutung im Atemgas gewährleistet. Allerdings kommt es während Hypothermie durch eine geringere Metabolisierungsrate zu einer Abnahme der CO₂-Produktion. Die CO₂-adaptierte geringere Atemfrequenz hat damit bei konstanten Tidalvolumina ein vermindertes Atemminutenvolumen zur Folge. Bei einer Verringerung des Atemminutenvolumens um 50% führte dies bei hypothermen Tieren zu einer verlangsamten Aufnahme von H₂S.

Ein weiterer bekannter Nachteil der inhalativen Zufuhr ist eine mögliche Irritation der Atemwege [10].

4.2. Hypothermie und Inflammation

In vorliegendem Experiment führte Hypothermie bei den Versuchstieren zu einer signifikant verringerten Konzentrationen von IL-6 und MCP-1 im Lungengewebe. Dies weist darauf hin, dass die Entzündungsreaktion, ausgelöst durch Anästhesie, maschinelle Beatmung und Kanülierung, durch Hypothermie reduziert werden konnte. Dieses Ergebnis stimmt mit vorhergehenden Studien überein, bei denen ebenfalls eine verringerte pulmonale Inflammation durch Hypothermie im Tierexperiment zu beobachten war. Nach einem durch maschinelle Ventilation ausgelösten Barotrauma konnte ein geringeres Entzündungsgeschehen bei hypothermen Tieren nachgewiesen werden [33]. Versuche am Mausmodell zeigten in der Vergangenheit bezüglich der Zytokinaktivierung bei Hypothermie allerdings nicht nur einheitliche Ergebnisse. Während Hypothermie in Studien einerseits Zytokinkonzentrationen reduzieren und die Überlebensrate nach Trauma und Hämorrhagie verbessern konnte [21], wurden andererseits genau gegenteilige Effekte bei Versuchen mit induzierter Sepsis gefunden [58]. Auch die vorliegenden Ergebnisse zeigen keinen einheitlichen Effekt der Hypothermie. Während MCP-1 reduziert werden konnte, wurde TNF- α nicht signifikant beeinflusst. Eine Studie über LPS-induzierte Endotoxämie bei juvenilen Mäusen kommt ebenfalls zu dem Ergebnis, dass durch Hypothermie zwar erhöhte Zytokinspiegel im peripheren Blut und der Leber gemessen wurden, die Konzentration im Lungengewebe jedoch konstant blieb [47].

Für die unterschiedlichen Studienergebnisse gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Ein wichtiger Aspekt ist der Versuchsaufbau, der sich bei verschiedenen Studien in wichtigen Punkten unterscheidet. Die Tatsache, dass in vorliegendem Experiment eine maschinelle Beatmung vorgenommen wurde, wohingegen frühere Studien spontan atmende Mäuse untersuchten, könnte die Ergebnisse maßgeblich beeinflusst haben. Es ist bekannt, dass maschinelle

Beatmung *per se* eine Inflammationsreaktion in der Lunge und anderen Organen verursachen kann [20,34,58]. Im Versuch wurden zwar niedrigere Tidalvolumina angewandt, um die Ausprägung der Entzündung möglichst gering zu halten, doch auch mit geringen Beatmungsdrücken löst eine unphysiologische maschinelle Ventilation bereits eine Inflammationsreaktion aus [36]. Ein Anhalt für die Richtigkeit dieser Thesen ergibt sich aus den Messergebnissen der Kontrolltiere. Bei diesen Tieren wurde eine reine Anästhesie ohne maschinelle Ventilation vorgenommen, um Organproben zu gewinnen. In der Tat zeigten diese Kontrolltiere die niedrigsten Gewebespiegel an Zytokinen und Chemokinen. Die maschinelle Ventilation kann somit als ein bedeutender Faktor im Auslösen der proinflammatorischen Antwort gesehen werden.

Eine weitere Variable, die das Entzündungsgeschehen modulieren könnte, ist das Narkoseverfahren. Frühere Studien wandten häufig Medikamente an, die das Immunsystem beeinflussten. So ist beispielsweise bekannt, dass Ketamin/Xylazin, was häufig zur Intubation von Nagern verabreicht wurde, die TNF- α -Freisetzung verringerte [20]. Xylazin, ein α_2 -Rezeptoragonist, hatte in verschiedenen Studien teils pro- [16,51] teils antiinflammatorische [22] Eigenschaften. In vorliegender Studie wurden Fentanyl und Ketamin verwendet, welche keine proinflammatorischen Eigenschaften aufweisen [50] und somit die Ergebnisse nicht beeinflussten. Die Tatsache, dass in vielen tierexperimentellen wie klinischen Studien kein klarer Nutzen der Hypothermie gezeigt werden konnte, kann unter anderem auf mangelnder Prophylaxe und Therapie von Nebenwirkungen beruhen. Eine wichtige Nebenwirkung ist die Hyperglykämie, die sich aufgrund des geringeren Glukoseverbrauchs durch eine reduzierte Stoffwechselrate einstellt. Deshalb wurden die Glukosespiegel in diesem Experiment engmaschig kontrolliert und gegebenenfalls adaptiert. Außerdem geht eine Hypothermie mit einer Flüssigkeitsextravasation einher, die zu einer Hypovolämie führen kann. Bei Untersuchungen an Schweinen wurde eine Extravasation von Flüssigkeit sofort nach Induktion der Hypothermie mit unveränderten Albumin- und Plasmaproteinspiegeln beobachtet [15]. In vorliegendem Experiment wurde der Flüssigkeitsverlust durch Gabe von kristallinen und kolloidalen Lösungen

ausgeglichen, um einen weiteren Faktor, der das Outcome verschlechtern könnte, auszuschalten.

4.3. H₂S und Inflammation

Im Experiment zeigte die Inhalation von H₂S bei normothermen Mäusen eine ähnliche Reduktion der Zytokin-Konzentrationen im Lungengewebe, wie sie auch durch den Einfluss von Hypothermie zu beobachten war. MCP-1 konnte durch H₂S unabhängig vom Temperatureffekt gesenkt werden, wohingegen IL-6 nur bei hypothermen Tieren reduziert wurde. Insgesamt liegt also ein antiinflammatorischer Effekt von H₂S vor. Damit liegen die Ergebnisse in Einklang mit früheren Studien, die die Wirkung von H₂S auf *ventilator-induced lung injury* untersuchten. Auch hier zeigte sich, dass Tidalvolumina von 12 ml/kg eine Entzündungsreaktion in der Lunge auslösten, die durch H₂S vermindert werden konnte. Ursächlich war die Reduktion ausgeschütteter Chemokine und Zytokine [14]. Die Auswertung von pAkt ergab eine verringerte Konzentration bei der Kombination von Hypothermie und H₂S. Auch in einer früheren Studie, die gastrointestinale Zellen untersuchte, wurden antiinflammatorische Effekte von H₂S gefunden, die über den pAkt-Signalweg liefen [23]. Trotz zahlreicher Studienergebnisse, die einen antiinflammatorischen Effekt postulieren, wird die Wirkung von H₂S auf die Immunfunktion kontrovers diskutiert. Bis heute ist aufgrund der Ergebnisse unterschiedlicher Untersuchungen noch immer nicht geklärt, ob H₂S ein „Metabolischer Mediator oder ein toxisches Gas“ [52] ist. Anlass zu dieser Diskussion geben vor allem die widersprüchlichen Ergebnisse zu Untersuchungen der Immunfunktion, die in verschiedenen Modellen zur systemischen Entzündung durchgeführt wurden. Dabei wurden sowohl pro- [62] [65] als auch antiinflammatorische [11,13] Effekte gefunden. Studien, die Inhibitoren der endogenen H₂S-Produktion wie DL-Propargylglycin (PAG) verwendeten, erzielten meist proinflammatorische Ergebnisse: PAG verzögerte Organschäden, milderte den Anstieg proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie die Aktivität der Myeloperoxidase in Leber und Lunge. Darüberhinaus wurden Leukozytenaktivierung und -emigration bei LPS-induzierter

Endotoxämie oder CLP-induzierter Sepsis verhindert [28]. Ebenfalls proinflammatorische Ergebnisse wurden in einer Studie zu Caerulein-induzierter Pankreatitis erzielt [51]. Dennoch widersprechen andere Studienergebnisse dieser Rolle von H₂S während der systemischen Entzündung. Im Gegensatz zu oben genannten Ergebnissen erschwerte der H₂S-Donor NaHS die systemische Entzündung [28,65]. Für eine antiinflammatorische und somit zytoprotektive Wirkung von H₂S sprechen weiterhin die Ergebnisse einer Studie, die eine verringerte Leukozyteninfiltration und -Adhäsion sowie einen Rückgang der Ödembildung durch Injektion von NaHS und Na₂S in einem Modell mit Carrageen-induzierten Hinterpfotenödemen bei Ratten untersuchte [61]. Außerdem konnte bei Mäusen mit einer rauchvermittelten akuten Lungenentzündung ein einziger Bolus Na₂S den Interleukin-1 β -Spiegel senken und die Konzentration an antiinflammatorisch wirksamem IL-10 signifikant erhöhen, was letzten Endes zu einer höheren Überlebensrate führte [13]. Es gibt zahlreiche Erklärungsversuche für diese Widersprüche. Der Einfluss von H₂S auf Entzündungsmediatoren scheint abhängig von Zelltyp und Stimulationsfaktor zu sein. In oben genannten Studien wurden verschiedene Gewebe untersucht, die jeweils unterschiedlich behandelt wurden. Der Vergleich zahlreicher Experimente zur Inflammationsreaktion wird weiterhin erschwert durch die Tatsache, dass in den verschiedenen Studien sehr unterschiedliche Applikationsdosen und -formen von H₂S verwendet wurden. Die LD₅₀ für H₂S wurde bei Ratten als 3 mg \times kg⁻¹ Körpergewicht (KG) i.v. beschrieben [49]. In den in der Literatur veröffentlichten Studien reichten die Dosen allerdings von 0,05 bis zu 5 mg \times kg⁻¹ KG. Daraus resultierende Effekte sind demnach sehr unterschiedlich. Während 10 mg/kg KG NaHS eine pulmonale Entzündungsreaktion reduzieren konnten, hatten 5 bzw. 15 mg/kg KG hingegen keinen Effekt [44]. Zudem wurde H₂S meist als Bolus verabreicht. Nur wenige Daten stammen aus Experimenten, bei denen H₂S als kontinuierliche Infusion verabreicht wurde. In der hier vorliegenden Studie wurde den Tieren 100 ppm H₂S über das Inspirationsgemisch zugeführt. Damit war während des Versuches eine kontinuierliche Anflutung gewährleistet.

4.4. Auswirkungen von H₂S und Hypothermie auf NF-κB

Bei der NF-κB-Aktivität verhält es sich anders als bei oben genannten Ergebnissen. Durch *sham*-Laparotomie, Instrumentierung und Beatmung wurde NF-κB hochreguliert. Dieser Effekt konnte durch Applikation von H₂S kaum reduziert werden. Hypothermie hingegen führte zu einer etwas deutlicheren Abschwächung, wenngleich die Ergebnisse keine statistische Signifikanz erreichten. Der durch Hypothermie erzielte Effekt konnte durch zusätzliche Anwendung von H₂S soweit verstärkt werden, dass das Ergebnis signifikant wurde. Dies scheint im Widerspruch dazu zu stehen, dass Zytokine zwar durch einzelne Einflussfaktoren verringert werden konnten, die Kombination aus beiden aber keinen zusätzlichen Effekt brachte.

In der Literatur liegen Daten vor, die einen Zusammenhang zwischen H₂S und der NF-κB-Aktivität nachweisen und dabei teils auf eine Aktivierung, teils auf eine Hemmung hinweisen. *In vitro* konnte H₂S die LPS-induzierte NF-κB-Aktivierung in Makrophagen verringern [37]. Im Gegensatz dazu konnten proinflammatorische Zusammenhänge in einer Studie gefunden werden, die bei Mäusen eine durch CLP induzierte Peritonitis untersuchte. Hier war die NF-κB-Aktivität bei Applikation des H₂S-Donors NaHS in Leber und Lunge erhöht und die Inflammation somit verstärkt [63,64]. Zhi *et al.* beschrieben die H₂S-induzierte NF-κB-Aktivierung mit reaktiver Produktion proinflammatorischer Zytokine in Monozyten [67]. Außerdem war die Induktion einer Lungenentzündung durch NaHS bei Mäusen möglich, was wiederum durch die Applikation eines NF-κB-Inhibitors verhindert werden konnte [63]. Verschiedene Vermutungen können angestellt werden, warum vorliegende Ergebnisse mit denen aus zuvor durchgeführten Studien nicht übereinstimmen. Zunächst muss der Zeitpunkt der Probeentnahme beachtet werden. In diesem Versuch erfolgte die Organgewinnung nach 20-22 Stunden nach der *sham*-Operation. In oben zitierten Studien wurde die Aktivität hingegen schon nach 4 [63] bzw. 8 Stunden [64] gemessen. Da die NF-κB-Aktivität im Verlauf einer Entzündungsreaktion Schwankungen unterworfen ist, kann somit kein direkter Vergleich gezogen werden. Andere Parameter des Versuchsaufbaus beeinflussten

den Spiegel dagegen weniger. Die maschinelle Ventilation beispielsweise hat *per se* auf NF- κ B sehr wahrscheinlich keinen Einfluss. Spontan atmende Mäuse hatten in früheren Studien eine ähnlich hohe NF- κ B-Aktivität wie solche, die wie in diesem Fall mit niedrigem Tidalvolumen beatmet wurden [26]. Die applizierten Pharmaka Ketamin und Fentanyl veränderten die NF- κ B- Aktivität bei TNF- α - stimulierten Lymphozyten ebensowenig [30].

Bleibt noch die Art der H₂S-Applikation zu diskutieren, die sich in den Studien unterschied. Während in oben genannten Studien teils ein i.v.-Bolus verabreicht wurde, applizierten wir H₂S gasförmig durch Inhalation. Tatsächlich können unterschiedliche Applikationsformen sogar gegensätzliche Effekte hervorrufen. Ein plötzlicher Anstieg der H₂S- Konzentration nach Inkubation mit NaHS steigerte die LPS-abhängige NF- κ B-Aktivität *in vitro*. Ein langsamer Anstieg von H₂S bewirkte hingegen eine dosisabhängige Verringerung der Aktivität [56]. Dieser Umstand stellt eine Erklärung für die Tatsache dar, dass die NF- κ B-Aktivität nur bei der Kombination von H₂S mit Hypothermie reduziert ist: Durch die CO₂-adaptierte verringerte Atemfrequenz bei gleichen Tidalvolumina und das folglich verminderte Atemminutenvolumen flutet H₂S während Hypothermie langsamer an und zeigt somit verringerte Aktivität.

Generell spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wichtige Rolle bei der Immunfunktion und bei der Entstehung von Entzündungen. Allerdings ist noch nicht abschließend geklärt, in welchem Zusammenhang er mit den immunmodulatorischen Eigenschaften von H₂S steht. Neue Studien berichten, dass entzündliche Prozesse, die im Zusammenhang mit H₂S untersucht wurden, teils unabhängig von der NF- κ B-Kaskade ablaufen [48]. Unsere Ergebnisse sprechen demnach auch für eine unabhängige Reaktion.

4.5. Auswirkungen auf Stressproteine und Apoptoseparameter

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben, dass die Expression von HO-1 im Lungengewebe durch die Einwirkung von H₂S unabhängig von der Körpertemperatur signifikant reduziert werden konnte. Auch in früheren Studien

wurde berichtet, dass H₂S antiinflammatorische und antiapoptotische Effekte über den HO-1-Signalweg bewirkt [37].

Die intrazellulären Signalwege, über die H₂S eine protektive Wirkung haben soll, sind derzeit noch unklar. *In vitro*-Experimente zeigten, dass die Applikation von H₂S auf LPS-stimulierte Makrophagen zu einer Hochregulierung von HO-1 mit konsekutiver Inhibition von NO-Produktion und NF-κB-Aktivierung führte [38]. In einer von Faller *et al.* durchgeführten Studie zur Erforschung von ventilator-induced lung injury (VILI) erhöhte wiederholtes Dehnen der Lunge durch maschinelle Ventilation die HO-1-Produktion. Durch Anwendung von H₂S konnte diese Proteinexpression verringert werden. Bei einer Kontrollgruppe mit spontan atmenden Mäusen wurde HO-1 dagegen nicht hochreguliert. Die HO-1-Induktion resultierte demnach aus einer Stressantwort auf die maschinelle Ventilation. H₂S limitierte diese Expression durch eine Verringerung des zellulären Stress, der mit maschineller Ventilation assoziiert ist [14]. Vorliegende Untersuchung stimmt insofern mit diesem Ergebnis überein, als es auch hier zu einer signifikant verringerten Expression von HO-1 durch H₂S kommt.

Ein weiteres Indiz für eine Entzündungsreaktion kann eine gesteigerte Apoptoserate darstellen. Deshalb erfolgte in dieser Arbeit die quantitative Bestimmung von Apoptoseparametern sowie ein Vergleich der verschiedenen Untersuchungsgruppen. Durch die Untersuchung von Bcl-2, Bcl-xL und Caspase-3 wurde der extrinsische Weg der Apoptose näher betrachtet, welcher unter anderem durch Zytokinausschüttung ausgelöst werden kann. Vorliegende Ergebnisse zeigen keine signifikante Erhöhung oder Erniedrigung der Apoptoserate, während in der Literatur sowohl pro- als auch antiapoptotische Wirkungen beschrieben sind.

In-vitro-Studien belegen, dass H₂S antiapoptotische Wirkung bei Neutrophilen, die mit H₂S behandelt wurden aufweist. Es konnte nachgewiesen werden, dass Schwefelwasserstoff p38 und Caspase-3 inhibierte [42].

Es existieren jedoch auch Anhaltspunkte für proapoptotische Wirkungen. Eine Untersuchung aortaler glatter Muskelzellen zeugt von einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des Gehalts an Caspase-3 und damit einer gesteigerten Apoptoserate [59]. Allerdings muss bei einem Vergleich der Studien

berücksichtigt werden, dass sehr unterschiedliche Dosen von H₂S angewendet wurden, die den physiologischen Bereich teils überschreiten. Die Auswirkungen von H₂S scheinen wie oben erwähnt ebenfalls abhängig von der Stimulationsart und dem Zelltyp zu sein.

Eine größere Studie, die sich mit Auswirkungen von H₂S auf Ischämie-Reperfusion nach Infarkt beschäftigte, lieferte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*-Daten zu Apoptose. Zum einen wurden isolierte Kardiomyozyten nach 6 Stunden Hypoxie und 12 Stunden Reoxygenierung untersucht. Ein Teil der Zellen wurde in der Reoxygenierungsphase mit H₂S behandelt. In dieser Gruppe fand sich ein niedrigerer Wert an Caspase-3 als in der Gruppe ohne H₂S. Zusätzlich wurden Herzzellen von Mäusen *in vivo* nach 45 min. Ischämie und 4 h Reperfusion auf apoptotische Zellen untersucht. Auch hier konnte ein antiapoptotischer Effekt mit Hilfe der TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)-Methode gefunden werden. Mit H₂S behandelte Mäuse wiesen eine Reduktion der apoptotischen Zellen um 59% im Vergleich zu anderen Tieren auf. Die Infarktgröße nahm ebenfalls ab [11].

In genannter Studie konnte die durch Ischämie-Reperfusion ausgelöste Apoptose in Kardiomyozyten durch H₂S verringert werden. Bei der *in vivo*-Analyse wurde eine Aussage über die Apoptose mit Hilfe der TUNEL-Methode getroffen. Diese Methode ist jedoch insofern kritikwürdig, als zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nur sehr schwer unterschieden werden kann [17]. In der von uns durchgeführten *in vivo*-Analyse fand die Auswertung eines Lungenhomogenats mit Hilfe exakter Proteinkonzentrationsbestimmung von Apoptoseparametern durch Western Blots statt. Die Tatsache, dass H₂S in vorliegendem Experiment keine signifikanten Auswirkungen auf den extrinsischen Weg der Apoptose hatte kann dadurch erklärt werden, dass das Trauma durch *sham*-Operation, maschinelle Ventilation und Instrumentierung zu gering war, um *per se* apoptotische Vorgänge auszulösen.

4.6. Messzeitpunkt

Ein weiterer wichtiger Faktor ist der Zeitpunkt der Organentnahme und damit die Betrachtung der Inflammationsreaktion zu einem bestimmten Zeitpunkt. Die Entnahme erfolgte 22 Stunden nach insgesamt fünfstündiger H₂S-Applikation. Bei den *sham*-operierten Tieren wird als Beginn der Inflammationsreaktion nicht die *sham*-Operation, die nur einem minimalen Eingriff entspricht, sondern der Zeitpunkt der Instrumentierung (Tracheotomie, Intubation, Kanülierung) gewählt, da diese den entscheidenden Eingriff für den Beginn des Entzündungsgeschehens darstellt. Da die terminale Organentnahme der Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen war, muss hierbei berücksichtigt werden, dass nur ein einziger Zeitpunkt des komplexen Vorgangs der Entzündungsreaktion betrachtet werden konnte. Die Ergebnisse erlauben somit keine Aussage über den Verlauf einzelner Parameter, sondern stellen vielmehr eine Momentaufnahme dar. Da verschiedene Entzündungsparameter im Verlauf der Inflammation eine unterschiedliche Kinetik aufweisen, kann daher keine absolute Aussage bei nur einem Messzeitpunkt getroffen werden.

5. Zusammenfassung

Suspended animation beschreibt eine Verlangsamung der Vitalfunktionen zum Schutz vor schädlichen Einflüssen. Neben Tieren, die natürlicherweise Winterschlaf halten, konnte dieser Zustand auch bei Spezies hervorgerufen werden, die normalerweise nicht zu Hibernation fähig sind. Der damit verbundene Überlebensvorteil in Extremsituationen, wie beispielsweise Hypoxie, stellt einen interessanten Ansatz für notfallmedizinische Forschung dar. Bisher war es möglich, *suspended animation* durch Infusion eiskalter kristalliner Flüssigkeiten auszulösen. Allerdings ist bisher noch nicht geklärt, welche potenziell positiven oder negativen Konsequenzen die Hypothermie vor allem in Bezug auf Entzündungsvorgänge mit sich bringt. Von einigen Autoren wird ein antiinflammatorischer Effekt postuliert, der bei genannten Zuständen protektive Wirkung haben könnte. Ebenso sind in der Literatur jedoch proinflammatorische Eigenschaften postuliert worden. Eine weitere Möglichkeit zur Induktion der ausgesetzten Belebung gelang durch die Applikation von H₂S. Doch auch bei diesem pharmakologischen Ansatz werden die Wirkungen kontrovers diskutiert. Die ursprünglich als toxisches Gas bekannte Substanz weist ebenso protektive wie deletäre Eigenschaften auf. Auch hier existieren in Bezug auf die Immunfunktion sowohl Erkenntnisse, die für eine proinflammatorische Wirkung, als auch solche, die für eine antiinflammatorische Wirkung sprechen. Neben metabolischen Effekten führt Schwefelwasserstoff (H₂S) zu einem Absinken der Körperkerntemperatur. Wichtig war es deshalb bei der Untersuchung inflammatorischer Effekte, die Auswirkungen von H₂S und Hypothermie sowohl getrennt als auch in Kombination zu betrachten, um die Wirkung der Einzelsubstanzen zu unterscheiden. Es sollte beurteilt werden, welche Rolle Hypothermie und H₂S bei Entzündungsvorgängen spielen, ob diese von NF-κB abhängig sind und ob Auswirkungen auf die Apoptose gefunden werden. Zu diesem Zweck wurden Mäuse im Alter von 10-12 Wochen, in vier verschiedene Gruppen randomisiert. Darunter Tiere mit 38°C Körpertemperatur jeweils mit und ohne H₂S und 27°C Körpertemperatur mit und ohne H₂S. Um die Ergebnisse in

Bezug zu setzen gab es außerdem Blut- und Gewebeproben einer Gruppe unbehandelter Tiere. Nach vorangegangener *sham*-Operation unterzog man die Tiere am Folgetag intensivmedizinischer Instrumentierung und Monitorings unter maschineller Beatmung und Anästhesie. Nach Organentnahme wurden Gewebeproben auf Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich der Reaktion auf Hypothermie und H₂S untersucht. Durch *sham*-Operation und maschinelle Beatmung entstand eine Entzündungsreaktion, die durch Hypothermie und H₂S verringert werden konnte. Dieser antiinflammatorische Effekt war unabhängig von Nuklearfaktor-kappa-B (NF-κB). Die Kombination beider Einflussfaktoren brachte keinen zusätzlichen Benefit. Das Stressprotein Hämooxygenase-1 (HO-1) konnte durch H₂S herunter reguliert werden. Hypothermie und H₂S hatten keinen Einfluss auf die Apoptose.

6. Literaturverzeichnis

1. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I: Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest. *Circulation* 106: 562-568 (2002)
2. Ali MY, Ping CY, Mok YY, Ling L, Whiteman M, Bhatia M, Moore PK: Regulation of vascular nitric oxide in vitro and in vivo; a new role for endogenous hydrogen sulfide? *Br J Pharmacol* 149: 625-634 (2006)
3. Barth E, Radermacher P, Szabo C: The world according to poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)-update 2006. *Intensive Care Med* 32: 1470-1474 (2006)
4. Baskar R, Li L, Moore PK: Hydrogen sulfide induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *FASEB J* 21: 247-255 (2007)
5. Bellamy R, Safar P, Tisherman SA: Suspended animation for delayed resuscitation. *Crit Care Med* 24: 24-47 (1996)
6. Bernard SA, Gray TW, Buist MD: Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 346: 557-563 (2002)
7. Bhatia M: Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB Life* 57: 603-606 (2005)
8. Blackstone E, Morrison M, Roth MB: H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* 308: 518 (2005)
9. Böttiger BW, Grabner C, Bauer H, Bode C, Weber T, Motsch J, Martin E: Long term outcome after out-of-hospital cardiac arrest with physician staffed emergency medical services: the Utstein style applied to a midsized urban/suburban area. *Heart* 82: 674-679 (1999)

10. Cheng Y, Ndisang JF, Tang G: Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: 2316-2323 (2004)
11. Collin M, Anuar FBM, Murch O: Inhibition of endogenous hydrogen sulfide formation reduces the organ injury caused by endotoxemia. *Br J Pharmacol* 146: 498-505 (2005)
12. Couch L, Martin L, Rankin N: Near death episode after exposure to toxic gases from liquid manure. *NZ Med J* 118: 1-4 (2005)
13. Dorman DC, Moulin FJM, McManus BE: 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)
14. Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15560-15565 (2007)
16. Esechie A, Kiss L, Olah G, Horvath EM, Hawkins H, Szabo C, Traber DL: Protective effect of hydrogen sulfide in a murine model of acute lung injury induced by combined burn and smoke inhalation. *Clin Sci* 115: 91-97 (2008)
17. Faller S, Ryter S.W., Choi A.M.K., Loop T, Schmidt R., Hoetzel A: Inhaled hydrogen sulfide protects against ventilator-induced lung Injury. *Anesthesiology* 113: 104-115 (2010)
18. Farstad M, Heltne JK, Rynning SE, Onarheim H, Mongstad A, Eliassen F: Can the use of methylprednisolone, vitamin C, or alpha-trinositol prevent cold-induced fluid extravasation during cardiopulmonary bypass in piglets? *J Thorac Cardiovasc Surg* 127: 525-534 (2004)

19. Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E: Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* 129: 1210-24 (2005)
20. Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL: The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131: 259-271 (2006)
21. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Chen AJ, Sarma JV, Zetoune FS, McGuire S: Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 449: 721-725 (2007)
22. 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)
23. Fukuda H, Tomimatsu T, Kanagawa T: Postischemic hyperthermia induced caspase-3 activation in the newborn rat brain after hypoxia ischemia and exacerbated the brain damage. *Biol Neonate* 84: 164-171 (2003)
24. Hassoun HAT, Kone BC, Mercer DW: Post-injury multiple organ failure: the role of the gut. *Shock* 15: 1-10 (2001)
25. Hegeman MA, Hennis MP, Heijnen CJ, Specht PAC, Lachmann B, Jansen NJG, Cobelens PM: Ventilator-induced endothelial activation and inflammation in the lung and distal organs. *Crit Care* 13: 132-138 (2009)
26. Hekimian G, Bagnon T, Thuong M: Cortisol levels and adrenal reserve after successful cardiac arrest resuscitation. *Shock* 22: 116-119 (2004)
27. Helmer KS, Cui Y, Chang L, Dewan A, Mercer DW: Effects of ketamine/xylazine on expression of tumor necrosis factor- α , inducible nitric oxide synthase, and cyclooxygenase-2 in rat gastric mucosa during endotoxemia. *Shock* 20: 63-69 (2003)

28. Hildebrand F, Giannoudis P, van Griensven M: Pathophysiologic changes and effects of hypothermia on outcome in elective surgery and trauma patients. *Am J Surg* 187: 363–371 (2004)
29. Hildebrand F, van Griensven M, Giannoudis P, Luerig A, Harwood P, Harms O: Effects of hypothermia and re-warming on the inflammatory response in a murine multiple hit model of trauma. *Cytokine* 31: 382-392 (2005)
30. Hofer S, Steppan J, Wagner T, Funke B, Lichtenstein C, Martin E, Graf BM: Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis. *Crit Care* 12: 404-408 (2009)
31. Huang Y, Li F, Tong W, Zhang A, He Y, Fu T, Liu B,: Hydrogen sulfide, a gaseous transmitter, stimulates proliferation of interstitial cells of Cajal via phosphorylation of AKT protein kinase. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 221: 125-132 (2010)
32. Jha S, Calvert JW, Duranski MR, Ramachandran A, Lefer DJ: Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H801-H806 (2008)
33. Kass LE, Eitel DR, Sabulsky NK, Ogden CS, Hess DR, Peters KL: Outcome of out-of-hospital cardiac arrest in New York City. The Pre-Hospital Arrest Survival Evaluation (PHASE) Study. *JAMA* 271: 678–683 (1994)
34. Kass LE, Eitel DR, Sabulsky NK, Ogden CS, Hess DR, Peters KL: One-year survival after prehospital cardiac arrest: the Utstein style applied to a rural-suburban system. *Am J Emerg Med* 12: 17-20 (1994)
35. Khan AA, Schuler MM, Prior MG: Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 103: 482-90 (1990)

36. Kim JH, Suk MH, Yoon DW, Kim HY, Jung KH, Kang EH, Lee SY, Lee SY, Suh IB: Inflammatory and transcriptional roles of poly (ADP ribose) polymerase in ventilator-induced lung injury. *Crit Care* 12: R108 (2008)
37. Kuboyama K, Safar P, Radovsky A, Tisherman SA, Stezoski SW, Alexander H: Delay in cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study. *Crit Care Med* 21: 1348-1358 (1993)
38. Leonov Y, Sterz F, Safar P, Radovsky A, Oku K, Tisherman S, Stezoski SW: Mild cerebral hypothermia during and after cardiac arrest improves neurologic outcome after cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 57-70 (1990)
39. Leslie M.: Nothing rotten about hydrogen sulfide's medical promise. *Science* 320: 155-157 (2008)
40. Li L, Bhatia M, Zhu YC, Ramnath RD, Wang ZJ, Anuar FB, Whiteman M: Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J* 19: 1196-1198 (2005)
41. Li L, Bhatia M, Zhu YZ: Hydrogen sulfide is a novel mediator of lipopolysaccharide-induced inflammation in the mouse. *FASEB J* 19: 1196-1198 (2005)
42. Lionetti V, Recchia FA, Ranieri VM: Overview of ventilator-induced lung injury mechanisms. *Curr Opin Crit Care* : 82-86 (2005)
43. Loop T, Liu Z, Humar M, Hoetzel A, Benzing A, Pahl HL, Geiger KK, Pannen BH: Thiopental inhibits the activation of nuclear factor κ B. *Anesthesiology* 96: 1202-1213 (2002)
44. Mason MG, Nicholls P, Wilson MT, Cooper CE: Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and non competitive (copper)

- binding to cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103: 708-713 (2006)
45. Meier T, Lange A, Papenberg H, Ziemann M, Fentrop C, Uhlig U, Schmucker P, Uhlig S, Stamme C: Pulmonary cytokine responses during mechanical ventilation of non-injured lungs with and without end-expiratory pressure. *Anesth Analg* 107: 1265-1275 (2008)
 46. Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, Zacharowski KD, Lucius R: Hypothermia and postconditioning after cardiopulmonary resuscitation reduce cardiac dysfunction by modulating inflammation, apoptosis and remodeling. *PLoS ONE* 10: e7588 (2009)
 47. Morita Y, Oda S, Sadahiro T, Nakamura M, Oshima T, Otani S, Hirasawa H: The effects of body temperature control on cytokine production in a rat model of ventilator-induced lung injury. *Cytokine* 47: 48-55 (2009)
 48. Mouritzen CV, Andersen MN: Mechanisms of ventricular fibrillation during hypothermia. Relative changes in myocardial refractory period and conduction velocity. *J Thorac Cardiovasc Surg* 51: 579-584 (1966)
 49. Nolan JP, Morley PT, Vanden Hoek TL: Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: an advisory statement by the advanced life support task force of the International Liaison Committee on Resuscitation. *Circulation* 108: 118-121 (2003)
 50. O'Mahoney DS, Liles WC, Altemeier WA, Dhanireddy S, Frevert CW, Liggitt D: Mechanical ventilation interacts with endotoxemia to induce extrapulmonary organ dysfunction. *Critical Care* 10: R 136 (2006)
 51. Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ: Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor- κ B via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free Radic Biol Med* 41: 106-119 (2006)

52. Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ: 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)
53. Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, Watanabe M, Nishimaki K, Yamagata K: Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med* 13: 688-694 (2007)
54. Padosch SA, Böttiger BW: Neuronal apoptosis following cerebral ischaemia: pathophysiology and possible therapeutic implications. *Curr Opin Anaesth* 16: 439-445 (2003)
55. Pfeifer R, Borner A, Krack A, Sigusch HH, Surber R, Figulla HR: Outcome after cardiac arrest: predictive values and limitations of the neuron-specific enolase and protein S-100 and the Glasco Coma Scale. *Resuscitation* 65: 49-55 (2005)
56. Polderman KH, Girbes AR: Potential mechanisms of hypothermia-induced electrolyte depletion. *Crit Care Med* 30: 1932-1933 (2002)
57. Popp E, Padosch SA, Vogel P, Schäbitz WR, Schwab S, Böttiger BW: Effects of intracerebroventricular application of brain-derived neurotrophic factor on cerebral recovery after cardiac arrest in rats. *Crit Care Med* 32: 359-365 (2004)
58. Remick DG, Xia H: Hypothermia and sepsis. *Front Biosci* 11: 1006-1013 (2006)
59. Richards V, Pinto D, Coombs P: Studies in suspended animation by hypothermia combined with hyperbaric oxyg. *Ann Surg* 158: 349-62 (1963)
60. Rinaldi L, Gobbi G, Pambianco M, Micheloni C, Mirandola P, Vitale M: Hydrogen sulfide prevents apoptosis of human PMN via inhibition of p38 and caspase-3. *86*: 391-397 (2006)

61. Rosomoff HL: Experimental brain injury during hypothermia. *Ann N Y Acad Sci* 80: 475-486 (1959)
62. Roth MB, Nystul TG: Carbon monoxide-induced suspended animation protects against hypoxic damage. *PNAS* 101: 9133-9136 (2004)
63. Safar PJ, Kochanek PM: Therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *N Engl J Med* 346: 612-613 (2002)
64. Sidhapuriwala JN, Ng SW, Bhatia M: Effects of hydrogen sulfide on inflammation in caerulein-induced acute pancreatitis. *J Inflamm* 6: 35 (2009)
65. Simon F, Giudici R, Duy C, Schelzig H, Öter S, Gröger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabó C, Radermacher P, Calzia E: Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide during porcine ischemia/reperfusion injury. *Shock* 30: 359-364 (2008)
66. Sivarajah A, Collino M, Yasin M, Benetti E, Gallicchio M, Mazzon E: Antiapoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R. *Shock* 31: 267-274 (2009)
67. Stewart CR, Landseadel JP, Gurka MJ, Fairchild KD: Hypothermia increases interleukin-6 and interleukin-10 in juvenile endotoxemic mice. *Pediatr Crit Care Med* 11: 109-116 (2010)
68. Stuhlmeier KM, Bröll J, Iliev B: NF-kappaB independent activation of a series of proinflammatory genes by hydrogen sulfide. *Exp Biol Med* 234: 1327-1338 (2009)
69. Szabó C: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6: 917-935 (2007)
70. Szelényi J, Kiss JP, Selmeczy Z, Szelényi M, Vizi ES: Opposite role of α 2- and β -adrenoceptors in the modulation of interleukin-10 production in endotoxaemic mice. *Neuro Rep* 11: 3565-3568 (2000)

71. Takenaka I, Ogata M, Koga K, Matsumoto T, Shigematsu A: Ketamine suppresses endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production in mice. *Anesthesiology* 80: 402-408 (1994)
72. Tamizhselvi R, Moore PK, Bhatia M: Inhibition of hydrogen sulfide synthesis attenuates chemokine production and protects mice against acute pancreatitis and associated lung injury. *Pancreas* 36: e24-e31 (2008)
73. Tisherman SA, Drabek T: Hydrogen Sulfide: metabolic mediator or toxic gas? *Pediatr Crit Care Med* 8: 129-130 (2008)
74. Torossian A, Ruehlmann S, Middeke M: Mild pre-septic hypothermia is detrimental in rats. *Crit Care Med* 32: 1899-1903 (2004)
75. Vaporidi K, Voloudakis G, Priniannakis G, Kondili E, Koutsopoulos A: Effects of respiratory rate on ventilator-induced lung injury at constant PaCO₂ in a mouse model of normal lung. *Crit Care Med* 36: 1277-1283 (2008)
76. Viscardi, Hester L, Lazusky M, Hasday JD, Fairchild D, Singh IS, Patel S: Hypothermia prolongs activation of NF- κ B and augments generation of inflammatory cytokines. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: 422-431 (2004)
77. Volpato GP, Searles RJ, Scherrer-Crosbie M: Cardiovascular response to breathing hydrogen sulfide in a murine model: separating the effects of body temperature. *APS Conference* (2006)
78. Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD: Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 126: 881-889 (1999)
79. Whiteman M, Li L, Rose P, Tan CH, Parkison DB, Moore PK: The effect of hydrogen sulphide donors on lipopolysaccharide-induced formation of inflammatory mediators in macrophages. *Antioxid Redox Signal* 12: 1147-1155 (2010)

80. Xiao H, Remick DG: Correction of perioperative hypothermia decreases experimental sepsis mortality by modulating the inflammatory response. *Crit Care Med* 33: 161-167 (2005)
81. Yang G, Sun X, Wang R: Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinase and caspase-3. *FASEB J* 18: 1782-1784 (2004)
82. Yang G, Yang W, Wu I, Wang R: H₂S , endoplasmatic reticulum stress, and apoptosis of insulin-secreting beta cells. *J Biol Chem* 282: 16567-16576 (2007)
83. Zanardo RCO, Brancaleone V, Distrutti E: Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *FASEB J* 20: 2118-2120 (2006)
84. Zhang H, Bhatia M: Hydrogen Sulfide: A novel mediator of leukocyte activation. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1: 1-15 (2008)
85. Zhang H, Moochhala SM, Bhatia M: Endogenous hydrogen sulfide regulates inflammatory response by activating the ERK pathway in polymicrobial sepsis. *J Immunol* 181: 4320-4231 (2008)
86. Zhang H, Moochhala SM, Moore PK, 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- κ B. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292: L960-L971 (2007)
87. Zhang H, Zhi L, Moochhala SM, Moore PK, Bhatia M: Endogenous hydrogen sulfide regulates leukocyte trafficking in cecal ligation and puncture-induced sepsis. *J Leukoc Biol* : 894-905 (2007)
88. Zhang Z, Huang H, Liu P, Tang C, Wang J: Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening K-ATP channels. *Can J Physiol Pharmacol* 85: 1248-1253 (2007)

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

7. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Radermacher für die Vergabe des interessanten Themas und die Ermöglichung dieser Dissertation in der Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung bedanken.

Herrn Dr. Florian Wagner möchte ich für die intensive Betreuung während der gesamten Zeit danken, für die viele Geduld, mit der er das Projekt von Beginn an unterstützte und für die vielen ausführlichen Erklärungen und Tipps.

Des Weiteren gilt mein Dank dem Team der APV Safranberg, Herrn Prof. Dr. Uwe Senftleben, vor allem aber Rosemarie Mayer und Bettina Stahl, die mich in die Arbeitsabläufe einführten und ohne deren Hilfe und Rat die Versuche nicht durchführbar gewesen wären.

Bei Frau Sandra Wagner möchte ich mich für die guten Präparate und die freundlichen Erklärungen bedanken.

Unterstützung bei technischen Problemen erhielt ich von Holger Fuchs, Daniel Schmidt und Philipp Schmidt. Vielen Dank!

Auch bei allen anderen Freunden möchte ich mich ganz herzlich für ihre dauernde Unterstützung und die wertvollen und schönen Pausen während der Laborarbeit und während des Fertigstellens bedanken.

Meiner Familie und vor allem meiner Mutter möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken. Für die zahlreichen passenden Ratschläge in so manch schwieriger Situation und für alles was ihr für mich getan habt. Ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen.

Danke!

8. Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt