Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Universität Hamburg Direktor: Prof. Dr. J. Schulte am Esch

Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen im poststenotischen Myokard unter Einfluß der bovinen Hämoglobinlösung HBOC-201 im Tiermodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt

von

Ralf Winter-Lutzke

aus Eutin

Hamburg, 2002

Angenommen von dem Fachbereich der Medizin der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Sprecher:

Referent: _____

Koreferent:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1	I
1.1. Ziel dieser Arbeit 1	ĺ
1.2. Einsatz von bovinen Hämoglobin-Lösungen 1	l
1.2.1. Charakteristika, Funktionen und Einsatzgebiete boviner Hämoglobin-	
lösungen 1	ļ
1.2.2. Vorteile boviner Hämoglobinlösungen 4	ł
1.2.3. Derzeitiger Kenntnisstand zur bovinen Hämoglobinlösung HBOC-201. 5	5
1.3. Myokardinfarkt 12	<u>)</u>
1.3.1. Definition, Epidemiologie und Ätiologie12)
1.3.2. Pathogenese, Morphologie und Lokalisation)
1.4. Apoptose und Nekrose 15	5
1.4.1. Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose	5
1.4.2. Methoden zum Nachweis von Apoptose und Nekrose	}
1.4.3. Zelltod im Herzinfarkt: Apoptose oder Nekrose?)
2. Material und Methoden	ļ
2.1. Tierversuch	l
2.1.1. Versuchsaufbau	I
2.1.2. Versuchsdurchführung	5
2.2. Herstellung von Gefrierschnitten des Herzens 27	7
2.3. Autoradiographischer Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen 28	3
2.3.1. In situ Nick Translation	3
2.3.2. Densitometrische Auswertung (ImageQuant, Molecular Dynamics) 33	3
2.3.3. Rechenmodus und statistische Auswertung	,
2.4. Histopathologische Färbungen 41	
3. Ergebnisse 43	3
3.1. Hämodynamik 43	3
3.2. Sauerstofftransport im Myokard 45	5
3.3. Ergebnisse der subdiafragmalen Echokardiographie (SDE) 46	5
3.4. Sauerstoffspannungen (tpO ₂) des Myokards 50)

1

3.5. In die Studie einbezogene Versuchstiere mit Gruppenzugehörig-	
keit	51
3.6. Korrigierte Werte der densitometrischen Auswertung	52
3.7. Deskriptive Statistik für die Densitometrie von Septum (S), linkem	
Ventrikel (L) und rechtem Ventrikel (R) der einzelnen Versuchstie-	
re (01-20)	53
3.8. Graphische Darstellung der Werte der einzelnen Gruppen in Box-	
Plots	54
3.9. Graphische Darstellung der Werte innerhalb der einzelnen Grup-	
pen in Box-Plots	56
3.10. Ergebnisse des Mann-Whitney-Tests	58
3.11. Ergebnisse der Histopathologie	61
3.11.1. Allgemeine Ergebnisse	61
3.11.2. Spezielle Ergebnisse der einzelnen Versuche	62
3.11.3. Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse anhand ausgewählter	
Präparate	65
Präparate 3.11.4. Statistische Auswertung der histopathologischen Färbungen	65 71
Präparate	65 71 72
Präparate	65 71 72 72
Präparate	65 71 72 72 77
Präparate	65 71 72 72 77
Präparate	65 71 72 72 77 77
 Präparate	65 71 72 72 77 79 82
 Präparate	65 71 72 72 77 79 82 85
 Präparate	65 71 72 72 77 79 82 85 85
 Präparate	65 71 72 72 77 79 82 85 85 85 85
 Präparate	65 71 72 72 77 79 82 85 85 85 85 85
Präparate	65 71 72 72 77 79 82 85 85 85 85 85 88 89
Präparate	65 71 72 72 77 82 85 85 85 85 85 88 89 91

6. Literaturverzeichnis	94
7. Anhang	104
7.1. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	104
7.2. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	107
Danksagung	109
Lebenslauf	110
Erklärung	111

1. Einleitung

1.1. Ziel dieser Arbeit

In einer Studie wurde bei 20 Foxhounds eine 90%ige Stenose der LAD der linken Koronararterie angelegt und die Tiere in 3 unterschiedlichen Gruppen jeweils unterschiedlichen Behandlungen ausgesetzt (prophylaktische Behandlung mit HBOC-201, therapeutische Behandlung mit HBOC-201, Infusion mit Ringerlösung als Kontrolle).

Das Ziel dieser Arbeit war, per In Situ Nick Translation (radioaktive Markierung von DNA-Einzelstrangbrüchen; Rigby et al., 1977) zu untersuchen, ob die myokardialen Zellen der Hunde aus den verschiedenen Gruppen sich signifikant in Bezug auf ihre DNA-Zersetzungsrate unterscheiden. Verglichen werden sollten diese Ergebnisse dann sowohl mit den in der Studie aufgenommenen Daten zur Hämodynamik und Gewebsoxygenierung als auch mit histopathologischen Färbungen der entsprechenden Herzmuskel.

1.2. Einsatz von bovinen Hämoglobin-Lösungen

1.2.1. Charakteristika, Funktionen und Einsatzgebiete boviner Hämoglobinlösungen

Unter Hämoglobinlösungen versteht man kolloidale Volumenersatzpräparate, die Sauerstoff transportieren und damit eine Alternative zur homologen Transfusion von Erythrozyten darstellen können (Standl et al., 1998a, 2000, 2001).

Zur Entwicklung dieser Lösungen führten u.a. verschiedene Probleme, die eine homologe Bluttransfusion aufweist. So ist eine adäquate Versorgung mit Fremdblut immer von einer ausreichenden Spenderzahl abhängig. Neben hohen Kosten führte in den letzten Jahren vor allem das potentielle Risiko der Infektion mit humanpathogenen Erregern (HIV, Hepatitis B oder C) zu einer Neubewertung der Indikation zur Bluttransfusion (Kühnl et al., 1994). Zudem ist es aufgrund der verschiedenen humanen Blutgruppenantigene immer notwendig, vor einer Bluttransfusion die Verträglichkeit der Konservenzu prüfen ("Kreuzprobe"), da ansonsten letale Unverträglichkeitsreaktionen auftreten können (Standl et al., 2000, 2001). Trotz aller Sorgfalt ist die Gefahr von Fehltransfusionen aufgrund menschlichen Versagens nicht auszuschließen (Standl et al., 2000).

In einem gewissen Maße können Fremdblutspenden bereits durch verschiedene Techniken reduziert werden, so z.B. durch akute normovolämische Hämodilution (ANH) oder intraoperative maschinelle Autotransfusion mittels "Cell Saver" (MAT) (Spahn et al., 1994). Trotzdem verbleiben aber Patientengruppen, für die aufgrund der besonderen Akuität oder des Ausmaßes des Blutverlustes (z.B. Polytrauma, Placenta praevia) solche Methoden nicht in Frage kommen.

Aufgrund dieser Tatsachen wurde bereits in den 30er Jahren (Salaskin et al., 1931) begonnen, Hämoglobin-Lösungen herzustellen. Die Gruppe um Amberson hat sich als Erste intensiv um die Entwicklung sogenannter stromafreier Hämoglobin-Lösungen (SFH) bemüht und deren Auswirkungen im Tiermodell und am Patienten erforscht (Amberson et al., 1933 und 1949). Es zeigten sich dabei aber einige organotoxische Nebenwirkungen, die nach und nach durch spezielle Reinigungsverfahren beseitigt werden konnten. Im weiteren Verlauf der Entwicklung entstand ein Herstellungsprotokoll, daß aber einigen Variationen unterliegt: Zuerst werden Erythrozyten in destilliertem Wasser oder Phosphatpuffer lysiert (Amberson et al., 1933). Nach einem Waschvorgang werden Erythrozyten-Stroma und -Membran abgetrennt (Hamilton et al., 1947) und ein Hämoglobin-Tetramer durch Kristallisation hergestellt. Es schließt sich eine elektrophoretische oder chromatographische Auftrennung und eine zusätzliche Purifikation durch Filtrieren, Waschen und mehrfache Dialyse an. Dadurch konnten die organotoxischen Nebenwirkungen bereits deutlich reduziert werden (Takahashi et al., 1991; Lee et al., 1989).

Unter den vielen derzeit untersuchten Hämoglobinlösungen wurde in dieser Studie die Substanz **HBOC-201** (hemoglobin-based oxygen carrier 201) der Firma Biopure (Cambridge MA, USA) untersucht. Es handelt sich hierbei um eine ultragereinigte, mit Glutaraldehyd polymerisierte bovine Hämoglobinlösung, die im Vergleich mit normalerweise zur Hämodilution eingesetzen Lösungen wie Hydroxyethylstärke (HES) einige wesentliche Unterschiede aufweist, die in Tabelle 1.1. vergleichend zusammengefaßt sind:

Parameter	HES	HBOC-201
	70.000/0,5; 6%	(Biopure, Cambridge MA,
		USA)
Molekulargewicht	70.000	32.000-500.000
Substitutionsgrad	0,45-0,55	
onkotischer Druck [mm Hg]	30	17
Viskosität, 37°C [mPa * s]	1,8-2,1	1,3
рН	4,5-6,5	7,6-7,9
Osmolarität [mOsm * kg ⁻¹]	300-330	293-307
Natrium [mmol * I ⁻¹]	154	152-168
Kalium [mmol * l ⁻¹]	0	3,5-5,5
Chlorid [mmol * I ⁻¹]	154	111-127
Calcium [mmol * I ⁻¹]	0	0,8-1,5
Hämoglobin [g * dl ⁻¹]		13,0 ± 1,0
Methämoglobin [%]		< 10
Oxyhämoglobin [%]		< 5
P ₅₀ [mm Hg]		36
Endotoxin [EU * ml ⁻¹]		< 0,5
Phospholipid [nmol * ml ⁻¹]		< 3
Sterilität		kein Kolonienwachstum

Tab. 1.1. Zusammensetzung von HES und HBOC-201.

Die bovinen Hämoglobinlösungen konkurrieren zur Zeit auf dem Gebiet des Blutersatzes mit rekombinanten oder chemisch modifizierten Human-Hämoglobinlösungen. Die bovinen Produkte zeichnen sich dadurch aus, daß sie möglicherweise wesentlich preiswerter vermarktet werden können und in großem Umfang verfügbar sind. Sie bergen aber eine potentielle Immunogenität, was noch durch Langzeitstudien zu klären bleibt (Standl et al., 1998b).

Die mittlerweile in Phase II und III eingesetzten Hämoglobinlösungen werden in der Anästhesiologie, Chirurgie und Notfallmedizin eingesetzt, um eine Substitution von intravaskulärem Volumen oder eine Verbesserung der Gewebsoxygenierung zu erreichen (Standl et al., 1997a). Außerdem können sie z.B. bei Tumorpatienten einen Vorteil darstellen, da hier aufgrund des teilweise schlechten Allgemeinzustandes und nicht aufschiebbarer Operationen oft von einer Eigenblutspende abgesehen werden muß (Standl, 1998). Einige Studien haben bereits gezeigt, daß Krebspatienten, die allogene Bluttransfusionen erhalten hatten, kürzere Intervalle ohne Rezidivbildung oder Metastasierung überlebten als andere Patienten ohne Fremdbluttransfusion (Tartter, 1992). Darüberhinaus wird eine höhere Infektionsrate bei Patienten, die homologe Erythrozytentransfusionen erhielten beschrieben, als bei Patienten, die nicht transfundiert wurden (Heiss et al., 1993). Der Einsatz von Hämoglobinlösungen scheint auch in der Onkologie von großer Bedeutung zu sein, da möglicherweise eine Erhöhung der Strahlen- und Chemotherapiesensitivität von Tumoren erreicht werden kann (Tartter, 1992).

1.2.2. Vorteile boviner Hämoglobinlösungen

Der entscheidende Vorteil der Hämoglobinlösungen im Vergleich mit kolloidalen Plasmasubstituten liegt in ihrer O₂-Bindekapazität (Standl et al., 1997a). Bovines Hämoglobin hat zudem eine niedrigere O₂-Affinität als z.B. humanes Hämoglobin oder Hämoglobin anderer Säugetierspezies, wodurch eine erleichterte O₂-Abgabe an die Gewebe erreicht wird. Außerdem kann das freie Hämoglobin arterielle Stenosen wesentlich besser passieren als vergleichsweise große Erythrozyten (Standl et al., 1996a: Horn et al., 1997). Bovine Hämoglobinlösungen haben dabei ein dreimal höheres Potential, die Gewebsoxygenierung wiederherzustellen als autologe Erythrozytenkonzentrate oder Warmblut (Standl et al., 1996a).

Frühere Nebenwirkungen wie Organtoxizität, Koagulopathien und Anstieg der Leberenzyme, die durch Phospholipide der Erythrozytenmembran und Endotoxine hervorgerufen wurden (Feola et al., 1988), konnten durch verschiedene Reinigungsschritte (wie oben geschildert) und Stabilisierung des Hämoglobintetramers z.B. durch Cross-Linking beseitigt werden. Im Tierversuch konnte nachgewiesen werden, daß bovine Hämoglobinlösungen der neuen Generation im Tierversuch keine wesentliche Organtoxizität mehr aufweisen (Bosman et al., 1992; Standl et al., 1996b; Lipfert et al., 1999).

Zusätzlich wurde durch chemische Modifikation eine längere intravaskuläre Verweildauer (36 Stunden experimentell, Vlahakes et al., 1990; 16 Stunden klinisch, Hughes et al., 1996) erreicht. Außerdem besitzt zellfreies Hämoglobin im Gegensatz zum zellgebundenen Hämoglobin keine Blutgruppenantigene, so daß es in Notfallsitutationen ohne vorherige Kreuzprobe eingesetzt werden kann.

Trotz guter Verträglichkeit der HBOC-201-Lösung, z.B. bei Patienten in der Leberchirurgie, verursacht HBOC-201 einen vasokonstriktorischen Nebeneffekt, der zu einer Steigerung insbesondere des systemischen Gefäßwiederstandes führt (Standl et al., 1998b). Dies kann nicht, wie bei den Hämoglobinlösungen der ersten Generation, durch Phospholipide erklärt werden, die in dieser Lösung an der Nachweisgrenze lagen, sondern durch einen anderen Effekt: alle nicht-oxydierten Hämoglobinlösungen binden Stickstoffmonoxid (NO). NO bewirkt normalerweise eine Relaxierung der Gefäßmuskulatur (Furchgott et al., 1980), es wird also durch das Wegfangen des NO durch freies Hämoglobin eine Vasokonstriktion hervorgerufen. Diese Nebenwirkung wäre z.B. im Falle eines Polytraumas mit Hämorrhagie zunächst sogar erwünscht, da de systemische Gefäßwiderstand und damit der MAP angehoben werden. Die Vasokonstriktion könnte allerdings die Situation von Patienten mit eingeschränkter kardialer Funktion verschlechtern (z.B. Herzinsuffizienz). Besonders fatal würde sich dabei eine Vasokonstriktion der Koronararterien auswirken (Biro et al., 1988).

Liard und Kunert (1993) stellten hingegen die Hypothese auf, daß diese Vasokonstriktion eine Reaktion auf die Hyperoxygenierung des Gewebes durch HBOC sei. Physiologischerweise verhindert eine reaktive Vasokonstriktion im Kapillargebiet die weitere Zufuhr von korpuskulären O₂-Trägern. Für plasmatisch transportiertes O₂ ist diese Regulation allerdings wirkungslos. Zusammen mit der niedrigen O₂-Affinität von HBOC-201 garantiert dies eine adäquate Gewegsoxygenierung sogar unter 95%iger arterieller Stenosierung (Horn et al., 1997).

Neben diesen zahlreichen Vorteilen der bovinen Hämoglobinlösungen gegenüber homologer Bluttransfusion darf man allerdings einen wichtigen Nachteil nicht außer Acht lassen, nämlich daß es sich bei diesen Lösungen lediglich um sauerstofftransportierende Volumenersatzmittel handelt. Bei erheblichen Blutverlusten müssen daher zusätzlich noch FFP, Gerinnungsfaktoren sowie Thrombozyten aus anderen Quellen ersetzt werden (Standl, 1998).

1.2.3. Derzeitiger Kenntnisstand zur bovinen Hämoglobinlösung HBOC-201 <u>Tierexperimentelle Studien :</u>

In einer tierexperimentellen Studie an Hunden (Standl et al., 1996b) wurden 19 Beagle-Hunde (10m / 9w; Alter: $3,2 \pm 1,4$ J; Gewicht: $15,4 \pm 3,6$ kg) anästhesiert und über einen Tubus mit 30% O₂ in Luft normoventiliert. Die Hunde wurden randomisiert in 2 Gruppen aufgeteilt und entweder mit HES (Gruppe 1) oder mit der bovinen Hämoglobinlösung UPBHII, einer Vorgängersubstanz von HBOC-201, Gruppe 2, bis zu Hämatokritwerten von 15%, 10% bzw. \leq 5% dilutiert. Eine Stunde nach Erreichen eines Hämatokrits von \leq 5% wurden die Hunde getötet und Leber und Nieren entnommen. Die Gewebsproben wurden fixiert, gefärbt (Toluidinblau / Pyroninrot bzw. PAS = Perjodsäure-Schiff) und licht- und elektronenmikroskopisch ausgewertet, wobei die Proben eines instrumentierten aber nicht dilutierten Hundes als "sham control" eingesetzt wurden. Bei den HES-Tieren zeigten sich im Gegensatz zu den UPBHII-Tieren gravierende histologische Veränderungen an den Nieren, wie z.B. Zytoplasmaprotrusionen und erweiterte Tubuli, die wahrscheinlich durch eine Hypoxie hervorgerufen wurden, da HES keine nachgewiesene toxische Wirkung auf Leber und Nieren hat und die Tiere zu keiner Zeit im Schock waren. Bei Hämatokritwerten von 5% konnte bei den mit HES hämodilutierten Hunden keine adäquate O_2 -Versorgung gewährleistet werden. Dies führte bei den HES-Tieren im Gegensatz zu den UPBHII-Tieren zum Kreislaufversagen. Die in der UPBHII-Gruppe erhaltene Organintegrität läßt sich mit der O_2 -Freisetzung aus UPBHII erklären. Durch elektronenmikroskopisch nachgewiesenen direkten Kontakt von UPBHII mit dem Gefäßendothel wurde die O_2 -Diffusion erleichtert, was eine hypoxische Organschädigung verhindern konnte.

In derselben Studie wurden verschiedene hämodynamische, hämatologische und O₂-Transport-Parameter gemessen. Es zeigte sich, daß, in einem fast vollständigen Blutaustauschversuch, UPBHII die Gewebsoxygenierung (tpO₂) im Skelettmuskel deutlich effektiver aufrechterhält als HES. Bei einem End-Hämatokrit-Wert von 2% konnte UPBHII sogar noch für eine Stunde hämodynamische Stabilität gewähren, wohingegen die HES-behandelten Hunde bereits bei einem Hämatokrit von 5% wegen cardiozirkulatorischer Dekompensation frühzeitig eingeschläfert werden mußten. Als Hauptvorteil von UPBHII zeigte sich aber in dieser Studie die Verbesserung des O₂-Diffusionstransportes im mikrozirkulatorischen Bereich, wie gesteigerte avDO₂ (systemische arterio-venöse O₂-Differenz) und O₂-Extraktion belegten, die den vasokonstriktorischen Effekt auf die größeren Gefäße überkompensieren konnten (Standl et al., 1997a).

Lipfert et al. (1999) untersuchten die Histologie und Ultrastruktur der Leber und Nieren von 8 Beagle-Hunden nach komplettem isovolämen Blutaustausch mit UPBHII. Die Ergebnisse dieser Versuchstiere wurden dann mit einer "sham control" und mit 8 weiteren Hunden verglichen, die mit HES infundiert wurden. Die Nieren der Versuchstiere zeigten keine Veränderungen verglichen mit der "sham control", was darauf hinweist, daß durch UPBHII eine ausreichende Gewebsoxygenierung und keine renale Toxizität vermittelt wird. Die mit HES infundierten Tiere hingegen zeigten deutliche Schädigungen der proximalen Tubuli, die sich z.B. durch erweiterte Lumina, Zytoplasma-Protrusionen, Bürstensaum-Defekte oder tubuläre Nekrosen auszeichneten. Im Bereich der Leber konnten in allen UPBHII-Tieren aber auch in den HES-Tieren vereinzelt leichte Veränderungen (Einzelzell-Nekrosen, Verringerung von Glykogen-Granula, Schwellung von Endothelzellen) beobachtet werden. Eine relevante Hepatotoxizität von UPBHII kann daher ausgeschlossen werden, da die Tiere HES-Gruppe die gleichen Veränderungen aufzeigten.

In einer weiteren Studie (Standl et al., 1996a) wurden 24 Foxhounds (15m / 9w; Alter: 2 ± 0.5 J; Gewicht: 30 ± 14 kg) randomisiert in 3 Gruppen eingeteilt. 3 Wochen vor Versuchsbeginn wurde den Tieren der Gruppe1 15 ml Blut / kg Körpergewicht entnommen, die Erythrozyten vom Plasma abgetrennt und separat als Erythrozytenkonzentrat aufbewahrt. Am Tag des Versuchs wurden alle Hunde anästhesiert, intubiert und mit 30% O₂ in Luft normoventiliert sowie bis zu Hämatokritwerten von 20%, 15% und 10% mit 6% HES 200.000/0,5 hämodilutiert. Die Tiere der Gruppe1 erhielten dann die 3 Wochen zuvor gewonnenen eigenen Erythrozytenkonzentrate, die Tiere der Gruppe 2 erhielten ihr eigenes, während der ANH gewonnenes Warmblut zurück und die Hunde der Gruppe 3 wurden mit HBOC-201 transfundiert. Dies wurde jeweils bis zum Erreichen eines Hämoglobinwertes von 1g/dl, 2g/dl bzw. 3g/dl, verglichen mit dem Hämoglobinwerte bei Hämatokritwerten von 10%, durchgeführt. Nach jeder Behandlung wurde eine Äguilibrierungsperiode von 20 min eingehalten, die Messungen lagen jeweils 60 min auseinander. Gemessen wurden Blutgase, hämodynamische Parameter, O2-Transport und die Oxygenierung des Muskelgewebes. Dabei zeigte sich, daß die mit HBOC-201 transfundierten Hunde eine signifikant höhere Gewebsoxygenierung im Muskel zeigten als die Hunde der anderen Gruppen. Es konnten im Vergleich mit den gelagerten Erythrozytenkonzentraten bezogen auf die transfundierte Menge an O₂-Trägern sogar 3- bis 4-fache Werte erzielt werden. Darauf wurde die Hypothese aufgebaut, daß HBOC-201 nicht nur bei Anämien einen O2-Versorgungsvorteil bieten kann, sondern auch unter sog. "low-flow"-Umständen, wie z.B. arteriellen Stenosen und myocardialen oder cerebralen Infarkten.

In einer weiteren tierexperimentellen Studie (Horn et al., 1998), die als Vorversuch für die dieser Arbeit zugrunde liegende Fragestellung zu werten ist, wurden 12 Foxhounds (8m / 4w; Gewicht: 29 ± 3 kg) anästhesiert und mit 30% O₂ in Luft

normoventiliert. Nach Hämodilution der Tiere mit Ringerlösung bis zu einem Hämatokrit von 20% wurden die Tiere randomisiert in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe 2 erhielt zusätzlich 200ml HBOC-201. Nach 15 min Ruhephase wurde in allen Gruppen eine 95% ige arterielle Stenose der linken A. poplitea gesetzt und den Tieren der Gruppe 1 nach 45 und 75 min je 200 ml 6% HES 200.000/0,5 infundiert. Die Tiere der Gruppe 2 und 3 erhielten zu unterschiedlichen Zeitpunkten (vor und nach Stenose) jeweils 200ml HBOC-201 auf zwei Dosen verteilt und 200 ml Ringerlösung. Nach der Instrumentierung der Tiere, nach Hämodilution, Applikation von Blut oder HBOC-201 sowie jeweils 30, 60 und 90 min nach der Stenosierung wurden Messungen verschiedener Parameter durchgeführt. Die Sauerstoffextraktionsrate des Muskels lag in den Gruppen 2 und 3 nach HBOC-201-Gabe signifikant höher als in Gruppe 1. Der tpO₂ blieb folglich über den gesamten Versuchszeitraum in Gruppe 3 (Prophylaxegruppe) unverändert. Daraus zogen die Autoren die Schlußfolgerung, daß die Gabe von HBOC-201 vor einer arteriellen Stenose einen Abfall des O₂-Partialdruckes im poststenotischen Muskelgewebe verhindern kann bzw. durch HBOC-201-Applikation wirksam beseitigt werden kann.

Einige andere internationale Arbeitsgruppen führten ebenfalls in den letzten Jahren tierexperimentelle Studien mit bovinen Hämoglobinlösungen durch.

Harringer et al. (1992) testeten den Einfluß der ultragereinigten, stromafreien bovinen Hämoglobinlösung <u>PBHg</u> im hämorrhagischen Schockmodell an Hunden. Die Tiere wurden für 60min auf einem systolischen arteriellen Druck von ≤50mmHg gehalten und dann entweder mit PBHg, PRBC (homologes Blut) oder 10% humanem Serumalbumin (HSA) als Volumenersatzmittel behandelt. Nach dem Volumenersatz wurden die Tiere 2h unter Anästhesie und die darauffolgenden 4h im Wachzustand untersucht. Es stellte sich heraus, daß der Volumenersatz mit 30±3ml/kgKG PBHg eine stabile Hämodynamik wiederherstellen und die vorhandene Azidose beseitigen konnte, sodass die Tiere die gleichen Werte erreichten wie die mit homologem Blut behandelten. Zusätzlich konnte, verglichen mit den HSA-behandelten Tieren, ein verbesserter O₂-Transport beobachtet werden. PBHg zeigte keinerlei cardiopulmonare Toxizität oder andere Nebenwirkungen. Eine weitere tierexperimentelle Studie wurde von Bosman et al. (1992) durchgeführt. Hier wurden 18 Hunde ebenfalls in einen hämorrhagischen Schock versetzt (SAD bei durchschnittlich 40mmHg für 30min) und anschließend mit Eigenblut, 6% HES (MW 200.000) in 0.9% NaCl oder <u>PBH</u>, einer polymerisierten bovinen Hämoglobinlösung, behandelt. Direkt nach der Infusion der entsprechenden Volumenersatzmittel stellten sich in allen drei Gruppen O₂-Abgabe und –Verbrauch wieder auf prähämorrhagische Werte ein. In der HES-behandelten Gruppen allerdings wurde der verminderte arterielle O₂-Gehalt durch ein um 158% erhöhtes Herzzeitvolumen ausgeglichen. In der Eigenblut-Gruppe war das Herzzeitvolumen um 31%, in der PBH-Gruppe nur um 9% erhöht. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Tiere der PBH-Gruppe sich ebenso gut erholten wie die Tiere der Eigenblut-Gruppe, dies aber ohne eine wesentliche Erhöhung des Herzzeitvolumens vor sich ging.

In einer tierexperimentellen Studie an Schafen testeten Vlahakes et al. (1990) den Einfluß einer gereinigten, polymerisierten bovinen Hämoglobinlösung <u>UPBH I</u> im Blutaustauschmodell. Alle untersuchten Tiere tolerierten einen \geq 95%igen Austausch bis zu einem Hämatokrit von 2,4±0,5% mit stabiler Hämodynamik. Die zuletzt erreichte Plasma-Hämoglobin-Konzentration von 6,1±1,6g/dl ermöglichte einen basalen O₂-Verbrauch. Alle Tiere, die UPBH I erhielten, überlebten nach Abschluß des Versuchs über einen langen Zeitraum, wobei eine rasche Resynthese oviner Erythrozyten beobachtet werden konnte.

In der tierexperimentellen Studie von Lee et al. (1989) wurde der Einfluß der ultragereinigten, polymerisierten bovinen Hämoglobinlösung <u>UPPBHg</u> an Ratten getestet. Hierbei wurden die Versuchstiere mit verschiedenen Dosen (25, 50, 75 bzw. 100ml/kg KG) UPPBHg infundiert. Eine zusätzliche Gruppe wurde mit den gleichen Dosen infundiert, der Lösung wurde dabei aber zusätzlich Bikarbonat zur Alkalisierung des Urins zugesetzt. Die dritte Versuchstier-Gruppe wurde mit UPPBHg infundiert, das mit Rinderblut-Lysaten kontaminiert war. Die Nierenfunktion wurde über den Versuchszeitraum durch die Bestimmung des Serum-Kreatinins untersucht. Die Infusion von UPPBHg bis zu Dosen von 50ml/kgKG verursachte keine nennenswerte Änderung im Serum-Kreatinin, wobei höhere Dosen eine reversible Kreatinin-Zunahme 24h nach der Infusion verursachte. Die mit Bikarbonat versetzten Lösungen minimierten hingegen die beobachtete reversible Toxizität, sogar bei Dosen bis 100ml/kgKG. Im Gegensatz dazu wurde bei den mit Hämolysat kontaminierten Lösungen 24h nach der Infusion bei allen Konzentrationen ein Anstieg des Serum-Kreatinins beobachtet, der auch von gleichzeitiger Bikarbonat-Infusion unbeinflußt blieb. Dieser Effekt war auch 48h nach der Infusion nicht rückläufig, bei Dosen über 25ml/kgKG trat der Exitus einiger Versuchstier ein. Diese Studie zeigte, daß UPPBHg auch in hohen Dosen eingesetzt werden kann, wobei nur leichte und reversible Nebenwirkungen auftreten. Die Beobachtung, daß die Alkalisierung des Urins diesen Nebenwirkungen entgegenwirkt, deutet darauf hin, daß sie durch eine Hämoglobinpräzipitation oder durch einen toxischen Effekt in den Nierenkanälchen verursacht werden.

Humanstudien:

In einer Humanstudie (Standl et al., 1998b) wurde 12 Patienten (6m / 6w; 35-69 y) vor einer Leberteilresektion 1 Liter autologes Blut entnommen und durch 2 Liter Ringer-Laktatlösung ersetzt. Zusätzlich erhielten die Patienten zufallsmäßig verteilt entweder 6% HES 70.000/0,5 (3 ml / kg, Gruppe 1) oder HBOC-201 (0,4 g / kg, Gruppe 2). Vor der Operation, am Operationstag, am 2., 3., 4. und 7. postoperativen Tag, am Entlassungstag sowie 3 Monate nach der Operation wurden Blutproben entnommen und für blutchemische, co-oximetrische, hämatologische, immunologische und Koagulationsuntersuchungen eingesetzt. HBOC-201 wurde von allen Patienten gut toleriert, es zeigten sich keine allergischen Reaktionen. Die Patientengruppe ist allerdings nicht groß genug, um darüber abschließende Aussagen zu machen. Weiterhin zeigten sich keine Vorteile von HBOC-201 gegenüber HES im Hinblick auf Einsparung von Fremdblut, was aber auf die geringe Dosis an HBOC-201 und die kleine Fallzahl zurückzuführen ist.

In einer anderen Humanstudie (Kasper et al., 1996) wurden 13 Patienten untersucht, die vor einer elektiven abdominalen Aortenoperation nach der Anästhesierung mit 1L Ringerlösung isovoläm hämodilutiert wurden. Die Patienten erhielten innerhalb von 30min zufällig verteilt entweder 3ml/kgKG HBOC-201 oder 6% HES. Während der Operation wurden die folgenden Parameter verfolgt: arterieller und Pulmonararterien-Druck, arterielle und gemischt venöse Blutgase, Herzindex (CI), systemischer und Pulmonargefäßwiderstands-Indices, O₂-Abgabe-Index (DO₂I), O₂-Verbrauchs-Index (VO₂I) und O₂-Extraktions-Verhältnis (O₂ER). 30min nach der HBOC-201-Gabe betrug der arterielle Druck 149% (p=0,028), der systemische Gefäßwiderstands-Index 169% (p=0,046) und der CI 75% (p=0,46) der Werte vor der Infusion. In Bezug auf die Herzfrequenz und den Pulmonargefäßwiderstand zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Der DO₂I betrug nach 30min 79% (p=0,046) und der VO₂I 76% (p=0,028) der Ausgangswerte, wobei das O₂ER unverändert blieb. Die Autoren schlossen aus diesen Beobachtungen, daß HBOC-201 in einer Dosierung von 3ml/kgKG die O₂-Abgabe durch ungünstige Effekte auf das Herzzeitvolumen beeinträchtigt.

Hughes et al. (1995) untersuchten die Beziehung zwischen dem Eisen-Metabolismus und der Pharmakokinetik von HBOC-201 in einer Humanstudie. Die Testpersonengruppe umfaßte 24 gesunde Personen, wobei 9 Männer und 9 Frauen HBOC-201, 3 Männer und 3 Frauen Ringerlösung infundiert wurde. Allen Testpersonen wurde 15% ihres Blutvolumens entnommen, gefolgt von einer 3:1 Hämodilution mit Ringerlösung. Die HBOC-201-Gruppe erhielt bis zu 45g bzw. 350ml HBOC-201, die Kontrollgruppe Ringerlösung. In den ersten 24h des Versuchs wurden serielle arterielle Blutproben entnommen und eine simultane Pulsoxymetrie durchgeführt. Anschließend wurden über einen Zeitraum von einem Monat weiter serielle Proben entnommen. Die höchsten Eisenkonzentrationen konnten 8h (bis zu 220µg/dl), die höchsten Ferritinkonzentrationen 48h (bis zu 180ng/ml) nach der Infusion gemessen werden. Die Serum-Eisen-Konzentrationen verliefen parallel zu den HBOC-201-Konzentrationen, wobei die Plasma-Halbwertszeit von HBOC-201 20h betrug. Die Serum-Erythropoietin-Konzentration stieg um das sechsfache 24h nach der Infusion an (p<0,001). Im Urin keines Patienten der HBOC-201-Gruppe konnte Hämoglobin nachgewiesen werden. Es zeigte sich also, daß HBOC-201 einen Anstieg in den plasmatischen Konzentrationen von Eisen, Ferritin und Erythropoietin verursacht, der den Verlauf der HBOC-201-Plasmawerte wiederspiegelt.

In der Studie von LaMuraglia et al. (2000) wurde ein größeres Patientenkollektiv (72 Personen) im Rahmen von elektiven infrarenalen Aortenoperationen untersucht. Die Testpersonen wurden randomisiert in eine HBOC-201-Gruppe und in eine RBC("red blood cell")-Gruppe eingeteilt. Dabei erhielten die Personen der HBOC-201-Gruppe (n=48) während der initialen Transfusion 60g HBOC-201 und optional drei weitere Dosen von jeweils 30g HBOC-201 innerhalb von 96h. Weiterhin benötigte Transfusionen bestanden aus RBC. Die Patienten der RBC-Gruppe (n=24) erhielten ausschließlich RBC-Transfusionen. Ziel der Studie war zu bestimmen, ob HBOC-201 die Transfusion von homologen Erythrozytenkonzentraten ersetzen kann. Die Patienten beider Gruppen waren in Bezug auf ihre Ausgangs-Parameter und Komplikationen vergleichbar, es zeigten sich keinerlei allergische Reaktionen. In der RBC-Gruppe benötigten alle Patienten mindestens eine RBC-Transfusion, wohingegen 13 von 48 Patienten der HBOC-201-Gruppe keine RBC-Transfusion benötigten. Die einzigen signifikanten Unterschiede zeigten sich in einer 15% igen Erhöhung des mittleren arteriellen Drucks und einer maximal dreifachen Erhöhung des Urin-Stickstoffgehalts nach HBOC-201-Gabe. In der RBC-Gruppe waren zwei (8%) und in der HBOC-201-Gruppe drei (6%) perioperative Fälle von Exitus zu verzeichnen. In 27% der Fälle konnte HBOC-201 die Notwendigkeit von RBC-Infusionen komplett eliminieren, reduzierte aber nicht den Mittelwert der benötigten RBC-Infusionen. Allgemein wurde die HBOC-201-Transfusion gut toleriert und beeinflußte weder die Morbiditäts- noch die Mortalitätsrate.

1.3. Myokardinfarkt

1.3.1. Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Unter einem Myokardinfarkt versteht man eine Koagulationsnekrose der Herzmuskulatur, die durch eine anhaltende Ischämie bei absoluter Korornarinsuffizienz eintritt. In den westlichen Industrieländern erleiden jedes Jahr ca. 300 pro 100 000 Einwohner einen Herzinfarkt. Etwa 30% der Herzinfarkte verlaufen tödlich.

Dem Herzinfarkt liegt meist eine Koronarsklerose zugrunde. Häufigste Ursache für die meist akut einsetzende Ischämie ist ein Verschluß eines Koronararterienastes durch eine akute Koronarthrombose. Der Thrombus kann sich auf einer atherosklerotischen Plaque entwickeln und bei größeren Herzinfarkten in über 80% der Fälle nachgewiesen werden. Seltene Ursachen des akuten Gefäßverschlusses sind Einblutungen in eine atheromatöse Plaque oder eine schnelle Progression der Koronarsklerose (Classen et al., 1998).

1.3.2. Pathogenese, Morphologie und Lokalisation

Schon nach 10min absoluter Ischämie des Myokards sind Veränderungen an den Zellorganellen elektronenmikroskopisch sichtbar. Der Energiestoffwechsel wird aufgrund der gestörten oxidativen Energiegewinnung auf anerobe Glykolyse umgestellt und der ATP-Spiegel sinkt. Durch diesen ATP-Mangel funktioniert die energieverbrauchende Ionenpumpe an den Membranen nicht mehr ausreichend. Dies führt zu einem Natrium- und Wassereinstrom in die Herzmuskelzellen. Die Polarisation der Zellmembranen wird aufgrund des gegenläufigen Kaliumausstroms gestört, dadurch können teilweise direkt nach dem Ereignis EKG-Veränderungen auftreten.

Im frühen Stadium zeigt sich lichtmikroskopisch eine sog. "trübe Schwellung" des Zytoplasmas. Die entsprechenden morphologischen Veränderungen sind eine Schwellung der Mitochondrien, eine Fragmentierung der Cristae mitochondriales – Sitz der Atmungskette – und eine deutliche Dilatation des endoplasmatischen Retikulums. Nach ca. 30min führt die Ischämie des Myokards zu einer irreversiblen Muskelschädigung.

Nach etwa 4-6 Stunden verursacht die beginnende Koagulationsnekrose irreversible Veränderungen der Myofibrillen. In der histologischen Färbung zeigt sich das Zytoplasma intensiv eosinrot. Die geschädigten Myozyten zeigen Hyperkontraktionsbänder. Durch die gestörte Membranfunktion gelangen intrazytoplasmatische Enzyme ins Serum.

Durch die Schädigung der Herzmuskelzellen werden Entzündungsmediatoren aktiviert und führen nach etwa 10-24 Stunden zum Einwandern von Entzündungszellen, vor allem neutrophiler Leukozyten aus dem hyperämischen Randsaum. Der Herzinfarkt ist zu diesem Zeitpunkt makroskopisch als lehmfarbene Nekrose sichtbar, wie Abbildung 1.1. zeigt:



Abb. 1.1.: Frischer Myokardinfarkt. Makroskopisches Bild. Lehmfarbene Abblassung des Myokards im Infarktgebiet und rötliches resorptives Granulationsgewebe im Randbereich (Pfeile). Aus Böcker, Denk, Heitz: *Pathologie* (1997). Ab dem 4. Tag beginnt sich Granulationsgewebe zu bilden. Aus dem Randgewebe der Nekrose sprießen zunehmend Kapillaren und die Makrophagen des Granulationsgewebes bauen die nekrotischen Bereiche ab. Am Ende der zweiten Woche werden von Fibroblasten zunehmend Kollagenfasern gebildet, bis nach ca. 6 Wochen die gesamte Nekrose durch kollagenes Bindegewebe ersetzt ist. Die so entstandene Narbe ist makroskopisch als grauweiße Schwiele erkennbar. Im Herzmuskel findet keine nennenswerte Regeneration statt, so daß das restliche Parenchym einer vermehrten Belastung ausgesetzt ist (Classen et al., 1998).

Die Lokalisation des Infarktes selbst hängt vom <u>Versorgungstyp</u> (siehe Abbildung 1.2.) der Koronararterien ab. Beim Normalversorgungstyp, der bei 70% der Menschen vorliegt, wird die Hinterwand der linken Kammer von der rechten Kranzarterie mitversorgt. Bei 10% der Menschen liegt der Rechtsversorgungstyp vor, bei dem die rechte Kranzarterie auch die linke Herzkante mitversorgt. Bei den restlichen 20% (Linksversorgungstyp) wird das gesamte linke Herz von der linken Kranzarterie versorgt. Die Lokalisation des Infarktes richtet sich also nach dem Versorgungsgebiet des verschlossenen Koronararterienastes (Benninghoff, 1994).



Abb. 1.2.: Schematische Querschnitte durch das Herz zur Darstellung der Versorgungsgebiete der A. coronaria dextra (schwarz) und A. coronaria sinistra (weiß). (a) ausgeglichener Versorgungstyp; (b) Rechtsversorgungstyp; (c) Linksversorgungtyp. R = Rechter Ventrikel; L = Linker Ventrikel. Aus Benninghoff: *Anatomie* (1994).

1.4. Apoptose und Nekrose

Zum Verständnis der Herzmuskelerkrankungen und Entwicklung neuer Therapiekonzepte ist es notwendig herauszufinden, welcher Mechanismus, Apoptose oder Nekrose, für den Tod der Herzmuskelzellen verantwortlich ist, oder ob es sich um eine Mischform dieser beiden Phänomene handelt.

1.4.1. Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose

Der Begriff der "Apoptose" (programmierter Zelltod) tauchte in der Literatur erstmals 1972 auf (Kerr et al., 1972) und beschrieb dort eine besondere Art des Zelltodes innerhalb vitaler Gewebe. In den letzten zehn Jahren wurde ein immenser Forschungsaufwand auf dem Gebiet der Apoptose betrieben, so daß ca. 30 neue Moleküle identifiziert wurden, die exklusiv an der Apoptose beteiligt sind. Zudem wurde festgestellt, daß ca. 20 andere Moleküle, denen bereits eine andere Funktion, z.B. in der Signaltransduktion, DNA-Reparatur, Transkription oder Replikation, zukommt, maßgeblich an der Apoptose beteiligt sind (Wyllie, 1998). Im Verlauf der Apoptose zeichnen sich bestimmte charakteristische Veränderungen in der Zellmorphologie ab: Das anfangs auftretende Schrumpfen der Zelle wird gefolgt von Einschnürungen der Membran, das letztendlich in den Zerfall der Zelle in membranumschlossene Apoptose-Körperchen mündet. Die Morphologie der Zellorganellen bleibt dabei im Normalfall erhalten, aber im Nukleus kommt es zu einer charakteristischen Kondensation des Chromatins, wobei bestimmte heterochromatische Bereiche entstehen (Wyllie, 1998). Diese morphologischen Charakteristika sind in Abbildung 1.3. dargestellt. Es handelt es sich bei der Apoptose um einen physiologischen Prozess, durch den unbrauchbare oder nutzlose Zellen während der Entwicklung oder anderer normaler biologischer Vorgänge entfernt werden.

Die **Nekrose** hingegen, die eher als "plötzlicher Zelltod" bezeichnet werden kann, stellt einen *pathologischen* Prozess dar, der auftritt, wenn Zellen einer physikalischen (Hypothermie, Hypoxie etc.) oder chemischen Schädigung ausgesetzt sind (Vermes et al., 1994). Der Vorgang der Nekrose beginnt mit der Unfähigkeit der Zelle, die Homöostase aufrecht zu erhalten, was zu einem Einstrom von Wasser und extrazellulären Ionen in die Zelle führt. Die Zellorganellen, dabei besonders die Mitochondrien, quellen auf und werden zerstört. Anschließend bricht die Plasmamembran auf und der cytoplasmatische Inhalt inklusive der lysosomalen Enzyme entleeren sich in den extrazellulären Raum. Folglich wird die Nekrose meist von starker Gewebsschädigung und enzündlicher Reaktion begleitet (Van Furth et al., 1988). Die einzelnen Schritte der Nekrose sind in Abbildung 1.4. schematisch dargestellt.



Abb. 1.3.: Schematische Darstellung der morphologischen Charakteristika der Apoptose.



Abb. 1.4.: Schematische Darstellung der morphologischen Charakteristika der Nekrose.

Neben diesen morphologischen Charakteristika unterscheiden sich Apoptose und Nekrose noch zusätzlich durch biochemische und physiologische Aspekte, die in Tabelle 1.2. zusammengefaßt sind:

Ap	ooptose	Ne	ekrose
Мо	rphologische Charakteristika:		
-	Aufblähen der Membran, Integrität aber bleibt erhalten	-	Membranintegrität geht verloren
-	Chromatinaggregation an der Kernmembran		
-	beginnt mit Schrumpfen der Plasmamembran	-	beginnt mit Aufquellen der Plasmamembran
	und Kondensation des Nukleus		und Mitochondrien
-	endet mit der Fragmentierung der Zelle in kleine	-	endet mit der Lyse der Zelle
	Körperchen		
-	Formation von membranumschlossenen Vesi-	-	keine Vesikelformation sondern komplette Lyse
	keln (Apoptosekörperchen)		
-	Mitochondrien werden durchlässig (bcl-2-	-	Zerfall der Organellen
	Proteinfamilie)		
Bio	ochemische Charakteristika:		
-	genau regulierter Prozess	-	Verlust der Homöostase-Regulation
-	energieabhänig	-	energieunabhängig (passiver Prozess, der auch
			bei 4°C abläuft)
-	nicht-zufällige, mono- und oligonukleosomale	-	Zufällige Zersetzung der DNA ("Schmier" im
	Aufspaltung der DNA ("Leiter" im Agarosegel)		Agarosegel)
-	prälytische DNA-Fragmentierung	-	postlytische DNA-Fragmentierung
-	Freisetzung verschiedener Faktoren (Cytoch-		
	rom C, AIF) durch Mitochondrien		
-	Aktivierung der Caspase-Kaskade		
-	Veränderungen der Membranasymmetrie		
Ph	ysiologische Charakteristika:		
-	betrifft individuelle Zellen	-	betrifft Gruppen benachbarter Zellen
-	hervorgerufen durch physiologische Stimuli	-	hervorgerufen durch unphysiologische Störun-
	(Mangel an Wachstumsfaktoren, Hormoneinfluß		gen (lytische Viren, Hypoxie, Ischämie u.a.)
	u.a.)		
-	Phagozytose durch Makrophagen oder benach-	-	Phagozytose der Zelltrümmer durch Makropha-
	barte Zellen		gen
-	keine entzündliche Reaktion	-	deutliche entzündliche Reaktion

Tab. 1.2.: Unterschiede von Apoptose und Nekrose.

1.4.2. Methoden zum Nachweis von Apoptose und Nekrose

Zum Nachweis von Apoptose und Nekrose existieren eine Vielzahl von Nachweismöglichkeiten, deren Anwendbarkeit vom zu untersuchenden Material abhängt (histologische Schnitte, Gewebeproben, Zellen in Zellkultur):

- In Situ *Nick Translation:* Das Enzym DNA-Polymerase I katalysiert die Addition von Nukleotiden, wenn ein DNA-Einzelstrangbruch vorliegt. Stellt man dem Enzym ein radioaktiv markiertes Nukleotid zum Einbau zur Verfügung, so kann man den Einbau autoradiographisch nachvollziehen.

 TUNEL (TdT-mediated X-dUTP nick end labeling): Das Enzym TdT (Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase) addiert Nukleotide an DNA-Doppelstrangbrüche.
 Gibt man ein radioaktiv markiertes Nukleotid zu, so kann man wie bei der Nick Translation den Einbau autoradiographisch, über Fluoreszenz oder mit der Alkalischen-Phosphatase-Reaktion verfolgen.

 DNA-Laddering: DNA wird aus den zu untersuchenden Zellen isoliert und zur Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Anschließend wird das Agarosegel mit Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert und im UV-Licht fluoresziert, angefärbt. Bei apoptotischen Zellen zeigt sich ein typisches leiterähnliches Muster der DNA-Fragmente. Bei nekrotischen Zellen sieht man einen "smear" (engl. für Schmier) über die Länge des Laufes.

- colorimetrischer Nachweis von Histon-DNA-Komplexen: Bei dieser Methode werden spezifisch Histon-DNA-Komplexe, die nur in der Apoptose, nicht bei der Nekrose entstehen, durch eine Immunreaktion angefärbt.

- Caspase 3-Aktivitäts-Test: Das Enzym Caspase 3 scheint eine Schlüsselrolle in der Apoptose-Initiation zu spielen. Anti-Caspase 3-beschichtete Reaktionsgefäße binden dabei die in den zu untersuchenden Zellysaten enthaltene Caspase 3. Anschließend wird ein Substrat zugefügt, daß bei spezifischer Zersetzung durch Caspase 3 ein Fluorochrom freisetzt. Dieses kann dann photometrisch gemessen werden.

- Western-Blot: Im Western-Blot werden die in den Zell-Lysaten enthaltenen Proteine elektrophoretisch im denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und dann mit Antikörpern inkubiert. Anschließend wird ein Sekundärantikörper zugefügt, der durch gekoppelte Enzyme die an die spezifischen Antigene gebundenen Erstantikörper sichtbar macht. Als Erstantikörper eignet sich hier bspw. PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase), ein 113 kDa großes Protein, das spezifisch an DNA-Strangbrüche bindet und von bestimmten Caspasen in Fragmente von 89 und 24 kDa zerlegt wird. Der Nachweis des 89 kDa-PARP-Fragmentes eignet sich als spezifischer Nachweis von frühen Apoptose-Stadien.

1.4.3. Zelltod im Herzinfarkt: Apoptose oder Nekrose?

Die 1972 von Kerr et al. erstmals beschriebene Apoptose wurde in den darauffolgenden Jahren zunehmend erforscht, so auch im Rahmen der myokardialen Ischämie. Eine Entwicklung der Veröffentlichungszahlen zum Thema Apoptose gibt die folgende Abbildung wieder:



Abb. 1.5.: Entwicklung der Apoptose-Veröffentlichungen pro Jahr 1972-2000. Quelle: National Library of Medicine, USA, Entrez PubMed.

Bei vielen Formen des Zellstresses mit Schädigung der Kern-DNA und der Mitochondrien werden Mischformen des Zelluntergangs mit Aktivierung des programmierten Zelltodes, der Apoptose, aber auch mit Elementen der "katastrophenartigen" Nekrose ausgelöst. So führen Ischämie, Reperfusion und Myokardinfarkt zur Induktion von Apoptose in Kardiomyozyten, wobei die Zellzerstörungen hauptsächlich durch Nekrose verursacht werden (Holtz und Heinrich, 1999; Pankuweit et al., 1999).

Reperfusion von ischämischen Herzarealen reduziert die Morbidität und die Mortalität (Gissi, 1986). Trotzdem vergrößert die Reperfusion das Ausmaß des myokardialen Schadens (u.a. Arrhythmien, Ausmaß der Infarktgröße) in verschiedenen klinischen Situationen (Grech et al., 1995) und zahlreichen Ischämie- und Reperfusionsmodellen (Lucchesi, 1994).

Mediatoren der Reperfusionsverletzung wie neutrophile Granulozyten, Sauerstoffradikale und Komplementbestandteile zerstören Kardiomyozyten unspezifisch im Rahmen der Nekrose. Trotzdem ist es zunehmend ersichtlich, daß ischämische und reperfundierte Areale ebenfalls durch Apoptose zugrunde gehen (Gottlieb et al., 1994; Sharov et al, 1996; Kajstura et al, 1996).

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuch

2.1.1. Versuchsaufbau

Die Studie wurde durch die örtliche Ethikkommission für Tierversuche der BAGS der FHH nach den "Principles of laboratory animal care" (National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources, Comission on Life Science (1996) genehmigt.

20 Foxhounds (10 männliche, 10 weibliche Tiere; Gewicht 31 ± 3kg) wurden am Versuchstag mit 2mg/kg KG Xylazine und 5mg/kg KG Ketamin-Hydrochlorid i.m. prämediziert, mit 5mg/kg Thiopental i.v. anästhesiert, intubiert und mit 30% Sauerstoff in Luft normoventiliert. Die Anästhesie wurde dann über kontinuierliche intravenöse Infusion von 0,02mg/(kg*h) Fentanyl, 0,4mg/(kg*h) Midazolam und 0,2mg/(kg*h) Vecuronium fortgesetzt.

Ein arterieller Katheter wurde über die rechte Arteria femoralis gelegt und bis in die distale Aorta vorgeschoben. Über diesen Katheter wurde der arterielle Blutdruck gemessen und Blutproben zur Bestimmung hämatologischer Parameter, der Elektrolyte und des Säure-Basen-Haushalts entnommen.

Ein Pulmonaliskatheter, der über die rechte Vena femoralis eingeführt und dessen Lage in "Wedge-Position" durch Druckkurven kontrolliert wurde, diente zur Messung des mittleren Pulmonalarteriendrucks (MPAD), des pulmonalkapillären Verschlußdrucks (PCWP) und der Temperatur in der Arteria pulmonalis. Das Herzzeitvolumen (HZV) wurde ebenfalls über diesen Katheter mit Hilfe des Marquette-Monitorings und der Kältedilutionstechnik (4°C kalte NaCI-Lösung) gemessen.

Um reproduzierbare Verhältnisse zu schaffen, wurden die Tiere

- auf einer Sauerstoffsättigung von >95% gehalten (pulsoximetrische Messung, eventuelle Erhöhung der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration)

- mit einer Wärmedecke abgedeckt und permanent mit einem Gebläse (41°C) gewärmt. Die Temperatur wurde mit einer Tympanon-Kontaktsonde an der Membrana tympani gemessen.

Parameter Bezeichnung	Einheit	Beschreibung
Geschlecht	m/w	Geschlecht der Versuchstiere
Alter	Jahre	Alter der Versuchstiere
Körpergewicht	kg	Körpergewicht vor Versuchsbeginn
HF	b/min	Herzfrequenz
SAD	mm Hg	systolischer arterieller Blutdruck
MAD	mm Hg	mittlerer arterieller Blutdruck
DAD	mm Hg	diastolischer arterieller Blutdruck
MPAD	mm Hg	mittlerer pulmonal-arterieller Blutdruck
PCWP	mm Hg	Pulmonal-kapillärer Verschlussdruck
HZV	l/min	Herzzeitvolumen
LVEDP	mm Hg	Linksventrikulärer enddiastolischer Blutdruck
KOD	mm Hg	kolloidosmotischer Druck
AF	min ⁻¹	Atemfrequenz
AZV	ml	Atemzugvolumen
artO ₂	ml/dl	arterieller Sauerstoffgehalt
pulpO ₂	mm Hg	Sauerstoffpartialdruck in der Arteria pulmo-
	5	nalis
pulO ₂	ml/dl	Sauerstoffgehalt in der Arteria pulmonalis
S.corpO ₂	mm Hg	Sauerstoffpartialdruck im Sinus coronarius
S.corO ₂	ml/dl	Sauerstoffgehalt im Sinus coronarius
Flow-coro.	ml/min	Flussrate Arteria coronaria sinistra
MyotpO ₂	mm Hg	Gewebssauerstoffpartialdruck im Myocard
DWT	mm	Diastolische Wanddicke des linken Ventri-
		kels im SDE
SWT	mm	Systolische Wanddicke des linken Ventrikels
	2	
	cm⁻	SDE
LVEDC	cm	Linksventrikulärer enddiastolischer Umfang
	cm	Linksventrikularer enddlastolischer Durch- messer im SDE
LVEDV	cm ³	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen im SDE
LVESA	cm ²	Lindsventrikuläre endsystolische Fläche im SDE
LVESC	cm	Lindsventrikulärer endsystolischer Umfang im SDE
LVESD	cm	Lindsventrikulärer endsystolischer Durch- messer im SDE
LVESV	cm ³	Lindsventrikuläres endsystolisches Volumen im SDE

|--|

Tab. 2.1.: Gemessene Parameter.

Merkmal	Rechnung	Einheit	Beschreibung
KOF	0,12·KG ^{2/3}	m ²	Körperoberfläche
BV	KG·0,08	1	Blutvolumen
AMV	AF·AZV	l/min	Atemminutenvolumen
HI	HZV/KOF	l/min∙m²	Herzindex
SV	HZV/HF	ml	Schlagvolumen des Herzens
SVR	(MAP-ZVD)·80 / HZV	dyne/s∙cm⁵	Systemischer Gefässwiderstand
PVR	(PAP-PCWP)·80 / HZV	dyne/s∙cm⁵	Pulmonaler Gefässwiderstand
DO ₂	artO ₂ ·HZVx10	ml/min	Sauerstoffangebot des Organismus
VO ₂	avDO ₂ ·HZVx10	ml/min	Sauerstoffverbrauch des Organismus
av-DO ₂	(artO ₂)-(pulO ₂)	ml/dl	Arterio-venöse Sauerstoffdifferenz
MyoDO ₂	artO2·Flow-coro./100	ml/min	Sauerstoffangebot des Myokards
MyoVO ₂	av-DO ₂ ·Flow-coro./100	ml/min	Sauerstoffverbrauch des Myokards
MyoavDO ₂	(artO ₂)-(S.corO ₂)	ml/dl	Arterio-venöse Sauerstoffdifferenz des
			Myokards des LAD-Versorgungsgebiets
Myo	/	mm Hg	10% bzw. 50% bzw. 90% Perzentile des
10%/50%/90%-			tpO ₂ des Myokards
		0/	Quataliasha Wanddiakanzuhahma daa
5001%	(5001-0001)/5001.100	%	linken Ventrikels im SDE
SWMA	Graduierung: 1-5	/	Segmentale Wandbeweglichkeitsstörun-
F 0		0/	gen des myocards
F3		%	zwischen Diastole / Systole des linken
			Ventrikels im SDE
FAC	(LVEDA-	%	Prozentuale Flächenänderung zwischen
	LVESA)/LVEDA·100		Diastole / Systole des linken Ventrikels
			im SDE
Cfs	(LVEDC-	%	Prozentuale Umfangsänderung zwi-
	LVESC)/LVEDC·100		schen Diastole / Systole des linken
			Ventrikels im SDE
Ef	(LVEDV-	%	Prozentuale Volumenänderung zwischen
	LVESV)/LVEDV•100		Diastole / Systole des linken Ventrikels
			l im SDE

Anschliessend wurden aus diesen Parametern die folgenden Werte berechnet:

Tab. 2.2.: Errechnete Parameter.



Abb. 2.1.: Schematische Darstellung des Versuchssitus.



Abb. 2.1.1: Stenosemodell.

2.1.2. Versuchsdurchführung

Der Sondenkopf eine Herzechos wurde rechts neben dem Xyphoid unterhalb des Zwerchfells im Abdomen plaziert und fixiert (subdiafragmale Echokardiographie, SDE). Dadurch konnte kontinuierlich das Myokard des linken Ventrikels im Querschnitt auf Papillarmuskelebene beobachtet werden ("short axis view").

Nach der chirurgischer Präparation der Tiere (Instrumentierung und Splenektomie) erfolgte eine 45minütige Ruhepause. Zwei der Tiere wurden in sog. Pilotversuchen untersucht, um vorab die Validität des Modells zu überprüfen. Nach Bestimmung der Ausgangswerte wurden die Tiere randomisiert in drei Gruppen eingeteilt:

Therapiegruppe:

Die Tiere erhielten zunächst lediglich eine Infusion mit Ringerlösung. Die Isovolämie wurde dabei während des Versuchs aufrecht erhalten.

Kontrollgruppe:

Nach Messung der Ausgangswerte wurde eine isovoläme Hämodilution mit Hydroxyethylstärke (HES Molekulargewicht 70.000/ Substitutionsgrad 0,5) bis zu einem Hämatokrit von 25% durchgeführt.

Prophylaxegruppe:

Die Tiere dieser Gruppe wurden nach Messung der Ausgangswerte mit Ringerlösung auf einen Hämatokrit von 25% hämodilutiert. Anschliessend erhielten sie über die Vena cava 0,6g/kg HBOC-201.

Bei allen Tieren wurde anschließend in Rechtsseitenlage eine Thorakotomie im 6. Intercostalraum durchgeführt, das Herz dargestellt, der linke vordere Ast (LAD) der Arteria coronaria sinistra über 4cm freipräpariert und im distalen Bereich der LAD ein elektromagnetischer Flussmesser angebracht. ca. 2cm proximal des Flussmessers wurde ein Occluder angebracht, mit dem eine exakte Stenosierung des Gefässes durchgeführt wurde.

Nach einer Ruhephase von 45min wurden die Ausgangswerte bestimmt.

In allen Gruppen wurde anschliessend der Occluder so geblockt, daß der Fluss durch die Arteria coronaria sinistra nur noch ≤10% des Ausgangswertes betrug (90%ige akute Koronarstenose). Diese Stenose wurde bis zum Versuchsende in allen Gruppen aufrechterhalten.

In der **Therapiegruppe** erfolgte nach Thorakotomie und Präparation des Herzens eine isovoläme Hämodilution auf einen Hämatokrit von 25%. Die Infusion von 0,2g/kgKG HBOC-201 erfolgte in dieser Gruppe erstmals 10min nach Anlage der Koronarstenose (**PGruppe 2**). Es folgten zwei Messungen bei 20 und 40min. Danach wurden erneut 0,2g/kgKG HBOC-201 infundiert. Die nächste Messung wurde 80min nach der Stenosierung durchgeführt. Den Tieren wurde noch einmal 0,2g/kgKG HBOC-201 infundiert und die letzte Messung 120min nach Setzen der Stenose durchgeführt.

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden lediglich mit Ringerlösung zur Aufrechterhaltung der Isovolämie infundiert (**PGruppe 1**).

Die Tiere der **Prophylaxegruppe** wurde nach der Stenosierung ebenfalls nur mit Ringerlösung zur Aufrechterhaltung der Isovolämie infundiert. In dieser Gruppe sollte die prophylaktische Wirkung von HBOC bei Applikation vor einer Koronarstenose untersucht werden (**ÞGruppe 3**).

In diesen Gruppen wurden weitere Messungen 20, 40, 80 und 120min nach der Koronarstenose durchgeführt.

Bei allen Tieren wurde die Koronarstenose nach den 120min wieder aufgehoben und die Reperfusion des Myocards durch kontinuierliche tpO₂-Messung und Echocardiografie über 30min verfolgt. Zuletzt wurden die Tiere euthanasiert und u.a. das Herz für die folgenden Untersuchungen entnommen. Das nachstehende Flussschema zeigt die Behandlung der drei Gruppen im Überblick:



Abb. 2.1.2: Versuchsprotokoll.

2.2. Herstellung von Gefrierschnitten des Herzens

Aus den explantierten Herzen wurden Gewebeproben aus dem Bereich des linken Ventrikel anteroseptal, in Septenhöhe und aus dem rechten Ventrikel entnommen. Die Gewebeproben bestanden aus einem kompletten Transversalschnitt durch das Herz vom Endo- bis zum Epikard. Das restliche Herz wurde in 3,7% Formalin fixiert. Die Gewebeproben wurden unverzüglich in ein Gefriergefäss mit flüssigem 2-Methylbutan gegeben. Diese Substanz bewirkt das sofortige Schockgefrieren des Gewebes auf -72°C, wodurch die Autolyse von Gewebsbestandteilen oder Nukleinsäuren verhindert wird. Für die anschliessenden Versuche wurden Kryoschnitte vom Ventrikel-Septum, vom dem Septum angrenzenden linken und von rechten Ventrikelarealen angefertigt. Dazu wurden die einzelnen Bestandteile des Herzens voneinander getrennt mit der der geplanten Schnittfläche abgewandten Seite auf ein Korkplättchen fixiert. Das Gewebe wurde anschliessend rasch mit einem Gefriermedium (Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Instruments GmbH) umhüllt und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

Um Schnitte anfertigen zu können, wurden die Blöcke auf -20°C erwärmt und auf Kryoblöcken fixiert. Anschließend wurden mittels Ultramikrotom (CM 1800, Leitz, Nussloch) 15µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf spezielle Objektträger (Superfrost, Novoglas) aufgebracht und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

2.3. Autoradiographischer Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen

2.3.1. In situ Nick Translation

Um die in frühen Phasen der Apoptose entstehenden DNA-Einzelstrangbrüche nachzuweisen, wurde die "*In situ* Nick Translation" (ISNT)-Methode (Rigby et al., 1977) angewendet. Hier werden die freien 3'OH-Enden der "offenen" Einzelstränge von einer DNA-Polymerase (*E. coli* DNA-Polymerase I (Kornberg Polymerase), Boehringer Mannheim) gebunden und die Einzelstränge mit dem vorhandenen Nukleotidgemisch, das auch radioaktiv markiertes dTTP (desoxy[*methyl*-³H]Thymidine 5'-triphosphat, Amersham Pharmacia Biotech) enthält, inkubiert. Die DNA-Polymerase füllt die Lücken in der DNA dann abhängig von der Sequenz des Gegenstranges ("template-abhängig") auf. Die Nick Translation ist in Abbildung 2.2. schematisch dargestellt:



Abb. 2.2.: Schematische Darstellung der *In situ* Nick Translation. Die Abbildung zeigt schematisch die Reaktion der *In Situ* Nick Translation: Das Enzym DNA-Polymerase bindet spezifisch an die 3'OH-Enden von DNA-Einzelstrangbrüchen und füllt den Strang, abhängig vom Gegenstrang, mit neuen Nukleotiden auf. Dabei werden dem Reaktionsgemisch zugesetzte radioaktiv markierte Nukleotide (X-dNTP) eingebaut und die Auffüllreaktion kann sichtbar gemacht werden.

Dazu wurden zuerst die Schnitte für 5min in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) aufgetaut und anschliessend für 20min in einer Methanol:Eisessig-Lösung (2:1) fixiert. Danach wurden die Schnitte wieder zweimal für 5min in NaCl gewa-

schen und mittels Warmluft getrocknet. Während der Trocknungsphase wurde das Reaktionsgemisch angesetzt, und zwar pro Schnitt:

Substanz	Endkonzentration	pro Schnitt
NT-Puffer		636,5µl
dATP	50µM (Stammlsg.: 5 mM)	7μΙ
dGTP	50µM (Stammlsg.: 5 mM)	7µI
dCTP	50µM (Stammlsg.: 5 mM)	7μΙ
DMSO	5%	35µl
³ H-dTTP (51Ci/mmol)	3µCi/ml	4µl
DNA-Polymerase	20U/ml	3,5µl
		DS - 700ul

25= /00µi

Tab. 2.3.: Reaktionsgemisch für die In Situ Nick Translation. Die dNTPs und die DNA-Polymerase wurden von Boehringer Mannheim bezogen, das DMSO (Dimethylsulfoxid) von Sigma und das ³H-dTTP von Amersham Pharmacia Biotech. Alle Komponenten wurden in einem Becherglas gemischt.

NT-Puffer:

Substanz	Endkonzentration	für 100ml
Tris _{MW=121,1}	50mM	605,5mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O _{MW=203,3}	5mM	102mg
2-Mercaptoethanol MW=78,13	10mM	78µI

Tab. 2.4.: Zusammensetzung des NT-Puffers. Der Puffer kann in grösseren Mengen angesetzt werden und in Aliquots bei -20°C für mehrere Wochen gelagert werden.

Nach der Fertigstellung wurde das Reaktionsgemisch 10sec durch Invertieren gemischt und 1min bei Raumtemperatur (RT) äquilibriert.

Anschliessend wurden je 700µl Reaktionscocktail auf die komplett trockenen Schnitte aufpipettiert.

Die Schnitte wurden dann 40min mit dem Reaktionsgemisch bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschliessend wurde die Reaktion durch Entfernen des Reaktionscocktails und Waschen der Schnitte in NaCl mit 1% Tetrasodium-Pyrophosphat (Sigma) gestoppt. Der Waschschritt wurde fünfmal wiederholt. Nach dem Waschen wurden die Schnitte wieder mittels Warmluft getrocknet, auf Fotokarton aufgeklebt und beschriftet.

Die Präparate wurden in eine Expositionskassette gelegt, darauf wurde im abgedunkelten Raum ein Röntgenfilm (Hyperfilm ³H, Amersham Pharmacia Biotech) platziert und für 24 Stunden im Dunkeln inkubiert.

Nach der Inkubationsphase wurden die Filme mittels des Röntgenentwicklers AG-FA G150 entwickelt (5min) und mit dem Fixierer AGFA G354 fixiert (10min).

Neben den zu untersuchenden Schnitten wurden die nachfolgend dargestellten Kontrollen durchgeführt:

1) Kontrollschnitte:

In Vorversuchen wurden Schnitte mit dem oben beschriebenen Reaktionsgemisch ohne DNA-Polymerase als Negativkontrolle behandelt, um einen unspezifischen Einbau der Nukleotide auszuschliessen.

Ebenfalls im Vorversuch wurden Schnitte mit einer Reaktionslösung inkubiert, die zusätzlich noch DNase I (Desoxyribonuklease I, Boehringer Mannheim) in verschiedenen Konzentrationen enthielt, um die Funktionalität der Reaktion zu zeigen (je mehr DNase I desto mehr Einzelstrangbrüche, desto mehr Nukleotideinbau, desto stärkere Schwärzung des Filmes). Abbildung 2.3. zeigt das aus dem Vorversuch hervorgegangene Autoradiogramm:



Abb. 2.3.: Autoradiogramm des Vorversuchs. Hier wurden den Reaktionsgemischen verschiedene Konzentrationen DNase I beigemischt, um auszutesten, welche Konzentration für die qualitativen Positivkontrollen in den weiteren Experimenten geeignet ist.

In den eigentlichen Experimenten wurden dann jedesmal drei Schnitte des linken Ventrikels eines unbehandelten Versuchstieres mit 100mU/ml DNase I behandelt. Parallel wurden drei weitere Schnitte dieses linken Ventrikels mit der Reaktionslösung ohne DNase I inkubiert. Diese sechs Schnitte wurden als qualitative Kontrollen für das Funktionieren der Reaktion verwendet. Sie wurden nicht quantitativ ausgewertet. Abbildung 2.4. zeigt diese qualitativen Kontrollen beispielhaft (Ausschnitt aus dem Autoradiogramm der linken Ventrikel von Tier 12, 18 und 19).



Abb. 2.4.: Kontrollschnitte des Autoradiogramms der linken Ventrikel von Tier 12, 18 und 19. Kontrollen K1-3 wurden zusätzlich mit 100mU/ml DNase I behandelt, Kontrollen K4-6 wurden mit dem gleichen Reaktionsgemisch inkubiert wie die zu untersuchenden Schnitte. Es ist deutlich zu sehen, daß durch die DNase I -Behandlung mehr DNA-Einzelstrangbrüche entstehen, wodurch es zu einer intensiveren Schwärzung bzw. einer höheren optischen Dichte kommt.

Grundsätzlich wurden Schnitte, die mit verschiedenen Reaktionscocktails inkubiert wurden (bspw. mit/ohne DNase I, mit/ohne DNA-Polymerase), in verschiedenen Gefässen und mit getrennten Puffer-Aliquots gewaschen, um eine Verschleppung der Enzyme (Kreuzkontamination) zu verhindern.
2) Microscale:

Als weitere Kontrolle wurde bei jedem Autoradiogramm eine Microscale verwendet. In diesen Teststreifen liegt das jeweilige Radioisotop gleichmässig in ein Polymer inkorporiert vor. Dabei sind 8-10 verschiedene Zonen mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität auf dem Streifen angeordnet, wie Abbildung 2.5. schematisch verdeutlicht. Für die quantitative Auswertung wurde die optische Dichte des intensivsten Feldes der Microscale herangezogen.



Abb. 2.5.: Links: schematische Darstellung einer Microscale (Quelle: Katalog Amersham Pharmacia Biotech). Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Bereiche in Bq/mg und in nCi/mg. *Rechts*: Microscale auf einem Autoradiogramm. Die niedrigeren spezifischen Aktivitäten sind nicht abgebildet, da sie keine Schwärzung des Röntgenfilms hervorgerufen haben. Im oberen Bereich ist abgebildet, wie per ImageQuant die optische Dichte des intensivsten Feldes der Microscale bestimmt wurde.

2.3.2. Densitometrische Auswertung (ImageQuant, Molecular Dynamics)

Die Autoradiogramme wurden mit Hilfe eines Laser-Densitometers (Personal Densitometer SI, Molecular Dynamics) eingelesen. Anschliessend wurde die Schwärzung der verschiedenen Areale des Filmes mit Hilfe des Programmes ImageQuant 4.1 (Molecular Dynamics) gemessen.

Dazu wurden pro Schnitt drei Ellipsen definiert, wie in Abbildung 2.6. beispielhaft dargestellt. Für die Bestimmung der optischen Dichte des dichteintensivsten Feldes der Microscale wurde meist ein Polygon verwendet, siehe Abbildung 2.7.



Abb. 2.6.: Messung der mittleren optischen Dichte am Beispiel eines Schnittes des linken Ventrikels von Tier 18. Pro Schnitt wurden drei elliptische Bereiche bestimmt, dabei wurde darauf geachtet, Artefakte von der Messung auszuschliessen.





Das Programm berechnet die mittlere optische Dichte des Films innerhalb dieser Ellipsen und Polygone. Diese Werte wurden in Tabellenform erfasst, wie Abbildung 2.8 beispielhaft zeigt:

<u>Name</u> Area	<u>Volume</u>	Bg. Value	Percent	Av	<u>erage</u>
ELPS-26	1949,7	0	3,3	0,466	4180
ELPS-27	2424,88	0	4,11	0,456	5314
ELPS-28	2181,11	0	3,69	0,432	5044
PGON-64	300,82	0	0,51	0,53	1310

Abb. 2.8.: ImageQuant-Werte für die definierten Bereiche des Beispielfilms.

Hierbei bezeichnet ELPS-X bzw. PGON-X die definierten Ellipsen bzw. Polygone; Volume gibt die Fläche des Bereichs an und Average die mittlere optische Dichte dieses Bereiches. Die anderen Werte sind zu vernachlässigen. Mit den Werten der mittleren optischen Dichte wird im folgenden Verlauf weitergerechnet. Zusätzlich wurden noch pro Film fünf freie Areale gemessen, um die Hintergrund-

schwärzung zu bestimmen.

Abbildung 2.9. zeigt beispielhaft ein Autoradiogramm. Bearbeitet wurden hierbei die linken Ventrikel von Tier 6, 10 und 16. K1-K3 bezeichnen die Kontrollschnitte mit DNase I -Behandlung, K4-6 die Kontrollschnitte ohne DNase I -Behandlung. Die Ellipsen 65-69 wurden für die Bestimmung des Hintergrundes gewählt. Das Polygon 64 zeigt den dunkelsten Wert der Microscale.

Abbildung 2.10. zeigt beispielhaft ein weiteres Autoradiogramm der rechten Ventrikel von Tier 7, 8, 9, und 11. Die Bezeichnung der Kontrollen entspricht der in Abbildung 2.9., die Hintergrundwerte wurden mit den Ellipsen 78-82 bestimmt. Die Microscale wurde hier mit Polygon 77 bestimmt.



Abb. 2.9.: Autoradiogramm der linken Ventrikel von Tier 6, 10, 16. Bestimmung der optischen Dichte mit dem Programm ImageQuant (Molecular Dynamics). Fotografie des Bildschirms.



Abb. 2.10.: Autoradiogramm der rechten Ventrikel von Tier 7, 8, 9 und 11. Bestimmung der optischen Dichte mit dem Programm ImageQuant (Molecular Dynamics). Fotografie des Bildschirms.

2.3.3. Rechenmodus und statistische Auswertung

Rechenmodus:

Aus den fünf Hintergrundwerten (65-69 in Abbildung 2.9, 78-82 in Abbildung
2.10) wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung bestimmt.

- Der Mittelwert des Hintergrundwertes wurde dann von den eigentlichen Messwerten abgezogen \Rightarrow Wert 1.

- Da zwei verschiedene Chargen von Microscales verschiedenen Herstellungsdatums verwendet wurden, wurden die Werte durch einen Korrekturwert geteilt, der den spezifischen Verfall der Aktivität über den Zeitraum von Herstellung bis Verwendung im Experiment ausgleicht. Für die verwendeten Chargen sind dies die Werte 0,928 für 1 Jahr und 4 Monate und 0,808 für 3 Jahre und 10 Monate (Quelle: Tabelle des Herstellers Amersham Pharmacia Biotech).

Von diesem Quotienten wurde ebenfalls der Hintergrundwert abgezogen
 ⇒ Wert 2.

- Zuletzt wurde dann der Quotient aus Wert 1 und 2 gebildet.

Die Rechnung kann also durch folgende Formel beschrieben werden:

$$(\overline{OD_{S}} - \overline{OD_{B}})$$

$$(\overline{OD_{M}} / \text{Korr}) - \overline{OD_{B}}$$

OD_S: mittlere optische Dichte eines <u>S</u>chnittpräparates

 $\overline{OD_B}$: mittlere optische Dichte des Hintergrundes (<u>Background</u>)

OD_M: mittlere optische Dichte der <u>M</u>icroscale

Korr: Korrekturfaktor für Microscale (dem Zeitraum von der Herstellung der Microscale bis zur Verwendung ist jeweils monatsweise ein Verallskoeffizient zugeordnet)

Je nachdem, wieviele Schnitte pro Präparat verarbeitet wurden (minimal 2, im Durchschnitt aber 5), fallen so jeweils 6 bis 15 Werte an. Diese wurden im folgenden Verlauf statistisch ausgewertet.

Statistische Auswertung:

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS (Version 10.0, SPSS. Zuerst wurde die deskriptive Statistik für die Werte berechnet, und zwar:

- Werteanzahl N
- Varianz (Range)
- Minimum / Maximum
- Mittelwert
- Standardabweichung

Anschliessend wurden die Werte in Diagrammen, sog. Box-Plots, zusammengefasst, und zwar geordnet nach der Behandlungsgruppe, zu der die jeweiligen Versuchstiere gehörten.

Zur Testung auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde für die autoradiographischen, histologischen sowie tpO₂-Ergebnisse der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewendet, für Ergebnisse der Hämodynamik, des O₂-Transports sowie TEE wurden Varianzanalysen (ANOVA) mit dem Scheffé-F-Test angewendet.

Der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test:

Was wird getestet?

Es soll überprüft werden, ob das Ausmaß von Schäden im Myokard, die durch Setzen ein Stenose erzeugt wurden, durch Gabe von verschiedenen Infusionslösungen beeinflußt werden kann. Mit anderen Worten, es soll geprüft werden, ob durch Gabe einer Infusionslösung die Zahl der DNA-Einzelstrangbrüche im Myocard verringert werden kann.

Getestet wird dabei, ob sich die Werte unter den mit verschiedenen Infusionslösungen behandelten Versuchstiergruppen signifikant unterscheiden.

Wie wird getestet?

Es sollen jeweils zwei Gruppen von nominal skalierten Eigenschaften (Graf et al., 1987: S. 70) (optische Dichte von Autoradiogrammen) miteinander verglichen werden. Da die Verteilungsfunktion der Eigenschaften auf die Gruppen nicht bekannt ist, und die Annahme einer Normalverteilung mit Hilfe des zentralen Grenzwertsatzes nur nach eingehender Prüfung angenommen werden darf, soll der Vergleich der Gruppen mittels des **Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests** (Wilcoxon et

al., 1973; Mann und Whitney, 1947) durchgeführt werden, der keine Annahme über die den Proben zugrunde liegende Grundgesamtheit macht.

Bei dem Test werden die nominal skalierten Daten in ordinal skalierte Daten über eine Rangskala gewandelt (Wonnacott et al., 1990: S. 525-533; Woolson, 1987: S. 187-203). Es wird weiterhin angenommen, daß die beiden Gruppen Zufallsstichproben aus ihren jeweiligen Grundgesamtheiten darstellen.

Es soll die Hypothese getestet werden, daß die beiden Gruppen die gleiche Verteilung des zu untersuchenden Merkmals + werden die einzelnen Datensätze bezüglich der zu untersuchenden Eigenschaft unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit in eine aufsteigende Reihenfolge gebracht. Die so angeordneten Datensätze werden von 1 aufsteigend durchnummeriert. Man sagt, jedem Datensatz wird ein Rang zugeordnet.

Enthalte die erste Gruppe N₁ Elemente und die zweite Gruppe N₂ Elemente, so erfolgt die Nummerierung aller Datensätze von 1 bis N₁+N₂. Unter der Annahme, daß das zu untersuchende Merkmal unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit die gleiche Verteilung aufweist, kann jeder Rang in jeder Gruppe auftreten. Somit existieren (N₁+N₂)! / (N₁! N₂!) Möglichkeiten, die Ränge auf zwei Gruppen von N₁ bzw. N₂ Elementen aufzuteilen. Unter der Nullhypothese, daß die Verteilung der Eigenschaften unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit ist, ist jede dieser möglichen Aufteilungen der Gruppen gleich wahrscheinlich und zwar mit

 $P = N_1! N_2! / (N_1 + N_2)! .$

Um zu testen, ob die Eigenschaft gleich über beide Gruppen verteilt ist, liegt es nahe, die Summe der Ränge der einen Gruppe mit der Summe der Ränge der anderen Gruppe zu vergleichen. Ohne Beschränkung der Allgemeingültigkeit kann man nur die Gruppe mit der kleinsten Rangsumme betrachten. Die Summe aller Ränge ergibt sich zu (N_1+N_2) (N_1+N_2+1) / 2. Im Folgenden wird wiederum ohne Beschränkung der Allgemeingültigkeit angenommen, daß die Gruppe mit der kleineren Rangsumme N₁ sei. Die Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion dieser Gruppe sei S₁. Sie ergibt sich durch Berechnung der Wahrscheinlichkeit N₁! N₂! / $(N_1+N_2)!$ für jede mögliche Verteilung der Ränge.

Berechnung

Ein kleines praktisches Problem bei der Betrachtung von Summenrängen ergibt sich aus der Mehrfachbelegung einzelner Ränge (Wonnacott et al., 1990: S. 528). So kann es vorkommen, daß einzelne Ränge doppelt, dreifach etc. vorkommen. Als Beispiel sei ein dreifacher 2. Platz angenommen: 1, 2, 2, 2, 3, ... In diesen Fällen bildet man die Summe der Mehrfachränge und bildet den Mittelwert, hier also (2+3+4)/3 = 3. Diesen Wert benutzt man für den Summenrang.

Es ist offensichtlich, daß ein gerader Rang, der doppelt, vierfach etc. zu einem Rangwert für den Summenrang führt, der nicht mehr eine ganze Zahl ist. Dies mag auf den ersten Blick verwirrend erscheinen, ist jedoch durch die mathematische Konstruktion des Summenranges erforderlich und steht in keinem Widerspruch zu den gemachten Annahmen.

Im Folgenden werden die erhobenen Daten betrachtet: $N_1=6$, $N_2=6$. Für diese Werte erhält man aus Wilcoxon et al. (1973) für den zweiseitigen Test die folgenden Wahrscheinlichkeiten:

p=0,10	p=0,05	p=0,02	P=0,01
28, 50 0,0465	26, 52 0,0206	24, 54 0,0076	23, 55 0,0043
29, 49 0,0660	27, 51 0,0325	25, 53 0,0103	24, 54 0,0076

Wobei die Tabelle wie folgt aufgebaut ist:

Zweiseitige Zielwahrscheinlichkeit	
Untere Grenze, obere Grenze einseitige Wahrscheinlichkeit	
Untere Grenze, obere Grenze einseitige Wahrscheinlichkeit	

Ergibt sich die Summe der Ränge von Gruppe 1: 29 und Gruppe 2: 49, so erhält man bei einem einseitigen Test um 5% Signifikanzniveau:

- 28, 50 0,0465
- 29, 49 0,0660

Die Wahrscheinlichkeit, daß die kleinere Rangsumme kleiner als 28 oder die größere Rangsumme größer als 50 ist, ist 0,0465. Die entsprechende Wahrscheinlichkeit für die Summe der Ränge von 29 bzw. 49 beträgt 0,0660. Mit einem minimalen Summenrang von 29 bei N_1 =6 und N_2 =6 ist das Ergebnis folglich nicht auf dem 5%-Niveau signifikant. Bei Owen (1962; S. 341 ff.) finden sich Tabellen, mit denen man den p-Wert bestimmen kann, bzw. mit Hilfe derer man bestimmen kann, ob sich zwei verglichene Wertereihen auf dem 5%-Niveau signifikant unterscheiden. Die Werte sind im folgenden aufgeführt.

2.4. Histopathologische Färbungen

Die histopathologische Aufarbeitung der Herzen erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut in Essen-Stehle. Von jedem einzelnen Experiment wurden die formalinfixierten Biopsien in toto histologisch aufgearbeitet. Dabei wurden die Schnitte so gelegt, daß ein transmuraler Überblick von Endokard zu Epikard ermöglicht wurde. Die Herzen wurden je nach Größe in 6-8 basisparallele Lamellen zerlegt. Aus jeder Lamelle wurden an den koronaren Versorgungsgebieten orientiert aus den verschiedenen Regionen (Vorderwand, Seitenwand, Hinterwand) transmurale Gewebsproben für die Paraffineinbettung entnommen. Auf diese Weise wurden von jedem Herzen etwa 30-35 Myokardproben untersucht. Die Präparate wurden einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Die qualitative und semiquantitative Auswertung der Schäden (Koagulationsnekrosen, myofibrilläre Degeneration) erfolgte blind, d.h. die auswertende Person wurde nicht über die Behandlung des jeweiligen Tieres informiert.

Zusätzlich wurden die Präparate der LFB (Luxol Fast Blue)-Methode unterzogen (Arnold et al., 1985). Hierbei wird besonders die myofibrilläre Degeneration visualisiert. Diese ist eine weitverbreitete Form der Myokardverletzung, die nach verschiedenen Läsionen auftreten kann. Es handelt sich um eine lokale Alteration, die die Koagulationsnekrosen von Infarkten umgibt. Die LFB-Methode bringt zwei verschiedene Färbeergebnisse hervor:

1) Unregelmäßige blaue, querverlaufende Banden, die die typische "Querbandverletzung" der myofibrillären Degeneration wiedergeben. Im Elektronenmikroskop betrachtet, handelt es sich hierbei um dichte Aggregate disorganisierter Myofilamente.

2) Diffuse Färbung der gesamten Myozyten. Ultrastrukturell zeigen sich hierbei filzartige Aufsplitterungen der Myofibrillen. Diese Art der myofibrillären Degeneration konnte man bisher mit anderen Färbemethoden nicht nachweisen. Die LFB-Methode eignet sich nicht für die Untersuchung von frühen Infarktphasen, da die

Koagulationsnekrosen nur leicht LFB-positiv sind. Mit dieser Färbemethode lassen sich Typ, Menge und Verteilung der myofibrillären Degeneration darstellen.

3. Ergebnisse

3.1. Hämodynamik

Hämodynamische Ergebnisse vor artefizieller Koronarstenose

	HF	MAD	MPAD	PCWP	н	SV	SVR	PVR	KOD
Kontroll-Gru	ppe (Gr.1)								
Ausgangs-	64±12	123±14	18±6	11±4	2,2±0,4	40±8	3794±565	224±164	10,6±2,0
werte									
Hämodilu-	78±21	124±21	19±3	13±1	3,5±0,4†	54±12†	2278±591*†	97±69	19,0±4,7*†
tion									
60min	73±12	115±11*	17±3	11±2	3,3±1,2	57±13†	2274±714*†	93±70	15,3±3,5*†
100min	72±11	109±14*	16±4	10±3	3,2±1,0	55±6†	2103±318*†	141±99	12,5±2,9*
Therapie-Gru	ippe (Gr.2	<u>)</u>							
Ausgangs-	75±24	141±23	21±5	12±3	2,8±0,7	41±14	3808±703	256±167	9,2±1,2
werte									
20min	76±27	140±28	20±4	12±3	3,0±0,6	45±14	3485±568	227±135	8,9±0,8
60min	75±27	141±25	20±5	12±4	3,2±0,8	47±13	3096±698	229±146	7,8±1,1†
100min	79±30	139±27	19±5	10±3	3,3±0,8	46±11	3177±572	242±145	8,4±0,8
Prophylaxe-C	Gruppe (G	<u>r.3)</u>							
Ausgangs-	89±21§	133±25	16±4	10±6	3,2±1,0	40±10	2966±995	174±76	10,6±4,4
werte									
Hämodilu-	95±18	107±22*	16±6	10±5	4,0±1,3	47±12	1934±630*†	114±50	5,6±1,2*§†
tion									
+HBOC-201	80±25	140±20§¶	17±8	11±5	2,9±0,9	40±9§	3644±720§¶	171±80	6,2±1,2*§†
100min	74±21	127±19	19±6	11±4	3,0±0,9	45±8§	2995±875§	206±90	6,2±7,0*§†

Tab. 3.1.: Hämodynamische Parameter der drei Gruppen vor artefizieller Koronarstenose.

<u>MW±Standardabweichung</u>. HF=Herzfrequenz [b·min⁻¹]; MAD=mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]; MPAD=mittlerer pulmonal-arterieller Blutdruck [mmHg]; PCWP=pulmonal-kapillärer Verschlußdruck [mmHg]; HI=Herzindex [I·min⁻¹·m⁻²]; SV=Schlagvolumen [ml]; SVR=systemischer Gefäßwiderstand [dyne·s⁻¹·cm⁻⁵]; PVR=pulmonaler Gefäßwiderstand [dyne·s⁻¹·cm⁻⁵]; KOD=kolloidosmotischer Druck [mmHg].

*=p<0,05 im Vergleich zur Therapie-Gruppe; §=p<0,05 im Vergleich zur Kontroll-Gruppe; †=p<0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten; ¶=p<0,05 im Vergleich zur Hämodilution.

	HF	MAD	MPAD	PCWP	HI	SV	SVR	PVR
Kontroll-Gru	ppe (Gr.1)							
Ausgangs-	82±20	101±21	16±2	11±2	3,5±1,1	53±10	1755±364	108±67
werte								
Koro-	108±31	93±5	19±3	12±3	3,2±0,7	38±12†	1816±510	157±72
narstenose								
20min	114±37	88±18	20±4	12±4	3,4±1,3	41±15	1485±241	161±72
40min	118±21	86±19	19±4	10±2	3,2±0,5	36±5†	1457±447	172±77
80min	129±41	86±17	21±6	12±2	3,5±1,0	39±14	1377±370	159±66
120min	148±36	86±12	19±4	12±3	3,6±0,7	31±2†	1343±250	153±47
<u>Therapie-Gru</u>	ippe (Gr.2)	<u>)</u>						
Ausgangs-	90±21	97±8	22±5*	12±4	4,0±1,1	48±15	1867±675	247±155
werte								
Koro-	117±9†	91±11	24±5*	13±3	3,7±0,8	36±13	1862±927	224±134
narstenose								
+HBOC-201	118±45	96±17	24±6	12±4	2,8±0,6†	27±8†	2345±680*	339±236
40min	109±17†	88±10†	26±10	12±3	2,8±0,3†	29±9†	2211±831	350±147*
+HBOC-201	119±22†	83±10	27±7	12±4	2,9±0,6	28±8†	2038±497*	388±148*
+HBOC-201	118±19	89±7	28±7	13±4	3,9±0,8	35±16	1595±311	329±161
Prophylaxe-0	Gruppe (G	r. <u>3)</u>						
Ausgangs-	106±14*	103±21	24±6*	10±2	3,7±2,2	38±12	2095±868	383±150*
werte								
Koro-	120±38	94±27	27±5*	14±2	2,9±1,6	31±9	2659±1644	307±116*
narstenose								
20min	127±38	91±20	28±8	13±5	4,0±2,2	33±7	1697±494	318±140*
40min	129±38	89±19	26±5*	13±4	3,4±2,1	29±12	1872±409	366±142*
80min	132±43	87±20	24±8	11±5	2,8±0,9	26±9	2302±798*	327±142*
120min	117±8	87±12	28±6*	12±1	3,6±2,4	33±14	1878±240*	376±164*

Tab. 3.2.: Hämodynamische Parameter der drei Gruppen während artefizieller Koronarstenose. <u>MW±Standardabweichung</u>. LVEDP=mittlerer linksventrikulärer enddiastolischer Blutdruck [mmHg].

*=p<0,05 im Vergleich zur Kontroll-Gruppe; §=p<0,05 im Vergleich zur Prophylaxe-Gruppe; †=p<0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten.

	S.corpO ₂	S.corO ₂	MyoavDO ₂	Flow-coro.	MyoDO ₂	MyoVO ₂
Kontroll-Gru	ope (Gr.1)					
Ausgangs-	29±6	4,7±1,6	5,7±1,8	45±12	4,64±1,29	1,63±0,61
werte						
Koronar-	26±5	3,7±1,6	6,5±2,4	3±1†	0,33±0,09†	0,15±0,08†
stenose						
20min	25±4	3,8±0,9	6,3±1,6	5±3†	0,55±0,35†	0,21±0,13†
40min	28±6	4,3±1,8	4,8±1,1	4±0†	0,33±0,09†	0,15±0,06†
80min	30±6	4,9±2,9	3,7±2,2	5±1†	0,22±0,05†	0,08±0,02†
120min	30±10	5,1±2,3	3,8±2,5	4±1†	0,35±0,17†	0,18±0,08†
<u>Therapie-Gru</u>	<u>ippe (Gr.2)</u>					
Ausgangs-	28±10	4,3±1,3	5,9±1,3	55±16	5,57±1,41	2,48±0,84
werte						
Koronar-	28±7	3,9±1,2	5,7±1,6	5±2†	0,47±0,17†	0,22±0,09†
stenose						
+HBOC-201	26±3	3,6±0,8	6,4±1,2	6±1†	0,60±0,07†	0,27±0,06†
40min	27±5	3,8±1,3	5,8±1,4	4±3†	0,44±0,31†	0,23±0,16†
+HBOC-201	24±7	3,3±0,8	5,7±1,4	6±2†	0,57±0,16*†§	0,32±0,08*†§
+HBOC-201	25±9	3,1±1,0	5,3±1,4	6±3†	0,52±0,24†	0,28±0,16†
Prophylaxe-C	Gruppe (Gr.3	<u>)</u>				
Ausgangs-	24±3	3,1±0,5	6,2±1,3	88±43	7,77±2,67	3,91±2,13*
werte						
Koronar-	25±14	2,3±1,7	5,5±2,0	8±6†	0,55±0,30†	0,34±0,26†
stenose						
20min	23±8	3,0±2,4	4,9±2,1	7±4†	0,50±0,26†	0,30±0,19†
40min	24±6	3,1±2,3	4,9±2,6	7±6†	0,48±0,22†	0,31±0,18†
80min	29±9	2,7±0,7	4,6±2,0	4±1†	0,31±0,11†	0,18±0,08†
120min	24±3	3,0±0,9	5,1±1,0	6±6†	0,48±0,44†	0,31±0,34†

3.2. Sauerstofftransport im Myokard

Tab. 3.3.: Parameter des Sauerstofftransports des Myokards.

<u>MW±Standardabweichung</u>. S.cor.-pO₂=Sauerstoffpartialdruck im Sinus coronarius [mmHg]; S.cor.-O₂=Sauerstoffgehalt im Sinus coronarius [ml·dl⁻¹]; Myo.-avDO₂=arterio-venöse Sauerstoffdifferenz des Myokards (regional) [ml·dl⁻¹]; Flow-coro.=Flußrate der LAD [ml·min⁻¹]; Myo.-DO₂=regionales Sauerstoffangebot des Myokards [ml·min⁻¹]; Myo.-VO₂=regionaler Sauerstoffverbrauch des Myokards [ml·min⁻¹]. *=p<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe; §=p<0,05 im Vergleich zur Prophylaxe-Gruppe; †=p<0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten.

3.3. Ergebnisse der subdiafragmalen Echokardiographie (SDE)

—					
	LVEDA	FS	FAC	CFS	EF
Kontroll-Grupp	oe (Gr.1)				
Ausgangs-	19,8±2,7	14,6±3,1	27,7±2,9	16,1±1,8	37,5±3,5
werte					
Hämodilution	21,1±1,8	17,9±4,9	32,3±3,1	18,0±1,8	44,7±3,8
60min	19,1±2,0	19,6±4,0	34,2±6,2	19,4±4,1	46,4±7,8
100min	17,6±2,3	19,6±5,2	34,2±7,0	19,4±4,3	45,1±8,9
Therapie-Grup	pe (Gr.2)				
Ausgangs-	21,0±2,2	17,0±5,1	30,6±5,6	17,6±2,4	43,0±3,4
werte					
20min	19,3±3,0	14,4±7,7	32,0±6,9	17,5±4,5	45,2±9,1
60min	19,8±2,9	19,6±2,8	37,9±4,6	21,3±2,4	51,3±5,9
100min	19,0±2,9	22,3±4,4	40,5±4,3	23,2±3,3	53,7±4,7
Prophylaxe-Gr	uppe (Gr.3)				
Ausgangs-	16,0±4,3*	17,9±8,3	33,5±10,1	18,8±7,3	46,8±12,1
werte					
Hämodilution	15,2±3,1*§	22,4±8,6	39,5±15,4	24,2±7,3	52,6±18,8
+HBOC-201	16,6±1,5*§	19,9±4,4	37,5±8,5	21,2±6,2	50,0±12,1
100min	16,7±1,6	22,8±4,4	36,4±10,1	21,2±6,7	48,2±14,3

Ergebnisse der (SDE) vor artefizieller Koronarstenose

Tab. 3.4.: Parameter der subdiafragmalen Echokardiographie (SDE) vor artefizieller Koronarstenose. <u>MW±Standardabweichung.</u> LVEDA=linksventrikuläre enddiastolische Fläche [cm²]; FS=prozentuale Durchmesseränderung zwischen Diastole und Systole des linken Ventrikels ("fractional shortening") [%]; FAC=prozentuale Flächenänderung des linken Ventrikels zwischen Diastole und Systole [%]; Cfs=prozentuale Umfangänderung zwischen Diastole und Systole des linken Ventrikels ("circumferencial fiber shortening") [%]; EF=prozentuale Volumenänderung zwischen Diastole und Systole des linken Ventrikels ("ejection fraction") [%].

*=p<0,05 im Vergleich zur Therapie-Gruppe; §=p<0,05 im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.









Abb. 3.1.: Wandbeweglichkeit des Myokards (SWMA-Index im SDE) und systolische Wanddickenzunahme des Myokards an der Vorderwand (SWT% anterior im SDE) vor artefizieller Koronarstenose. \blacktriangle = Kontrollgruppe; \blacksquare = Therapiegruppe; \blacklozenge = Prophylaxegruppe.

	LVEDA	FS	FAC	CFS	EF
Kontroll-Grupp	e (Gr.1)				
Ausgangs-	16,1±2,5	24,1±5,7	42,2±6,8	24,2±4,3	54,7±7,9
werte					
Koronarste-	17,7±2,6	13,6±2,7†	27,9±3,4†	14,2±2,2†	38,6±5,7†
nose					
20min	17,7±3,2	10,1±2,0†¶	26,5±4,4†	12,7±4,4†	37,6±6,2†
40min	16,6±2,1	14,4±5,5†	24,7±6,8†	12,9±5,3†	34,0±8,4†
80min	15,2±1,7	12,7±3,9†	24,7±6,6†	11,9±3,9†	33,0±10,8†
120min	15,8±2,9	11,2±6,3†	28,3±5,8†	15,2±3,3†	40,9±6,8†
Therapie-Grupp	<u>be (Gr.2)</u>				
Ausgangs-	16,1±4,3	24,0±6,5	45,0±11,1	26,3±7,1	57,3±14,1
werte					
Koronarste-	16,7±1,8	11,7±5,8†	27,8±6,8†	14,9±3,0†	38,0±9,3†
nose					
+HBOC-201	16,3±2,5	18,2±12,6*	35,0±15,8	19,4±10,2	48,0±17,4
40min	16,2±1,9	14,6±11,5	27,2±13,9†	15,4±9,1†	37,4±16,2†
+HBOC-201	16,7±2,6	11,1±6,3†	28,8±7,0†	14,2±4,7†	41,4±8,7†
+HBOC-201	16,7±1,8	15,1±10,8	26,7±13,0†	13,4±6,6†§	36,1±14,6†
Prophylaxe-Gru	<u>ıppe (Gr.3)</u>				
Ausgangs-	15,7±2,1	27,1±10,0	45,3±9,5	27,6±5,8	60,0±10,7
werte					
Koronarste-	15,5±2,2	16,8±8,7	31,3±8,5†	19,8±6,6	42,8±10,9†
nose					
20min	15,2±3,3	18,1±6,6†	30,7±7,3†	17,0±3,5	40,9±8,4†
40min	16,1±1,8	15,6±6,6†	32,7±8,3†	21,6±10,2	44,1±9,3†
80min	14,6±2,0	19,4±9,2	36,1±16,5	19,6±9,8	47,5±17,9
120min	14,6±2,2	21,7±5,4*	41,4±7,1*	23,5±4,2*	54,4±8,3*

Ergebnisse der SDE während artefizieller Koronarstenose

Tab. 3.5.: Parameter der subdiafragmalen Echokardiographie (SDE) während artefizieller Koronarstenose. <u>MW±Standardabweichung</u>. *=p<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe; \uparrow =p<0,05 im Vergleich zu den Ausgangswerten; \S =p<0,05 im Vergleich zur Prophylaxe-Gruppe; \P =p<0,05 im Vergleich zur Koronarstenose.



-20

-30

Ausgangswerte Stenose 20 min





80 min

120 min

40 min

= + 0,2 g/kg KG HBOC-201

	10%-Perzentile	50%-Perzentile	90%-Perzentile
	[mmHg]	[mmHg]	[mmHg]
Kontroll-Gruppe (Gr.1)			
Ausgangswerte	18,7	20,6	26,8
Koronarstenose	3,0†	5,6†	8,9†
20min	2,5†	3,1†	3,6†
40min	3,2†	2,9†	3,9†
80min	2,4†	2,9†	2,8†
120min	2,5†	2,4†	3,0†
<u> Therapie-Gruppe (Gr.2)</u>			
Ausgangswerte	18,4	22,8	30,8
Koronarstenose	1,6§†	2,2§†	5,0§†
+HBOC-201	9,0	12,1*†¶	16,8*¶
40min	9,6*	11,9*†	18,1*†
+HBOC-201	10,0*	12,1*†	13,8*†
+HBOC-201	11,4*	14,6*†	18,0*†
Prophylaxe-Gruppe (Gr	<u>.3)</u>		
Ausgangswerte	16,5	18,1	20,5
Koronarstenose	11,0*	16,2*	20,5*
20min	12,7*	14,9*	19,7*
40min	15,3*	16,2*	19,3*
80min	11,2*	14,1*	18,1*
120min	16,1*	18,2*	19,6*

3.4. Sauerstoffspannungen (tpO₂) des Myokards

Tab. 3.6.: Sauerstoffspannungen des Myokards. 10%-Perzentile: 10% der tpO₂-Messungen waren niedriger als dieser Wert; 50%-Perzentile: 50% der tpO₂-Messungen waren höher als dieser Wert; 90%-Perzentile: 10% der tpO₂-Messungen waren höher als dieser Wert. Darstellung der Werte als Median in mmHg. *=p<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe; \uparrow =p<0,05 im Vergleich zur den Ausgangswerten; §=p<0,05 im Vergleich zur Prophylaxe-Gruppe; ¶=p<0,05 im Vergleich zur Koronarstenose.

3.5. In die Studie einbezogene Versuchstiere mit Gruppenzugehörigkeit

In der beschriebenen Tierversuchsstudie wurden 20 Hunde untersucht. Da die hier beschriebenen Untersuchungen "geblindet", d.h. ohne Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit der Hunde durchgeführt wurden, wurden zunächst die Präparate aller Hunde für die In Situ Nick Translation herangezogen. Im Anschluß an die Auswertung wurde dann die Verteilung der Hunde auf die Gruppen aufgelöst und bestimmte Hunde aus unterschiedlichen Gründen aus der Auswertung ausgeschlossen, was die folgende Tabelle darstellen soll:

Gruppe	Behandlung	Tier	Begründung für Aus- schluß aus der Studie
1	1. IHD HES	1	Exitus vor Reperfusion
Kontroll-		7	
Gruppe	2. Ringerlösung	9	
		15	
		17	
		20	
2	1. IHD Ringerlö-	2	
Therapie-	sung	6	
Gruppe	2. HBOC-201	8	Exitus nach 16min Reper- fusion
		10	Exitus vor Reperfusion
		12	
		14	
		19	
3	1. IHD Ringerlö-	3	Exitus nach 5min Reperfu-
Prophylaxe-	sung		sion
Gruppe	und HBOC-201	4	
		5	Exitus vor Reperfusion
	2. Ringerlösung	11	
		13	Exitus vor Reperfusion
		16	
		18	

Tab. 3.7.: Gruppeneinteilung, Behandlung und evtl. Ausschlußkriterien der Versuchstiere.

Tier	Linker V.	Ν	Septum	N	Rechter V.	Ν	Gruppe
1	-	-	-	-	-	-	1
2	0,87	15	-	-	-	-	2
3	-	-	-	-	-	I	3
4	-	-	2,144	15	0,42	15	3
5	-	-	-	-	-	-	3
6	1,336	15	0,433	15	0,253	15	2
7	0,557	18	0,647	15	0,536	15	1
8	-	-	-	-	-	-	2
9	1,572	15	0,704	15	0,52	12	1
10	-	-	-	-	-	-	2
11	1,006	15	0,583	15	0,565	15	3
12	0,754	15	-	-	2,111	15	2
13	-	-	-	-	-	-	3
14	0,591	15	0,724	15	0,788	15	2
15	1,206	15	0,635	12	0,831	15	1
16	0,629	15	0,585	9	2,102	6	3
17	0,881	12	0,547	15	0,787	15	1
18	0,996	15	0,911	15	-	-	3
19	0,814	15	0,444	12	0,548	15	2
20	0,896	15	1,835	15	0,595	15	1

3.6. Korrigierte Werte der densitometrischen Auswertung

Tab. 3.8.: Nach der in Material und Methoden, Abschnitt 2.3.3., dargestellten Rechnung kor-rigierte Werte der densitometrischen Auswertung. Linker V.: Linker Ventrikel; Rechter V.:Rechter Ventrikel; N: Anzahl der per Densitometrie bestimmten und ausgewerteten Einzelwerte.

3.7. Deskriptive Statistik für die Densitometrie von Septum (S), linkem Ventrikel (L) und rechtem Ventrikel (R) der einzelnen Hunde (01-20)

	Ν	Range	Minimum	Maximum	Mean	Group	Std. Deviation
S_04	15	1,421	1,483	2,903	2,14409	3 (P)	0,36862
S_06	15	0,247	0,308	0,555	0,43270	2 (T)	0,076181
S_07	15	0,394	0,456	0,850	0,64664	1 (K)	0,13251
S_09	15	0,599	0,279	0,878	0,70448	1 (K)	0,15211
S_11	15	0,356	0,425	0,781	0,58275	3 (P)	0,098493
S_14	15	0,228	0,610	0,838	0,72356	2 (T)	0,066438
S_15	12	0,383	0,446	0,829	0,63541	1 (K)	0,10667
S_16	9	0,201	0,510	0,711	0,58531	3 (P)	0,064362
S_17	15	0,231	0,441	0,672	0,54662	1 (K)	0,080405
S_18	15	0,515	0,565	1,080	0,91143	3 (P)	0,14597
S_19	12	0,249	0,297	0,545	0,44391	2 (T)	0,076254
S_20	15	1,391	1,048	2,440	1,83482	1 (K)	0,49247
R_04	15	0,455	0,094	0,549	0,42009	3 (P)	0,12112
R_06	15	0,145	0,186	0,330	0,25264	2 (T)	0,039302
R_07	15	0,294	0,379	0,673	0,53612	1 (K)	0,087932
R_09	12	0,228	0,423	0,651	0,52019	1 (K)	0,081061
R11	15	0,287	0,438	0,725	0,56454	3 (P)	0,084692
R_12	15	1,971	1,379	3,350	2,11068	2 (T)	0,48260
R14	15	0,455	0,562	1,017	0,78775	2 (T)	0,12780
R_15	15	0,304	0,653	0,956	0,83076	1 (K)	0,086618
R_16	6	1,248	1,248	2,496	2,10193	3 (P)	0,45886
R_17	15	0,786	0,468	1,254	0,78654	1 (K)	0,20667
R_19	15	0,129	0,474	0,603	0,54805	2 (T)	0,038431
R20	15	0,250	0,478	0,729	0,59549	1 (K)	0,072103
L_02	15	0,466	0,679	1,144	0,86983	2 (T)	0,12905
L_06	15	0,954	0,966	1,921	1,33609	2 (T)	0,32915
L_07	18	0,814	0,215	1,028	0,55733	1 (K)	0,29116
L_09	15	0,825	1,051	1,876	1,57202	1 (K)	0,19860
L_11	15	0,353	0,852	1,205	1,00592	3 (P)	0,11736
L_12	15	0,435	0,529	0,964	0,75362	2 (T)	0,12597
L_14	15	0,324	0,454	0,779	0,59140	2 (T)	0,091710
L_15	15	1,310	0,632	1,942	1,20559	1 (K)	0,41462
L_16	15	0,328	0,459	0,787	0,62868	3 (P)	0,087250
L_17	12	0,199	0,761	0,961	0,88131	1 (K)	0,058108
L_18	15	0,412	0,826	1,239	0,99550	3 (P)	0,11292
L_19	15	0,390	0,635	1,025	0,81422	2 (T)	0,11651
L_20	15	0,504	0,669	1,173	0,89595	1 (K)	0,12370

Tab. 3.	.9.:	Desk	riptive	Statistik	der	bea	arbeiteten	Werte.	N:	Werteanza	hl;	Mean:	Mittelw	ert;
Group:	Grup	ope; I	Range:	Werteber	eich;	St.	Deviation:	Standa	rdat	oweichung;	K:	Kontroll	gruppe;	T:
Therapi	iegru	ppe;	P: Propl	hylaxegru	ope.									

3.8. Graphische Darstellung der Werte der einzelnen Gruppen in Box-Plots



Abb. 3.3.: Darstellung der Werte für den linken Ventrikel aller drei Gruppen.



Abb. 3.4.: Darstellung der Werte für das Septum aller drei Gruppen.



Abb. 3.5.: Darstellung der Werte für den rechten Ventrikel aller drei Gruppen.



Zusammenstellung der Werte aller Grupen

Abb. 3.6.: Zusammenfassende Darstellung aller Werte, geordnet nach Gruppe.

3.9. Graphische Darstellung der Werte innerhalb der einzelnen Gruppen in Box-Plots



Abb. 3.7.: Darstellung der Werte für linken Ventrikel, Septum und rechten Ventrikel der Kontrollgruppe (1).



Abb. 3.8.: Darstellung der Werte für linken Ventrikel, Septum und rechten Ventrikel der Therapiegruppe (2).



Abb. 3.9.: Darstellung der Werte für linken Ventrikel, Septum und rechten Ventrikel der Prophylaxegruppe (3).



Abb. 3.10.: Zusammenfassende Darstellung aller Werte, geordnet nach Position.

3.10. Ergebnisse des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests

<u>A) Vergleich von linkem Ventrikel, Septum bzw. rechtem Ventrikel zwischen den verschiedenen Gruppen:</u>

Linker Ventrikel:

Verglichene	Summenränge	N	kritische Werte	р
Gruppen			für p=0,05	
Kontrolle (1)	33	5	19, 36	p>0,05
Therapie (2)	22	5		
Kontrolle (1)	23	5	7, 20	p<0,05
Prophylaxe (3)	13	3		
Therapie (2)	21	5	7, 20	p<0,05
Prophylaxe (3)	15	3		

Tab. 3.10. : Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für den linken Ventrikel der drei Gruppen.

Septum:

Verglichene	Summenränge	N	kritische Werte	р
Gruppen			für p=0,05	
Kontrolle (1)	18	4	6, 18	p<0,05
Therapie (2)	10	3		
Kontrolle (1)	16	4	11, 25	p>0,05
Prophylaxe (3)	20	4		
Therapie (2)	8	3	6, 18	p<0,05
Prophylaxe (3)	20	4		

Tab. 3.11. : Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für das Septum der drei Gruppen.

Rechter Ventrikel:

Verglichene	Summenränge	N	kritische Werte	р
Gruppen			für p=0,05	
Kontrolle (1)	24	5	12, 28	p>0,05
Therapie (2)	21	4		
Kontrolle (1)	23	5	*	p<0,05
Prophylaxe (3)	5	2		
Therapie (2)	15	4	*	p>0,05
Prophylaxe (3)	6	2		

Tab. 3.12. : Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für den rechten Ventrikel der drei Gruppen.

* eigene Berechnung (N=2 nicht in Tabelle enthalten)

<u>B)</u> Vergleich von linkem Ventrikel (L), Septum (S) und rechtem (R) Ventrikel innerhalb einer Gruppe:

Kontrollgruppe (1):

Vergleich	Summenr	änge N	kritische Wer für p=0,05	te p
L	32	5	12, 28	p<0,05
S	13	4		
L	37	5	19, 36	p<0,05
R	18	5		
S	21	4	12,18	p>0,05
R	24	5		

Tab. 3.13. : Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für linken Ventrikel, Septum und rechten Ventrikel der Kontrollgruppe (1).

Therapiegruppe (2):

Ve	ergleich Summenränge		Ν	kritische Werte	р
				für p=0,05	
L		29	5	7, 20	p<0,05
S		7	3		
L		28	5	12, 28	p<0,05
R		17	4		
S		10	3	6, 18	p<0,05
R		18	4		

Tab. 3.14. : Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für linken Ventrikel, Septum und rechten Ventrikel der Therapiegruppe (2).

Prophylaxegruppe (3):

V	/ergleich	Summenränge	N	kritische Werte	р
				für p=0,05	
L		14	3	6, 18	p>0,05
S		14	4		
L		12	3	*	p<0,05
R		3	2		
S		18	4	*	p<0,05
R		3	2		

Tab. 3.15. : Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für linken Ventrikel, Septum und rechten Ventrikel der Prophylaxegruppe (3).

* eigene Berechnung (N=2 nicht in Tabelle enthalten)

Es ergeben sich also folgende Aussagen:

zu A):

- die <u>linken Ventrikel</u> der Kontrollgruppe und der Therapiegruppe zeigen keine signifikanten Unterschiede auf 5%-Niveau
- ⇒ der <u>linke Ventrikel</u> der Kontrollgruppe zeigt signifikant mehr DNA-Einzelstrangbrüche als der der Prophylaxegruppe
- ⇒ der <u>linke Ventrikel</u> der Therapiegruppe zeigt signifikant mehr DNA-Einzelstrangbrüche als der der Prophylaxegruppe
- ⇒ das <u>Septum</u> der Kontrollgruppe zeigt signifikant mehr DNA-Einzelstrangbrüche als das der Therapiegruppe
- die <u>Septen</u> der Kontroll- und Prophylaxegruppe zeigen keine signifikanten Unterschiede auf 5%-Niveau
- ⇒ das <u>Septum</u> der Therapiegruppe zeigt signifikant weniger DNA-Einzelstrangbrüche als das der Prophylaxegruppe
- ⇒ der <u>rechte Ventrikel</u> der Kontrollgruppe zeigt signifikant mehr DNA-Einzelstrangbrüche als der Prophylaxegruppe
- die <u>rechten Ventrikel</u> von Kontroll- und Therapie- bzw. von Therapie- und Prophylaxegruppe zeigen keine signifikanten Unterschiede auf 5%-Niveau

zu B):

- der linke Ventrikel der <u>Kontrollgruppe</u> weist signifikant mehr DNA-Einzelstrangbrüche auf als der rechte Ventrikel
- der linke Ventrikel der <u>Kontrollgruppe</u> weist signifikant mehr DNA-Einzelstrangbrüche auf als das Septum
- zwischen rechtem Ventrikel und Septum der Kontrollgruppe sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar
- der linke Ventrikel der <u>Therapiegruppe</u> weist signifikant mehr DNA-Einzelstrangbrüche auf als das Septum
- der linke Ventrikel der <u>Therapiegruppe</u> weist signifikant weniger DNA-Einzelstrangbrüche auf als der rechte Ventrikel
- das Septum der <u>Therapiegruppe</u> weist signifikant weniger DNA-Einzelstrangbrüche auf als der rechte Ventrikel
- das Septum der <u>Prophylaxegruppe</u> weist signifikant mehr DNA-Einzelstrangbrüche auf als der rechte Ventrikel
- der linke Ventrikel der <u>Prophylaxegruppe</u> weist signifikant mehr DNA-Einzelstrangbrüche auf als der rechte Ventrikel
- zwischen linkem Ventrikel und Septum der <u>Prophylaxegruppe</u> sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar

3.11. Ergebnisse der Histopathologie

3.11.1. Allgemeine Ergebnisse

In allen Untersuchungsproben konnte keine vollständige Koagulationsnekrose beobachtet werden. In der Hämatoxilin-Eosin (HE)-Färbung waren gelegentlich beginnende eosinophile Zytoplasmafärbungen aufdeckbar, die jedoch nicht eine abschließende Bewertung der Veränderungen zuließen. Die histologische Analyse fußt daher ausschließlich auf dem Ergebnis der LFB-Färbung.

In dieser Färbung sind Vorstadien einer Koagulationsnekrose an einer Sarkomeren-Dilatation, an einer körnigen Granulierung zwischen den einzelnen Querstreifen und einer matten rauchblauen Tönung der Myozyten (bei rötlicher Färbung ungeschädigten Myokards) erkennbar. Diese Färbebesonderheiten der Koagulationsnekrose-Vorstufen sind erfahrungsgemäß frühestens nach einer Ischämiedauer von zwei Stunden, häufiger und eindeutig nach 3-4 Stunden erkennbar. Die Ischämiedauer des vorliegenden Experiments liegt somit an der Grenze des im lichtmikroskopischen Bereich Erkennbaren.

Die myofibrilläre Degeneration ist dagegen mit der Luxol-Fast-Blue (LFB)-Färbung bereits 5min nach Schädigungsbeginn sicher und deutlich aufgrund einer intensiven Blaufärbung erkennbar. Dabei kann die Muskelzelle diffus blau getönt sein oder durch ein intensives blaues homogenisiertes Querband verformt sein.

Die Querbandläsion tritt unter den Bedingungen der territorialen Ischämie häufiger auf als der diffuse Subtyp der myofibrillären Degeneration. Aus der allgemeinen Pathologie des voll ausgebildeten Herzinfarktes ist bekannt, daß ein großes breites Zentrum aus Koagulationsnekrose endokardial von einem Saum aus myofibrillren Degenerationen vom Querbandtyp umgeben wird, der nach epikardial und zu den Seiten an Breite zunimmt. Dem gegenüber besteht der typische Aspekt eines temporär ischämischen Myokards nach Reperfusion in einer territorial ausgebreiteten myofibrillären Degeneration innerhalb des ehemaligen Ischämiegebietes. Entsprechend dem Intervall zwischen dem Ischämiebeginn und dem Reperfusionsbeginn ergeben sich, bezogen auf das Erscheinungsbild des reperfundierten Myokards, fließende Übergänge zwischen den beiden oben geschilderten Extremen mit unterschiedlich großen endokardnah gelegenen Koagulationsnekrosebezirken und wechselnd breiten Säumen aus myofibrillärer Degeneration im epikardialen Anteil. Dabei sind die epikardialen Herde aus myofibrillärer Degeneration in wechselndem Ausmaß mit unveränderten Myokardabschnitten verzahnt.

In den vorliegenden Experimenten ist kein vollausgebildeter Myokardinfarkt aus Koagulationsnekrose und Randsaum mit myofibrillärer Degeneration (MFD) erkennbar. Es finden sich jeweils nur Vorstufen von Koagulationsnekrose und MFD in unterschiedlichem Ausmaß und unterschiedlicher räumlicher Anordnung. Dabei ist keine starre Einordnung in zwei oder drei grundsätzliche Reaktionstypen zu verzeichnen. Vielmehr bieten die einzelnen Experimente Veränderungen, die sich hinsichtlich der transmuralen Ausdehnung und des relativen Verhältnisses zwischen Koagulationsnekrose und MFD mehr graduell als grundsätzlich unterscheiden.

Eine Sonderstellung nehmen die Versuche 7 (Kontrollgruppe, Gruppe1) und 12 (Therapiegruppe, Gruppe2) ein, bei denen das Myokard endokardnah allenfalls ein leichtes Ödem erkennen läßt. Auch finden sich kaum MFD. Es sind lediglich annähernd saumartig diskrete MFD im epikardnahen Drittel aufdeckbar. Auch der Versuch 17 nimmt eine Sonderstellung ein. Er läßt lediglich in Lamelle 3 und Lamelle 4 vereinzelte kleine Herde in den unmittelbar endokardnahen Bereichen (innere Fünftel) der Vorderwand erkennen, die eine Mischung aus MFD und Koagulationsnekrose-Vorstufen zeigen. Weiter distal zur Spitze gelegene und proximale Lamellen zeigen diese Veränderungen nicht.

3.11.2. Spezielle Ergebnisse der einzelnen Versuche

Folgende Versuchstiere konnten vollständig geblindet ausgewertet werden: Tier 2; 4; 6; 8; 9; 11; 14; 15; 18-20.

Da die Anlage der Ligatur an der LAD in ihrem Abstand zu der Bifurkation im AV-Sulkus zwischen 0,5 und 3cm schwankte, konnte die Seitenausdehnung der Schädigungsgebiete (Einbziehung der Seiten- oder Hinterwand) nicht zur Bestimmung des Schweregrades der ischämischen Schädigung herangezogen werden, da in Abhängigkeit von der Ligaturhöhe Variationen im Versorgungsgebiet der ligierten Arterie zu erwarten waren. Für die Auswertung wurde daher lediglich die transmurale Ausdehnung der Schädigung und das quantitative Verhältnis bzw. die räumliche Anordnung von Koagulationsnekrose-Vorstufen und MFD im Septum und im anteroseptalen Bereich herangezogen. Dabei ließen sich bezüglich der Anordnung der Schädigung zwei große Gruppen erkennen, und zwar Fälle mit mehr fleckförmiger endokardnaher Schädigung und solche mit flächenhaft ausgedehnter Schädigung. Eine Zwischenstellung nahmen dabei Fälle ein, die eine Konfluenz endokardnaher Schädigungszonen zu großen, zackig begrenzten Feldern erkennen lassen. Dabei fiel auf, daß Fälle mit fleckförmig angeordneter Schädigung in transmuraler Richtung nur kleine endokardnahe Schädigungszonen aufwiesen, während die endokardnahen flächenhaft zusammenhängenden Schädigungen auch eine größere Ausdehnung nach epikardial zeigten.

Grundtyp	Fleckförmig				Flächenhaft						
Tier Nr. (Grup-	4 (3)	18 (3)	14 (2)	11 (3)	15 (1)	19 (2)	20 (1)	8 (2)	6 (2)	9 (1)	2 (2)
pe)											
Endo-Schaden											
Prinzip	K+S	Mix/	K+S	konfl.	konfl.	Mix	MFD	K+S	K+S	K+S	K+S
		KS		MFD-	K+S		Mix				
				Mix							
Koag	++	+/++	++	+/++	+++	+/++	+/++	++++	++/	+++	++/
									+++		+++
MFD-Saum	(+)	+	((+))		+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+
MFD innen	(+)	+/++	+		+			+/++	+/++	++	(+)
MFD territ.				++++		+++	+++				
MFD-Koag-Mix		z.T.	z.T.	ja	z.T.	ja	ja			ja	
Epi-Herde											
Menge	+	(+)	+++	++	++/	+/++	++/	++	++/	+/++	+/++
					+++		+++		+++		
reine MFD	ja	ja	ja		ja	ja	ja				
Koag + MFD	ja			ja	ja	ja		ja	ja	ja	ja
Anteil MFD	+		+++	++	+/++	++	++/	+/++	++	+	+/++
							+++				
Anteil Koag.	(+)			+	++/	(+)	((+))	((+))	+	((+))	+
					+++						
Ausdehnung transmural							•	•		•	
flächenhaft	25%	20%	50%	50%	66%	50%	66%	33%	50%	66%	50%
Epi-Herde	25%	33%	50%	75%	80%	66%	80%	66%	66%	75%	75%
Gruppe	А	А	А	А	В	В	В	С	С	С	С

Tab. 3.16. : Tabellarische Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse. Gruppe 1: Kon-trollgruppe; Gruppe 2: Therapiegruppe; Gruppe 3: Prophylaxegruppe. Weitere Erklärungen zu inder Tabelle verwendeten Abkürzungen, siehe folgende Seite.

Erklärungen zur Tabelle:

Endokardschaden: endokardnahes Schädigungsmuster

Epi-Herde: daran epikardial anschließende herdförmige Schädigungen

Ausdehnung transmural:

flächenhaft: bezogen auf die Gesamtgröße der fleckförmigen oder flächen-

haften endokardnahen Schädigung (s. Endo-Schaden)

Epi-Herde: bezogen auf die Gesamtgröße der sich an den "Endo-Schaden" anschließenden epikardwärtigen Schädigungsherde

z.B. 25%: endokardnahes Viertel o.ä.

Gruppe: bezogen auf den Text: A= fleckenförmiger Schaden

B= flächenhafter Schaden

C= Zwischengruppe

Schweregrad/Menge: ((

((+)) vereinzelt

(+) wenig
+ leicht
++ mittelgradig
+++ schwer
+++ massiv
+/++ Zwischenstufen

K+S: Koagulationsnekrose-Vorstufen und MFD-Saum

Mix: enge Durchmischung von Zellen mit MFD und Koagulationsnekrose-Vorstufen

MFD-Mix: z.T. reine MFD, z.T. Mix (s.o.)

konfl.: konfluierende Herde

MFD: Myofibrilläre Degeneration

Koag: Koagulationsnekrose-Vorstufen

MFD innen: MFD innerhalb des zentralen Feldes aus Koagulationsnekrose-Vorstufen

MFD territ.: flächenhaft (territorial) ausgedehnte MFD

3.11.3. Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse anhand ausgewählter Präparate



Abb. 3.11.: Bild 269/34. Tier 18; Prophylaxe-Gruppe (3).

Fleckförmige Myokardschädigung (blau gesäumte und gefleckte Felder) nur im endokardnahen Drittel. Typisch für eine primäre territoriale ischämische Läsion ist ein 4-6 Zellen breiter schädigungsfreier subendokardialer Saum (rot). Zur Tiefe hin schließt sich unveränderte Myokard (rot) an – im Unterschied zur flächenhaften Schädigung bei 269/26 (Tier 11, s.u.).

Luxol-Fast-Blue, x 25 (Originalvergrößerung).

Dieses Schädigungsmuster gilt auch in unterschiedlicher Ausprägung für die Tiere 4, 11 und 14: fleckförmig, Prädominanz der myofibrillären Degeneration.



Abb. 3.12.: Bild 269/6. Tier 11; Prophylaxe-Gruppe (3).

Felderförmig ausgebreitete myofibrilläre Degeneration vom Querbandtyp (intensiv blau) im ödematös aufgelockerten reperfundierten Ischämieareal. Das mehr rauchblaue Feld entspricht Koagulationsnekrose-Vorstufen mit randlichen MFD (intensiv blau). Perivaskulär teilweise kleinfleckig ungeschädigtes Myokard (rot). Luxol-Fast-Blue, x25 (Originalvergrößerung).



Abb. 3.13.: Bild 269/13. Tier 11; Prophylaxe-Gruppe (3).

MFD vom Querbandtyp aus dem Zentrum eines Schädigungsfeldes des gleichen Versuchstieres wie in Abb. 3.10.. Die Herzmuskelzellen werden von massenhaften, z.T. gruppiert gelagerten blau gefärbten Querbändern durchsetzt. Dazwischen hellere Zytoplasmaabschnitte mit destruierten Sarkomeren. Die Querbandzellen sind noch kernhaltig.

Luxol-Fast-Blue, x250 (Originalvergrößerung)


Abb. 3.14.: Bild 269/13. Tier 11; Prophylaxe-Gruppe (3).

Flächenhaft ausgebreitete Myokardschädigung (im Unterschied zu Abb. 3.9. und 3.10. bei gleicher Vergrößerung) von dicht unterhalb des Endokards, blau getönt. Nur der schmale rötliche Streifen unter dem Endokard entspricht ungeschädigtem Myokard.

Luxol-Fast-Blue, x25 (Originalvergrößerung).

Gleiches Schädigungsmuster (flächenhaft, Prädominanz der Koagulationsnekrose-Vorstufen mit MFD-Randsaum) auch bei den Tieren 2, 6, 8, 16. Die Tiere 15, 19, 20 nehmen eine Zwischenstellung mit Konfluenz fleckförmiger Schädigungsherde ein, z.T. mit Prädominanz flächenhafter Querbänder, z.T. mit Prädominanz von Koagulationsnekrose-Vorstufen.



Abb. 3.15.: Bild 269/3429. Tier 9; Kontroll-Gruppe (1).

Flächenhafte Myokardschädigung. Zu beachten ist die rauchblaue Tönung der meisten Myozyten, die auf eine Koagulationsnekrose-Vorstufe hinweist, im Unterschied zu dem rötlich getönten ungeschädigten Myokard. An der Grenze zwischen erhaltenem und geschädigtem Myokard ein sehr schmaler Saum intensiv blau getönter MFD vom Querbandtyp.

Luxol-Fast-Blue, x50 (Originalvergrößerung).



Abb. 3.16.: Bild 269/24. Tier 9; Kontroll-Gruppe ().

Randzone einer flächenhaften Myokardschädigung vom Typ der Infarkt-Frühphase. Rechts oben eine schmale Zone ungeschädigten Myokards mit leicht rötlichem Farbton. Daran schließt sich ein vier Zellen breiter Saum tief blauer MFD vom Querbandtyp an. Die linke untere Bildhälfte zeigt eine morphologische Frühphase der Koagulationsnekrose mit Sarkomerendilatation, leichter Verschmälerung z.T. Wellung überdehnter Myozyten so wie einer groben rauchblauen Granulierung, die z.T. auch in Zellen mit MFD vom Querbandtyp vorkommt und das lichtmikroskopische Äquivalent kalziumüberladener Mitochondrien darstellt. Die Zellkerne sind in dieser frühen Phase der sich beginnend morphologisch abzeichnenden infarkttypischen Koagulationsnekrose noch erhalten. Luxol-Fast-Blue, x400 (Originalvergrößerung).

3.11.4. Statistische Auswertung der histopathologischen Färbungen

Zur Auswertung der histopathologischen Färbungen wurden die Ergebnisse in eine Rangliste eingebracht und mittels des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Dabei ergaben sich folgende p-Werte:

Verglichene Gruppen	р
Prophylaxe vs. Kontrolle	0,05*
Therapie vs. Kontrolle	0,88
Prophylaxe vs. Therapie	0,13

Tab. 3.17. : Statistische Auswertung der histopathologischen Färbungen.Vergleich der Rang-listenwerte der einzelnen Gruppen untereinander mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.

Die Ergebnisse der Histopatholgie zeigen also ebenfalls, daß die Prophylaxegruppe signifikant weniger Schäden aufweist als die Kontrollgruppe.

Anschließend wurden die Ranglistenwerte mit den 10%-Perzentilen des tpO₂ im Myokard mit Hilfe des Spearman's Rho-Korrelationskoeffizienten verglichen. Mit diesem Test können zwei ordinale Variablen miteinander verglichen werden (bivariable Korrelation). Die Werte jeder Variable werden vom kleinsten zum größten in eine Rangliste gebracht und der Korrelationskoeffizient (r) errechnet. Anschließend können die zugehörigen p-Werte und damit der Signifikanzgrad bestimmt werden.

Meßzeitpunkt	r	р
vor Stenose	-0,42	0,19
10min Stenose	-0,62	0,08
20min Stenose	-0,77	0,006*
40min Stenose	-0,83	0,006*
80min Stenose	-0,60	0,06
120min Stenose	-0,46	0,18

Es ergaben sich folgende Werte:

Tab. 3.18. : Statistischer Vergleich der histopathologischen Ergebnisse mit den 10%-Perzentilen des tpO_2 des Myokards. Vergleich der Ranglistenwerte der einzelnen Gruppen untereinander mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests.

Je höher der tpO₂, desto weniger myofibrilläre Degenerationen liegen vor. Signifikant korrelieren die Werte der Zeitpunkte 20min und 40min nach der Koronarstenose.

4. Diskussion

4.1. Hauptergebnisse der Studie

Die Ergebnisse zeigten, daß die untersuchten Tiere im Rahmen einer isovolämen Hämodilution hämodynamische Stabilität zeigten und keine Störungen der Wandbeweglichkeit des Myokards auftraten. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß bei Anlage einer Koronarstenose die präventive Applikation von HBOC-201 eine Reduktion des O₂-Partialdruckes im poststenotischen Myokard verhinderte und die Störungen der Wandbeweglichkeit des linken Ventrikels geringer ausfielen als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Nach Anlage der Koronarstenose bewirkte die therapeutische Transfusion von HBOC-201, daß sowohl der Abfall der myokardialen O₂-Sättigung als auch die neuaufgetretenen Störungen der myokardialen Wandbeweglichkeit fast vollständig rückläufig waren. Insgesamt war die präventive Transfusion von HBOC-201 vor Anlage der Koronarstenose effektiver als die therapeutische Applikation, da die poststenotische O₂-Sättigung im Myokard höher und die ischämischen Störungen der Wandbeweglichkeit des Myokards geringer ausfielen. Die Reduktion von Herzindex und Schlagvolumen des Myokards, die zu Beginn der artefiziellen Koronarstenose aufgetreten waren, konnten durch die Transfusion von insgesamt 0,6g/kgKG HBOC-201 rückgängig gemacht werden.

Über die Methode der In Situ Nick Translation (Rigby et al., 1977) sollte überprüft werden, ob HBOC-201 nicht nur die physiologischen Parameter beeinflußt, sondern auch den im Zuge der akuten myokardialen Ischämie und Hypoxie beobachteten Zelltod verringern oder verhindern kann.

Die Prophylaxegruppe weist im linken Ventrikel signifikant weniger DNA-Einzelstrangbrüche auf als die Kontroll- und die Therapiegruppe.

Innerhalb der anderen Herzregionen (Septum, rechter Ventrikel) ließen sich keine einheitlichen Tendenzen feststellen. Das läßt sich u.a. darauf zurückführen, daß durch die 90%ige Stenosierung des linken vorderen Astes der Arteria coronaria sinistra gleiche Bedingungen im linken Ventrikel aller Gruppen vorlagen. Im rechten Ventrikel und im Septum hingegen lassen sich Unterschiede der Blutversorgung aufgrund eventuell unterschiedlicher Versorgungstypen und individueller anatomischer Besonderheiten erwarten. Weiterhin zeigt diese Studie, daß die In Situ Nick Translation als adäquate Methode zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen in Herzmuskelgewebe verwendet werden kann, was auch die unter 4.2. dargestellte Literatur belegt.

Die Methode der In Situ Nick Translation wurde innerhalb dieser Arbeit am poststenotischen Myokard etabliert. DNA-Schäden können mit dieser Methode dosisabhängig nachgewiesen werden, wie der DNasel-Vorversuch (siehe 2.3.1) zeigt.

Die histopathologische Auswertung mit der Luxol-Fast-Blue Färbung zeigte, daß in der Prophylaxegruppe signifikant weniger Schäden im Rahmen der myofibrillären Degeneration auftraten, als in der Kontrollgruppe.

Sowohl die Untersuchung der Hämodynamik, Gewebsoxygenierung und SDE als auch die In Situ Nick Translation und die histopathologische Färbung ergaben, daß das poststenotische Myokard der Prophylaxegruppe am wenigsten Schäden davongetragen hat. Die prophylaktische Gabe der bovinen Hämoglobinlösung HBOC-201 verringert im Stenosemodell signifikant die Schäden im Myokard, die durch eine Ischämie/Hypoxie entstehen. HBOC-201 ist deshalb möglicherweise in der Lage, kardiozirkulatorische Komplikationen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit während isovolämer Hämodilution oder akut auftretender Anämie zu verhindern.

Bisher wurde die Wirkung von Hämoglobin-Lösungen am Myokard bei Anlage einer artefiziellen Koronarstenose kaum untersucht. In der Studie von Ebner et al. (1983) wurden Minipigs bei akuter Ischämie des Myokards über die linke Arteria coronaria mit einer Hämoglobin-Lösung perfundiert und zeigten, verglichen mit der Kontrollgruppe, Vorteile hinsichtlich der Gewebsoxygenierung und der hämodynamischen Stabilität. Eine weitere Studie (Pristoupil et al., 1986) zeigte, daß Ratten, denen eine chemisch modifizierte Hämoglobin-Lösung direkt in die linke Arteria coronaria infundiert wurde bei globaler Hypoxie eine verbesserte Kontraktilität des Herzens zeigten und daß der von der Hämoglobin-Lösung transportierte Sauerstoff zu 70% an das Myokard abgegeben wurde.

In zwei an dieser Klinik durchgeführten Untersuchungen an Hunden wurde gezeigt, daß die prophylaktische und therapeutische Transfusion von HBOC-201 bei peripherer arterieller Stenosierung den Abfall des tpO₂ im Skelettmuskel verhindert bzw. rückgängig macht (Horn et al., 1997, 1998). In dieser Studie erfolgte die Anlage einer arteriellen Stenose allerdings bei einem Gewebe, das keinen sehr hohen Sauerstoffverbrauch aufwies, da die Untersuchungen bei anästhesierten und relaxierten Hunden durchgeführt wurde. Trotzdem zeigte sich hier erstmalig, daß die prophylaktische Hämodilution mit HBOC-201 vor Anlage einer artefiziellen arteriellen Stenose eine poststenotische Gewebshypoxie verhindern kann.

In der vorliegenden Tierstudie allerdings wurde die Wirkung von HBOC-201 bei Anlage einer arteriellen Stenose am Myokard, einem Organ mit physiologisch hohem Sauerstoffverbrauch - auch unter Ruhebedingungen - untersucht. Es zeigte sich deutlich, daß auch am Myokard bei Anlage einer 90%igen koronaren Stenose die eingesetzte Hämoglobin-Lösung zu einer Verbesserung des regionalen, poststenotischen myokardialen Sauerstoffpartialdrucks führt. Es wurde die 90%ige Koronarstenose gewählt, da bei einer kompletten Okklusion der Arterie mit einem schnellen Herztod einer sehr hohen Anzahl der Tiere zu rechnen gewesen wäre.

In der Kontroll-Gruppe zeigte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum ein signifkanter Abfall des Sauerstoffpartialdrucks auf Werte um 2,5mmHg während sich dieser Effekt in der Therapie-Gruppe erwartungsgemäß auch vor der Transfusion von HBOC-201 zeigte. Diese Beobachtung ist entscheidend für den Wirksamkeitsnachweis dieser Hämoglobin-Lösung. Die Reduktion des tpO2 im poststenotischen Myokard führte zu ischämischen Störungen der Wandbeweglichkeit des linksventrikulären Myokards, die mit der subdiafragmalen Echokardiographie erfaßt wurden. In der Prophylaxe-Gruppe hingegen kam es zu keinem Abfall des poststenotischen tpO₂ im Myokard und auch in der Therapiegruppe stieg dieser nach Transfusion von 0,2g/kgKG HBOC-201 wieder signifikant an. Dies beweist, daß die Transfusion der bovinen Hämoglobin-Lösung zu einer Steigerung der myokardialen Oxygenierung trotz kontinuierlich bestehender Koronarstenose führt. Durch diese Verbesserung der poststenotischen Oxygenierung kam es in der Prophylaxe-Gruppe während der Koronarstenose lediglich zu einem Abfall des myokardialen Sauerstoffpartialdrucks um maximal 20% und nicht wie in der Kontroll-Gruppe um über 80%.

In der Kontrollgruppe kam es nach der Koronarstenose zu einem Abfall des Schlagvolumens des Myokards, gleichzeitig verschlechterte sich bei den Tieren die Sauerstoffaufnahme im Myokard (Myo.-VO₂). Die Tiere der Prophylaxe-Gruppe zeigten zu diesem Zeitpunkt verglichen mit der Kontrollgruppe eine 125% höhere, die Tiere der Therapie-Gruppe eine 300% höhere Sauerstoffaufnahme. Durch die Applikation von HBOC-201 kam es in den jeweiligen Gruppen also zu einer verstärkten Aufnahme von Sauerstoff ins Myokard.

Die effektive Abgabe von Sauerstoff an das myokardiale Gewebe bei Transfusion mit HBOC-201 kann auf die niedrige Sauerstoffaffinität, das homogene Ausfüllen der Kapillaren mit Verkürzung der Diffusionsstrecke des Sauerstoffs und durch Sauerstoff-Bridging (Sauerstoff-Transport vom zentral im Lumen gelegen Erythrozyten zur Kapillarwand; Standl, 1998) erklärt werden. Zellulär gebundene Sauerstoffträger sind offensichtlich aufgrund ihrer Größe und physiologischen Eigenschaften nur unzureichend in der Lage, poststenotisches Gewebe zu oxygenieren. Die mit der subdiafragmalen Echokardiographie (SDE) gemessenen funktionellen myokardialen Parameter (FS, FAC, Cfs, EF, SWMA, SWT%) fielen in der Kontroll-Gruppe während der Koronarstenose ab. Die linksventrikuläre myokardiale Funktion ohne Transfusion von HBOC-201 durch die Stenosierung der Koronararterie war deutlich eingeschränkt, was sich in der Reduktion der Änderung von Umfang, Durchmesser, Fläche und Volumen des linken Myokards zwischen Diastole und Systole äußerte. Insbesondere die prozentuale Volumenänderung (prozentualer Anteil des Blutes des linken Ventrikels, der mit der Systole ausgeworfen wird) sank mit Anlage der Stenose um ca. 20% ab, während in der Prophylaxe-Gruppe nach 120min Koronarstenose der Abfall der Auswurffraktion nur 5,5% betrug und damit die Reduktion dieses Parameters signifikant niedriger war.

Zur Erfassung der myokardialen Ischämie sind vor allem die Parameter der Wandbeweglichkeit, der SWMA-Index (Index der segmentalen Wandbeweglichkeitsstörungen des Myokards) und systolische Wanddickenzunahme des linken Ventrikels von Bedeutung. Linksventrikuläre Störungen der Wandbeweglichkeit traten in der Kontroll- und Therapie-Gruppe auf, wobei die Wandbeweglichkeitsstörungen in der Therapie-Gruppe nach Transfusion von HBOC-201 deutlich rückläufig waren und gleichzeitig die Sauerstoffsättigung im poststenotischen Gewebe dieser Gruppe wieder anstieg. Interessant war weiterhin, daß in dieser Untersuchung die Sauerstoffsättigung im myokardialen Gewebe und der Index der segmentalen Wandbeweglichkeitsstörungen des Myokards gleichförmige Verläufe in allen Behandlungsgruppen zeigten. Bei Transfusion von HBOC-201 vor und während der Koronarstenose waren sowohl die Sauerstoffkonzentration im Gewebe des poststenotischen Myokards höher als auch die Störungen der Wandbeweglichkeit des Myokards signifikant geringer als in der Kontroll-Gruppe.

Die linksventrikuläre myokardiale Funktion wurde weiterhin über die systolische Wanddickenzunahme (SWT%) beurteilt. In der Kontroll-Gruppe fiel dieser Wert nach Anlage der Koronarstenose um 40% ab, was eine funktionelle Auswirkung der Ischämie auf die Beweglichkeit des anterioren Anteils des linksventrikulären Myokards belegt. Das Ausbleiben des Abfalls der SWT% in der Prophylaxe-Gruppe nach 120min Koronarstenose zeigt, daß die Transfusion von HBOC-201 vor Anlage der Koronarstenose durch die Erhöhung der myokardialen Sauerstoffsättigung die Ischämie im Myokard reduziert hatte.

Die wesentliche Beobachtung, daß die Prophylaxe-Gruppe im Koronarstenose-Modell am wenigsten Schäden davontrug, wurde durch die molekularbiologische Untersuchung über die In Situ Nick Translation und die histopathologische Analyse klar bestätigt.

4.2. Die Bewertung der *In Situ* Nick Translation anhand der Literatur

Die Methode der In Situ Nick Translation wurde im Rahmen einer tierexperimentellen Studie einer anderen Arbeitsgruppe bereits am Hirn getestet (Krause et al., 2000). In diesem Versuch wurden Kaninchen anästhesiert und an eine extrakorporale Zirkulation angeschlossen. Die Tiere wurden in drei Versuchsgruppen eingeteilt: eine Kontrollgruppe, die nur anästhesiert aber ansonsten nicht weiter behandelt wurde; eine Ischämiegruppe, bei der ein 10minütiges Kammerflimmern induziert wurde; und eine Hypoxiegruppe, die für 10min mit 100% Stickstoff beatmet wurde. Im Anschluß wurde bei Aufrechterhalten einer Hirntemperatur von 37°C für 60min reperfundiert, die Hirne entnommen, kryokonserviert und der In Situ Nick Translation unterzogen. Dabei zeigte sich, daß sowohl eine 10minütige Hypoxieals auch eine 10minütige Ischämiephase gefolgt von einer 60minütigen Reperfusion zu einer signifikanten Zunahme der DNA-Einzelstrangbruchrate im neuronalen Gewebe führen. Interessanterweise fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und belasteten Tieren, wenn im Anschluß an die Hypoxie bzw. Ischämie keine Reperfusion durchgeführt wurde. Dies spricht für die Theorie, daß ein Großteil der Schäden erst während der Reperfusionsphase auftritt, was auch in Abschnitt 4.2.3. dargestellt wird (Krause et al., 2000).

Iseki wendete die In Situ Nick Translation an, um DNA-Einzelstrangbrüche (engl. DNA-single strand breaks, abgekürzt SSB) in verschiedenen Rattengeweben zu detektieren. Iseki brachte dieses Phänomen allerdings nicht mit dem Zelltod direkt in Korrelation, sondern betrachtete dies als dynamische Veränderung des Chromatins im Zuge der Zelldifferenzierung. Im Rahmen der Studie stellte sich heraus, daß die verschiedenen Muskelzellpopulationen unterschiedlich auf die Nick Translation reagierten. Dabei wurde eine sehr starke Reaktion im Skelettmuskel, eine mittlere Intensität im Herzmuskel und eine sehr schwache Färbung in der glatten Muskulatur beobachtet. Diese Unterschiede interpretierte Iseki dahingehend, daß die verschiedenen Zelltypen unterschiedlich auf Nukleasen reagieren, daß unterschiedliche Nukleaseaktivitäten in den verschiedenen Zellen zu verzeichnen sind, und daß die Chromatinstruktur in den Zellen unterschiedlich ist, so daß unterschiedliche Zugänglichkeit für Enzyme wie die DNA-Polymerase gewährleistet wird (Iseki, 1986).

In einer späteren Untersuchung von Gold et al. wurde die DNA-Fragmentierung in Zusammenhang mit dem Zelltod durch Apoptose gebracht. Gold et al. merkten an, daß die DNA-Fragmentierung sowohl ein Zeichen der Apoptose als auch der späten Nekrosestadien ist. In Kombination mit verschiedenen anderen Methoden, so z.B. der immunhistochemischen Färbung mit apoptose-spezifischen zytoplasmatischen- und Oberflächenmarkern oder Untersuchung der Membranintegrität, konnten apoptotische Zellen selektiv angefärbt werden. Die Methode eignet sich aber offenbar nicht zum Nachweis früher Nekrosestadien (Gold et al., 1993).

In den folgenden Jahren wurden einige Untersuchungsreihen zum Nachweis von SSB im postischämischen Gewebe, vor allem am Affen- und Rattenhirn, durchgeführt.

Tobita et al. untersuchten die SSB-Rate im Affenhirn nach einer 15-minütigen Vorderhirnischämie. Dabei stellte sich heraus, daß die Menge der Einzelstrangbrüche direkt nach der Ischämie der der unbehandelten Kontrollgruppe entspricht. Ein signifikanter Anstieg der positiven Reaktion auf die ISNT konnte erst nach einer Rezirkulation von einer Stunde beobachtet werden. Nach einer vierstündigen Rezirkulation war die SSB-Rate wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe abgesunken. Es zeigt sich hier also, daß auch die Reperfusionsdauer einen deutlichen Einfluß auf die Einzelstrangbruchrate haben kann (Tobita et al., 1995).

In einer weiteren Studie untersuchten Chen et al. DNA-Strangbrüche in Rattenhirnen nach einer einstündigen Okklusion der Arteria cerebri media und verschiedenen Reperfusionsdauern über In situ DNA Polymerase I-vermittelte Biotin-dATP Nick-Translation (PANT, entspricht ISNT) und Terminale deoxynucleotidyl-Transferase-vermitteltes dUTP Nick end-labeling (TUNEL). SSB konnten hier mit PANT schon nach einer Minute Reperfusion nachgewiesen werden. Doppelstrangbrüche hingegen waren per TUNEL erst nach einer Stunde Reperfusion nachzuweisen (Chen et al., 1997). Verglichen mit bspw. der Studie von Tobita et al. (1995) zeigt sich hier allerdings auch nach 72 Stunden noch kein Rückgang der Menge an SSB. Dies kann durch verschiedene DNA-Reparatursysteme in den verschiedenen Hirnbereichen erklärt werden. In nicht-neuronalen Systemen wurde bereits beschrieben, daß SSB repariert werden können, aber unreparierte SSB Apoptose induzieren können (Spencer et al., 1989).

Die ISNT-Methode wird folglich in der Literatur als sensitive Methode zum Nachweis von SSB im Zusammenhang mit Apoptose beschrieben.

4.3. Weitere Methoden zum Nachweis verschiedener Apoptoseund Nekrosestadien

Der Nachweis von Einzelstrangbrüchen allerdings ist nur eine von zahlreichen Nachweismethoden des Zelltodes. Bei Huppertz et al. (1999) sind in einem Übersichtsartikel weitere Methoden zum Nachweis der verschiedensten während des Zelltodes auftretenden Phänomene zusammengestellt.

Die in der Einleitung schon kurz angesprochenen **Caspasen** - apoptose-spezifisch aktivierte Cystein-Aspartasen, die bestimmte Substrate zersetzen und damit weitere Reaktionen im Apoptoseverlauf auslösen - können per immunhistochemischer Färbung nachgewiesen werden. Die Caspasen bestehen aus einer Prodomäne und zwei katalytischen Domänen. Im frühen Verlauf der Apoptose wird auf einen apoptotischen Reiz hin die Prodomäne abgespalten, die beiden katalytischen Domänen werden getrennt und lagern sich danach zum heterodimeren, aktiven Enzym zusammen. Das Problem, das sich während dieser Methode ergibt, ist die Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven Caspaseformen. Es existieren wenige Antikörper, die eine bestimmte Sequenz in der Procaspase erkennen, die im aktiven Enzym aufgetrennt wird. Antikörper, die die katalytischen Untereinheiten erkennen, würden eine positive Reaktion sowohl mit der inaktiven als auch mit der aktiven Form hervorrufen. Eine Alternative zum Nachweis der Caspasen würde hier nur der Western Blot darstellen, in dem die Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt werden. Ein Antikörper gegen Caspase 9 (Firma Cell Signaling Inc.) erkennt bspw. Fragmente der Größen 17, 35, 37 und 47 kDa, der korrespondierende Antikörper gegen die gespaltene, also aktive Caspase erkennt nur ein Fragment von 37 kDa Größe.

Aktivierung von Caspasen im Verlauf der Apoptose führt zur Zerstörung von Zytoskelettbestandteilen und damit zum Schrumpfen der Membran und Ausstülpen von kleinen **Membranbläschen** (sog. membrane blebbing). Diese Bläschen können bisher nur über Transmissions-Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Außerdem birgt diese Methode isoliert betrachtet die Fehlerquelle, daß Membranbläschen auch zeitweise während der Mitose gebildet werden (Laster et al., 1996), diese Bläschen allerdings im Gegensatz zu den apoptotischen F-Aktin enthalten. Eine weitere Methode ist der Nachweis der Spaltprodukte der Caspase-Substrate, so z.B. von **Cytokeratin 18**, einem Bestandteil der Intermediärfilamente. Kommerziell erwerbliche monoklonale Antikörper (bspw. "M30 Cyto Death", Firma Roche), die spezifisch diese Spaltprodukte erkennen und zur immunhistochemischen Färbung eingesetzt werden können.

Das Enzym **PARP** (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) ist an der DNA-Reparatur beteiligt. Wird diese von den Caspasen zerlegt, so wird die Reparatur von DNA-Schäden erschwert, es kommt zunehmend zur Zerstörung des Erbmaterials in den Zellkernen. Es gibt auch für PARP spezifische Antikörper (Cell Signaling Inc. Roche), die im Western-Blot das entstandene 89kDa-Fragment von dem ungespaltenen Gesamtprotein (116 kDa) unterscheiden.

Letztendlich laufen viele dieser Ereignisse auf die Zerstörung der DNA hinaus, sei es passiv durch die Verhinderung der DNA-Reparatur oder aktiv durch die Aktivierung von Nukleasen. Zerstörte DNA kann entweder durch die oben beschriebene und in dieser Arbeit verwendete ISNT-Methode, oder aber durch die **TUNEL**-Methode (s. Einleitung, Abschnitt 1.2.2) nachgewiesen werden.

Darüber hinaus kann die **DNA-Fragmentierung** auch über die Agarose-Gelelektrophorese dargestellt werden (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.2.2).

Das folgende Übersichtsschema zeigt die zeitliche Abfolge und den Zusammenhang der oben beschriebenen Methoden:



Abb. 4.1.: Nachweis ausgewählter Schritte der Apoptose. Die für die beschriebenen Methoden relevanten Apoptosephasen sind dargestellt und die entsprechenden Schritte, zu denen Nachweismethoden vorhanden sind, nummeriert: 1) immunhistochemischer bzw. Western-Blot-Nachweis von aktiven Caspasen. 2) Mikroskopischer Nachweis von Membranbläschen. 3) Immunhistochemischer Nachweis der Zersetzung von Cytokeratin 18 durch Caspasen. 4) Western-Blot-Nachweis der Zersetzung des Enzyms PARP durch Caspasen. 5) Nachweis der DNA-Degradation über TUNEL bzw. ISNT (verändert nach Huppertz et al., 1999).

4.4. Zelltod in der Reperfusionsphase: Apoptose oder Nekrose?

Bereits 1987 faßten Simpson und Lucchesi Studien zusammen, die zeigten, daß während myokardialer Ischämie und besonders während der Phase der Reoxygenierung Verletzungen des Myokards zu beobachten sind. In diesem Artikel wird der Begriff der Reperfusionsverletzung (reperfusion injury) aufgeworfen. Dies wurde als irreversible zelluläre Schädigung durch Nekrose definiert, die durch die Wiedereinführung von molekularem Sauerstoff in die ischämischen Bereiche entsteht. Als Ursachen dafür werden u.a. ein vermehrter Calciumeinstrom in membrangeschädigte Zellen, der Einstrom von Entzündungszellen oder auch die Bildung von O₂-stämmigen freien Radikalen angeführt. Der Zelltod durch die Reperfusionsverletzung wurde hier als Nekrose bezeichnet. Es wurde allerdings nicht weiter darauf eingegangen, ob es sich hierbei wirklich um Nekrose, wie nur kurz erwähnt wurde, oder eventuell auch um Apoptose handeln kann (Simpson und Lucchesi, 1987).

Kajstura et al. untersuchten am Rattenherzen, in welchen Zeiträumen sich Apoptose oder Nekrose im Herzmuskel nach einer Verengung (genauer prozentualer Wert der Volumenstromreduktion nicht angegeben) der linken Koronararterie manifestieren und auf welche Bereiche des Herzens dies limitiert ist (linker bzw. rechter Ventrikel oder Septum). Die Tiere wurden 45 Minuten, 3 Stunden, einen Tag, 6 Tage bzw. 12 Tage nach Setzen der Stenose euthanasiert. Die Apoptose wurde dabei mit einer TUNEL-Reaktion, über DNA-Gelelektorphorese und konfokale Mikroskopie untersucht, die Nekrose über eine immunhistochemische Färbung des Myosins im Zytoplasma. Dabei stellte sich heraus, daß beide Formen des Zelltodes 45 Minuten nach Setzen der Arterienverengung beobachtet werden konnten. Die Nekrose erreichte dabei ihr Maximum einen Tag, die Apoptose hingegen 6 Tage nach der Instrumentierung. 12 Tage nach der Behandlung konnte nur noch Nekrose, aber keine Apoptose mehr beobachtet werden. Dabei konnte im gesamten Herzen Nekrose nachgewiesen werden, wohingegen die Apoptose auf den linken Ventrikel und das Septum beschränkt war. Interessanterweise war immer quantitativ mehr Nekrose als Apoptose zu beobachten: auf dem Höhepunkt des Zelltodes konnte im linken Ventrikel 52-mal, und im Septum 33-mal mehr Nekrose als Apoptose nachgewiesen werden. Kajstura et al. stellten darauf basierend die Hypothese auf, daß die Nekrose der vorherrschende Mechanismus des Zelltodes im Herzen ist, dessen Blutzufluss zum Myokard akut verringert ist, wohingegen die Apoptose den allgemeinen Verlust von Myozyten im ischämischen Herzen verursacht. Es wird allerdings auch darauf hingewiesen, daß die verwendeten Methoden eventuell Fehlerquellen bergen: die TUNEL-Methode erkennt nur frühe Stadien der Apoptose und die Myosin-Antikörper-Färbung detektiert nur späte Nekrosephasen. Da über die Dauer dieser beiden Prozesse in Myozyten allerdings noch nicht viel bekannt ist, kann es sein, daß dies die Ergebnisse verfälschen kann (Kajstura et al., 1996, Kajstura et al., 1998).

Ein weiterer Ubersichtsartikel von Bartling et al. beschäftigt sich mit Apoptose und Nekrose im postischämischen Herzmuskel. Hier wird allerdings deutlich gemacht, daß es nicht sinnvoll ist, eine strikte Trennung von Apoptose und Nekrose anzustreben, sondern daß es eher notwendig ist, beide Mechanismen vollständig zu verstehen und zu betrachten. Nähme man die Studien der vergangenen Jahre zusammen, so zeige sich, daß im Zentrum der ischämischen Myokardbereiche der Myozytenzelltod hauptsächlich nach Nekrosemustern abläuft, wobei nur sehr wenige apoptotische Merkmale zu verzeichnen sind. In den akut gedehnten aber vitalen Randbereichen der infarzierten Bereiche allerdings ist hauptsächlich Apoptose zu beobachten, wobei aber auch in seltenen Fällen zytosolisches Material nachgewiesen werden konnte (Nekrosemerkmal). In den Randbereichen kann vor allem während der Reperfusion Apoptose beobachtet werden. Zitiert wird hierzu u.a. die Untersuchung von Saraste et al. (1997), in der die Autoren mit einer TUNELähnlichen Methode apoptotische Myozyten vor allem in den Randbereichen nachweisen konnten (Bartling et al, 1998).

Die Studie von Jeremias et al. zeigt deutlich, daß besonders in der Phase der Reperfusion apoptoserelevante Marker nachgewiesen werden, so z.B. die sog. DILs (*death inducing ligands*), dazu gehört u.a. CD95 *ligand* (Fas *ligand*). Diese Liganden werden im Falle von Zellstreß durch spezifische Enzyme von der Zellmembran gelöst und können an ihre spezifischen Rezeptoren (in diesem Fall CD95) binden. Diese Bindung läutet weitere Apoptosereaktionen ein. Als weitere Bestätigung dieser Ergebnisse zeigte sich, daß isolierte Herzen von CD95-knockout-Mäusen eine deutlich verringerte Zelltodrate nach Ischämie und Reperfusion zeigten als die untersuchten Herzen von Wildtypmäusen (Jeremias et al., 2000).

Die dargestellte Entwicklung der Untersuchungen zum Zelltod während der Ischämie und der Reperfusion bei Koronarstenose (Myokardinfarkt) zeigt also, daß bis heute nicht genau eingegrenzt werden kann, welchen genauen zeitlichen Ablauf und welche quantitative und räumliche Verteilung die beiden Typen des Zelltodes einnehmen. Es scheint während der Ischämie die Nekrose im zentralen infarzierten Bereich vorzuherrschen, wohingegen während der Reperfusion weiter im Randbereich gelegene Myozyten durch den programmierten Zelltod, die Apoptose, absterben.

Eine interessante Erklärung hierfür liefert die Studie von Leist et al., in der in einem Zellkulturmodell zuerst die intrazellulären ATP-Speicher durch Oligomycin, das die mitochondriale ATP-Synthese hemmt, geleert wurden und die Zellen dann spezifischen Apoptosetriggern (Staurosporin bzw. Anti-CD95-Antikörper) ausgesetzt wurden. Es stellte sich hierbei heraus, daß die Zellen in den nekrotischen Zelltod übergehen. Wird den Zellen allerdings wieder ermöglicht, über die Glykolyse ATP herzustellen, so kann der programmierte Zelltod durch Apoptose beobachtet werden. Die Autoren stellen die Hypothese auf, daß Apoptose und Nekrose zwei Extreme eines kontinuierlichen Ablaufs des Zelltodes sind, und daß die jeweilige ATP-Verfügbarkeit und damit das Vorhandensein von Zellenergie über den letztendlichen Ablauf entscheidet (Leist et al., 1997).

4.5. Kritische Betrachtung der Ergebnisse der In Situ Nick Translation

4.5.1. Problem der Kontrollgruppe

Ein Problem dieser Arbeit stellt sicherlich die Wahl der Kontrollgruppe dar. Gewählt wurden hier Tiere, die ebenfalls einer 90% igen Stenose unterzogen wurden, aber keine HBOC-201-Infusion erhielten. Statt dessen wurden sie im ersten Versuchsteil vor der Stenose mit HES und nach der Stenose mit Ringerlösung infundiert.

Es wäre hier vielleicht sinnvoll gewesen, zusätzlich eine komplett unbehandelte Tiergruppe als Kontrolle ("sham control") heranzuziehen, um auch basale, endogene DNA-Schäden mit in die Betrachtung aufzunehmen.

Jeden Tag treten tausende von DNA-Einzelstrangbrüchen pro Zelle auf. Diese entstehen entweder durch reaktive Sauerstoffspezies, andere genotoxische Stubstanzen, durch Desintegration defekter Zuckermoleküle oder Entfernen defekter Basen (Caldecott, 2001). Die meisten dieser physiologischen DNA-Einzelstrangbrüche werden per Exzisionsreparatur ("BER": base excision repair; Norbury et al., 2001) wieder entfernt. Die entstandenen Lücken werden dann durch die Enzyme DNA-Polymerase und DNA-Ligase wieder aufgefüllt. Größere Schäden können allerdings entstehen, wenn es zur Replikation dieser geschädigten DNA-Bereiche kommt. Normalerweise wird das verhindert, denn zur Ausbildung der Replikationsgabel ist eine bestimmte Struktur ("negative supercoiled") der DNA notwendig, die im Falle eines Einzelstrangbruches nicht mehr gewährleistet ist. Manchmal kommt es allerdings doch zur Weiterführung der Replikation an dieser Stelle, wodurch ein Doppelstrangbruch entstehen kann (Kuzminov, 2001). Dieser kann nicht so einfach repariert werden wie ein Einzelstrangbruch, hier ist der wesentlich kompliziertere Vorgang der homologen Rekombination notwendig (Norbury et al., 2001). Manchmal kommt es auch zur nichthomologen Wiederverknüpfung von Doppelsträngen, wobei unwiederbringlich genetische Information verloren geht, was zu einem pathologischen Zustand führen kann (Kuzminov, 2001).

In zwei Studien von Newton et al. aus dem Jahre 1989 wurde der Zusammenhang von Lebensalter und DNA-Einzelstrangbruchrate untersucht. Hierbei stellte sich heraus, daß bei der Hausfliege *Musca domestica* kein signifikanter Unterschied der DNA-Einzelstrangbruchraten zwischen Gruppen höherer und niedrigerer Lebenserwartung festzustellen war. Interessant war hier allerdings, daß die Tiere mit der geringeren Lebenserwartung eine größere Anfälligkeit für exogen (γ -Strahlung) erzeugte Einzelstrangbrüche aufwiesen, was auf schlechtere DNA-Reparatursysteme dieser Population zurückgeführt wurde (Newton et al., 1989a). In der zweiten Studie wurde festgestellt, daß bei den untersuchten Fliegen die DNA-Schäden nicht der kausale Faktor für den Alterungsprozess darstellen, da auch bei 23 Tage alten Fliegen nicht signifikant mehr Einzelstrangbrüche gefunden wurden als in 3 Tage alten Tieren. Es wurde aber auch festgestellt, daß ältere Tiere eine höhere Suszeptibilität für Einzelstrangbrüche aufweisen, was auf eine im Alter veränderte Chromatinstruktur zurückgeführt wurde (Newton et al., 1989b). Es gibt auch eine Reihe von Untersuchungen, die einen starken Einfluß von Umweltfaktoren auf die DNA-Einzelstrangbruchrate feststellten. So z.B. die Untersuchung von Reitz et al. (1993) die zeigte, daß das Personal einer Onkologiestation, die permanent dem Kontakt mit Zytostatika ausgesetzt waren, eine höhere Einzelstrangbruchrate aufwies als die Kontrollgruppe (Reitz et al., 1993). Eine ähnliche Studie befaßte sich mit Anästhesisten, die permanent in Kontakt Inhalationsanästhetika standen. Auch hier ließ sich eine höhere DNA-Einzelstrangbruchrate als in der Kontrollgruppe zeigen (Reitz et al., 1994). In allen Gruppen wurden Raucher und Nichtraucher untersucht, wobei sich herausstellte, daß das Rauchen die DNA-Einzelstrangbruchrate sowohl in den Versuchs- als auch in den Kontrollgruppen steigerte.

Quelle des DNA Schadens Art des Schadens Strahlung UV ssB ionisierende (Röntgen, y) dsB Chemikalien alkylierende Stoffe ss Beschädigung Bleomycin, O₂-Radikale dsB und ssB Replikationsfehler ss Mismatches, Deletionen und Insertionen endogene DNA-Enzymfehler V(D)J Rekombination ssB und dsB "class switch" Rekombination dsB andere Enzyme ssB und dsB

Die folgende Tabelle stellte noch einmal Quellen und die daraus resultierende Art der DNA-Schäden zusammen:

Tab. 4.1.: Quelle und Art von natürlich auftretenden DNA-Schädigungen. Verändert nach Lieber, 1998.

Die dargestellten Fakten belegen, daß es eine Vielzahl von Faktoren gibt, die endogene DNA-Schäden bedingen können. Es wäre also wichtig, eine komplett unbehandelte Tiergruppe zur Kontrolle heranzuziehen, um diesen basalen Schädigungsgrad festzustellen und in die Auswertung mit einbeziehen zu können. Trotzdem erlaubt die vorliegende Studie den Gruppenvergleich.

4.5.2. Zeitfenster

Die Aussagekraft einer der vorliegenden Untersuchung vergleichbaren Studie könnte weiterhin erhöht werden, wenn Proben zu verschiedenen Zeiten nach der Stenosierung bzw. Reperfusion isoliert würden.

Alle Tiere wurden nach Beseitigung der Stenose (120min) noch 20 min reperfundiert und dann euthanasiert. Aus der oben zitierten Literatur (Simpson und Lucchesi, 1987; Jeremias et al., 2000) geht aber deutlich hervor, daß die Reperfusionsdauer einen entscheidenden Einfluß auf den Zelltod in den postischämischen Bereichen nimmt. Es ergäben sich daher mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit weitere wichtige Informationen, wenn direkt nach Lösen der Stenose und in verschiedenen Zeitabständen nach Beginn der Reperfusion Proben entnommen würden. Hierfür müßten verschiedene Gruppen von Tieren zu definierten Zeitpunkten euthanasiert werden, was allerdings die Zahl der Versuchstiere deutlich erhöhen würde.

Ein gutes Beispiel für einen solchen Versuchsaufbau liefert die Studie von Black et al. (1998), bei der die linke Koronararterie von Ratten für eine Zeitspanne von 45min okkludiert wurde (keine Angabe über den genauen Werte der Volumenstromreduktion). Die Tiere wurden dann nach 0; 60; 120 bzw. 180min Reperfusion euthanasiert und verschiedenen molekularbiologischen Untersuchungen unterzogen. Hierbei wurde die DNA-Zersetzung per TUNEL-Reaktion und über Agarosegelelektrophorese ("DNA-laddering") untersucht, zusätzlich wurde ein Antiserum für die Immunfluoreszenz eingesetzt, das die Caspase 3 nur nach einem apoptotischen Reiz, also in ihrer aktiven Form, erkennt (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). In der nicht-ischämischen Kontrolle konnten keine TUNEL-positiven Zellen nachgewiesen werden; ebenso blieb die interventrikuläre septale Region frei von TUNEL-positiven Zellen.

Nach 45min Stenose ohne Reperfusion fanden sich wenige TUNEL-positive Zellen, während im Rahmen der Reperfusion, die bis zu drei Stunden andauerte, ein deutlicher Anstieg der Zahl an positiven Zellen zu verzeichnen war. Ebenso stieg die internukleosomale Spaltung von DNA, nachgewiesen mit DNA-laddering, proportional mit steigender Reperfusionszeit an. Eine Caspase-3 Immunreaktion wurde bereits nach 45min Stenose beobachtet, in der Phase der Reperfusion allerdings wurde diese Reaktion noch einmal wesentlich deutlicher.

Diese Studie zeigt, daß es wichtig ist, die Ergebnisse nach unterschielichen Reperfusionszeiten miteinander zu vergleichen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde keine Endpunktmessung durchgeführt, sondern mit der *In Situ* Nick Translation ein dynamisches Phänomen nachgewiesen. In verschiedenen Studien wurden Reperfusionszeiten bis zu einigen Tagen untersucht, wobei man allerdings auch wieder beachten muß, daß in so einer langen Zeitspanne schon wieder endogene Reparaturmechanismen greifen könnten. Daher erscheint es zunehmend wichtig, verschiedene Methoden parallel anzuwenden, die wiederum verschiedene Teilvorgänge eines komplex strukturierten biologischen Prozesses visualisieren (vgl. 4.3.).

4.5.3. Problem der Probenlokalisierung

Einen weiteren zu beachtenden Punkt der vorliegenden Arbeit stellt die Lokalisation der entnommenen und hier untersuchten Proben dar. Hierbei ist es wichtig, exakt definierte Bereiche ischämischer Areale zu entnehmen. Gerade das Septum ist hier als problematisch einzustufen, da es sowohl von der linken als auch von der rechten Koronararterie versorgt wird. Darüber hinaus sind wahrscheinlich auch bei Hunden die verschiedenen Formen von Versorgungstypen (Normalversorgungstyp, Linksversorgungstyp, Rechtsversorgungstyp) von Bedeutung (siehe 1.3.2.) und dass das Hundeherz eine bekanntermaßen gute Kollateralisierung der Koronarien aufweist.

In der Studie von Black et al. (1998) wurde festgestellt, daß eine Caspase-3 Immunreaktion im gesamten ischämischen und reperfundierten Bereich nachgewiesen werden konnte. Die innere Region des linken Ventrikels hatte allerdings keine prominente Caspase-3 Reaktivität. Die endokardiale Region des linken Ventrikels unterliegt anscheinend nicht den gleichen pro-apoptotischen Reizen, die in anderen Regionen des ischämischen Herzens zur positiven Caspase-3 Reaktivität geführt haben. Vielleicht wurden daher mehr Nekrosen im Endokardbereich (Black et al., 1998). Es erscheint also sinnvoll, genau definierte Bereiche des Herzens zu untersuchen und auch die einzelnen Teile (linker Ventrikel, Septum, rechter Ventrikel) noch einmal in verschiedene Bereiche einzuteilen, bspw. in endo-, peri- und epikardiale Zonen. Diese verschiedenen Proben müßten dann noch einmal untereinander verglichen werden.

4.5.4. Kritische Betrachtung der statistischen Auswertung

Aufgrund der geringen Zahl der Tiere pro Gruppe ist die Benutzung einiger gängiger statistischer Verfahren nicht erlaubt, die auch bei geringen Unterschieden in den betrachteten Merkmalen eine statistisch signifikante Trennung der Gruppen ermöglicht hätten. U.a. wäre eine Aussage über die Verteilung der Grundgesamtheit möglich.

Die durchgeführten Untersuchungen könnten die Basis für eine größere Versuchsserie oder gar eine probeweise Adaptation an menschliche Verhältnisse darstellen. Ein p-Wert von 5% ist nicht in jedem Fall sinnvoll: Man wünscht nicht unbedingt die geringe Irrtumswahrscheinlichkeit - also die Wahrscheinlichkeit " α " die Hypothese abzulehnen obwohl diese richtig ist - von 5%, sondern nimmt eine größere Irrtumswahrscheinlichkeit in Kauf um z.B. die geringe Fallzahl auszugleichen: Der unterstellte Zusammenhang sollte dann bei einem positiven Entscheid durch eine größere Untersuchung bestätigt werden. Somit wäre es also sinnvoller die Irrtumswahrscheinlichkeit über 5% auf 10% oder gar 20% hinaufzusetzen.

Mit der in situ-Nick Translation werden über die Autoradiographie DNA-Einzelstrangbrüche visualisiert. Die optische Dichte der Autoradiographien ist eine *Proxy*-Variable für die in diesem Versuch gemessenen hämodynamischen Parameter: Je größer die optische Dichte, desto größer die Zahl der Einzelstrangbrüche. Die optische Dichte ist eine Proxy-Variable für die hämodynamischen Verhältnisse.

Eine Proxy-Variable dient eigentlich der Erfassung eines Vorgangs, den man mittels einer direkten Variable nicht oder nur unter sehr großem Aufwand erfassen kann. Grundsätzlich muß man davon ausgehen, daß Proxy-Variablen die Genauigkeit von Modellen verringern. Man darf jedoch nicht vergessen, daß es Probleme gibt, die man ohne Proxy-Variablen gar nicht erfassen bzw. bearbeiten könnte.

Selbstverständlich gibt es auch Probleme, bei denen die Erfassung der Proxy-Variable aufgrund von meßtechnischen Gegebenheiten sehr viel genauer durchgeführt werden kann, als dies bei der Erfassung der eigentlich interessierenden Variable möglich ist. Die gemessenen hämodynamischen Parameter geben die Verhältnisse auf der makroskopischenen Ebene wieder. Der Zustand der einzelnen Zellen, also die mikroskopische Ebene, bleibt ist für die heutigen hämodynamischen Messungen nicht erfaßbar.

4.6. Ausblick

In künftigen Untersuchungen mit vergleichbaren Fragestellungen sollten z.B. kleinere Versuchstiere wie Ratten gewählt werden, um die Anzahl der Versuchstiere erhöhen zu können.

Die Aufteilung der Tiere könnte dabei in 5 Gruppen erfolgen:

- Therapiegruppe (wie in der vorliegenden Arbeit)

- Prophylaxegruppe (wie in der vorliegenden Arbeit)

- Kontrollgruppe 1 (komplett unbehandelt, "sham control")

- Kontrollgruppe 2 (instrumentiert und anästhesiert, keine Stenose aber Infusion mit Ringerlösung bzw. HES)

- Kontrollgruppe 3 (wie Kontrollgruppe 2 aber mit Stenose)

Durch die verschiedenen Kontrollgruppen könnte gezeigt werden, welche Schritte im Versuchsaufbau Einfluß auf die DNA-Einzelstrangbruchrate haben und daß nicht die Grundbehandlung diese Werte verändert.

Die Reperfusionsphase sollte verlängert, im Extremfall sogar bis auf mehrere Tage ausgedehnt werden. Dadurch wäre dann gezeigt, welchen zeitlichen Verlauf die DNA-Einzelstrangbruchrate in der postischämischen Phase zeigt. Denkbar wäre ein Zeitraster von 0; 1; 2; 3; 4; 8; 12; 24; 48; 72 Stunden o.ä.. Die hier beschriebenen Vorschläge würden allerdings die Zahl der Versuchstiere immens erhöhen. Das Experiment müßte dann voraussichtlich in verschiedenen Durchgängen durchgeführt werden, was Schwankungen bedingen könnte. Diese Überlegungen gilt es vor einem solchen Versuch gegeneinander abzuwägen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der ultragereinigten bovinen Hämoglobinlösung HBOC-201 auf das poststenotische Myokard im Tiermodell an 20 Foxhounds untersucht. Die Prophylaxe-Gruppe (Gr.3) erhielt dabei HBOC-201 vor Anlage der artefiziellen Koronarstenose, die Therapie-Gruppe (Gr.2) wurde nach Anlage der Stenose mit HBOC-201 infundiert. Die Kontroll-Gruppe (Gr.1) erhielt lediglich Infusionen mit HES und Ringerlösung. Intraoperativ wurden die hämodynamischen Werte, die Gewebsoxygenierung des Myokards und dessen Verhalten in der subdiafragmalen Echokardiographie (SDE) untersucht. Weiterhin wurden die Myokard-Gewebeproben histopathologische auf myofibrilläre Degeneration und auf DNA-Einzelstrangbrüche im Rahmen des Zelltodes untersucht.

Der Zelltod im Myokard der Versuchstiere wurde mit Hilfe der Methode der In Situ Nick Translation (ISNT) untersucht. Bei dieser Methode werden radioaktiv markierte Nukleotide ([H³]dTTP) durch die *E. coli*-DNA-PolymeraseI in DNA-Einzelstrangbrüche ("nicks"), die im Rahmen des Zelltodes entstehen, eingebaut. Der Einbau dieser Nukleotide wurde autoradiographisch ausgewertet, wobei der Grad der Schwärzung des Röntgenfilmes proportional zum Ausmaß der DNA-Schädigung ist. Dieses wurde quantitativ über die Densitometrie mit der entsprechenden Software ausgewertet. Es folgte die statistische Analyse der Ergebnisse mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney Tests.

Die während des Tierversuchs gemessenen Werte der Gewebsoxygenierung des Myokards sowie die histopathologischen Ergebnisse wurden ebenfalls mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney Test ausgewertet. Die statistische Auswertung der Ergebnisse zur Hämodynamik, zum O₂-Transport im Myokard und die Ergebnisse der SDE erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests mit Scheffés Rank Test.

Die ISNT-Untersuchung ergab, daß die Prophylaxe-Gruppe im linken Ventrikel signifikant weniger (p<0,05) DNA-Einzelstrangbrüche aufwies als die Kontroll- und die Therapie-Gruppe.

Durch die Transfusion von HBOC-201 stiegen die Sauerstoffextraktion bzw. der tpO₂ im Myokard gegenüber mit HES behandelten Tieren signifikant an; die präventive Gabe von HBOC-201 konnte dabei eine tpO₂-Reduktion im Myokard verhindern. Auch die im SDE analysierten Wandbeweglichkeitsstörungen des Myokards waren unter HBOC-201-Gabe deutlich geringer als die der Kontroll-Gruppe, wobei auch hier die präventive Gabe von HBOC-201 effektiver war als die therapeutische.

Die histopathologische Untersuchung der Gewebeproben der drei Versuchstiergruppen wies ebenfalls die Prophylaxe-Gruppe als die am geringsten geschädigte aus. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, daß insbesondere die prophylaktische Gabe von HBOC-201 vor Anlage einer artefiziellen Koronarstenose unter akuter

Anämie die Schädigung des Myokards deutlich verringern kann.

6. Literaturverzeichnis

Amberson, W. R., Jennings, J. J., and Martin, R. (1949). Clinical experience with hemoglobine-saline solutions, J Appl Physiol *1*, 469-89.

Amberson, W. R., Mulder, A. G., Steggerda, F. R., Flexner, J., and Pankratz, D. S. (1933). Mammalian life without red blood corpuscles, Science *78*, 2014-15.

Arnold, G., Kaiser, C., and Fischer, R. (1985). Myofibrillar degeneration - a common type of myocardial lesion and its selective identification by a modified luxol fast blue stain., Pathol Res Pract *180*, 405-415.

Bartling, B., Holtz, J., and Darmer, D. (1998). Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction?, Basic Res Cardiol *93*, 71-84.

Benninghoff, A. (1994). Anatomie. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen, Vol 1 (München Wien Baltimore, Urban & Schwarzenberg).

Biro, G. P., Taichman, G. C., Lada, B., Keon, W. J., Rosen, A. L., and Sehgal, L. R. (1988). Coronary vascular actions of stroma-free hemoglobin preparations, Artif Organs *12*, 40-50.

Black, S. C., Huang, J. Q., Rezaiefar, P., Radinovic, S., Eberhart, A., Nicholson, D. W., and Rodger, I. W. (1998). Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat, J Mol Cell Cardiol *30*, 733-742.

Böcker, W., Denk, H., and Heitz, P. U. (1997). Pathologie (München Wien Baltimore, Urban & Schwarzenberg).

Bosman, R. J., Minten, J., Lu, H. R., Van Aken, H., and Flameng, W. (1992). Free polymerized hemoglobin versus hydroxyethyl starch in resuscitation of hypovolemic dogs, Anesth Analg *75*, 811-7.

Caldecott, K. W. (2001). Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair, Bioessays 23, 447-55.

Chen, J., Jin, K., Chen, M., Pei, W., Kawaguchi, K., Greenberg, D. A., and Simon, R. P. (1997). Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death, J Neurochem *69*, 232-45.

Classen, M., Diehl, V., and Kochsiek, K. (1998). Innere Medizin (München Wien Baltimore, Urban & Schwarzenberg).

Ebner, E., Birkigt, H. G., Riedel, E., Sedlarik, K., and Fritzsche, L. (1983). [Perfusion of the ischemic myocardium in the acute phase of a myocardial ischemia using a stroma-free hemoglobin solution], Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe *16*, 292-300.

Feola, M., Simoni, J., Canizaro, P. C., Tran, R., Raschbaum, G., and Behal, F. J. (1988). Toxicity of polymerized hemoglobin solutions, Surg Gynecol Obstet *166*, 211-22.

Furchgott, R. F., and Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, Nature *288*, 373-6.

GISSI (1986). Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISSI)., Lancet *1(8478)*, 397-402.

Gold, R., Schmied, M., Rothe, G., Zischler, H., Breitschopf, H., Wekerle, H., and Lassmann, H. (1993). Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections, J Histochem Cytochem *41*, 1023-30.

Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., and Engler, R. L. (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes, J Clin Invest *94*, 1621-8.

Graf, U., Henning, H. J., and Stange, K. (1987). Formeln und Tabellen der angewandten mathematischen Statistik (Hamburg, Springer Verlag GMBH &CO KG).

Grech, E. D., Jackson, M. J., and Ramsdale, D. R. (1995). Reperfusion injury after acute myocardial infarction, Bmj *310*, 477-8.

Hamilton, P. B., Farr, L. E., Hiller, A., and van Slyke, D. D. (1947). Preparation of hemoglobin solutions for intravenous infusion, J Exp Med *86*, 455-63.

Harringer, W., Hodakowski, G. T., Svizzero, T., Jacobs, E. E., Jr., and Vlahakes, G. J. (1992). Acute effects of massive transfusion of a bovine hemoglobin blood substitute in a canine model of hemorrhagic shock, Eur J Cardiothorac Surg *6*, 649-54.

Heiss, M. M., Mempel, W., Jauch, K. W., Delanoff, C., Mayer, G., Mempel, M., Eissner, H. J., and Schildberg, F. W. (1993). Beneficial effect of autologous blood transfusion on infectious complications after colorectal cancer surgery, Lancet *342*, 1328-33.

Holtz, J., and Heinrich, H. (1999). [Apoptosis--what is it? Significance in coronary heart disease and myocardial infarct], Herz 24, 196-210.

Horn, E. P. (2000) Hämodynamik und Gewebsoxygenierung während artifizieller Koronarstenose unter Hämodilution mit bovinem Hämoglobin, Habilitationsschrift, Universität Hamburg, Hamburg.

Horn, E. P., Standl, T., Wilhelm, S., Jacobs, E. E., Freitag, U., Freitag, M., and Schulte am Esch, J. (1997). Bovine hemoglobin increases skeletal muscle oxygenation during 95% artificial arterial stenosis, Surgery *121*, 411-8.

Horn, E. P., Standl, T., Wilhelm, S., Jacobs, E. E., Freitag, U., Freitag, M., and Schulte am Esch, J. (1998). [Bovine hemoglobin. HBOC-201 causes a reduction of the oxygen partial pressure in poststenotic skeletal muscle], Anaesthesist *47*, 116-23.

Hughes, G. S., Jr., Francome, S. F., Antal, E. J., Adams, W. J., Locker, P. K., Yancey, E. P., and Jacobs, E. E., Jr. (1995). Hematologic effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in normal male and female subjects, J Lab Clin Med *126*, 444-51.

Huppertz, B., Frank, H. G., and Kaufmann, P. (1999). The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization, Anat Embryol (Berl) *200*, 1-18.

Iseki, S. (1986). DNA strand breaks in rat tissues as detected by in situ nick translation, Exp Cell Res *167*, 311-26.

Jeremias, I., Kupatt, C., Martin-Villalba, A., Habazettl, H., Schenkel, J., Boekstegers, P., and Debatin, K. M. (2000). Involvement of CD95/Apo1/Fas in cell death after myocardial ischemia, Circulation *102*, 915-20.

Kajstura, J., Cheng, W., Reiss, K., Clark, W. A., Sonnenblick, E. H., Krajewski, S., Reed, J. C., Olivetti, G., and Anversa, P. (1996). Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats, Lab Invest *74*, 86-107.

Kajstura, J., Liu, Y., Baldini, A., Li, B., Olivetti, G., Leri, A., and Anversa, P. (1998). Coronary artery constriction in rats: necrotic and apoptotic myocyte death, Am J Cardiol *82*, 30K-41K.

Kasper, S. M., Walter, M., Grune, F., Bischoff, A., Erasmi, H., and Buzello, W. (1996). Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery, Anesth Analg *83*, 921-7.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br J Cancer *26*, 239-57.

Krause, T., Tonner, P. H., Scholz, J., Paris, A., von Knobelsdorf, G., Tuszynski, S., and Schulte am Esch, J. (2000). Autoradiographischer Nachweis von DNA Einzelstrangbrüchen im Hirngewebe. Ein früher Marker für zerebrale Ischämie und Hypoxie., Aasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther *35*, 603-605.

Kühnl, P., Loliger, C., and Laufs, R. (1994). [Risk of infection caused by homologous blood transfusion], Chirurg *65*, 1071-4.

Kuzminov, A. (2001). Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double- strand breaks, Proc Natl Acad Sci U S A *98*, 8241-6.

LaMuraglia, G. M., O'Hara, P. J., Baker, W. H., Naslund, T. C., Norris, E. J., Li, J., and Vandermeersch, E. (2000). The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution, J Vasc Surg *31*, 299-308.

Laster, S. M., and Mackenzie, J. M., Jr. (1996). Bleb formation and F-actin distribution during mitosis and tumor necrosis factor-induced apoptosis, Microsc Res Tech *34*, 272-80.

Lee, R., Atsumi, N., Jacobs, E. E., Jr., Austen, W. G., and Vlahakes, G. J. (1989). Ultrapure, stroma-free, polymerized bovine hemoglobin solution: evaluation of renal toxicity, J Surg Res *47*, 407-11.

Leist, M., Single, B., Castoldi, A. F., Kühnle, S., and Nicotera, P. (1997). Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis, J Exp Med *185*, 1481-1486.

Liard, J. F., and Kunert, M. P. (1993). Hemodynamic changes induced by low blood oxygen affinity in dogs, Am J Physiol *264*, R396-401.

Lieber, M. R. (1998). Warner-Lambert/Parke-Davis Award Lecture. Pathological and physiological double-strand breaks: roles in cancer, aging, and the immune system, Am J Pathol *153*, 1323-32.

Lipfert, B., Standl, T., Dullmann, J., Helmchen, U., Schulte am Esch, J., and Lorke, D. E. (1999). Histology and ultrastructure of liver and kidney following blood exchange with ultrapurified, polymerised bovine hemoglobin in comparison with hydroxyethyl starch, Lab Invest *79*, 573-82.

Lucchesi, B. R. (1994). Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury, Arzneimittelforschung *44*, 420-32.

Mann, H. B., and Whitney, D. R. (1947). On the test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other, The Annals of Mathematical Statistics *18*, 50-60.

Newton, R. K., Ducore, J. M., and Sohal, R. S. (1989a). Effect of age on endogenous DNA single-strand breakage, strand break induction and repair in the adult housefly, Musca domestica, Mutat Res *219*, 113-20.

Newton, R. K., Ducore, J. M., and Sohal, R. S. (1989b). Relationship between life expectancy and endogenous DNA single-strand breakage, strand break induction and DNA repair capacity in the adult housefly, Musca domestica, Mech Ageing Dev *49*, 259-70.

Norbury, C. J., and Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage, Annu Rev Pharmacol Toxicol *41*, 367-401. NRC (1996). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Washington, D.C., National Academic Press).

Owen, D. B. (1962). Handbook of statistical tables (Reading, Mass., Addison-Wesley Publishing).

Pankuweit, S., Jobmann, M., Crombach, M., Portig, I., Alter, P., Kruse, T., Hufnagel, G., and Maisch, B. (1999). [Cell death in inflammatory heart muscle diseases-apoptosis or necrosis?], Herz 24, 211-8.

Pristoupil, T. I., Kramlova, M., Fricova, V., and Mosinger, B. (1986). Haemoglobin solutions: reversibly bound oxygen and its effect upon the hypoxic heart, Physiol Bohemoslov *35*, 193-8.

Reitz, M., Afghanyar, S., and Gutjahr, P. (1993). Increasing rates of DNA singlestrand breaks in lymphocytes of clinical personnel handling cytostatic drugs, J Cancer Res Clin Oncol *119*, 237-42.

Reitz, M., Coen, R., and Lanz, E. (1994). DNA single-strand breaks in peripheral lymphocytes of clinical personnel with occupational exposure to volatile inhalational anesthetics, Environ Res *65*, 12-21.

Rigby, P. W., Dieckmann, M., Rhodes, C., and Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I, J Mol Biol *113*, 237-51.

Salaskin, S., and Krinsky, J. (1931). Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper III B. Perfusionsversuche, Zeitsch Physiol Chemie *196*, 121-39.

Saraste, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Henriksen, K., Parvinen, M., and Voipio-Pulkki, L. M. (1997). Apoptosis in human acute myocardial infarction, Circulation *95*, 320-3.

Sharov, V. G., Sabbah, H. N., Shimoyama, H., Goussev, A. V., Lesch, M., and Goldstein, S. (1996). Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure, Am J Pathol *148*, 141-9.

Simpson, P. J., and Lucchesi, B. R. (1987). Free radicals and myocardial ischemia and reperfusion injury, J Lab Clin Med *110*, 13-30.

Spahn, D. R., Leone, B. J., Reves, J. G., and Pasch, T. (1994). Cardiovascular and coronary physiology of acute isovolemic hemodilution: a review of nonoxygen-carrying and oxygen-carrying solutions, Anesth Analg *78*, 1000-21.

Spencer, J. P., Jenner, A., Aruoma, O. I., Cross, C. E., Wu, R., and Halliwell, B. (1996). Oxidative DNA damage in human respiratory tract epithelial cells. Time course in relation to DNA strand breakage, Biochem Biophys Res Commun *224*, 17-22.

Standl, T. (1998a). [Hemoglobin solutions: volume replacement or oxygen therapy?], Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 33, 699-714.

Standl, T. (2000). Arificial Oxygen Carriers as Red Blood Cell Substitutes -Perfluorocarbons and Cell-Free Hemoglobin, Infusionsther Transfusionsmed *27*, 128-137.

Standl, T. (2001). Haemoglobin-based erythrocyte transfusion substitutes, Expert Opin Biol Ther *1*, 831-43.

Standl, T., Burmeister, M. A., Horn, E. P., Wilhelm, S., Knoefel, W. T., and Schulte am Esch, J. (1998b). Bovine haemoglobin-based oxygen carrier for patients undergoing haemodilution before liver resection, Br J Anaesth *80*, 189-94.

Standl, T., Horn, P., Wilhelm, S., Greim, C., Freitag, M., Freitag, U., Sputtek, A., Jacobs, E., and Schulte am Esch, J. (1996a). Bovine haemoglobin is more potent than autologous red blood cells in restoring muscular tissue oxygenation after profound isovolaemic haemodilution in dogs, Can J Anaesth *43*, 714-23.

Standl, T., Lipfert, B., Reeker, W., Schulte am Esch, J., and Lorke, D. E. (1996b). [Acute effects of complete blood exchange with ultra-purified hemoglobin solution or hydroxyethyl starch on liver and kidney in the animal model], Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther *31*, 354-61. Standl, T., Reeker, W., Redmann, G., Kochs, E., Werner, C., and Schulte am Esch, J. (1997a). Haemodynamic changes and skeletal muscle oxygen tension during complete blood exchange with ultrapurified polymerized bovine haemoglobin, Intensive Care Med *23*, 865-72.

Standl, T., Wilhelm, S., Horn, E. P., Burmeister, M., Gundlach, M., and Schulte am Esch, J. (1997b). [Preoperative hemodilution with bovine hemoglobin. Acute hemodynamic effects in liver surgery patients], Anaesthesist *46*, 763-70.

Takahashi, T., Iwasaki, K., Malchesky, P. S., Harasaki, H., Emoto, H., Goldcamp, J. B., Matsushita, M., Nose, Y., Rolin, H., 3rd, and Hall, P. (1991). Effects of single-dose infusion of pyridoxalated-hemoglobin- polyoxyethylene conjugate solution on canine renal function, Artif Organs *15*, 462-73.

Tartter, P. I. (1992). The association of perioperative blood transfusion with colorectal cancer recurrence, Ann Surg *216*, 633-8.

Tobita, M., Nagano, I., Nakamura, S., Itoyama, Y., and Kogure, K. (1995). DNA single-strand breaks in postischemic gerbil brain detected by in situ nick translation procedure, Neurosci Lett *200*, 129-32.

Van Furth, R., and Van Zwet, T. L. (1988). Immunocytochemical detection of 5bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells, J Immunol Methods *108*, 45-51.

Vermes, I., and Haanen, C. (1994). Apoptosis and programmed cell death in health and disease, Adv Clin Chem *31*, 177-246.

Vlahakes, G. J., Lee, R., Jacobs, E. E., Jr., LaRaia, P. J., and Austen, W. G. (1990). Hemodynamic effects and oxygen transport properties of a new blood substitute in a model of massive blood replacement, J Thorac Cardiovasc Surg *100*, 379-88.

Wilcoxon, F. (1945). Individual comparison by ranking methods, Biometrics Bulletin *1*, 80-83.

Wilcoxon, F., Katti, S. K., and Wilcox, R. A. (1973). Critical values and probability levels for the Wilcoxon Rank Sum Test and the Wilcoxon Signed Rank Test. In Selected Tables in Mathematical Statistics, H. L. Harter, and D. B. Owen, eds. (Providence, Rode Island, American Mathematical Society).

Wonnacott, T. H., Wonnacott, R.J. (1990). Introductory Statistics (New York, Chichester, John Wiley & Sons).

Woolson, R. F. (1987). Statistical methods for the analysis of biomedical data (New York, Chichester, John Wiley & Sons).

Wyllie, A. H. (1998). Cell death. In Apoptosis and Cell proliferation (Boehringer Mannheim).
7. Anhang

7.1. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung /	Seite	Bezeichnung
Tabelle		
Tab. 1.1.	3	Zusammensetzung von HES und HBOC-201
Abb. 1.1.	13	Frischer Myokardinfarkt
Abb. 1.2.	14	Schematische Querschnitte durch das Herz zur Darstellung der Ver-
		sorgungsgebiete der A. coronaria dextra (schwarz) und A. coronaria
		sinistra (weiß)
Abb. 1.3.	16	Schematische Darstellung der morphologischen Charakteristika der
		Apoptose
Abb. 1.4.	16	Schematische Darstellung der morphologischen Charakteristika der
		Nekrose
Tab. 1.2.	17	Unterschiede von Nekrose und Apoptose
Abb. 1.5.	19	Entwicklung der Apoptose-Veröffentlichungen pro Jahr 1972-2000.
Tab. 2.1.	22	Gemessene Parameter
Tab. 2.2.	23	Errechnete Parameter
Abb. 2.1.	24	Schematische Darstellung des Versuchssitus
Abb. 2.1.1.	24	Stenosemodell
Abb. 2.1.2.	26	Versuchsprotokoll
Abb. 2.2.	28	Schematische Darstellung der In situ Nick Translation
Tab. 2.3.	29	Reaktionsgemisch für die In Situ Nick Translation
Tab. 2.4.	29	Zusammensetzung des NT-Puffers
Abb. 2.3.	30	Autoradiogramm des Vorversuchs
Abb. 2.4.	31	Kontrollschnitte des Autoradiogramms der linken Ventrikel von Tier
		12, 18 und 19
Abb. 2.5.	32	Links: schematische Darstellung einer Microscale, Rechts: Microsca-
		le auf einem Autoradiogramm
Abb. 2.6.	33	Messung der mittleren optischen Dichte am Beispiel eines Schnittes
		des linken Ventrikels von Tier 18
Abb. 2.7.	33	Messung der optischen Dichte der Microscale
Abb. 2.8.	34	ImageQuant-Werte für die definierten Bereiche des Beispielfilms
Abb. 2.9.	35	Autoradiogramm der linken Ventrikel von Tier 6, 10, 16
Abb. 2.10.	36	Autoradiogramm der rechten Ventrikel von Tier 7, 8, 9 und 11
Tab. 3.1.	43	Hämodynamische Parameter der drei Gruppen vor artefizieller Koro-
		narstenose

Abbildung /	Seite	Bezeichnung
Tabelle		
Tab. 3.2.	44	Hämodynamische Parameter der drei Gruppen während artefizieller
		Koronarstenose
Tab. 3.3.	45	Parameter des Sauerstofftransports des Myokards
Tab. 3.4.	46	Parameter der subdiafragmalen Echokardiographie (SDE) vor artefi-
		zieller Koronarstenose
Abb. 3.1.	47	Wandbeweglichkeit des Myokards (SWMA-Index im SDE) und systo-
		lische Wanddickenzunahme des Myokards an der Vorderwand
		(SWT% anterior im SDE) vor artefizieller Koronarstenose.
Tab. 3.5.	48	Parameter der subdiafragmalen Echokardiographie (SDE) während
		artefizieller Koronarstenose
Abb. 3.2.	49	Wandbeweglichkeit des Myokards (SWMA-Index im SDE) und systo-
		lische Wanddickenzunahme des Myokards an der Vorderwand
		(SWT% anterior im SDE) bei artefizieller Koronarstenose.
Tab. 3.6.	50	Sauerstoffspannungen des Myokards
Tab. 3.7.	51	Gruppeneinteilung, Behandlung und evtl. Ausschlußkriterien der
		Hunde
Tab. 3.8.	52	Nach der in Material und Methoden, Abschnitt 2.3.3., dargestellten
		Rechnung korrigierte Werte der densitometrischen Auswertung
Tab. 3.9.	53	Deskriptive Statistik der bearbeiteten Werte
Abb. 3.3.	54	Darstellung der Werte für den linken Ventrikel aller drei Gruppen.
Abb. 3.4.	54	Darstellung der Werte für das Septum aller drei Gruppen.
Abb. 3.5.	55	Darstellung der Werte für den rechten Ventrikel aller drei Gruppen.
Abb. 3.6.	55	Zusammenfassende Darstellung aller Werte, geordnet nach Gruppe.
Abb. 3.7.	56	Darstellung der Werte für linken Ventrikel, Septum und rechten Ven-
		trikel der Kontrollgruppe (1).
Abb. 3.8.	56	Darstellung der Werte für linken Ventrikel, Septum und rechten
		Ventrikel der Therapiegruppe (2).
Abb. 3.9.	57	Darstellung der Werte für linken Ventrikel, Septum und rechten Ven-
		trikel der Prophylaxegruppe (3).
Abb. 3.10.	57	Zusammenfassende Darstellung aller Werte, geordnet nach Position.
Tab. 3.10.	58	Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für den linken
		Ventrikel der drei Gruppen.
Tab. 3.11.	58	Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für das Septum
		der drei Gruppen.
Tab. 3.12.	58	Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für den rechten
		Ventrikel der drei Gruppen.
Tab. 3.13.	59	Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für linken Ventri-
		kel, Septum und rechten Ventrikel der Kontrollgruppe (1).

Abbildung /	Seite	Bezeichnung
Tabelle		
Tab. 3.14.	59	Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für linken Ventri-
		kel, Septum und rechten Ventrikel der Therapiegruppe (2).
Tab. 3.15.	59	Statistische Auswertung des Vergleiches der Werte für linken Ventri-
		kel, Septum und rechten Ventrikel der Prophylaxegruppe (3).
Tab. 3.16.	63	Tabellarische Zusammenfassung der histologischen Ergebnisse.
Abb. 3.11.	65	Bild 269/34. Tier 18; Prophylaxe-Gruppe (3).
Abb. 3.12.	66	Bild 269/6. Tier 11; Prophylaxe-Gruppe (3).
Abb. 3.13.	67	Bild 269/13. Tier 11; Prophylaxe-Gruppe (3).
Abb. 3.14.	68	Bild 269/13. Tier 11; Prophylaxe-Gruppe (3).
Abb. 3.15.	69	Bild 269/3429. Tier 9; Kontroll-Gruppe (1).
Abb. 3.16.	70	Bild 269/24. Tier 9; Kontroll-Gruppe (1).
Tab. 3.17.	71	Statistische Auswertung der histopathologischen Färbungen
Tab. 3.18.	71	Statistischer Vergleich der histopathologischen Ergebnisse mit den
		10%-Perzentilen des tpO ₂ des Myokards
Abb. 4.1.:	81	Nachweis ausgewählter Schritte der Apoptose.
Tab. 4.1.	86	Quelle und Art von natürlich auftretenden DNA-Schädigungen.

7.2. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
СТР	Cytosin-Triphosphat
dl	Deziliter
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DSB, dsB	double strand break, DNA-Doppelstrangbruch
et al.	et alii, und andere
g	Gramm
GTP	Guanin-Triphoshat
H ₂ O	Wasser
HES	Hydroxyethylstärke
HBOC-201	hemoglobine-based oxygen carrier 201
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
IHD	isovoläme Hämodilution
ISNT	In Situ Nick Translation
J	Jahre
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
m	Meter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mM	millimolar
mPa	Millipascal
m/w	männlich / weiblich

Ν	Werteanzahl
n.n.	nicht nachweisbar
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
S	Sekunde
SDE	Subdiafragmale Echokardiographie
SFH	Stromafreie Hämoglobinlösung
SSB, ssB	single strand break, DNA-Einzelstrangbruch
Tab.	Tabelle
tpO ₂	Gewebe-O ₂ -Partialdruck (t=tissue, Gewebe)
TdT	Terminale Desoxynukleotid-Transferase
TUNEL	TdT-mediated X-dUTP nick end labeling
	TdT-vermittelte X-dUTP Strangbruch-Markierung
TTP	Thymidin-Triphosphat
UPBH	ultrapurified polymerized bovine hemoglobine
UV	ultraviolette Strahlung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Schulte am Esch herzlich dafür danken, daß ich die Dissertation an seiner Klinik und seinem Lehrstuhl durchführen konnte, und daß er es mir ermöglicht hat, an Weiterbildungsveranstaltungen teilzunehmen, die die Fertigstellung der Dissertation erleichtert und beschleunigt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Standl für die Bereitstellung des interessanten Themas, die immerwährende Unterstützung, die Geduld in fachlichen Diskussionen und die überaus fundierten Kritiken, ohne die ich das eine oder andere Mal im Strudel der Wissenschaft zu versinken drohte.

Ein weiterer Dank geht an Dipl. Ing. Dr. med. Krause für seine engmaschige und freundliche Betreuung der praktischen Arbeiten und die vielen konstruktiven Laborbesprechungen, durch die die Feinabstimmung ermöglicht wurde.

Herrn Dr. med. André Gottschalk möchte ich für die Einführung in das Thema danken.

Sehr danken möchte ich auch der leitenden MTA Frau Weber für ihre tägliche Unterstützung und sehr gute Zusammenarbeit im Labor.

Bedanken möchte ich mich von Herzen bei meiner Mutter und meinem Stiefvater Axel, ohne deren Unterstützung und Geduld meine universitäre Ausbildung nicht möglich gewesen wäre.

Einen liebevollen Dank richte ich auch an meine Freundin Dipl. Biol. Andrea Schröder für ihr Verständnis, ihre Integrität und die Geduld für die vielen Wochenenden, an denen sie mich an den PC abgeben mußte.

Der lieben Aina danke ich für ihr - trotz ihres geringen Alters - Großmaß an Verständnis dafür, daß in der Vergangenheit der gemeinsame Reitsport, Kino und Popcorn in den Hintergrund rücken mußten.

Meinem Freund Dipl. Ing. Dr. med. Mirko Junge danke ich für den Einblick in statistische Sphären und seine Kontinuität.

Meinem Freund Andreas Habermann danke ich für die inzwischen Jahrzehnte währende Freundschaft, und daß er es auf unnachahmliche Weise versteht, mir den Rücken freizuhalten.

Meinen Freunden und Kommilitonen Tobias Fock und Gunnar Menzer danke ich für die tolle Zeit an der Uni voller Prüfungen und Examina und den phantastischen Zusammenhalt, der uns seit dem Präparierkurs gegeben ist.

Lebenslauf

Persönliche Daten	Ralf Winter-Lutzke	
	geboren am 08.12.1967 in Eutin	
Schulausbildung		
1974 - 1978	Grundschule in Lütjenburg	
1978 - 1986	Gymnasium Lütjenburg	
1986 - 1987	Gymnasium Preetz	
1992 - 1994	Lohmühlengymnasium (Abendgymn.) Hamburg	
	Abschluß Abitur	
Berufsausbildung		
1987 - 1989	Ausbildung zum Rettungssanitäter im Rahmen des Zivildiens-	
	tes	
	DRK Hamburg-Altona	
1990 - 1993	Ausbildung zum Gas-Wasser-Installateur	
	Abschluß Gesellenprüfung	
1993 - 1996	Mitarbeit im elterlichen Betrieb	
Hochschulausbildung		
seit 1996	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg	
März 1998	Physikum	
März 1999	1. Staatsexamen	
März 2001	2. Staatsexamen	
seit April 2001	Praktisches Jahr Universität Lübeck; Ostholstein-Klinik Eutin	
	in den Abteilungen für Anästhesiologie, Innere Medizin und	
	Chirurgie	
Famulaturen		
Juli-September 1998	Praxis für Allgemeinmedizin Dr. Haller, Heiligenhafen	
August 1999	Praxis für Allgemeinmedizin Dr. Haller, Heiligenhafen	
Februar/März 2000	Israelitisches Krankenhaus Hamburg, Abteilung für Innere Medizin	
September/Oktober 2000	Ostholstein-Klinik Eutin, Abteilung für Anästhesiologie	
April 2001	Allgemeines Krankenhaus Barmbek, Hamburg, Abteilung für Unfall und Wiederherstellungschirurgie	

Erklärung:

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.