

**Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**  
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Alwin E. Goetz

**Auswirkungen der prophylaktischen oder  
therapeutischen Gabe der zellfreien  
Perfluorbronlösung Oxygent™ auf die  
Ausprägung myokardialer DNS-Schäden  
nach akuter Koronararterienligatur im  
Ischämie- und Reperfusionsmodell**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
eines Doktors der Medizin,  
dem Fachbereich Medizin der  
Universität Hamburg vorgelegt von

**Eric Lang**

aus Mönchengladbach

Hamburg, 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am : 21.09.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Th. Standl

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. Th. Krause

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Th. Heitzer

*Alle Raben sind schwarz.*  
*Alles Nichtschwarze sind Nichtrabben.*  
*( Carl G. Hempel )*

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>7</b>
1.1	DNS : AUFBAU UND SCHÄDEN .....	9
1.2	ARTEN DES ZELLTODES.....	12
1.3	EIGENSCHAFTEN VON FLUORIERTEN KOHLENWASSERSTOFFEN .....	14
1.4	MYOKARDINFARKT UND ALTERNATIVE SAUERSTOFFTRÄGER .....	18
1.4.1	Studien mit PFC .....	19
1.5	ZIELKRITERIEN.....	21
1.5.1	Darstellung von DNS-Einzelstrangbrüchen.....	21
1.5.2	Darstellung des „No-reflow“-Phänomens .....	21
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK .....</b>	<b>22</b>
2.1	GENEHMIGUNG DES TIERVERSUCHES.....	22
2.2	STATISTIK UND FALLZAHLBERECHNUNG .....	22
2.3	OPERATIVER VERSUCHSABLAUF .....	23
2.3.1	Versuchsgruppen .....	25
2.3.2	Art und Haltung der Versuchstiere.....	25
2.3.3	Studienmedikation PFC-Emulsion Oxygent™ .....	25
2.3.4	Narkose und Präparation .....	26
2.4	INTRAOPERATIVE MESSWERTE .....	31
2.4.1	Hämodynamik.....	31
2.4.2	Temperatur .....	31
2.4.3	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration und Kapnometrie .....	32
2.4.4	Blutgasanalysen, Elektrolyt- und Hämoglobinkonzentrationen .....	32
2.4.5	Blutzucker .....	33
2.5	GEWEBEAUFARBEITUNG.....	33
2.6	„AREA AT RISK“ .....	34
2.6.1	Technik .....	34
2.6.2	Auswertung.....	34
2.7	„THIOFLAVIN-S-FÄRBUNG“ .....	35
2.7.1	Technik .....	35
2.7.2	Auswertung.....	35
2.8	NICK-TRANSLATION UND AUTORADIOGRAPHIE .....	39
2.8.1	Technik .....	39
2.8.2	Kontrollschnitte .....	42
2.8.3	Densitometrische Auswertung .....	45
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>50</b>
3.1	INTRAOPERATIVE MESSWERTE .....	50
3.1.1	Gewicht .....	50
3.1.2	Hämodynamik.....	50
3.1.3	Inspiratorische Sauerstoff-Konzentration und Blutgasanalysen .....	52
3.1.4	Gesamte Hämoglobinkonzentration .....	52
3.1.5	Säure-Basen-Haushalt.....	52
3.1.6	Blutzucker-Konzentration .....	52
3.1.7	Elektrolyte .....	53
3.1.8	Temperatur .....	53
3.2	„AREA AT RISK“ .....	54
3.3	„NO-REFLOW“-AREALE.....	55
3.4	NICK-TRANSLATION.....	56
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>58</b>
4.1	EFFEKTE VON PFC AUF „NO-REFLOW“-AREALE .....	58
4.1.1	Ischämischer Endothelschaden und mikrovaskuläre Verschlüsse .....	59

4.1.2	Leukozyteneffekte .....	59
4.1.3	Reaktive Sauerstoffmetabolite .....	60
4.1.4	Weitere Mechanismen .....	61
<b>4.2</b>	<b>AUSWIRKUNG DER PFC-APPLIKATION AUF DNS-EINZELSTRANGBRÜCHE.....</b>	<b>63</b>
<b>4.3</b>	<b>HÄMODYNAMISCHE WIRKUNGEN UND NEBENWIRKUNGEN VON PERFLUOBRON ...</b>	<b>66</b>
<b>4.4</b>	<b>METHODENKRITIK .....</b>	<b>67</b>
4.4.1	Tierversuche .....	67
4.4.2	Ischämie- und Reperfusionzeit .....	67
4.4.3	„Area at risk“ .....	68
4.4.4	Blutflussmessung .....	68
4.4.5	Vorzeitige Mortalität.....	69
4.4.6	Lidocain-Applikation .....	69
4.4.7	Auswertung.....	70
<b>4.5</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>76</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>89</b>
7.1	ABKÜRZUNGEN.....	89
7.2	ÜBERSICHT DER LABORCHEMISCHEN PARAMETER.....	91
<b>8</b>	<b>TABELLEN .....</b>	<b>92</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>101</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>102</b>

## 1 Einleitung

Schon zu Lebzeiten William Harveys, der 1628 in *De Motu Cordis* als erster den Blutkreislauf beschrieb, dachten Gelehrte daran Blut durch andere Flüssigkeiten zu ersetzen. *Wenn statt schönem Blut, Wein oder Milch durch die Adern der Menschen flössen, so ihre Vorstellung, ließe sich gar manches Zipperlein heilen.*

Ernsthafte Versuche künstliches Blut zu entwickeln, unternahmten Forscher jedoch erst Anfang der 40er Jahre des 20. Jahrhunderts.<sup>171</sup> Die Entdeckung, dass Patienten über Blut-Transfusionen mit dem HI-Virus infiziert werden können, sowie der erste Golfkrieg in den 80er Jahren verschufen der Forschung an künstlichen O<sub>2</sub>-Trägern neuen Rückenwind.

1966 tauchten L.C. Clark Jr. und F. Gollan eine Maus in eine organische Flüssigkeit die zuvor mit Sauerstoff unter einem Atmosphärendruck equilibriert worden war.<sup>1</sup>

Diese Handlung quittierte das Tier mit heftigstem Strampeln und eindeutiger Unruhe. Erstaunlicherweise legte sich die Todesangst des Tieres nach der Aspiration. Nach einer Stunde in der Lösung überlebte das Tier weitere 24h.

### Abbildung 1.1

In eine O<sub>2</sub>-gesättigte, fluoridierte Kohlenwasserstofflösung getauchte Maus



Quelle: <http://www.medline.ru/thorough/oglav/tom1.shtml>

HA. Sloviter und T. Kamimoto zeigten 1967, dass es möglich ist, an einem vom Körper isolierten Gehirn, das in O<sub>2</sub>-gesättigtem Perfluorobutyltetrahydrofuran eingelegt war, weiterhin EEG-Potentiale abzuleiten.<sup>2</sup>

Diesen Versuchen scheint ein makaberer Charakter anheim zu sein, dennoch hatten sie eines gemeinsam: bei beiden Lösungen handelte es sich um fluorierte Kohlenwasserstoffverbindungen, die offensichtlich O<sub>2</sub> an Gewebe abgeben konnten.

Bei einer Inzidenz der KHK in den westlichen Industrienationen von 5-7%, Tendenz zunehmend, stellen für den Anästhesisten Myokardischämien eine wesentliche perioperative Komplikation dar. Bei einem weltweiten Auftreten von 5 Millionen Patienten im Jahr, kann diese potenziell tödlich verlaufende Komplikation nicht als selten bezeichnet werden. Das klinische Erscheinungsbild dieser perioperativen Myokardischämien ist mannigfaltig und reicht von ST-Strecken-Veränderungen, Arrhythmien, bis zum asystolischen Herzstillstand.<sup>3, 4, 5</sup> Mangano et al. konnten in einer Studie an 474 nicht kardiologischen Patienten mit nachgewiesener KHK die Häufigkeit ischämischer Komplikationen aufzeigen.<sup>6</sup> Böttiger et al. verwiesen auf eine besonders vulnerable Phase zum Ende des chirurgischen Eingriffes hin, wobei die meisten Patienten am 1.-2. postoperativen Tag versterben.<sup>3</sup> Somit liegt eine kurze Zeitspanne zwischen dem ischämischen Ereignis und dem Vollbild des myokardialen Untergangs.

Vorbestehende Koronarstenosen können hierbei akut, durch einen Thrombus verlegt werden. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass sie Mangels Vasodilatoren unter einen kritischen Mindestdurchmesser verengt werden und eine beinahe Stase eintritt. Am Ende steht ein deutliches Missverhältnis zwischen O<sub>2</sub>-Angebot und Bedarf im myokardialen Gewebe. Genau auf dieser Vorstellung basierend, könnte das Ischämierisiko von Patienten durch eine Gabe von zellfreien Blutersatzstoffen gemindert werden, da sich ihre molekulare Größe deutlich von der des Erythrozyten unterscheidet und somit eventuelle

Fliesshindernisse passiert werden könnten; oder aber eine präischämische Aufsättigung des Gewebes mit O<sub>2</sub> stattfinden und hieraus eine verlängerte Ischämietoleranz resultieren könnte.

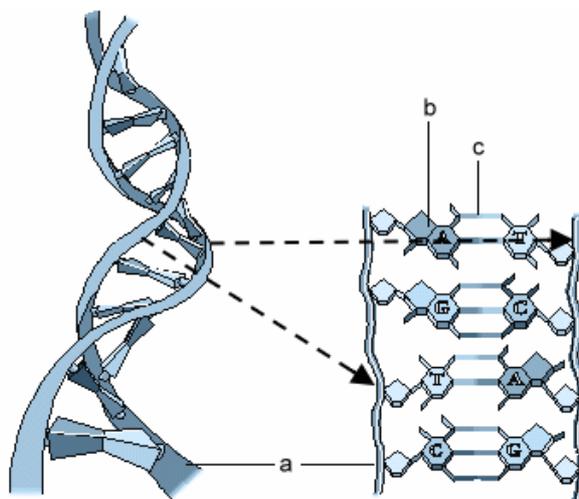
In dieser Arbeit soll eine Testung des zellfreien Blutersatzstoffes Oxygent™, einem Perfluorcarbon, im Kleintiermodell durchgeführt werden. Die Partikelgröße der getesteten Lösung schwankt zwischen 0,2 – 0,4 µm, da hier eine Mischung aus ≈58% Perfluorocetyl bromid und ≈2% Perfluordecyl bromid in einer Emulsion vorliegt. Bei diesen Größenverhältnissen könnten Stenosen theoretisch passiert werden. Molekülgröße und O<sub>2</sub>-Transport legen somit eine potentielle Verminderung von Ischämie- und Reperfusionsschäden nahe.<sup>7-13</sup>

### **1.1 DNS : Aufbau und Schäden**

Bei dem Grundgerüst des Lebens handelt es sich um die sog. Desoxyribonukleinsäure, kurz DNS. Bei dieser α-Doppelhelix, die 1953 von J.Watson und F.Crick, nachgewiesen wurde, handelt sich um einen Doppelstrang bestehend aus zwei Polynukleotidketten entgegengesetzter Polarität, die durch komplementäre Basenpaarung über Wasserstoffbrücken die Konformation einer Doppelhelix annehmen. Die Reihenfolge der einzelnen Nukleotide, die über 3',5'-Phosphodiesterbindungen verknüpft sind, kodiert die genetische Information. Ein Nukleotid besteht aus einem Zucker (Desoxyribose), einem Phosphatrest sowie jeweils einer der organischen Basen Adenin und Guanin (Purine) bzw. Cytosin und Thymin (Pyrimidine), durch die sich die einzelnen Nukleotide unterscheiden. Drei solcher Nukleotide bilden ein Basentriplett, welches für eine der zwanzig Aminosäuren kodiert. Die Reihenfolge der Aminosäuren bestimmt wiederum die Art des synthetisierten Proteins.

## Abbildung 1.2

Darstellung der DNS  $\alpha$ -Doppelhelix-Struktur



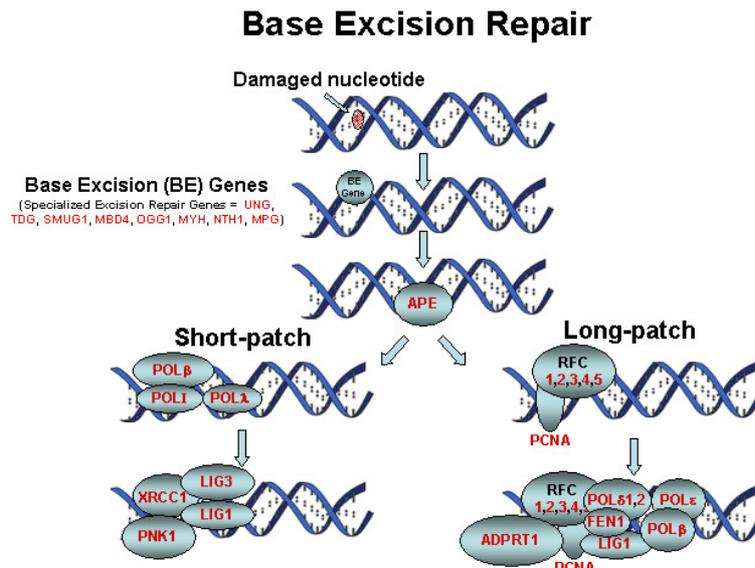
Quellen: <http://www.biokular.de/2002/Chemotherapie/dna.gif>

Trotz diverser Reparaturmechanismen kann es im Rahmen von endo- oder exogenen Noxen, aber auch physiologischen Prozessen zur Schädigung der DNS in lebenden Zellen kommen.<sup>14</sup> Hierbei treten sowohl Einzel-, als auch Doppelstrangbrüche auf. Selbst ohne besondere Noxen kommen tagtäglich Einzelstrangbrüche unter physiologischen Bedingungen vor.<sup>15</sup> Ein deutlicher Anstieg ihrer Rate ist bereits sehr schnell nach Einwirken einer Noxe (z.B. einer Ischämie) zu detektieren.<sup>16; 17</sup> Anhand von Einzelstrangbrüchen kann jedoch nicht das weitere Schicksal der Zelle beschrieben werden, da sowohl nekrotische Zellen, als auch Zellen, die bei Wiederherstellung des Energiehaushaltes eine „restitutio ad integrum“ erfahren, diese DNS-Schädigung aufweisen. Die Ursachen hierfür können freie Sauerstoffradikale, andere genotoxische Ursachen, die Desintegration defekter Zuckermoleküle, sowie das Entfernen defekter Basen durch Endonukleasen sein.<sup>18</sup> Im Gegensatz zu Doppelstrangbrüchen kann hier jedoch ein besonderer Reparaturmechanismus greifen. Polymerasen benutzen den intakten zweiten Strang als Matrize. Somit ist eine fehlerfreie Reproduktion gewährt, die für die Zelle keine

weiteren Folgen aufweist.<sup>17, 19</sup> Das Schlüsselwort hierbei lautet Exzisionsreparatur („BER“: base excision repair).<sup>20</sup>

### Abbildung 1.3

Darstellung des BER-Mechanismus



Quelle: <http://egp.gs.washington.edu/ber.html>

Ist jedoch die einwirkende Noxe zu stark, oder wirkt zu lange ein, entstehen mit DNS-Doppelstrangbrüchen wesentlich größere Schäden<sup>21</sup>, die als nahezu irreparabel gelten.<sup>22</sup> Für die Reparatur von DNS-Doppelstrangbrüchen sind vor allem zwei Reparatursysteme verantwortlich, das Nicht-Homologe-End Joining (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR).<sup>20</sup> Man geht davon aus, dass einfache Schäden mit dem NHEJ und komplizierte Schäden durch die HR repariert werden. Der Einsatz der Reparatursysteme durch die Zelle ist von der Phase des Zellzyklus abhängig. In der G1/G0-Phase wird das NHEJ und in der Synthese und G2-Phase das HR eingesetzt. Noch unklar ist, ob und in welchem Umfang die HR in der G1/G0-Phase zum Einsatz kommt. Unter der Annahme, dass wenige, aber schwierig zu

reparierende DNS-Schäden für Tumorentstehung und Zellinaktivierung entscheidend sind, könnte der Anteil der HR in G1/G0 entscheidend für die Reparatur oder die fehlerhafte Reparatur von Doppelstrangbrüchen sein. Maßgeblich für Überleben oder Zelltod scheinen die Anzahl der DNS-Einzelstrangbrüche und das Verhältnis der DNS-Einzel- zu den DNS-Doppelstrangbrüchen zu sein.<sup>23</sup> Dennoch erzeugt nicht jede Schädigung der DNS auch einen wirklichen Schaden am Erbmateriale. Das Menschliche Genom besitzt sog. Introns und Exons, wobei nur Exons die wirklich kodierenden Anteile darstellen. Tritt also ein Defekt in einem nicht-kodierenden Intron auf, so ist dies für die Zelle ohne auftretenden Schaden zu bewerten. In der vorliegenden Studie wurde das Ausmaß der Ischämie- und Reperfusionsschäden anhand von DNS-Einzelstrangbrüchen quantifiziert, um frühzeitige, nicht-letale Zellschädigungen noch vor dem Auftreten von histologischen Veränderungen nachzuweisen.<sup>16, 24</sup>

## **1.2 Arten des Zelltodes**

Obwohl in dieser Arbeit nur das Auftreten von Einzelstrangbrüchen quantitativ beurteilt werden soll und hieraus keine direkten Schlüsse über den weiteren Weg der Zelle gezogen werden können, sollen an dieser Stelle dennoch kurz die beiden potenziell möglichen Wege des „Zelltodes“ skizziert werden.

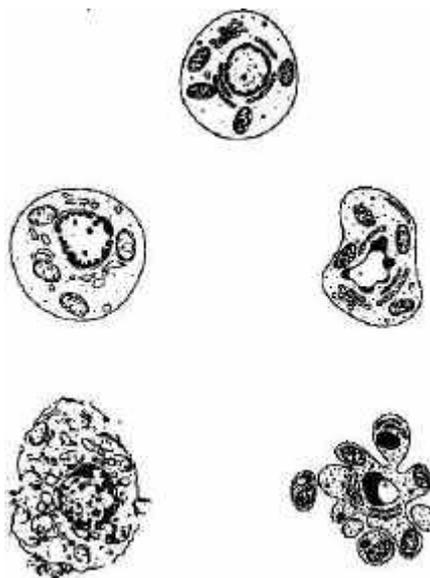
Sollte sich der entstandene Schaden für die Zelle als nicht kompensierbar herausstellen, so gibt es zwei unterschiedliche Arten des Zelltodes: Apoptose und Nekrose. Wie bereits oben erwähnt, kann jedoch nicht anhand der Schädigung der daraus resultierende Zelluntergang vorhergesagt werden. DNS-Doppelstrangbrüche treten sowohl im Rahmen der Nekrose als auch des programmierten Zelltodes, der Apoptose, auf.<sup>25, 26</sup> Nekrose stellt immer einen pathologischer Prozess dar, der stets energieunabhängig abläuft und mit einer deutlichen Entzündungsreaktion einhergeht.<sup>27</sup> Voraussetzung für die Nekrose ist eine Noxe, die die Kompensationsfähigkeit der Zelle

übersteigt. Folge ist eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran, unabhängig von der Art der auslösenden Noxe. Dadurch bedingt ein Wassereinstrom mit konsekutiver Schwellung der Zelle und ihrer Organellen bis die Plasmamembran schließlich aufbricht. Dabei frei werdende Zellinhalte, wie z.B. Peroxidasen, lösen die begleitende Entzündungsreaktion aus.

Im Verlauf des kontrollierten Zelltodes, der Apoptose hingegen, kommt es zu einer Schrumpfung der Zelle („Schrumpfnekrose“) und Zerfall in membranumschlossene Vesikel. Diese verpackten Apoptose-Körperchen (apoptotic bodies) setzen keinerlei Entzündungsreiz. Man kann also sagen, dass apoptotische Zellen keinen weiteren, schädigenden Reiz an ihre Umgebungszellen abgeben. Bei normaler Morphologie der Zellorganellen kommt es im Nukleus zu einer charakteristischen Kondensation des Chromatins mit bestimmten heterochromatischen Bereichen und einem geordneten Abbau.<sup>28</sup>

#### **Abbildung 1.4**

*Schematische Darstellung von Nekrose (links) und Apoptose (rechts).*



Quelle: <http://www.uni-kl.de/FB-Biologie/AG-Zankl/zelltod.jpg>

Obwohl sich beide Arten des Zelltods in mannigfaltiger Art und Weise unterscheiden, sind beide Formen keinesfalls strikt voneinander zu trennen. So können einige Stimuli sowohl Apoptose als auch Nekrose nach sich ziehen.<sup>29</sup> In diesen Fällen ist die Art des Zelluntergangs abhängig von Zeit, Lokalisation oder Schwere des ursächlichen Stimulus.<sup>29</sup> Auch der sekundäre Übergang primär apoptotischer Zellen in Nekrose<sup>24</sup> ist ebenso wie das parallele Auftreten von Apoptose und Nekrose in einem Gewebe<sup>23</sup> nachgewiesen worden. Letzteres tritt im Rahmen von Ischämie, Reperfusion und Myokardinfarkt auf.<sup>30, 31</sup>

### **1.3 Eigenschaften von fluorierten Kohlenwasserstoffen**

Wie bereits erwähnt, stammen die ersten Experimente mit Perfluorcarbonen (PFC) von Clark LC J und Gollan F aus dem Jahre 1966. In den folgenden Jahren wurden weitere Versuche zum Thema PFC von Sloviter et al. sowie Geyer et al. durchgeführt. Alle Versuche zeigten positive Ergebnisse in Bezug auf den Sauerstofftransport und die O<sub>2</sub>-Abgabe von PFC-Lösungen. Im Jahre 1978 wurde Oxypherol-ET entwickelt, das in Japan im klinischen Einsatz ist, 1989 unter dem Namen Fluosol-DA 20% von der amerikanischen „Food and Drug Administration“ als erste und einzige Perfluorcarbon-Emulsion die Zulassung erhielt. Jedoch war die Anwendung auf die perkutane transluminale Koronarangioplastie zur Verbesserung der O<sub>2</sub>-Versorgung bei Hochrisikopatienten beschränkt.<sup>32</sup>

Perfluorcarbone sind lineare oder zyklische Kohlenwasserstoffverbindungen, bei denen sämtliche Wasserstoffatome durch Halogene, in erster Linie Fluoratome, substituiert sind. Aufgrund der ausgeprägten Molekülstabilität werden PFC im Organismus nicht metabolisiert und verhalten sich chemisch inert [Kohlenwasserstoff-Fuorid-Bindung mit einer Bindungsenergie von 486 kJ/mol und kurzer Bindungslänge 0,136nm]. Somit entfallen unerwünschte Wirkungen aufgrund von wirksamen Metaboliten. Nach i.v. Applikation beträgt die Halbwertszeit, je nach Partikelgröße, 2-5h, und nimmt, je kleiner das Molekül ist, zu.

Es findet eine Umverteilung, vermittelt durch Makrophagen in das Monozyten-Phagozyten System (MPS) statt. Dies führt zu einer vermehrten Anreicherung vor allem in Leber und Milz.

Hier beträgt die HWZ 2 bis 5 Tage. Danach reichern sich PFC im Fettgewebe an. Hieraus werden sie anschließend über Lunge, Niere und Fäzes ausgeschieden.

PFC besitzen ein hohes physikalisches Lösungsvermögen für Gase wie  $O_2$  oder  $CO_2$ . Die transportierte  $O_2$ -Menge ist direkt proportional zu dem  $O_2$ -Partialdruck und dem PFC-Anteil der Emulsion [Gesetz von Henry].

Der Gastransport unterliegt dabei, im Gegensatz zu Hämoglobin, keiner Bindungskinetik. Die physikalische Lösung des Sauerstoffs ermöglicht aufgrund des Druckgefälles eine schnelle und vollständige Abgabe des Sauerstoffs an das Gewebe.

Jedoch sind hierzu sehr hohe  $O_2$ -Partialdrücke notwendig. Erst bei einem  $pO_2$  von 600 mmHg gewährleisten die neuen PFC-Emulsionen einen Sauerstoffgehalt, der im Bereich von intraerythrozytärem Hb liegt (Hämoglobin:  $20 \text{ ml } O_2 \text{ dl}^{-1}$ , Perflubron:  $17 \text{ ml } O_2 \text{ dl}^{-1}$ ). Da aber keine kovalente Bindung mit dem Sauerstoff eingegangen wird, erfolgt eine im Vergleich zum Hb erleichterte Abgabe an das Gewebe. So werden unter Beatmung mit einer inspiratorischen  $O_2$ -Konzentration ( $FIO_2$ ) von 1,0 und einem  $pO_2$  von 500 mmHg und einem mittleren Gewebe- $pO_2$  von etwa 40 mmHg etwa 90% des PFC-gelösten Sauerstoffs freigesetzt. Im Gegensatz dazu werden unter gleichen Bedingungen aus dem Vollblut nur 20-30% des Hb-gebundenen  $O_2$  abgegeben.<sup>33</sup>

Für die intravasale Administration müssen PFC wegen ihrer geringen Wasserlöslichkeit emulgiert werden. Der bei den Erstgenerations-PFC (z.B. Fluosol-DA™) verwendete Emulgator Pluronic™ F-68 induzierte zahlreiche Nebenwirkungen (Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1**

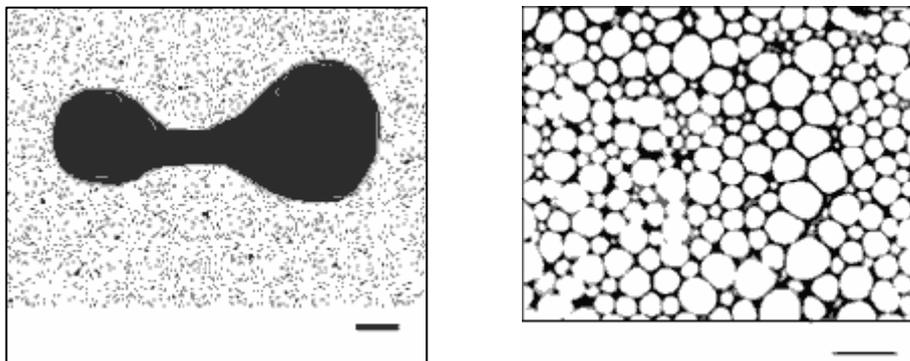
<b>System</b>	<b>Effekt</b>	<b>Literatur</b>
Hämodynamik	Vasodilatation Hypotension	Sakas et al. (1992) <sup>34</sup> Waxman et al. (1984) <sup>35</sup>
Blutrheologie	Blutviskositätserhöhung	Hunter et al. (1990) <sup>36</sup>
Gerinnung	Fibrinstruktur-Aufbau-Störung	Carr et al. (1991) <sup>37</sup>
Komplementsystem	Aktivierung	Ingram et al. (1993) <sup>38</sup>
in vitro	Zellwachstumsinhibition Leukozyttoxizität Thrombozyttoxizität	Lane et al. (1988) <sup>39</sup> Smith et al. (1992) <sup>40</sup> Smith et al. (1993) <sup>41</sup>
während Ischämie	PMN-Leukozyten-Inhibition Superoxidanionenbildung gesteigert	Williams et al. (1988) <sup>42</sup> Forman et al. (1992) <sup>43</sup>

Die derzeit aktuellen PFC-Emulsionen enthalten als Emulgator ausschließlich ein Phospholipid auf der Basis von Hühnereigelb.<sup>44</sup> An allergische Reaktionen sollte hierbei dennoch gedacht werden.

Neben einer besseren Verträglichkeit dieses Emulgators besitzen neuere PFC-Emulsionen einen wesentlich höheren PFC-Anteil und damit eine deutlich bessere O<sub>2</sub>-Transportkapazität. Aufgrund der kleinen Molekülgröße (teilw. <0,2µm) weisen sie sehr gute rheologische Eigenschaften auf.

## Abbildung 1.5

Die linke Abbildung zeigt die Größenverhältnisse von Erythrozyten zu PFC-Micelen. Das rechte Bild zeigt eine Vergrößerung von PFC-Micelen.



Quelle: <http://www.medline.ru/thorough/oglav/tom1.shtml>

Die PFC-Emulsionen der zweiten Generation sind gebrauchsfertig und im ungefrorenen Zustand bei Kühlung etwa zwei Jahre lagerungsstabil.<sup>45</sup> Neuere klinische Studien belegen eine gute Verträglichkeit der neueren PFC-Lösungen.<sup>46, 174, 175</sup>

Unspezifische Reaktionen im Sinne grippeähnlicher Symptome, wurden jedoch an gesunden Probanden festgestellt. Dazu zählen: Flush, Rückenschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Myalgien, Kopfschmerzen und Übelkeit. Die Symptome konnten mit Cyclooxygenasehemmern und Kortikosteroiden verhindert oder therapiert werden.

Erklären lassen sich diese Symptome am ehesten durch die Phagozytose der Partikel und der daraus resultierenden Monozyten-Makrophagenaktivierung. Diese schütten im unterschiedlichen Ausmaße Prostaglandine, Endoperoxide und Zytokine aus und induzieren möglicherweise die Expression von Akut-Phase-Proteinen.

Hierbei scheint das Nebenwirkungspotential der Lösung u.a. von der Partikelgröße abzuhängen. Kleinere Partikel werden schlechter phagozytiert und rufen daher eine geringere Reaktion des MPS hervor.

Des weiteren ist 2-3 Tage nach Applikation von PFC-Emulsionen ein Abfall der Thrombozytenzahl um 15-20% beschrieben. Dieser reguliert sich aber innerhalb einer Woche.<sup>47 – 50, 174</sup>

Der nicht von der Hand zu weisende Nachteil der PFC-Emulsionen ist der benötigte  $FIO_2$  von 0,5 bis 1,0, um eine ausreichende Lösung von Sauerstoff zu gewährleisten.<sup>51</sup> Damit eignet sich die Lösung vor allem für lungengesunde, kontrolliert beatmete Patienten, z.B. im Bereich der Hämodilution während Anästhesie, oder für die Versorgung von Transplantaten.<sup>176</sup>

#### **1.4 Myokardinfarkt und alternative Sauerstoffträger**

Ein stenotischer oder thrombotischer Verschluss einer oder mehrerer Koronararterien führt zu einer poststenotischen Ischämie. Die daraus resultierende Diskrepanz zwischen myokardialem Sauerstoffangebot und -bedarf ist die Ursache für z.B. pektanginöse Beschwerden, oder ein akutes Koronarsyndrom, im schlimmsten Falle für einen koagulationsnekrotischen Myokarduntergang, den Myokardinfarkt. Für einen Infarkt ist nachweislich der Verschluss eines Koronarastes durch einen Thrombus die Hauptursache. Dabei setzt sich auf eine vorbestehende Stenose durch Plaqueruptur ein frischer Thrombus auf und verschließt das Gefäß.<sup>52</sup>

Bereits in mehreren Studien wurde eine Wirksamkeit im Sinne einer Reduktion von Infarktausmaß und Reperfusionsschäden für PFC gezeigt.<sup>51, 53 - 57</sup> Stets wurde hierbei in den PFC-Studien lediglich eine therapeutische Applikation im Anschluß an das Ischämie erzeugende Ereignis untersucht. Die prophylaktische Gabe einer PFC-Emulsion könnte aber zusätzlich für eine vor dem Ereignis erfolgte Gewebsoxygenierung sorgen und somit ischämische Schäden verringern oder gar verhindern. Durchaus wären bei diesem Ansatz Kombinationstherapien mit anderen kardioprotektiven Maßnahmen denkbar. Zu hoffen wäre hierbei eine Addition der kardioprotektiven Effekte. So wäre z.B. eine intraoperative Kombination mit  $\beta$ -Blockern, welche eine Ökonomisierung der Herzarbeit erreichen sollen, mit PFC-Emulsionen denkbar. Eine prophylaktische Gabe kann insbesondere deswegen in Betracht gezogen werden, da ein Großteil der chirurgischen Eingriffe elektiven Charakters ist. Eine gute Planung und

Risikoerkennung ermöglicht ein frühes Handeln. Aber auch ohne vorher genau erkennbare Risikofaktoren, stellen perioperative Myokardischämien, gerade während Ein- und Ausleitung eine erhebliche Gefahr dar.<sup>3, 6, 58, 59</sup> Patienten mit nachgewiesener koronarer Herzerkrankung bzw. mit Risikofaktoren für eine koronare Herzerkrankung zeigten, laut einer Studie von Mangano et al. bis zu 20% Myokardischämien präoperativ, 25% intraoperativ und 41% postoperativ. Angina pectoris, Myokardinfarkt oder akuter Herztod korrelierten mit dem postoperativen Auftreten von Ischämien.<sup>6</sup>

Der Reduktion gerade dieser ischämischen Ereignisse durch eine prophylaktische PFC-Emulsionsgabe könnte eine erhebliche klinische Relevanz zukommen.

#### **1.4.1 Studien mit PFC**

Mehrere Studien, sowohl tierexperimentell, als auch klinisch, wurden zu dieser Thematik durchgeführt.

##### Experimentelle Studien:

Holman et al. untersuchten die dosisabhängige Wirkung von PFC auf die Gewebeoxygenierung während kardiopulmonalem Bypass im Hundemodell. Dabei zeigte sich eine Zunahme des gemischt-venösen O<sub>2</sub>-Partialdrucks in Abhängigkeit von der Dosis des PFC nach Beendigung des Bypass sowie eine dosisabhängige Abnahme der Letalität.<sup>60</sup> Forman et al. konnten ebenfalls am Hundemodell zeigen, dass während Koronararterienokklusion zugeführtes Fluosol-DA 20% die Infarktgröße signifikant reduzierte und dadurch in wesentlich geringerem Ausmaße zu Wandhypokinesien führte.<sup>61</sup>

Goodin et al. untersuchten die kombinierte Gabe von PFC und Kristalloiden zur Volumentherapie des hämorrhagischen Schocks an 16 gesunden Beagle-Hunden. Hierbei konnte eine höhere Überlebensrate im Vergleich zur reinen Kristalloid-Therapie gezeigt werden, 100% vs. 63%.<sup>62</sup> Die Arbeitsgruppe Cernaianu et al. zeigte eine verbesserte Gewebsoxygenierung bei unterschiedlichen Eingangs-Hb-Werten und

unterschiedlichen PFC-Konzentrationen pro kg KG im Hundemodell.<sup>63</sup> Cabrales et al. konnten zeigen, dass eine therapeutische Gabe von PFC in einem Ischämie-Reperfusion-Modell der Skelettmuskulatur des Hamsters den Reperfusionsschaden verringern konnte.<sup>178</sup> Verantwortlich hierfür wurde eine verminderte Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel gemacht. Kozhura et al. wiesen einen positiven PFC Effekt in einem Ischämie-Modell des Darms bei Ratten nach. So konnte ein irreversibler Schaden der Mucosa durch die oxygenierte PFC-Lösung Perfloran™ verhindert werden.<sup>179</sup>

#### Klinische Studien:

In einer japanischen Multizenterstudie der Phase II und III fassten 1982 Mitsuno et al. Ergebnisse von 186 Patienten zusammen, die Fluosol-DA 20% als Ersatz von chirurgischen Blutverlusten in einer Dosierung zwischen 6-25 ml kg<sup>-1</sup> KG in einem Fall sogar 80 ml kg<sup>-1</sup> KG erhielten. Hierbei konnten für einen FIO<sub>2</sub> >0,5 günstige Einflüsse auf die Hämodynamik, den arteriellen pO<sub>2</sub>, die Gewebsoxygenierung, sowie den Säure-Basen-Haushalt beobachtet werden.<sup>64</sup>

Gould et al. berichteten über 8 chirurgische Patienten mit akuter Anämie, die aus religiösen Gründen Blutprodukte ablehnten. Ihnen wurde bei einer durchschnittlichen Hb-Konzentration von 3,0±0,4g dl<sup>-1</sup> Fluosol-Da 20% bis zu einer Maximaldosis von 40 ml kg<sup>-1</sup> KG infundiert. Es konnte jedoch keine Verbesserung der Überlebensrate nachgewiesen werden.<sup>65</sup>

In einer prospektiven Studie erhielten 36 Patienten der Glaubensgemeinschaft Zeugen Jehovas bei schwerer Anämie (mittlere Hb-Konzentration 4,3 g dl<sup>-1</sup>) neben Kristalloiden und Kolloiden eine einmalige Bolusgabe von 30 ml kg<sup>-1</sup> KG Fluosol-DA 20%. Es konnte jedoch keinerlei Einfluss auf die Mortalität im Vergleich zur herkömmlichen Volumentherapie gezeigt werden. Ebenso wie Gould et al. schoben die Autoren dies auf die kurze Halbwertszeit und die damit verbundene kurze Wirkdauer der PFC-Emulsion.<sup>66</sup>

In einer Pilotstudie an 7 chirurgischen Patienten, die präoperativ akut normovolämisch hämodilutiert wurden, stieg nach Infusion von 0,9 g kg<sup>-1</sup>

KG Perflubron-Emulsion der gemischt-venöse  $pO_2$  signifikant an, während Herzzeitvolumen und  $O_2$ -Verbrauch unverändert blieben.<sup>67</sup>

1999 veröffentlichten Spahn et al. eine Studie an 147 orthopädischen Patienten. Ab einem Hb-Wert von  $9 \text{ g dl}^{-1}$  erhielten die Patienten entweder 450ml kolloidale Infusionen, autologe Bluttransfusionen  $0,9 \text{ g kg}^{-1} \text{ KG}$ , oder aber  $1,8 \text{ g kg}^{-1} \text{ KG}$  einer Perfluobron-Emulsion.<sup>46</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Patienten, die die höchste Perflubrondosierung erhalten hatten, am längsten ohne definierte Hypotensionszeichen waren. Im Gegenzug traten aber in genau dieser Gruppe Störungen der Thrombozyten und Blutungen vermehrt auf.

Keipert et al. konnten zeigen, dass unter PFC-Therapie ein temporärer Abfall der Thrombozytenzahl und ein Anstieg der Leberenzyme sowie grippeähnliche Symptome nachweisbar waren.<sup>50, 177</sup>

## **1.5 Zielkriterien**

### **1.5.1 Darstellung von DNS-Einzelstrangbrüchen**

Es soll die Auswirkungen der prophylaktischen oder therapeutischen Anwendung der zellfreien Perfluorcarbonlösung Oxygent™ im Kleintiermodell auf die Rate an DNS-Einzelstrangbrüchen im linken Ventrikel durch den quantifizierenden Nachweis von DNS-Einzelstrangbrüchen mit Hilfe der Autoradiographie nach „in-situ“-Nick-Translation gezeigt werden.

### **1.5.2 Darstellung des „No-reflow“-Phänomens**

Durch die prophylaktische oder therapeutische Anwendung der zellfreien Perfluorcarbonlösung im Kleintiermodell könnte die Größe von sog. „No-reflow“-Arealen günstig beeinflusst werden. Diese Reperfusionsschäden sollen durch die färberische Anwendung der fluoreszierenden Substanz Thioflavin-S quantitativ dargestellt werden.

## **2 Material und Methodik**

Anmerkung:

Diese Arbeit ist im Rahmen einer Studie erstellt worden, deren Hauptzielparameter die Reduktion des Anteils des Infarktareals an der „Area at risk“ im Nachweis mittels Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) sowie als Nebenziel die Beeinflussung der Inzidenz von Arrhythmien darstellte. Die folgenden Zielkriterien waren primär zur Hypothesengenerierung ohne eigenständige Power-Analyse konzipiert. Deshalb beziehen sich einige Parameter (z.B. die Fallzahlberechnung) auf den Infarktnachweis mittels TTC.

### **2.1 Genehmigung des Tierversuches**

Eine Genehmigung der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales (BAGS) der Hansestadt Hamburg für die in dieser Arbeit vorgestellte Versuchsreihe wurde nach veterinärmedizinischer Begutachtung erteilt (Antragsnummer 51/00). Die Versuche wurden streng nach 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.<sup>68</sup>

### **2.2 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 „in vivo“-Injektion von Patentblau. Zugrundegelegt wurden die Effekte, die mit Perfluorocarbonen in vergleichbaren Modellen erzielt wurden.<sup>149</sup> Entsprechend diesen Ergebnissen wurde eine Reduktion des Areal von ~25% in der Prophylaxe- (1) oder Therapie-Gruppe (2) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (3) angenommen. Die Bestimmung der notwendigen Gruppengröße erfolgte Computer-gestützt (Instat, Graphpad Corp, CA, USA). Bezogen auf den Hauptzielparameter ( $\alpha$ -Fehler: 5%,  $\beta$ -Fehler 20%, Power: 0,8) ergab sich somit zunächst eine

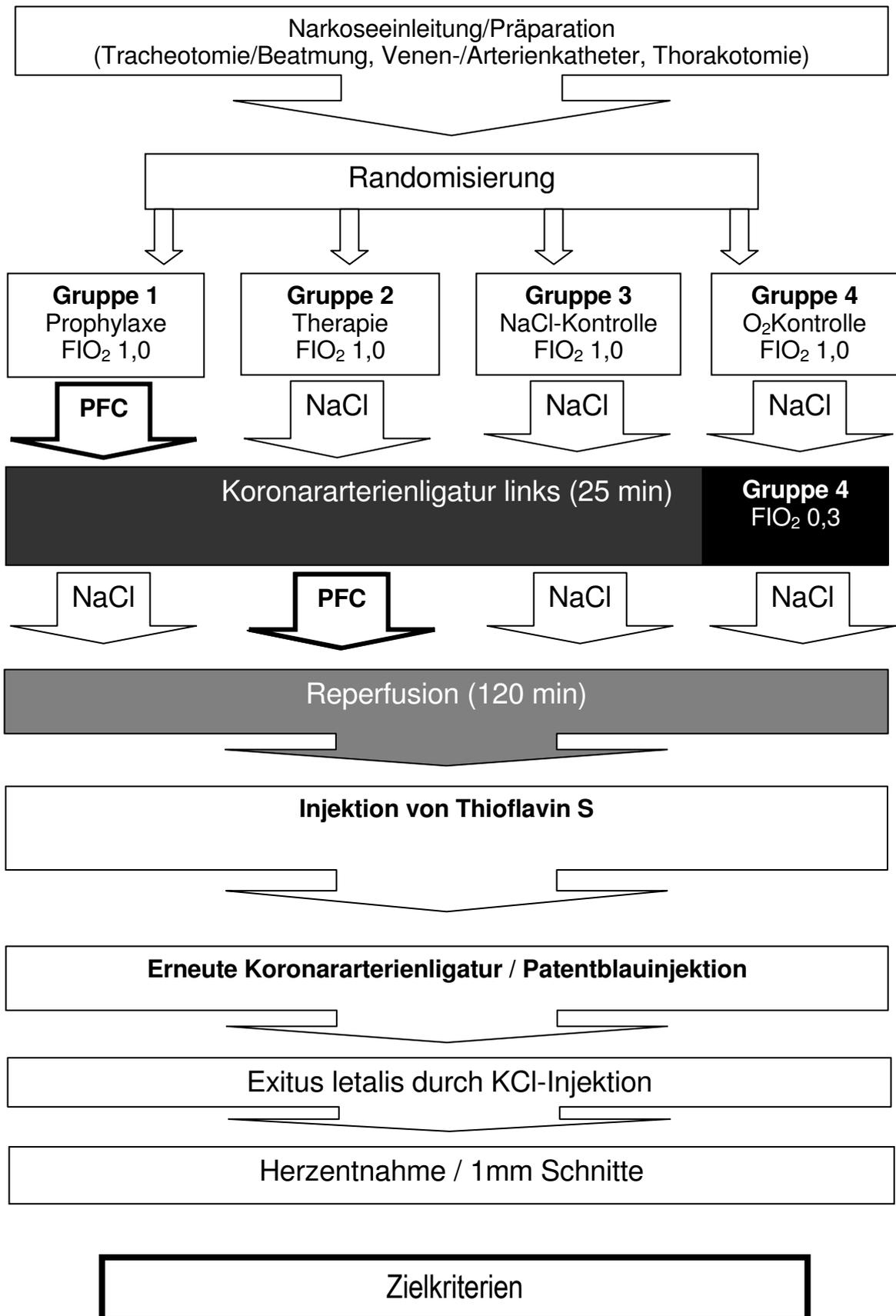
Anzahl von 10 Tieren pro Gruppe, die komplett den Versuch durchlaufen müssten. Aus ethischen Gründen sollte der Bedarf an Versuchstieren möglichst gering gehalten. Deshalb erfolgte eine blockweise Randomisierung von jeweils 8 Tieren und eine Zwischenanalyse nach jeweils 8 Tieren, die den Versuch komplett 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  $p < 0,05$  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<sup>69</sup> im myokardialen Infarktmodell der Ratte wurde zunächst eine entsprechend höhere Tierzahl für den Versuch beantragt. Es wurden für die Parameter „Infarktareale“ und „DNS-Strangbrüche“ nur Tiere in die Auswertung eingeschlossen, die den Versuch komplett durchlaufen haben.

Die statistische Auswertung erfolgte Computer-gestützt mittels SPSS 9.0. Kontinuierliche Parameter wurden mittels ANOVA und zweiseitigem post-hoc-Test nach Dunnett für unverbundene Stichproben verglichen. Hierbei diente die Positiv-Kontroll-Gruppe als Referenz. Ein  $p < 0,05$  wurde als signifikant angenommen.

### **2.3 Operativer Versuchsablauf**

In der Abbildung 2.1 ist der schematische Versuchsablauf dargestellt. Der Ausdruck „Zielkriterien“ fasst die Aufarbeitung und Auswertung des Gewebes im Bezug auf „No-reflow“-Areale und DNS-ESB zusammen. Die genauen Schritte werden ab Abschnitt 2.5 erläutert und in Abbildung 2.5 schematisch dargestellt.

**Abbildung 2.1** Schematische Darstellung des Versuchablaufs und der Zielkriterien



### **2.3.1 Versuchsgruppen**

Die Versuchstiere wurden in der vorliegenden kardialen Ischämie- und Reperfusionstudie in vier Gruppen eingeteilt: Prophylaxe-Gruppe (G1), Therapie-Gruppe (G2), NaCl-Kontrollgruppe (G3) und O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe (G4). In der O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe erfolgte ein kompletter Versuchsdurchlauf, jedoch mit einer FIO<sub>2</sub> von 0,3 ab Ligatur, da dies Raumlufbedingungen am nächsten kommt und auch während humanen Narkosen nicht unterschritten werden sollte sowie einer NaCl-Applikation zu beiden Applikationszeitpunkten. Die NaCl-Kontrollgruppe erhielt eine FIO<sub>2</sub> von 1,0 und ebenfalls zu beiden Applikationszeitpunkten NaCl-Lösung. Die Tiere der Behandlungsgruppen unterschieden sich lediglich hinsichtlich des Zeitpunktes der PFC-Applikation vor, beziehungsweise nach Ischämieinduktion.

### **2.3.2 Art und Haltung der Versuchstiere**

Für diesen Versuch wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Aufzucht), die über die Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vom Züchter Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden, mit einem Lebendgewicht von 250-350g KG verwendet. Eine 5-tägige 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 fand regelmäßig statt. Die Ernährung bestand aus SNIFF Standarddiät (Hamburg) und Wasser ad libitum. Der Transport zum Labor erfolgte stets schonend in einer gewärmten Transportbox. Die Tiere wurden erst am Versuchstag aus der Tierhaltung geholt.

### **2.3.3 Studienmedikation PFC-Emulsion Oxygent™**

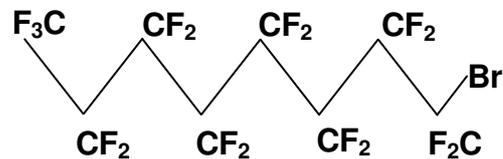
In diesem Versuch kam die PFC-Emulsion, Oxygent™ (Alliance Corp. San Diego, USA) zur Testung. Die Lösung besteht zu ≈58% aus Perfluorooctylbromid, sowie ≈2% Perfluorodecylbromid. Als Emulgator dienen ≈3,6% Eigelb-Phospholipide und Lecithin.

Oxygent™ besitzt unter Raumtemperatur eine Haltbarkeit von einigen Stunden und ist bei ca. +4°C für mehrere Monate lagerungsstabil. Eine gute Verträglichkeit wurde sowohl im Tiermodell, als auch an Menschen, mit einer Dosierung von max. 2,7g kg<sup>-1</sup> KG nachgewiesen.

### Abbildung 2.2

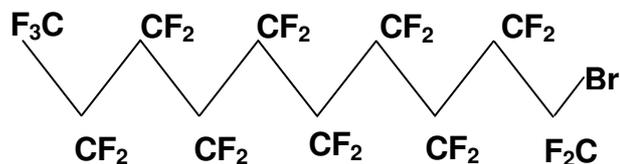
Dargestellt sind die jeweiligen Strukturformeln von Perfluorooctylbromid (1) und Perfluorodecylbromid (2), den beiden Perfluorocarbonen der Oxygent™-Emulsion.

1)



**Perfluorooctylbromid  
(Perflubron)**

2)



**Perfluorodecylbromid**

#### 2.3.4 Narkose und Präparation

Da von unserer Arbeitsgruppe bereits im Vorfeld Versuche mit ähnlichem Studiendesign durchgeführt wurden, konnte auf viele Erfahrungswerte zurückgegriffen werden.<sup>87</sup> Dennoch fand eine ständige Adaptation und Verbesserung des Versuchsaufbaus statt.

Eine Allgemeinanästhesie wurde bei den Versuchstieren durch eine intramuskuläre Gabe von Ketamin (80 mg kg<sup>-1</sup> KG) [Pfizer Pharma

GmbH, Karlsruhe] und Midazolam [(3mg kg<sup>-1</sup> KG) [Fa. Hoffmann la Roche AG, Grenzach Wyhlen] herbeigeführt.

Um Drucknekrosen, bzw. eine Kompartmentsymptomatik zu verhindern, wurde ein maximales Injektionsvolumen von 0,2 ml je Muskel nicht überschritten.<sup>70</sup> Nach Erreichen einer ausreichenden Anästhesietiefe, mit erhaltener Spontanatmung und Aussetzen der Abwehrbewegungen wurden die Tiere auf einen beheizbaren Kleintier-OP-Tisch (Heated Rodent Operating Table, [Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA] gelagert. Unter Sauerstoffinsufflation, EKG-Ableitung, rektaler Temperaturmessung und Pulsoximetrie erfolgte nach Lokalinfiltration mit Lidocain 0,1%; (1,6 ml kg<sup>-1</sup> KG) [Astra Zeneca, Wedel] eine Tracheotomie. Über die V. cava superior erfolgte die Anlage eines zentralvenösen Katheters über den im Folgenden die Narkose als total-intravenöse Anästhesie mit Midazolam (10 mg kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) und repetitiven Fentanylboli (7,5 mg kg<sup>-1</sup>) [Janssen-Cilag, Neuss] aufrechterhalten wurde. Zur Deckung des Flüssigkeitsbedarfs wurde den Tieren insgesamt 20 ml kg<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> Flüssigkeit zugeführt. (Gemisch aus der Midazolam-Lösung und NaCl 0,9%) Von einer hypertonen Infusionslösung wurde, trotz des positiven Volumeneffektes abgesehen, da in diversen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass hypertone NaCl-Lösung Einfluss auf die Aktivität neutrophiler Granulozyten besitzt und die systemische Einflussnahme auf das Tiermodell so gering wie möglich gehalten werden sollte.<sup>71 - 75</sup> Wie im Versuchsgruppenteil beschrieben, wurden die Tiere unter dieser Medikation mit einem Sauerstoff-/Luftgemisch volumenkontrolliert beatmet (Inspira Advanced Safety Ventilator) [Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA]. Über die Anpassung des Atemminutenvolumens (AMV), der Verwendung von Wärmelampe und beheiztem OP-Tisch, sowie der Applikation von Glucos, wurden Normokapnie, Normothermie und Normoglykämie gewährleistet. Der Kohlendioxidpartialdruck wurde kontinuierlich endexpiratorisch (Monitoreinheit mit Mainstream-Messung) [Fa. Datex-Ohmeda, Helsinki Finnland] und intermittierend arteriell (ABL 500) [Radiometer Kopenhagen, Dänemark) bestimmt. Die Wärmung erfolgte ergänzend

zum beheizbaren Kleintier-OP-Tisch mit Wärmelampen Osram Siccatherm 280W [Osram GmbH, München]. Zur Durchführung von Blutgasanalysen und zur kontinuierlichen Messung des Blutdruckes erfolgte die Anlage eines arteriellen Zuganges in die rechte Arteria femoralis. Während der gesamten weiteren Präparationsphase betrug die  $FIO_2$  in allen Gruppen 1,0 unter kontrollierter Beatmung. Nach linksseitiger Thorakotomie im vierten oder fünften Interkostalraum wurde die Beatmung mit einem PEEP von 3-5 mbar fortgesetzt, um eine Atelektasenausbildung zu verringern, bzw. zu vermeiden. Eine Perikardiotomie wurde zur Darstellung der linken Koronararterie zwischen dem Ansatz des Truncus pulmonalis und linkem Herzohr durchgeführt. Anschließend wurde das Herz aus dem Thorax luxiert und ein 6/0 Seidenfaden ( Perma-Hand™ Seide) [Firma Ethicon, Norderstedt] mittels Unterstechung um die linke Koronararterie nahe des Ursprungs gelegt. Schonend wurde danach das Herz nach intrathorakal reponiert.<sup>76</sup> Beide Fadenenden wurden zum Schutz des Gefäßes durch ein zurechtgeschnittenes Filzplättchen und anschließend durch einen ca. 7-10 cm langen Polyethylen-Schlauch (Perfusorleitung, Außendurchmesser: 1,5 mm) [ Fa. B. Braun Melsungen], geführt.<sup>77</sup> Durch Fadenspannung konnte somit eine Unterbindung des koronararteriellen Gefäßes erfolgen.<sup>78</sup>

Nach abgeschlossener Präparation erfolgte die Randomisierung der Tiere in die jeweiligen Gruppen. Ab diesem Zeitpunkt wurde entsprechend Gruppenzugehörigkeit, die  $FIO_2$  angepasst. Anschließend folgte eine Erholungsphase von 20 Minuten für die Tiere. Während des Versuches wurde eine engmaschige Messung von Hämodynamik, Sauerstoff- und Hämoglobinkonzentration, Temperatur und Blutzucker sowie die Durchführung von Blutgasanalysen durchgeführt. Die zeitliche Abfolge der Messpunkte sowie die einzelnen Messparameter sind in Tabelle 3.2 grafisch dargestellt. Nach Messpunkt 3 erfolgte in der Prophylaxe-Gruppe (1) die Gabe von  $6g\ kg^{-1}$  ( $10ml\ kg^{-1}$ ) Oxygent™, während die Tiere der Gruppen 2-4 das äquivalente Volumen in Form von NaCl 0,9%

erhielten. Die Gabe erfolgte im Zeitfenster von 5 min über den zentralen Venenkatheter. Nach Ende der Applikation erfolgte Messpunkt 4. Fünfzehn Minuten nach Ende der Applikation wurde in sämtlichen Gruppen die Okklusion der Koronararterie für 25 min angelegt. Nach 10 min Ligatur wurden in der Therapiegruppe ( $6\text{g kg}^{-1}$  ( $10\text{ml kg}^{-1}$ ) Oxygent™ appliziert, während die Tiere der anderen Gruppen wiederum das selbe Volumen in Form von NaCl erhielten. Die Aufhebung der Koronararterienligatur erfolgte nach 25 min Ischämiezeit. Kurz vor Beendigung der Reperfusion von 120 min erfolgte eine Injektion von 4% Thioflavin-S ( $1\text{ ml kg}^{-1}$ ) [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München] vor Reokklusion der Koronararterienligatur. Thioflavin-S ist ein endothelfärbender Fluoreszenzfarbstoff, mit dessen Hilfe das sog. „No-reflow“-Phänomen nachgewiesen werden kann. Zur Darstellung der „Area at risk“ wurden den Tieren im unmittelbaren Anschluss an die Reokklusion des Koronargefäßes 2 ml Patentblau [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München] intravenös über den ZVK injiziert.<sup>79</sup> Der Exitus letalis erfolgte in tiefer Narkose durch eine i.v. KCl-Injektion ( $2\text{ mmol kg}^{-1}$  KCl 7,45%). Die Herzentnahme wurde nach Absetzen an den großen Gefäßen sofort durchgeführt. Während des gesamten operativen Verlaufes wurden alle gemessenen Parameter im Normbereich gehalten. Dies beinhaltete insbesondere die Gabe von NaCl 0,9% (bei einem ZVD $<5\text{ mmHg}$  und bis zu einem Hb von  $10\text{g dl}^{-1}$ ), Glukose 10% (bei einem BZ $<70\text{mg dl}^{-1}$ ), Natrium-Bikarbonat 8,4% (bei einem SBE  $<-5\text{ mmol l}^{-1}$ ). Darüber hinaus erfolgte bei Auftreten von VF der Versuch einer Defibrillation mittels „thumb version“.<sup>80</sup>

**Tabelle 2.1** Übersicht der intraoperativen Messpunkte und Parameter (die verwendeten Abkürzungen sind im Anhang 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, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
4	Applikation Prophylaxe+5 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
5	Applikation Prophylaxe+10min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.
6	Applikation Prophylaxe +20min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.
7	Ligatur +5 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
8	Applikation Therapie	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp.
9	Ligatur +25min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
10	Reperfusion +10 min	FiO <sub>2</sub> , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, 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, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.

## **2.4 Intraoperative Messwerte**

### **2.4.1 Hämodynamik**

#### **Zentraler Venendruck**

Die Messung des zentralen Venendruckes (ZVD) erfolgte zu festen Zeitpunkten über den zentralvenösen Zugang mittels elektromagnetischem Druckaufnehmer [Logical, Medex, Klein-Winternheim] und Monitoreinheit (Tram 200 A) [Marquette, Milwaukee, USA].

#### **Mittlerer arterieller Blutdruck**

Der arterielle Blutdruck wurde über einen Katheter in der rechten A. femoralis kontinuierlich bestimmt. Die Ableitung erfolgte über den selben elektromagnetischen Druckaufnehmer, der auch für den ZVD Verwendung fand. Da für die Organperfusion der arterielle Mitteldruck (MAP) relevanter ist, wurde nur der MAP und nicht der systolische und diastolische Druck aufgezeichnet.

#### **Herzfrequenz**

Die kontinuierliche EKG-Ableitung erfolgte über die Pfoten mittels Klebeelektroden für Neugeborene (Agilent 13953D) [Agilent Technology, Andover, USA] als Eindhoven-Ableitung und wurde auf einen Monitor (Tram 200 A) [Marquette, Milwaukee, USA] übertragen sowie mit Hilfe des an den Monitor angeschlossenen Druckers (direct digital writer series 7100) [Marquette, Milwaukee, USA] zu den entsprechenden Messzeitpunkten mit  $50 \text{ mm s}^{-1}$  auf Papier dokumentiert. Es erfolgte eine manuelle Auswertung, da Frequenzen um  $450 \text{ min}^{-1}$  bei automatischer Auswertung zu Fehlern führen.

### **2.4.2 Temperatur**

Es wurde bereits vor Versuchsbeginn sowie während des Versuches strikt auf Normothermie der Tiere geachtet. Die Wärmung erfolgte mittels des beheizbaren Kleintieroperationstisches sowie zusätzlich bei Bedarf mit einer Wärmelampe (Osram Siccatherm 280W) [Osram GmbH, München]. Die Körpertemperatur wurde bei jedem Tier kontinuierlich

über eine rektale Sonde am Messmodul (Tram 200 A) [Marquette, Milwaukee, USA] gemessen.

#### **2.4.3 Inspiratorische Sauerstoffkonzentration und Kapnometrie**

Eine kontinuierliche inspiratorische Sauerstoffkonzentrationsmessung erfolgte über eine in das Mischkammerreservoir des Beatmungsgerätes eingebrachte Elektrode (Oxydig) [Dräger, Lübeck]. Der endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Partialdruck wurde kontinuierlich mit einem Normocap Monitor [Datex-Omeda, Helsinki, Finnland] im Mainstream gemessen und graphisch auf dem Monitor (Tram 200 A) [Marquette, Milwaukee, USA] dargestellt. Da bei ungeblockten Trachealkanülen eine nicht zu vernachlässigende Undichtigkeit auftreten kann, wurde hier nur eine qualitative Überwachung durchgeführt, um z.B. Dislokationen oder Verlegungen des Respiratorsystems frühzeitig erkennen zu können. Die Werte wurden dementsprechend nicht ausgewertet.

#### **2.4.4 Blutgasanalysen, Elektrolyt- und Hämoglobinkonzentrationen**

Die Entnahme von arteriellem Blut zur Bestimmung arterieller Blutgasanalysen (BGA), der Blutglukosewerte sowie aller anderen laborchemischen Parameter erfolgte ebenfalls über den arteriellen Zugang. Es wurden Kapillaren á 150 µl verwendet, um unnötige Blutverluste zu vermeiden. 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]. Darüber hinaus wurden folgende Parameter berechnet: Standard-Basenüberschuss (SBE), Standard-Bikarbonat (SBc), Sauerstoff-Sättigung (SaO<sub>2</sub>). Weiterhin wurden die Gesamthämoglobinkonzentration (tHb), der Anteil an Oxyhämoglobin (HbO<sub>2</sub>), Carboxyhämoglobin (COHb), Methämoglobin (MetHb) und freiem (plasmatisch gelöstem) Hämoglobin (fHb) gemessen (OSM 3) [Radiometer, Kopenhagen, Dänemark].

#### **2.4.5 Blutzucker**

Die Bestimmungen der Blutzuckerkonzentration erfolgten mittels B-Glucose Analyser [Hemocue, Angelholm, Schweden].

#### **2.5 Gewebeaufarbeitung**

Eine schematische Übersicht der Gewebeaufarbeitung zeigt Abbildung 2.3. Das entnommene Herz wurde zur histopathologischen Aufarbeitung für 20 min bei -20°C tiefgekühlt, in eine vorgekühlte Matrix (Heart Matrix) [Harvard Medical Instruments, Holliston, MA, USA] für 1mm-Schnitte eingebracht und basisparallel mittels Rasierklingen (Aesculap, Ersatzklingen zu BA244R) [Braun-Melsungen AG, Melsungen] lamelliert. Sämtliche nachfolgende Untersuchungen erfolgten „verblindet“.

Nur die geradzahligen Schnitte wurden nach dem Schneiden sofort zwischen zwei mit Folie abgedeckten Objektträgern in Trockeneis eingelegt und im Anschluss bei -80°C tiefgefroren. Um die Gefrierschnitte anfertigen zu können, wurden diese Präparate innerhalb von 4-12 Wochen nach dem Versuch in der Kühlkammer in Gefriermedium (Tissue Freezing Medium, Jung) [Leica Instruments GmbH, Nußloch] eingebettet, wobei das Gewebe mit der Unterseite auf einem Korkplättchen fixiert wurde. Diese so entstandenen „Blöcke“ wurden sofort bei -80°C tiefgefroren und erst kurz vor Bearbeitung auf -20°C erwärmt. Nach der Fixation der eingebetteten Präparate auf Kryoblöcken erfolgte die Anfertigung der Gefrierschnitte mittels Ultramikrotom (CM 1800) [Leitz, Nussloch] aus der zentralen Schnittebene 8, in der Ventrikeldicke und Infarktausdehnung das größte Ausmaß annahmen. Die Schnittdicke betrug 10µm. Die Schnitte wurden jeweils auf einen in Trockeneis gelagerten Objektträger (Superfrost) [Novoglas Labortechnik, Bern, CH] aufgezogen und in Pappmappen wiederum bei -80°C gelagert. Die histochemische Technik zum Nachweis von DNS-Strangbrüchen wurde demzufolge nur in der zentralen Schnittebene (Schnittebene 8) durchgeführt.

Die ungeradzahligen Schnitte wurden den direkten Färbemethoden zugeführt, bzw. im Falle der Patentblau-Färbung direkt gescannt. Ausdrücklich wird an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass in dieser Arbeit die „Area at risk“ nur zur Validierung des „No-reflow“-Phänomens Verwendung fand. Es konnte somit sichergestellt werden, dass das „No-reflow“-Phänomen innerhalb der „Area at risk“ auftrat.

## **2.6 „Area at risk“**

### **2.6.1 Technik**

Die „Area at risk“ stellt das theoretisch zu schädigende Areal dar, da es sich um eine in vivo Färbung des Versorgungsgebietes der ligierten Koronararterie handelt. Es wurde in vivo am Ende des Versuches bei erneuter Ligatur der Koronararterie Patentblau injiziert. Somit stellt sich das durchblutete Gewebe blau gefärbt dar, wobei das ligierte, aus der Blutversorgung abgekoppelte Gewebe, ungefärbt bleibt. Beide Areale sind deutlich von einander abgrenzbar. Die ungeradzahligen Schnitte wurden sofort nach Lamellierung von beiden Seiten eingescannt, um verlustfrei eine Bewertung der „Area at risk“ zu ermöglichen.

### **2.6.2 Auswertung**

Die Bestimmung der Flächengröße der „Area at risk“ (Patentblau-negative Areale) und des linken Ventrikels erfolgte planimetrisch mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ScionImage™ (Scion Corp.) [ML, USA] jeweils für die Ober- und Unterseite jedes Schnittes, wobei eine auf dem Scan angebrachte Zentimeterskala zur Berechnung der Größenverhältnisse herangezogen wurde. Das Ventrikellumen, sowie der rechte Ventrikel wurden bei dieser Messung stets ausgelassen. Die Auswertung erfolgte streng verblindet. Beide Einzelflächen wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt. Auf diesen Werten aller Teilschnitte beruhte die anschließende Berechnung der entsprechenden Volumina bezogen auf das gesamte linke Herz und nach Aufhebung der Verblindung auf die jeweiligen Versuchsgruppen. Diese Technik entspricht dem publizierten internationalen Standard.<sup>81, 82</sup>

## **2.7 „Thioflavin-S-Färbung“**

### **2.7.1 Technik**

Die für den Versuch benötigte 4%ige Lösung Thioflavin-S wurde selbst hergestellt. Hierfür wurden 0,4 g Thioflavin-S in 10 ml NaCl gelöst. Dieser Ansatz wurde, nach Auflösung des Pulvers, 5 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße gefiltert. Diese Lösung konnte ohne Probleme über längere Zeit im Kühlschrank gelagert werden. Vor der Applikation erfolgte stets eine Erwärmung im Wasserbad auf 37 °C um hypotherme Beeinflussungen des Versuches zu verhindern.

Die Thioflavin-S-Lösung wurde zum Versuchsende kurz vor der Reokklusion langsam appliziert. Die Injektionszeit belief sich hierbei auf ca. 30 - 60 s. Nach Injektion über den zentralen Venenkatheter musste die Anflutungszeit beachtet werden. Der zugrunde liegende Mechanismus bei der Thioflavin-S-Technik ist das Anfärben von Endothelzellen. Durch die Gabe des Thioflavin-S in der Reperusionsphase, ohne mechanische Okklusion der Koronararterie, kann somit festgestellt werden, welche Areale einer gestörten Mikrozirkulation unterliegen. Um die Beeinflussung des fluoreszierenden Effektes so gering wie möglich zu halten, wurde das Gewebe direkt im Anschluss an das Einscannen der „Area at risk“, dem Fluoreszenzscan unterzogen ( Fluor-S™ Multilmager) [Bio-Rad, Hercules, CA, USA]. Das Gerät arbeitete hierbei in dem für Thioflavin-S angegebenen Lichtwellenspektrum von 430 – 550 nm. Bei diesen Scans fand stets eine Standardbelichtungszeit von 15s Anwendung.

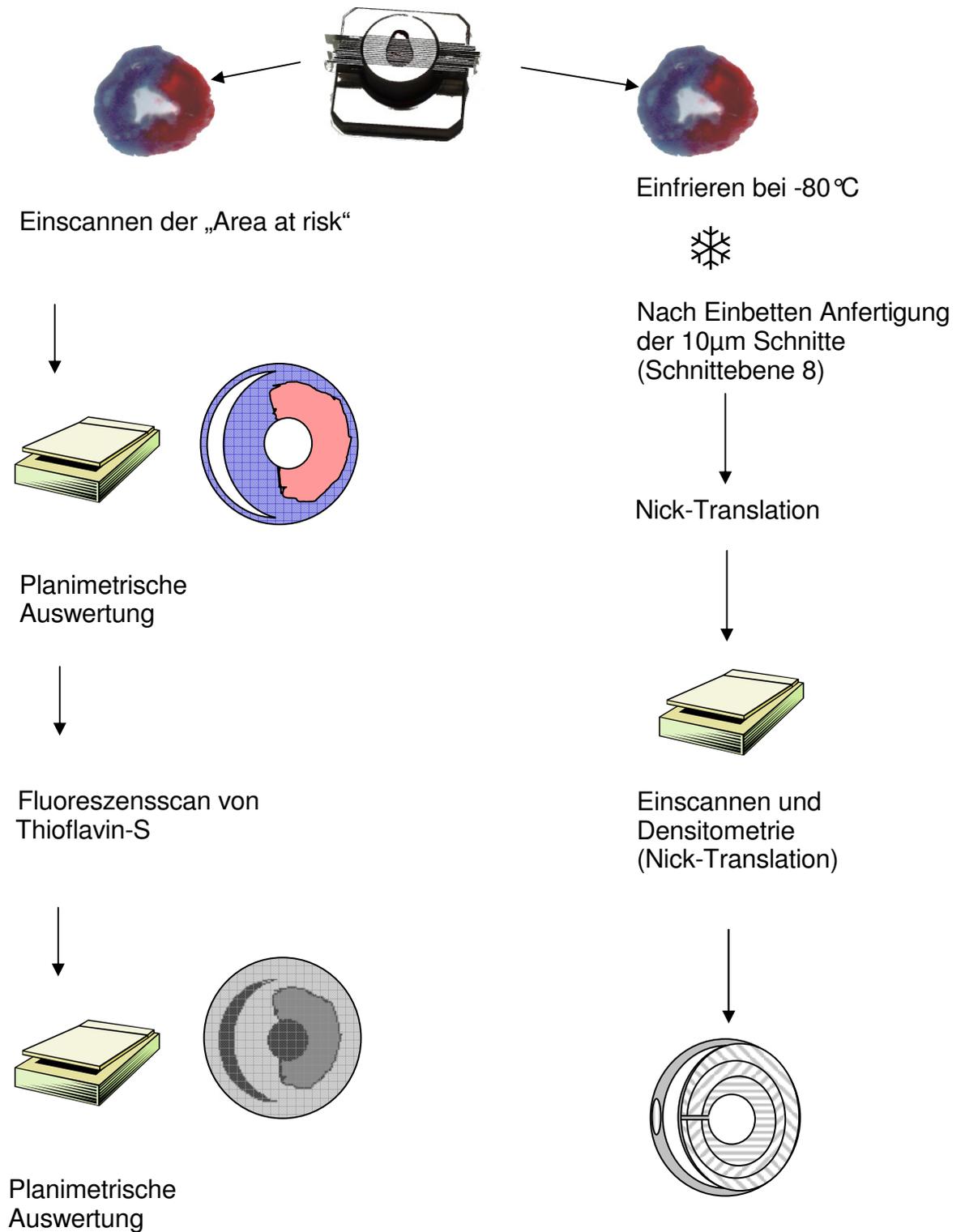
### **2.7.2 Auswertung**

Wie bei den anderen Färbetechniken erfolgte auch hier eine geblindete, planimetrische Auswertung der Scans. Das Ventrikellumen wurde streng aus der Messung ausgenommen und das „No-reflow“-Areal ins Verhältnis zum linken Ventrikel gesetzt. Um das Verfahren zu validieren, wurden vereinzelt Kontrollscans gemacht. Diese bestanden aus der Entnahme einer Gewebeprobe der Nieren. Wobei eine Niere vor

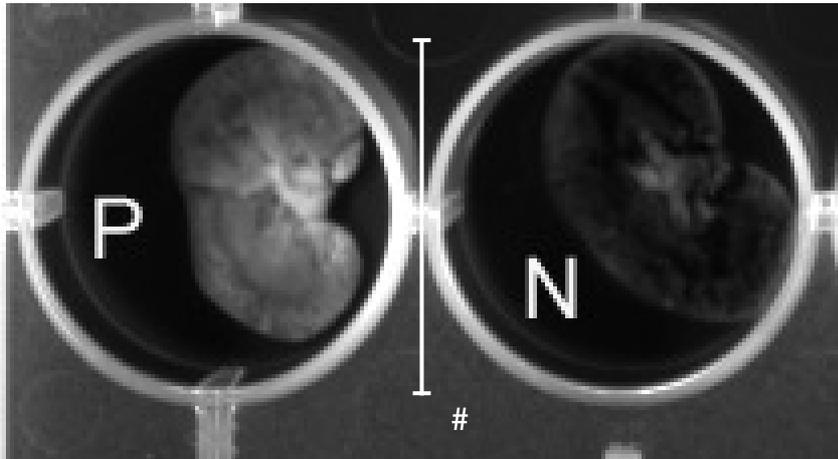
Thioflavin-S Injektion ligiert worden war. So erhielten wir direkt eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Diese Entnahme erfolgte nur am Anfang der Versuchsreihe und wurde nach Validierung des Thioflavin-S-Färbeverfahrens nicht mehr durchgeführt.

**Abbildung 2.3** Schema der Gewebeaufarbeitung

Basisparallele Lamellierung des Herzens in 1mm Schnitte in einer Heart Matrix (Harvard Apparatus)



**Abbildung 2.4** Darstellung verschiedener „No-reflow“-Scans.



Dargestellt sind Fluoreszenzscans von Nierengewebeschnitten. Deutlich zu erkennen ist das fluoreszierende Verhalten der Positivkontrolle **P**. **N** stellt die Negativkontrolle dar. Zwischen den beiden Präparaten ist eine Marke mit der Länge 2cm eingefügt #.

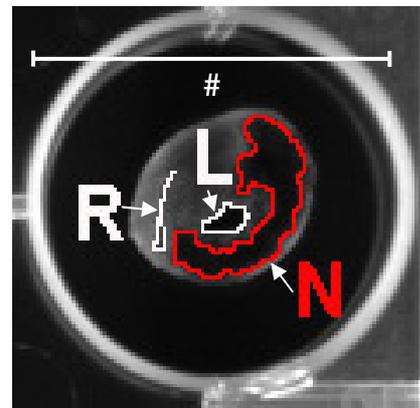
**Abbildung 2.5**

Die Darstellung zeigt einen Fluoreszenzscan myokardialen Gewebes. Zu erkennen sind die jeweils gekennzeichneten Ventrikellumen.

**R** entspricht dem rechten Ventrikellumen.

**L** entspricht dem linken Ventrikellumen.

Der rot umfahrene und mit **N** gekennzeichnete Bereich entspricht dem gut zu erkennenden „No-reflow“-Phänomen. Am oberen Bildrand Längenmarkierung mit 2cm Länge #.



Für eine Anfärbung muss das Thioflavin-S also durch Perfusion das Endothel erreichen. Ein Faktor der dies stören kann ist das sog. „No-reflow“-Phänomen.

Hierbei handelt es sich um mehrere diskutierte Mechanismen, welche als gemeinsame Endstrecke eine mikrozirkulatorische Perfusionsstörung haben.<sup>83, 84</sup>

## 2.8 Nick-Translation und Autoradiographie

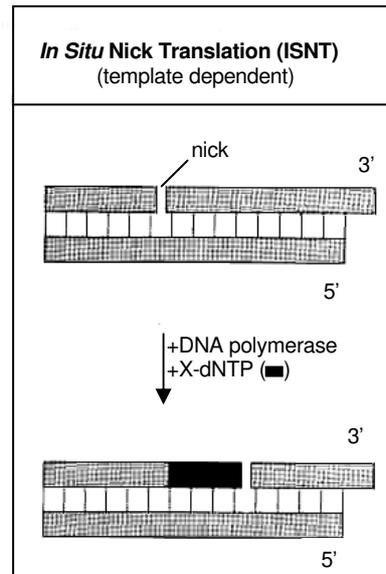
### 2.8.1 Technik

Bei der Nick-Translation handelt es sich um ein enzymabhängiges in situ Verfahren, welches die Detektion von DNS-Einzelstrangbrüchen erlaubt.<sup>22, 85, 86</sup> Die Bezeichnung „Nick“ steht in diesem Zusammenhang für eine geöffnete Phosphodiesterbrücke mit einem freien 3´OH-Ende in einem doppelsträngigen DNS-Molekül, kurz für einen DNS-Einzelstrangbruch. Wie in dieser Arbeit bereits erwähnt wurde, treten DNS-Einzelstrangbrüche bei hypoxischem Zellstress auf, also auch in einem Ischämie-Modell. Für dieses Verfahren wurden die tiefgefrorenen Gewebeschnitte verwendet. Nach dem Auftauen und Waschen der Gefrierschnitte wurden diese mit einem Reaktionscocktail aus DNS-Polymerase I und radioaktiv markierten Nukleotiden inkubiert. In diesem Arbeitsschritt bindet eine E. coli DNS-Polymerase Typ I spezifisch an die freien 3´OH-Enden der aufgetretenen DNS-Einzelstrangbrüche (Kornberg Polymerase) [Boehringer, Mannheim]. Das in diesem Reaktionscocktail enthaltene Nukleotidgemisch, welches auch radioaktiv markiertes dTTP, desoxy[methyl-3H]Thymidine-5´-triphosphat, [Firma Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, GB] enthält, verwendet die DNS-Polymerase Typ I zur Füllung der DNS-Einzelstrangbrüche mittels „de novo“-Synthese. Hierbei wird jedoch ein intakter, komplementärer Gegenstrang benötigt, welcher der Polymerase als Matrize dient. An dieser Stelle erklärt sich die Selektivität der Nick-Translation für DNS-Einzelstrangbrüche. Bei einem DNS-Doppelstrangbruch haben beide Stränge einen Bruchschaden erlitten, weshalb die DNS-Polymerase I ihre Arbeit an diesen Stellen nicht aufnehmen kann. An einem DNS-Einzelstrangbruch katalysiert das Enzym gleichzeitig den Abbau des ursprünglichen DNS-Stranges am 5´-Phosphat-Ende. Das mit dem Wasserstoffisotop Tritium (<sup>3</sup>H) radioaktiv markierte dTTP, wird an den Stellen in den neusynthetisierten Strang eingebaut, an denen sich in der Matrize ein Adenin befindet. Da Tritium  $\beta$ -Strahlung emittiert, kann es zur Schwärzung eines Röntgenfilms führen, indem es die im Film enthaltenen Silberhalogenide reduziert. Damit besteht ein proportionaler

Zusammenhang zwischen der Menge an eingebautem radioaktiven dTTP, also der DNS-Einzelstrangbruchrate, und der Schwärzungsintensität des Röntgenfilms. Eine semiquantitative Bestimmung von DNS-Einzelstrangbrüchen lässt sich somit densitometrisch durchführen. Das genaue Verfahren ist nachfolgend im Einzelnen beschrieben und in Abbildung 2.6 schematisch dargestellt.

### Abbildung 2.6

Die Abbildung zeigt schematisch die Reaktion der „in-situ“-Nick-Translation.



(Quelle: Hersteller-Katalog)

Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Schnitte wurden für 5 min in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) aufgetaut. Anschließend für 20 min in einer Methanol : Eisessig-Lösung (2:1) fixiert. Nach zwei darauf folgenden Waschvorgängen für jeweils 5 min in NaCl 0.9% wurden die Schnitte mittels Warmluft getrocknet. Parallel wurde das Reaktionsgemisch in folgenden Konzentrationen angesetzt (Tabelle 2.2).

**Tabelle 2.2** Reaktionsgemisch für die In-Situ-Nick-Translation. <sup>1</sup>Boehringer Mannheim, <sup>2</sup>Sigma, <sup>3</sup>Amersham Pharmacia Biotech. Alle Komponenten wurden in einem Becherglas gemischt.

Substanz	Endkonzentration	pro Schnitt
NT-Puffer		636,5 µl
dATP <sup>1</sup>	50 µM (Stammlsg.: 5 mM)	7 µl
dGTP <sup>1</sup>	50 µM (Stammlsg.: 5 mM)	7 µl
dCTP <sup>1</sup>	50 µM (Stammlsg.: 5 mM)	7 µl
Dimethylsulfoxid (DMSO) <sup>2</sup>	5%	35 µl
<sup>3</sup> H-dTTP (51 Ci/mmol) <sup>3</sup>	3 µCi/ml	4 µl
DNS-Polymerase <sup>1</sup>	20 U/ml	3,5 µl

Der Puffer (Tabelle 2.3) wurde in größeren Mengen angesetzt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

**Tabelle 2.3** Zusammensetzung des NT-Puffers.  
Tris : Tris [hydromethyl]aminomethane (TRIZMA BASE)

Substanz	Endkonzentration	für 100 ml
Tris <small>MW=121,1</small>	50 mM	605,5 mg
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O <small>MW=203,3</small>	5 mM	102 mg
2-Mercaptoethanol <small>MW=78,13</small>	10 mM	78 µl

Die Lösung wurde 10 s durch Invertieren vermengt und 1 min bei Raumtemperatur equilibriert. Danach wurden je 700 µl der Lösung auf die vollständig trockenen Schnitte pipettiert und diese dann 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Entfernen des Reaktionscocktails und Waschen der Schnitte in NaCl mit 1% Tetrasodium-Pyrophosphat [Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München] gestoppt. Dieser Waschschrift wurde fünfmal wiederholt um sämtliche Lösungsrückstände zu entfernen. Es folgte das Trocknen der Schnitte mittels Warmluft und das anschließende sorgfältige Aufkleben auf Fotokarton und Beschriften der Schnitte. Nun konnte in einem abgedunkelten Raum ein Röntgenfilm (Hyperfilm 3H) [Amersham

Pharmacia Biotech, Amersham, GB] vorbereitet und beides zusammen in einer Expositionskassette für 24 Stunden im Dunkeln inkubiert werden. Die so geschwärzten Filme wurden durch den Röntgenentwickler AGFA G150 entwickelt (5 min) und mit dem Fixierer AGFA G354 fixiert (10 min), wobei nicht reduzierte Silberhalogenide entfernt wurden.

### **2.8.2 Kontrollschnitte**

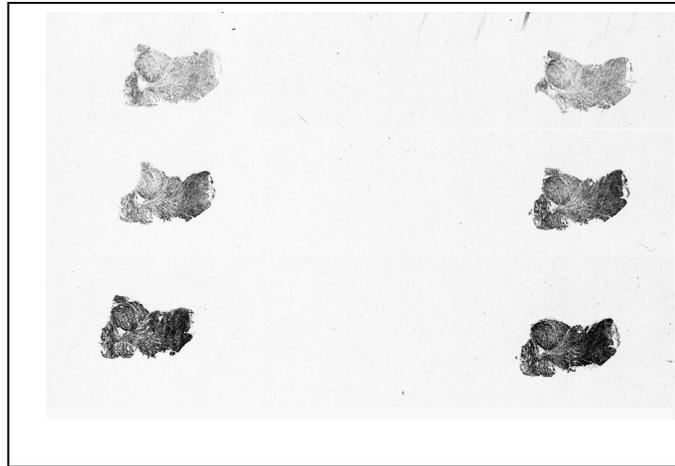
Das dargestellte Verfahren ist von unserer Arbeitsgruppe 2002 erstmalig in einem kardialen Ischämiemodell etabliert und in einem Abstract veröffentlicht worden.<sup>172</sup> Hierfür musste ausgeschlossen werden, dass ein unspezifischer Einbau von Nukleotiden und somit auch des radioaktiven Markers Tritium stattfindet. Aus diesem Grund wurden in Vorversuchen Schnitte mit dem oben beschriebenen Reaktionsgemisch ohne DNS-Polymerase als Negativkontrolle behandelt.

Eine Positivkontrolle fand in diesen Vorversuchen durch die zusätzliche Inkubation der Schnitte mit Desoxyribonuklease I, einer Restriktionsendonuclease statt. Dieses Enzym lässt bindungsspezifische DNS-Einzelstrangbrüche entstehen. Um die Funktionalität der Reaktion zu testen, wurden die Schnitte mit Reaktionslösungen die unterschiedliche Desoxyribonuklease I - Konzentrationen aufwiesen, inkubiert (Desoxyribonuklease I) [Boehringer Mannheim].

Es konnte hierbei gezeigt werden, dass mit größerer Desoxyribonuklease I-Konzentration die Schwärzung des Filmes zunahm. Die zunehmende Zahl an DNS-Einzelstrangbrüchen führte zu einem vermehrten Einbau von dTTP, somit auch Tritium-Einbau und Schwärzung des Filmes.

Abbildung 2.7 zeigt die aus dem Vorversuch hervorgegangenen Ergebnisse der Autoradiographie.

**Abbildung 2.7** Autoradiographische Ergebnisse des Vorversuches. Hier wurden den Reaktionsgemischen verschiedene, aufsteigender Konzentrationen Desoxyribonuklease I beigemischt, um eine geeignete Konzentration für die qualitativen Positivkontrollen des Hauptversuches zu bestimmen.

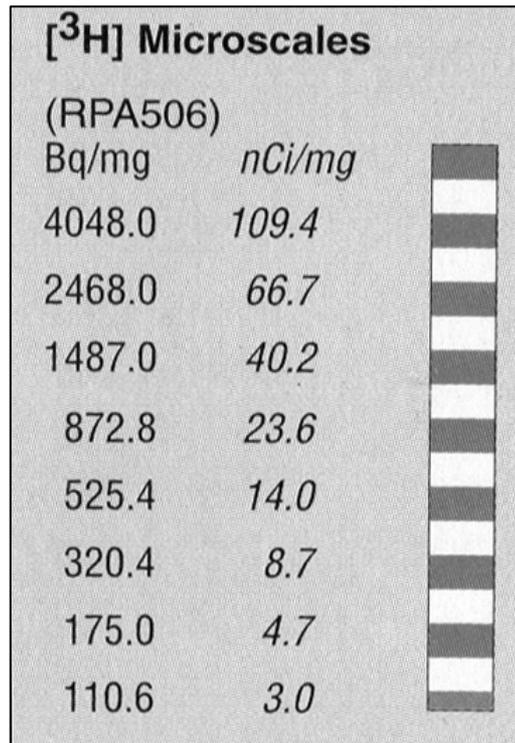


*Quelle: eigene Vorversuche*

Die somit bestimmte, geeignete Konzentration der Positivkontrollen fand sich im Versuch in sog. Microscales [Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, GB] wieder. Diese, auf jedem Film aufgebrachten Teststreifen, enthielten das Radioisotop Tritium in einem Polymer gebunden. In 6-8 sichtbaren Zonen mit unterschiedlicher Konzentration, welche auf einem Streifen untereinander angeordnet sind, stellt jede Zone eine spezifische Isotopen-Aktivität dar. Dies wird in der folgenden Abbildungen kurz dargestellt. Nur die Zone mit der größten Schwärzung wurde als Bezugspunkt für die quantitative Messung verwendet.

### Abbildung 2.8

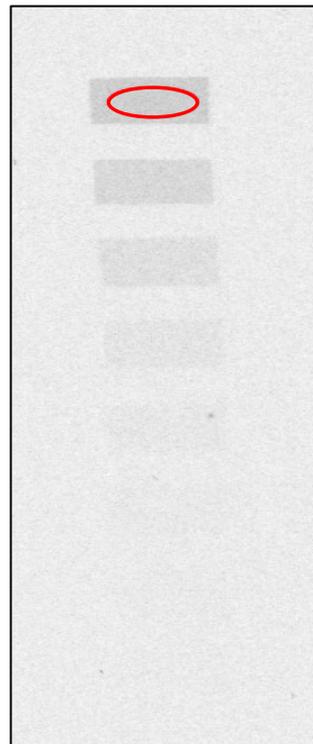
Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Bereiche in Bq/mg und in nCi/mg.



Quelle: Katalog Amersham Pharmacia Biotech

### Abbildung 2.9

Auf einem Film aufgebrachte Microscales. Die niedrigeren spezifischen Aktivitäten sind nicht abgebildet, da sie den Röntgenfilm nicht schwärzten. Die rote Ellipse zeigt, wie per Image Quant™ die optische Dichte des intensivsten Feldes der Microscales bestimmt wurde.



Quelle: eigene Arbeit

Eine Kreuzkontamination der Präparate mit unterschiedlichen Enzymen und Lösungen wurde durch getrenntes Waschen und getrennte Gefäße streng vermieden. Die Nick-Translation wurde mittels eines Standard-Kits durchgeführt (Kit Nick-Translation, Kat.-Nr. 976776) [ROCHE Diagnostics - Applied Science, Mannheim].

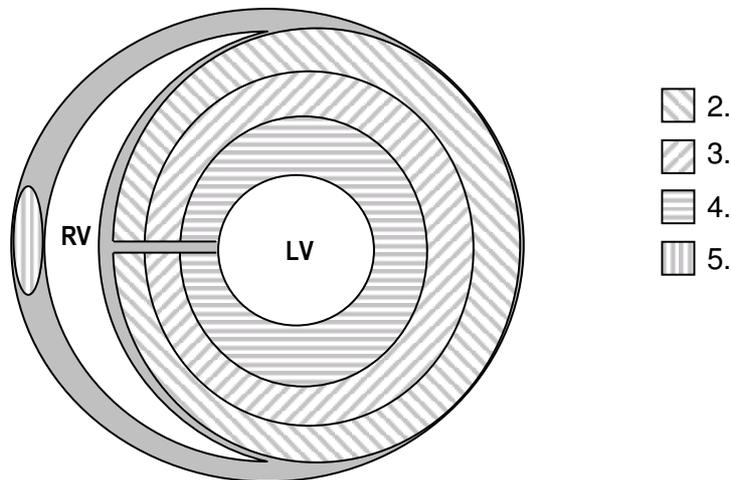
### **2.8.3 Densitometrische Auswertung**

Über ein Laser-Densitometer erfolgte das Einlesen der Autoradiogramme in den Computer (Personal Densitometer SI, Molecular Dynamics). Über das Computerprogramm Image Quant™ 4.1 wurden die Schwärzungsgrade in den Arealen gemessen. Hierbei fand ein einfestgelegtes Muster Verwendung. Gemessen wurden:

1. linker Ventrikel gesamt, ohne Lumen
2. eine epikardiale Sichel
3. eine myokardiale Sichel
4. eine endokardiale Sichel
5. ein repräsentativer Teil des rechten Ventrikels

Dieses Verfahren der myokardialen Drittelung fußt auf der Idee, auf diese Weise Unterschiede in der schichtweisen Myokardversorgung feststellen zu können. Eine schematische Darstellung findet sich in der Abbildung 2.10.

**Abbildung 2.10** Schematische Darstellung der verschiedenen Auswertungsareale zur Quantifizierung der Dichte der DNS-Einzelstrangbrüche im autoradiographischen Nachweis nach Nick-Translation (Die nummerierten Felder entsprechen den o.g. Messarealen).



2. + 3. + 4. entsprechen dem gesamten linken Ventrikel, also dem Messareal mit der Nummer 1.

Für die Referenzwertbestimmung (RW) pro Film wurde die optische Dichte des jeweils intensivsten Feldes der 3 auf jedem Film mitgeführten Microscales bestimmt (Polygonales Messfeld). Die Hintergrundschwärzung (HS) wurde ebenfalls berücksichtigt und mit drei großen, ellipsenförmigen Arealen verteilt über den Film berechnet. Das Programm berechnete für jedes Areal die mittlere optische Dichte mit Standardabweichung, Median und Flächengröße (in Pixeln). Die Werte wurden zur Weiterverarbeitung in MS-Excel™-Tabellen übernommen [Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim]. Der genaue Ablauf ging wie folgt von statten.

1. Als erster Schritt wurde der „Range“ des Durchschnittswertes der optischen Dichte (Average) für jeden Film auf einen Bereich von 0,0 bis 1,0 eingestellt.
2. Ein Mittelwert für die Hintergrundschwärzung (HS) wurde aus den drei Ellipsen eines Filmes und deren Hintergrundwerten berechnet.

Bei allen folgenden Messungen musste dieser Grundwert von den Rohwerten subtrahiert werden.

3. Nach dem gleichen Prinzip wurde aus den am intensivsten geschwärzten Arealen der Microscales eines Filmes ein Mittelwert berechnet. Von diesem Wert musste die Hintergrundschwärzung subtrahiert werden, um daraus den Referenzwert (RW) eines Filmes bilden zu können. Dieser Referenzwert wurde dann mit einer optischen Dichte von  $1=100\%$  festgelegt.
4. Von jedem Tier wurden fünf Präparate der Schnittebene 8 angefertigt. Bei jedem Präparat wurden, nach dem oben dargestellten Verfahren, sämtliche Areale ausgemessen. Aus den jeweiligen Arealen aller fünf Präparate wurden sodann die Mittelwerte errechnet. Also z.B. der Mittelwert aus fünf Endokardsicheln usw.. Diese Mittelwerte wiederum wurden durch die HS korrigiert.
5. Musste beispielsweise aufgrund von Artefakten, oder einem ungünstig gelegenen Ventrikellumen ein einzelnes Messareal in mehrere unterteilt werden, so wurde wie folgt berechnet:

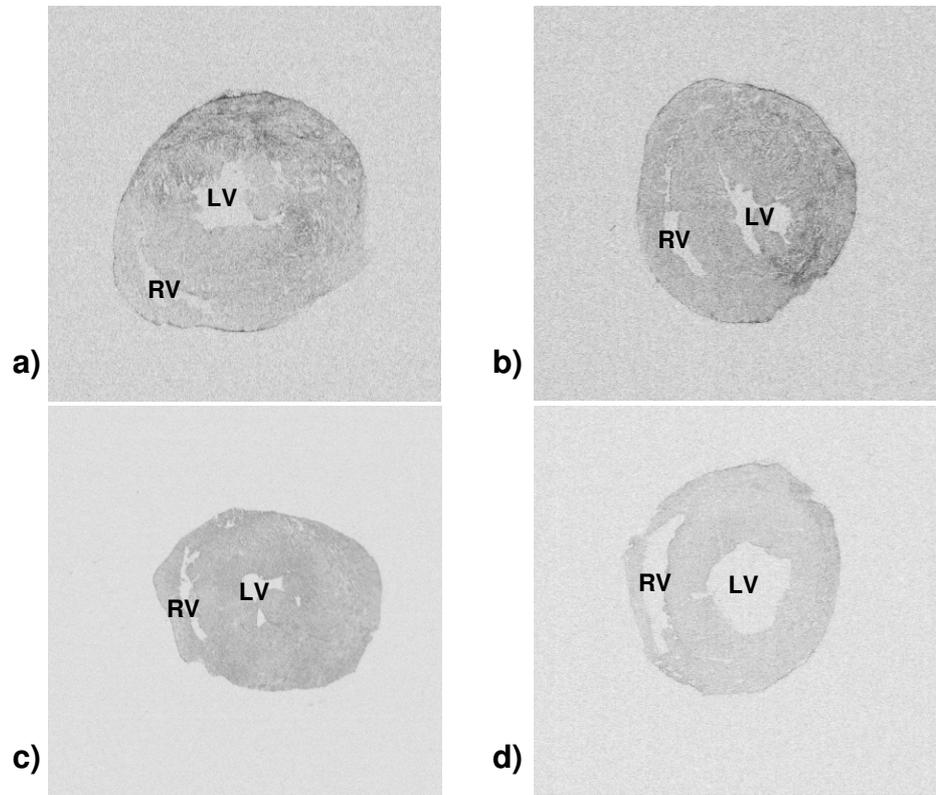
$$\frac{Av_1 \cdot F_1 + \dots + Av_n \cdot F_n}{F_1 + \dots + F_n}$$

$Av$ =Average (Durchschnittswert);  $F$ =Fläche;  $n$ =Anzahl der Teilstücke

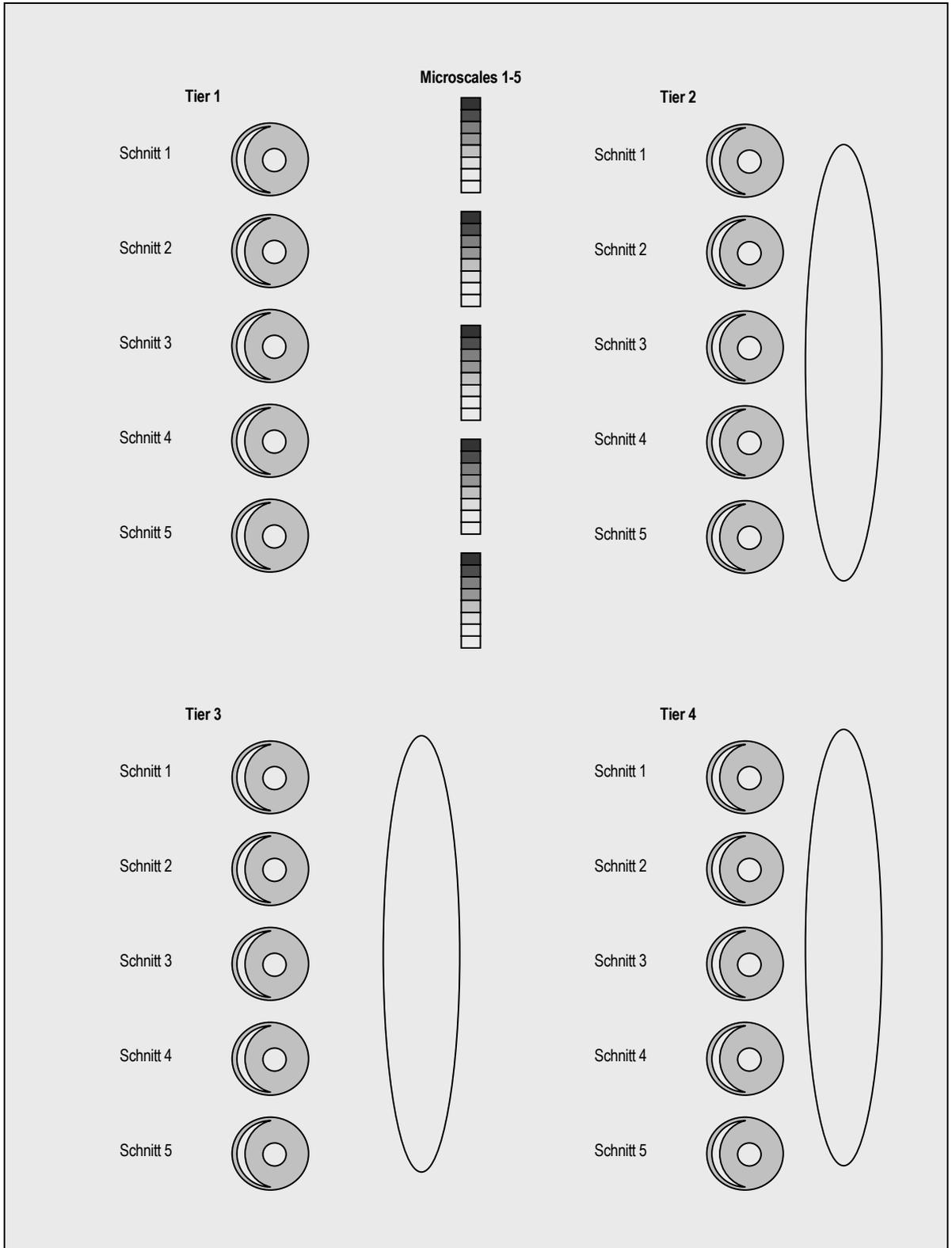
6. Eine Extremwertkorrektur fand durch die Herausnahme des jeweiligen Schnitt mit dem sowohl höchsten, als auch niedrigsten Werte für den linken Ventrikel statt.
7. Die somit pro Tier verbliebenen drei Werte pro Messareal wurden nun in Relation zum Referenzwert mit einem Wert von  $100\%$  gesetzt und als relative Dichte in Prozent angegeben. Aus diesen Werten wurde anschließend ein Mittelwert gebildet, so dass für jedes Tier jeweils ein Wert pro Schicht in die statistische Auswertung einging
8. Die statistische Auswertung erfolgte direkt im Anschluss, nachdem bei allen Tieren die Kodierung aufgehoben und die Tiere entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit geordnet wurden.

## Abbildungen 2.11

Dargestellt sind Schnittbeispiele für alle Tiergruppen. Zu erkennen sind die stärker geschwärtzten Areale. **a)** O<sub>2</sub>-Kontrolle; **b)** NaCl-Kontrolle; **c)** Prophylaxe; **d)** Therapie  
Rechter Ventrikel (RV), Linker Ventrikel (LV)



**Abbildung 2.12** Schematische Darstellung der Filmbelegung mit je 5 Schnitten von 4 Versuchstieren, den Microscales für die Ermittlung des Standards sowie einer Positiv- und einer Negativ-Kontrolle. Zusätzlich sind die Felder für die Bestimmung der Hintergrundschwärzung (HS) eingezeichnet.



### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Intraoperative Messwerte**

In die statistische Auswertung wurden nur Tiere aufgenommen, die den kompletten Versuch, also 25 min Ischämie und 120 min Reperfusion, durchlaufen haben. Tiere, die vor Versuchsbeginn verstarben, wurden nicht ausgewertet und sind somit auch nicht dargestellt. Die gesamten Daten sind nochmals im Anhang mit Mittelwert und Standardabweichung tabellarisch dargestellt.

##### **3.1.1 Gewicht**

Beim Gewicht konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Das Gewicht der Tiere lag zwischen 260g und 386g vor Versuchsbeginn (Tabelle 8.3.1 im Anhang).

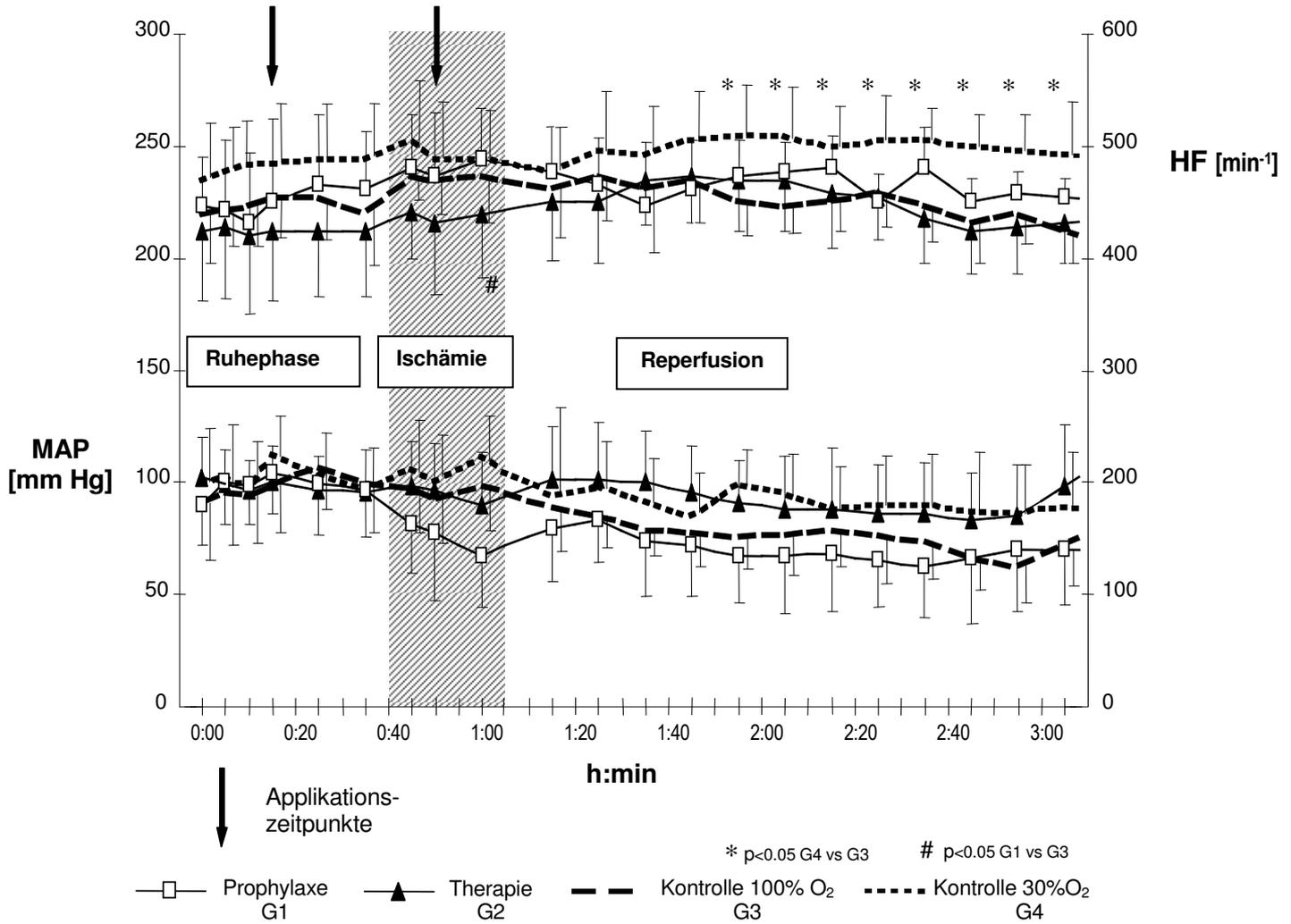
##### **3.1.2 Hämodynamik**

Hierunter werden der mittlere arterielle Druck (Tabelle 8.3.3), der zentralvenöse Druck (Tabelle 8.3.4) und die Herzfrequenz (Tabelle 8.3.2) gefasst. MAP und ZVD gehören zu den invasiven Messungen und sind nur durch Katheterisierung möglich.

Der ZVD bewegte sich während des Versuches im Bereich von 5,5 - 8 mmHg in allen Gruppen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden.

Sowohl beim MAP, als auch der HF, konnte zu Versuchsbeginn kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen beobachtet werden. Auch die PFC-Applikation hatte hierauf keinen relevanten Einfluss. Jedoch war in der Prophylaxe-Gruppe ein tendenziell geringerer MAP festzustellen. Diese Veränderung zeigte aber keine statistische Signifikanz. Zum Ischämieende hin zeigte sich der MAP in Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 3 signifikant erniedrigt. In den letzten 50 min der Reperfusion waren zwischen den Gruppen, G4 und G3 signifikante Unterschiede bei der Herzfrequenz,  $G4 > G3$ , festzustellen.

**Abbildung 3.1** Darstellung des MAP und der Herzfrequenz.



### **3.1.3 Inspiratorische Sauerstoff-Konzentration und Blutgasanalysen**

Bis auf die O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe konnte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dieses beruht jedoch auf dem Versuchsaufbau, da in G4 eine Beatmung mit einer FIO<sub>2</sub> von 30% geplant war (Tabelle 8.3.5). Somit waren der arterielle pO<sub>2</sub> (Tabelle 8.3.6) und die arterielle SaO<sub>2</sub> (Tabelle 8.3.13) in Gruppe 4 geringer als in den anderen Gruppen. Zum jeweiligen Zeitpunkt der PFC-Applikationen und den ersten 10 min der Reperfusion konnte, sowohl in der Therapie-, als auch der Prophylaxe-Gruppe ein signifikanter Anstieg des paO<sub>2</sub> gemessen werden. Für den arteriellen pCO<sub>2</sub> konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Tabelle 8.3.7).

### **3.1.4 Gesamte Hämoglobinkonzentration**

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen für die gesamte Hämoglobinkonzentration detektiert werden (Tabelle 8.3.11).

### **3.1.5 Säure-Basen-Haushalt**

Zu Beginn der Messungen zeigte sich eine signifikante Differenz des arteriellen pH-Wertes (Tabelle 8.3.8) zwischen den Gruppen G2 (Therapie) und G3 (O<sub>2</sub>-Kontrolle). Bei weiteren Messungen bestand dieser Unterschied nicht mehr. Das Standard-Bikarbonat (Tabelle 8.3.9) sowie der s-Base-Excess (Tabelle 8.3.10) konnten ohne Gruppenunterschiede stabil gehalten werden.

### **3.1.6 Blutzucker-Konzentration**

Der Blutglukosewert (Tabelle 8.3.20) lag bei allen Tieren zwischen 106–138 mg dl<sup>-1</sup>. Signifikante Unterschiede zeichneten sich zwischen den Gruppen nicht ab.

### **3.1.7 Elektrolyte**

Die Konzentrationen von  $\text{Na}^+$  (Tabelle 8.3.17),  $\text{K}^+$  (Tabelle 8.3.18) und  $\text{Ca}^{++}$  (Tabelle 8.3.19) wiesen zumeist keine deutlichen Unterschiede auf. Lediglich zum Messzeitpunkt Ligatur + 20 min wies die  $\text{K}^+$ -Konzentration in der Prophylaxe-Gruppe einen signifikanten Unterschied gegenüber der Therapie-Gruppe auf.

### **3.1.8 Temperatur**

Bei der Temperatur (Tabelle 8.3.21) konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In sämtlichen Gruppen konnte die rektal gemessene Körpertemperatur im Bereich zwischen 37,5 °C und 38,5 °C gehalten werden. Dies entspricht einer Normothermie bei Ratten.

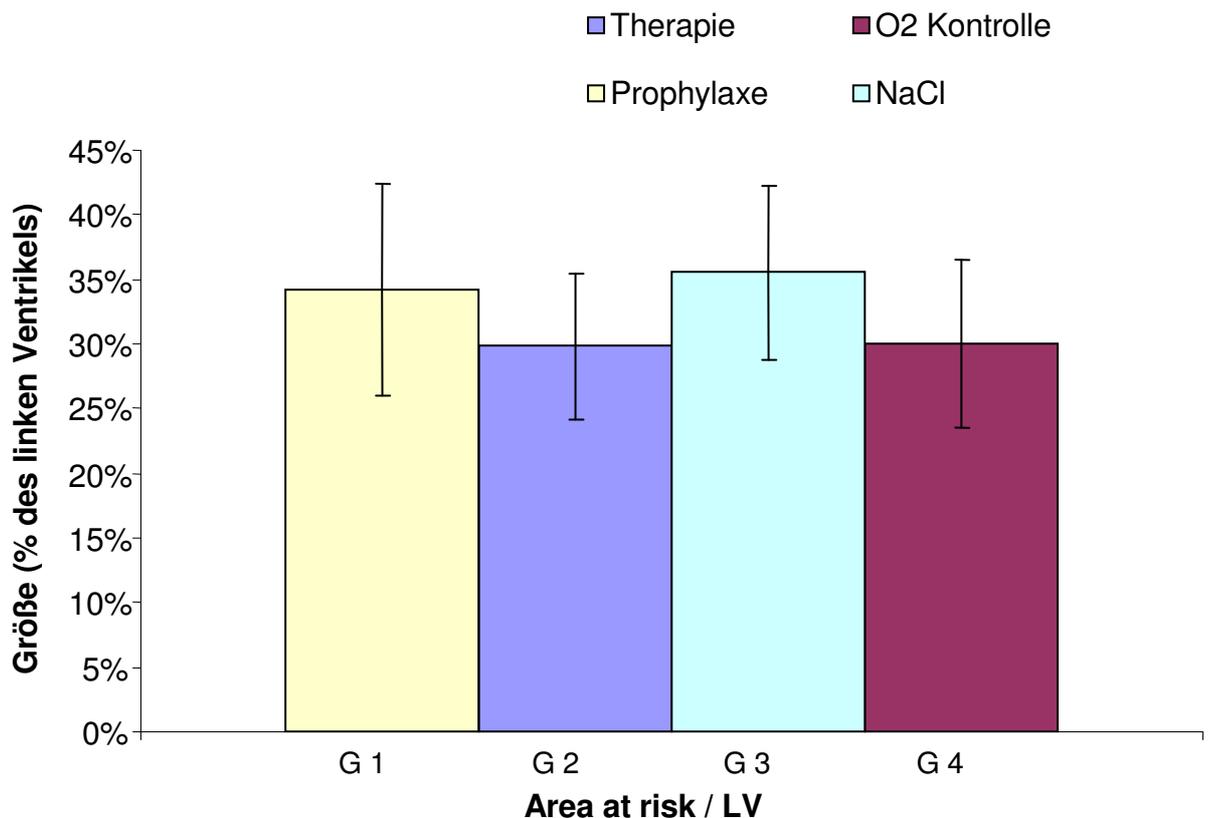
### 3.2 „Area at risk“

Die „Area at risk“ wurde in diesem Versuch als Bezugspunkt für das „No-reflow“-Phänomen verwendet. Hierfür fand eine planimetrische Auswertung des Areals in Bezug auf den linken Ventrikel gesamt statt.

Die „Area at risk“ als Prozentangabe vom gesamten linken Ventrikel, ohne Lumen, zeigte unter den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Prozentangaben lagen zwischen 29,8 und 35,5 % Volumenanteil des linken Ventrikels (MW±SD).

#### Abbildung 3.2

Dargestellt sind die Größe der „Area at risk“ in Prozent des linken Ventrikels.



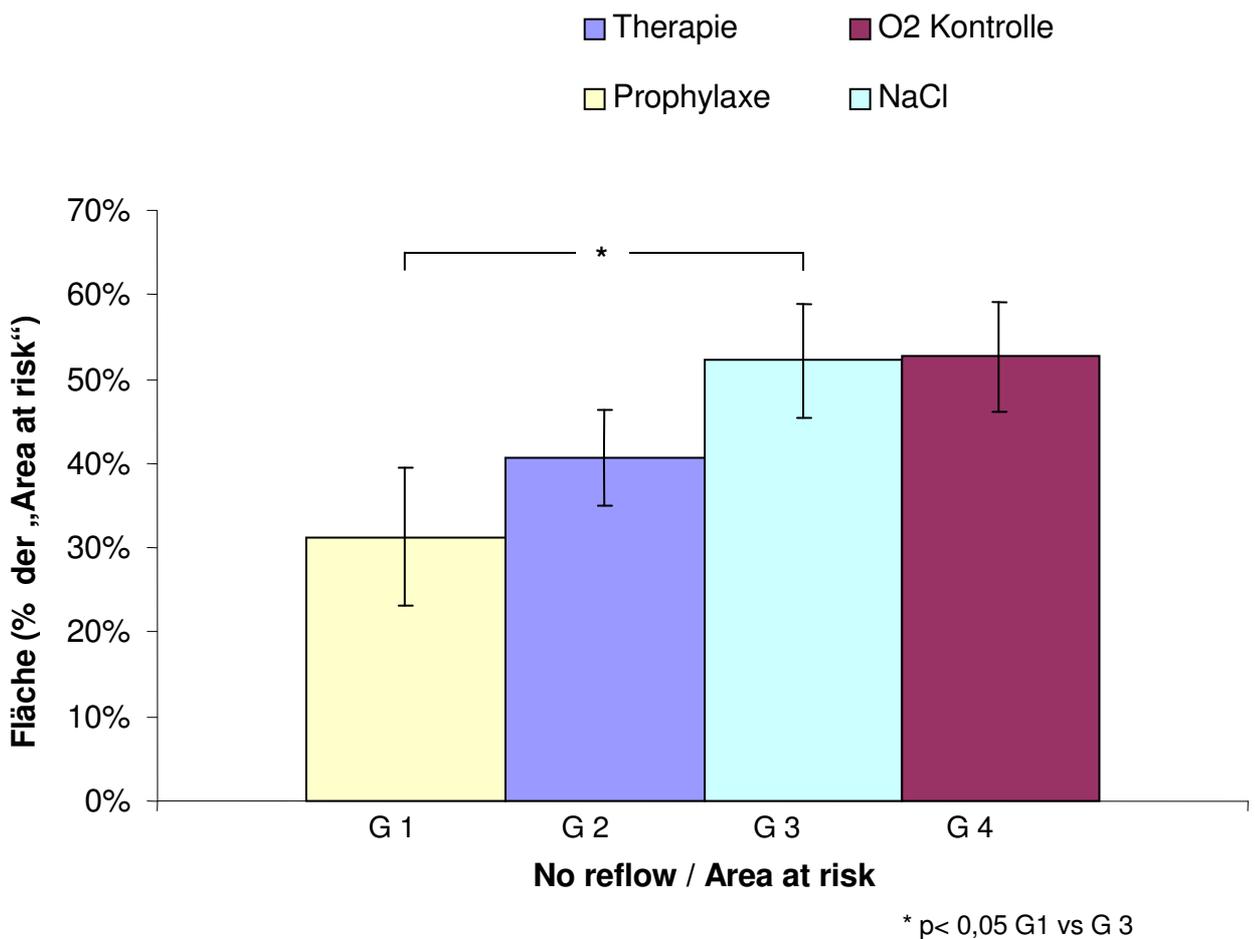
### 3.3 „No-reflow“-Areale

Wie bereits erwähnt wurde, sollten die die „No-reflow“-Areale in Relation zur „Area at risk“ angegeben werden.

Hierbei konnten zwischen der O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe und der NaCl-Gruppe keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden. In beiden PFC behandelten Gruppen stellten sich verringerte „No-reflow“-Areale im Vergleich zur NaCl-Gruppe dar, wobei diese jedoch nur bei der Gegenüberstellung der Prophylaxe-Gruppe zur NaCl-Gruppe signifikant ausfielen.

#### Abbildung 3.3

Dargestellt sind die „No-reflow“ Areale in Prozent der „Area at risk“.



### 3.4 Nick-Translation

Die Auswertung der Nick-Translation erfolgte über eine densitometrische Messung fünf unterschiedlicher Schnitte eines jeden Tieres aus der Ebene 8. Hierbei wurde der linke Ventrikel jeweils in drei Schichten, epi-, myo- und endokardiale Schicht, unterteilt. Diese Areale wurden ins Verhältnis zu einem repräsentativen Areal des rechten Ventrikels gesetzt. Alle Messungen erfuhren eine Korrektur der Hintergrundschwärzung und jeder Film besaß ein Microscale-Areal mit dem definierten Schwärzungsgrad 1 = 100%, um Verhältnismäßigkeiten darstellen zu können.

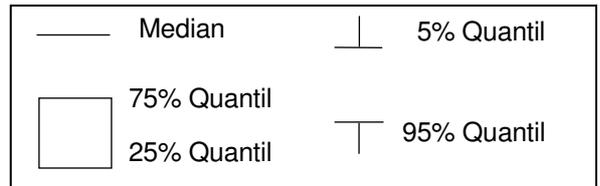
Die Quantifizierung von DNS-Einzelstrangbrüchen (DNS-ESB) innerhalb des linken Ventrikels aller mit 100 % ventilierten Tiere, erbrachte im Vergleich zum rechten Ventrikel der O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe, signifikante Unterschiede. Die Mittelwerte aller drei Schichten der O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe ergaben im direkten Vergleich mit den anderen Gruppen (FIO<sub>2</sub> = 1,0) niedrigere DNS-ESB-Raten. Alle anderen Gruppen, sowohl die Prophylaxe, die Therapie-, als auch die NaCl-Gruppe wiesen in diesen Regionen deutlich höhere Werte auf.

Interessanter Weise konnte keine signifikante Differenz in der O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe zwischen dem linken und rechten Ventrikel gezeigt werden.

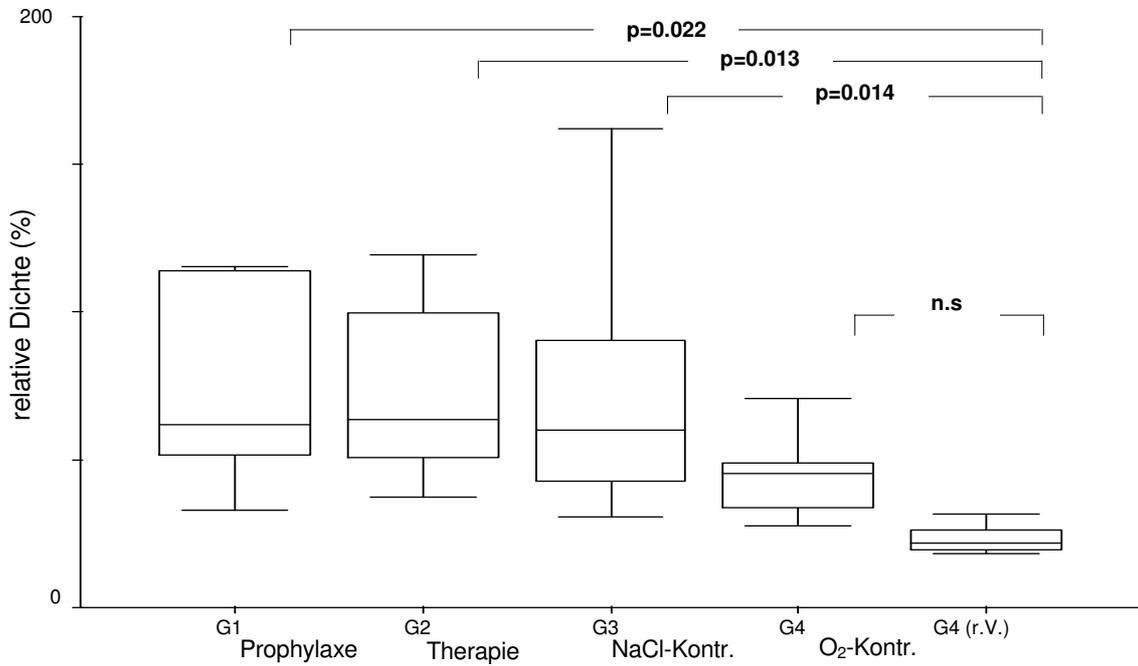
Hingegen war das 95% Konfidenzintervall der DNS-ESB im rechten Ventrikel aller mit einer FIO<sub>2</sub> von 100% therapierten Tiere höher als bei Tieren mit einer FIO<sub>2</sub> von 0,3. Signifikant war dies aber nur im Vergleich zur Therapie-Gruppe.

### Abbildung 3.4

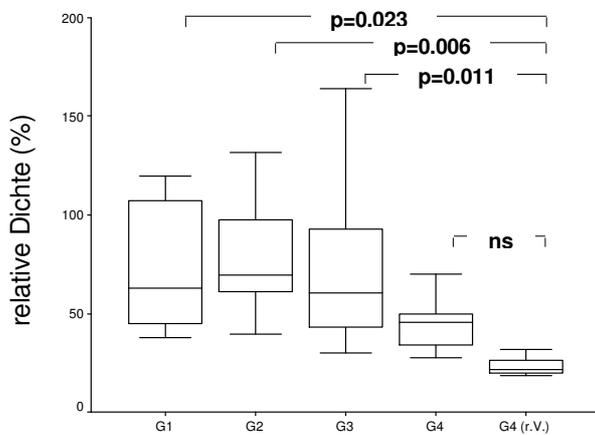
Darstellung der unterschiedliche Schwärzungsgrade als Box-and-Whisker-Plots.



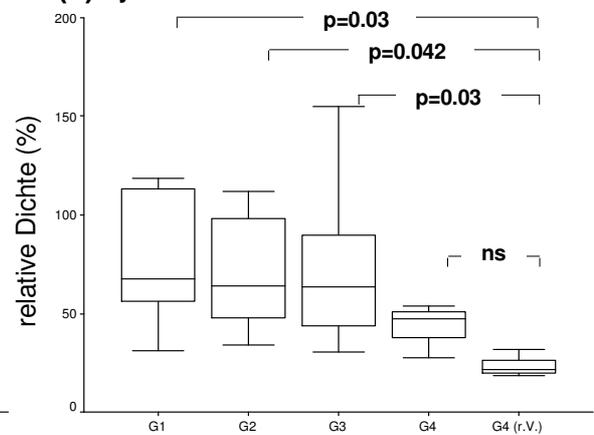
#### (a) linker Ventrikel gesamt



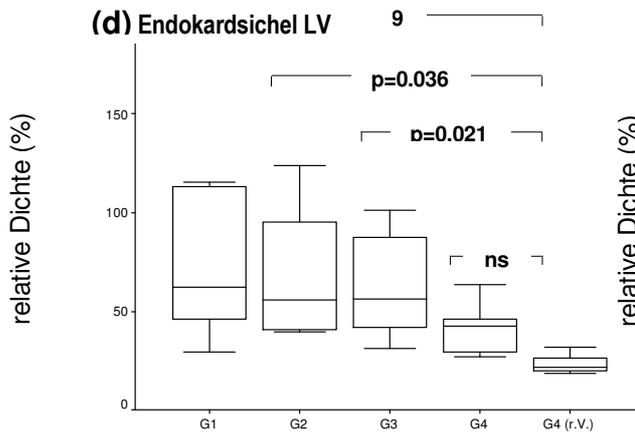
#### (b) Epikardsichel LV



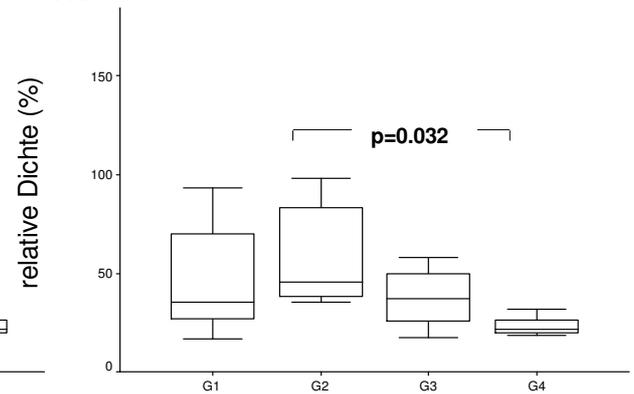
#### (c) Myokardsichel LV



#### (d) Endokardsichel LV



#### (e) rechter Ventrikel



## 4 Diskussion

In der vorliegenden Studie sollte gezeigt werden, dass durch die prophylaktische oder therapeutische Applikation von PFC die DNS-ESB-Rate beeinflusst werden kann. Ebenso wurde von einer hypothetischen Beeinflussung von sog. „No-reflow“-Arealen ausgegangen. Obwohl beide PFC-behandelten Gruppen Reduktionen des „No-reflow“-Phänomens aufwiesen, konnte nur die prophylaktische Applikation eine signifikante Reduktion von „No-reflow“-Arealen im Vergleich zur O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe zeigen. Die Signifikanz konnte bei der Therapie-Gruppe nicht gezeigt werden.

Für die Messungen der DNS-ESB-Raten sehen die Ergebnisse anders aus. So scheint ein Zusammenhang zwischen der insuffizienten O<sub>2</sub>-Konzentration und dem Auftreten von DNS-ESB im linksventrikulären Myokard zu existieren, das einer Ischämie und anschließenden Reperfusion unterzogen wurde. Bezugspunkt für sämtliche Gruppen war hierfür ein repräsentatives rechtsventrikuläres Areal der O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe. Dies entspricht Gewebe, welches in nicht-ischämischem Myokard lag und ohne medikamentöse Therapie sowie ohne erhöhte O<sub>2</sub>-Applikation den gesamten Versuch durchlief. Hierbei konnten wir feststellen, dass das Auftreten von DNS-ESB in sämtlichen Gruppen mit einer FIO<sub>2</sub> von 100% signifikant höher war. Durch die Applikation von PFC konnte über einen Zeitraum von 10min eine signifikante Erhöhung des paO<sub>2</sub> festgestellt werden.

### 4.1 Effekte von PFC auf „No-reflow“-Areale

Der Begriff „No-reflow“-Phänomen wurde im Jahre 1967 von Majno geprägt.<sup>88</sup> In dieser Arbeit wurden verschiedene cerebrale Ischämiezeiten an Kaninchen getestet. Bei längeren Ischämiezeiten konnten Veränderungen in der cerebralen Mikrozirkulation festgestellt werden. Dieses Phänomen wurde in diversen Arbeiten bestätigt.<sup>89, 90, 91, 92</sup> 1974 konnte Kloner zum ersten Mal in einem Versuch an Kaninchenherzen mit dem Endothel färbenden Stoff Thioflavin-S „No-

reflow“ Areale sichtbar machen. Er prägte den Namen „anatomical No-reflow“.<sup>93</sup> In weiteren Untersuchungen wurde versucht die mikrovaskulären Veränderungen aufzudecken. Fragte Kloner noch 1993 selber in einem Artikel rhetorisch „Does reperfusion injury exist in humans?“<sup>94</sup>, um Kritikern die Wichtigkeit vor Augen zu führen, so wird das Auftreten des „No-reflow“-Phänomens bei Menschen heutzutage nicht mehr in Frage gestellt.

Momentan werden diverse Mechanismen diskutiert, welche in ihrer Gesamtheit das „No-reflow“-Phänomen verursachen sollen. Hierbei scheinen besonders unterschiedliche Reperforationszeiten die Ausprägung zu beeinflussen, weniger die Ischämiezeiten.<sup>95</sup> Die Wertigkeit der zugrunde liegenden Mechanismen ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht geklärt.

#### **4.1.1 Ischämischer Endothelschaden und mikrovaskuläre Verschlüsse**

Schon in Kloners Artikel 1974 wurden am Kaninchenmodell Veränderungen am koronaren Endothel festgestellt. In den meisten Zonen traten Endothelschwellungen und Vorstülpungen (blebs) auf. Diese Lumenverengungen könnten eine direkte Ursache für regionale Perfusionsdefekte sein, da sofort im Anschluss an die Wiederherstellung des koronaren Blutflusses in Kapillaren eng gepackte Erythrozyten zu finden sind. Somit also irgendeine Form von Perfusion kurze Zeit bestanden haben muss um diese Erythrozyten in die während der Ischämie verschlossenen Kapillaren zu befördern.<sup>93</sup>

#### **4.1.2 Leukozyteneffekte**

Engler et al. konnten zeigen, dass mit den von Kloner beschriebenen Effekten ein Anstieg von neutrophilen Granulozyten in den „No-reflow“-Arealen zu beobachten ist.<sup>96</sup> Englers Versuche die Granulozyten auszuwaschen waren erfolglos, woraus er schloss, dass die Zellen am Endothel andocken. Das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten scheint die Größe der „No-reflow“-Areale zu beeinflussen, aber für das

Auftreten von „anatomical No-reflow“ nicht Grundvoraussetzung zu sein. So konnte auch an Herzen, die mit Leukozyten freiem Blut perfundiert wurden, das „No-reflow“-Phänomen beobachtet werden.<sup>97</sup> Von großer Bedeutung ist aber, dass neutrophile Granulozyten über eine Vielzahl von Substanzen Modulationsmöglichkeiten besitzen. So können polymorphkernige Zellen reaktive Sauerstoffmetabolite, proteolytische Enzyme und Lipooxygenase-Produkte (z.B. Leukotriene) freisetzen, welche mit Thrombozyten und Endothelzellen interagieren.

Ebenso findet aber auch eine Modulation der Leukozyten durch Endothelzellen statt. So bilden Leukozyten hierdurch gehäuft Adhäsionsmoleküle aus, so z.B. das interzelluläre Adhäsions-Molekül 1 (ICAM-1), oder auch P-Selectin. Die Leukozytenaktivität in Anwesenheit von PFC unterliegt multiplen Mechanismen. So unterscheiden sich prophylaktische- und therapeutische PFC-Gaben in ihrer Leukozytenmodulation.<sup>178</sup> Cabrales et al. zeigten bei therapeutischer Anwendung eine verminderte Leukozytenaktivität. Wohingegen eine prophylaktische Gabe eine Steigerung der Leukozytenaktivität bewirkte. Ob hierfür hohe Sauerstoffpartialdrücke im Gewebe verantwortlich sind muss noch geklärt werden. Des Weiteren spielen Nitratverbindungen, Prostacyclin und der Plättchenaktivierende Faktor (PAF) eine Rolle. Thrombozyten beeinflussen polymorphkernige Granulozyten durch die Freisetzung von Thromboxan A<sub>2</sub>, Serotonin, Lipooxygenase-Produkte, Proteasen, Adenosin und den „platelet-derived growth factor“, kurz PDGF. Eine „einfache“ Interaktion mit PFC scheint eher unwahrscheinlich.

#### **4.1.3 Reaktive Sauerstoffmetabolite**

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von O<sub>2</sub>-Radikalen eine weitere Endothelschädigung hervorruft.<sup>98 - 102</sup>

Als Orte der Freisetzung müssen neben den Leukozyten die Mitochondrien und die Xanthinoxidase Reaktion genannt werden. Durch das gehäufte Auftreten von freien Sauerstoffradikalen könnte der physiologische Abbauweg über die Superoxid Dismutase überfordert

sein. So konnte in einer Arbeit von Przyklenk et al. gezeigt werden, dass durch die Applikation der Reduktionsenzyme Superoxid Dismutase und Catalase sowohl die Größe von „No-reflow“-Arealen, als auch das Auftreten ultrastruktureller Endothelveränderungen verringert werden konnte.<sup>103</sup>

#### **4.1.4 Weitere Mechanismen**

Es sind Dysfunktionen des Gefäßtonus nach Ischämie und Reperfusion beschrieben wurden, welche auch über mehrere Wochen bestehen können. Interessanterweise kann dieses Phänomen durch Preconditioning verringert werden.<sup>104</sup> Ebenso sind mechanische Flussbehinderungen zu finden. Zu diesen zählen myokardiale und endotheliale Schwellungen.<sup>105, 106, 107</sup> Das intravaskuläre Verklumpen von Fibrin und Thrombozyten kann ebenso als mechanisches Hindernis gewertet werden, wobei aber auch hiermit eine Erklärung des Phänomens nicht möglich ist.<sup>108, 109, 110</sup> So konnte bei Thrombozyten freiem Blut zwar eine Reduktion der „No-reflow“-Areale nach Ischämie und Reperfusion beobachtet werden, aber eben kein Ausbleiben.<sup>97</sup> Im Gegensatz zu tierexperimentellen Modellen wird in klinischen Versuchen noch ein zusätzlicher Faktor vermutet: Mikroembolien verursacht durch atherosklerotische Plaque-Trümmer.<sup>101</sup> Diese könnten, losgelöst durch z.B. Scherstress oder iatrogener Intervention, direkte Verschlüsse verursachen, oder aber sogar entzündliche Prozesse triggern.

Anhand der Vielfalt oben beschriebener Mechanismen des „No-reflow“-Phänomens fällt es schwer, genauere Wirkmechanismen von PFC-Emulsionen zu verifizieren. Als sicher anzusehen ist der Größenvorteil von PFC-Emulsionen als O<sub>2</sub>-Träger gegenüber Erythrozyten. (siehe hierzu auch Abbildung 2.5) Daraus schließend wäre auch eine weiter bestehende Perfusion mit PFC-haltigem Plasma trotz intravasaler Lumenverengung denkbar. Somit würde also auch eine myokardiale O<sub>2</sub>-Versorgung weiterbestehen. Ein kompletter Verschluss jedoch, wie von uns vorgenommen, könnte auch von PFC-Emulsionen nicht passiert

werden. Als reiner Sauerstofflieferant würde PFC somit keine längere Wirkung erzielen können. Jedoch kann eine präischämische Gewebsoxygenierung eventuell I/R-Schäden vermindern. Tahepold et al. zeigten in einem Versuch an Ratten, dass Tiere, die vor Ischämie/Reperfusion (Zeitraum 20, bzw. 180 min) in einer 95% O<sub>2</sub>-Atmosphäre gehalten wurden, eine geringere myokardiale Schädigung aufwiesen als Tiere unter Raumluft.<sup>111</sup>

Diese Daten können mit unseren Ergebnissen in Einklang gebracht werden. So konnte nur durch die prophylaktische PFC-Gabe eine signifikante Größenreduktion von „No-reflow“-Arealen bewirkt werden. Da nach Applikation der PFC-Emulsionen jeweils signifikante Unterschiede in Bezug auf die arteriellen Sauerstoffpartialdrücke gegenüber der NaCl-Gruppe aufgetreten sind, besitzt eine prophylaktische Gabe das Potenzial, einen Anstieg des Sauerstoffgewebepartialdrucks auch im Gewebe zu bewirken. Es wären also ähnliche Bedingungen wie in der Arbeit von Tahepold et al. gegeben. Die therapeutische Gabe wies nur einen Trend in der Reduktion des „No-reflow“-Phänomens gegenüber der NaCl-Gruppe auf. Dieser Effekt scheint also allein durch ein hochkonzentriertes, präischämisches O<sub>2</sub>-Angebot und nicht durch eine therapeutische Applikation möglich zu sein.

Forman et al. konnten in einem tierexperimentellen Versuch zeigen, dass eine therapeutische Gabe der PFC-Emulsion Fluosol™ im Vergleich zu einer NaCl-Kontrolllösung eine kapilläre Obstruktion verhindern kann.<sup>9</sup> Diese Arbeit geht mit den Ergebnissen unserer Therapie-Gruppe konform.

Wird bei bestehender Ligatur PFC injiziert, so könnte das Medikament erst nach Erreichen seines Bestimmungsortes eine Wirkung erzielen, im Gegensatz zu einer prophylaktischen Gabe. Somit würde ein einsetzender Reperfusionsschaden der therapeutischen PFC-Gabe direkt entgegen wirken und möglicher Weise verhindern, dass eine Prophylaxe äquivalente PFC-Menge mikrozirkulatorisch wirksam werden kann. Die beiden genannten Unterschiede zu einer prophylaktischen

Applikation könnten eine Erklärung für die verschiedenen -Ergebnisse in den PFC-Gruppen sein.

Ein weiterer Erklärungsversuch, welcher auch in mehreren Arbeiten bestätigt wird, ist eine Interaktion von PFC-Lösungen mit neutrophilen Granulozyten, einschließlich eingeschränkter Chemotaxis.<sup>65, 112, 113, 114</sup> Daraus könnte sich ableiten lassen, warum die prophylaktische PFC-Gabe bessere Ergebnisse erzielt als die therapeutische. So könnte PFC im ischämischen Myokard die intravasale Ansammlung von neutrophilen Granulozyten verringern. Eine ganze Kaskade könnte in ihrer Entstehung gemindert werden.

Endotheladhesion von neutrophilen Granulozyten führt zu weiteren Endothelschäden, durch Lipid-Peroxidasen, Protein-Oxidasen und eine vermehrte Freisetzung von O<sub>2</sub>-Radikalen.<sup>115, 116, 117</sup>

Eine therapeutische Applikation würde wiederum ihre Wirkung erst in einem beginnenden Reperfusionsschaden entfalten und somit mutmaßlich schlechtere Ergebnisse erzielen. Diese Ergebnisse lassen sich mit unserer Arbeit in Einklang bringen.

#### **4.2 Auswirkung der PFC-Applikation auf DNS-Einzelstrangbrüche**

Die von uns verwendete Technik zur DNS-ESB-Detektion, die in-situ Nick-Translation, gilt als Standard-Verfahren zum Nachweis von Einzelstrangbrüchen in verschiedenen Geweben.<sup>16, 86, 118</sup> In unserer Versuchsgruppe konnte dieses Verfahren zum ersten Mal zur quantitativ-densitometrischen Auswertung von DNS-ESB am Hundeherzen validiert werden.<sup>172</sup> 2003 veröffentlichten Krause et al. Die NICK-Translation am Rattenherzen.<sup>173</sup>

Somit stellt diese Methode eine verlässliche Technik dar, um an Gefrierschnitten des Rattenherzens in einem Ischämie-Reperfusion-Modell Einzelstrangbrüche zu zeigen. Als Vorteil dieser Technik sei zu erwähnen, dass sie unabhängig von anderen Färbetechniken eine Auswertung ermöglicht. Daher könnten auch Schäden außerhalb der „Area at risk“ festgestellt werden, welche unabhängig von der Ligatur

entstanden sind und eventuell durch eine Patentblau-Färbung kupiert sein könnten. Vorteilhaft scheint auch ihre, von der Schwärzungsintensität abhängige Abstufung zu sein. Ein sog. „entweder-oder“-Prinzip, wie es bei einem Infarktnachweis mittels TTC-Technik (Triphenyltetrazolium-Chlorid) Anwendung findet, kann durch die Nick-Translation und ihrer Gewichtung um ein Vielfaches verfeinert werden.

PFC-Emulsionen besitzen ein großes physikalisches Lösungsvermögen für O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>. Hierfür sind aber hohe Partialdrücke der jeweiligen Gase notwendig. Es ist jedoch bekannt, dass die Schwere von Radikalenreaktionen direkt vom Sauerstoffgewebepartialdruck abhängig ist.<sup>119</sup> Somit wäre für die PFC-Anwendung ein regelrechter Radikalen-“burst“ mit seinem zellulären Schädigungspotenzial zu erwarten.

Die Nick-Translation stellt eine frühe, sensitive Technik dar um ischämische, oxidative Zellschädigungen widerzugeben.<sup>16, 120</sup>

Die Ergebnisse in unserer Arbeit, in einem 25 min Ischämie- und 120 min Reperfusionmodell zeigen auf, dass eine alleinige, hohe inspiratorische O<sub>2</sub>-Konzentration mit den daraus resultierenden Gewebepartialdrücken ausreichen scheint, um DNS-Einzelstrangbrüche hervorzurufen. Alle Gruppen, die mit einer hohen FIO<sub>2</sub> beatmet wurden zeigten signifikante Unterschiede in der DNS-ESB-Rate im Vergleich zum Referenzwert (FIO<sub>2</sub> 0,3). In den beiden PFC-Gruppen konnte sogar eine im Vergleich zur NaCl-Gruppe noch höhere Rate an Einzelstrangbrüchen nachgewiesen werden. Diese wies zum Zeitpunkt der PFC-Applikation auch signifikant erhöhten paO<sub>2</sub> Werte auf. Somit ziehen wir den Schluss, dass ein direkter Zusammenhang zwischen Sauerstoffpartialdruck und dem Auftreten von DNS-Einzelstrangbruch-Raten zu postulieren ist. Diese Hypothese konnte durch Zingarelli und Szabados bestätigt werden.<sup>121, 122</sup>

DNS-Einzelstrangbrüche können u.U. eine Ursache für den Untergang der Zellen sein. Durch die Aktivierung der sog. nucleären Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) versucht die Zelle, die ESB-Reparatur zu

initiieren.<sup>123, 124</sup> Dieser Prozess läuft unter Spaltung von NAD<sup>+</sup> ab. Steigt die PARP-Aktivität über einen bestimmten Grad an, so kann dies zu einem interzellulären NAD<sup>+</sup>- und ATP-Mangel führen. Dies stellt einen Trigger für Zelltod dar.<sup>122, 125, 126, 127</sup> Eine wichtige Rolle scheint ein Energiemangel der Mitochondrien zu sein. Oxidativer Stress führt in ihnen zur Freisetzung von Cytochrom C, einem Zelltod-Initiator.<sup>128, 129</sup> Eine verschlechterte zelluläre Energiesituation führt zu einer zusätzlichen Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen (ROS), welche wiederum einen Trigger für den Zelltod darstellen.<sup>130, 131</sup> Ionisiertes Calcium spielt hierbei eine wichtige Rolle. Veränderungen der mitochondrialen Membranpermeabilität, verursacht durch ROS, führt zu einem intramitochondrialen NAD<sup>+</sup> Verlust und somit einem weiteren Energieverlust.<sup>132, 130</sup> Interessanterweise scheint die alleinige Aktivierung von PARP schon zu mitochondrialen Schäden zu führen.<sup>133, 134</sup>

Kaneda et al. wiesen in einer Arbeit darauf hin, dass Myokardschäden am geringsten ausfallen, wenn eine mittlere bis hohe Sauerstoffpartialdrücke vorzufinden sind. Hyperoxysche Bedingungen wiesen hingegen größere Schäden auf.<sup>135</sup> Dieser Versuch wurde jedoch in einer Langendorff Apparatur durchgeführt und somit nicht in vivo. Außerdem wurden keine Medikamente appliziert.

Eine abschließende Aussage aus unseren Ergebnissen zu tätigen wäre jedoch nicht zulässig. Das Auftreten von DNS-ESB kann nicht als Endpunkt betrachtet werden. Jedoch sind sämtliche DNS-Reparatur-Mechanismen direkt energieabhängig und dürften unter ischämischen Bedingung ihre Funktionalität einbüßen.<sup>136</sup> Dies bedeutet, dass der Nachweis von DNS-Einzelstrangbrüchen nur eine zelluläre Momentaufnahme darstellt. Erst ein weiteres Erschöpfen von zellulären Energiereserven würde die Zelle, bei Übersteigen der Reparaturmechanismen, in den Zelltod führen.

Jedoch scheint, unabhängig einer PFC-Applikation, ein erhöhtes Sauerstoffangebot den Benefit der Energiebereitstellung, durch ein vermehrtes Auftreten freier Sauerstoffradikale aufzuheben. Eine

zusätzliche PFC-Medikation, mit der notwendig hohen  $FIO_2$ , erhöht die DNS-ESB-Rate

### **4.3 Hämodynamische Wirkungen und Nebenwirkungen von Perfluobron**

1984 stellten Waxman et al. fest, dass der verwendete Emulgator Pluronic™ F-68 Hypotensionen verursachte. Heutige PFC-Emulsionen verwenden Emulgatoren auf Lecithin-Basis, bei denen diese Nebenwirkung nicht mehr auftreten. Dennoch führen zu rasche Injektionen zu einem kurzzeitigen RR-Abfall. Länger anhaltende Effekte sollten eher einer indirekten Wirkung zugeschrieben werden.

In unserer Arbeit zeigte sich bei der Herzfrequenz nur zwischen den beiden nicht PFC-behandelten Gruppen eine signifikante Erhöhung zum Versuchsende hin. Weder in G1, noch in G2 fielen unterschiedliche Herzfrequenzen auf.

Die Prophylaxe-Gruppe wies in der Ischämiephase einen signifikant niedrigeren MAP auf und zeigte im Restversuch einen tendenziell niedrigeren MAP. Ursachen für die beschriebenen Phänomene können nicht benannt werden und wären daher spekulativ.

## **4.4 Methodenkritik**

### **4.4.1 Tierversuche**

Generell gilt für Tierversuche eine eingeschränkte Übertragbarkeit auf den Menschen. Zwar stellt das Tiermodell der Ratte<sup>137-141</sup>, neben Kaninchen<sup>142-147</sup> und Hunden<sup>93, 95, 148-150</sup> einen Standard dar, doch müssen in Bezug auf Übertragbarkeit dennoch Abstriche gemacht werden. Speziell in einer Ischämie-, Reperfusionssituation kommen folgende Punkte zum Tragen: Ratten zeigen im Gegensatz zu Kaninchen und Hunden einen relativ einheitlichen linksventrikulären Versorgungstyp, ohne nennenswerte Kollateralisierung. Hierzu muss angemerkt werden, dass dies nicht unbedingt einem Patienten mit chronischer koronarer Gefäßkrankheit entspricht.<sup>151</sup> Beim Menschen tritt hingegen eine deutliche Kollateralisierung auf, welche zusätzlich zum Mechanismus des „Preconditioning“ zu einer möglichen Reduktion von ischämischen Folgeschäden führt. Des Weiteren muss angemerkt werden, dass es sich bei den Versuchstieren dieser Arbeit durchweg um junge, gesunde Tiere gehandelt hat. Dies spiegelt nicht den multimorbiden koronaren Risikopatienten wider. Dennoch entspricht das von uns gewählte Tiermodell zur Untersuchung von myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschäden einem weit verbreiteten, internationalen Standard.<sup>152</sup>

### **4.4.2 Ischämie- und Reperusionszeit**

Die in der Literatur am Kleintiermodell beschriebenen Ischämiezeiten liegen in einem Bereich von 20-90 Minuten.<sup>140, 153-155</sup> Somit liegt die von uns gewählte Ischämiezeit von 25 min eindeutig im unteren Bereich. Grund hierfür war die, in einem Vorversuch festgestellte Verschlechterung der Tiere zum Ende der Ischämiephase von 30 min, was zu einer erhöhten Verlustrate an Versuchstieren führte.<sup>156</sup>

Die gewählte Reperusionszeit von 120 min entspringt dem Nachweis von Infarktarealen mittels TTC, welche aber in dieser Arbeit nicht untersucht, wohl aber Gegenstand einer anderen Dissertation wurden.<sup>81</sup>

In Bezug auf die Zielparameter der vorliegenden Arbeit, die DNS-ESB-Rate und Untersuchung des „No-reflow“-Phänomens, wurde eine Arbeit von Reffelmann herangezogen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass es keine signifikanten Unterschiede im regionalen myokardialen Blutfluss zwischen einer 120 min und 180 min Reperfuionszeit zu geben scheint.<sup>142</sup>

Da DNS-Einzelstrangbrüche sehr früh auftreten, war die gewählte Reperfuionszeit sicherlich ausreichend, um eine quantitative Untersuchung der unterschiedlichen Gruppen durchzuführen.

#### **4.4.3 „Area at risk“**

Die Stelle der Ligatur wurde bewusst in den Bereich der Aufteilung der linken Koronararterie weiter distal gelegt. In der aktuellen Versuchsreihe wurde entsprechend den Modifikationen von Ye et al. zur Senkung der Mortalität bei kardialen Ischämie-Modellen an Ratten<sup>157</sup>, diese Stelle vorgezogen, anstatt direkt den Hauptstamm der linken Koronararterie zu ligieren. Dennoch liegt die Größe der „Area at risk“ als Anteil des linken Ventrikels mit etwa 30-35 % im durchschnittlichen Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte. Bei vergleichbarer Technik sind in Versuchen mit Kaninchen Werte von 30-40%<sup>158, 159</sup>, teilweise sogar von 50-55% beschrieben worden.<sup>78, 160</sup> Man beachte aber, dass es sich hierbei um ein anderes Versuchstier gehandelt hat.

#### **4.4.4 Blutflussmessung**

Im Gegensatz zu der oft rein visuell durchgeführten Kontrolle von Ischämie und Reperfusion<sup>137, 145, 159, 161</sup> fand in dieser Studie zusätzlich die planimetrische Auswertung nicht perfundierter Areale mittels in-vivo Injektion von Thioflavin-S Anwendung. Es existieren zwar auch andere Messverfahren, z.B. die Injektion von farb- oder radioaktiv gekoppelter Mikrosphären, die auch am Rattenmodell schon angewendet wurden, aber in dieser Versuchsreihe nicht zur Anwendung kamen. So ist der Nachteil der Mikrosphärentechnik in einer wiederholten Blutentnahme zu sehen, welche die Gefahr einer Hypovolämie und Anämie,

insbesondere im Rattenmodell, mit sich bringt, die streng vermieden werden sollte.<sup>162</sup>

Andere Methoden, wie z.B. die Kontrastechokardiographie, angewendet ebenfalls an Kleintieren<sup>163</sup>, oder die Messung per Single Photonen Emission-Computed Tomography (SPECT)<sup>164</sup>, standen nicht zur Verfügung.

#### **4.4.5 Vorzeitige Mortalität**

Insgesamt 12 Tiere konnten aufgrund vorzeitiger Mortalität nicht in die Versuchsauswertung aufgenommen werden. Ihre Nummern wurden mit einer fortlaufenden alphabetischen Kennung wiederverwendet. 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). Somit lag die vorzeitige Mortalität in diesem Versuch bei ~ 27%. Das verwendete Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion ist bei der Ratte ansonsten mit einer vorzeitigen Mortalität von etwa 30-50% assoziiert.<sup>157</sup>

Somit ergibt sich folgender Kritikpunkt: Ist die Mortalität in einer der Gruppen höher als in den anderen, so gehen kardiozirkulatorisch instabile Tiere dieser Gruppe nicht in die Auswertung mit ein.

Dies kann zu einer nachfolgenden Bevorzugung dieser Gruppe führen. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass gerade Tiere, die einen besonders großen Infarkt erlitten haben, nicht in die Auswertung einbezogen wurden, da sie vorzeitig verstarben.

Unserer Ansicht nach lässt sich dieses Problem nicht umgehen. Ohne die Möglichkeit der in-vivo Patentblau-Färbung ist eine Feststellung der „Area at risk“ nicht möglich. Ebenso würden unterschiedliche Ischämie- bzw. Reperusionszeiten sämtliche weiteren Vergleiche zwischen den Gruppen, z.B. bei DNS-ESB-Raten, unmöglich machen.

#### **4.4.6 Lidocain-Applikation**

In der Literatur ist mehrfach über die das Immunsystem beeinflussende Wirkung von Lokalanästhetika berichtet wurden.<sup>165-167</sup> Auch scheinen

diese Substanzen einen Einfluss auf Myokardinfarkt und Reperfusion zu besitzen. Jedoch sind die Angaben in der Literatur unterschiedlich. Während einige tierexperimentelle Versuche einen protektiven Effekt des Lidocains in Bezug auf Infarktgröße beschreiben<sup>168-169</sup>, konnten diese Ergebnisse in anderen Untersuchungen nicht bestätigt werden.<sup>170</sup> Da aufgrund der momentan vorliegenden Datenlage keine definitiven Aussagen gemacht werden können, haben wir uns eindeutig **für** eine Lidocain-Gabe vor der Tracheotomie entschieden.

Hierbei wurden intravenöse Injektionen vermieden und eine gewichtsadaptierte Injektion verwendet. Somit sollten eventuelle Lidocaineffekte in allen Gruppen vergleichbar sein.

#### **4.4.7 Auswertung**

In dieser Arbeit wurde das Auftreten von DNS-ESB untersucht. Hierbei muss angeführt werden, dass die DNS extrem empfindlich gegenüber diversen chemischen oder physikalischen Noxen reagiert. Somit müssen DNS untersuchende Verfahren streng standardisiert werden. Geringste Abweichungen können artifizielle Anstiege von DNS-ESB-Raten nach sich ziehen. Hierzu gehören:

- Quetschung des Gewebes
- Verzögerung des Gewebeeinfrierens
- Artifizielles Auf- oder Antauen des Gewebes
- Erschütterung
- Lichteinwirkung

Die Aufbereitung des Gewebes mittels Feinschnittkryotoms für die Nick-Translation beinhaltet stets die Gefahr der Gewebeerreißung. Was die Auswertung erschweren kann, bzw. unmöglich macht.

Bei der Auswertung der Nick-Translation muss beachtet werden, dass die Areale manuell mit der Computer-Maus umfahren wurden und auch die Aufteilung der Ventrikelwand in epi-, myo- und endokardiale Drittel subjektiv erfolgte, somit geringfügige Abweichungen nicht

ausgeschlossen werden können. Eine standardisierte, verblindete Auswertung durch zwei Personen verhinderte hierbei eine systematische Bevorzugung oder Benachteiligung einzelner Gruppen. Bei der Untersuchungen der DNS-ESB können Rückschlüsse für das gesamte Herz nicht ohne Vorbehalt gezogen werden, da Ergebnisse nur in einer mutmaßlich repräsentativen Ebene des Herzens erhoben worden sind.

#### **4.5 Ausblick**

Die von uns zu ersten Mal eingesetzte prophylaktische Gabe einer PFC-Emulsion konnte keine einheitlichen Ergebnisse liefern.

So konnte zwar die prophylaktische Gabe eine signifikante Reduktion der „No-reflow“-Areale bewirken, im Gegenzug die therapeutische Applikation aber nur einen Trend aufweisen. Dies stimmt in Bezug auf die Therapiegruppe nicht unbedingt mit anderen Arbeiten überein.<sup>51, 54-</sup>

<sup>57, 178</sup> Jedoch sind die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse keineswegs einheitlich. So konnten Hale et al. keinen Effekt von PFC-Lösungen nachweisen.<sup>158</sup> Cabrales hingegen zeigte in einem Ischämie-Reperfusion-Modell am Hamster eine Wirkung von therapeutisch eingesetztem PFC, wohingegen eine Prophylaxe keinen Benefit aufwies, ja sogar durch eine gesteigerte Leukozytenaktivität einen größeren Kapillarschaden bewirkte.<sup>178</sup>

Bei der Untersuchung aufgetretener DNS-ESB konnte festgestellt werden, dass die für PFC-Emulsionen hohe  $FIO_2$  von 0,5 – 1,0 an sich wohl ein schädigendes Potenzial für das Gewebe aufweist. So zeigten beide Verumgruppen um den Zeitpunkt der Medikamentenapplikation nicht nur signifikant höher  $paO_2$ -Werte, sondern wiesen auch die größte Schwärzung in der densitometrischen Auswertung auf. Doch auch die NaCl-Gruppe mit einer ebenfalls erhöhten  $FIO_2$  von 1,0 zeigte im Vergleich zum rechten Ventrikel der Gruppe G4 signifikante Unterschiede. PFC-Emulsionen ist es also möglich „No-reflow“-Areale zu verringern und gleichzeitig offensichtlich höhere Gewebesauerstoffpartialdrücke aufzubauen. Hieraus resultiert

wahrscheinlich auch eine höhere Quote an freien Sauerstoffradikalen. Interessant wäre es nun, Versuche mit einer Kombination aus PFC-Medikamentation in prophylaktischer Anwendung und „Radikalfängern“ durchzuführen. Um den klinischen Bezug zu vergrößern könnte das Modell auch dem Effekt des Preconditioning unterzogen werden, da dies einem chronischen Herzkranken eher entsprechen würde. Unter diesen rezidivierenden, chronischen Ischämien scheint eine Hochregulation von sog. „heat shock Proteinen“ (HSP) stattzufinden. Auch dies wäre ein interessanter Ansatz, da HSP einen DNS protektiven Einfluss zu haben scheinen. Als vielversprechend sollte die prophylaktische PFC-Gabe mit ihrem Neutrophilen modulierenden Effekt betrachtet werden. Kombinationstherapien scheinen den größten Effekt aufzuweisen und in diese Richtung sollten zukünftige Arbeiten unseres Erachtens weisen. Einen ebenfalls sehr interessanten Ansatz zeigte Matsumoto in seiner Studie indem er vorschlug eine O<sub>2</sub>-gesättigte PFC-Lösung als Transportmedium für Transplantate zu verwenden.<sup>176</sup>

## **5 Zusammenfassung**

### **Hintergrund**

Wie in mehreren Studien belegt werden konnte, erleiden koronare Risikopatienten in ca. 5% perioperativ eine myokardiale Ischämie, die sich als akutes Koronarsyndrom äußert und mit einer hohen Letalität verbunden ist. Es konnte gezeigt werden, dass es besonders vulnerable Zeitpunkte für diese myokardialen Ischämischen Ereignisse gibt. Die Gabe eines zellfreien Sauerstoffträgers, wie z.B. einer O<sub>2</sub>-gesättigten PFC-Emulsion, könnte die myokardiale Ischämie verhindern oder deren Ausmaße verringern.

### **Fragestellung**

Es sollte in dieser Studie überprüft werden, ob die prophylaktische oder therapeutische Gabe einer PFC-Emulsion (Oxygent™) in der Lage ist, in einem Ischämie-, Reperusionsmodell am Kleintier, „No-reflow“-Areale in ihrer Größe und die Entstehung von DNS-Einzelstrangbrüchen in ihrer Häufigkeit günstig zu beeinflussen.

### **Methodik**

In der vorliegenden Studie wurde an 32 Ratten, welche den Versuchsaufbau vollständig durchlaufen hatten, die Fragestellung überprüft. Hierzu wurde bei allen 32 Tieren in Allgemeinanästhesie eine Tracheotomie durchgeführt, ein ZVK, sowie ein arterieller Katheter gelegt. Außerdem wurde nach einer linksseitigen Thorakotomie eine Ligatur an der linken Koronarie (LAD) angelegt. Anschließend folgte die Gruppenzuteilung. Diese sah wie folgt aus:

- G1 Prophylaxe-Gruppe
- G2 Therapie-Gruppe
- G3 NaCl-Kontrollgruppe
- G4 O<sub>2</sub>-Kontrollgruppe

Die Gruppen unterschieden sich dahingehend, dass der Gruppe G1 25 min vor Ligaturverschluss 6 g kg<sup>-1</sup> Oxygent™, bei einer FIO<sub>2</sub> von 1,0, appliziert wurden. Die Gruppe G2 erhielt die gleiche Dosis wie G1, jedoch erst 10 min nach Anlage der Ligatur, aber ebenfalls mit einer FIO<sub>2</sub> von 1,0. Gruppe G3 erhielt bei einer FIO<sub>2</sub> 1,0 eine Applikation von NaCl. Die Gruppe G4 entsprach der Gruppe G3, jedoch bei einer reduzierten FIO<sub>2</sub> von 0,3. Nach einer Ischämiezeit von 25 min wurde in

allen Gruppen die Ligatur wieder geöffnet und eine 120 minütige Reperfusion schloss sich an. Die Injektion von Thioflavin-S, anschließendem Ligaturverschluss und Gabe von Patentblau beendeten den Versuch. Es folgte die semiquantitative Auswertung der „Area at risk“, der „No-reflow“-Areale und der DNS-ESB mittels in situ Nick-Translation. Alle Auswertungen wurden verblindet vorgenommen.

### **Ergebnisse**

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich Demographie und Basisparametern. Bei einer vergleichbaren „Area at risk“ zwischen den Gruppen, zeigte als einzige Gruppe die Prophylaxe-Gruppe einen signifikant niedrigere Größe des „No-reflow“-Areal im Vergleich zur NaCl-Gruppe G3. Die Therapie-Gruppe G2 konnte nur einen Trend zu einem kleineren No-reflow“-Areal darstellen. In der Nick-Translation konnte gezeigt werden, dass alle mit einer  $\text{FIO}_2$  von 1,0 beatmeten Tiere einen signifikant höhere Rate an DNS-ESB im Vergleich zum rechten Ventrikel der Gruppe G4 aufwiesen.

### **Schlussfolgerungen**

In beiden mit PFC behandelten Gruppen konnten eine Reduktion der „No-reflow“-Areale nachgewiesen werden, wobei nur die Gruppe G1 eine Signifikanz erzielte. Möglicherweise scheinen hierbei protektive Effekte über die Modulation von neutrophilen Granulozyten eine Rolle zu spielen. Im Gegenzug konnte die Untersuchung von DNS-ESB-Raten zeigen, dass ein hoher  $\text{O}_2$ -Gewebepartialdruck, welcher bei der Anwendung von PFC mit einer  $\text{FIO}_2$  von 0,5 – 1,0, zwangsläufig entsteht, eine negative Auswirkung auf die Entstehung von DNS-Einzelstrangbrüchen hat. Zu diskutieren wäre z.B. das vermehrte Entstehen von freien Sauerstoffradikalen und der daraus resultierenden zunehmenden Endothelschädigung mit all ihren Folgen. So muss abschließend festgestellt werden, dass die beobachtete Reduktion von „No-reflow“-Arealen unter PFC-Gabe in Relation zu einem eventuellen erzeugten Schaden gesehen werden muss, da die nötigen  $\text{FIO}_2$ -Werte mit einem erhöhten Gewebepartialdruck einher gehen. Welche Auswirkungen jedoch eine erhöhte Rate an Einzelstrangbrüchen für das Gewebe aufweist, ist abschließend nicht festzustellen, da keine Aussage über den zellulären Endpunkt getroffen werden kann. Zu

diesem Zeitpunkt kann daher nicht festgestellt werden, ob die DNS-ESB-Rate die Reparaturmechanismen der Zelle übersteigt, der Weg in die Apoptose führt, oder das Gewebe nekrotisch wird, mit daraus resultierender Entzündungsreaktion und vielleicht zusätzlichem Gewebeschaden. Ob unter bestimmten Umständen eine „restitutio ad integrum“ möglich ist, müssen zukünftige Studien zeigen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Clark, L. C. and Gollan, F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* 152, 1966, 1755-1756
2. Sloviter HA, Kamimoto T. Erythrocyte substitute for perfusion of brain. *Nature* 216 1967, 458-460
3. Böttiger, B. W. and E. Martin. [Prevention of perioperative myocardial ischemia-an update]. *Anaesthesist*. 2000;49:174-86.
4. Christopherson, R., C. Beattie, 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.
5. Landesberg, G., M. H. Luria, et al. Importance of long-duration postoperative ST-segment depression in cardiac morbidity after vascular surgery. *Lancet*. 1993;341:715-9.
6. Mangano, D. T., W. S. Browner, 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;323:1781-8.
7. Menasche P, Fauchet M, Lavergne A, Commin P, Masquet C, Lorente P, Birkui P, Geyer RP, Piwnica A. Reduction of myocardial infarct size by a fluorocarbon-oxygenated reperfusate. *Am J Cardiol* 1984;53:608-13.
8. Menasche P, Escorsin M, Birkui P, Lavergne A, Fauchet M, Commin P, Lorente P, Geyer RP, Piwnica A. Limitations of fluorocarbons in reducing myocardial infarct size. *Am J Cardiol* 1985;55:830-4.
9. Forman MB, Bingham S, Kopelman HA, Wehr C, Sandler MP, Kolodgie F, Vaughn WK, Friesinger GC, Virmani R. Reduction of infarct size with intracoronary perfluorochemical in a canine preparation of reperfusion. *Circulation* 1985;71:1060-8.
10. Forman MB, Puett DW, Wilson BH, Vaughn WK, Friesinger GC, Virmani R. 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.
11. Schaer GL, Karas SP, Santoian EC, Gold C, Visner MS, Virmani R. Reduction in reperfusion injury by blood-free reperfusion after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1385-93.
12. Forman MB, Pitarys CJ, 2nd, Vildibill HD, Lambert TL, Ingram DA, Virmani R, Murray JJ. 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.

13. Hale SL, Hammerman H, Kloner RA. Effect of two perfluorocarbon emulsions on reperfusion injury after coronary artery occlusion in rabbits. *Basic Res Cardiol* 1995;90:404-9.
14. Marnett, L. J. P., J.P. Endogenous DNS damage and mutation. *Trends-Genet.* 2001;17/4:214-221.
15. Eastman, A. B., M. A. The origin of DNS breaks: a consequence of DNS damage, DNS repair, or apoptosis? *Cancer Invest.* 1992;10/3:229-240.
16. Chen, J., K. Jin, et al. Early detection of DNS strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNS damage in apoptosis and neuronal cell death. *J Neurochem.* 1997;69:232-45.
17. Jin, K. C., C. F.; Nagayama, T.; Chen, M.; Sinclair, J.; Graham, S.H.; Simon,R.P. In situ detection of neuronal DNS strand breaks using the Klenow fragment of DNS polymerase I reveals different mechanisms of neuronal death after global cerebral ischemia. *J Neurochem.* 1999;72:1204-1214.
18. Marnett, L. J. P., J.P. Endogenous DNS damage and mutation. *Trends-Genet.* 2001;17/4:214-221.
19. Lauerma, K., M. Saeed, et al. Verapamil reduces the size of reperfused ischemically injured myocardium in hypertrophied rat hearts as assessed by magnetic resonance imaging. *Am Heart J.* 1996;131:14-23.
20. Norbury, C. J., Hickson, I.D. Celular responses to DNS damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367-401.
21. Kuzminov, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:8241-8246.
22. Krause T, Einhaus M et al. A novel technique for the detection of DNS single-strand breaks in human white blood cells and its combination with the unscheduled DNS synthesis assay. *Int Arch Occup Environ Health.* 1993;65:77-82.
23. Tounekti, O. K., A.; Foray, N.; Orłowski, S.; Mir, L.M. The ratio of single-to double-strand DNS breaks and their absolute values determine cell death pathway. *Br J Cancer.* 2001;84/9:1272-1279.
24. Saraste, A. and K. Pulkki. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45:528-37.
25. Granville, D. J., C. M. Carthy, et al. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest.* 1998;78:893-913.
26. Renvoize, C. B., A.; Pallardy, M.; Breard, J. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol.* 1998;12:111-120.
27. Van Furth, R. V. Z., T. L. Immunocytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells. *J Immunol Methods.* 1988;108:45-51.
28. Wyllie, A. H. Cell death. In *Apoptosis and Cell proliferation.* Boehringer Mannheim. 1998.

29. Hockenbery, D. Defining apoptosis. *Am J Pathol.* 1995;146:16-19.
30. Holtz, J. H., H. Apoptosis- what is it? Significance in coronary heart disease and myocardial infarct. *Herz.* 1999;24:196-210.
31. Pankuweit, S. J., M.; Crombach, M.; Portig, I.; Alter, P.; Kruse, T.; Hufnagel, G.; Maisch, B. Cell death in inflammatory heart muscle diseases - apoptosis or necrosis ? *Herz.* 1999;24:211-218.
32. Kent KM, Cleman MW, Cowley MJ et al., Reduction of myocardial ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty with oxygenated fluosol. 1990, *Am J Cardiol* 66, 279-284
33. Keipert PE, Faithfull NS, Bradley JD et al., Enhanced oxygen delivery by perflubron emulsion during acute hemodilution. 1994, *Artif Cells Blood Sustit Immobil Biotechnol* 22, 1161-1167
34. Sakas DE, Crowell RM, Zervas NT, Effects of lecithin-emulsified perfluorochemical compounds in ischemic brain injury. 1994 *Artif Cells Blood Sustit Immobil Biotechnol* 22, 83-89
35. Waxman K, Cheung CK, Mason KR, Hypotensive reaction after infusion of a perfluorochemical emulsion. 1984 *Crit Care Med* 12, 609-610
36. Hunter RL, Papadea C, Gallagher CJ, Finlayson DC, Check IJ, Increased whole blood viscosity during coronary artery bypass surgery. Studies to evaluate the effects of soluble fibrin and poloxamer 188. 1990 *Thromb Haemost* 63, 6-12
37. Carr ME Jr., Powers PL, Jones MR, Effects of poloxamer 188 on the assembly, structure and dissolution of fibrin clots. 1991 *Thromb Haemost* 66, 565-568
38. Ingram DA, Forman MB, Murray JJ, Activation of complement by Fluosol attributable to the pluronic detergent micelle structure. 1993 *J Cardiovasc Pharmac* 22, 456-461
39. Lane TA, Krukonis V Reduction in the toxicity of a component of artificial blood substitute by supercritical fluid fractionation. 1988 *Transfusion* 28, 375-378
40. Smith DJ, Lane TA Effect of a high concentration perfluorocarbon emulsion on platelet function. 1992 *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 20, 1045-1049
41. Smith DJ, Lane TA Effect of a high concentration perfluorocarbon emulsion on platelet function. 1993 *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 21, 173-181
42. Williams JH Jr., Chen M, Drew J, Panigan E, Hosseini S, Modulation of rat granulocyte traffic by a surface active agent in vitro and bleomycin injury. 1988 *Proc Soc Exp Biol Med* 188, 461-470
43. Forman MB, Ingram DA, Murray JJ Role of perfluorochemical emulsions in the treatment in myocardial reperfusion injury. 1992 *Am Heart J* 124, 1347-1357

44. Pelura TJ, Johnson CS, Tarara TE Weers JG, Stabilization of perflubron emulsions with egg yolk phospholipid. 1992 *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 20, 845-848
45. Postel M, Riess JG, Weers JG, Fluorocarbon emulsions – the stability issue. 1994 *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22, 991-1005
46. Spahn DR, Brempt R van, Theilmeier G et al., Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. European Perflubron Study Group. 1999 *Anesthesiology* 91, 1195-1208
47. Ries JG, Overview of progress in the fluorocarbon approach to in vivo oxygen delivery. 1992 *Biomater Artif Cells Immobil Biotechnol* 20, 183-202
48. Leese PT, Noveck RJ, Shorr JS, Woods CM, Flaim KE, Keipert PE. Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. I. Effects on coagulation function in healthy volunteers. *Anesth Analg*. 2000 Oct;91(4):804-11.
49. Flaim FS, Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. 1994 *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22, 1043-1054
50. Keipert PE; Faithfull NS, Roth DJ et al., Supporting tissue oxygenation during acute surgical bleeding using a perfluorochemical-based oxygen carrier. 1996 *Adv Exp Med Biol* 388, 603-609
51. Kolodgie, F. D., A. Farb, et al. Hyperoxic reperfusion is required to reduce infarct size after intravenous therapy with perfluorochemical (Fluosol-DA 20%) or its detergent component (poloxamer 188) in a poorly collateralized animal model. Absence of a role of polymorphonuclear leukocytes. 1994 *J Am Coll Cardiol* 24, 1098-108.
52. Hort, W. [Pathology of acute myocardial infarction]. 2001 *Internist (Berl)* 42:631-40.
53. Bajaj, A. K., M. A. Cobb, et al. Limitation of myocardial reperfusion injury by intravenous perfluorochemicals. Role of neutrophil activation. 1989 *Circulation* 79 645-56.
54. Forman, M. B., D. A. Ingram, et al. Role of perfluorochemical emulsions in the treatment of myocardial reperfusion injury. 1992 *Am Heart J* 124, 1347-57.
55. Forman, M. B., C. J. Pitarys, 2nd, 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.
56. Forman, M. B., D. W. Puett, et al. Preservation of endothelial cell structure and function by intracoronary perfluorochemical in a canine preparation of reperfusion. *Circulation*. 1987;76:469-79.
57. Forman, M. B., R. Virmani, et al. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation*. 1990;81:IV69-78.

58. Fleisher, L. A., A. H. Nelson, et al. Postoperative myocardial ischemia: etiology of cardiac morbidity or manifestation of underlying disease? *J Clin Anesth.* 1995;7:97-102.
59. Landesberg, G., M. H. Luria, et al. Importance of long-duration postoperative ST-segment depression in cardiac morbidity after vascular surgery. *Lancet.* 1993;341:715-9.
60. Holman WL, Spruell RD, Ferguson ER, et al., Tissue oxygenation with graded dissolved oxygen delivery during cardiopulmonary bypass. 1995 *J Thorac Cardiovasc Surg* 110, 774-785
61. Forman MB, Pitarys CJ, Vildibill HD, et al., Pharmacologic perturbation of neutrophils by fluosol results in a sustained reduction in infarct size in the canine model of reperfusion. 1992 *J Am Coll Cardiol* 19, 205-216
62. Goodin TH, Grossbard EB, Kaufman RJ et al., A perfluorochemical emulsion for prehospital resuscitation of experimental hemorrhagic shock: a prospective, randomized, controlled study. 1994 *Crit Care Med* 22, 680-689
63. Cernaianu AC, Spence RK, Vassilidze TV et al., Improvement in circulation and oxygenation status by perflubron emulsion (oxygent HT) in a canine model of surgical hemodilution. 1994 *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22, 965-977
64. Mitsuno T, Ohyanagi H, Naito R, Clinical studies of a perfluorochemical whole blood substitute (Fluosol – DA) Summary of 186 cases. 1982, *Ann Surg* 196, 60-69
65. Gould SA, Rosen AL, Sehgal LR et al., Fluosol-DA as a red-cell substitute in acute anemia. 1986 *N Engl J Med* 314, 1653-1656
66. Spence RK, McCoy S, Costable J et al., Fluosol DA-20 in the treatment of severe anemia: randomized, controlled study of 46 patients. 1990 *Crit Care Med* 18, 1227-1230
67. Wahr JA, Trouwborst A, Spence RK et al., A pilot study of the effects of a perflubron emulsion, AF 0104, on mixed venous oxygen tension in anesthetized surgical patients. 1996 *Anesth Analg* 82, 103-107
68. National Research Council IoLAR, Commission on Life Sciences. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Washington, D.C.: National Academy Press, 1996.
69. Gulati, A., A. C. Sharma, et al. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit Care Med.* 1996;24:137-47.
70. Waynforth, H. and P. Flecknell. *Experimental and surgical technique in the rat.* second Edition ed. London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto: Academic Press,; 1992.
71. Kølsten-Peterson J A, Immune effect of hypertonic saline: fact or fiction? 2004, *Acta Anaesthesiol Scand* 48, 667-678

72. Giesla DJ, Moore EE, Zallen G, Biffl WL, Silliman CC, Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything. 2000, *J Trauma* 48, 388-395
73. Pascual JL, Ferri LE, Seely AJ et al., Hypertonic saline resuscitation of hemorrhagic shock diminishes neutrophil rolling and adherence to endothelium and reduces in vivo vascular leakage. 2002, *Ann Surg* 236, 634-642
74. Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD, Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. 1998, *J Immunol* 161, 6288-6296
75. Rosengren S, Henson PM, Worthen GS, Migration associated volume changes in neutrophils facilitate the migratory process in vitro. 1994, *Am J Physiol* 267, C1623-C1632
76. Selye, H., E. Bajusz, et al. Simple techniques for surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*. 1960;11:398-407.
77. Hort, W. and S. da Canalis. Untersuchung an Rattenherzen nach temporärer Unterbindung der linken Kranzarterie. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1965;339:61-71.
78. Okamura, T., M. Toshiro, et al. Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovascular Research*. 2000;45:642-650.
79. Ito, W. D., S. Schaarschmidt, et al. Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2169-75.
80. Walker, M. J., M. J. Curtis, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res*. 1988;22:447-55.
81. Fishbein, M. C., S. Meerbaum, 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.
82. Takashi, E. and M. Ashraf. 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.
83. Reffelmann T, Kloner RA, The "No-reflow" phenomenon: basic science and critical correlates. *Heart* 2002, 87, 162-168
84. Rezkalla SH, Kloner RA, No-reflow Phenomenon. *Circulation* 2002, 105, 656-662
85. Krause, T., J. Scholz, et al. DNA single strand breaks as a sensitive marker for neuronal injury following a transient cerebral hypoxemia. *Anesthesiology*. 1998;89:A765.

86. Nose, K. and H. Okamoto. Detection of carcinogen-induced DNS breaks by nick translation in permeable cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;111:383-9.
87. Burmeister MA, Rempf C, Standl TG, et al..Effects of prophylactic or therapeutic application of bovine haemoglobin HBOC-200 on ischaemia-reperfusion injury following acute coronary ligation in rats.2005, *Br J Anaesth.*Dec;95(6):737-45.
88. Majno G, Ames III A, Chiang J, et al., No reflow after cerebral ischemia. 1967, *Lancet* 2, 569-570
89. Ames III A, Wright RL, Kowada M, et al., Cerebral ischemia II: the No-reflowphenomenon. 1968 *Am J Pathol* 52, 437-447
90. Cerisoli M, Ruggeri F, Amelio GF, et al., Experimental cerebral “No-reflow phenomenon”: response to intracarotid injection of dexamethasone, furosemide and escina. 1981, *J Neurosurg Sci* 25, 7-12
91. Ito U, Ohno K, Yamaguschi T, et al., Transient appearance of „No-reflow“ phenomenon in Mongolian gerbils. 1980, *Stroke* 11, 517-521
92. Asano T, Sano K, Pathogenetic role of No-reflow phenomenon in experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. 1977 *J Neurosurg* 46, 454-466
93. Kloner RA, Ganopte CE, Jennings RB, The “No-reflow” phenomenon after temporary coronary occlusion in dogs. 1974, *J Clin Invest* 54, 1496-1508
94. Kloner RA, Does reperfusion injury exist in humans? 1993, *Am Coll Cardiol* 21, 537-545
95. Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, et al., Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. 1989, *Circulation* 80, 1846-1861
96. Engler RL, Schmidt-Schonbein GW, Pavelec RS, Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. 1983, *Am J Pathol* 111, 98-111
97. Byrne JG, Appleyard RF, Lee CC et al., Controlled reperfusion of the regionally ischemic myocardium with leukocyte-depleted blood reduces stunning, the No-reflow phenomenon, and infarct size. 1992, *J Thorac Cardiovasc Surg* 103, 66-72
98. Kloner RA, No reflow revisited. 1989 *J Am Coll Cardiol* 14, 1814-1815
99. Kloner RA, Alker K, Campbell C, et al., Does tissue-type plasminogen activator have direct beneficial effects on the myocardium independent of the ability to lyse intracoronary thrombi. 1989 *Circulation* 79, 1125-1136
100. Punch J, Rees R, Cashmer B, et al., Xanthine oxidase: its role in the No-reflow phenomenon. 1992, *Surgery* 111, 169-176

101. Koo A, Komatsu H, Tao G, et al., Contribution of No-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia-reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. 1991, *Hepatology* 15, 507-514
102. Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, et al., Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. 1986, *Am J Physiol* 251, H314-H322
103. Przyklenk K, Kloner RA, „Reperfusion injury“ by oxygen-derived free radicals? Effect of superoxide dismutase plus catalase, given at the time of reperfusion, on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature, and regional myocardial blood flow. 1989, *Circ Res* 64, 89-96
104. Richard V, Kaeffler N, Tron C, et al., Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. 1994, *Circulation* 89, 1254-1261
105. Summers WK, Jamison RL, The no reflow phenomenon in renal ischemia. 1971, *Lab Invest* 25, 635-643
106. Manciet LH, Poole DC, McDonagh PF, et al., Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for No-reflow phenomenon. 1994, *Am J Physiol* 266, H1541-H1550
107. Gavin JB, Thomson RW, Humphrey SM, et al., Changes in vascular morphology associated with the No-reflow phenomenon in ischaemic myocardium. 1983, *Virchows Arch* 399, 325-332
108. Topol EJ, Yadav JS, Recognition of importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. 2000, *Circulation* 101, 570-580
109. Seydoux C, Goy J-J, Davies G, Platelet and neutrophil imaging techniques in the investigation of the response to thrombolytic therapy and the No-reflow phenomenon. 1993, *Am Heart J* 125, 1142-1147
110. Michaels AD, Gibson CM, Barron HV, Microvascular dysfunction in acute myocardial infarction: focus on the roles of platelets and inflammatory mediators in the No-reflow phenomenon. 2000, *Am J Cardiol* 85, 50b-60b
111. Tahepold P, Elfstrom P, Eha I, Kals J, Taal G, Talonpoika A, Valen G, Vaage J, Starkopf J, Exposure of rats to hyperoxia enhances relaxation of isolated aortic rings and reduces infarct size of isolated hearts. 2002, *Acta Physiol Scand* 175, 271-277
112. Rice HE, Virmani R, Hart CL, Kolodgie FD, Farb A, Dose-dependent reduction of myocardial infarct size with the perfluorochemical Fluosol-DA. 1990, *Am Heart J* 120, 1039-1046
113. Janco RL, Virmani R, Morris PJ, Gunter K, Perfluorochemical blood substitutes differentially alter human monocyte procoagulant generation and oxidative metabolism. 1985, *Transfusion* 25, 578-582
114. Carlson RE, Schott RJ, Buda AJ, Neutrophil depletion fails to modify myocardial no reflow and functional recovery after coronary reperfusion. 1989, *J Am Cardiol* 14, 1803-1813

115. Xie YW and Wolin MS Role of nitric oxide and its interaction with superoxide in the suppression of cardiac muscle mitochondrial respiration. Involvement in response to hypoxia/reoxygenation. 1996, *Circulation* 94: 2580-2586
116. Pan N and Hori H The interaction of acteoside with mitochondrial lipid peroxidation as an ischemia/reperfusion injury model. 1994, *Adv Exp Med Biol* 361: 319-325
117. Butterfield DA, Howard BJ, Yatin S, Allen KL and Carney JM, Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. 1997, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 674-678
118. Iseki, S. DNS strand breaks in rat tissues as detected by in situ nick translation. *Exp Cell Res.* 1986;167:311-26
119. Saran M, Bors W. Direct and indirect measurements of oxygen radicals. *Klin Wochenschr* 1991;69:957-64.
120. Nagayama T, Lan J, Henshall DC, Chen D, O'Horo C, Simon RP, Chen J. Induction of oxidative DNA damage in the peri-infarct region after permanent focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2000;75:1716-28.
121. Zingarelli B, Cuzzocrea S, Zsengeller Z, Salzman AL and Szabo C (1997) Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase. *Cardiovasc Res* 36: 205-215
122. Szabados E, Fisher MG, Toth K, Csete B, Nemeti B, Trombitas K, Habon T, Endrei D and Sumegi B (1999a) Role of reactive oxygen species and poly-ADP-ribose polymerase in the development of AZT-induced cardiomyopathy in rat. *Free Radic Biol Med* 26: 309-317
123. Lindahl T, Satoh MS, Poirier GG and Klungland A (1995) Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. *Trends Biochem Sci* 20: 405-411
124. Jacobson MK and Jacobson EL (1999) Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends Biochem Sci* 11: 415-417
125. Radons J, Heller B, Burkle A, Hartmann B, Rodriguez ML, Kroncke KD, Burkart V and Kolb H (1994) Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD<sup>+</sup> depletion. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 1270-1270
126. Gilad E, Zingarelli B, Salzman AL and Szabo C (1997) Protection by inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase against oxidant injury in cardiac myoblasts In vitro. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2585-2597
127. Grupp IL, Jackson TM, Hake P, Grupp G and Szabo C (1999) Protection against hypoxia-reoxygenation in the absence of poly (ADP-ribose) synthetase in isolated working hearts. *J Mol Cell Cardiol* 31: 297-303
128. Lenaz G (1998) Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1366: 53-67

129. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM and Venkatachalam MA (1998) Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene* 17: 3341-3349
130. Takeyama N, Matsuo N and Tanaka T (1993) Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca<sup>2+</sup>-dependent inner-membrane permeability transition. *Biochem J* 294: 719-725
131. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, et al. (1998) The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1366: 177-196
132. Said SI, Berisha HI and Pakbaz H (1996) Excitotoxicity in the lung: N-methyl-D-aspartate-induced, nitric oxide-dependent, pulmonary edema is attenuated vasoactive intestinal peptide and by inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4688-4692
133. Virag L, Salzman AL and Szabo C (1998) Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J Immunol* 161: 3753-3759
134. Szabados E, Literati-Nagy P, Farkas B and Sumegi B (2000) BGP-15, a nicotinic amidoxime derivate, protects heart from ischemia-reperfusion injury through modulation of poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Biochem Pharmacol* 59: 937-945
135. Kaneda T, Ku K, Inoue T, Onoe M, Oku H. Postschismic reperfusion injury can be attenuated by oxygen tension control. *Jpn Circ J.* 2001 Mar;65(3):213-8.
136. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:367-401.
137. Takashi E, Ashraf M. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. 2000, *J Mol Cell Cardiol* 32, 209-224
138. Okumara T, Miura T, Takemura G, Fujiwara H, Iwamoto H, Kawamura S, Kimura M, Ikeda Y, Iwatate M, Matsuzaki M, Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. 2000, *Cardiovasc Res* 45, 642-650
139. Ji LL, Fu RG, Waldrop TG, Liu KJ, Swartz HM, Myocardial response to regional ischemiy and reperfusion in vivo rat heart. 1993 *Can J Physiol Pharmacol* 71, 811-817
140. Schwarz ER, Somoano Y, Hale SL, Kloner RA, What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat? 2000, *J Thromb Thrombolysis* 10, 181-187
141. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ, Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. 1985, *Am J Pathol.* 121, 522-530

142. Reffelmann T, Hale SL, Li G, Kloner RA. Relationship between no reflow and infarct size as influenced by the duration of ischemia and reperfusion. 2002, *AM J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H766-772
143. Farb A, Kolodgie FD, Jenkins M, Virmani R. Myocardial infarct extension during reperfusion after coronary artery occlusion: pathologic evidence. 1993, *J Am Coll Cardiol* 21, 1245-1253
144. Sterling DL, Thornton JD, Swafford A, Gottlieb SF, Bishop SP, Stanley AW, Downey JM. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo. 1993 *Circulation* 88, 1931-1936
145. Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG Jr., Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. 1993 *Circulation* 87, 963-971
146. Xuan YT, Tang XL, Qiu Y, Banerjee S, Takano H, Han H, Bolli R, Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. 2000, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H2360-H2371
147. Krenz M, Cohen MV, Downey JM, The protective and anti-protective effects of ethanol in a myocardial infarct model. 2002, *Ann N Y Acad Sci* 957, 103-114
148. Hale SL, Alker KJ, Kloner RA, Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. 1988, *Circulation* 78, 428-434
149. Virmani R, Kolodgie FD, Osmialowski A, Zimmerman P, Mergner W, Forman MB, Myocardial protection by perfluorochemical infusion during transient ischemia produced by balloon coronary occlusion. 1988, *Am Heart J* 116, 421-431
150. Rolf N, Meissner A, Van Aken H, Weber TP, Hammel D, Mollhorf T, The effects of thoracic epidural anesthesia on functional recovery from myocardial stunning in propofol-anesthetized dogs. 1997, *Anesth Analg* 84, 723-729
151. Hort W, Pathologie des akuten Herzinfarktes. 2001, *Internist* 42, 631-640
152. Vivaldi, M. T., Kloner R. A., et al. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol*. 1985;121:522-30
153. Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C, Murphy E, Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. 2001, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H499-508
154. Lauerma K, Saeed M, Wendland MF, Derugin N, Yu KK, Higgins CB, Verapamil reduces the size of reperfused ischemically injured myocardium in hypertrophied rat hearts as assessed by magnetic resonance imaging. 1996, *Am Heart J* 131, 14-23

155. Richard V, Tron C, Blanc T, Thuillez C, Infarct size-limiting properties of Ro 40-5967, a novel nondihydropyridine calcium channel, in anesthetized rats: comparison with verapamil. 1995, *J Cardiovasc Pharmacol* 25, 552-557
156. Burmeister M, Rempf C, Rehberg S, Standl T, Schulte am Esch J, Effects of a prophylactic or therapeutic application of cell-free hemoglobin solution HBOC-200 on infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in rats. 2003, *Anesthesiology* A-751
157. Ye, J., L. Yang, 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
158. Hale, S. L., H. Hammerman, et al. Effect of two perfluorocarbon emulsions on reperfusion injury after coronary artery occlusion in rabbits. *Basic Res Cardiol.* 1995;90:404-9
159. Rice, H. E., R. Virmani, et al. Dose-dependent reduction of myocardial infarct size with the perfluorochemical Fluosol-DA. *Am Heart J.* 1990;120:1039-46
160. Fryer, R. M., A. K. Hsu, et al. Opioid-induced cardioprotection against myocardial infarction and arrhythmias: mitochondrial versus sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294:451-7
161. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M, Monophosphoryl lipid A provides biphasic cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rat hearts. 1999 *Br J Pharmacol* 128, 412-418
162. Koerner JE, Terjung RL, Effects of physical training on coronary collateral circulation of the rat. 1982 *J Appl Physiol* 52, 376-387
163. Oshita A, Ohmori K, Yu Y, Kondo I, Takeuchi H, Takagi Y, Wada Y, Yukiiri K, Mizushige K, Kohno M, Myocardial blood flow measurements in rats with simple pulsing contrast echocardiography. 2002, *Ultrasound Med Biol* 28, 459-466
164. Rumsey WL, Kuczynski B, Patel B, Bauer A, Narra RK, Eaton SM, Nunn AD, Strauss HW, SPECT imaging of ischemic myocardium using a technetium-99m-nitroimidazole ligand. 1995, *J Nucl Med* 36, 1445-1450
165. Fischer LG, Bremer M, Coleman EJ, et al., Local anesthetics attenuate lysophosphatidic acid-induced priming in human neutrophils. 2001, *Anesth Analg* 92, 1041-1047
166. Hollmann MW, Durieux ME, Local anesthetics: effects on inflammation, wound healing and coagulation. 2000, *Pogr Anesthesiol* 14, 291-304
167. Hollmann MW, Gross A, Jelacin N, Durieux ME, Local anesthetics effects on priming and activation of human neutrophils. 2001, *Anesthesiology* 95, 113-122

168. Lee R, Nitta T, Schmidt RA, Schuessler RB, Harris KM, Gay WAJ, Retrograde infusion of lidocaine or L-arginine before reperfusion reduces myocardial infarct size. 1998, *Ann Thorac Surg* 65, 1353-1359
169. Lesnefsky EJ, Benthuyssen KM van, McMurtry IF, Shikes RH, Johnston RB, Horwitz LD, Lidocaine reduces canine infarct size and decrease release of a lipid peroxidation product. 1989, *J Cardiovasc Pharmacol* 13, 895-901
170. Lorgeril M de, Rousseau G, Basmadjian A, Latour JG, Lignocaine in experimental myocardial infarction: failure to prevent neutrophil accumulation and ventricular fibrillation and to reduce infarct size. 1988, *Cardiovasc Res* 22, 439-446
171. Amberson WR, Jennings JJ, Rhode CR Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *Appl 1949 Physiol* 1: 469-89
172. Standl TG. M.D.; Winter-Lutzke R M.D.; et al. Prophylactic Application of Bovine Hemoglobin-Based Oxygen Carrier HBOC-201 Reduced DNA Single Strand Breaks in the Canine Post-Stenotic Myocardium. 2002 ASA Annual Meeting Abstracts. *Experimental Circulation*. 97(3A):A609, October.
173. Krause Thorsten M.D.; Winter Ralph M.D.; et al.. Evaluation of Ischemia-Reperfusion Injury by Detection of DNA Single Strand Breaks in Rat Heart. 2003 ASA Annual Meeting Abstracts. *Experimental Circulation*. 99(3A):A739, October.
174. Spahn DR, Waschke K, Standl T, et al. Use of Perflubron to Decrease Allogeneic Blood Transfusion in High-blood-loss Non-Cardiac Surgery. Results of a European Phase 3 Study. 2002, *Anesthesiology* 97, 1338-49
175. Standl T. Artificial Oxygen Carriers as Red Blood Cell Substitutes - Perfluorocarbons and Cell-Free Hemoglobin. 2000, *Infus Ther Transfus Med*. 27. 128-137
176. Matsumoto S. Clinical application of perfluorocarbons for organ preservation. 2005, *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 33(1). 75-82
177. Flaim SF. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. 1994 *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22: 1043-1054
178. Cabrales P, Tsai AG, et al. Perfluorocarbon in microcirculation during ischemia reperfusion. 2007, *J AM Coll Surg*. 204, 225-235
179. Kozhura VL, et al. Reperfusion injury after critical intestinal ischemia and its correction with perfluorochemical emulsion "perftoran". 2005, *World J Gastroenterol*, 45, 7084-7090

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

ANOVA	Analysis of Variance
BAGS	Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales
BGA	Blutgasanalyse
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BZ	Blutzuckerkonzentration
Ca <sup>++</sup>	Calcium (ionisiert)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Da	Dalton
DNS-DSB	DNS-Doppelstrangbrüche
DNS-ESB	DNS-Einzelstrangbrüche
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dTTP	Desoxy[methyl-3H]Thymidine 5'-Triphosphat
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKG	Elektrokardiogramm
E-Lyte	Elektrolyte
fHb	Freies (plasmatisch gelöstes) Hämoglobin
FIO <sub>2</sub>	Fraktion des inspirierten Sauerstoffs
<sup>3</sup> H	Tritium
Hb	Hämoglobin
HbO <sub>2</sub>	Oxyhämoglobin
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
HS	Hintergrundschwärzung
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzzeitvolumen
ISNT	In situ Nick-Translation
K <sup>+</sup>	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzerkrankung
KOD	Kolloidosmotischer Druck
LAD	Left Anterior Descendend=Ramus interventrikularis anterior
LV	Linker Ventrikel
MAP	Mittlerer Arterieller Druck
MgCl	Magnesiumchlorid
MPS	Makrozyten-Phagozyten-System
MW	Mittelwert
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nCi	NanoCurie
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> ct	Arterieller Sauerstoffgehalt
OxyHb	Oxygeniertes Hämoglobin
p	Alphafehler

P/Pa	Partialdruck
PAP	Pulmonalarterieller Druck
PBS	Phosphatyl buffered saline
PFC	Perfluorocarbone
PTCA	Percutane Transluminäre Coronarangioplastie
RV	Rechter Ventrikel
RW	Referenzwert
SaO <sub>2</sub>	Arterielle Sauerstoffsättigung
SBc	Standard Bicarbonat
SBE	Standard Basenüberschuss
SD	Standardabweichung
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
SVR	Systemischer Vaskulärer Widerstand
Temp	Temperatur
tHb	Gesamthämoglobin
tPO <sub>2</sub>	Gewebesauerstoffpartialdruck
TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid
ZVD	Zentralvenöser Druck
ZVK	Zentralvenöser Katheter

## 7.2 Übersicht der laborchemischen Parameter

### Gemessene Parameter:

pH

p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>

p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>

O<sub>2</sub>ct

K<sup>+</sup>

Na<sup>+</sup>

ionisiertes Ca<sup>++</sup>

SaO<sub>2</sub>

tHb

OxyHb

MetHb

COHb

fHb

BZ

### Berechnete Parameter:

SBc

SBE

## 8 Tabellen

**Tabelle 8.3.1 Gewicht der Tiere**

Gewicht (g)		
Gruppe	MW	SD
Prophylaxe G1	328,0 ± 42,1	
Therapie G2	317,5 ± 20,2	
NaCl-Gruppe G3	317,8 ± 24,2	
O <sub>2</sub> -Gruppe G4	308,3 ± 21,7	

**Tabelle 8.3.2 Herzfrequenz**

Herzfrequenz HF ( 1 min <sup>-1</sup> )	Prophylaxe G1		Therapie G2		NaCl-Gruppe G3		O <sub>2</sub> -Gruppe G4	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Ruhe +30	431,2±	63,5	420,0±	70,3	446,2±	34,9	483,7±	38,0
Applikation 1+10	465,0±	63,6	423,7±	58,9	453,7±	38,0	487,5±	49,1
Ligatur +5	480,0±	47,4	441,2±	42,5	472,5±	19,8	506,2±	52,9
Applikation 2+10 min	488,7±	44,2	438,7±	56	472,5±	41,7	487,5±	44,3
Reperfusion +10 min	476,2±	40,9	450,0±	51,9	461,2±	42,2	476,2±	40,9
Reperfusion +20 min	465,0±	42,4	450,0±	54,0	472,5±	38,9	495,0±	54,0
Reperfusion +30 min	446,2±	57	468,7±	39,5	461,2±	56	491,2±	44,8
Reperfusion +40 min	461,2±	44,8	472,5±	41,7	468,7±	36,5	506,2±	43,5
Reperfusion +50 min	472,5±	32,6	468,7±	44,8	450,0±	30	510,0±	45*
Reperfusion +60 min	476,2±	27,8	468,7±	44,8	446,2±	23,4	510,0±	42,4*
Reperfusion +70 min	480,0±	30	457,5±	49,1	450,0±	25,9	498,7±	36,5*
Reperfusion +80 min	450,0±	25,9	453,7±	38,0	457,5±	29,0	506,2±	38,0*
Reperfusion +90 min	480,0±	36,7	435,0±	39,6	446,2±	31,6	506,2±	27,8*
Reperfusion +100 min	450,0±	21,2	423,7±	38,0	431,2±	36,5	498,7±	29,7*
Reperfusion +110 min	457,5±	19,8	427,5±	41,7	438,7±	25,7	495,0±	33,5*
Reperfusion +120 min	453,7±	17,9	431,2±	36,5	423,7±	27,8	491,2±	47,2*

\* p<0,05 G4 vs. G3

**Tabelle 8.3.3 Arterieller Mittlerer Blutdruck**

MAP mmHg	Prophylaxe G1		Therapie G2		NaCl-Gruppe G3		O <sub>2</sub> -Gruppe G4	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Ruhe +30	98,7±	17,5	96,7±	13,2	93,6±	21,2	98,7±	19,2
Applikation 1+10	99,7±	23	96,7±	15,3	107,3±	19,1	103,5±	18,8
Ligatur +5	67,3±	21,3*	98,3±	20,2	97,3±	19,8	105,6±	21,9
Applikation 2+10 min	79,6±	22,4	90,0±	23,3	98,3±	19,5	111,2±	18,4
Reperfusion +10 min	83,5±	24,1	101,6±	23,3	88,6±	19,2	94,0±	39,8
Reperfusion +20 min	73,6±	19	100,8±	26,3	85,6±	14,4	98,6±	19,3
Reperfusion +30 min	71,5±	24,1	99,8±	23,2	78,3±	11,0	91,5±	18,8
Reperfusion +40 min	66,7±	22,7	95,1±	21,3	77,8±	15,0	85,1±	19,0
Reperfusion +50 min	67,6±	20,6	91,0±	18,3	75,7±	13,7	99,3±	14,9
Reperfusion +60 min	68,3±	26	88,1±	23,5	76,7±	17,8	94,2±	18,3
Reperfusion +70 min	64,8±	26,2	88,3±	26,7	78,2±	15,8	88,3±	18,3
Reperfusion +80 min	62,6±	20,4	86,5±	21,3	76,5±	21,5	90,1±	21,6
Reperfusion +90 min	66,6±	22,6	85,7±	23	73,8±	17,3	89,6±	23,1
Reperfusion +100 min	69,7±	29,4	83,0±	21,5	66,0±	13,5	87,0±	26,6
Reperfusion +110 min	69,8±	26,8	85,1±	23	62,7±	16,6	86,1±	21,5
Reperfusion +120 min	69,8±	24,8	98,1±	27,5	73,1±	18,9	89,0±	24,9

\* p<0,05 G1 vs. G3

**Tabelle 8.3.4 Zentraler Venendruck**

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

**Tabelle 8.3.5 Inspiratorische Sauerstoffkonzentration**

F <sub>i</sub> O <sub>2</sub> (%)	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
<b>Prophylaxe G1</b>	96,1 ± 3,87		96,3 ± 3,78		96,1 ± 4,09		96,0 ± 4,47		96,0 ± 4,47		96,2 ± 3,85	
<b>Therapie G2</b>	94,3 ± 4,57		94,0 ± 4,78		92,8 ± 5,72		93,3 ± 4,96		93,2 ± 5,20		92,7 ± 5,31	
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	97,0 ± 4,81		96,7 ± 4,59		97,2 ± 4,50		96,8 ± 4,36		96,6 ± 4,44		96,5 ± 5,10	
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	31,6 ± 2,45	*	32,1 ± 3,72	*	31,5 ± 1,93	*	31,1 ± 1,36	*	31,1 ± 1,13	*	31,5 ± 2,07	*

(\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)

**Tabelle 8.3.6 Arterieller Sauerstoffpartialdruck**

paO <sub>2</sub> (mmHg)	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
<b>Prophylaxe G1</b>	361,9 ± 96		474,7 ± 75	*	446,0 ± 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	*	477,0 ± 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	*	108,0 ± 12	*	107,7 ± 16	*	97,43 ± 20	*	98,54 ± 24	*

(\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)

**Tabelle 8.3.7 Arterieller Kohlendioxidpartialdruck**

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

(\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)

**bTabelle 8.3.8 Arterieller pH-Wert**

pH	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
<b>Gruppe</b>													
<b>Prophylaxe G1</b>	7,3	±0	7,3	±0	7,3	±0,1	7,3	±0,1	7,3	±0,1	7,2	±0,1	
<b>Therapie G2</b>	7,4	±0,1	*	7,4	±0	7,3	±0	7,3	±0	7,3	±0	7,2	±0
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	7,3	±0	7,3	±0	7,3	±0	7,3	±0	7,3	±0	7,3	±0	
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	7,4	±0	7,4	±0	7,3	±0,1	7,3	±0,1	7,3	±0,2	7,3	±0	

(\*  $p < 0,05$  vs. NaCl-Kontrolle)

**Tabelle 8.3.9 Standardbikarbonat-Konzentration**

HCO <sub>3</sub> (mmol <sup>-1</sup> )	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
<b>Prophylaxe G1</b>	22,0	± 2,60	22,0	± 3,43	19,9	± 1,81	18,7	± 2,93	20,0	± 1,81	18,2	± 2,58
<b>Therapie G2</b>	19,6	± 3,04	21,1	± 2,46	19,4	± 2,36	19,6	± 2,40	19,2	± 1,38	17,4	± 2,80
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	22,0	± 3,54	21,2	± 3,44	22,3	± 0,96	22,1	± 2,14	21,0	± 1,71	19,6	± 3,80
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	21,0	± 2,79	20,6	± 2,34	20,6	± 3,11	20,1	± 3,19	18,3	± 4,91	19,7	± 3,29

**Tabelle 8.3.10 Standard-Basenüberschuss**

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

**Tabelle 8.3.11 Gesamthämoglobin Konzentration**

tHb (g dl <sup>-1</sup> )	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
Prophylaxe G1	14,4	±1,7	12,6	±1,7	12,5	±1,6	12,4	±1,4	12,8	±1,2	12,7	±1,3
Therapie G2	13,6	±0,8	12,1	±1,1	12,9	±1,2	11,8	±1,7	12,0	±1,3	12,0	±1,2
NaCl-Gruppe G3	13,0	±1	12,1	±1,2	12,1	±1,6	11,6	±1,2	11,3	±1,2	11,9	±1,2
O <sub>2</sub> -Gruppe G4	12,1	±1,1	11,7	±1,2	11,6	±1,1	11,1	±1,2	11,6	±1,3	11,8	±1,2

**Tabelle 8.3.12 Art. Sauerstoffgehalt**

O <sub>2</sub> ct (ml dl <sup>-1</sup> )	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
Prophylaxe G1	19,5	±2,3	16,0	±1,9	15,8	±2	15,5	±2	16,2	±1,9	16,3	±3,2
Therapie G2	18,6	±1,1	17,0	±1,9	17,8	±1,7	15,0	±2,3	15,3	±2,5	15,1	±2,3
NaCl-Gruppe G3	17,8	±1,3	16,5	±1,6	16,7	±2,2	15,9	±1,9	15,6	±2,2	16,4	±3
O <sub>2</sub> -Gruppe G4	15,8	±1,7	15,1	±2,1	15,1	±1,4	14,5	±1,5	14,1	±1,8	14,0	±1,9

**Tabelle 8.3.13 arterielle O<sub>2</sub> Sättigung**

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

(\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)

**Tabelle 8.3.14 Zentral venöse Sättigung**

SAT (%)	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
Prophylaxe G1	99,8 ± 0,26		99,9 ± 0,25		100 ± 0,00		99,9 ± 0,14		99,9 ± 0,04		99,8 ± 0,46	
Therapie G2	99,9 ± 0,11		100 ± 0,00		99,9 ± 0,07		99,2 ± 1,86		98,9 ± 2,85		99,8 ± 0,53	
NaCl-Gruppe G3	99,6 ± 0,68		99,5 ± 0,60		99,7 ± 0,37		99,6 ± 0,53		99,8 ± 0,36		99,8 ± 0,21	
O <sub>2</sub> -Gruppe G4	94,4 ± 6,36 *		93,5 ± 7,21 *		94,3 ± 3,36 *		94,9 ± 2,40 *		89,1 ± 12,4 *		86,8 ± 12,9 *	

(\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)

**Tabelle 8.3.15 Arterielle Konzentration Oxyglobin**

HbO <sub>2</sub> (%)	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
Prophylaxe G1	98,7 ± 0,7		93,6 ± 3,5		92,6 ± 3,1 *		92,2 ± 2 *		92,4 ± 2,3		91,6 ± 2,7	
Therapie G2	98,5 ± 0,6		98,5 ± 0,5		98,6 ± 0,6		91,5 ± 1,8 *		91,6 ± 1,8		90,4 ± 1,9 *	
NaCl-Gruppe G3	98,5 ± 1		98,4 ± 0,9		98,5 ± 0,8		98,5 ± 1		98,6 ± 0,8		98,8 ± 0,6	
O <sub>2</sub> -Gruppe G4	93,4 ± 6,4 *		92,6 ± 7,3 *		93,1 ± 3,1 *		93,9 ± 2,3 *		88,2 ± 12 *		85,9 ± 13 *	

(\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)

**Tabelle 8.3.16 Desoxyhämoglobin (RHb)**

cHHb (%)	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
Prophylaxe G1	0,1 ± 0,3		0,1 ± 0,3		0,0 ± 0,1		0,0 ± 0,1		0,0 ± 0,1		0,1 ± 0,4	
Therapie G2	0,0 ± 0,1		0,0 ± 0		0,0 ± 0,1		0,7 ± 1,9		1,0 ± 2,9		0,1 ± 0,5	
NaCl-Gruppe G3	0,3 ± 0,6		0,4 ± 0,6		0,2 ± 0,3		0,3 ± 0,5		0,1 ± 0,4		0,1 ± 0,2	
O <sub>2</sub> -Gruppe G4	5,5 ± 6,3 *		6,4 ± 7,1 *		5,7 ± 3,2 *		5,0 ± 2,4 *		10,7 ± 12 *		13,1 ± 13 *	

**Tabelle 8.3.17 Natrium Konzentration**

Na <sup>+</sup> (mmol <sup>-1</sup> )	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
Prophylaxe G1	138,6	±4,4	139,6	±1,9	139,3	±4,1	137,3	±3,4	140,5	±4,5	140,3	±4,7
Therapie G2	140,4	±4,5	137,6	±4,5	139,9	±4,9	139,4	±4,1	140,1	±3	143,3	±2,3
NaCl-Gruppe G3	139,8	±9,5	142,6	±3,1	140,1	±3,9	143,0	±3,3	141,3	±3,8	143,9	±5,9
O <sub>2</sub> -Gruppe G4	139,9	±2,9	138,6	±4,5	137,6	±6,6	138,3	±8,5	139,5	±3,7	143,0	±4,6

**Tabelle 8.3.18 Kalium Konzentration**

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

(\* p<0,05 vs. NaCl-Kontrolle)

**Tabelle 8.3.19 Ionisierte Calcium Konzentration**

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

**Tabelle 8.3.20 Blutzucker**

BZ (mg dl-1)	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
<b>Prophylaxe G1</b>	112,6	±15	130,8	±16	125,6	±23	125,1	±22	129,4	±21	106,0	±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	118,0	±17
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	126,6	±21	129,0	±20	123,3	±24	128,3	±38	127,0	±42	124,1	±36

**Tabelle 8.3.21 Rektale Körpertemperatur**

Temperatur ( °C)	Ruhephase +10min		Applikation1 +10min		Okklusion +5min		Applikation2 +10min		Reperfusion +10min		Reperfusion +110min	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
<b>Gruppe</b>												
<b>Prophylaxe G1</b>	37,6	±0,5	37,9	±0,3	38,1	±0,6	37,8	±0,6	37,8	±0,4	38,1	±0,6
<b>Therapie G2</b>	38,1	±0,4	38,2	±0,6	38,1	±0,4	37,7	±0,6	37,7	±0,8	37,8	±0,5
<b>NaCl-Gruppe G3</b>	37,8	±0,5	37,7	±0,5	37,7	±1	37,4	±0,9	37,8	±0,7	37,7	±0,7
<b>O<sub>2</sub>-Gruppe G4</b>	37,9	±0,6	37,8	±0,9	38,1	±0,5	38,0	±0,6	38,0	±0,9	37,8	±0,5

## 9 Danksagungen

Viele Menschen haben dazu beigetragen, dass diese Arbeit letztendlich in dieser Form erscheinen kann. Ohne ein so gut funktionierendes Team wäre es wahrscheinlich nicht möglich gewesen.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. Jochen Schulte am Esch für die Möglichkeit, meine Dissertation in der ehemals unter seinem Direktorat stehenden Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie unter hervorragenden wissenschaftlichen Bedingungen zu erarbeiten und zu schreiben, danken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Thomas Standl, dessen Unterstützung bei weitem nicht auf die Dissertation begrenzt war. Die Arbeit in der von ihm geleiteten Forschungsgruppe war prägend und wegbereitend für meine berufliche Zukunft. Hierfür seinen gebührenden Dank auszudrücken kann kaum gerecht werden.

Herrn Priv - Doz. Dr. Marc Burmeister gilt mein Dank , da die maßgebliche Idee zu dieser Arbeit aus seiner Feder stammte.

Eine unendliche Hilfe in jeder erdenklichen Situation war Herr Dr. Christian Rempf, der es auch in den widrigsten Situationen schaffte, niemals den Faktor Mensch missen zu lassen. Ein offener, flexibler. Geist

Ein besonderer Dank gebührt meinem Mitdoktorand, Herrn Arno Ritter, dessen Freundschaft eine Bereicherung meines Lebens darstellt.

Herrn Priv - Doz. Dr. André Gottschalk gebührt mein Dank für die schnelle und gründliche Korrektur dieser Arbeit.

Einen wesentlichen Anteil an dieser Arbeit hatte durch ihre unerlässliche Unterstützung bei den histochemischen Nachweismethoden Frau Dr. Simone Tuszinsky.

Für die überaus freundliche Aufnahme in ihrer Mitte sowie die stets unkomplizierte, rücksichtsvolle und erfolgreiche Kooperation möchte ich mich bei der leitenden MTA Frau Weber und ihren Kolleginnen Frau Schuppart und Frau Lüchow bedanken.

## 10 Lebenslauf

Name : Eric Lang

Anschrift : Nerzweg 67, 48157 Münster

Geburtsdatum /-ort : 08.08.1973 in Neuwerk / Mönchengladbach

Familienstand : ledig

Eltern : Heide Lang, geb. Kirchner  
Manfred Lang

Schulbildung : 1980-1984 Besuch der Grundschule Grefrath bei  
Neuss / Steinheim  
1984 – 1995 Besuch des Friedrich-Schiller-  
Gymnasiums in Marbach

Schulabschluss : Allgemeine Hochschulreife 1995

Zivildienst : 1996-1997 Deutsches Rotes Kreuz Ludwigsburg

Studium : Studienbeginn April 1998 an der Universität Mainz  
Zum WS 2001 Wechsel an die Universität Hamburg

Examina : 2001 Ärztliche Vorprüfung  
2002 Erstes Staatsexamen  
2004 Zweites Staatsexamen  
2005 Drittes Staatsexamen

Beruf : seit dem 02.01.2006 als wissenschaftlicher  
Mitarbeiter an der Klinik und Poliklinik für  
Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der  
Westfälischen Wilhelms - Universität Münster tätig

## **11 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.