

**Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Direktor: Prof. Dr. med. A. E. Goetz

**UNTERSUCHUNGEN ZUR BEEINFLUSSUNG VON  
ISCHÄMIE UND REPERFUSIONSSCHÄDEN DURCH  
KÜNSTLICHE SAUERSTOFFTRÄGER**

**Teil 1: Einfluss der Perfluorocarbonemulsion Oxygent® auf kardiale Ischämie-  
und Reperfusionsschäden der Ratte**

**Teil 2: Untersuchung der Beeinflussung der Hämoxigenase 1 Expression durch den  
Blutersatzstoff HBOC-201 in der Zellkultur von Endothelzellen**

**Promotionsschrift**

zur Erlangung des Dokortitels  
dem Fachbereich Medizin der  
Universität Hamburg vorgelegt von

**Arno Ritter**  
aus Hamburg

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am : 09.02.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. A.E.Goetz

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Standl

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. med. T. Strate

Verstand und Vernunft sind ein formelles Vermögen.  
Das Herz liefert den Gehalt, den Stoff.

Johann Wolfgang von Goethe

Meiner Frau in Liebe gewidmet

## Inhaltsverzeichnis

1.	Arbeitshypothese und Fragestellung .....	6
2.	Einleitung.....	7
2.1.	Ansatz .....	10
2.2.	Hämoglobinlösungen .....	11
2.3.	Perfluorocarbone.....	15
2.4.	Myokardinfarkte und alternative Sauerstoffträger.....	18
2.5.	Reperfusionsschäden .....	20
2.5.1.	Myokardiales Stunning.....	20
2.5.2.	Arrhythmien.....	21
2.5.3.	Vaskuläre Reperfusionsschäden (no-reflow phenomenon).....	21
2.6.	Mögliche Wirkungen von HBOC / PFC auf Ischämie- und Reperfusionsschäden .....	25
2.6.1.	Wirkungen von PFC auf Ischämie- und Reperfusionsschäden .....	25
2.6.2.	Wirkungen von HBOC auf Ischämie- und Reperfusionsschäden .....	25
3.	Material und Methodik des tierexperimentellen Versuches / PFC.....	27
3.1.	Tierschutz .....	27
3.2.	Statistik und Fallzahlberechnung.....	27
3.3.	Operativer Versuchsablauf .....	28
3.3.1.	Versuchsgruppen .....	28
3.3.2.	Versuchstiere .....	28
3.3.3.	Narkose und Präparation.....	29
3.3.4.	Intraoperative Messwerte.....	34
3.4.	Arrhythmieerfassung .....	36
3.4.1.	Elektrokardiogramm.....	36
3.4.2.	Auswertung.....	36
3.5.	Organaufarbeitung .....	37
3.6.	TTC-Färbung und “Area at Risk”.....	38
3.6.1.	Technik .....	38
3.6.2.	Auswertung.....	39
4.	Material und Methodik des Zellkulturversuches / HBOC.....	41
4.1.	Material.....	41
4.2.	Zellbiologische Methoden .....	41
4.2.1.	Auftauen von Zellen, Ansetzen und Umsetzen einer Zellkultur .....	41
4.3.	Chemikalien und Ansätze .....	45
4.3.1.	Zusammensetzung der HBOC enthaltenden Zellkulturmedien.....	45
4.3.2.	Zusammensetzung der Hämin enthaltenden Zellkulturmedien .....	45

4.4.	Messung von Bilirubin .....	46
4.5.	Lyse der Endothelzellen .....	47
4.5.1.	Ansatz des Zellysepuffers.....	47
4.5.2.	Lysieren der Endothelzellen .....	48
4.6.	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	48
4.7.	Auftrennung eines Proteingemisches in der SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	48
4.7.1.	Coomassie-Brilliant-Blue Färbung.....	51
4.7.2.	Färbung von Proteinen auf Membranen .....	51
4.7.3.	Statistische Auswertung der Ergebnisse des Zellkulturversuches....	54
5.	Ergebnisse.....	55
5.1.	Ergebnisse PFC / tierexperimenteller Versuch.....	55
5.1.1.	Hämodynamik.....	55
5.1.2.	Ergebnisse der Blutgasanalyse .....	56
5.1.3.	„Area at risk“ und Infarktgröße .....	57
5.1.4.	Arrhythmien.....	58
5.2.	Ergebnisse HBOC / Zellkulturversuch .....	62
5.2.1.	Bilirubinproduktion / erste Versuchsreihe: zeitlicher Verlauf.....	62
5.2.2.	Bilirubinproduktion / zweite Versuchsreihe .....	63
5.2.3.	Westernblot / Induktion von HO-1 .....	63
6.	Diskussion .....	67
6.1.	Diskussion PFC / tierexperimenteller Versuch.....	67
6.1.1.	Effekte von PFC auf das Infarktareal .....	67
6.1.2.	Effekte von PFC auf Herzrhythmusstörungen.....	72
6.1.3.	Methodenkritik zum PFC-Versuch.....	73
6.2.	Diskussion HBOC / Zellkulturversuch.....	77
6.2.1.	Methodenkritik zum Zellkulturversuch .....	78
7.	Zusammenfassung .....	80
8.	Literaturverzeichnis .....	82
9.	Anhang.....	92
9.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	92
9.2.	Tabellen .....	95
10.	Danksagung .....	110
11.	Lebenslauf.....	111
12.	Eidesstattliche Erklärung .....	112

## 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob ein prophylaktischer oder therapeutischer Einsatz von künstlichen Sauerstoffträgern die Ausdehnung von Myokardinfarkten reduzieren kann. Im Besonderen soll untersucht werden, ob und wie es möglich sein kann Schäden zu reduzieren, die mit Reperfusion des Herzens auftreten können.

Diese Arbeit besteht aus zwei methodisch unterschiedlichen Versuchsreihen:

1) Im Versuch am Rattenmodell soll untersucht werden, ob der künstliche Blutersatzstoff Perflourcarbon (PFC) in der Lage ist, die Ausbreitung der Infarktareale am Herzen nach Koronarokklusion bei prophylaktischer oder therapeutischer Gabe zu verhindern. In Versuchen mit einem rein therapeutischen Ansatz konnte gezeigt werden, dass PFC die Größe von nekrotischen Arealen verringern kann [1-7].

Um die Herzschiädigung zu detektieren, werden die infarzierten Areale denen von der Ischämie betroffenen Areale („area at risk“) gegenübergestellt. Eine Reduktion der Größe der infarzierten Areale innerhalb der „area at risk“ soll als Parameter für eine positive Beeinflussung der Ischämie- und Reperfusionsschäden genutzt werden. Weitere untersuchte Parameter sind während der Ischämie und nachfolgender Reperfusion (I/R) auftretende Herzrhythmusstörungen. Rhythmusstörungen können einen hohen Einfluss auf die Letalität bei I/R haben. Sie sollen in diesem Versuch weiteren Aufschluss über Schwere des Schadens durch I/R geben und es soll untersucht werden, ob der Einsatz von PFC Inzidenz und Qualität der Rhythmusstörungen beeinflusst.

2) Im Zellkulturversuch soll untersucht werden, ob der aus polymerisiertem Hämoglobin bestehende Blutersatzstoff HBOC-201 Endothelzellen zur Synthese von Hämoxigenase 1 anregen kann. Hämoxigenase-1 ist ein Enzym das am Abbau von Häm zu Bilirubin beteiligt ist. Hämoxigenase-1 wird bei erhöhten Hämoglobinkonzentrationen, bei oxydaktivem Stress und durch dem HBOC-201 verwandte Blutersatzstoffe hochreguliert [8, 9]. In Tierversuchen wurde gezeigt, dass HBOC-201 die Ausbreitung von nekrotischen Herzarealen nach I/R vermindern kann. Eine Hochregulation von Hämoxigenase 1 durch Gabe von HBOC-201 wäre ein möglicher Wirkmechanismus, da bei erhöhter Hämoxigenaseaktivität im Herzgewebe eine wirkungsvolle Schutzfunktion nach I/R beschrieben worden ist [10-20].

## 2. Einleitung

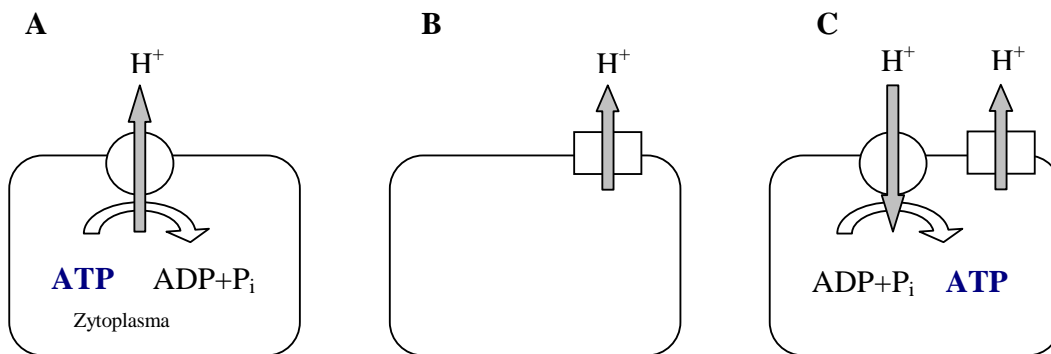
Das Leben entstand vor etwa 3,5-4 Milliarden Jahren in einem Urozean, in dem sich geochemisch produzierte energiereiche organische Moleküle angereichert hatten. Ebenso wie in der Uratmosphäre fehlte in diesem Urozean Sauerstoff völlig; andernfalls hätten sich aufgrund des hohen Oxidationspotentials von Sauerstoff organische Moleküle weder bilden noch erhalten können. In dieser Nährlösung wasserstoffreicher organischer Moleküle (z.B. Glucose) schwimmend, gewannen die ersten prokaryotischen Organismen ihre Energie durch Glycolyse: ATP entstand durch Substratkettenphosphorylierung [21].

Die Elektronentransportphosphorylierung ist jüngerem Datums. Da Sauerstoff im Urozean fehlte, musste der bei der Oxydation organischer Moleküle freiwerdende Wasserstoff auf andere (organische) Moleküle übertragen werden. Als Endprodukte entstanden dabei organische Säuren (Lactat, Acetat, u.a.), die den intrazellulären pH-Wert erniedrigen und damit den Anstoß zur Entwicklung einer ATP-getriebenen Protonenpumpe in der Zellmembran gaben. Auf diese Weise konnten Protonen nach außen transportiert werden (Abb. 2.1 A) [21,22].

Mit fortschreitender Ausbreitung dieser Organismen, die Energie ausschließlich auf glycolytischem Wege gewannen, muss es im Urozean rasch zu einem Mangel an organischen Nährstoffen gekommen sein. Der biologische Verbrauch überstieg die geochemische Produktion der Nährstoffmoleküle. ATP wurde daher kostbar, jedenfalls zu kostbar, um es im hergebrachten Ausmaß zum Antrieb der Protonenpumpe aufzubrauchen. Es entwickelten sich daher Organismen, die über ein in der Zellmembran lokalisiertes Elektronentransportsystem verfügten, das aus Molekülen mit unterschiedlichem Redoxpotential bestand; so wurde ein Protonentransport durch die Zellmembran ohne ATP-Verbrauch möglich (Abb. 2.1 B). Der Protonentransport wurde so effizient, dass ein Konzentrationsgradient entlang der Zellmembran aufgebaut werden konnte. Die ATP verbrauchende Protonenpumpe konnte nun durch Protoneneinstrom in die Zelle entlang des Gradienten –also durch Umkehr des Protonenstromes- ATP produzieren. Die ATP- Synthetase entstand aus dieser rückwärts laufenden Protonenpumpe (Abb. 2.1 C).



**Abb. 2.1.** Schematische Darstellung von Protonentransportsystemen und ATP-Synthese



Mit weiterer Ausbreitung des Lebens auf der Erde kam es zunehmend zu einem Mangel an Kohlenstoffverbindungen, die für den Aufbau von lebensnotwendigen Zellbausteinen benötigt werden. Aus diesem Mangel der gleichbedeutend mit Energiemangel war entstand die Fähigkeit mancher Zellen, das damals reichlich vorhandene CO<sub>2</sub> mittels Lichtenergie durch Photosynthese zum Aufbau von Kohlenwasserstoffverbindungen zu nutzen. Als Abfallprodukt der Photosynthese entstand Sauerstoff, der sich in der Atmosphäre anreicherte und so die erste globale Umweltvergiftung auslöste, da die Lebewesen bis dahin nicht in der Lage waren, sich vor der Oxidation zelleigener Moleküle durch Sauerstoff zu schützen [21-23]. Zu diesem Zeitpunkt entwickelte sich ein außerordentlich gewinnbringender Mechanismus zur Sauerstoffentsorgung. Die Elektronentransportsysteme wurden so verändert, dass eine Elektronenübertragung von NADH+H<sup>+</sup> auf O<sub>2</sub> möglich wurde. Das Prinzip des aeroben Stoffwechsels entstand. Mittels dieses Prinzips ist es möglich, organische Kohlenwasserstoffverbindungen zu Wasser und CO<sub>2</sub> abzubauen und daraus mehr Energie zu gewinnen, als es zuvor durch anaerobe Stoffwechselwege möglich war. Die Zellen waren so dem Sauerstoff nicht mehr schutzlos ausgeliefert, und gleichzeitig konnten sie bedeutend mehr Energie erzeugen [23]. Dieser aerobe Stoffwechselweg wurde im Laufe der Evolution immer weiter verbessert. Mit Entstehung der Mitochondrien in den Eukaryonten vor etwa 1,5 Milliarden Jahren wurde der Elektronentransport, die Endoxydation von Wasserstoff mit

Sauerstoff und die ATP-Synthese in besonders effektiv arbeitende spezialisierte Zellorganellen verlagert. Man nimmt an, dass ursprünglich anaerobe räuberische Prokaryoten aerobe Prokaryoten durch Endozytose aufnahmen, diese aber nicht verdaut wurden, sondern innerhalb des Räubers weiterexistierten. So entwickelte sich eine Symbiose beider Zellarten, wobei Energiegewinnung und ATP-Synthese immer mehr Aufgabe der aerob arbeitenden Partner blieben, bis sie sich schließlich zu den Kraftwerken der Zelle –den Mitochondrien entwickelten. Für die Richtigkeit dieser sogenannten Endosymbiontentheorie gibt es vielerlei Anhaltspunkte, wie zum Beispiel die Ähnlichkeit von Protein- und DNA-Struktur der Eukaryotenorganellen mit ihren prokaryotischen Vorläufern [21,24,25]. Stellte der Sauerstoff zunächst eine Gefahr für das Leben da, so sind Lebewesen mit einem aeroben Stoffwechsel –also auch wir Menschen- obligat vom Vorhandensein von Sauerstoff im Körpergewebe abhängig.

Sauerstoff kann durch Diffusion maximal über 1 mm im Gewebe eine ausreichende Konzentration für den aeroben Stoffwechsel erreichen. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, dass der Sauerstoff aktiv ins Gewebe befördert werden muss, wenn der Organismus eine gewisse Größe übersteigt. Daher haben sich im Laufe der Evolution verschiedene Techniken zum Sauerstofftransport entwickelt.

Die Insekten verfügen beispielsweise über ein verzweigtes Netz von Luftröhren – den Tracheen, über die das Gewebe sehr effektiv mit Sauerstoff versorgt werden kann. Ein solches Tracheennetz kann jedoch nur bis zu einer gewissen Größe des Stromgebietes eine ausreichende Ventilation herbeiführen, da die Strömungseigenschaften stark von Länge und Verzweigung der Luftröhren abhängig sind. Dies ist ein Grund, warum Insekten nie eine gewisse Körpergröße überschreiten [21].

Tiere, die über Lungen oder Kiemen atmen verwenden Flüssigkeiten (Blut, Hämolymphe) als Sauerstofftransportmedium, die mechanisch in zirkulierende Strömung versetzt werden. Auf diese Weise lässt sich O<sub>2</sub> zwar über größere Distanzen als in luftgefüllten Tracheen transportieren, doch ergibt sich hier ein Nachteil: Flüssigkeiten können wesentlich (ca. 20mal) weniger O<sub>2</sub> aufnehmen als Luft. Daher hat sich in vielen Tiergruppen ein O<sub>2</sub>-Transport durch spezielle O<sub>2</sub>-bindende Proteine entwickelt. Im menschlichen Blut liegen diese Proteine in Form von Hämoglobin dichtgepackt in speziellen Transportzellen – den Erythrozyten vor. Mit der Entwicklung dieses Transportsystems gelingt es, eine Sauerstoffkonzentration im Blut zu erreichen, die bis auf 200 ml O<sub>2</sub> l<sup>-1</sup>, d.h. bis auf den O<sub>2</sub>-Gehalt der Atmungsluft gesteigert wird [21, 26].

Das Herz steht im Zentrum des Gastransportes mittels der zirkulierenden Strömung von Blut. Es muss nicht nur die Lungen und alle anderen Organe, sondern auch sich selbst durch seine Pumpleistung mit Blut und somit mit Sauerstoff versorgen. Daher muss das Herz verglichen mit anderen Organen relativ viel Leistung erbringen; dies bedingt einen aeroben Stoffwechsel, da über einen anaeroben Stoffwechsel eine solch hohe Leistung nicht dauerhaft zu gewährleisten wäre.

Kommt es aufgrund eines Verschlusses eines Koronargefäßes zu einem Stillstand der Blutversorgung in einem Bereich des Herzmuskels, führt dies zu einem akuten Sauerstoffmangel, einem Erliegen der Energiegewinnung durch den aeroben Stoffwechsel und schließlich zu einem Untergang des betroffenen Herzmuskels. Die Pumpfunktion des Herzens kann durch diesen Infarkt stark vermindert werden, so dass es zu einer lebensbedrohlichen Mangelversorgung der Organe kommen kann.

Unsere heutige Medizin hat unterschiedliche Strategien entwickelt, um die Blutzirkulation im vom Herzinfarkt betroffenen Myokard wiederherzustellen.

In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob künstlich hergestellte Blutersatzstoffe, die über die Fähigkeit verfügen Sauerstoff zu transportieren, einen Beitrag zur Verhütung oder zur Therapieverbesserung des Herzinfarktes leisten können.

## **2.1.    Ansatz**

Fünf Millionen Menschen sind jährlich von perioperativ auftretenden Myokardischämien betroffen. Diese Myokardischämien äußern sich bei Risikopatienten auch im Rahmen nicht-herzchirurgischer Eingriffe in Form von Rhythmusstörungen, Angina pectoris bis hin zum Myokardinfarkt mit hoher Letalität [27-30]. Perioperative Myokardinfarkte treten per definitionem während einer Operation oder innerhalb der ersten Woche nach einem operativen Eingriff auf und gelten als gefährliche Komplikation mit einer durchschnittlichen Letalität von 17%.

Nicht-herzchirurgische Eingriffe bei Menschen ohne Infarktanamnese sind mit einem perioperativem Infarktrisiko von 0,1-0,66% behaftet. Bei Patienten, die bereits einen Infarkt in der Vorgeschichte erlitten, erhöht sich dieses Risiko auf das 10-50-fache; die perioperative Reinfarktrate wird für diese Patientengruppe mit 3,2 - 7,7% angegeben [27-30].

Für diese Patientengruppe wäre möglicherweise eine prophylaktische oder therapeutische Gabe plasmatischer Sauerstoffträger von Vorteil. Hier soll auf zwei chemisch unterschiedliche Sauerstoffträger und ihre möglichen Einsatzmöglichkeiten bei Ischämien des Herzens eingegangen werden. Der eine untersuchte Stoff (HBOC-201) besteht aus chemisch modifiziertem bovines Hämoglobin, der andere (PFC) aus mit Fluor und Brom halogenierten organischen Kohlenwasserstoffverbindungen.

Denkbarer Wirkungsmechanismus beider Stoffe wäre eine verbesserte myokardiale Sauerstoffversorgung, die Ischämie- und Reperfusionsschäden minimiert.

Ein weiterer Wirkungsmechanismus des HBOC-201 könnte eine Beeinflussung des zellulären Hämoglobinabbaus durch das Enzym Hämoxigenase-1 sein, dessen zell- und gewebsschützende Wirkungen vielfach beschrieben wurden [10-20].

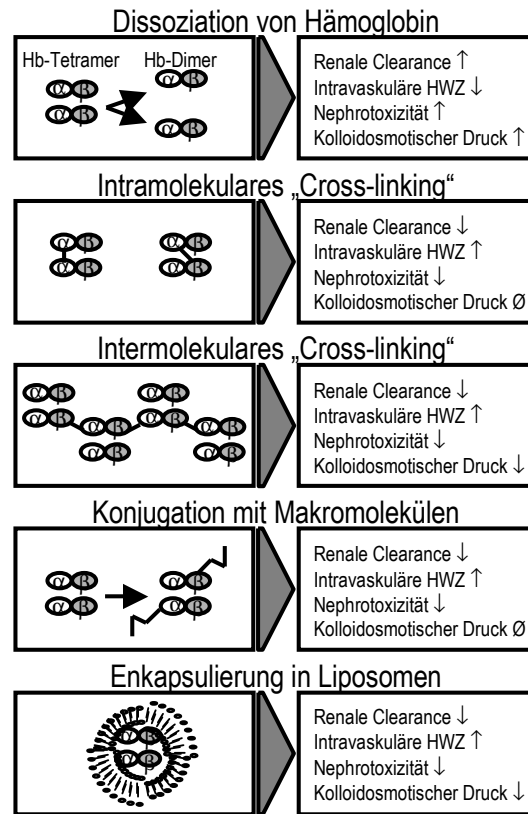
## **2.2. Hämoglobinlösungen**

Die Entwicklung von Hämoglobinlösungen wird ursprünglich durch den Wunsch vorangetrieben einen Blutersatz zu schaffen, der bei akut auftretenden Anämien im Rahmen von traumatischen oder operativen Blutverlusten das Leben des Patienten retten kann, ohne von den üblichen Produkten aus Spenderblut wie etwa Erythrozytenkonzentraten abhängig zu sein. Diese klassischen Blutersatzpräparate aus menschlichem Spenderblut haben den Nachteil der Blutgruppenkompatibilitäten und von transfusionsbedingten Infektionen, wie z.B. HIV oder Hepatitis B und C. Auch kann es in bestimmten Situationen zu Engpässen in der Versorgung mit diesen Blutprodukten kommen und für Bluttransfusionen ist ein hoher organisatorischer und technischer Aufwand für Gewinnung, Testung und Lagerung notwendig. An der Entwicklung eines zellfreien Blutersatzstoffes wird daher seit vielen Jahren gearbeitet. Erste klinische Studien wurden bereits 1916 von SELLARDS und MINOT bei Freiwilligen sowie bei anämischen Patienten durchgeführt [31].

Bei den ersten Hämoglobinlösungen traten lebensbedrohliche Nebenwirkungen in Form von einer aktivierten intravasalen Gerinnung [31-33] sowie von Fieber und Nierenversagen [34] auf. Ursache hierfür waren die Rückstände von Zellmembranen, wie z.B. Phospholipide [34, 35]. Noch 1978 zeigten sich in einer Studie zur Sicherheit von Hämoglobinlösungen relevante hämodynamische und nephrologische Komplikationen,

die weitere klinische Studien für Jahre nicht mehr vertretbar erscheinen ließen [36]. Die pathophysiologische Grundlage der hypertensiven Effekte von Hämoglobinlösungen konnte noch nicht endgültig aufgeklärt werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit spielt die Bindung und daraus resultierende Inaktivierung von vasodilatatorisch wirksamem NO an das freie Hämoglobinmolekül eine wichtige Rolle („NO-Scavenging“) [37]. Darüber hinaus kann es unter HBOC-Anwendung zu einer erhöhten Freisetzung von Endothelin sowie zu einer Sensibilisierung von Adrenozeptoren kommen [38, 39]. Ferner ist als klinische Nebenwirkungen die Methämoglobinbildung anzuführen. Die vermehrte Methämoglobinbildung erklärt sich aus dem Fehlen der Methämoglobinreduktase und anderer Reduktionsenzyme in der zellfreien Hämoglobinlösung. Klinische Relevanz kommt der Methämoglobinämie allerdings erst bei Verabreichung größerer Hämoglobinmengen sowie bei einer Überladung des makrozytär-phagozytären Systems (MPS) zu [40]. Die ursprünglich beobachtete renale Toxizität von HBOC infolge von Verunreinigungen durch Phospholipidmembranen der Erythrozyten in den älteren Hämoglobinlösungen konnte durch Einführung der Ultrapurifikation beseitigt werden. Neben den überwiegend toxischen Nebenwirkungen ergaben sich weitere Probleme im Zusammenhang mit der kurzen intravasalen Verweildauer, der hohen Sauerstoffaffinität sowie dem hohen kolloidosmotischen Druck (KOD) durch eine hohe Anzahl von Einzelmolekülen und Fraktionen des Hämoglobins (Hb). Aus diesem Grund wurden die zur Zeit zugelassenen bzw. in Phase-III-Studien befindlichen Präparate chemisch modifiziert (Abbildung 2.2).

**Abbildung 2.2.** Schematische Darstellung der Modifikationen von Hämoglobinmolekülen zur Verminderung toxischer Nebenwirkungen sowie zur Verlängerung der intravasalen Halbwertszeit.



Quelle [41]

Durch die Polymerisation erhöht sich das mittlere Molekulargewicht, während sich die Molekülzahl reduziert. Eine verlängerte intravasale Verweildauer und ein erniedrigter KOD sind die Folge. Im Falle der von uns in der vorliegenden Versuchsreihe benutzten Lösung HBOC-201 beträgt das Molekulargewicht in Abhängigkeit vom Polymerisationsgrad 64.000-500.000 Dalton. Die intravasale Halbwertszeit wird mit 16-24 Stunden angegeben [40]. HBOC-201 ist eine zellfreie, ultragereinigte, polymerisierte Rinderhämoglobinlösung. Sie zeichnet sich durch eine niedrige Sauerstoffaffinität und einen ausgeprägten Bohr-Effekt aus, so dass eine verbesserte Geweboxygenierung infolge der erleichterten Sauerstoffabgabe in der Peripherie zu erwarten ist. Durch Änderung des Ladungszustandes verschiebt sich die Sauerstoffbindungskurve im Sinne einer erleichterten Sauerstoffabgabe in der Peripherie nach rechts. Dies schlägt sich in

einem erhöhten P50 in Höhe von 36 mmHg gegenüber humanem, in Erythrozyten gebundenem Hämoglobin mit einem P50 in Höhe von 26 mmHg nieder [40].

Inzwischen sind zahlreiche Hämoglobinlösungen in klinischen Studien angewendet worden. Eine Übersicht über die verschiedenen Lösungen gibt Tabelle 2.1.

**Tabelle 2.1.** Übersicht über die in der Entwicklung befindlichen zellfreien Hämoglobinlösungen.

Produkt	Hersteller	Quelle	Modifikation	Entwicklungsstand
HemAssist™	Baxter, Deerfield, IL, USA	Human	intramolekulares Diaspirin alpha-alpha "cross linked" Tetramer	Phase III Trauma/Schlaganfälle, gestoppt 2002, Herz-Chirurgie, IHD
HemoLink™	Hemosol, Toronto, Canada	Human	Intra- and intermolekulares "cross-linking" mit O-Raffinose	Phase II/III, IHD/Chirurgie/Herz-Chirurgie
Hemopure™ Oxyglobin™	Biopure, Cambridge, MA, USA	Bovin	Glutaraldehyd Polymerisation	Phase III/ Zulassung in Süd-Afrika Perioperative Transfusion, Herz-Chirurgie, IHD
Optro™	Somatogen, Boulder, CA, USA	Rekombinant	Intramolekular "cross-linking" Beta-Ketten Mutation (108 Lys)	Phase II, gestoppt 1999
PEG-Hb™	Enzon, Piscataway, NJ, USA	Bovin	Polyethylen Glycol-konjugiert ("pegylated")	Phase Ib, Tumor Radiosensibilisierung
PHP	Apex Bioscience, Research Triangle Park, NC, USA	Human	Oberflächen-modifiziertes Polyoxyethylen-pyridoxiliertes Polymer	Phase III, NO-induzierte Hypotension
PolyHeme™	Northfield, Evanston, IL, USA	Human	glutaraldehyd polymerisation	Phase III, Trauma, Operationen

Quelle [42]

In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass mit HBOC ein suffizienter Volumenersatz und eine adäquate oder sogar verbesserte Gewebsoxygenierung nach hämorrhagischem Schock und während Blutaustausch möglich sind. Durch chemische Modifikation von HBOC kann die Intensität der vasokonstriktorisches Nebeneffekte, die durch NO-Bindung verursacht sind, reduziert werden. Die erhöhte Sauerstoffextraktion

in Anwesenheit von HBOC in Kombination mit dem plasmatischen Sauerstofftransport bewirken trotz Vasokonstriktion eine gesteigerte Gewebsoxygenierung sogar im poststenotischen Gewebe. Mit HBOC wird die Perfusion auf mikrozirkulatorischer Ebene verbessert, so dass Gewebsschäden nach akuter Pankreatitis oder Ischämie/Reperfusion am Herzen und am Hirn signifikant reduziert werden konnten [43-47].

Klinische Studien haben gezeigt, dass der perioperative Einsatz von unterschiedlichen Hämoglobinlösungen (Hemopure®, PolyHeme®, Hemolink® und HemAssist®) die Anzahl der benötigten homologen EK reduzieren und die Anzahl der Patienten ohne Fremdbluttransfusion erhöhen kann. Dies wurde bei Notfallpatienten, in der Gefäß-, Herz- und Abdominalchirurgie gezeigt. Polymerisierte HBOC scheinen eine geringere Inzidenz an Nebenwirkungen zu haben als intra-molekular vernetzte Hämoglobinpräparate. Bislang ist HBOC-201 (Hemopure®) die einzige Substanz mit einer Zulassung für die Therapie perioperativer Anämie in Südafrika [48, 49].

### **2.3. Perfluorocarbone**

Die Perfluorocarbone (PFC) sind wie HBOC als künstliche Blutersatzstoffe mit der Fähigkeit zum Sauerstofftransport entwickelt worden. Das erste Medikament auf PFC-Basis wurde bereits vor mehr als 20 Jahren von Green Cross Corporation (Osaka, Japan) unter dem Handelsnamen Fluosol® angeboten. Perfluorocarbone sind organische Kohlenwasserstoffverbindungen, die komplett mit Fluor- und Bromatomen halogeniert wurden. Bevor sie als Blutersatz angewandt werden können, müssen sie aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit emulgiert werden. PFC zeichnen sich durch eine relativ hohe Dichte ( $>2\text{g/dl}$ ) aus und sind chemisch inert. Dies verhindert eine Metabolisierung zu möglicherweise toxischen oder wirkungslosen Abbauprodukten. Nach intravenöser Applikation beträgt die intravasale Halbwertszeit der Perfluorocarbone etwa 2-5 Stunden. Die Halbwertszeit ist abhängig von der Partikelgröße, wobei sie zunimmt, je kleiner die Partikel sind. Perfluorocarbone werden aus dem Blut vermittelt durch Makrophagen in das mononukleäre Phagozytosesystem (MPS) umverteilt, was zu einer Anreicherung vor allem in Leber und Milz führt. Die Halbwertszeit im MPS beträgt 2 bis 5 Tage. Nach Aufenthalt der Perfluorocarbone im MPS reichern sie sich im Fettgewebe an, wo sie bis



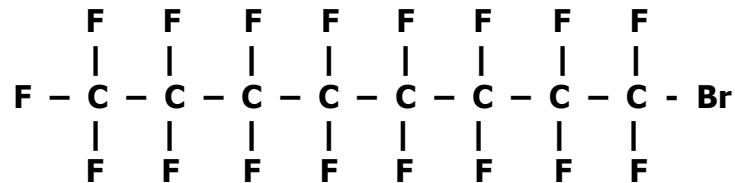
zu mehreren Monaten verbleiben, um anschließend durch allmählichen Übertritt ins Blut in die Lunge zu gelangen und dort abgeatmet zu werden.

Perfluorocarbone sind in der Lage große Mengen Kohlendioxid, Sauerstoff und andere Gase physikalisch zu lösen. Dabei ist die Menge an gelöstem Gas direkt proportional zu dem Partialdruck des Gases. Für die klinische Anwendung bedeutet dies, dass die Höhe der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration direkt die Menge an gelöstem Sauerstoff bestimmt. Bei einem  $pO_2$  von 600 mmHg gewährleisten die neueren PFC-Emulsionen einen Sauerstoffgehalt, der im Bereich des intraerythrozytären Hämoglobins liegt (Hämoglobin: 20 ml  $O_2$  / dl; Perflurbron: 17 ml  $O_2$  / dl). Um einen Sauerstofftransport durch PFC in das Gewebe zu gewährleisten, muss also die inspiratorische Sauerstoffkonzentration relativ hoch sein. Ein wesentlicher Vorteil der Perfluorocarbone besteht darin, dass sie Sauerstoff leicht in der Peripherie im Gewebe abgeben können. Da der Sauerstoff im PFC physikalisch gelöst und nicht wie beim Hämoglobin kovalent gebunden ist, kann in hypoxischem Gewebe nahezu der gesamte Sauerstoff aus dem Intravasalraum abgegeben werden. Weitere Vorteile der Perfluorocarbone sind die extrem geringe Viskosität und die im Vergleich zum Erythrozyten sehr viel kleinere Partikelgröße (0,2-0,4  $\mu\text{m}$  Durchmesser). Dies macht die Perfluorocarbone zu einem idealen Sauerstoffträger für Gewebe und Organe, die von kritisch reduzierter Perfusion betroffen sind.

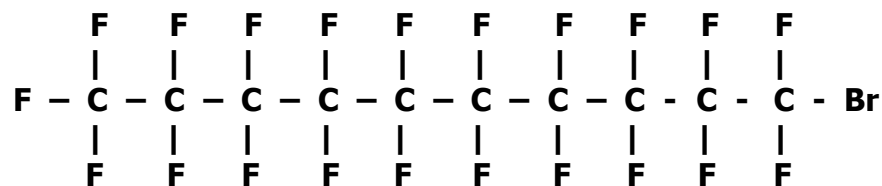
In dieser Arbeit soll die PFC-Emulsion, Oxygent® (Alliance Corp., San Diego, USA) zur Anwendung kommen, welche auf Perflubron (Perfluorooctylbromid 68%:  $C_8F_{17}Br$ ) und PFDP (Perfluorodecylbromid 2%:  $C_{10}F_{21}Br$ ) basiert.

**Abbildung 2.3.** Strukturformel von Perfluorooctylbromid (1) und Perfluorodecylbromid (2)

**1)**



**2)**



Die Emulsion setzt sich aus 60% Perflubron, 3,6% Eigelb-Phospholipiden und Lecitin zusammen. Oxygent® ist bei Zimmertemperatur für mehrere Stunden stabil und kann bei Kühlschranktemperatur (+4°C) für mehrere Monate gelagert werden.

Die gute Verträglichkeit von Oxygent® konnte im Tiermodell und in der klinischen Erprobung am Menschen in Dosierungen von bis zu 2,7 g/kg KG gezeigt werden [50-52]. An klinischen Nebenwirkungen konnten lediglich grippeähnliche Symptome, die auf kurzfristige Ausschüttung von Cytokinen zurückzuführen sind, eine dosisabhängige Thrombozytopenie, die ohne klinische Relevanz blieb sowie eine temporäre Erhöhung von Leberenzymen festgestellt werden.

Wie erwähnt besteht ein Nachteil der Perfluorocarbone darin, dass eine hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentration von 50% bis 100% zur ausreichenden Lösung von Sauerstoff gewährleistet sein muss. Somit ergeben sich Anwendungsmöglichkeiten vor allem bei beatmeten Patienten im Zusammenhang mit einer präoperativen, akuten,

normovolämischen Hämodilution. So konnte für Oxygent® in einer klinischen Studie bei orthopädischen Eingriffen mit hohem Blutverlust gezeigt werden, dass Oxygent® im Vergleich mit kolloidalen Lösungen und Erythrozytenkonzentraten in der Lage ist, über einen signifikant längeren Zeitraum und bei einem höheren Anteil von Patienten das Auftreten von definierten Transfusionstriggern wie Hypotension, Tachykardie, reduzierter gemischtvenöser Sauerstoffsättigung zu verhindern. Präoperativ wurde bei den Patienten im Rahmen einer Hämodilution ein Zielhämoglobinwert von 9 g/dl erreicht und anschließend wurde mit jeweils 450 ml einer kolloidalen Lösung, Erythrozytenkonzentraten oder 0,9 bzw. 1,8 g/kg KG Oxygent® substituiert [52].

#### **2.4. Myokardinfarkte und alternative Sauerstoffträger**

Ein akuter thrombotischer Verschluss eines Herzkranzgefäßes ist die Ursache des Herzinfarktes bei der überwiegenden Anzahl der Patienten [53]. Die Ischämie des Herzmuskels bewirkt eine Diskrepanz zwischen myokardialem Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf.

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der Perfluorocarbone (PFC) die Ausbildung von Ischämie- und Reperfusionsschäden am Herzmuskel reduzieren können [4, 54-57]. In den USA liegt deshalb eine Zulassung für PFC für die intrakoronararterielle Applikation bei der percutanen transluminalen coronaren Angioplastie (PTCA) vor. Die angeführten Studien untersuchten allerdings überwiegend PFC-Lösungen mit geringer Sauerstofftransportkapazität sowie ausschließlich einen therapeutischen Einsatz der Lösungen, d.h. dass die Gabe erst nach erfolgter Ischämie erfolgte. Der Nachteil auch bei der Anwendung moderner PFC-Lösungen liegt in der Notwendigkeit, eine hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentration von 50-100% gewährleisten zu müssen, da nur so eine ausreichende Menge an Sauerstoff physikalisch gelöst werden kann [7]. Der Vorteil von HBOC liegt demgegenüber in der wirksamen Abgabe einer nachweisbaren Menge an Sauerstoff unter Atmung von Raumluft (21% O<sub>2</sub>) und der geringen Dosis von HBOC, die für eine Augmentierung des Gewebs-pO<sub>2</sub> notwendig ist (0,4 g kg<sup>-1</sup>), d.h. nur 200-250 ml auf den Menschen übertragen [43,44].

Zur prognostischen Bedeutung perioperativer Myokardischämien liegen zahlreiche klinische Untersuchungen vor [29, 30, 58]. In einer Studie von MANGANO et al. zur

perioperativen kardialen Morbidität und Mortalität bei nicht kardiochirurgischen Eingriffen fanden sich an 474 Patienten mit nachgewiesener koronarer Herzerkrankung bzw. mit Risikofaktoren für eine koronare Herzerkrankung. Bei 18% dieser Patienten traten postoperative kardiale Komplikationen wie akute Herzinsuffizienz, instabile Angina pectoris, ventrikuläre Tachykardie, Myokardinfarkt oder akuter Herztod auf. Mit dem Auftreten unmittelbar postoperativer Myokardischämien war das Risiko kurzfristig nachfolgender ischämischer Komplikationen wie Angina pectoris, Myokardinfarkt oder akutem Herztod um mehr als das 9-fache erhöht. Auch im Hinblick auf die Langzeitprognose über 2 Jahre zeigte sich, dass kardiale Komplikationen mehr als doppelt so häufig auftraten, wenn perioperative Myokardischämien detektiert wurden [29]. In einer Übersichtsarbeit weisen BÖTTIGER und MARTIN darauf hin, dass die schwersten Ischämien am Ende des chirurgischen Eingriffs bzw. im Zusammenhang mit der Ausleitung der Narkose zu erwarten sind [27].

Eine Besonderheit perioperativer Myokardischämien besteht darin, dass das Risiko ihres Auftretens oft schon bei Planung und Vorbereitung der Narkose bekannt ist. Somit bietet sich die Möglichkeit einer zeitlich begrenzten prophylaktischen Intervention bei Patienten mit hoch eingeschätzter Gefährdung durch perioperativ auftretende Myokardischämien an. Ein möglicher prophylaktischer Einsatz von HBOC oder PFC bei kardialen Risikopatienten stellt einen völlig neuartigen Ansatz zur perioperativen Risikoreduktion dar. Bei kardialen Hochrisikopatienten gibt es einige andere Strategien zur Minimierung des Narkoserisikos. Zu nennen sei die verbreitet angewandte perioperative  $\beta$ -Adrenozeptoren-Blockade [59-61]. Auch für die Anwendung von Statinen [62, 63] und thorakalen Epiduralkathetern [64] existieren Studien, die auf eine perioperative Risikoreduktion hinweisen. Neben den eben beschriebenen Strategien könnten HBOC oder PFC über einen völlig anderen Wirkmechanismus das Risiko von Myokardischämien oder deren Konsequenzen (z.B. maligne Rhythmusstörungen oder Myokardinfarkte) reduzieren.

Eine tierexperimentelle Untersuchung zu den Auswirkungen einer Applikation von PFC vor bzw. nach Anlage einer Okklusion der linken Koronararterie mit anschließender Reperfusion stellt vor diesem Hintergrund den ersten Schritt für eine innovative auf Vorbeugung beruhende klinische Behandlungsstrategie dar.

## 2.5. Reperfusionsschäden

Myokardischämien können am wirkungsvollsten durch möglichst rasch wiederhergestellten Blutfluss (Reperfusion) im betroffenen Gewebe behandelt werden, da von der Dauer der Ischämie die Funktion und die Erholung des Gewebes stark determiniert wird. Es stehen mehrere Techniken zur Wiederherstellung des Blutflusses zur Verfügung. Zu nennen sei die medikamentöse Thrombolyse, die operative Anlage von Bypässen oder die PTCA mit Ballonerweiterung bzw. des Setzen eines Stents in die okkludierte Koronararterie. Mit Wiederherstellung des Blutflusses werden aber auch bedrohliche Reaktionen im von der Ischämie geschädigten Gewebe hervorgerufen. Hier soll im Besonderen auf drei bedeutende Reperfusionsschäden eingegangen werden: das myokardiale Stunning, die mit Reperfusion vergesellschafteten Arrhythmien und der vaskuläre Reperfusionsschaden.

### 2.5.1. Myokardiales Stunning

Das myokardiale Stunning ist definiert als eine verlangsamte Erholung vitaler Herzareale, die von einer Ischämie gefolgt von einer Reperfusion betroffen sind. Die verlangsamte Erholung des Herzgewebes äußert sich in einer deutlich eingeschränkten Funktion trotz der Wiederherstellung des Blutflusses [65, 66]. Die Ausprägung dieses Reperfusionsschadens ist von der Dauer und dem Ausmaß der vorangegangenen Ischämie abhängig. Viele Studien belegen diese verspätete Wiederherstellung systolischer und diastolischer Herzfunktionen. So kann nach einer erfolgreichen Thrombolyse die Herstellung einer zufriedenstellenden Herzleistung von 10 Tagen bis hin zu mehreren Wochen dauern [66-70]. Eine schnellere Verbesserung der Herzfunktion konnte bei Patienten festgestellt werden, bei denen eine Reperfusion innerhalb der ersten 4 Stunden nach Auftreten von infarktbedingten Schmerzen erreicht wurde. Bei der Vergleichsgruppe betrug das Ischämie-Intervall mehr als 4 Stunden. Hier wurde eine vergleichbare Erholung des Herzens entweder erst nach längerer Zeit, oder gar nicht erreicht [70].

### 2.5.2. Arrhythmien

Jährlich sterben etwa 100.000 Menschen in Deutschland am plötzlichen Herztod. Bei den lebensbedrohlichen Rhythmusstörungen handelt es sich vor allem um Kammerflimmern, Tachykardien und Asystolien [71]. In der überwiegenden Zahl der Fälle ist die koronare Herzerkrankung der auslösende Faktor. In 40% findet sich ein akuter Myokardinfarkt, in 39% ein transientes myokardischämisches Ereignis und nur in 20% kommt es zu einer lebensbedrohlichen Arrhythmie ohne Störung der Myokarddurchblutung [72]. Kardiale Arrhythmien sind damit eine typische und relativ häufige Folge von myokardialen Perfusionsstörungen mit konsekutiver Sauerstoffminderversorgung des betroffenen Gewebes. Darüber hinaus treten in der Reperfusionphase verstärkt Arrhythmien auf. Besonders eine Belastung mit freien Sauerstoffradikalen zu Beginn der Reperfusion wird als Auslöser von Arrhythmien diskutiert [73-76]. Eine Reduktion von zellulären Ischämie- und Reperfusionsschäden kann zur einer verringerten Mortalität durch eine Reduktion von Arrhythmien führen [75].

### 2.5.3. Vaskuläre Reperfusionsschäden (no-reflow phenomenon)

Kommt es trotz Beseitigung eines infarktverursachenden Flusshindernisses in den Koronarien zu einer Einschränkung der Gewebsdurchblutung, spricht man vom no-reflow Phänomen [75, 95, 96].

Bei der Entwicklung von diesen Reperfusionsschäden spielen neben Inhibition der NO-Wirkung im Endothel und Entstehung von Sauerstoffradikalen auch Entzündungsreaktionen im Gewebe eine Rolle. Die wichtigsten Mechanismen, die zum no-reflow Phänomen führen sollen im Folgenden kurz dargestellt werden.

#### 2.5.3.1. *Einschränkung der Stickstoffmonoxyd (NO) Wirkung*

Der Botenstoff NO bewirkt eine Vasodilatation in Blutgefäßen. Die Reperfusion kann jedoch dazu führen, dass NO im Endothel nicht mehr in einer Menge vorhanden ist, die einen ausreichenden Blutfluß innerhalb der Kapillaren gewährleistet. Der Verbrauch von NO resultiert u.a. aus dessen Eigenschaft eine Verbindung mit Sauerstoffradikalen

einzuweisen, deren Entstehung insbesondere durch Reperfusion hervorgerufen werden kann. Dies führt zu einer Vasokonstriktion, die in einer Perfusionsminderung des Gewebes endet [78, 79].

#### 2.5.3.2. *Freie Sauerstoffradikale*

Mit Beginn der Reperfusion kommt es zur vermehrten Entstehung von freien Sauerstoffradikalen [79-85]. Zu ihnen gehören das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ), Hydrogen Peroxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxyl-Radikal ( $OH\cdot$ ). Unter normalen physiologischen Bedingungen kommt es vor allem im mitochondrialen Elektronentransportsystem zur Bildung von Sauerstoffradikalen. Auch im endoplasmatischen Retikulum und in nukleären Membranen können Sauerstoffradikale entstehen. Die Zelle verfügt über verschiedene Mechanismen, diese Radikale zu entgiften. Hier spielt vor allem das im Zytosol und im Mitochondrium vorhandene Enzym Superoxyd-Dismutase (SOD) eine Rolle [86]. Während einer Ischämie und vor allem kurz nach Reperfusion kommt es zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen. Sie entstehen in Mitochondrien, werden vom vaskulären Enzym Xantinoxidase und von neutrophilen Granulozyten gebildet [86, 87]. Je nach Ausprägung und Dauer der Ischämie kann es zu einer Überlastung der zelleigenen Entgiftung der Sauerstoffradikale kommen. Das übermäßige Anfallen von Sauerstoffradikalen kann folgende Effekte auf die betroffenen Zellen haben:

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Proteine, die Bestandteile der Zell- und Mitochondrienmembran sind, werden oxydiert. Es kommt aufgrund der entstehenden Membranschäden zu einer erhöhten zytosolischen Calciumkonzentration. Dies führt zur

- Aktivierung von Proteinkinasen, Phospholipasen und anderen am Abbau von Zellbestandteilen beteiligten Enzymen
- Triggerung weiterer Sauerstoffradikalentstehung durch Aktivierung der endothelialen Xantinoxidase
- Abnahme der Sensitivität der Mikrofilamente für  $Ca^{++}$ , was zu myokardialem Stunning führt
- Veränderung des Ablaufes des Aktionspotentials, wie frühe und späte Nachpolarisation und erhöhte Neigung zur ektopen Reizentstehung, was die

Entstehung von Arrhythmien hervorruft

- Auftreten von chromosomalen Aberrationen und DNA-Schäden
- Inaktivierung von NO
- Aktivierung des Komplementsystemes
- Expression von Adhäsionsproteinen wie P-Selektin, was zur Verlegung der Kapillaren durch am Endothel angelagerte neutrophile Granulozyten führt [73].

### 2.5.3.3. *Das Komplementsystem*

Zur Initiation und Aufrechterhaltung einer Entzündungsreaktion ist eine Aktivierung des Komplementsystems notwendig. So kommt es auch im Rahmen des Reperfusionsschadens zu einer Reaktion des Komplements [88, 89]. Für Sauerstoffradikale wurde gezeigt, dass diese in der Lage sind, direkt eine Aktivierung des Komplementsystems zu erreichen [89, 90].

Die Komplementreaktion wird durch Anaphylatoxine (u.a. C3a, C4a und C5a) vermittelt. C3a, C4a und C5a wirken direkt vasokonstriktorisch, verstärken die Gefäßpermeabilität und vermitteln eine Freisetzung der Entzündungsmediatoren Histamin, so wie von Thromboxanen und Leukotrienen. Durch diese Entzündungsmediatoren kommt es u.a. zu einer Schwellung der Endothelzellen, so dass das Gefäßlumen verengt wird und sich die Gewebperfusions verschlechtert. C5a wirkt als starker Auslöser von Chemotaxis, die eine Adhäsion und Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das Endothel zur Folge hat [88, 89].

Zur Komplementreaktion gehört auch die Bildung des „Membrane Attack Complex“ (MAC, C5b-9).

Dieser ist in der Lage, Zellmembranen durch das Einfügen von transmembranösen Poren-Proteinkomplexen zu attackieren. Der Effekt des folgenden  $Ca^{++}$ -Einstromes wurde in Abschnitt 2.5.3.2. beschrieben. Eine hohe Konzentration von MAC hat Zellyse zur Folge. Durch Vermittlung von P-Selektin kann der MAC eine gesteigerten Adhäsion von neutrophilen Granulozyten bewirken.



Neutrophile Granulozyten sind maßgeblich an der Abwehr von in den Körper eingedrungenen pathogenen Keimen beteiligt. Sie sind auch für die physiologische Antwort auf Gewebsschäden verantwortlich. Die Bedeutung der neutrophilen Granulozyten in Bezug auf Ischämie- und Reperfusionsschäden setzt sich aus folgenden Reaktionen zusammen:

- Freisetzung von verschiedenen Proteinasen (Elastase, Collagenase, Gelatinase) [91]
- Freisetzung von Entzündungsmediatoren insbesondere von Leukotrien B<sub>4</sub>, Thromboxan A<sub>2</sub> und PAF (Platlet aktivating faktor) [77, 91, 92].
- Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen [77, 91, 92].
- Anlagerung von neutrophilen Granulozyten an das Endothel, was zur Behinderung des Blutflusses in kleinen Gefäßen und Kapillaren führt. Es kommt zu sogenanntem Rolling und Sticking, das heißt zu einem durch die erhöhte Affinität der Leukozyten zum Endothel ausgelösten verlangsamten Rollbewegungen der Leukozyten entlang der Endothelwand bzw. zu Verschlüssen kapillärerer Strombahnen [65, 77, 93, 94].

Diese Reaktionen führen zu einer Schwellung der Endothelzellen (Gewebsödem) und somit zu einer Einengung des Gefäßlumens. Die durch neutrophilen Adhäsion hervorgerufene Perfusionsbehinderung wird infolgedessen weiter verschlechtert.

## **2.6. Mögliche Wirkungen von HBOC / PFC auf Ischämie- und Reperfusionsschäden**

### 2.6.1. Wirkungen von PFC auf Ischämie- und Reperfusionsschäden

Die Partikelgröße der in Oxygent<sup>®</sup> enthaltenen PFC beträgt nur etwa 1/70 der Größe eines Erythrozyten und PFC Emulsionen verfügen über eine geringe Viskosität. Somit besteht die Möglichkeit, mit PFC von Ischämie und Reperfusion betroffenes Herzgewebe mit Sauerstoff zu versorgen, das aufgrund der Adhäsion von Neutrophilen am Endothel und der entzündlichen Schwellung des Gewebes von Erythrozyten nicht mehr erreicht werden kann [95].

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass PFC die Funktion von neutrophilen Granulozyten hemmen kann [7, 57, 56, 96]. Dies hat vor allem hemmenden Einfluss auf die gewebsschädigenden Einflüsse der neutrophilen Granulozyten, wie Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Endotheladhäsion bzw. Chemotaxis.

### 2.6.2. Wirkungen von HBOC auf Ischämie- und Reperfusionsschäden

Auch polymerisierte Hämoglobinmoleküle haben wie PFC-Partikel eine sehr viel geringere Größe, als ein Erythrozyt. Somit verfügen sie über ähnliche positive rheologische Eigenschaften wie das PFC.

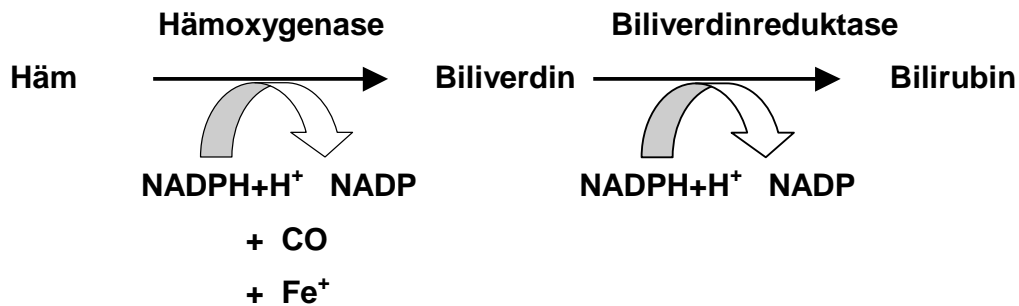
#### 2.6.2.1. *Hämoxygenase 1 und Ischämie-/ Reperfusionsschäden*

Für andere künstliche Blutersatzstoffe auf Hämoglobinbasis konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, eine vermehrte Expression des Hitzeschockproteins Hämoxygenase 1 (HO-1, Synonym: HSP 32) hervorzurufen [97]. In vielen Studien konnte belegt werden, dass HO-1 einen protektiven Einfluss bezüglich Ischämie- und Reperfusionsschäden ausübt [10-20].

HO-1 ist wie Hämoxygenase 2 (HO-2) am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Abbaus von Häm zu Bilirubin beteiligt (Abb. 2.3). HO-1 und HO-2 sind Isoenzyme, wobei HO-2 in einer konstanten vergleichsweise geringen Menge in der Zelle vorhanden

ist. Die Expression von HO-1 erfolgt aufgrund verschiedener Stimuli und kann um ein Vielfaches höher ausfallen, als die der HO-2 [9].

**Abb. 2.4.** Reaktionsgleichung des Hämabbaus durch Hämoxxygenase



Für die protektive Wirkung der HO-1 sind folgende Eigenschaften verantwortlich:

- Das beim Hämabbau freiwerdende Kohlenstoffmonoxyd ( $\text{CO}$ ) ist wie  $\text{NO}$  ein Mediator für Relaxierung von glatter Gefäßmuskulatur. Es kann somit der Verengung der Gefäße während der Reperfusion entgegenwirken [11, 20].  $\text{CO}$  verhindert darüber hinaus das Auftreten von kardialen Arrhythmien [11, 12].
- Biliverdin und Bilirubin sind potente Radikalfänger. Es konnte gezeigt werden, dass Bilirubin den Schaden durch Sauerstoffradikale in der Reperfusion signifikant verringern kann [19].
- HO-1 greift in die Regulation von endothelialen Signalproteinen ein, die eine Adhäsion von neutrophilen Granulozyten vermitteln (ICAM). Aufgrund dieser Wechselwirkung kann der Schaden durch neutrophile Granulozyten in der Reperfusion vermindert werden [98].
- Durch Hochregulation von Cyclooxygenase 2 (COX 2) durch HO-1 Aktivität kommt es zur Ausschüttung der Prostaglandine  $\text{PGI}_2$  und  $\text{PGE}_2$ .  $\text{PGI}_2$  hat einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenaggregation, was die Durchblutung des ischämischen bzw. reperfundierten Myokards verbessert.  $\text{PGE}_2$  wirkt vasodilatatorisch und hemmt Immunreaktionen (Makrophagenfunktion, T-Killer- und Helferzellen), was ebenfalls Ischämie- und Reperfusionsschäden verhindert [99, 100].

### **3. Material und Methodik des tierexperimentellen Versuches / PFC**

#### **3.1. Tierschutz**

Für die in dieser Arbeit vorgestellte Versuchsreihe wurde nach veterinärmedizinischer Begutachtung eine Genehmigung des BAGS der Freien und Hansestadt Hamburg erteilt (Antragsnummer 51/02). Die Versuche wurden entsprechend dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ von 1996 des National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, durchgeführt [101].

#### **3.2. Statistik und Fallzahlberechnung**

Ausschlaggebend für die Kalkulation der Fallzahl war als Hauptzielparameter das Infarktareal als Anteil an der „Area at Risk“ im Nachweis mittels Färbung mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid nach Demarkierung der „Area at Risk“ durch „in vivo“-Injektion von Patentblau. Zugrundegelegt wurden die Effekte, die mit Perfluorocarbonen in vergleichbaren Modellen erzielt wurden [102]. Entsprechend diesen Ergebnissen wurde eine Reduktion des Areals um 25% in der Prophylaxe- (1) oder Therapie-Gruppe (2) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (3) angenommen. Die Bestimmung der notwendigen Gruppengröße erfolgte Computergestützt (InStat, Graphpad Corp, CA, USA). Bezogen auf den Hauptzielparameter ( $\alpha$ -Fehler: 5%,  $\beta$ -Fehler 20%, Power: 0,8) ergab sich somit zunächst eine Anzahl von 10 Tieren pro Gruppe, die komplett den Versuch durchlaufen müssten. Aus ethischen Gründen wurde der Bedarf an Versuchstieren möglichst gering gehalten. Deshalb erfolgte eine blockweise Randomisierung von jeweils 8 Tieren und eine Zwischenanalyse nach jeweils 8 Tieren, die den Versuch komplett durchlaufen hatten. Erreichte ein Tier nicht das geplante Versuchsende wurde der Versuch bezogen auf die Randomisierungsliste als nicht erfolgt gewertet. Nach Erreichen eines Signifikanzniveaus von  $<0,05$  für den Unterschied zwischen einer der Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe bezogen auf den Hauptzielparameter wurde die Versuchsreihe geplant beendet. Aufgrund einer hohen frühzeitigen Mortalität von 40-50% entsprechend anderen Publikationen [103] im

myokardialen Infarktmodell der Ratte wurde zunächst eine entsprechend höhere Tierzahl für den Versuch beantragt. Es wurden für die Parameter, die sich auf die Größe der Infarktareale bezogen nur Tiere in die Auswertung eingeschlossen, die den Versuch komplett durchlaufen haben. Für das Nebenzielkriterium der Arrhythmien wurden alle Tiere in die Auswertung eingeschlossen, die den Zeitpunkt der Randomisierung erreicht hatten, unabhängig davon zu welchem Zeitpunkt sie im weiteren Verlauf verstarben oder den Versuch komplett durchliefen.

Die statistische Auswertung erfolgte Computergestützt mittels SPSS 9,0. Kontinuierliche, wiederholte Parameter wurden mittels ANOVA mit  $\alpha$ -Korrektur für Messwertwiederholung (Varianzgleichheit: Bonferoni, Varianzungleichheit: Dunit-C) verglichen. Infarktgrößen (TTC), wurden mittels zwei-seitigem T-Test für unverbundene Stichproben verglichen. Bei ordinalen Daten (Arrhythmien) erfolgte die Testung zwischen den Gruppen mittels Mann-Whitney U-Test. Ein  $p \leq 0,05$  wurde als signifikant angenommen.

### **3.3. Operativer Versuchsablauf**

#### 3.3.1. Versuchsgruppen

Für den vorliegenden kardialen Ischämie- und Reperusionsversuch teilten wir die Versuchstiere in jeweils eine Prophylaxe-Gruppe (1), eine Therapie-Gruppe (2), eine Kontrollgruppe, die kein PFC erhielt, jedoch mit 100% Sauerstoff beatmet wurde (3) und eine Kontrollgruppe, die kein PFC erhielt und mit 30% Sauerstoff beatmet wurde (4).

#### 3.3.2. Versuchstiere

##### 3.3.2.1. *Art*

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Sprague-Dawley-Ratten, die wir mittelbar über die Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vom Züchter Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

### 3.3.2.2. *Haltung*

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn mindestens 5 Tage zur Gewöhnung in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus, 20°-22°C Raumtemperatur und 50-60%iger relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Ernährung bestand aus SNIFF Standarddiät (Hamburg) und Wasser ad libitum. Ab dem Vorabend des Versuches wurden die Tiere nüchtern belassen, hatten allerdings weiter freien Zugang zu Wasser. Der Transport zum Labor erfolgte in einer gewärmten Transportbox.

### 3.3.3. *Narkose und Präparation*

Um die Letalität im myokardialen Ischämiemodell so gering wie möglich zu halten, wurde das Narkoseregime im Rahmen der Etablierung des Modells vor Beginn des Hauptversuches fortlaufend optimiert. Im Folgenden wird im Detail die Narkoseführung und Präparation dargestellt. Die wesentlichen Schritte sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

Die Versuchstiere wurden vor Beginn des Versuches durch eine intramuskuläre Gabe von Ketamin (80 mg kg<sup>-1</sup>) und Midazolam (3 mg kg<sup>-1</sup>) in Allgemeinanästhesie versetzt. Hierbei wurde ein maximales Injektionsvolumen von 0,2 ml je Muskel nicht überschritten [104]. Nach Aussetzen der Abwehrbewegungen wurden die Tiere auf einen beheizbaren Kleintier-OP-Tisch (Heated Rodent Operating Table, Harvard Apparatus) gelagert. Unter Sauerstoffinsufflation, EKG-Ableitung, rektaler Temperaturmessung und Pulsoximetrie erfolgte nach Lokalinfiltration (Lidocain 0,1%: 0,5 ml) eine Tracheotomie. Nach Anlage eines zentralen intravenösen Zuganges über die V. cava superior wurde die Narkose als total-intravenöse Anästhesie mit Midazolam (10 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) und einem Fentanylbolus (7,5 µg kg<sup>-1</sup>) aufrechterhalten. Die weitere Fentanylapplikation wurde dem individuellen Bedarf der Tiere angepasst, der durch Beurteilung der Narkosetiefe anhand des Verhaltens von Pulsfrequenz, Blutdruck und Reflexstatus festgestellt wurde. Zur Erhaltung des Flüssigkeitshaushaltes wurde den Tieren insgesamt 20 ml kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Flüssigkeit zugeführt. Dieses Volumen setzte sich aus der Midazolam-Lösung und NaCl 0,9% zusammen. Die Ratten wurden unter dieser Medikation mit einem Sauerstoff-/Luftgemisch kontrolliert beatmet (Inspira Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus). Die FIO<sub>2</sub> betrug dabei situationsadaptiert 0,3 bis 1,0. Es wurden

Normocapnie, Normothermie und Normoglykämie gewährleistet. Der Kohlendioxidpartialdruck wurde kontinuierlich endexpiratorisch (Monitoreinheit mit Mainstream-Messung, Fa. Datex-Ohmeda) und intermittierend arteriell (Radiometer Kopenhagen) bestimmt. Die Wärmung erfolgte ergänzend zum beheizbaren Kleintier-OP-Tisch mit Wärmelampen. Zur Durchführung von Blutgasanalysen und zur kontinuierlichen Messung des Blutdruckes erfolgte die Anlage eines arteriellen Zuganges in die rechte Femoralarterie. Während der gesamten weiteren Präparationphase betrug die  $\text{FIO}_2$  1,0 unter kontrollierter Beatmung. Nach linksseitiger Thorakotomie im vierten oder fünften Interkostalraum wurde die Beatmung mit positiv-endexpiratorischem Druck (3-5 mbar) fortgesetzt, um eine Atelektasenausbildung zu vermeiden. Es erfolgte die Perikardiotomie zur Darstellung der linken Koronararterie zwischen dem Ansatz des Truncus pulmonalis und linkem Herzohr. Anschließend wurde das Herz in üblicher Technik aus dem Thorax luxiert, ein 6-0 Seidenfaden mittels Unterstechung um die linke Koronararterie nahe des Ursprungs gelegt und das Herz nach thorakal reponiert [105]. Beide Fadenenden wurden zum Schutz des Gefäßes ähnlich den Angaben anderer Autoren [106] durch ein Filzplättchen (Meadox Dacron Felt) und anschließend durch einen 1 cm langen Polyethylen-Schlauch (Perfusorleitung, Fa. Braun Melsungen, Außendurchmesser: 1,5 mm) geführt. Durch Fadenspannung konnte somit eine Unterbindung des Gefäßes erfolgen [107]. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die randomisierte Gruppeneinteilung. Nach Randomisierung wurde eine Erholungsphase von 30 Minuten durchgeführt und die  $\text{FIO}_2$  bei Tieren der Gruppe 4 wurde auf 0,3 reduziert.. Während des Versuches erfolgte eine engmaschige Messung von Hämodynamik, Blutgasen, Sauerstoffgehalt, Hämoglobinkonzentrationen, Temperatur und Blutzucker. Zehn min nach der Erholungsphase wurden die ersten Messungen im Rahmen von Messpunkt 1 vorgenommen. Die zeitliche Abfolge der Messpunkte sowie die einzelnen Messparameter sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Nach Messpunkt 3 erfolgte in der Prophylaxe-Gruppe (1) die Gabe von  $6 \text{ g kg}^{-1}$  Perflubron® Emulsion während die Tiere der Gruppen 2-4 jeweils 2 ml NaCl 0,9% erhielten. Die Gabe erfolgte intravenös (ZVK) über 5 min. Direkt nach dem Ende der Applikation erfolgte Messpunkt 4. Fünfzehn min nach Ende der Applikation wurde in den Gruppen 1-4 die Koronarligatur für 25 min zugezogen. Nach 10 min Ligatur erfolgte in der Therapiegruppe (2) die Gabe von  $6 \text{ g kg}^{-1}$  Perflubron® Emulsion während die Tiere der anderen Gruppen wiederum 2 ml NaCl zum Volumenausgleich erhielten. Die Koronarligatur wurde nach 25 min Ischämiezeit

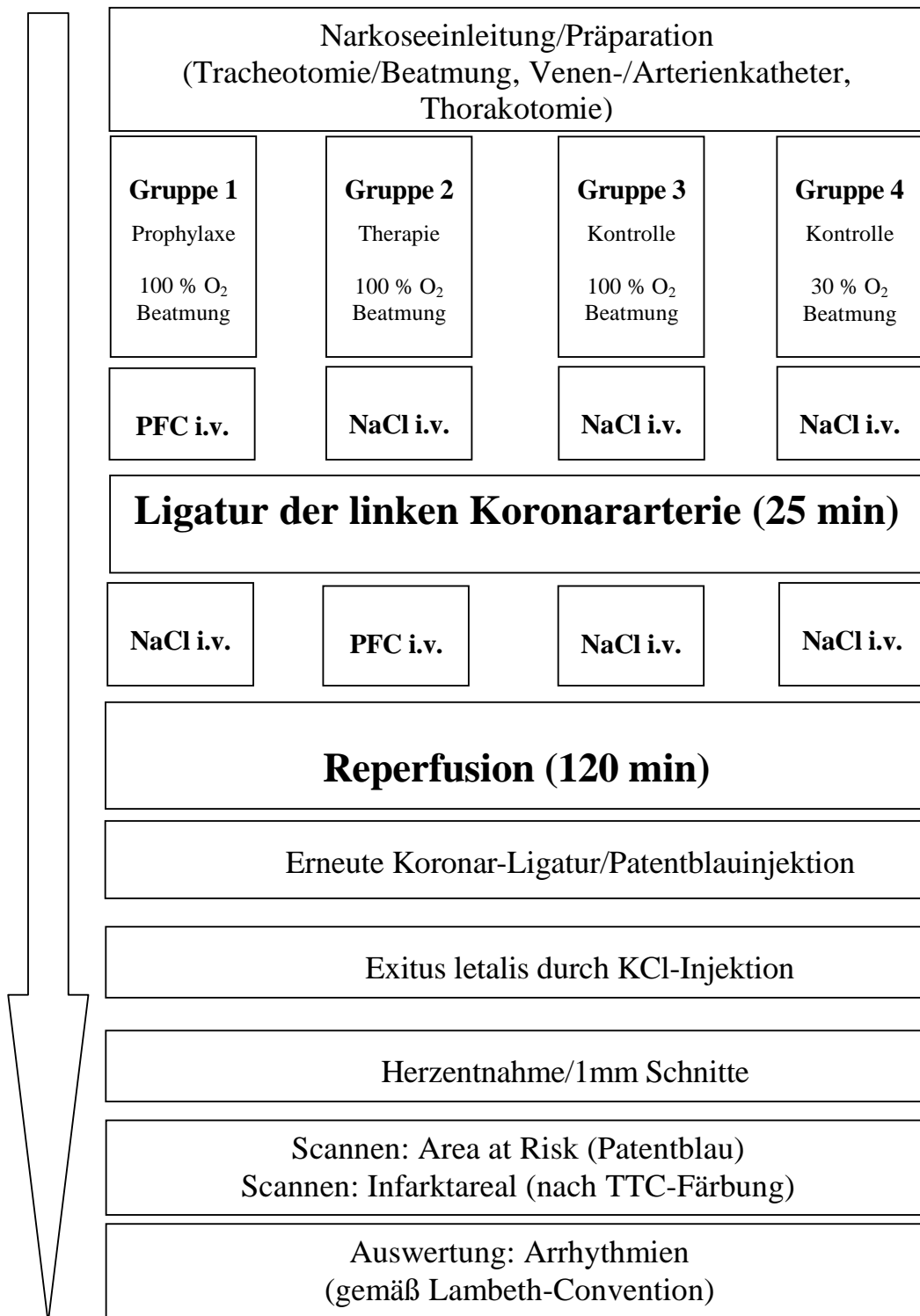
beendet. Nach einer Reperfusion von 120 min wurde die Koronarligatur erneut zugezogen. Die Tiere erhielten, entsprechend internationalem Standard [108] zur Darstellung der „Area at Risk“ 2 ml Patentblau (Sigma Chemicals GmbH, Deutschland) intravenös (ZVK) injiziert. Der Exitus letalis wurde anschließend durch KCl-Injektion ( $2 \text{ mmol kg}^{-1}$  KCl 7,45%) herbeigeführt. Es erfolgte die sofortige Entnahme des Herzens nach Absetzen an den großen Gefäßen. Während des gesamten operativen Verlaufes wurde versucht alle gemessenen Parameter im Normbereich zu halten. Dies beinhaltete insbesondere die Gabe von NaCl 0,9% (bei einem ZVD < 5 mmHg), Natrium-Bicarbonat 8,4% (bei einem SBE < -5 mmol l<sup>-1</sup>), Calcium-Chlorid (bei einem ionisierten Ca<sup>2+</sup> < 1,0 mmol l<sup>-1</sup>), Glukose 10% (bei einem BZ < 70 mg dl<sup>-1</sup>). Die FIO<sub>2</sub> wurde in Gruppe 4 ebenfalls angepasst, sofern der PaO<sub>2</sub> unter 70 mmHg abfiel. Darüberhinaus erfolgte bei Auftreten von Kammerflimmern der Versuch einer Defibrillation mittels „thumb version“ [109].



**Tabelle 3.1.** Übersicht der intraoperativen Messpunkte und Parameter (Die verwendeten Abkürzungen sind im Anhang unter 7.1 erläutert).

Messpunkt	Zeitpunkt	Messparameter
1	Ruhephase +10 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
2	Ruhephase +20 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
3	Ruhephase +30 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
4	Applikation +5 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
5	Applikation +10 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
6	Applikation +20 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
7	Ligatur +5 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
8	Applikation 2	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
9	Ligatur +25min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
10	Reperfusion +10 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
11	Reperfusion +20 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
12	Reperfusion +30 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
13	Reperfusion +40 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
14	Reperfusion +50 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
15	Reperfusion +60 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
16	Reperfusion +70 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
17	Reperfusion +80 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
18	Reperfusion +90 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
19	Reperfusion +100 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
20	Reperfusion +110 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.,
21	Reperfusion +120 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.

**Abb. 3.1.** Schematische Darstellung des Versuchsablaufs



### 3.3.4. Intraoperative Messwerte

#### 3.3.4.1. *Inspiratorische Sauerstoffkonzentration und Capnometrie*

Die inspiratorische Konzentration wurde kontinuierlich über eine in das Reservoir des Beatmungsgerätes eingebrachte Elektrode (Oxydig, Dräger, Lübeck) gemessen, die direkt vor dem Ansaugschlauch platziert wurde. Der endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Partialdruck wurde kontinuierlich mit einem Normocap™ Monitor (Datex-Omega, Helsinki, Finnland) gemessen und graphisch auf dem Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) dargestellt. Diese Messung wurde nur qualitativ genutzt um eine Dislokation oder Verlegung der Trachealkanüle frühzeitig zu detektieren. Eine quantitative Messung ist beim Kleintier mit einer ungeblockten Trachealkanüle nicht verlässlich. Die Werte wurden dementsprechend nicht ausgewertet.

#### 3.3.4.2. *Hämodynamik*

##### **Zentraler Venendruck**

Die Messung des zentralen Venendrucks (ZVD) erfolgte intermittierend über den zentralvenösen Zugang mittels elektromagnetischem Druckaufnehmer (Logical, Medex, Klein-Winternheim) und Monitoreinheit (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA).

##### **Mittlerer arterieller Druck**

Der arterielle Blutdruck wurde über den Katheter in der rechten A. femoralis kontinuierlich bestimmt. Die Ableitung erfolgte kontinuierlich über einen weiteren elektromagnetischen Druckaufnehmer (Logical, Medex, Klein-Winternheim) und der selben Monitoreinheit (siehe 3.3.4.2.). Da für die Perfusion der arterielle Mitteldruck (MAP) relevant ist und die Blutdruckamplitude bei Ratten darüberhinaus im Vergleich zum Menschen sehr gering ist wurde nur der MAP und nicht der systolische und diastolische Druck für die Auswertung registriert.

## **Herzfrequenz**

Die Erfassung der Herzfrequenz ist unter 3.4.1. im Detail dargestellt.

### *3.3.4.3. Blutgasanalysen, Elektrolyt- und Hämoglobinbestimmungen*

Die Entnahme von arteriellem Blut zur Bestimmung arterieller Blutgasanalysen (BGA), sowie aller laborchemischen Parameter und der Blutglucosewerte erfolgte ebenfalls über den arteriellen Zugang. Eine Glaskapillare (Clinitubes, Radiometer Medical, Kopenhagen) wurde mit arteriellem Blut befüllt; anschließend erfolgte die Bestimmung von pH, PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, ionisiertem Calcium, Kalium und Natrium erfolgte mittels Analysator (ABL 505, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Hierüber wurden weiterhin folgende Parameter berechnet: Standard-Basenüberschuss (SBE), Standard-Bikarbonat (SBc), Sauerstoff-Sättigung (SaO<sub>2</sub>). Weiterhin wurden Gesamthämoglobin (tHb), Oxyhämoglobin (HbO<sub>2</sub>), Carboxyhämoglobin (COHb) und Methämoglobin (MetHb) bestimmt (OSM 3, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark).

### *3.3.4.4. Blutzucker*

Die Bestimmungen der Blutzuckerkonzentration erfolgten mittels B-Glucose Analyser (Hemocue, Angelholm, Schweden)

### *3.3.4.5. Temperatur*

Es wurde bereits vor Versuchbeginn sowie während des Versuchs strikt auf Normothermie der Tiere geachtet. Die Wärmung erfolgte mittels dem beheizbaren Operationstisch sowie zusätzlich bei Bedarf mit einer Wärmelampe (Osram Siccatherm 280W). Die Körpertemperatur wurde bei jedem Tier kontinuierlich über eine rektale Sonde am Messmodul (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) gemessen.

### 3.4. Arrhythmieerfassung

#### 3.4.1. Elektrokardiogramm

Die kontinuierliche EKG-Ableitung erfolgte über die Pfoten mittels Klebeelektroden für Neugeborene (Agilent 13953D, Agilent Technology, Andover, USA) als Extremitätenableitung und wurde auf einen Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) übertragen. Alle arrhythmischen Ereignisse wurden mit Hilfe des an den Monitor angeschlossenen Druckers (direct digital writer series 7100, Marquette, Milwaukee, USA) mit  $25 \text{ mm s}^{-1}$  dokumentiert und nachfolgend verblindet entsprechend dem Score (s.u.) quantifiziert. Die Herzfrequenz wurde ebenfalls durch manuelle Zählung am Ausdruck bestimmt um etwaige Artefakte bei der automatischen Messung auszuschließen.

#### 3.4.2. Auswertung

Die Auswertung der kardialen Arrhythmien erfolgte entsprechend den Richtlinien und Definitionen der *Lambeth Conventions* [109]. Es kam der von CURTIS und WALKER validierte Arrhythmiescore C zur Anwendung [110]. Der Score ist in Tabelle 3.2 dargestellt:

**Tabelle 3.2.** Arrhythmie-Score C nach CURTIS und WALKER [110]. (VES=Ventrikuläre Extrasystole; VT=Ventrikuläre Tachycardie; VF=Ventrikuläres Flimmern/Flattern)

Wert	Ereignis
0	Keine VES, VT, VF
1	VES
2	1-5 Episoden von VT ( $\geq 4$ VES)
3	>5 Episoden von VT und/ oder 1xVF
4	2-5 Episoden von VF
5	>5 Episoden von VF

Es wurde für jedes Versuchstier das jeweils schwerste Ereignis innerhalb zweier vordefinierter Zeitspannen gewertet.

Zeitintervall 1:

Ischämie
----------

Zeitintervall 2:

Ischämie	Reperfusion
----------	-------------

### 3.5. Organaufarbeitung

Zur histopathologischen Aufarbeitung wurde das Herz nach Entnahme zunächst unter angezogener Koronarligatur mit 4° C kalter isotonischer NaCl- Lösung gespült. Dann wurde das Herz in eine auf 4° C vorgekühlte Herzmatrix (Heart Matrix, Harvard) gelegt und bei -20° C für 10 Minuten tiefgekühlt. Mittels der Herzmatrix wurde das gefrorene Herz basiparallel in 1mm dicke Schitte lamelliert. Sämtliche nachfolgende Untersuchungen erfolgten „verblindet“.

### 3.6. TTC-Färbung und „Area at Risk“

#### 3.6.1. Technik

Die mittels Injektion von Patentblau dargestellte „Area at Risk“ entspricht dem Versorgungsareal des ligierten Gefäßes. Um eine Unschärfe bei der Flächenberechnung durch ein Verwaschen der Patentblau-markierten Areale im Rahmen der weiteren Färbung zu verhindern, wurden die ungeradzahigen Schnitte direkt nach dem Schneiden vor der Färbung mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) beidseits eingescannt. Durch das beidseitige Einscannen konnte, wie auch bei der nachfolgenden TTC-Technik, ohne Informationsverlust auf jeden zweiten Schnitt verzichtet werden, da diese für eine andere hier nicht dargestellte Versuchsfragestellung benötigt wurden. Die „Area at Risk“ stellt sich in den Schnitten als ungefärbtes Myokard scharf abgegrenzt innerhalb des blau angefärbten restlichen Gewebes des Herzens dar.

Für die Darstellung des Infarktareals erfolgte entsprechend vielfach vorbeschriebener Technik [111] eine Färbung der Schnitte in Multilayers mit TTC in 0,2 mol Trispuffer (pH=7,8, Serva Biochemica, Heidelberg). Nach 10 min Inkubation bei 37° im Wasserbad wurde die Reaktion mittels Formalin 6% terminiert. Die Schnitte wurden wiederum von beiden Seiten eingescannt.

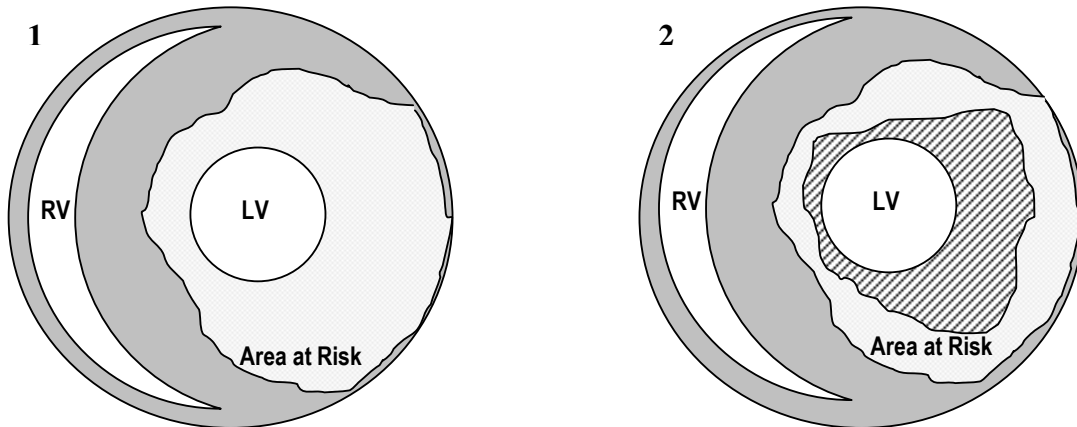
TTC ist ein Salz welches durch eine Ringstruktur aus Kohlenstoff und 4 Stickstoffatomen charakterisiert ist, wobei ein Stickstoff quaternär ist. Die Färbung mittels TTC basiert auf der Reduktion von Tetrazolium mit Öffnung der Ringstruktur und Umwandlung in das rote Formazan. Der Prozess erfolgt enzymabhängig durch membrangebundene Oxidasen mit den Co-Enzymen NADH und NADPH, welche zu NAD respektive NADP oxidiert werden. Die Färbung erfolgt nicht mehr, wenn NADH/NADPH unter eine Konzentration von 80 pmol mg<sup>-1</sup> Gewebe abfallen [112]. TTC weist damit einen Mangel an Co-Enzyme im infarzierten Myokard nach. Die Ausdehnung der Infarkte im Nachweis mittels TTC ist nahezu identisch mit ultrastrukturellen Nachweisen der transmuralen Ausdehnung mittels Elektronenmikroskopie [112].

### 3.6.2. Auswertung

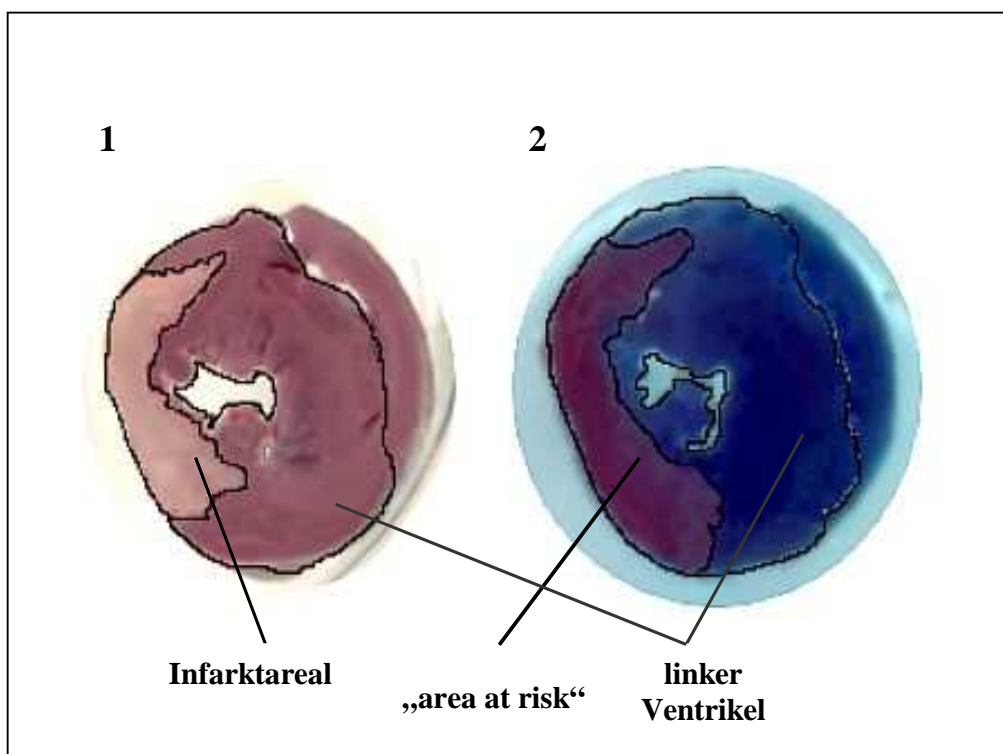
Zur Verdeutlichung ist die Technik der Flächenberechnung in Abbildungen 3.2. und 3.3. dargestellt. Die Flächen wurden wie dargestellt mittels dem Bildbearbeitungsprogramm ScionImage™ (Scion Corp., ML, USA) planimetrisch ausgewertet. Die Auswertung erfolgte ohne Kenntnis der Gruppenzuordnung. Es wurden die Flächen des linken Ventrikels (äußere schwarze Umrandung s. Abb. 3.2.), der „area at risk“ (Patentblau-negative Areale), des Infarktareals (helle Areale umgeben von durch das TTC rot gefärbten Arealen) sowie deren Relationen berechnet. Nach Ermittlung der Einzelflächen erfolgte die summatorische Flächen- und Volumenberechnung für das Gesamtherz und nachfolgend für die Gruppen. Die Technik entspricht dem vielfältig publizierten internationalen Standard [111, 113].



**Abbildung 3.2.** Schematische Darstellung der verschiedenen Auswertungsareale zur Quantifizierung des myokardialen Infarktareals nach Anfärbung mittels Patent-Blau (1) und Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) (2). LV=linker Ventrikel, RV=rechter Ventrikel, quergestreiftes Areal= Infarktareal.



**Abb. 3.3.** Darstellung der Vermessung von Infarktarealen (1) und „Area at Risk“ (2) am nativ-Präparat



## **4. Material und Methodik des Zellkulturversuches / HBOC**

### **4.1. Material**

Die eingefrorenen Endothelial Zellen wurden uns freundlicherweise von der kardiochirurgischen Arbeitsgruppe (Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Deutschland) überlassen.

### **4.2. Zellbiologische Methoden**

#### **4.2.1. Auftauen von Zellen, Ansetzen und Umsetzen einer Zellkultur**

Zum Ansetzen einer Zellkultur konnte 1 ml tiefgefrorene Zellsuspension bei Raumtemperatur aufgetaut werden, anschließend wurde diese Zellsuspension in 10 ml vorgewärmtem Medium inklusiv des Supplements (Endothelial Cell Growth Medium MV, Promocell, 69126 Heidelberg, Deutschland) aufgenommen und 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert (Universal 32, Hettich, 78532 Tuttlingen, Deutschland), um das DMSO, welches die Zerstörung der Zellmembranen während des Einfriervorganges verhindert, auszuwaschen. Das Pellet wurde mit 5 ml vorgewärmtem Medium resuspendiert, in eine T25 Kulturflasche (Falcon, BD Biosciences Labware Europe, 38800 Le Pont De Claix, Frankreich) ausgesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank (Hera Cell 240, Heraeus, 63450 Hanau, Deutschland) kultiviert. Nach 2-3 Tagen konnte das Medium gewechselt und das Zellwachstum kontrolliert werden. Die Zellen wurden bis zu einer 80-100%igen Konfluenz kultiviert. Zum Trypsinieren und Splitten adhärent wachsender Zellen konnte zunächst das Medium sorgfältig abgesaugt werden. Um eventuell verbliebene Mediumreste zu entfernen, wurden die Zellen 2x mit 1 ml Trypsin (Cat.No. 25300-062, Gibco Invitrogen GmbH, 76131 Karlsruhe, Deutschland) benetzt, leicht geschwenkt und anschließend das Trypsin mit einer sterilen Pipette (Falcon) abgesaugt. Mit 0,7 ml Trypsin konnte dann der Kulturflaschenboden bedeckt und anschließend die Kulturflasche für 3 - 5 Minuten in einen Brutschrank gestellt werden. Nach der Inkubation wurden die Zellen vom Flaschenboden leicht abgeklopft und die vollständige Zellablösung konnte dann unter dem Mikroskop (CK 30, Olympus, 20097 Hamburg,

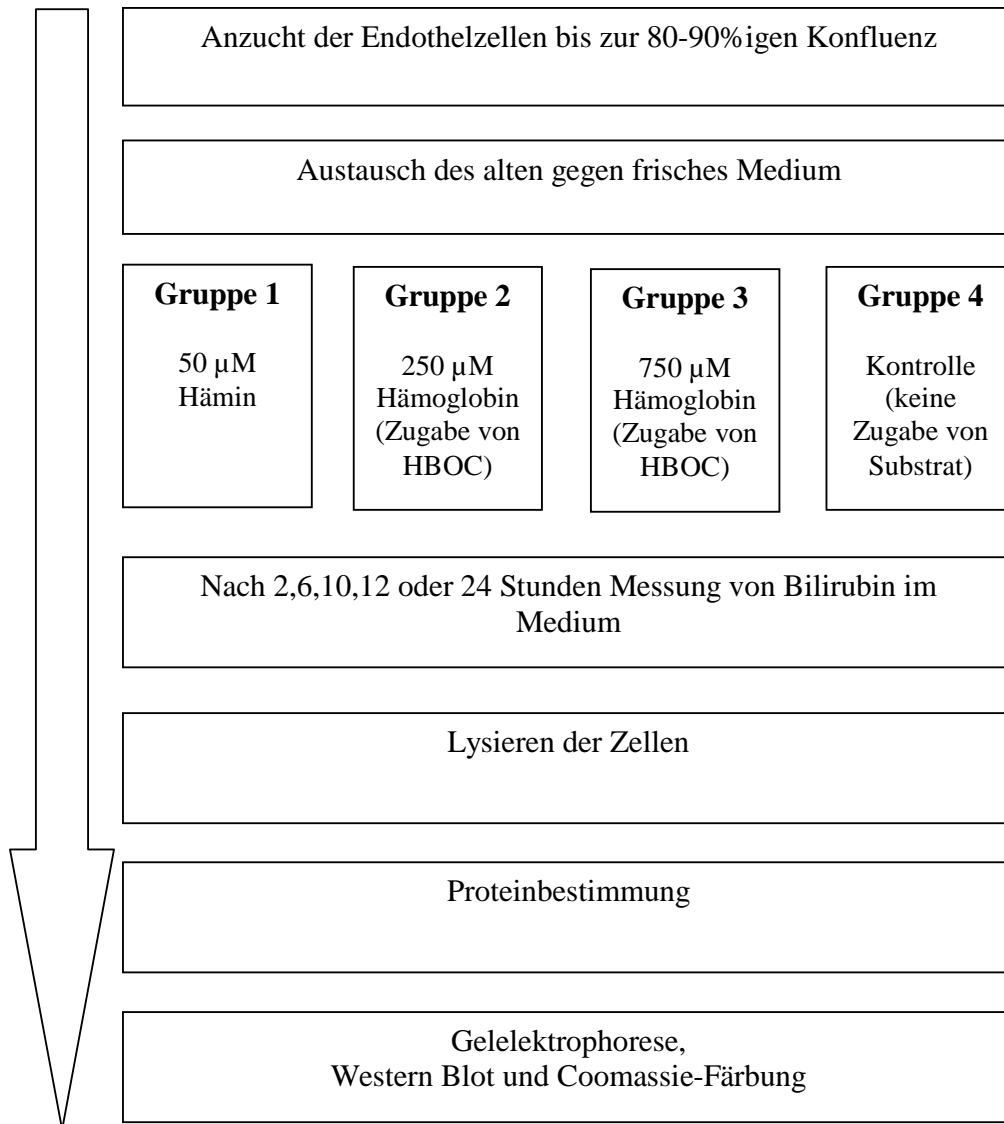
Deutschland) kontrolliert werden. Zum Neutralisieren wurden 5 ml Medium zugegeben, anschließend diese Zellsuspension auf mehrere T25 Kulturflaschen verteilt und mit 8 ml Medium in einem Brutschrank kultiviert. Nach 2-3 Tagen wurde das Medium gewechselt und das Zellwachstum kontrolliert. Der Versuch konnte nach Erreichen einer 80-90%igen Konfluenz gestartet werden. Am Versuchsbeginn wurde das alte Medium gegen je 5 ml neues Medium ausgetauscht, das unterschiedliche Konzentrationen an Substrat (HBOC oder Hämin) enthielt; zu den Negativkontrollen wurde nur neues Medium ohne Substrat gegeben.

Es wurden zwei im Versuchsaufbau unterschiedliche Messreihen durchgeführt.

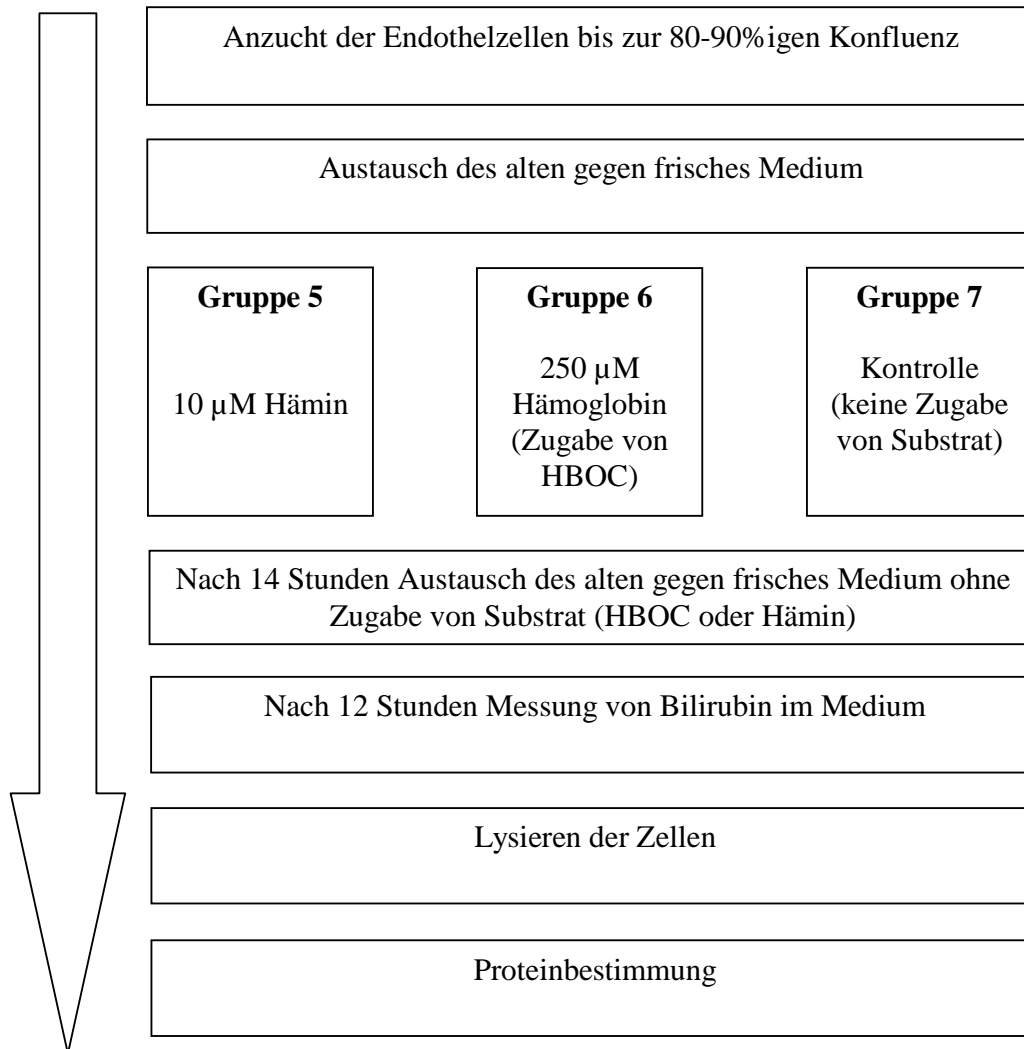
- Bei der ersten Messreihe wurde nach 2,6,10,12 und 24 Stunden Inkubation (mit 50  $\mu$ M Hämin, 250  $\mu$ M Hämoglobin, 750  $\mu$ M Hämoglobin oder keinem Substrat für den Hämabbau) Medium entnommen und die Bilirubinkonzentration bestimmt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, der Gesamtproteingehalt bestimmt. Mit dem Zellysat wurde ein Western-Blot zum Nachweis von Hämoxxygenase 1 durchgeführt (s. Schema Abb. 4.1).

- Bei der zweiten Messreihe wurden die Endothelzellen zunächst für 14 Stunden mit 10  $\mu$ M Hämin, 250  $\mu$ M Hämoglobin oder ohne Substrat inkubiert. Dann wurde das Medium abgegossen, die fest am Flaschenboden anhaftenden Endothelzellen wurden zweimal mit 5 ml Medium gespült und 5 ml frisches Medium ohne Substratzusätze wurde hinzugegeben. Nach zwölfstündiger Inkubation wurde die Bilirubinkonzentration im Kulturmedium bestimmt, und anschließend die Proteinkonzentration gemessen (s. Schema Abb. 4.2).

**Abb. 4.1.** Schema zum Versuchsaufbau der Zellkultur der ersten Messreihe



**Abb. 4.2.** Schema zum Versuchsaufbau der Zellkultur der zweiten Messreihe



### 4.3. Chemikalien und Ansätze

#### 4.3.1. Zusammensetzung der HBOC enthaltenden Zellkulturmedien

HBOC 201 wurde von der Firma Biopure (Cambridge, MA USA) bezogen. Die HBOC Konzentration wurde so gewählt, dass 250 bzw. 750  $\mu$ molare Konzentrationen von Hämoglobin im Zellkulturmedium erreicht wurden. 1 l HBOC enthält 140 g Hämoglobin, das eine Molmasse von 65000 Dalton besitzt. Das Zellkulturmedium für die Zellen, die mit HBOC inkubiert wurden setzte sich folgendermaßen zusammen:

1 mol	Hämoglobin	$\equiv$	65000 Da	$\equiv$	464,286 l HBOC
250 $\mu$ mol	Hämoglobin	$\equiv$			0,116 l HBOC
750 $\mu$ mol	Hämoglobin	$\equiv$			0,348 l HBOC

Ansatz 250  $\mu$ M HBOC : 0,116 Teile (Vol.) HBOC + 0,884 Teile (Vol.) Medium

Ansatz 750  $\mu$ M HBOC : 0,348 Teile (Vol.) HBOC + 0,652 Teile (Vol.) Medium

#### 4.3.2. Zusammensetzung der Hämin enthaltenden Zellkulturmedien

Das Hämin wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie (München, Deutschland) bezogen. Zunächst konnten 0,5 g pulverisiertes Hämin (Molmasse= 651,96 Da) mit Trizma-Base (Sigma) in einem molaren Verhältnis von 1:10 in 1 M NaOH Lösung (Merck 64293 Darmstadt, Deutschland) aufgelöst werden. Die Zugabe von NaOH erfolgte, bis alle Bestandteile in Lösung übergegangen waren. Anschließend wurde der pH-Wert mittels eines pH-Meters (Beckmann, 72 pH Meter) unter Zugabe von 1 M HCl Lösung (Merck) auf pH 7 eingestellt. Dann konnte die Lösung mit destilliertem Wasser verdünnt werden, bis ein Gesamtvolumen von 76,69 ml entsprechend einer Häminkonzentration von 10 mM erreicht wurde. Die Hämin-Stammlösung wurde in 1,5 ml Reagenzgefäßen (Sarstedt, 51588 Nümbrecht Deutschland) aliquotiert und bei  $-20^{\circ}$  C

aufbewahrt. Mit dieser Stammlösung konnten die Zellkulturmedien für die Hämin Versuchsreihe hergestellt werden.

Ansatz 50  $\mu\text{M}$  Hämin: 1 Teil (Vol.) Hämin [10mM] + 199 Teile (Vol.) Medium

Ansatz 10  $\mu\text{M}$  Hämin: 1 Teil (Vol.) Hämin [10mM] + 999 Teile (Vol.) Medium

#### **4.4. Messung von Bilirubin**

Die Messung von Bilirubin im Kulturmedium wurde nach der von TURCANU und DHOUB beschilderten Methode durchgeführt [114].

500  $\mu\text{l}$  Überstand wurde nach Ablauf der Inkubationszeiten aus den T25 Kulturflaschen entnommen, mit 250 mg Bariumchlorid (Sigma) in einem Reagiergefäß mittels eines Vortexers (MS1 Minishaker IKA Labortechnik GmbH + CoKG, Staufen, Deutschland) auf höchster Stufe 15 Sekunden geschüttelt. Danach wurde 0,75 ml 99%iges Benzol (Sigma) hinzugegeben und 1 Minute geschüttelt. Dadurch entstand eine milchig weiße Suspension, die bei 13000 g für 30 min zentrifugiert (Biofuge stratos, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland) wurde. Durch die Zentrifugation wurde die Suspension in zwei Phasen aufgetrennt. Die obere Benzolphase wurde abpipettiert und in eine Einmalküvette (Brand, 97877 Wertheim, Deutschland) überführt. Die Bilirubinkonzentration wurde mit Hilfe eines Spektralphotometers (Genesys 6, ThermoSpectronic, 28199 Bremen, Deutschland) aus der Differenz zwischen der Absorption bei einer Lichtwellenlänge von 450 nm und 600 nm bestimmt ( $\epsilon_{450} = 27,3 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

## 4.5. Lyse der Endothelzellen

### 4.5.1. Ansatz des Zellysepuffers

Um die im Zellysat enthaltenen Proteine vor Verdauung durch Proteasen zu schützen, wurde dem Zellysepuffer (CellLytic™-M / Sigma) vor Verwendung Proteaseinhibitoren hinzugegeben.

Dazu wurden in der Vorbereitung folgende Stocklösungen angesetzt:

10 mg PMSF (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA U.S.A.) pro 1 ml Isopropanol (Sigma)

50000 KIU (Kallikrein Inhibitory Units) Aprotinin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) pro 1 ml destilliertem Wasser

0,1839 mg Natrium Orthovanadate (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) pro 1 ml destilliertem Wasser (ergibt eine 100 mM Lösung)

Kurz vor Verwendung des Lysepuffers wurden folgende Mengen an Stocklösungen zum Puffer hinzugegeben:

10 µl PMSF / ml Lysepuffer,

50 KIU / ml Lysepuffer,

10 µl Natrium Orthovanadate / ml Lysepuffer.



#### 4.5.2. Lysieren der Endothelzellen

Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgegossen und die am Flaschenboden anhaftenden Zellen mit 2 ml 4° C kaltem Phosphatpuffer PBS (Gibco Invitrogen GmbH, 76131 Karlsruhe, Deutschland) 1:10 mit Aqua dest. verdünnt gewaschen. Nach vollständigem abpipetieren des Phosphatpuffers wurde 1 ml Lysepuffer in die Kulturflaschen gegeben, und diese dann anschließend 10 min auf Eis geschüttelt (Allegro Rotator, Nichols Institute Diagnostics San Clemente, CA, USA,). Das Zelllysate wurde in Reagiergefäße überführt und bei -80 °C aufbewahrt.

#### 4.6. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde ein DC Protein Assay Kit II (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gemäß Arbeitsvorschrift des Herstellers verwendet. Der Proteinstandard wurde parallel zur Messung der Zelllysateproben angesetzt. Er wurde mit je 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,5 mg/ml Rinderalbumin durchgeführt. Da der Gesamtproteingehalt des Zelllysates über dem Bereich der Albuminstandardmessungen lag, wurden die Lysatproben vor der Messung mit Lysepuffer in einem Verhältnis 1:2 verdünnt.

#### 4.7. Auftrennung eines Proteingemisches in der SDS-Polyacrylamid-Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)

Alle nachfolgend aufgeführten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck bezogen.

Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an die Originalmethode von LÄMMLI durchgeführt [115]. Hierbei wird eine Proteinlösung mit dem Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) behandelt. Die meisten Proteine binden SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis. Ferner denaturiert SDS die Proteine zusammen mit den reduzierenden Agenzien DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Somit unterscheiden sich die Proteine nur noch in ihrem Stokes-Radius oder in ihrer Masse und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. In der SDS-PAGE wandern die

SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol, wobei die Polyacrylamidmatrix als ein molekulares Sieb fungiert und die Proteine nach Stokes-Radius oder Masse auftrennt.

Das verwendete Acrylamid/ Bisacrylamid polymerisiert nach Zugabe von APS und TEMED (Serva, Heidelberg, Deutschland) zu Polyacrylamid aus und bildet ein Molekularsieb. Zur SDS-PAGE wurde zunächst ein Trenngel vorgelegt, in dem die Proteine dann aufgetrennt werden. Der Molekularsiebeffekt der Polyacrylamidmatrix in diesem Gel ist aufgrund der höheren Konzentration von Acrylamid höher als im Sammelgel. Die Acrylamidkonzentration richtet sich nach dem Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurden Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 12,5% verwendet. In diesem Gel findet die eigentliche Trennung des Proteingemisches statt. Nach Auspolymerisieren des Trenngels wird dieses mit einem Sammelgel überschichtet. Das Sammelgel hat einen niedrigeren Molekularsiebeffekt aufgrund einer niedrigeren Acrylamidkonzentration. Es dient in der Auftrennung der Schaffung einer einheitlichen Lauffront. Es wurden Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 5% verwendet. Das Verhältnis Trenngel:Sammelgel betrug 2,6:1. Für eine Gelelektrophorese wurden die zu untersuchenden Proteingemische mit ca.1/3 Vol. des Probenvolumens mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt, für 5 min bei 95° C denaturiert und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer Agarose-Gelelektrophoresekammer (Easy Cast OWL Scientific, Inc., Portsmouth, NH USA) bei 180 V in SDS-Laufpuffer. Die Dauer des Gellaufs konnte anhand des mitlaufenden Marker-Proteingemisches abgeschätzt werden.

Trenngel 60 ml

12,5% Acrylamid 25 ml Acrylamid/Bisacrylamid (Biozym, 31833 Hess. Oldendorf, Deutschland) (37,5:1)

375 mM Tris 15 ml 1,5 M Tris (ICN)/ HCl pH 8,8

0,1% (w/v) SDS (Serva) 600 µl 10% (w/v) SDS

0,05% (v/v) TEMED (Serva) 30 µl

0,05% (w/v) APS 300 µl 10% (w/v) APS

### Sammelgel 24 ml

5% Acrylamid 4 ml Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)

125 mM Tris 6 ml 0,5 M Tris/ HCl pH 6,8

0,1% (w/v) SDS 240  $\mu$ l 10% (w/v) SDS

0,1% (v/v) TEMED 24  $\mu$ l

0,1% (w/v) APS 240  $\mu$ l 10% (w/v) APS

Die 10% (w/v)-ige Ammoniumpersulfatlösung ist bei 4°C ca. 2 Wochen haltbar. Zur längeren Aufbewahrung sollten Aliquots bei -20°C gelagert werden.

### 5 X SDS-Ladepuffer 10 ml

0,0625 M Tris 1,25 ml 0,5 M Tris/ HCl pH 6,8

0,2% (w/v) SDS 200  $\mu$ l 10% (w/v) SDS

10% (v/v) Glycerin

5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol frisch zufügen

10 X SDS-Laufpuffer 2 l

250 mM Tris 62 g

19,2 mM Glycin 288 g

0,1% (w/v) SDS 20

#### 4.7.1. Coomassie-Brilliant-Blue Färbung

Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue R250 bzw. G250 ermöglicht das Anfärben von Proteinen in Gelen. Der Farbstoff wurde einem Puffer zugegeben, der gleichzeitig zum Färben die Proteine auch im Gel fixiert. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei 50-100 ng pro Proteinbande.

Zur Färbung wurde das SDS-PA Gel für ca. 30 min in der Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Die Entfärbung des Gels erfolgte in der entsprechenden Lösung ohne Farbstoff, wobei die Dauer der Entfärbung sich nach der erwarteten Bandenintensität und der Gelstärke richtete und zwischen 30 min bis 1 h dauerte. Hierbei wurde die Entfärbelösung mehrmals gewechselt. Die Entfärbelösung konnte mehrfach verwendet werden, indem diese nach Gebrauch in eine Flasche mit ein paar Löffeln Aktivkohle gefüllt wurde. Nach Absetzen der Aktivkohle, welche den Farbstoff bindet, wurde die Lösung filtriert und wiederverwendet.

#### Coomassie-Lösung

45% (v/v) Methanol

45% (v/v) H<sub>2</sub>O

10% (v/v) Essigsäure

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)

0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva)

#### 4.7.2. Färbung von Proteinen auf Membranen

##### 4.7.2.1. *Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western-Blot)*

Nachdem die Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden sie elektrophoretisch auf eine Membran übertragen (Blotten). Es wurde ein Halbtrockentransfer in einer Blotkammer (Western Blot Trans Blot Kammer; Bio-Rad) mit Platin/Edelstahl-Elektroden durchgeführt. Hierzu wurde die Membran im

Transferpuffer angefeuchtet und auf 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier (Whatman GmbH, Göttingen, Deutschland) gelegt, das sich auf der Kathodenplatte befand. Das in Transferpuffer äquilibrierte Gel wurde so auf die Membran gelegt, daß keine Luftblasen entstehen. Auf das Gel kamen wiederum mehrere Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier (Whatman). Anschließend wurde die Anodenplatte auf diese Anordnung gelegt und die Apparatur unter Strom gesetzt. Es wurde für 45 min bei 20V geblottet.

Die verwendete hydrophobe Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran (Hybond-P PVDF-Transfer-Membran /Amersham Biosciences Europe GmbH, 79111 Freiburg, Deutschland) muß vor dem Transfer kurz in Methanol quellen, bis die Membran beinahe durchsichtig erschien und anschliessend in Transferpuffer äquilibriert werden.

Transferpuffer 10x – 1 l

0,5 M Tris 58,2 g

0,4 M Glycin 29,3 g 3,75% (w/v) SDS 37,5 ml 10% (w/v) SDS

Dem 1x Transferpuffer wurde 20% (v/v) Methanol zugesetzt.

#### 4.7.2.2. *Immunodetektion*

Proteine können indirekt über eine Antikörperreaktion detektiert werden. Hierbei bindet ein spezifischer Antikörper an das jeweilige Protein. Ein zweiter markierter Antikörper bindet an den spezifischen Erstantikörper. Mit Hilfe einer Proteinmarkers kann nun die Position des Proteins bestimmt werden. Diese Methode stellt einen sehr sensitiven Nachweis dar.

#### 4.7.2.3. *Western-Blot*

Im Western-Blot kann ein spezifisches Protein in einem Proteingemisch, das in einem SDS-PA Gel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen wurde, detektiert werden.

Um die unspezifische Absorption des spezifischen Antikörpers an die Membran zu verhindern, wurde die Membran durch eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur in einem Blocking Reagenz abgesättigt. Es folgte eine Inkubation mit dem spezifischen Antikörper (für 1 h bei Raumtemperatur), der in dem Blocking Reagenz verdünnt wurde. Die Verdünnung des Antikörpers richtet sich nach der Proteinmenge und nach der Affinität des Antikörpers zum Protein. In Tabelle 4.1 ist der in der Arbeit verwendete Antikörper und die jeweiligen Verdünnungen zusammengefaßt. Antikörper, die nicht gebunden wurden, wurden mit einem Waschpuffer für 3x 15 min ausgewaschen. Es folgte eine Inkubation mit dem 2. HRPO (horseradish peroxidase)-markierten Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper, Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L) /Dianova, Hamburg, Deutschland) der gegen den 1. Antikörper gerichtet ist. Dieser Antikörper wurde ebenfalls in einem Blocking Reagenz verdünnt. Die Verdünnung betrug 1:20000. Nicht gebundener Antikörper wurde wiederum mit einem Waschpuffer entfernt. Durch die Zugabe einer ECL-Lösung für 2 min konnte die HRPO das in der Lösung enthaltene Luminol oxidieren und so eine Chemilumineszenz auslösen.

Das entstehende Licht wurde auf einem Röntgenfilm (Medical X-Ray-Film / Fuji, 40549 Düsseldorf, Deutschland) mittels eines Röntgenfilmentwicklers (Agfa Curix-60 / Agfa, 50670 Köln, Deutschland) sichtbar gemacht.

Tabelle 4.1: Übersicht über den im Western Blot verwendeten primären Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung

verwendeter Antikörper in der Western-Blot Analyse	Verdünnung in Blocking Reagenz
anti HO-1 (C-18) IgG von der Ziege gerichtet gegen Hämoxxygenase 1 von Mensch, Maus, Ratte (Santa Cruz Biotechnology Cat. no.: sc-1796)	1:100
	1:500

Waschpuffer 20x – 2 l

200 mM Tris 48,44 g

2 M NaCl 233,76 g

0,09% (v/v) Tween-20 1,8 ml (frisch zufügen)

Der pH Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Blocking Reagenz

5% (w/v) Milchpulver (Bio-Rad) in 1x Waschpuffer

#### 4.7.3. Statistische Auswertung der Ergebnisse des Zellkulturversuches

Die gemessenen Bilirubinkonzentrationen der ersten Versuchsreihe wurden mittels post-hoc Test nach Dunnett t (2-sided) ausgewertet, wobei die Gruppen 1, 2 und 3 der Negativ- Kontrollgruppe gegenübergestellt wurden.

Die gemessenen Bilirubinkonzentrationen der zweiten Versuchsreihe wurden mittels post-hoc Test nach Bonferroni ausgewertet. Das zugrundegelegte Signifikanzniveau betrug  $p < 0,05$ . Die statistischen Berechnungen wurden mit der Software SPSS for Windows (9.0) durchgeführt.

## **5. Ergebnisse**

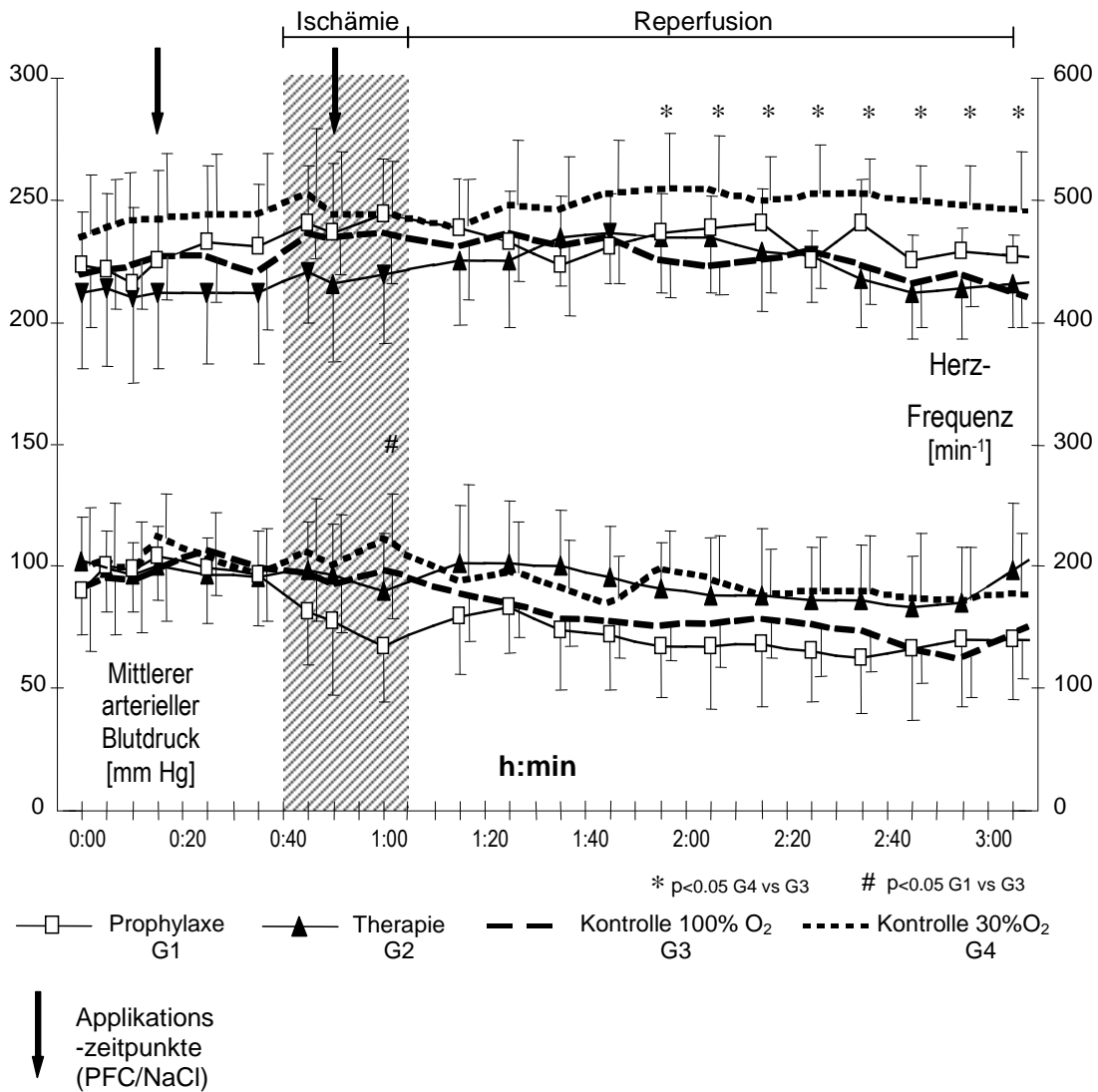
### **5.1. Ergebnisse PFC / tierexperimenteller Versuch**

#### **5.1.1. Hämodynamik**

Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck sind in Abb. 5.1 dargestellt. Zu Versuchsbeginn gab es zwischen den Tieren in den unterschiedlichen Gruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Blutdruck und Herzfrequenz. Auch nach Applikation von PFC konnten keine relevanten Veränderungen dieser Parameter festgestellt werden. In Gruppe 1 (Prophylaxe) konnte während der Phase der Koronarligatur tendenziell ein geringerer mittlerer arterieller Blutdruck detektiert werden. Am Ende der ischämischen Periode war der mittlere arterielle Blutdruck in Gruppe 1 im Vergleich zur Gruppe 3 (100% O<sub>2</sub> Ventilation) verringert. Die mit 30% O<sub>2</sub> beatmeten Tiere (Gruppe 4) zeigten im Vergleich zur Gruppe 3 signifikant höhere Herzfrequenzen während der letzten 50 min der Reperfusionphase.



Abb. 5.1. Darstellung von Herzfrequenz und mittlerem arteriellem Blutdruck



### 5.1.2. Ergebnisse der Blutgasanalyse

Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Körpertemperatur, dem arteriellen pCO<sub>2</sub> oder der Hb-Konzentration. All diese Werte lagen im Normbereich (siehe Anhang).

In den Messungen zu Versuchsbeginn fielen signifikante Unterschiede des pH-Wertes zwischen der Therapiegruppe (2) und der 100% O<sub>2</sub>-Gruppe (G3) auf. Die arteriellen pO<sub>2</sub>

und SaO<sub>2</sub> Werte waren in der Gruppe 4 nahezu gleich; diese Werte waren erwartungsgemäß höher in den Gruppen, die mit 100 % Sauerstoff beatmet wurden. Zehn Minuten nach Gabe von PFC und 10 Minuten nach der Reperfusion konnte in den Gruppen 1 und 2 ein erhöhter arterieller Sauerstoffpartialdruck beobachtet werden.

### 5.1.3. „Area at risk“ und Infarktgröße

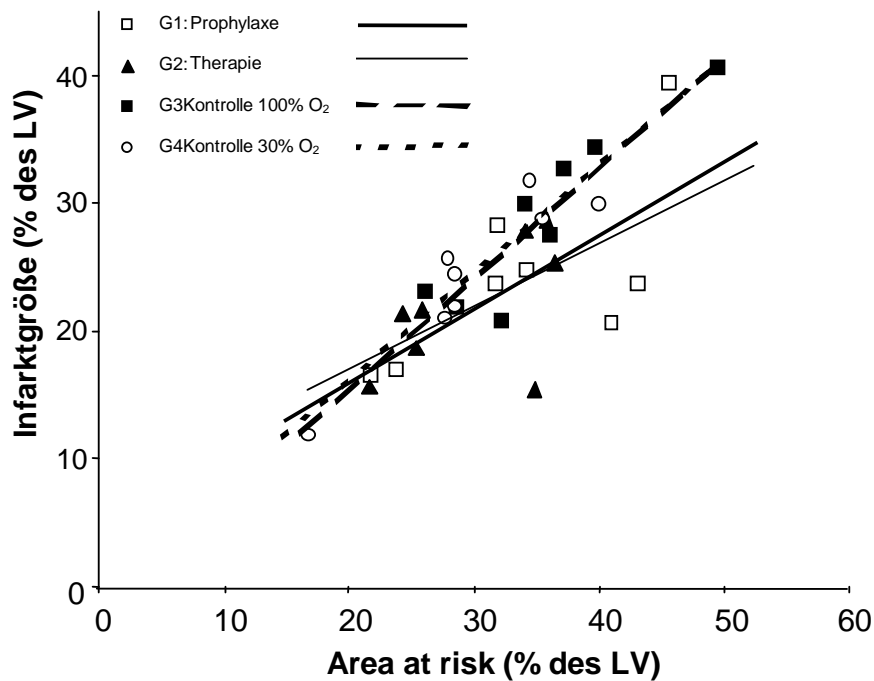
In Abb.5.2 ist das Verhältnis zwischen Infarktgröße und „area at risk“ dargestellt. Zwischen den verschiedenen Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied in dem prozentualen Anteil der „area at risk“ am gesamten linken Ventrikel. In Tabelle 5.1 sind die Mittelwerte von „area at risk“ im prozentualen Anteil des linken Ventrikels und Infarktgröße (gemessen mit TTC) im prozentualen Anteil der „area at risk“ für die unterschiedlichen Gruppen angegeben.

Im Vergleich der Infarktfläche als prozentualer Anteil der „area at risk“ konnte lediglich ein Trend zur Infarktreaktion in den Gruppen gezeigt werden, die PFC erhielten (G1; G2), wenn man diese beiden Gruppen der Gruppe 4 (30% O<sub>2</sub>-Beatmung) gegenüberstellt; die Unterschiede erwiesen sich nach der statistischen Auswertung als nicht signifikant (G1 p=0,25; G2 p=0,48 vs. G4).

**Tabelle 5.1.** „Area at risk“ in % des linken Ventrikels (LV) und Infarktgröße in % der „area at risk“; Mittelwerte ± Standardabweichung

		area at risk (% LV)	Infarktgröße (% area at risk)
Prophylaxe	G1	34.17±8.72	71.74±13.44
Therapie	G2	29.81±6.06	74.22±13.53
Kontrolle 100% O <sub>2</sub>	G3	35.49±7.24	81.06±8.44
Kontrolle 30% O <sub>2</sub>	G4	29.95±6.92	81.15±8.13

Abb. 5.2. Darstellung vom Verhältnis Infarktgröße (TTC) zu „area at risk“



#### 5.1.4. Arrhythmien

Ventrikuläre Arrhythmien sind in Abb. 5.3. getrennt nach ihrem Auftreten während der Ischämieperiode allein und während des Zeitraumes bestehend aus Ischämie und Reperfusion dargestellt. In diesem Versuch traten während der Ischämiephase Arrhythmien mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen 5 und 20 min nach Beginn der Ischämie auf. Ventrikuläre Extrasystolen (VES) waren die am häufigsten festgestellten Arrhythmieereignisse. Während der Ischämie traten sie in allen Gruppen mit einer Häufigkeit von 37,5 bis 87,5 Prozent auf; ventrikuläre Salven (VS) traten bei 25 bis 62,5% der Ratten auf und ventrikuläre Tachycardien konnten bei 25 bis 50% aller Versuchstiere festgestellt werden. Ventrikuläres Flimmern (VF) konnte in diesem Versuch bei keinem der Tiere beobachtet werden.

Betrachtet man den Zeitraum der Ischämie und Reperfusion beinhaltet, so traten VES als Gesamtanzahl pro Gruppe wie folgt auf:

- Gruppe 1  $72 \pm 76$
- Gruppe 2  $108 \pm 93$
- Gruppe 3  $120 \pm 127$
- Gruppe 4  $193 \pm 263$

Nach statistische Auswertung von Inzidenz von Arrhythmien eingeteilt nach VES, VS und VT (hier angegeben in Prozent der Tiere pro Gruppe, die diese Arrhythmien zeigten) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden. Auch bei Einteilung der Arrhythmieereignisse nach dem Arrhythmiescore C gemäß CURTIS und WALKER [110] konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gezeigt werden (Abb. 5.4). Dies gilt für beide beobachteten Zeiträume, die sich aus Ischämie bzw. Ischämie und Reperusionsphase zusammensetzen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.3 ,5.4 und in Tabelle 5.2 zusammengestellt.

Abb. 5.3. Darstellung der Inzidenz von unterschiedlich schweren Arrhythmien

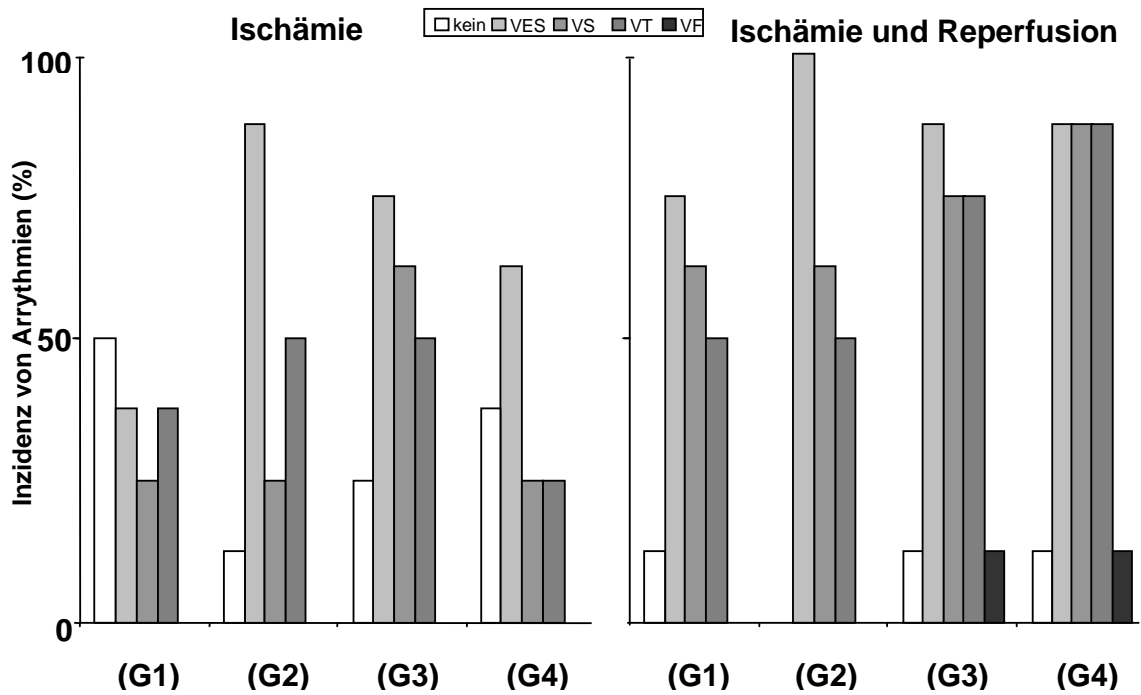
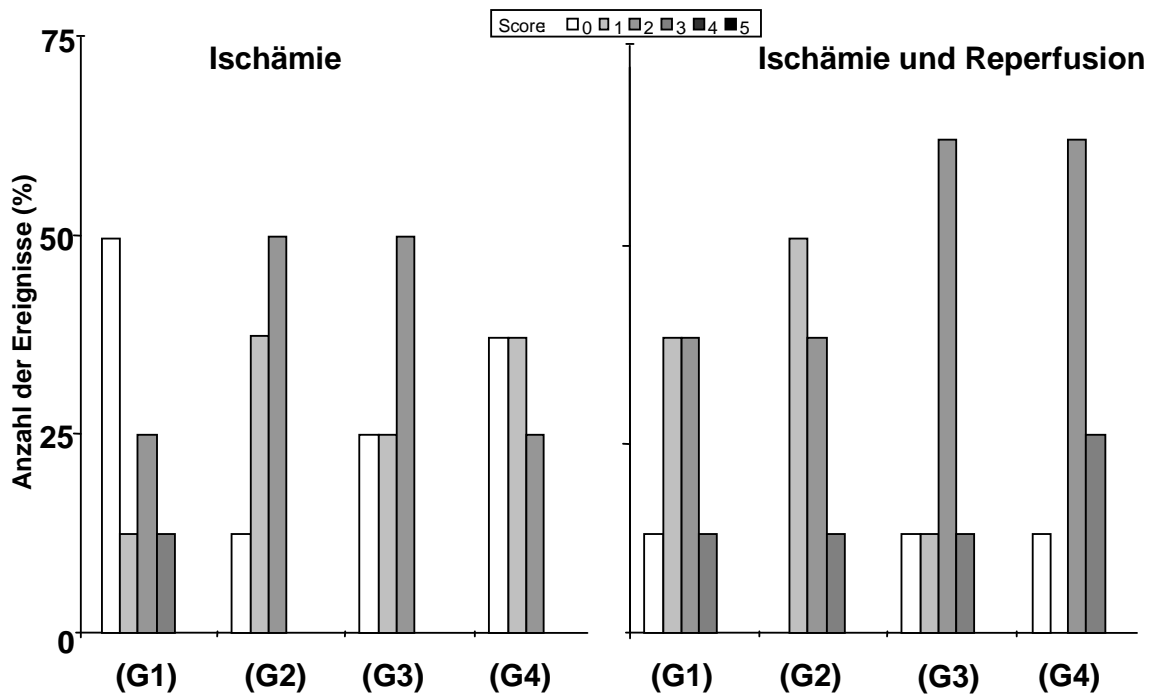


Abb. 5.4. Darstellung der Inzidenz von unterschiedlich schweren Arrhythmien eingeteilt nach dem Score gemäß Lambeth-Convention



*Tabelle 5.2. Arrhythmiescore nach Curtis und Walker gemäß Lambeth-Convention*

Ischämie				Ischämie und Reperfusion			
G1	G2	G3	G4	G1	G2	G3	G4
Prophylaxe	Therapie	Kontrolle 100% Sauerstoff	Kontrolle 30% Sauerstoff	Prophylaxe	Therapie	Kontrolle 100% Sauerstoff	Kontrolle 30% Sauerstoff
<b>1,000</b>	<b>1,375</b>	<b>1,250</b>	<b>0,875</b>	<b>1,500</b>	<b>1,650</b>	<b>1,750</b>	<b>2,000</b>

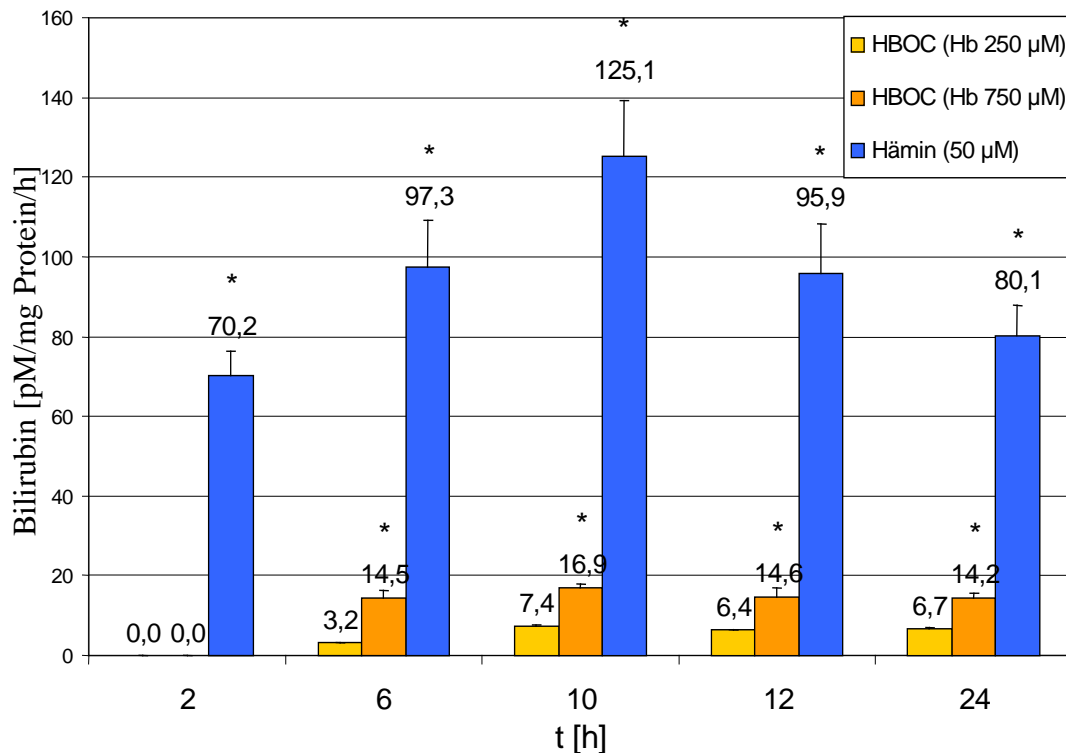
## 5.2. Ergebnisse HBOC / Zellkulturversuch

### 5.2.1. Bilirubinproduktion / erste Versuchsreihe: zeitlicher Verlauf

In Abb. 5.5 ist der zeitliche Verlauf der Bilirubinproduktion von Endothelzellen dargestellt, die mit 50  $\mu\text{M}$  Hämin oder 250  $\mu\text{M}$  bzw. 750  $\mu\text{M}$  Hämoglobin (enthalten in HBOC) inkubiert worden sind.

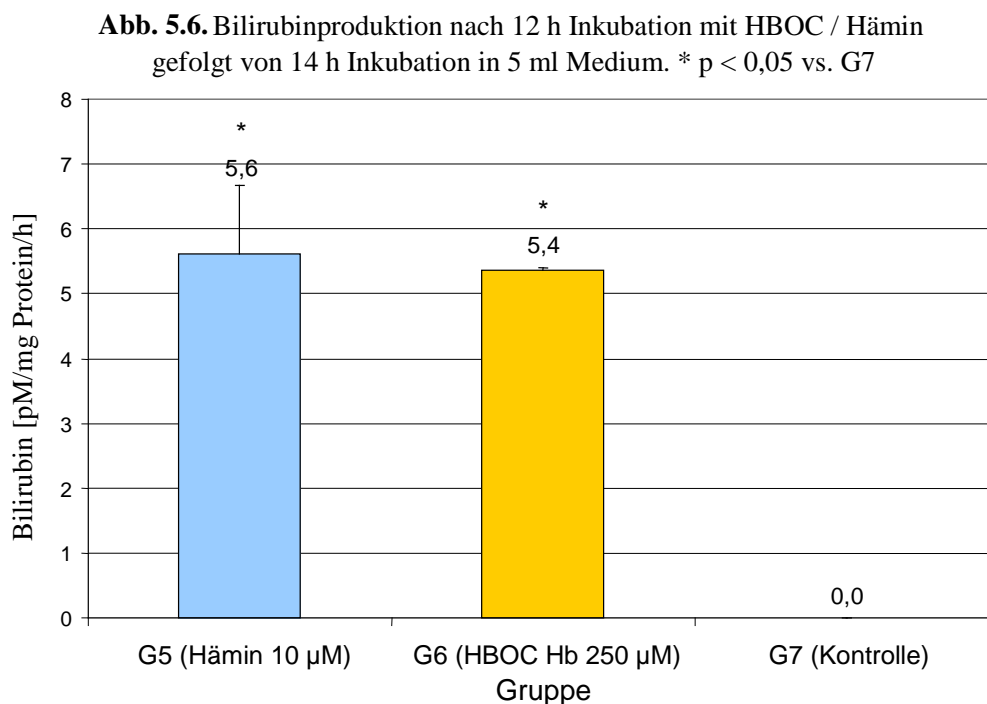
Die höchste Bilirubinproduktion pro Stunde konnte in allen Gruppen nach einer zehnstündigen Inkubation festgestellt werden. Obwohl die HBOC Gruppen eine rechnerisch 5 bzw. 15 mal höhere Konzentration an Substrat für den Hämabbau enthielten, fiel die Bilirubinkonzentration im Medium in diesen Gruppen um ein Vielfaches geringer aus, als in der Gruppe die Hämin enthielt.

**Abb. 5.5.** Bilirubinproduktion in 5 ml Medium nach Inkubation mit HBOC/ Hämin im zeitlichen Verlauf. \*  $p < 0,05$  vs. G4 (Kontrollgruppe 30%  $\text{O}_2$ )



### 5.2.2. Bilirubinproduktion / zweite Versuchsreihe

In Abb. 5.6 ist die Bilirubinproduktion von Endothelzellen dargestellt, die mit 10  $\mu\text{M}$  Hämin oder 250  $\mu\text{M}$  Hämoglobin (enthalten in HBOC) inkubiert worden sind. Zunächst wurden die Zellen für 14 Stunden mit Hämin oder HBOC inkubiert. In dieser Zeit konnte das jeweilige Substrat für die durch Hämooxygenase vermittelte Reaktion von den Endothelzellen aufgenommen werden. Dann wurde das Substrat durch zweimaliges Spülen entfernt. Nach weiterer Inkubation für 12 Stunden mit normalem Zellkulturmedium konnten in beiden Gruppen eine nicht signifikant unterschiedliche Bilirubinproduktion gemessen werden. Es wurden bei unterschiedlichen Konzentrationen von Hämin (10  $\mu\text{M}$ ) und Hämoglobin (250  $\mu\text{M}$ ) nahezu gleiche Konzentrationen von Bilirubin im Medium erreicht.



### 5.2.3. Westernblot / Induktion von HO-1

Im spezifischen Proteinnachweis mittels Westernblots konnte lediglich in den Positivproben (Gruppe 1; 50  $\mu\text{M}$  Hämin) Hämooxygenase 1 nachgewiesen werden. Hier

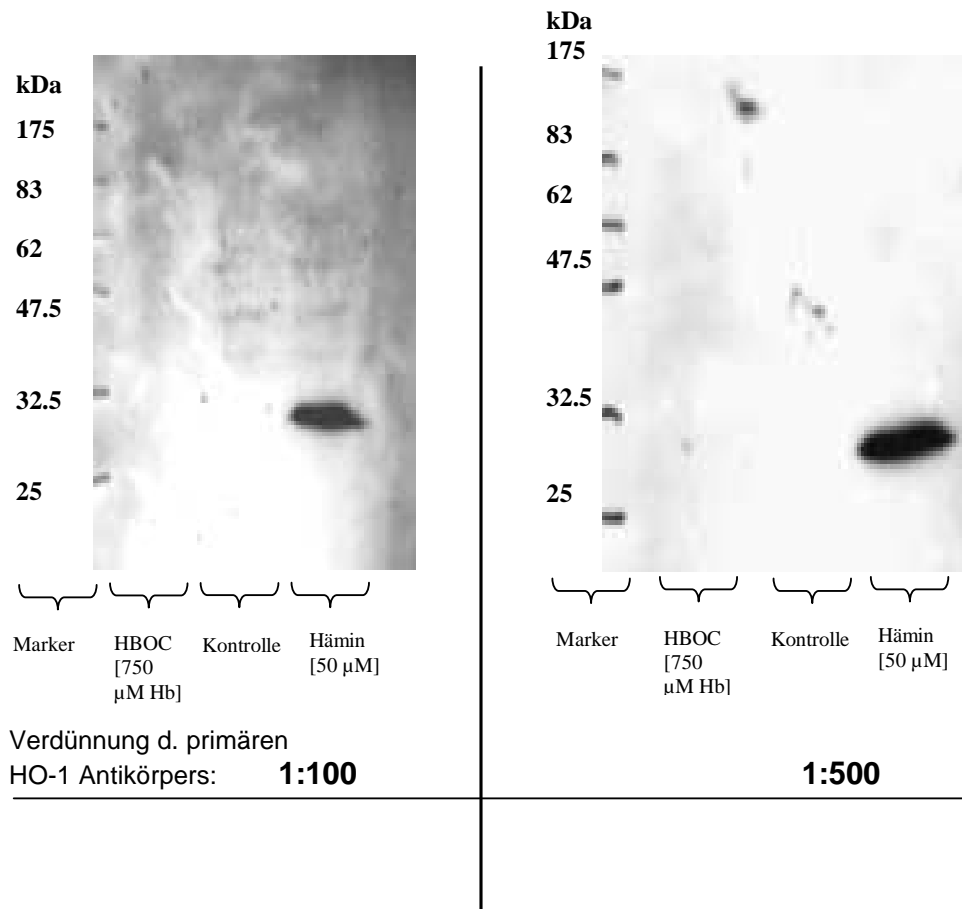


gelang der Nachweis mit einem schwächeren Signal nach 10 Stunden Inkubation, nach 24 Stunden Inkubation war das Signal deutlich ausgeprägt. In den HBOC-Proben, die 250 oder 750  $\mu\text{M}$  Hämoglobin enthielten konnte keine Hämoxxygenase 1 detektiert werden.

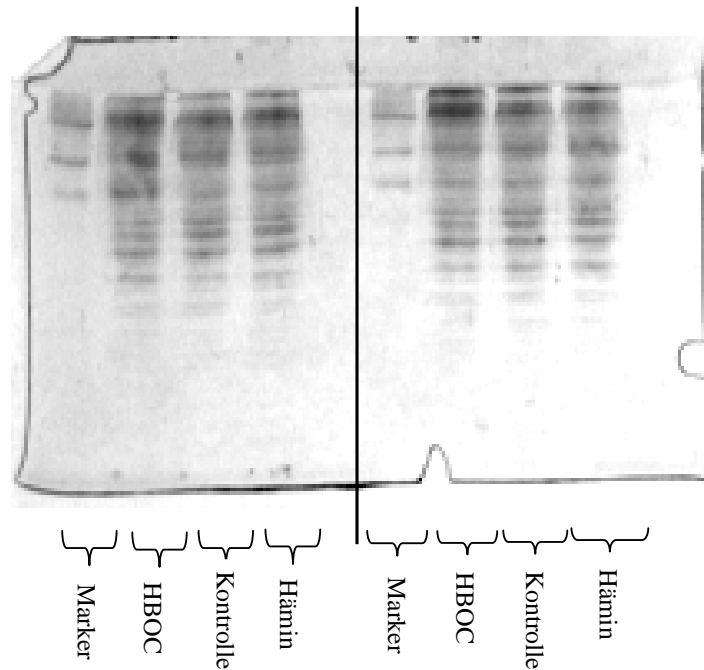
In den Negativ-Kontrollen, in denen kein Hämoglobin oder Hämin vorlag, konnte ebenfalls keine Hämoxxygenase-1 nachgewiesen werden.

Abb. 5.7 und Abb. 5.9 zeigt das Ergebnis des Westernblots, Abb. 5.8 zeigt die gleiche Membran, die zum Nachweis des erfolgreichen Proteintransfers mit einer Coomassie-Proteinfärbung angefärbt wurde. Hier ist zu erkennen, dass der Proteintransfer regelmäßig in allen Gruppen erfolgte.

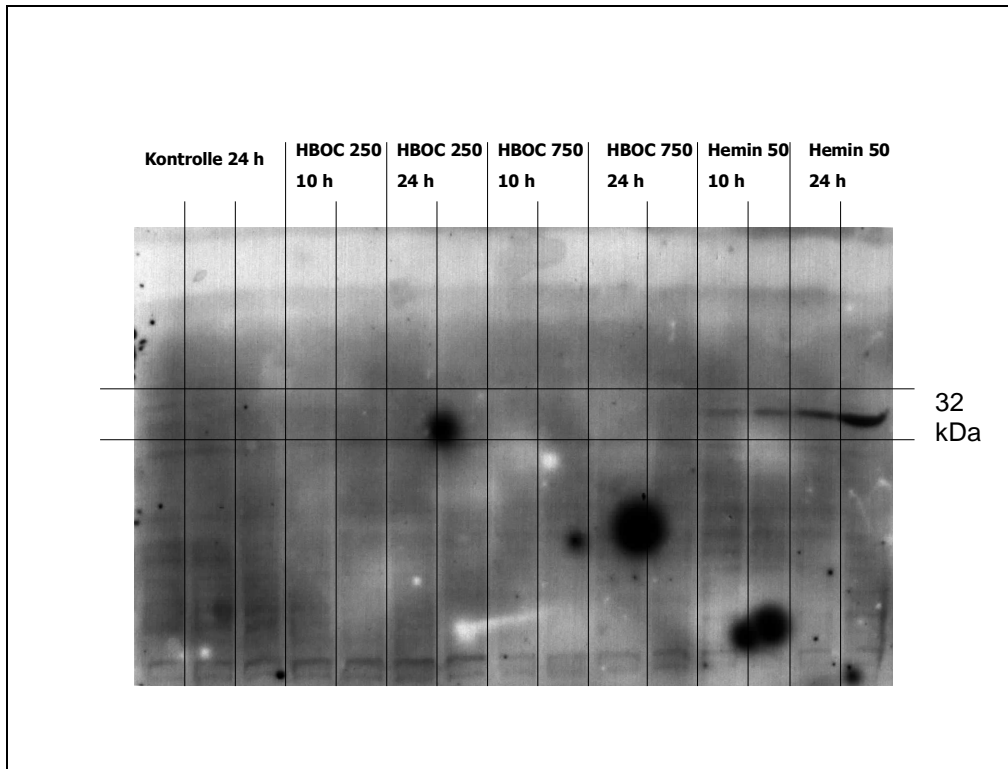
**Abb. 5.7.** Westernblot anti-HO-1: HBOC [Hb: 750  $\mu$ M], Hämin [50 $\mu$ M] bei t=24h  
Entwicklungszeit: 45 min



**Abb. 5.8.** Coomassie-Färbung von transferiertem 12.5% SDS PA Gel



**Abb. 5.9.** Westernblot anti-HO-1: HBOC [Hb 250 / 750  $\mu$ M]; Hämin [50 $\mu$ M] bei t=10h / 24h Verdünnung d. primären HO-1 Antikörpers: 1:100



## **6. Diskussion**

### **6.1. Diskussion PFC / tierexperimenteller Versuch**

In diesem Versuch konnte keine signifikante Reduktion von Infarktarealen durch die therapeutische oder prophylaktische Gabe von PFC gezeigt werden. Die Infarktgrößen der mit PFC behandelten Tiere waren zwar kleiner als die der Kontrollgruppen, es konnte aber nur ein Trend und keine signifikante Infarktreduktion durch Verabreichung von PFC festgestellt werden.

Beim Vergleich der prophylaktischen und der therapeutischen Gabe von PFC konnte kein signifikanter Unterschied, sondern nur ein gering ausgeprägter Trend zur stärkeren Infarktreduktion innerhalb der Prophylaxegruppe festgestellt werden.

Weder die therapeutische noch die prophylaktische Applikation von PFC führte zu einer signifikanten Verringerung von ventrikulären Arrhythmien während der Ischämie- und Reperusionsphase.

#### **6.1.1. Effekte von PFC auf das Infarktareal**

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Gruppe der Perfluorocarbone (PFC) die Ausbildung von Ischämie- und Reperfusionsschäden am Herzmuskel reduzieren können [4, 54-57]. In klinischen Studien konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass Patienten während einer percutanen transluminalen coronaren Angioplastie (PTCA) von der intracoronararteriellen Applikation von Perfluorocarbon-Emulsionen Profitieren. In den USA liegt deshalb eine Zulassung für PFC für die intrakoronararterielle Applikation bei der PTCA vor. Dieses spezielle Einsatzgebiet der Perfluorocarbone zielt vor allem auf eine alternative Sauerstoffversorgung des Herzens durch den in die Koronararterien eingebrachten PTCA-Katherter. Hier soll vor allem während der Ballondilatation eine Sauerstoffversorgung durch hinter dem Ballon eingebrachtes PFC aufrecht erhalten werden [116-119]. Daraus resultieren zu unserem Versuch unterschiedliche Konzentrationen des PFCs im Herzgewebe, da wir keine

koronararterielle Applikation in unserem Versuch vornehmen, und so die lokalen Konzentrationen des PFCs geringer ausfallen. Die systemische i.v. Gabe des PFCs in unserem Versuch gründet sich vor allem darauf, dass hier ein prophylaktischer Einsatz erprobt werden sollte, der in der klinischen Praxis nur auf diesem Wege durchführbar wäre.

Die oben angeführten Studien untersuchten einen therapeutischen Einsatz der Lösungen, d.h. dass die Gabe erst nach der Ischämie erfolgte. Wie schon erwähnt wird dieser Arbeit erstmalig ein prophylaktischer Einsatz von PFC untersucht. Die günstigen Eigenschaften des PFCs bezüglich des Sauerstofftransportes und der Sauerstoffabgabe in das Gewebe lassen vermuten, dass in unserem Versuch im Herzgewebe der prophylaktisch behandelten Tiere eine Aufsättigung mit Sauerstoff stattgefunden hat, bevor die Ischämie einsetzte. Diese Sauerstoffaufsättigung wäre ein denkbarer Mechanismus zur Verminderung von Reperfusionsschäden, da die Hypoxie im Herzgewebe nach Koronarligatur sich durch das angehobene Sauerstoffangebot verkürzt hätte. Auf den zudem denkbaren Effekt der Präkonditionierung soll unter 6.1.1.2. genau eingegangen werden.

Die geringe Viskosität der Emulsion und die geringe Größe der PFC-Partikel machen es wahrscheinlich, dass auch während der Ischämie und der ein plasmatischer Fluß zumindest an den Außenzonen der „area at risk“ erhalten bleibt, der über den Transport von PFC in dieses Areal eine verbesserte Sauerstoffversorgung des betroffenen Herzgewebes ermöglicht. Für die beschriebenen Flussbehinderungen, die sich vor allem durch Entzündungsprozesse während der Reperfusion ergeben, würden die selben Eigenschaften der PFC-Emulsion zum Tragen kommen. Dies wäre ein denkbarer Mechanismus zur Verkleinerung des Infarktareales innerhalb der „area at risk“.

#### *6.1.1.1. Effekte von PFC auf die Funktion neutrophiler Granulozyten*

Die durch die Ischämie und Reperfusion angestoßenen entzündlichen Reaktionen des Herzgewebes wirken sich negativ auf die Perfusion aus. Besonders herauszustellen ist die verstärkte Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Gefäßendothel („rolling“ und „sticking“) und das durch die Entzündungskaskade ausgelöste Ödem. Beides führt zu

einer Verschlechterung der Gewebsperfusion in der Reperfusion durch Einengung der kapillären Strombahn (siehe 2.5.3.4.).

In einem I/R-Versuch am Kaninchenmodell wird von FORMAN et al. gezeigt, dass unter therapeutischem Einsatz von PFC während der Reperfusionsphase die Interaktionen von neutrophilen Granulozyten am Endothel deutlich geringer ausfielen, wie in der Kontrollgruppe [57].

Auch bei anderen Versuchen bezüglich der Reaktionen von neutrophilen Granulozyten konnte gezeigt werden, dass deren Funktion durch PFC eingeschränkt werden kann [6, 54, 96]. Sowohl Chemotaxis als auch Produktion von O<sub>2</sub>-Radikalen wurde durch PFC verringert [96].

Da die neutrophilen Granulozyten bei der Entstehung von Reperfusionsschäden eine Schlüsselrolle besonders durch Adhäsion am Endothel und durch deren Freisetzung von O<sub>2</sub>-Radikalen zukommt, könnte vermutet werden, dass sich dieser Effekt auch im I/R Tiermodell auf die Infarktgröße auswirkt.

#### 6.1.1.2. *Effekte von Sauerstoff bei Ischämie und Reperfusion*

Der durchschnittliche Durchmesser der Erythrozyten beträgt 7,5 µm. Eine Passage durch Gefäße mit einem geringeren Durchmesser ist aufgrund der Fähigkeit der Erythrozyten, sich durch Verformung der Enge anzupassen, bis zu einem gewissen Grad möglich. Ab einem gewissen Ausmaß der Einengung des Gefäßlumens durch Reperfusionsschäden ist die Passage von Erythrozyten durch die Kapillaren nicht mehr möglich. Eine Aufrechterhaltung der Sauerstoffversorgung durch PFC ist aufgrund der im Vergleich mit dem Erythrozytendurchmesser ca. 35 mal kleineren Partikelgröße des PFCs (0,2 µm) denkbar. Durch PFC wäre also verbesserte eine plasmatische Sauerstoffversorgung des Herzgewebes möglich.

FORMAN et al. konnten anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachweisen, dass es bei Hunden, die mit der PFC Emulsion Fluosol in einem kardialen Ischämie und Reperfusionsversuch therapiert wurden, im Vergleich zur mit NaCl-Lösung therapierten Kontrollgruppe zu keiner kapillären Obstruktion kam [3].

KOLODGIE et al. diskutieren, dass die Beatmung mit 100% O<sub>2</sub>, die bei der Applikation von Perfluorocarbonen aufgrund der Sättigungseigenschaften dieser Stoffe nötig ist, an sich einen positiven Einfluß auf die Reduktion des Infarktareals haben könnte [55]. Auf der anderen Seite werden durch PFC-Gabe verbunden mit einer 100%igen Sauerstoffbeatmung erhöhte O<sub>2</sub>-Partialdrücke während der Reperfusion erreicht, was zu einer Erhöhung der Konzentration von Sauerstoffradikalen führen könnte. Dies könnte das Ausmaß der Zellschäden durch die Reperfusion vergrößern.

Im Folgenden soll kurz auf verschiedene Untersuchungen eingegangen werden, die sich mit Auswirkungen von Hyperoxie vor Ischämie und während der Reperfusion beschäftigen.

TAHEPOLD et al. konnten an Ratten zeigen, dass die Schäden am Herzen nach Ischämie und Reperfusion durch vorherigen 60 oder 180 minütigen Aufenthalt in einer 95% O<sub>2</sub>-Atmosphäre verhindert werden konnten [120]. In diesem Versuch wurden die Herzen nach dem Aufenthalt der Tiere in der Sauerstoffatmosphäre entnommen und in eine Langendorff Apparatur überführt. Es folgte eine 25 minütige globale Ischämie mit anschließender 60 minütiger Reperfusion. Die durch TTC-Färbetechnik dargestellten infarzierten Areale konnten von 45% in der Kontrollgruppe durch Vorbehandlung mit Sauerstoff auf 22% verringert werden. Für diese Ergebnisse wird von den Autoren ein präkonditionierender Effekt der Hyperoxiebehandlung diskutiert.

Im Gegensatz hierzu zeigt eine Studie von KANEDA et al. eine Schädigung von Rattenherzen durch Hyperoxie während der Reperfusion [121]. Hier erfolgt der Versuch in einer Langendorff Apparatur, wobei die Aussage über das Ausmaß der Herzschädigung über Messung von koronarem Fluß, kardialem Auswurfvolumen, dem Produkt aus systolischem Blutdruck und der Herzfrequenz (RPP), und Creatinkinasekonzentration (CK) getroffen wird. Der Versuch wurde an drei Gruppen durchgeführt. Die Reperfusion erfolgte unter einem relativ niedrigen Sauerstoffpartialdruck (PO<sub>2</sub>=300±50 mmHg) in Gruppe 1, mittleren Sauerstoffdruck (PO<sub>2</sub>=500±50 mmHg) in Gruppe 2 und Hyperoxie (PO<sub>2</sub>=700±50 mmHg) in Gruppe 3. Es zeigte sich, dass koronarer Fluss, kardiales Auswurfvolumen, und RPP in Gruppe 2 signifikant höher waren als in den anderen Gruppen. Die CK-Konzentration lag in Gruppe 2 signifikant unter den Konzentrationen der anderen Gruppen. Die Autoren

schließen hieraus, dass ein mittlerer Sauerstoffpartialdruck in der Reperfusionphase Reperfusionsschäden minimieren kann, und dass eine Hyperoxie durch Entstehung von Sauerstoffradikalen zu einer vermehrten Herzschädigung durch die Reperfusion führt.

Beide zuletzt beschriebenen Arbeiten lassen sich in Zusammenhang mit unserem Versuch bringen. Aufgrund der 100% O<sub>2</sub>-Beatmung der Tiere der Gruppen 1-3 wäre sowohl eine protektiv wirkende Präkonditionierung, als auch eine Herzschädigung durch vermehrte Entstehung von Sauerstoffradikalen in der Reperfusion zu diskutieren. In den Kontrollgruppen 3 (100% O<sub>2</sub>-Beatmung) und 4 (30% O<sub>2</sub>-Beatmung) fallen die Größen der Infarktareale nahezu gleich groß aus. Auch die hämodynamischen Parameter zeigen keinen signifikanten Unterschied. Hierfür wären beide zuvor genannten Punkte (Präkonditionierung und Entstehung von Sauerstoffradikalen) als Mechanismen denkbar, da sie sich bezüglich der Reperfusionsschäden in ihren Wirkungen entgegenstehen. In der Prophylaxe- und Therapiegruppe wäre ebenfalls eine gegenseitige Aufhebung der beiden zuvor beschriebenen Effekte möglich. Für den Trend zur Infarktreduktion durch PFC blieben die beschriebenen Wirkungen auf plasmatische Sauerstoffversorgung und Neutrophilenfunktion als möglicher Wirkmechanismus denkbar.

Im erwähnten Experiment von KOLODGIE et al. [55] führte die intrakoronararterielle Applikation von oxygeniertem Perfluorocarbonlösungen, nicht jedoch die Applikation von desoxygeniertem PFC, zu einer Verbesserung der Durchblutung nach der Reperfusion. Die Zeiten wurden hier länger gewählt, als in unserem Experiment: die Ischämiezeit betrug 90 Minuten, die anschließende Reperfusion 210 Minuten.

Die Abweichung unserer Ergebnisse von den Ergebnissen der o.g. Studie von KOLODGIE et al. könnte in den kürzeren Ischämie- und Reperfusionszeiten begründet sein. Es wäre denkbar, dass die hemmenden Eigenschaften von PFC auf die Granulozytenfunktion erst nach einer gewissen Inkubationszeit im vollen Ausmaß möglich sind, in der PFC von den neutrophilen Granulozyten aufgenommen werden kann. Auch könnte die direkte intrakoronare Applikation zu einer höheren lokalen Konzentration im Herzgewebe geführt haben, was die genannten protektiven Eigenschaften des PFCs verstärkt haben könnte, ohne dass die denkbaren negativen Folgen der 100%igen O<sub>2</sub>-Beatmung zum Tragen gekommen wären.



### 6.1.2. Effekte von PFC auf Herzrhythmusstörungen

Im Vergleich der Herzfrequenz in den verschiedenen Versuchsgruppen wurde eine signifikant erhöhte Frequenz in der Gruppe 4 (30% Sauerstoffbeatmung) während der letzten 50 Minuten des Versuches festgestellt. Dies lässt zwar eine gewisse Erhöhung des Sauerstoffverbrauches vermuten, da jedoch der MAD nicht signifikant unterschiedlich zu den anderen Gruppen war, kann dieser O<sub>2</sub>-Mehrverbrauch nur relativ gering gewesen sein. So ist auch erklärbar, dass die Ausbreitung der nekrotischen Infarktareale nicht signifikant vergrößert war.

Sauerstoffradikale sind besonders während des Beginns der Reperfusionphase wichtige Auslöser von Arrhythmien [73-75]. Trotz der vermuteten erhöhten Sauerstoffpartialdrücke durch PFC-Behandlung und 100%iger O<sub>2</sub>-Beatmung im reperfundierten Herzmuskel konnte keine Erhöhung bezüglich des Auftretens von Arrhythmien festgestellt werden. Möglicherweise konnte durch das Zusammenspiel der oben genannten Prozesse zwar keine signifikante Reduktion von Infarktflächen innerhalb der „area at risk“ erreicht werden, die erhöhten Konzentrationen von Sauerstoffradikalen reichten jedoch nicht aus, um sich in schwereren Arrhythmieereignissen bemerkbar zu machen.

In einem von KOLODZIE und ALBERT durchgeführten Versuch am Hundemodell konnte gezeigt werden, dass die Gabe einer PFC Emulsion (Fusol-DA ®) die Häufigkeit von schweren Arrhythmien (ventrikulären Tachycardien) vermindern konnte [122]. Da sich der Versuchsablauf in einigen Punkten von unserem Versuch am Rattenmodell unterscheidet, sei im Folgenden der Versuchsablauf kurz dargestellt.

Die Dauer der Ischämie betrug 30 Minuten, gefolgt von 6 Stunden 100%iger Sauerstoffbeatmung in einer Fusolgruppe und einer Kontrollgruppe, die Heparin erhielt. Eine Negativ-Kontrollgruppe erhielt weder Heparin noch Fusol DA ® und wurde mit 30% O<sub>2</sub> beatmet. Fusol DA ® und Heparin wurden 30 Minuten vor Okklusion der LAD verabreicht. 6 Tage nach dem ischämischen Ereignis wurden die Hundeherzen mittels eines Elektrostimulators gereizt, so dass das Auftreten von Arrhythmien je nach Vorschädigung durch die vorangegangene Ischämie provoziert wurde. Erst dann erfolgte die Tötung der Tiere und eine histochemische Auswertung der dann angefertigten

Herzschnitte.

Es verstarben 3 von 9 Hunden in der Fusol DA ®- Gruppe, 7 von 9 Hunden in der Heparinkontrollgruppe und 13 von 15 Hunden in der 30%-Sauerstoffgruppe an ventrikulären Tachykardien.

Aufgrund des abweichenden Versuchsablaufes sind die Ergebnisse nur eingeschränkt mit unseren Ergebnissen vergleichbar. Besonders die vergleichsweise lange Zeit von 6 Tagen bis zur Arrhythmieerfassung und die künstliche Elektrostimulation führen zu einer nur eingeschränkten Vergleichbarkeit. Jedoch gibt es sonst keine weiteren Studien zu PFC-Emulsionen in I/R –Versuchen, die auf die Entstehung von Arrhythmien eingehen.

In Bezug auf die sich widersprechenden Ergebnissen unseres Versuches am Rattenmodell und des eben beschriebenen Versuches lassen sich folgende Erklärungsmöglichkeiten anführen:

- verbesserte Blutversorgung durch den ausgeprägten kollateralen Versorgungstyp des Hundeherzens
- dadurch möglicherweise verbesserte plasmatische Versorgung mit Sauerstoff durch PFC
- unterschiedlich stark ausgeprägter Schaden durch Sauerstoffradikale in der Reperfusion, was einen Einfluss auf Entstehung von Arrhythmien haben kann.

### 6.1.3. Methodenkritik zum PFC-Versuch

#### 6.1.3.1. *Tierversuche*

Ein Tiermodell bildet nur teilweise die Verhältnisse im menschlichen Körper ab. Das gilt auch für die vorliegende Studie, die an Ratten durchgeführt wurde. Das Design dieses Versuches stellt jedoch eine anerkannte und vielfältig praktizierte Vorstufe zu Humanstudien dar.

Bei Ratten und Kaninchen besteht im Gegensatz zu Hunden der Vorteil des relativ einheitlichen Infarktareales durch relativ identische Versorgungstypen ohne wesentliche

Kollateralversorgung. In Versuchen anderer Arbeitsgruppen an Hunden konnte im Gegensatz zu unseren Ergebnissen eine signifikante Infarktreduktion durch eine therapeutische PFC-Gabe erreicht werden [3, 4, 55, 122]. Es besteht jedoch ein Unterschied zwischen der Blutversorgung von Ratten- oder Kaninchenherzen und Hundeherzen, der beim Vergleich der unterschiedlichen Versuche beachtet werden muss; Hundeherzen sind in einem viel größerem Umfang durch kollateral angeordnete Blutgefäße versorgt, als die Herzen von Ratten und Kaninchen. Das bedeutet, dass bei Hunden ein Herzareal gleichzeitig von Blutgefäßen versorgt wird, die jeweils aus unterschiedlichen Stromgebieten gespeist werden; gleichzeitig besteht eine stärkere Vernetzung der Herzgefäße untereinander. Dies erlaubt bei Unterbindung des Blutstromes in einem Blutgefäß eine alternative Versorgung des betroffenen Herzareals über die kollateralen Blutgefäße. Dies führt wiederum dazu, dass durch die Ischämie betroffene Areale des Hundeherzens soweit ausreichend mit Blut versorgt werden, dass sich die Ischämie- und Reperfusionsschäden vermehrt zurückbilden können [123].

In bezug auf Infarkt gefolgt von Reperfusion ist es wahrscheinlich, dass während dieser Ereignisse die „area at risk“ trotz des eingeschränkten Blutstromes in einem größeren Ausmaß weiterhin von plasmatisch transportiertem PFC erreicht werden kann, als in Herzen bei denen die Kollateralisierung nur schwach ausgeprägt ist.

Eine Aufrechterhaltung eines plasmatischen Stromes innerhalb der von der Ischämie betroffenen Herzareale könnte eine denkbare Erklärung für die Wirksamkeit von PFC Emulsionen auf Verminderung von Reperfusionsschäden in den erwähnten Versuchen am Hundeherzen darstellen. Durch die kollateral ausgebildete Blutversorgung des Hundeherzens und die geringe Partikelgröße des PFCs könnte auch während der Ischämie PFC in Herzareale der „area at risk“ gelangen und dort zu einer verbesserten Sauerstoffversorgung des Herzmuskels führen. Kommt es dann zu Beginn der Reperfusion zu einer erhöhten Belastung des Herzgewebes mit Sauerstoffradikalen, sind diejenigen Zellen, die durch das PFC während der Ischämie mit Sauerstoff versorgt werden konnten, widerstandsfähiger gegen diese zellschädigende Noxe.

Für Rattenherzen wäre aufgrund der geringen Kollateralisierung ein Vordringen von PFC in Ischämische Bezirke auf plasmatischem Wege weniger wahrscheinlich. Das Herzgewebe von Ratten ist der Ischämie ausgesetzt, ohne dass größere Randzonen

innerhalb der „area at risk“ durch eine Sauerstoffaufsättigung durch PFC profitieren könnten, so wie es im Hundeherzen vorstellbar ist. Kommt es während der Reperfusion zur Entstehung von Sauerstoffradikalen innerhalb des relativ stark durch die Ischämie vorgeschädigten Herzgewebes, so ist eine vergleichsweise weite Ausbreitung der nekrotischen Areale innerhalb der „area at risk“ wahrscheinlich.

Versuche mit Ischämie gefolgt von Reperfusion am Kaninchenmodell sind jedoch in den Aussagen unterschiedlich; die Blutversorgung im Kaninchenherzen ähnelt der von Rattenherzen bezüglich der Kollateralisierung.

Durch die geringe Kollateralisierung der Rattenherzen lässt sich in einem I/R-Versuch die „area at risk“ besonders klar durch die von uns verwendeten Färbemethoden darstellen. Auf der anderen Seite bildet das Hundeherz eher den Zustand eines menschlichen Herzens mit fortgeschrittener Koronareinengung ab: bei Patienten mit Koronarverengungen, die über Jahrzehnte entstanden sind, findet man eine ähnlich stark ausgeprägte kollateral angeordnete Gefäßversorgung, wie sie am gesunden Hundeherzen vorliegt. Somit bildet das Hundemodell die klinische Praxis bezüglich der Ischämien bei kardialen Risikopatienten näher ab. Im Rattenmodell lassen sich schwerere Ischämien darstellen und die Färbungen (Patentblau, TTC) der Herzschnitte fällt eindeutiger aus, da sich „area at risk“ und Infarktareal klar vom nicht durch die Ischämie betroffenen Areal abgrenzen lassen.

#### 6.1.3.2. *Ischämie und Reperfusionszeit*

Die Arbeitsgruppe von RICE konnte in Versuchen am Kaninchenmodell mit Messung von Infarktarealen nach 24 Stunden einen positiven Effekt der PFC Emulsion Fluosol auf die Ausbreitung von infarzierten Herzarealen zeigen [102] .

HALE konnte in einem I/R Versuch, bei dem die Reperfusionszeit 4 Stunden betrug, keinen positiven Effekt der PFC Emulsionen Perflubron® und Fluosol zeigen [7].

In beiden hier angeführten Versuchen betrug die Ischämiezeit 30 Minuten und die PFC Emulsionen wurden nach einem Zeitraum von 20 oder 25 Minuten nach Beginn der Ischämiephase in ähnlichen Dosierungen wie auch in unserem Versuch verabreicht.

Die gewählte Ischämiezeit von 25 min ist also im Vergleich mit anderen Arbeiten relativ kurz. Grund hierfür war die in einem Vorversuch bei einer Ischämiezeit von 30 min festgestellte erhöhte Mortalität der Tiere zum Ende der Ischämie hin [45].

Somit könnte die Länge der Reperfusionzeit einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt zu haben.

Wie bei dem unter 6.1.1.2. erwähnten Versuch von KOLODZIE [55] kann hier spekuliert werden, dass die hemmenden Eigenschaften von PFC auf die Granulozytenfunktion erst nach einer gewissen Inkubationszeit im vollen Ausmaß möglich sind.

Es sei auch darauf hingewiesen, dass die komplexe Entzündungskaskade nach der Reperfusion, Apoptose und Nekrose eingeschlossen, erst nach Wochen vollständig beendet ist [73]. In unserem Versuch wird also nur der Beginn der Entzündungsreaktion abgebildet.

#### 6.1.3.3. *Letalität während des Versuches*

Zwölf Tiere verstarben während des Versuches, ohne ihn komplett durchlaufen zu haben. Sie konnten somit nicht in die Auswertung der Versuchsergebnisse bezüglich der Ausbreitung der „area at risk“ und des Infarktareals einbezogen werden. Vier Tiere verstarben vorzeitig in der Prophylaxe-Gruppe (G1), zwei in der Therapie-Gruppe (G2), zwei in der NaCl-Gruppe (G3) und vier in der O<sub>2</sub>-Gruppe (G4). Die vorzeitige Letalität betrug insgesamt  $\approx 27\%$ . Das verwendete Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion wird bei der Ratte mit einer vorzeitigen Letalität von etwa 30-50% angegeben [103].

Unterschiedlich hohe Letalitäten zwischen den Versuchsgruppen sollen bei der Betrachtung der Gesamtergebnisse berücksichtigt werden. Sonst besteht die Gefahr, dass schädliche Auswirkungen des Versuchsregimes innerhalb einer Gruppe bei der statistischen Auswertung der „area at risk“ und des Infarktareals verborgen bleiben. Die Unterschiede der Letalität zwischen den Gruppen ist bei unserem Versuch am ehesten in der Tatsache zu suchen, dass bei Umstechung der LAD mit der Ligatur die Größe des

Infarktes schwer einzuschätzen ist. Bei den verstorbenen Tieren könnte allein die Schwere der kardialen Ischämie zum vorzeitigen Tod geführt haben. Sollte die Applikation von PFC zu einer erhöhten Letalität geführt haben, so wäre zu erwarten, dass sie auch in der Therapiegruppe erhöht gewesen wäre.

## **6.2. Diskussion HBOC / Zellkulturversuch**

In anderen Zellkulturversuchen von MOTTERLINI et al. konnte gezeigt werden, dass Blutersatzstoffe auf Hämoglobinbasis, die sich in der chemischen Struktur vom HBOC-201 unterscheiden, eine Expression der Hämoxygenase 1 hervorrufen können [8]. HBOC-201 zeichnet sich gegenüber der dort erprobten Blutersatzstoffe durch eine bessere Verträglichkeit bei der Anwendung am Tier und Menschen aus. Dies hängt mit der Stabilität des Hämoglobinpolymers im HBOC-201 zusammen, die dazu beiträgt, dass Wechselwirkungen mit Endothelien und Immunsystem geringer ausgeprägt sind.

Diese Stabilität wirkt sich aber auch auf den Abbau des HBOC-201 durch die Zellen aus. Kommt es schon bei relativ geringen Konzentrationen von Häm, Hämin oder Hämoglobin zu einer Expressierung von Hämoxygenase 1, konnte dieser Effekt auch bei vergleichsweise hohen Konzentrationen von HBOC-201 nicht gezeigt werden.

Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Abbau des HBOC-201 träger verläuft, als der Abbau der Vergleichsstoffe auf Hämbasis. In dem hier durchgeführten Versuch konnte zwar eine Bilirubinproduktion nach Inkubation mit HBOC-201 gemessen werden, diese fiel aber sehr gering aus. Gleichzeitig konnte in den HBOC-201 Proben keine Hämoxygenase 1 detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die in diesen Proben gemessene Bilirubinproduktion durch das in allen Endothelzellen vorhandene Isoenzym Hämoxygenase 2 ermöglicht wurde. HBOC wurde zwar von den Zellen aufgenommen, es ist aber denkbar, dass eine Herauslösung einzelner Hämoleküle aus dem HBOC-Polymer nur sehr langsam erfolgte. So konnten die Konzentrationen von Hämoglobin oder Häm nicht erreicht werden, die ein ausreichend starkes Signal für die Expressierung der Hämoxygenase 1 dargestellt hätten.

Die Ergebnisse der zweiten Messreihe lassen einen Schluss darauf zu, ob HBOC-201 von Endothelzellen aufgenommen wurde; sie zeigen auch, dass die Konzentration von

HBOC-201 ein Vielfaches der Häminkonzentration betragen musste, um ähnlich hohe Bilirubinwerte im Medium zu erreichen.

In dieser Messreihe konnte nur innerhalb der ersten Inkubationsphase von 14 Stunden Substrat für die Bilirubinsynthese aus dem Medium von den Endothelzellen aufgenommen werden. Nach Entfernung von HBOC-201 oder Hämin konnte das aufgenommene Substrat zur Herstellung von Bilirubin genutzt werden. Aus diesem Versuch lassen sich zwei unterschiedliche Schlussfolgerungen ziehen:

- sowohl HBOC-201 als auch Hämin wurde über einen Zeitraum von 14 Stunden von Endothelzellen aufgenommen. Beide Substrate wurden anschließend teilweise zu Bilirubin abgebaut.
- mit einer Häminkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  konnte ein nahezu gleicher Bilirubinwert gemessen werden, wie in den Proben, die mit 250  $\mu\text{M}$  Hämoglobin (enthalten in HBOC-201) inkubiert worden waren. Es war also eine fast 25 mal höhere Hämoglobinkonzentration in den HBOC-201 Proben notwendig um ähnliche Bilirubinwerte wie in den Häminproben zu erreichen.

## 6.2.1. Methodenkritik zum Zellkulturversuch

### 6.2.1.1. Messmethoden

Da in diesem Versuch lediglich die Bilirubinkonzentration im Medium, also extrazellulär gemessen wurde, sind diese Ergebnisse nicht direkt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar, geben aber einen Anhalt über die Syntheseleistung der Zellen. MOTTERLINI et al. konnten in einem Versuch mit anderen chemisch modifizierten Hämoglobinen (Hämoglobin A0 (HbA0), „cross-linked“ Hämoglobin (alpha-alpha-Hb), Cyanomet-alpha-alpha-Hämoglobin (CNmet alpha-alpha-Hb)) eine Anregung der Hämoxigenase 1 Expression zeigen [8]. Dies gelang auch durch eine Messung der HO-1 Aktivität mittels eines Enzymassays, der direkt die Syntheseleistung der intrazellulär vorliegenden HO-1 erkennbar macht.

Die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Westernblots sind aber direkt mit den

Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar. Somit lässt sich aufgrund der gemessenen Bilirubinproduktion im Medium und aufgrund der Ergebnisse des Westernblots der Schluss ziehen, dass im Gegensatz zu den anderen Blutersatzstoffen auf Hämoglobinbasis (HbA0, alpha alpha Hb, CNmet alpha alpha Hb) selbst hohe Dosen von HBOC-201 nicht zu einer Exprimierung der HO-1 führen.

#### 6.2.1.2. *Hohe HBOC-201 Konzentrationen*

Um Bilirubin im Medium detektieren zu können, war es notwendig, sehr hohe Konzentrationen von HBOC-201 zu wählen. Diese hohen Konzentrationen hatten aber zur Folge, dass trotz Spülung der Endothelzellen nicht das gesamte HBOC-201 vor der Lyse der Zellen entfernt werden konnte. Somit ist die erhöhte Proteinkonzentration in den HBOC-201 Proben zu erklären.

Daher ist das Ergebnis der ersten Versuchsreihe nur begrenzt aussagekräftig, was den Vergleich der Bilirubinproduktion der unterschiedlichen Gruppen betrifft. Die hier errechneten Werte sind aufgrund dieses Fehlers für die 750  $\mu$ M Hämoglobin enthaltenen Proben um ca. das 1,7fache, die der 250  $\mu$ M Hb-Proben um das ca. 1,2fache zu niedrig angegeben. Somit soll diese Versuchsreihe lediglich über den zeitlichen Ablauf der Bilirubinproduktion Auskunft geben. In den Häminproben war die Aktivität der Hämoxygenase 1 nach 10 Stunden am höchsten, und ließ dann wieder allmählich nach. In den HBOC-201 Proben war die Bilirubinproduktion ebenfalls nach 10 Stunden am höchsten und blieb dann auf einem nur gering niedrigerem Niveau bestehen. Dies kann so gedeutet werden, dass der Abbau durch die konstant vorhandene Hämoxygenase 2 erfolgte, der nur die langsam aus dem HBOC-201 herausgelösten einzelnen Hämoglobinmoleküle als Substrat zur Verfügung standen.

Die Proteinmessung der zweiten Messreihe war nicht durch die hohen HBOC-201 Konzentrationen verfälscht, da hier gründlicher mit Medium gespült worden war und den Zellen in einer zweiten Inkubationsphase kein Substrat für die Bilirubinsynthese angeboten wurde.



## 7. Zusammenfassung

Studien belegen, dass etwa 3% aller nichtherzchirurgischen koronaren Risikopatienten perioperativ einen Myokardinfarkt erleiden. Somit ist das perioperative Infarktisiko in dieser Patientengruppe im Vergleich zu Patienten ohne kardiale Risiken um das zehnfache bis fünfzigfache erhöht. Perioperative Myokardischämien manifestieren sich klinisch bei Risikopatienten auch als Rhythmusstörungen oder Angina pectoris. Die Gabe plasmatischer Sauerstoffträger, wie die zellfreie Hämoglobinlösung HBOC-201 oder die PFC-Emulsion, Oxygent® stellt eine potentielle Möglichkeit dar, die Inzidenz und Auswirkungen dieser Komplikationen zu verringern.

Am Rattenmodell wurde untersucht, ob therapeutischer oder prophylaktischer Einsatz der PFC Emulsion Oxygent® Infarkt- und Reperfusionsschäden bzw. Herzrhythmusstörungen nach Koronarligatur gefolgt von Reperfusion vermindern kann.

In einem Zellkulturversuch wurde untersucht, ob HBOC-201 Endothelzellen zur Expression des Hitzeschockproteins Hämooxygenase 1 (HO-1) anregen kann, welches protektiv auf die Entstehung von Ischämie- und Reperfusionsschäden wirkt.

Im Tierexperiment erhielt die Prophylaxe-Gruppe G1 25 min vor Ligaturverschluss  $6 \text{ g kg}^{-1}$  Oxygent®; die Therapiegruppe G2 erhielt die gleiche Dosis 10 min nach Ligaturverschluss. Die Negativ-Kontrollgruppe G3 erhielt NaCl in äquivalenter Menge. In den Gruppen G1 – G3 erfolgte die Beatmung bei einer  $\text{FIO}_2$  von 1,0. Die  $\text{O}_2$ -Kontrollgruppe G4 entsprach der Gruppe G3 bei einer reduzierten  $\text{FIO}_2$  von 0,3. Nach einer Ischämiezeit von 25 min folgte eine Reperusionszeit von 120 min. Die „area at risk“ wurde durch Patentblaufärbung, die Infarktareale wurden durch eine TTC-Färbung demarkiert. Anschließend erfolgte eine planimetrische Ausmessung der Herzareale.

In der Zellkultur wurden Endothelzellen der Ratte mit  $50 \mu\text{M}$  Hämin (Positiv-Kontrolle, G1), mit HBOC-201 ( $250 \mu\text{M}$ , G2 und  $750 \mu\text{M}$ , G3) und ohne weiteren Zusatz zum Kulturmedium (Negativ-Kontrolle, G4) für 2, 6, 10, 14 und 24 h inkubiert. Es folgte die Messung von Bilirubin im Medium und ein Nachweis von HO-1 durch einen Westernblot.

Im tierexperimentellen Versuch konnte keine signifikante Reduktion der Infarktareale

und der kardialen Arrhythmien durch die therapeutische oder prophylaktische Gabe der PFC Emulsion Oxygent® gezeigt werden.

Im Zellkulturversuch konnte gezeigt werden, dass HBOC-201 in Endothelzellen der Ratte nicht zu einer Expression des Enzyms HO-1 führt.

Im Vergleich der Ergebnisse des tierexperimentellen Teils mit denen anderer Arbeitsgruppen fällt auf, dass widersprüchliche Ergebnisse vor allem zu Versuchen am Hundemodell festzustellen sind. Dies lässt darauf schließen, dass anatomische und physiologische Unterschiede zwischen den Tieren dafür verantwortlich sind. Die Beatmung mit 100% O<sub>2</sub>, die für einen ausreichend hohen Sauerstofftransport durch PFC nötig ist, könnte zu einer vermehrten Entstehung von O<sub>2</sub>-Radikalen geführt haben, wodurch eine Aufhebung von positiven Effekten des PFCs während Ischämie- und Reperfusionzeit denkbar ist.

Die hohe Stabilität des HBOC-Moleküls, die einerseits für die gute Verträglichkeit bei der Anwendung an Mensch und Tier verantwortlich ist, scheint auch für das Ausbleiben eines Abbaus durch HO-1 verantwortlich zu sein. Die geringe Entstehung von Bilirubin ist auf die Syntheseleistung des Isoenzym Hämoxxygenase 2 zurückzuführen.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Menasche P, et al., Reduction of myocardial infarct size by a fluorocarbon-oxygenated reperfusate. *Am J Cardiol*, 1984. **53**: 608-13.
2. Menasche P, et al., Limitations of fluorocarbons in reducing myocardial infarct size. *Am J Cardiol*, 1985. **55**: 830-34.
3. Forman MB, et al., Reduction of infarct size with intracoronary perfluorochemical in a canine preparation of reperfusion. *Circulation*, 1985. **71**: 1060-68.
4. Forman MB, et al., Beneficial long-term effect of intracoronary perfluorochemical on infarct size and ventricular function in a canine reperfusion model. *J Am Coll Cardiol*, 1987. **9**: 1082-90.
5. Schaer GL, et al., Reduction in reperfusion injury by blood-free reperfusion after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1990. **15**: 1385-93.
6. Forman MB, et al., Pharmacologic perturbation of neutrophils by Fluosol results in a sustained reduction in infarct size in the canine model of reperfusion. *J Am Coll Cardiol*, 1992. **19**: 205-16.
7. Hale SL, et al., Effect of two perfluorocarbon emulsions on reperfusion injury after coronary artery occlusion in rabbits. *Basic Res Cardiol*, 1995. **90**: 404-9.
8. Motterlini R, et al., Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am J Physiol*, 1995. **269**: 648-55.
9. Maines MD, et al., Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J Biol Chem*, 1986. **261**: 411-19.
10. Masini E, et al., Heme oxygenase-1 and the ischemia-reperfusion injury in the rat heart. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003. **228**: 546-49.
11. Bak I, et al., The role of heme oxygenase-related carbon monoxide and ventricular fibrillation in ischemic/reperfused hearts. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**: 639-48.
12. Akamatsu Y, et al., Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury. *Faseb J*, 2004. **18**: 771-72.

13. Otterbein LE, et al., Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nat Med*, 2003. **9**: 183-90.
14. Pachori AS, et al., Hypoxia-regulated therapeutic gene as a preemptive treatment strategy against ischemia/reperfusion tissue injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**: 12282-87.
15. Yet SF, et al., Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice. *Circ Res*, 2001. **89**: 168-73.
16. Choi AM, Heme oxygenase-1 protects the heart. *Circ Res*, 2001. **89**: 105-7.
17. Pataki T, et al., Regulation of ventricular fibrillation by heme oxygenase in ischemic/reperfused hearts. *Antioxid Redox Signal*, 2001. **3**:125-34.
18. Yoshida T, et al., H(mox-1) constitutes an adaptive response to effect antioxidant cardioprotection: A study with transgenic mice heterozygous for targeted disruption of the Heme oxygenase-1 gene. *Circulation*, 2001. **103**: 1695-701.
19. Clark JE, et al., Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**: 643-51.
20. Maulik N, et al., Nitric oxide/carbon monoxide. A molecular switch for myocardial preservation during ischemia. *Circulation*, 1996. **94**: 398-406.
21. Wehner R, Gehring W, (1995) *Zoologie*, 23. Aufl., *Stoff- und Energiewechsel, Energetik*. Thieme, Stuttgart.
22. Schopf JW, *The evolution of the earliest cells*. *Sci. Am.*, 1978. 239: 110-38.
23. Hochachka PW, Somero GN, (1980) *Strategien biochemischer Anpassung*. Thieme, Stuttgart.
24. Schlegel HG, (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Aufl., *Die Zelle und ihre Struktur, Die eukaryotische Zelle*. Thieme, Stuttgart.
25. Cavalier-Smith T, *The Origin and Early Evolution of Eucaryotic Cell*. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 1981. 32- 33.
26. Weibel ER, (1984) *The Pathway for Oxygen*. Harward University Press, Camebridge/Ma.
27. Böttiger BW, Martin E, *Prävention perioperativer Myokardischämien - ein Update*. *Anaesthesist*, 2000. **49**: 174-86.

28. Christopherson R, et al., Perioperative morbidity in patients randomized to epidural or general anesthesia for lower extremity vascular surgery. *Perioperative Ischemia Randomized Anesthesia Trial Study Group [see comments]. Anesthesiology*, 1993. **79**: 422-34.
29. Mangano DT, et al., Association of perioperative myocardial ischemia with cardiac morbidity and mortality in men undergoing noncardiac surgery. *The Study of Perioperative Ischemia Research Group. N Engl J Med*, 1990. **323**: 1781-88.
30. Landesberg G, et al., Importance of long-duration postoperative ST-segment depression in cardiac morbidity after vascular surgery. *Lancet*, 1993. **341**: 715-19.
31. Sellards A, Minot G, Injection of Haemoglobin in man and its relation to blood destruction, with especial reference to the anaemias. *J Med Res*, 1916. **34**: 469-94.
32. Moss GS, et al., Stroma-free hemoglobin. I. Preparation and observations on in vitro changes in coagulation. *Surgery*, 1973. **74**: 198-203.
33. Friedman HI, et al., Histologic and ultrastructural effects of stroma-free hemoglobin solutions on rat liver, kidney, and brain. *Surg Forum*, 1977. **28**: 3-5.
34. Rabinovici R, et al., Biological responses to liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) are improved by a PAF antagonist. *Circ Shock*, 1990. **31**: 431-45.
35. Feola M, et al., Complement activation and the toxicity of stroma-free hemoglobin solutions in primates. *Circ Shock*, 1988. **25**: 275-90.
36. Savitsky JP, et al., A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther*, 1978. **23**: 73-80.
37. Schultz SC, et al., A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med*, 1993. **122**: 301-8.
38. Gulati A, et al., Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci*, 1995. **56**: 1433-42.
39. Gulati A, et al, Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit Care Med*, 1996. **24**: 137-47.
40. Spence RP, et al., Blood substitutes. *Clinical Practice of Transfusion Medicine*. 1996, Churchill Livingstone: New York. 967-84.
41. Standl T, Haemoglobin-based erythrocyte transfusion substitutes. *Expert Opin Biol Ther*, 2001. **1**: 831-43.

42. Burmeister MA, et al., Auswirkungen der prophylaktischen oder therapeutischen Gabe der Hämoglobinlösung HBOC-200 auf die Infarktgröße nach kardialer Ischämie und Reperfusion der Ratte. *Anästh Intensivmed*, 2003. **43**, 744.
43. Standl T, et al. Bovine haemoglobin is more potent than autologous red blood cells in restoring muscular tissue oxygenation after profound isovolaemic haemodilution in dogs. *Can J Anaesth*, 1996. **43**: 714-23.
44. Standl T, et al., Hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 provides higher and faster increase in oxygen tension in skeletal muscle of anemic dogs than do stored red blood cells. *J Vasc Surg*, 2003. **37**: 859-65.
45. Burmeister MA, et al., Effects of prophylactic or therapeutic application of bovine haemoglobin HBOC-200 on ischaemia-reperfusion injury following acute coronary ligation in rats. *Br J Anaesth*, 2005. **95**: 737-45.
46. Freitag M, et al., Enhanced central organ oxygenation after application of bovine cell-free haemoglobin HBOC-201. *Can J Anaesth* 2005. **52**: 904-14.
47. Freitag M, et al., Improvement of impaired microcirculation and tissue oxygenation by hemodilution with hydroxyethyl starch plus cell-free hemoglobin in acute porcine pancreatitis. *Pancreatology*, 2006. **6**: 232-39.
48. Standl T, Künstliche Sauerstoffträger: Hämoglobinlösungen - Stand 2004. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2005. **40**: 38-45.
49. Standl T, Artificial Oxygen Carriers: Hemoglobin-Based Oxygen Carriers - Current Status 2004. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 2004. **31**: 262-68.
50. Gayeski TE, et al., Whole animal, lung and muscle hemodynamics and function are maintained during and after Oxygent HT infusion. *Adv Exp Med Biol*, 1994. **361**: 313-18.
51. Riess JG, Krafft MP, Fluorinated materials for in vivo oxygen transport (blood substitutes), diagnosis and drug delivery. *Biomaterials*, 1998. **19**: 1529-39.
52. Spahn DR, et al., Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. *European Perflubron Emulsion Study Group [see comments]. Anesthesiology*, 1999. **91**: 1195-208.
53. Hort W, Pathologie des akuten Herzinfarktes. *Internist (Berl)*, 2001. **42**: 631-40.
54. Forman M, et al., Role of perfluorochemical emulsions in the treatment of myocardial reperfusion injury. *Am Heart J*, 1992. **124**: 1347-57.

55. Kolodgie FD, et al., *Limitation of no reflow injury by blood-free reperfusion with oxygenated perfluorochemical (Fluosol-DA 20%)*. *J Am Coll Cardiol*, 1991. **18**: 215-23.
56. Bajaj AK, et al., *Limitation of myocardial reperfusion injury by intravenous perfluorochemicals. Role of neutrophil activation*. *Circulation*, 1989. **79**: 645-56.
57. Forman MB, et al., *Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury*. *Circulation*, 1990. **81**: 69-78.
58. Fleisher LA, et al., *Postoperative myocardial ischemia: etiology of cardiac morbidity or manifestation of underlying disease?* *J Clin Anesth*, 1995. **7**: 97-102.
59. Mangano DT, et al., *Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group*. *N Engl J Med*, 1996. **335**: 1713-20.
60. Wallace A, et al., *Prophylactic atenolol reduces postoperative myocardial ischemia. McSPI Research Group*. *Anesthesiology*, 1998. **88**: 7-17.
61. Poldermans D, et al., *Bisoprolol reduces cardiac death and myocardial infarction in high-risk patients as long as 2 years after successful major vascular surgery*. *Eur Heart J*, 2001. **22**: 1353-58.
62. Pan W, et al., *Statins Are Associated With a Reduced Incidence of Perioperative Mortality After Coronary Artery Bypass Graft Surgery*. *Circulation*, 2004. **14**: 1145-49.
63. O'Neil-Callahan K, et al., *Statins decrease perioperative cardiac complications in patients undergoing noncardiac vascular surgery: the Statins for Risk Reduction in Surgery (StaRRS) study*. *Am Coll Cardiol*. 2005. **45**: 336-42.
64. Waurick R, Van Aken H, *Update in thoracic epidural anaesthesia*. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2005. **19**: 201-13.
65. Bolli R, *Mechanism of myocardial "stunning"*. *Circulation*, 1990. **82**: 723-38.
66. Braunwald E, Kloner RA, *The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction*. *Circulation*, 1982. **66**: 1146-49.
67. Ribeiro LG, et al., *Prostacyclin in experimental myocardial ischemia: effects on hemodynamics, regional myocardial blood flow, infarct size and mortality*. *Am J Cardiol*, 1981. **47**: 835-40.
68. Anderson JL, et al., *A randomized trial of intracoronary streptokinase in the treatment of acute myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 1983. **308**: 1312-18.

69. Stack RS, et al., Functional improvement of jeopardized myocardium following intracoronary streptokinase infusion in acute myocardial infarction. *J Clin Invest*, 1983. **72**: 84-95.
70. Ito H, et al., Time course of functional improvement in stunned myocardium in risk area in patients with reperfused anterior infarction. *Circulation*, 1993. **87**: 355-62.
71. Sefrin P, Schua R, Ergebnisse kardiopulmonaler Wiederbelebung. *Internist (Berl)*, 1992. **33**: 332-40.
72. Goldstein S, The epidemiology of tachyarrhythmia in sudden death. *Pacing Clin Electrophysiol*, 1986. **9**: 1339-42.
73. Birnbaum Y, et al., Pathobiology and Clinical Impact of Reperfusion Injury. *J Thromb Thrombolysis*, 1997. **4**: 185-95.
74. Ravingerova T, et al., Free oxygen radicals contribute to high incidence of reperfusion-induced arrhythmias in isolated rat heart. *Life Sci*, 1999. **65**: 1927-30.
75. Aiello EA, et al., Arrhythmia and delayed recovery of cardiac action potential during reperfusion after ischemia. Role of oxygen radical-induced no-reflow phenomenon. *Circ Res*, 1995. **77**: 153-62.
76. Humphreys RA, et al., Orally administered NHE1 inhibitor cariporide reduces acute responses to coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol*, 1999. **276**: 749-57.
77. Lefler AM, et al., Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 1994. **28**: 289-94.
78. Lefler AM, et al., Protection of ischemia-reperfusion injury by sydnonimine NO donors via inhibition of neutrophil-endothelium interaction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993. **22**: 27-33.
79. McCord JM, Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook. *Free Radic Biol Med*, 1988. **4**: 9-14.
80. Zweier JL, et al., Recombinant superoxide dismutase reduces oxygen free radical concentrations in reperfused myocardium. *J Clin Invest*, 1987. **80**: 1728-34.
81. Jeroudi MO, et al., Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants. *Am J Cardiol*, 1994. **73**: 2B-7B.
82. McCord JM, Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med*, 1985. **312**: 159-63.



83. Russell RC, et al., Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg*, 1989. **5**: 79-84.
84. Korthuis RJ, Granger DN, Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol*, 1993. **16**: 119-26.
85. Kloner RA, et al., Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation*, 1989. **80**: 1115-27.
86. McCord JM, Fridovich I, The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*, 1969. **244**: 6056-63.
87. Ferrari R, Ceconi C, Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents. *Am J Med*, 1991. **91**: 95-105.
88. Homeister JW, Lucchesi BR, Complement activation and inhibition in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1994. **34**: 17-40.
89. Kilgore KS, et al., The complement system in myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 1994. **28**: 437-44.
90. Weisman HF, et al., Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*, 1990. **249**: 146-51.
91. Entman ML, Smith CW, Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res*, 1994. **28**: 1301-11.
92. Hansen PR, Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*, 1995. **91**: 1872-85.
93. Weyrich AS, et al., In vivo neutralization of P-selectin protects feline heart and endothelium in myocardial ischemia and reperfusion injury. *J Clin Invest*, 1993. **91**: 2620-29.
94. Ma XL, et al., Monoclonal antibody to L-selectin attenuates neutrophil accumulation and protects ischemic reperfused cat myocardium. *Circulation*, 1993. **88**: 649-58.
95. Forman MB, et al., Demonstration of myocardial reperfusion injury in humans: results of a pilot study utilizing acute coronary angioplasty with perfluorochemical in anterior myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1991. **18**: 911-18.

96. Murray JJ, et al., Fluosol in myocardial reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*, 1995. **25**: 1742-43.
97. Motterlini R, Macdonald VW, Cell-free hemoglobin potentiates acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in rabbit hearts. *J Appl Physiol*, 1993. **75**: 2224-33.
98. Wagener FA, et al., Differential effects of heme oxygenase isoforms on heme mediation of endothelial intracellular adhesion molecule 1 expression. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **291**: 416-23.
99. Haider A, et al., Regulation of cyclooxygenase by the heme-heme oxygenase system in microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **300**: 188-94.
100. Li Volti G, et al., Heme oxygenase attenuates angiotensin II-mediated increase in cyclooxygenase-2 activity in human femoral endothelial cells. *Hypertension*, 2003. **41**: 715-19.
101. National Research Council, I.o.L.A.R., Commission on Life Sciences, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 1996, Washington, D.C.: National Academy Press.
102. Rice HE, et al., Dose-dependent reduction of myocardial infarct size with the perfluorochemical Fluosol-DA. *Am Heart J*, 1990. **120**: 1039-46.
103. Ye J, et al., A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality. *Mol Cell Biochem*, 1997. **176**: 227-33.
104. Waynforth H, Flecknell P, *Experimental and surgical technique in the rat*. second Edition ed. 1992, London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto: Academic Press. 3.
105. Selye H, et al., Simple techniques for surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*, 1960. **11**: 398-407.
106. Hort W, da Canalis S, *Untersuchung an Rattenherzen nach temporärer Unterbindung der linken Kranzarterie*. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1965. **339**: 61-71.
107. Okamura T, et al., Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovascular Research*, 2000. **45**: 642-50.
108. Ito WD, et al., Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J Mol Cell Cardiol*, 1997. **29**: 2169-75.

109. Walker MJ, et al., *The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion.* *Cardiovasc Res*, 1988. **22**: 447-55.
110. Curtis MJ, Walker MJ, *Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia.* *Cardiovasc Res*, 1988. **22**: 656-65.
111. Fishbein MC, et al., *Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique.* *Am Heart J*, 1981. **101**: 593-600.
112. Klein HH, et al., *The mechanism of tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction.* *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 1981. **393**: 287-97.
113. Takashi E, Ashraf M, *Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers.* *J Mol Cell Cardiol*, 2000. **32**: 209-24.
114. Turcanu V, et al., *Determination of heme oxygenase activity in murine macrophages for studying oxidative stress inhibitors.* *Anal Biochem*, 1998. **263**: 251-53.
115. Laemmli UK, *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* *Nature*, 1970. **227**: 680-85.
116. Cleman M, et al., *Prevention of ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty by transcatheter infusion of oxygenated Fluosol DA 20%* *Circulation*, 1986. **74**: 555-62.
117. Robalino BD, et al., *Protection against ischemia during prolonged balloon inflation by distal coronary perfusion with use of an autoperfusion catheter or Fluosol,* *J Am Coll Cardiol*. 1992. **20**: 1378-84.
118. Young LH, et al., *Metabolic and functional effects of perfluorocarbon distal perfusion during coronary angioplasty.* *Am J Cardiol*. 1990. **65**: 986-90.
119. Cowley MJ, et al., *Perfluorochemical perfusion during coronary angioplasty in unstable and high-risk patients.* *Circulation*, 1990. **81**: 27-34.
120. Taher IP, et al., *Pretreating rats with hyperoxia attenuates ischemia-reperfusion injury of the heart.* *Life Sci*, 2001. **68**: 1629-40.
121. Kaneda T, et al., *Postischemic reperfusion injury can be attenuated by oxygen tension control.* *Jpn Circ J*, 2001. **65**: 213-18.

122. Kolodgie FD, et al., *Effect of Fluosol-DA on infarct morphology and vulnerability to ventricular arrhythmia. Am Heart J, 1986. 112: 1192-201.*

123. Maxwell MP, et al., *Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. Cardiovasc Res, 1987. 21: 737-46.*

## 9. Anhang

### 9.1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
alpha alpha Hb	hemoglobin „cross-linked“ zwischen alpha-Ketten mit bis-(3,5-dibromosalicyl)fumarate
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
BAGS	Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der freien und Hansestadt Hamburg
BGA	Blutgasanalyse
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> = Rinder-Serum-Albumin
BZ	Blutzuckerkonzentration
Ca <sup>++</sup>	Calcium ionisiert
CO	Kohlenmonoxyd
COHb	Carboxyhämoglobin
Da	Dalton
DCLHb	Diaspirin Cross-linked Hemoglobin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribinucleinsäure
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKG	Elektrokardiogramm
E-Lyte	Elektrolyte
fHb	Freies Hämoglobin (plasmatisch gelöst)
FiO <sub>2</sub>	Fraktion des inspirierten Sauerstoffs
Hb	Hämoglobin
HbA0	Hämoglobin, Blutgruppe A0
HbO <sub>2</sub>	Oxyhämoglobin

HBOC	Hemoglobin Based Oxygen Carrier
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
HO-1	Hämoxygenase 1
HO-2	Hämoxygenase 2
HZV	Herzzeitvolumen
IHD	Isovoläme Hämodilution
I/R	Ischämie gefolgt von Reperfusion
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzerkrankung
KIU	Kallikrein Inhibitory Units
KOD	Kolloidosmotischer Druck
LAD	Left Anterior Descendend Artery=Ramus interventricularis sinister
LV	Linker Ventrikel
MAP	Mittlerer Arterieller Druck
MetHb	Methämoglobin
MGW	Molekulargewicht
min	Minute(n)
MPS	makrozytär-phagozytären Systems
MW	Mittelwert
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
p	Alphafehler
P	Partialdruck
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	Pulmonalarterieller Druck
PBS	Phosphatyl buffered saline
PFC	Perfluorocarbone
P50	Halbsättigungspartialdruck des Hämoglobins
PTCA	Percutane Transluminäre Coronar Angioplastie

PVR	Pulmonaler Vaskulärer Widerstand
rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RV	Rechter Ventrikel
RW	Referenzwert
SaO <sub>2</sub>	Arterielle Sauerstoffsättigung
sek	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std	Stunde(n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Temp	Temperatur
tHb	Gesamthämoglobin
tPO <sub>2</sub>	Gewebesauerstoffpartialdruck
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid
VES	Ventrikuläre Extrasystole
VF	Ventrikuläres Flimmern
Vol.	Volumen; bezogen auf das Volumen
VT	Ventrikuläre Tachykardie
v/v	<i>volume per volume</i> = Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> = Gewicht pro Volumen
ZVD	Zentralvenöser Druck
ZVK	Zentralvenöser Katheter

## 9.2. Tabellen

*Tabelle 9.2.1. Gewicht der Tiere*

Gewicht (g)			
Gruppe		MW	± SD
Prophylaxe	G1	328,0	± 42,2
Therapie	G2	317,5	± 20,3
NaCl-Gruppe	G3	317,8	± 24,3
O <sub>2</sub> -Gruppe	G4	308,3	± 21,8



*Tabelle 9.2.2. Darstellung der Herzfrequenz (\* p<0,05 G4 vs. G3)*

<b>Herzfrequenz</b>	<b>Prophylaxe G1</b>			<b>Therapie G2</b>			<b>NaCl-Gruppe G3</b>			<b>O2-Gruppe G4</b>		
<b>HF ( 1 min<sup>-1</sup>)</b>	<b>MW</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>	<b>MW</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>	<b>MW</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>	<b>MW</b>	<b>±</b>	<b>SD</b>
<b>Ruhe +30</b>	431	±	64	420	±	70	446	±	35	484	±	38
<b>Applikation 1+10</b>	465	±	64	424	±	59	454	±	38	488	±	49
<b>Ligatur +5</b>	480	±	47	441	±	43	473	±	20	506	±	53
<b>Applikation 2+10 min</b>	488	±	44	439	±	56	473	±	42	488	±	44
<b>Reperfusion +10 min</b>	476	±	41	450	±	52	461	±	42	476	±	41
<b>Reperfusion +20 min</b>	465	±	42	450	±	54	473	±	39	495	±	54
<b>Reperfusion +30 min</b>	446	±	57	469	±	40	461	±	56	491	±	45
<b>Reperfusion +40 min</b>	461	±	45	473	±	42	469	±	37	506	±	44
<b>Reperfusion +50 min</b>	473	±	33	469	±	45	450	±	30	510	±	45*
<b>Reperfusion +60 min</b>	476	±	28	469	±	45	446	±	23	510	±	42*
<b>Reperfusion +70 min</b>	480	±	30	458	±	49	450	±	26	499	±	37*
<b>Reperfusion +80 min</b>	450	±	26	454	±	38	458	±	29	506	±	38*
<b>Reperfusion +90 min</b>	480	±	37	435	±	40	446	±	32	506	±	28*
<b>Reperfusion +100 min</b>	450	±	21	424	±	38	431	±	37	499	±	30*
<b>Reperfusion +110 min</b>	458	±	20	428	±	42	439	±	26	495	±	34*
<b>Reperfusion +120 min</b>	454	±	18	431	±	37	424	±	28	491	±	47*

\* p<0,05 G4 vs. G3

*Tabelle 9.2.3. Darstellung des mittleren arteriellen Drucks (\* p<0,05 G1 vs. G3)*

MAP mmHg	Prophylaxe G1			Therapie G2			NaCl-Gruppe G3			O2-Gruppe G4		
	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD	MW	±	SD
<b>Ruhe +30</b>	99	±	18	97	±	13	94	±	21	99	±	19
<b>Applikation 1+10</b>	100	±	23	97	±	15	107	±	19	104	±	19
<b>Ligatur +5</b>	67	±	21*	98	±	20	97	±	20	106	±	22
<b>Applikation 2+10 min</b>	80	±	22	90	±	23	98	±	20	111	±	18
<b>Reperfusion +10 min</b>	84	±	24	102	±	23	89	±	19	94	±	40
<b>Reperfusion +20 min</b>	74	±	19	101	±	26	86	±	14	99	±	19
<b>Reperfusion +30 min</b>	72	±	24	100	±	23	78	±	11	92	±	19
<b>Reperfusion +40 min</b>	67	±	23	95	±	21	78	±	15	85	±	19
<b>Reperfusion +50 min</b>	68	±	21	91	±	18	76	±	14	99	±	15
<b>Reperfusion +60 min</b>	68	±	26	88	±	24	77	±	18	94	±	18
<b>Reperfusion +70 min</b>	65	±	26	88	±	27	78	±	16	88	±	18
<b>Reperfusion +80 min</b>	63	±	20	87	±	21	77	±	22	90	±	22
<b>Reperfusion +90 min</b>	67	±	23	86	±	23	74	±	17	90	±	23
<b>Reperfusion +100 min</b>	70	±	29	83	±	22	66	±	14	87	±	27
<b>Reperfusion +110 min</b>	70	±	27	85	±	23	63	±	17	86	±	22
<b>Reperfusion +120 min</b>	70	±	25	98	±	28	73	±	19	89	±	25

\* p<0,05 G1 vs. G3

*Tabelle 9.2.4. arterieller Kohlendioxidpartialdruck (\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)*

<b>paCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>						
	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	38,3 ± 4,9	38,3 ± 6,6	37,1 ± 4,1	36,8 ± 5,0	38,6 ± 3,1	39,2 ± 5,3
<b>Therapie G2</b>	31,3 ± 8,9	34,5 ± 3,9	33,8 ± 3,8 *	35,4 ± 4,2	37,8 ± 5,6	37,3 ± 5,1
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	39,3 ± 7,2	38,4 ± 6,4	41,6 ± 1,8	40,3 ± 5,0	39,3 ± 5,9	38,5 ± 6,5
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	34,0 ± 7,7	34,5 ± 6,3	36,9 ± 6,4	36,4 ± 5,9	35,8 ± 5,7	38,1 ± 8,0

*Tabelle 9.2.5. arterieller Sauerstoffpartialdruck (\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)*

<b>paO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>						
	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	361,9 ± 96	474,7 ± 75 *	446 ± 121	371,7 ± 146	431,7 ± 107 *	401,5 ± 101 *
<b>Therapie G2</b>	388,3 ± 75	415,2 ± 82	405,9 ± 82	545,3 ± 40 *	524,8 ± 51 *	477 ± 53
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	332,4 ± 127	345,2 ± 136	354,1 ± 103	342,1 ± 109	329,4 ± 94	380,3 ± 108
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	106,4 ± 24 *	108,1 ± 24 *	108 ± 12 *	107,7 ± 16 *	97,43 ± 20 *	98,54 ± 24 *

*Tabelle 9.2.6. Gesamthämoglobin-Konzentration*

<b>tHb (mg dl-1)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	14,41 ± 1,7	12,64 ± 1,7	12,53 ± 1,6	12,49 ± 14	12,86 ± 12	12,79 ± 13
<b>Therapie G2</b>	13,64 ± 0,8	12,15 ± 1,1	12,99 ± 1,2	11,84 ± 1,7	12,03 ± 13	12,03 ± 12
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	13,01 ± 1	12,10 ± 1,2	12,19 ± 1,6	11,66 ± 12	11,39 ± 12	11,94 ± 12
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	12,16 ± 1,1	11,76 ± 1,2	11,69 ± 1,1	11,17 ± 1,2	11,68 ± 13	11,86 ± 12

*Tabelle 9.2.7. rektale Körpertemperatur*

<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	37,65 ± 0,5	37,95 ± 0,3	38,19 ± 0,6	37,86 ± 0,6	37,88 ± 0,4	38,11 ± 0,6
<b>Therapie G2</b>	38,19 ± 0,4	38,24 ± 0,6	38,16 ± 0,4	37,79 ± 0,6	37,78 ± 0,8	37,80 ± 0,5
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	37,85 ± 0,5	37,75 ± 0,5	37,75 ± 1,0	37,48 ± 0,9	37,89 ± 0,7	37,76 ± 0,7
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	37,95 ± 0,6	37,89 ± 0,9	38,13 ± 0,5	38,01 ± 0,6	38,04 ± 0,9	37,86 ± 0,5

*Tabelle 9.2.8. art. Sauerstoffgehalt*

<i>O<sub>2</sub>ct (ml dl-1)</i>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	19,50 ± 2,3	16,05 ± 1,9	15,83 ± 2,0	15,58 ± 2,0	16,25 ± 1,9	16,34 ± 3,2
<b>Therapie G2</b>	18,68 ± 1,1	17,06 ± 1,9	17,8 ± 1,7	15,09 ± 2,3	15,34 ± 2,5	15,14 ± 2,3
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	17,84 ± 1,3	16,54 ± 1,6	16,7 ± 2,2	15,99 ± 1,9	15,63 ± 2,2	16,40 ± 3,0
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	15,80 ± 1,7	15,18 ± 2,1	15,11 ± 1,4	14,56 ± 1,5	14,19 ± 1,8	14,00 ± 1,9

*Tabelle 9.2.9. Konzentration Oxyglobin (\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)*

<i>HbO<sub>2</sub> (%)</i>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	98,75 ± 0,7	93,66 ± 3,5	92,65 ± 3,1 *	92,24 ± 2 *	92,44 ± 2,3	91,61 ± 2,7
<b>Therapie G2</b>	98,54 ± 0,6	98,56 ± 0,5	98,64 ± 0,6	91,51 ± 1,8 *	91,69 ± 1,8	90,49 ± 1,9 *
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	98,5 ± 1	98,48 ± 0,9	98,56 ± 0,8	98,55 ± 1	98,68 ± 0,8	98,83 ± 0,6
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	93,44 ± 6,4 *	92,64 ± 7,3 *	93,19 ± 3,1 *	93,93 ± 2,3 *	88,26 ± 12 *	85,91 ± 13 *

*Tabelle 9.2.10. pH-Wert (\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)*

<b>pH</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	7,38 ± 0	7,39 ± 0	7,36 ± 0,1	7,33 ± 0,1	7,34 ± 0,1	7,29 ± 0,1
<b>Therapie G2</b>	7,43 ± 0,1 *	7,40 ± 0	7,38 ± 0	7,36 ± 0	7,33 ± 0	7,29 ± 0
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	7,37 ± 0	7,37 ± 0	7,35 ± 0	7,36 ± 0	7,36 ± 0	7,32 ± 0
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	7,42 ± 0	7,40 ± 0	7,37 ± 0,1	7,37 ± 0,1	7,32 ± 0,2	7,34 ± 0

*Tabelle 9.2.11. Standardbasenüberschuss*

<b>SBE</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	-2,18 ± 2,7	-2,14 ± 3,4	-4,43 ± 2,1	-6,04 ± 3,4	-4,59 ± 2,4	-6,93 ± 3,2
<b>Therapie G2</b>	-4,06 ± 2,5	-2,88 ± 2,5	-4,69 ± 2,5	-4,69 ± 2,5	-5,41 ± 1,2	-7,73 ± 3,1
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	-2,31 ± 3,3	-3,1 ± 3,3	-2,31 ± 1,0	-2,33 ± 2,2	-3,43 ± 1,6	-5,34 ± 3,7
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	-1,73 ± 3,3	-3,29 ± 1,9	-3,65 ± 3,2	-4,3 ± 3,4	-6,58 ± 6,6	-4,98 ± 3,2

*Tabelle 9.2.12. Natrium-Konzentration*

<b>Na<sup>+</sup> (mmol l-1)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	138,6 ± 4,4	139,6 ± 1,9	139,3 ± 4,1	137,3 ± 3,4	140,5 ± 4,5	140,3 ± 4,7
<b>Therapie G2</b>	140,4 ± 4,5	137,6 ± 4,5	139,9 ± 4,9	139,4 ± 4,1	140,1 ± 3	143,3 ± 2,3
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	139,8 ± 9,5	142,6 ± 3,1	140,1 ± 3,9	143 ± 3,3	141,3 ± 3,8	143,9 ± 5,9
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	139,9 ± 2,9	138,6 ± 4,5	137,6 ± 6,6	138,3 ± 8,5	139,5 ± 3,7	143 ± 4,6

*Tabelle 9.2.13. Kalium-Konzentration*

<b>K<sup>+</sup> (mmol l-1)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	5,9 ± 1,0	5,5 ± 0,7	5,7 ± 1,1	5,9 ± 0,7 *	5,6 ± 1,1	6,9 ± 1,6
<b>Therapie G2</b>	4,7 ± 1,2	5,0 ± 0,5	4,9 ± 0,7	4,6 ± 0,5	4,8 ± 0,4	5,4 ± 1,1
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	5,2 ± 0,9	4,7 ± 1,1	5,1 ± 0,8	4,7 ± 0,8	4,9 ± 0,8	5,5 ± 1,3
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	5,0 ± 0,5	4,7 ± 0,7	4,9 ± 0,8	4,6 ± 0,8	4,9 ± 1,4	5,4 ± 1,5

*Tabelle 9.2.14. Konzentration an ionisiertem Calcium*

<b>Ca<sup>++</sup> (mmol l-1)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	1,21 ± 0,2	1,14 ± 0,2	1,19 ± 0,1	1,23 ± 0,2	1,20 ± 0,1	1,21 ± 0,2
<b>Therapie G2</b>	1,15 ± 0,1	1,30 ± 0,3	1,19 ± 0,1	1,16 ± 0,1	1,27 ± 0,1	1,16 ± 0,1
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	1,15 ± 0,2	1,12 ± 0,1	1,24 ± 0,1	1,23 ± 0,1	1,19 ± 0,1	1,23 ± 0,2
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	1,21 ± 0,1	1,22 ± 0,1	1,23 ± 0,1	1,31 ± 0,2	1,16 ± 0,1	1,27 ± 0,1

*Tabelle 9.2.15. Desoxyhämoglobin (RHb)*

<b>cHHb (%)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	0,19 ± 0,3	0,13 ± 0,3	0,038 ± 0,1	0,05 ± 0,1	0,05 ± 0,1	0,14 ± 0,4
<b>Therapie G2</b>	0,05 ± 0,1	0 ± 0	0,025 ± 0,1	0,73 ± 1,9	1,05 ± 2,9	0,16 ± 0,5
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	0,33 ± 0,6	0,45 ± 0,6	0,26 ± 0,3	0,35 ± 0,5	0,19 ± 0,4	0,15 ± 0,2
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	5,56 ± 6,3 *	6,44 ± 7,1 *	5,71 ± 3,2 *	5,05 ± 2,4 *	10,76 ± 12 *	13,11 ± 13 *



*Tabelle 9.2.16. arterielle Sättigung (\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)*

saO <sub>2</sub> (%)	Ruhephase +10min	Applikation1 +10min	Okklusion +5min	Applikation2 +10min	Reperfusion +10min	Reperfusion +110min
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	99,8 ± 0,1	99,9 ± 0	99,8 ± 0,2	99,7 ± 0,4	99,9 ± 0,1	99,8 ± 0,2
<b>Therapie G2</b>	99,9 ± 0,1	99,9 ± 0	99,9 ± 0,1	99,9 ± 0	99,9 ± 0	99,9 ± 0
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	99,7 ± 0,3	99,7 ± 0,3	99,8 ± 0,2	99,8 ± 0,2	99,7 ± 0,3	99,8 ± 0,4
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	97,1 ± 2,4 *	97,1 ± 2,6 *	97,5 ± 0,8 *	97,3 ± 1,1 *	95,1 ± 4,5 *	95,6 ± 4,0 *

*Tabelle 9.2.17. Blutzucker*

BZ (mg dl-1)	Ruhephase +10min	Applikation1 +10min	Okklusion +5min	Applikation2 +10min	Reperfusion +10min	Reperfusion +110min
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	112,6 ± 15	130,8 ± 16	125,6 ± 23	125,1 ± 22	129,4 ± 21	106 ± 22
<b>Therapie G2</b>	115,8 ± 11	116,3 ± 20	106,8 ± 20	138,8 ± 18	137,9 ± 17	127,8 ± 22
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	117,8 ± 11	117,3 ± 22	128,4 ± 17	131,6 ± 13	127,5 ± 14	118 ± 17
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	126,6 ± 21	129 ± 20	123,3 ± 24	128,3 ± 38	127 ± 42	124,1 ± 36

*Tabelle 9.2.18. Zentraler Venendruck*

<b>ZVD (mmHg)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	6,8 ± 3,5	7 ± 3,0	6,5 ± 2,5	6,4 ± 2,1	5,6 ± 3,2	6,5 ± 3,7
<b>Therapie G2</b>	6 ± 1,8	6,4 ± 1,9	7 ± 1,9	7,6 ± 4,1	6,3 ± 2,3	5,8 ± 1,7
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	7 ± 2,7	6,9 ± 3,4	7,3 ± 2,7	7,6 ± 2,5	7,1 ± 1,8	7,5 ± 1,5
<b>O2-Gruppe G4</b>	6,1 ± 2,0	6,6 ± 2,0	7,6 ± 2,9	6,6 ± 2,0	7,6 ± 3,2	6,4 ± 2,2

*Tabelle 9.2.19. gemischt venöse Sättigung (\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)*

<b>SAT</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	99,8 ± 0,3	99,9 ± 0,3	100 ± 0	99,9 ± 0,1	100 ± 0	99,8 ± 0,5
<b>Therapie G2</b>	100 ± 0,1	100,0 ± 0	100 ± 0,1	99,3 ± 1,9	99,0 ± 2,9	99,8 ± 0,5
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	99,7 ± 0,7	99,6 ± 0,6	99,7 ± 0,4	99,7 ± 0,5	99,8 ± 0,4	99,9 ± 0,2
<b>O2-Gruppe G4</b>	94,4 ± 6,4 *	93,5 ± 7,2 *	94,3 ± 3,4 *	94,9 ± 2,4 *	89,2 ± 12,4 *	86,8 ± 12,9 *

*Tabelle 9.2.20. inspiratorische Sauerstoffkonzentration (\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)*

<b>F<sub>i</sub>O<sub>2</sub>(%)</b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	96,1 ± 3,9	96,4 ± 3,8	96,1 ± 4,1	96,0 ± 4,5	96,0 ± 4,5	96,3 ± 3,9
<b>Therapie G2</b>	94,4 ± 4,6	94,0 ± 4,8	92,9 ± 5,7	93,4 ± 5,0	93,3 ± 5,2	92,8 ± 5,3
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	97,0 ± 4,8	96,8 ± 4,6	97,3 ± 4,5	96,9 ± 4,4	96,6 ± 4,4	96,5 ± 5,1
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	31,6 ± 2,5 *	32,1 ± 3,7 *	31,5 ± 1,9 *	31,1 ± 1,4 *	31,1 ± 1,1 *	31,5 ± 2,1 *

*Tabelle 9.2.21. Standardbikarbonat*

<b>HCO<sub>3</sub></b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	22,0 ± 2,6	22,1 ± 3,4	20,0 ± 1,8	18,7 ± 2,9	20,0 ± 1,8	18,3 ± 2,6
<b>Therapie G2</b>	19,7 ± 3,0	21,1 ± 2,5	19,4 ± 2,4	19,6 ± 2,4	19,3 ± 1,4	17,4 ± 2,8
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	22,0 ± 3,5	21,3 ± 3,4	22,3 ± 1,0	22,2 ± 2,1	21,1 ± 1,7	19,7 ± 3,8
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	21,0 ± 2,8	20,6 ± 2,3	20,6 ± 3,1	20,1 ± 3,2	18,4 ± 4,9	19,7 ± 3,3

*Tabelle 9.2.22. Gesamt Kohlendioxid*

<b>tCO<sub>2</sub></b>	<b>Ruhephase +10min</b>	<b>Applikation1 +10min</b>	<b>Okklusion +5min</b>	<b>Applikation2 +10min</b>	<b>Reperfusion +10min</b>	<b>Reperfusion +110min</b>
<b>Gruppe</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Prophylaxe G1</b>	52,0 ± 6,0	52,0 ± 8,1	47,2 ± 4,2	44,4 ± 6,8	47,5 ± 4,1	43,5 ± 6,0
<b>Therapie G2</b>	46,2 ± 7,4	49,6 ± 5,8	45,7 ± 5,4	46,4 ± 5,6	45,6 ± 3,4	41,6 ± 6,5
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	51,9 ± 8,4	50,3 ± 8,1	52,8 ± 2,2	52,4 ± 5,0	49,8 ± 4,1	46,7 ± 9,1
<b>O2-Gruppe G4</b>	49,4 ± 6,7	48,6 ± 5,6	48,6 ± 7,3	47,4 ± 6,8	43,5 ± 11,1	46,7 ± 7,9

*Tabelle 9.2.23. Bilirubinproduktion Zellkulturgruppen G1 – G4*

<b>Bilirubin (pmol/mg/h)</b>					
<b>Inkubationszeit t (h)</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
<b>Gruppe n=4</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>	<b>MW ± SD</b>
<b>Hämin (50 µM) G1</b>	70,2 ± 6,27	97,29 ± 11,86	125,14 ± 13,97	95,88 ± 12,31	80,08 ± 7,8
<b>HBOC (Hb 250 µM) G2</b>	0 ± 0	3,16 ± 0,02	7,42 ± 0,33	6,44 ± 0,03	6,65 ± 0,28
<b>HBOC (Hb 750 µM) G3</b>	0 ± 0	14,45 ± 1,95	16,86 ± 0,98	14,64 ± 2,42	14,22 ± 1,34
<b>Kontrolle G4</b>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

*Tabelle 9.2.24. Proteingehalt Zellkulturgruppen G1 – G4*

<b>Protein (mg/ml)</b>					
<b>Inkubationszeit t (h)</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
<b>Gruppe</b>	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD	MW ± SD
<b>Hämin (50 µM) G1</b>	1,64 ± 0,09	1,47 ± 0,1	1,68 ± 0,07	1,88 ± 0,04	1,80 ± 0,08
<b>HBOC (Hb 250 µM) G2</b>	2,03 ± 0,06	1,93 ± 0,01	1,98 ± 0,09	1,9 ± 0,01	2,01 ± 0,02
<b>HBOC (Hb 750 µM) G3</b>	2,87 ± 0,36	2,24 ± 0,18	2,67 ± 0,43	2,9 ± 0,75	3,01 ± 0,13
<b>Kontrolle G4</b>	1,56 ± 0,08	1,54 ± 0,06	1,8 ± 0,12	1,76 ± 0,12	1,79 ± 0,09

*Tabelle 9.2.25. Bilirubinproduktion Zellkulturgruppen G5 - G7*

<b>Bilirubin (pmol/mg/h)</b>	
<b>Gruppe n=5</b>	MW ± SD
<b>Hämin (10 µM) G5</b>	5,61 ± 1,07
<b>HBOC (Hb 250 µM) G6</b>	5,36 ± 0,04
<b>Kontrolle G7</b>	0 ± 0

*Tabelle 9.2.26. Proteingehalt Zellkulturgruppen G5 – G7*

<b>Protein (mg/ml)</b>			
<b>Gruppe</b>	MW	±	SD
<b>Hämin (10 µM) G5</b>	1,63	±	0,05
<b>HBOC (Hb 250 µM) G6</b>	1,71	±	0,01
<b>Kontrolle G7</b>	1,62	±	0,01

## **10. Danksagung**

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Jochen Schulte am Esch danken, der bis 2005 Direktor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie war. Unter seiner Leitung entstanden in unserer Arbeitsgruppe viele Projekte, die durch seine Unterstützung ermöglicht wurden. Ich möchte auch dem amtierenden Direktor der Klinik Herrn Prof. Dr. Götz für seine Unterstützung bei den Vorträgen und Veröffentlichungen und für sein Interesse an dieser Arbeit danken.

Mein ganz besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Prof. Thomas Standl. Er war stets ein verlässlicher Betreuer und immer für uns erreichbar. Ohne seine Erfahrung, Planung und ohne seinen Rückhalt wäre diese Arbeit, sowie viele andere Projekte nicht möglich gewesen. Für die mir eingeräumte Freiheit bei Planung und Durchführung des Zellkulturversuchs bin ich ihm besonders zu Dank verpflichtet.

Für seine kompetente und freundliche Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit möchte ich Herrn PD Dr. André Gottschalk danken. Die Korrekturdurchsicht meiner Doktorarbeit und des Entwurfes für das geplante Paper war eine unschätzbare Hilfe.

Ohne das Engagement von Herrn PD Dr. Marc Burmeister wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen, wofür ich ihm herzlich danken möchte.

Eine herausgehobene Rolle besonders während des experimentellen Arbeitens kommt Herrn Dr. Rempf zu. Ohne seine umfassende Betreuung und seinen Enthusiasmus wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen.

Frau Dr. Gritta Tettweiler bin ich besonders für Ihre Hilfe beim erstellen der Western Blots dankbar.

Meinem Mitdoktoranden Eric Lang möchte ich für eine gute Zeit danken. Durch die vielen Tage, Wochen und Monate intensiver Zusammenarbeit sind wir nicht nur ein sich perfekt ergänzendes Team, sondern auch enge Freunde geworden. Diese Freundschaft begleitete uns durch Studium, Doktorarbeit und Examenszeit und ich hoffe sie besteht noch weit in die Zukunft.

Für die kompetente und freundliche Unterstützung bei der Arbeit mit der Zellkultur möchte ich der leitenden MTA Frau Monika Weber herzlich danken. Auch möchte ich ihren Kolleginnen und im Besonderen Frau Sonja Schuppart danken.

Meinen Eltern möchte ich für die Unterstützung und ihren Rückhalt danken.

Meiner Frau bin ich ganz besonders für ihre Geduld und die vielen guten Tage, die wir bisher gemeinsam hatten dankbar. Ihr ist diese Arbeit gewidmet.

## 11. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name Arno Ritter  
Geburtsdatum/-ort 30.05.1974 in Hamburg  
Adresse Ilandkoppel 15  
22337 Hamburg  
Telefon 040 / 22739351  
Familienstand verheiratet

### Schulbildung

1983 - 1987 Besuch der Grundschule Moisburg  
1987 – 1989 Besuch der Orientierungsstufe Hollenstedt  
1989 – 1994 Besuch des Gymnasiums Neu Wulmstorf  
1994 Abschluß: allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

1994 – 1995 Rettungssanitäter  
beim Malteser-Hilfsdienst Buxtehude

### Studium

Oktober 1995 Immatrikulation an der Technischen Universität  
Braunschweig für das Studium der Biologie  
September 1997 Vordiplom  
Oktober 1997 Immatrikulation an der Universität Göttingen für das  
Hauptstudium der Biologie  
April 1998 Immatrikulation an der Universität Hamburg für das  
Studium der Medizin  
März 2001 Physikum  
April 2002 1. Staatsexamen  
April 2004 2. Staatsexamen  
Mai 2005 3. Staatsexamen und Approbation  
seit Mai 2005 Assistenzarzt in der Abteilung für  
Anästhesiologie und operative Intensivmedizin,  
Asklepios Klinik Nord, Hamburg



## **12. Eidesstattliche 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.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Arno Ritter

