

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Anästhesiologie
Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
Leiter: Prof. Dr. med. Peter Radermacher

**Einfluss von parenteralem H₂S auf DNA-Schäden bei
Ischämie / Reperfusion im Schweinmodell**

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

vorgelegt von
Simone Grupp
aus Aalen

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. **Berichterstatter:** Prof. Dr. Peter Radermacher

2. **Berichterstatter:** Prof. Dr. Hubert Schelzig

Tag der Promotion: 16. Dezember 2010

Meinen Eltern und meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
	1.1 Ischämie/Reperfusionsschaden und oxidativer Stress nach thorakalem Aorten-Clamping	1
	1.2 Suspended Animation	3
	1.3 H ₂ S	3
	1.4 Oxidativer Stress	4
	1.5 Hyperbare Oxygenierung (HBO) als Modell für oxidativen Stress	7
	1.6 Ermittlung primärer DNA-Schäden mit Hilfe des Comet-Assays	8
	1.7 Fragestellung	9
2	Material und Methoden	10
	2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation	10
	2.2 Studienmedikament	12
	2.3 Versuchsablauf	13
	2.4 Comet Assay mit Vollblutproben - in vivo	16
	2.5 Hyperbare Sauerstoffexposition (HBO) - ex vivo	16
	2.6 Methodischer Ablauf des Comet Assays	20
	2.7 Statistische Auswertung	26
3	Ergebnisse	27
	3.1 Allgemeine Erhebungsdaten	27
	3.2 Hämodynamik, Gasaustausch, Säure-Base- und metabolische Parameter	27
	3.3 IK-1001 Konzentrationen	29
	3.4 Vollblutproben und Comet Assays	31
	3.5 HBO-Exposition von Lymphozyten und Comet Assay	32
	3.6 TNF- α	33
	3.7 8-Isoprostan-Konzentrationen	34
	3.8 Temperatur	35
	3.9 Noradrenalingabe zur Kreislaufstabilisierung	36

Inhaltsverzeichnis

	3.10 Noradrenalin-Zeit	37
4	Diskussion	38
	4.1 Das Studienmodell	38
	4.2 Hämodynamik, Gasaustausch, Säure-Base- und metabolische Parameter	39
	4.3 IK-1001 Konzentrationen	40
	4.4 Nachweis von DNA-Schäden in vivo in Vollblutproben	41
	4.5 Effekt der Noradrenalingabe zur Kreislaufstabilisierung	45
	4.6 8-Isoprostan: Parameter für oxidativen Stress - in vivo und TNF- α : Entzündungsparameter	46
	4.7 Hyperbare Sauerstoffexposition - ex vivo	48
	4.8 Schlussfolgerung	51
5	Zusammenfassung	52
6	Literaturverzeichnis	54
7	Danksagung	69
8	Lebenslauf	70

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
α	Signifikantsniveau
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
A.	Arteria (Arterie)
Aa.	Arteriae (Arterien)
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Base Excess
°C	Grad Celsius
CBS	Cystathion β-Synthase
CCD	Charge Coupled Device (Digitaler Kamerasensor)
cm	Z(C)entimeter
CO	Kohlenstoffmonoxid (carbon monoxid)
CO₂	Kohlenstoffdioxid (carbon dioxide)
const.	konstant
CSE	Cystathion γ-Lyase
dH₂O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure / desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylendiamine tetraacetic acid)
EKG	Elektrokardiogramm
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
FiO₂	inspiratorische Sauerstoffkonzentration (fraction of inspired oxygen)
g	Gramm
GC	Guanin-Cystein
h	Stunde(n) (hour(s))
H₂O	Wasser (dihydrogen monoxide)

Abkürzungsverzeichnis

H₂O₂	Wasserstoffperoxid
H₂S	Hydrogen Sulfid = Schwefelwasserstoff
HAES	Hydroxyaethylstärke
HBO	hyperbare Oxygenation
HF	Herzfrequenz
HS	Hydrosulfid-Anion
IK	IKARIA
IL	Interleukin
I/R	Ischämie/Reperfusion
ITBV	intrathorakales Blutvolumen
i.v.	intravenös
K_{ATP}-Kanäle	Adenosin-Triphosphat-sensitive Kalium-Kanäle
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
LMP	low melting point
M	Molar
mA	Milliampère
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MEEO	medium-electro-endoosmosis
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MZP	Messzeitpunkt
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrogen
NaOH	Natronlauge
Na₂S	Di-Natrium Sulfid
NF-κB	nukleärer Faktor kappa B
nm	Nanometer
O₂	Sauerstoff (oxygen)

Abkürzungsverzeichnis

OP	Operationssaal
p	Druck
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pa_{CO2}	partieller Kohlenstoffdioxiddruck (partial pressure of carbon dioxide)
Pa_{O2}	Sauerstoffpartialdruck (partial pressure of oxygen)
PBS	Phosphat basierte Saline, Phosphat-gepufferte Saline
PEEP	positiver endexpiratorischer Druck (positive end expiratory pressure)
pH	Kennzahl für den Säuregrad einer Flüssigkeit (potentia hydrogenii)
RMPI	Roswell Memorial Park Institute
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RO₂[°]	Peroxyradikal
SV	Schlagvolumen
T	Temperatur
TA	Thymin-Adenin
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol)
Triton X-100	Alpha-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-omega-hydroxypoly(oxy-1,2-ethanediyl)
V	Volt
V.	Vene
v.a.	vor allem
vs.	versus (gegen, gegenüber gestellt)
z.B.	zum Beispiel
ZVD	Zentralvenöser Druck

1 Einleitung

1.1 Ischämie/Reperfusionsschaden und oxidativer Stress nach thorakalem Aorten-Clamping

Das aortale Clamping wird in Operationen bei abdominellen oder thorakoabdominellen Aneurysmen angewandt. Während des Eingriffes wird unterhalb und oberhalb der Gefäßläsion eine Klemme aufgesetzt und der Blutfluss durch das betroffene Gefäßsegment vorübergehend unterbrochen. Danach wird der Aneurysma-tragende Gefäßanteil durch eine Prothese ersetzt. Nach Einnähen der Prothese in die Gefäßwand wird der Blutstrom wieder freigegeben [81]. Während dieser gefäßchirurgischen Therapie im thorakoabdominellen Übergang der Aorta kommt es zu einer unumgänglichen Ischämie der unteren Körperhälfte, an deren Folgen 30 % der Patienten postoperativ leiden. Als Folge einer Rückenmarksischämie stellt die Paraplegie eine der gefürchtetsten Komplikationen nach Rekonstruktion der thorakalen Aorta dar. Als Ursache der postoperativen Paraplegie wurden bis jetzt unter anderem die Ischämie bzw. Hypoxie, die Ödembildung durch Liquordruckanstieg während der Klemmphase und ein Reperfusionsschaden nach Öffnen der Aortenklappen experimentell untersucht [18, 34, 126]. Darüber hinaus sind durch die entstehenden Ischämie/Reperfusionsschäden alle diejenigen Organe betroffen, die ihre Blutversorgung distal der Clampingstelle beziehen.

Nach Wiederherstellung des Blutflusses kommt es dann zu einer Reperfusion des ischämischen Organs. Obwohl dieser Vorgang notwendig ist, um eine irreversible Gewebsschädigung zu vermeiden, kann der Reperfusionsvorgang den Schaden um ein Vielfaches, verglichen mit der Schädigung durch die Ischämie selbst [83], potenzieren. Durch Reperfusion entstandene zelluläre Zerstörung eines vorher ischämischen, jedoch vitalen Gewebes nennt man Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R)-Schaden. Dabei kommt es zur Entstehung von oxidativen Radikalen. Bei entsprechender Ausprägung der Ischämie/Reperfusionsschaden-Sequenz kann dies zu einer Entzündungsreaktion bis hin zum Multiorganversagen führen [94].

Einleitung

Thorakales Aorten-Clamping ist somit ein typisches Beispiel für Ischämie/Reperfusionsschädigung von Organen, die ihre Blutversorgung distal der Clampingstelle beziehen.

Eine Möglichkeit, wie es zur Entstehung oxidativer Radikalbildung bei Ischämie kommen kann, ist folgende:

Im Zustand einer Ischämie mit nachfolgender Reperfusion kommt es zu einer Schädigung der Endothelzellen. In Folge der Ischämie findet dabei ein stetiger Abbau von ATP über ADP zu AMP statt, wodurch es zu einer Ansammlung von Adenosin kommt. Da das Gewebe unter Sauerstoffmangel leidet, tritt eine Anreicherung von Hypoxanthin als Abbauprodukt von Adenosin auf. Bei Wiederaufnahme von Sauerstoff nach Reperfusion des Gewebes entsteht durch die Xanthin-Oxidase der Endothelzellen Xanthin aus Hypoxanthin. Bei diesem Vorgang kommt es zur Produktion von Superoxiden und Wasserstoffperoxiden [49]. Dieser Exzess an Oxidantien führt zu oxidativem Stress und zur Zerstörung. Die toxisch-reaktiven Sauerstoffsubstanzen führen zu einer direkten Schädigung der Lipid-Zellmembran, wobei die Aktivierung der Phospholipase A2 für die Aktivierung des Eikosanoidmetabolismus verantwortlich gemacht wird. Dabei kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Thromboxan-A₂, Leukotrien-B₄, IL-1, IL-6. Infolge der Inflammation kommt es zur Generierung weiterer Zytokine wie TNF- α sowie zur Biosynthese von Adhäsionsmolekülen, die eine verstärkte Endothel-Leukozyten-Anheftung vermitteln [25].

Als weitere Ursache oxidativen Stresses wird die Infiltration und Aktivierung von Neutrophilen angenommen. Dabei kommt es durch die NADH-Oxidase der polymorphkernigen Leukozyten zur weiteren Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂), welches aus Superoxiden (O₂⁻) gebildet wird, die Schäden an der DNA durch Einzelstrangbrüche verursachen [111].

Ein viel versprechender Ansatz zur Organprotektion, der auf dem im englischen Sprachgebrauch als „suspended animation“ bezeichneten Funktionszustand beruht und in den letzten Jahren im Blick auf klinische Anwendungen

weiterentwickelt wurde (siehe Kapitel 1.2), könnte jedoch schon in naher Zukunft eine innovative Methode darstellen, um die Komplikationsrate dieser Eingriffe zu senken [16, 17, 89, 93].

1.2 Suspended Animation

Als suspended animation wird ein Winterschlaf-ähnlicher Zustand bezeichnet. Dieser beruht auf der Fähigkeit, welche selbst bei höheren Säugetieren noch erhalten ist, von Natur aus wesentliche Lebensfunktionen reversibel zu verlangsamen oder anzuhalten [89]. In diesem Zustand können sich die Lebewesen vor sogar ansonsten tödlichen Folgen widriger Umweltbedingungen, wie z.B. längerem Sauerstoffmangel, schützen. Aus diesem Grund ist dieses eindrucksvolle biologische Prinzip in den Mittelpunkt des Interesses in der Notfall- und Intensivmedizin gerückt [16, 17, 93]. Am Hund und am Schwein konnte bereits experimentell gezeigt werden, dass die Induktion dieses Zustandes unmittelbar nach Auslösung eines traumatisch bedingten, schweren hämorrhagischen Schocks tatsächlich die Organe (v.a. das Gehirn) bis zu 60 Minuten lang vor Hypoxie-bedingten Schäden schützen kann [3, 4, 5, 15, 16, 78, 87, 119]. Mittlerweile wurde der Beweis erbracht, dass die suspended animation pharmakologisch ausgelöst werden kann. Gelänge es, diesen Zustand auch beim Menschen auf diese unkomplizierte Weise herbeizuführen, könnte dieses Verfahren genutzt werden, um zur Protektion minderperfunderer Organe in der Phase des Aorten-Clampings angewandt zu werden [38].

1.3 H₂S

Hydrogen Sulfid (H₂S) ist ein farbloses, entzündliches, wasserlösliches Gas mit einem charakteristischen Geruch nach faulen Eiern. Jahrelang machte H₂S in erster Linie auf sich aufmerksam als ein toxisches Gas und als eine Gefahr für die Umwelt [42, 59, 113]. Es wurde dann erkannt, dass es sich bei H₂S auch um ein endogen gebildetes Signalmolekül handelt [65, 106, 113]. H₂S wird endogen in verschiedenen Geweben des Säugetiers durch zwei Enzyme gebildet, die verantwortlich sind für die Metabolisierung von L-Cystein. Dabei handelt es sich um die Cystathion-β-Synthase (CBS) und die Cystathion-γ-Lyase (CSE) [42, 113]. Seit der Entdeckung, dass es sich bei H₂S um ein physiologisches Signalmolekül

Einleitung

handelt, wurden experimentelle Studien durchgeführt mit dem Ziel, sein biologisches Profil zu umschreiben [73]. Aus Studien ging hervor, dass H_2S ein wirksames Antioxidans ist [60, 115, 123]. H_2S erhöht darüber hinaus die Produktion von Glutathion, was bekanntermaßen zu den wichtigsten als Antioxidans wirkenden Stoffen im Körper gehört [60].

Weitere Studien wurden durchgeführt, aus denen ein protektiver Einfluss von H_2S auf den Zustand der Hypoxie-Reoxygenierung und auf die I/R-Schädigung hervorgeht [20, 39, 100, 124]. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es nun von Interesse, ob H_2S oxidativem Stress und somit DNA-Schäden im Rahmen dieser Arbeit entgegen wirken kann.

1.3.1 H_2S als Auslöser der suspended animation

Die Entdeckung, dass H_2S eine suspended animation induzieren kann, begann mit Experimenten, die zeigten, dass winterschlafähnliche Zustände in Tieren hervorgerufen werden konnten, die von Natur aus keinen Winterschlaf halten.

Zunächst wurde demonstriert, dass bei Lebewesen eines niedrigeren Entwicklungsstandes der Zustand der suspended animation unter Bedingungen extremer Hypoxie bzw. Anoxie aktiv ausgelöst werden kann [79, 82]. In einer weiteren Versuchsreihe wurde CO verwendet [79]. In einem darauf folgenden Versuch wurde CO durch H_2S ersetzt, das ähnlich wie CO als ein Inhibitor der Cytochrom c Oxidase fungiert. Dies zeigte einen prinzipiellen Weg auf, auch höher entwickelte Lebewesen pharmakologisch in den Zustand der suspended animation zu versetzen. H_2S kann schon in niedrigen, nicht toxischen Mengen eine reversible suspended animation im Säugetier, welches normalerweise keinen Winterschlaf hält, induzieren [21, 89].

1.4 Oxidativer Stress

Unter physiologischen Bedingungen herrscht in der Zelle ein Gleichgewicht zwischen der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und deren Beseitigung. In dieser Situation dienen ROS als Mediatoren in Signaltransduktionskaskaden, die Wachstum, Proliferation [31, 110] und viele andere Abläufe der Zelle regulieren, wobei ihre Aktivität unter der Kontrolle antioxidativer Mechanismen steht. Es gibt

Einleitung

jedoch auch Situationen, während derer es zu einer erhöhten Produktion von ROS oder einer verminderten Beseitigung durch die Abnahme zellulärer Abwehrmechanismen kommen kann. Dadurch wird das oben genannte Gleichgewicht gestört. In diesen Fällen spricht man von „oxidativem Stress“ [9, 51, 97]. Hierbei kommt es u.a. zu Schädigungen von Lipiden und Nukleinsäuren.

Bei der Lipidperoxidation handelt es sich um eine radikalische Kettenreaktion, die von ROS angestoßen wird [23, 97]. Dabei werden die ungesättigten Fettsäuren in den Membranen der Zelle geschädigt. Am Anfang der Kettenreaktion steht die Reaktion von ROS mit Lipiden, bei der es zur Bildung eines Lipidradikals kommt. In einem Zwischenschritt reagiert dieses Lipidradikal mit Sauerstoff zu einem Peroxylradikal (RO_2°). Dieses Peroxylradikal reagiert wiederum mit Lipiden, wodurch es zur erneuten Bildung eines Lipidradikals und hierdurch letztlich zur Kettenreaktion kommt. Eine Kettenabbruchreaktion tritt erst ein, wenn sich zwei Peroxylradikale treffen, oder wenn ein Peroxylradikal auf einen Radikalfänger, beispielsweise Vitamin E, trifft [23]. Durch die Lipidperoxidation kommt es zu strukturellen und funktionellen Membranveränderungen in der Zelle, was zu degenerativen Erkrankungen führen kann [6, 24, 41, 51]. Einige Produkte der Lipidperoxidation können auch direkt zu Schädigungen der DNA führen [23, 72]. Im Zuge der Lipidperoxidation entstehen aus dem Membranbaustein Arachidonsäure in mehreren Reaktionsschritten Isoprostane [114]. Dabei handelt es sich um Konstitutions- und Stereoisomere der Prostaglandine. Sie werden als Marker für Lipidperoxidation und somit als Parameter des oxidativen Stresses herangezogen [74, 88].

Die Nukleinsäuren sind eine weitere wichtige Molekülgruppe, die durch Reaktionen mit ROS direkt geschädigt wird. Eine Veränderung der DNA durch ROS spielt wahrscheinlich nicht zuletzt bei der Entstehung von Krebs eine Rolle [27, 56, 63]. Etwa 20% der durch ROS induzierten Reaktionen an der DNA bewirken Schädigungen am Zucker-Phosphat-Gerüst [9], wodurch DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen entstehen. Der größere Teil der Schädigungen sind Basenmodifikationen [24], von denen bereits über 100 bekannt [40] und deren wichtigste Vertreter in Abbildung 1 aufgeführt sind. Die

Einleitung

häufigste Basenveränderung ist das 8-Hydroxyguanin (7,8-dihydro-8-oxo-Guanin), welches prämutagene Eigenschaften besitzt. Bei der DNA-Replikation paart es fälschlich mit Adenin und führt so zu einem GC → TA Basenaustausch, was zu einer Missense- oder Nonsense-Mutation führen kann.

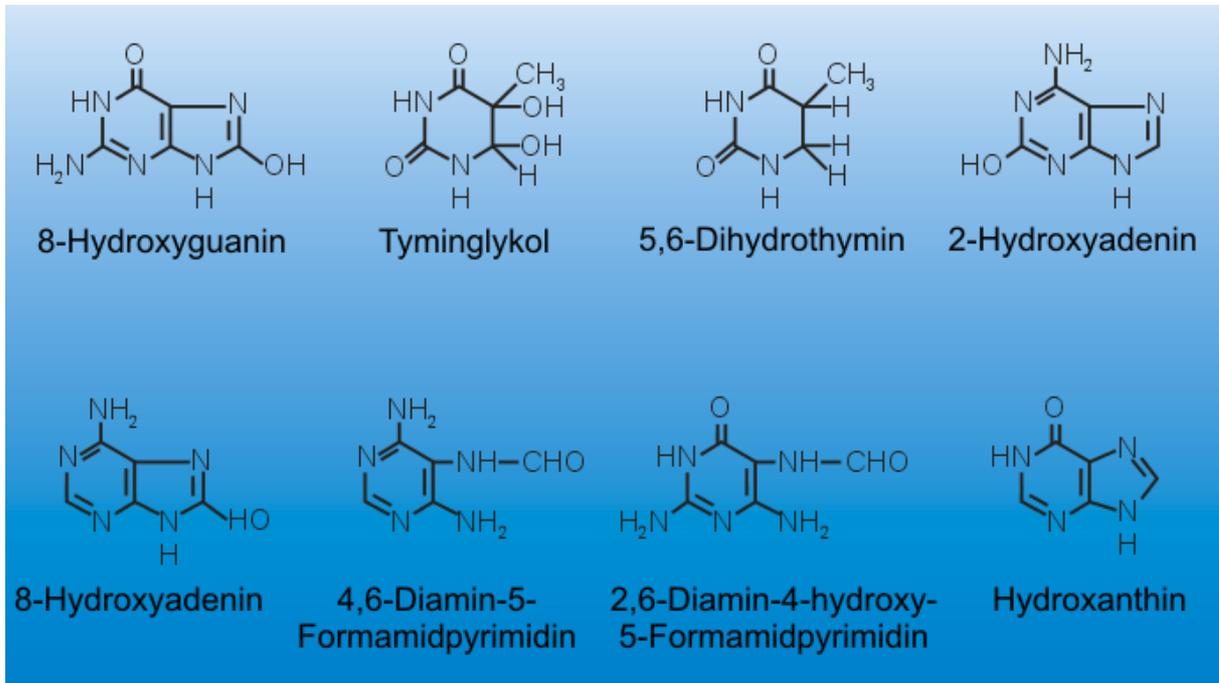


Abbildung 1: Häufigste Vertreter oxidativ veränderter DNA-Basen

Oxidativer Stress hat zudem proinflammatorische Effekte. Aragno et al. [8] konnten zeigen, dass die Ausschüttung verschiedener Faktoren wie TNF- α und die Aktivierung des in inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle spielenden Transkriptionsfaktors NF- κ B durch oxidativen Stress initiiert werden und gleichzeitig mittels Antioxidantien reduziert werden können. ROS haben chemotaktische und aktivierende Effekte auf verschiedene Entzündungszellen wie Makrophagen, Granulozyten und anderer Entzündungszellen [96]. Die Ausschüttung von Cytokinen wie IL-1, IL-8 und Eikosanoiden steigert den Entzündungsprozess zusätzlich [86].

1.5 Hyperbare Oxygenierung (HBO) als Modell für oxidativen Stress

Hyperoxie, also die Exposition mit supraatmosphärischen O₂-Konzentrationen, bewirkt eine Ausbildung von DNA-Schäden. Die Hyperbare Oxygenation (HBO), das heißt die Exposition mit reinem Sauerstoff bei supraatmosphärischen Umgebungsdrücken, ist daher ein Modell für oxidative Schädigung der DNA [103]. Durch die HBO-Anwendung kommt es zu vermehrter Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. Wenn dadurch eine zu große Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies einem zu geringen Pool an Antioxidantien gegenübersteht, entsteht oxidativer Stress [118]. Ein Anstieg der Sauerstoffradikalproduktion konnte mit Hilfe der Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) sowohl an Versuchstieren [121] als auch an Menschen [76] indirekt nachgewiesen werden. Die hauptsächlichsten Ziele dieser entstandenen Radikale sind Enzyme, Zellmembranen sowie die DNA mit daraus hervorgehenden Schäden an Zellstrukturen [118]. Mit Hilfe des Comet Assays konnte gezeigt werden, dass therapeutisch genutztes HBO zu DNA-Schäden in Leukozyten von gesunden freiwilligen Probanden führt, die sich als DNA-Strangbrüche und oxidativ veränderte Basenschäden darstellten [35]. In vitro besteht eine Dosis–Wirkungs–Beziehung zwischen HBO und DNA-Schäden: Je höher der Sauerstoffpartialdruck und je länger die Expositionszeit, desto stärker und häufiger sind die DNA-Einzelstrangbrüche ausgeprägt [91]. Neben der Induktion der beschriebenen genotoxischen Effekte zeigten Untersuchungen an HBO-exponierten Probanden auch das Auftreten eines oxidativen Schutzes, da nur nach der ersten Behandlung eine Steigerung der DNA-Schäden festzustellen war, nicht jedoch bei wiederholter Behandlung am nächsten Tag [35, 90].

Die Exposition von Probanden, Versuchstieren oder Zellkulturen mit hyperbarem Sauerstoff ist somit ein Modell, um oxidative DNA-Schäden zu beschreiben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die hyperbare Oxygenierung als „second hit“ verwendet. Damit ist gemeint, dass die Leukozyten nach der Beanspruchung in vivo durch die HBO-Behandlung einem weiteren potentiell schädigenden Verfahren ausgesetzt wurden. Es wurde dadurch untersucht, wie die Zellen nach dem Clamping und nach der Behandlung mit dem Studienmedikament bzw. dem Placebo auf eine zusätzliche Schädigung reagieren.

1.6 Ermittlung von DNA-Schäden mit Hilfe des Comet-Assays

Die Methode des Comet Assays (Einzelzellgelelektrophorese) ist ein einfacher und schneller Test. Mit ihm lassen sich DNA-Läsionen sensitiv nachweisen [99]. DNA-Läsionen sowie alkalilabile Stellen und oxidative Basenveränderungen werden durch die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies herbeigeführt [92]. Oxidative Basenveränderungen können dabei mit dem Comet Assay sekundär in Strangbrüche überführt werden [92]. Deshalb wird der Comet Assay in der Grundlagenforschung zur Untersuchung von DNA-Schäden und deren Reparatur benutzt [32]. Er eignet sich zum Nachweis von DNA-Läsionen in praktisch allen eukaryontischen Zellen. DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche können in der alkalischen Variante der Einzelzellgelelektrophorese, die in einem Milieu mit einem $\text{pH} > 13$ durchgeführt wird, nachgewiesen werden [99, 107]. Im Gegensatz zu anderen Genotoxizitätstests sind die Vorteile der Einzelzellgelelektrophorese u.a. eine hohe Sensitivität zum Aufzeigen kleiner DNA-Schäden und ein geringer Bedarf an Probenmaterial [108]. Dies hat dazu geführt, dass der Comet Assay als Genotoxizitätstest große Bedeutung gewonnen hat.

Zur Analyse wird eine geringe Menge an Zellen ($\sim 10^4$) als Einzelzellsuspension in flüssige Agarose aufgenommen, auf einen Objektträger aufgebracht und einer Lyse unterzogen. Während der Lyse unter alkalischen Bedingungen werden die Membranen sowie die Proteine der Zelle abgebaut, so dass nur noch die DNA des Kerns vorliegt. Anschließend werden die Objektträger einem alkalischen Puffer ausgesetzt, der die DNA entspiralisiert und alkalilabile Schäden in Strangbrüche überführt. Danach werden die Objektträger einer horizontalen Gelelektrophorese unterzogen, bei der nun Strangbrüche zu einer verstärkten Wanderung relaxierter DNA oder kurzer Fragmente in Richtung Anode führen. Nach Färbung der DNA mit Ethidiumbromid erkennt man im mikroskopischen Bild einen „Kometen“, wobei es sich beim „Kometenkopf“ um den ursprünglichen Zellkern und beim „Kometenschweif“ um die gewanderten DNA-Bruchstücke handelt. Als Maß für die DNA-Schädigung einer Zelle dient das „Tailmoment“, welches das Produkt der relativen Intensität des Kometenschweifes gegenüber dem Kometenkopf und der auf den Schwerpunkt des Kopfes korrigierten Wanderungslänge der DNA ist.

1.7 Fragestellung

Im Rahmen dieser tierexperimentellen Untersuchung zur Induktion einer sogenannten suspended animation mit dem Ziel der Unterbindung bzw. der Reduktion von Ischämie- und Reperfusionsschäden nach Crossclamping der thorakalen Aorta, gemessen in den regionalen Stromgebieten des Schweins, durch Einsatz des Sulfid-Donors IK-1001 wurden folgende Fragen untersucht:

1. Wie beeinflusst der durch H₂S ausgelöste Zustand der suspended animation die im Rahmen der Ischämie/Reperfusionsschäden zu erwartenden DNA-Schäden in vivo in Form von DNA-Strangbrüchen ?
2. Gibt es Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen bei der Sensitivität gegenüber eines „Second Hit“ ex vivo durch einen zusätzlichen oxidativen Stressfaktor in Form einer HBO-Exposition ?

2 Material und Methoden

2.1 Anästhesie und chirurgische Präparation

2.1.1 Versuchsaufbau, Anzahl der Versuchstiere und ethische Grundlagen

Die Versuche wurden nach den Richtlinien „Umgang mit Labortieren“ des „Bundesinstituts für Gesundheit“ durchgeführt. Das Versuchsprotokoll wurde sowohl von dem Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm als auch vom Regierungspräsidium Tübingen, Baden-Württemberg, genehmigt.

Für die Versuchsreihe wurden 21 deutsche Landschweine beiderlei Geschlechts aus dem Tierforschungszentrum der Universität Ulm mit einem Körpergewicht zwischen 42 und 54 kg (medianes Gewicht 44 kg) verwendet, da das Schwein anatomisch, metabolisch, physiologisch sowie auch pathophysiologisch von den in Frage kommenden Spezies die größte Homologie mit dem Menschen aufweist. Für die eigentliche Studie kamen davon 16 zur Verwendung. Ein Schwein starb noch vor Anwendung des Studienmedikaments aufgrund der chirurgischen Präparation und wurde daher nicht in die Auswertung aufgenommen. Vor Studienbeginn wurden an 4 Schweinen Vorversuche durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in eine IK-1001- Gruppe und eine Placebogruppe/Kontrollgruppe aufgeteilt. 8 Tieren wurde 0,2 mg/kg reversiblen Atmungsketten-Inhibitor IK-1001 als Bolus und anschließend 2 mg/kgxh als Dauerinfusion im Verlauf des thorakalen Aorten-Clamping-Versuchs über eine zentralvenöse Infusion, gelöst in 5% Glucose, verabreicht. Die 8 Versuchstiere in der Kontrollgruppe bekamen 0,9 % NaCl in gleicher Art und Weise infundiert.

Die Tiere lebten vor dem jeweiligen Versuchstag etwa eine Woche im Tierforschungszentrum der Universität Ulm. Vor Operationsbeginn stand ein 18-stündiger Futterentzug, wohingegen den Tieren Wasser jederzeit in unbegrenzter Menge zur Verfügung stand.

2.1.2 Anästhesie und Medikation während der Operation

Bereits 1 Stunde vor der Narkose bekamen die Versuchstiere im Tierforschungszentrum eine intramuskuläre Prämedikation in Form von 5 mg/kg Azaperon (Stresnil[®], Janssen, Neuss, Deutschland) und 2,5 mg Atropin (Atropinsulfat[®], Braun, Melsungen, Deutschland). Der Transport in den Tier-OP der Sektion „Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung“ in der Parkstraße 11, 89073 Ulm, erfolgte schlafend in einer Transportkiste (Zeitaufwand ca. 60 Minuten). Zunächst wurde den Tieren über die Ohrvene ein intravenöser Zugang gelegt. Die O₂-Sättigung wurde pulsoxymetrisch über einen „Fingerclip“, der am Schwanz der Tiere angebracht wurde, überwacht (Datex Capnomac Ultima[®] ULT-S-3301, Datex Instrumentarium Corp, Helsinki, Finnland). Die Narkose wurde unter Sauerstoffgabe über den i.v.-Zugang in der Ohrvene mit 3-5 mg/kg Propofol (Disoprivan 2%, Astrazeneca GmbH, Wedel / Schleswig-Holstein, Deutschland) und 1-2 mg/kg Ketamin (Ketavet[®], Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland) eingeleitet. Nach einer Rückenlagerung der Schweine erfolgten die orotracheale Intubation und die kontrollierte maschinelle Beatmung (Servo 900C[®], Siemens, Erlangen, Deutschland – inspiratorische O₂-Konzentration (FiO₂) : 0,35, Atemfrequenz wurde so angepasst, um den arteriellen PCO₂ bei 35±4 mmHg zu halten, positiver endexpiratorischer Druck (PEEP): 10 cm H₂O). Die expiratorische CO₂-Konzentration wurde kontinuierlich zur Überwachung der Beatmung gemessen. Zur Aufrechterhaltung der Narkose diente ein Luft-Sauerstoff-Gemisch (FiO₂: 0,35) zusammen mit einer Dauerinfusion bestehend aus Propofol (6-8 mg/kg/h) und dem Analgetikum Remifentanyl (0,15–0,2 mg/kg/h). Außerdem wurden Elektroden für die kontinuierliche EKG-Überwachung und eine Magensonde gelegt. Während des gesamten Experiments erhielten die Tiere eine Infusion von 10 ml/kg/h Ringer-Lösung (Ringerlösung Fresenius[®], Fresenius Kabi, Erlangen) zur Flüssigkeitssubstitution. Die Raumtemperatur wurde zwischen 24 und 26 °C gehalten und alle Tiere wurden kontinuierlich warm gehalten durch eine Matratze, die auf 39 °C aufgeheizt wurde.

2.1.3 Operative Eingriffe

Beide Aa. femorales wurden freigelegt und jeweils mit einer 10F-Schleuse versehen, in welche Ballonkatheter zur Durchführung der proximalen und distalen Okklusion der Aorta eingeführt wurden. Zur korrekten Platzierung des proximalen Ballon-Katheters wurde eine linksanteriore Thorakotomie durchgeführt. Mittels transabdominaler Ultraschallkontrolle wurde die korrekte Positionierung des distalen Ballonkatheters durchgeführt. Die Position des proximalen Katheters wurde durch die Palpation der thorakalen Aorta über die laterale Thorakotomie erreicht. Ein Katheter wurde direkt oberhalb der aortalen Bifurkation und der andere direkt nach dem Abgang der Arteria subclavia sinistra positioniert. Das Ausklemmen der kranialen und kaudalen Aortenstrombahn ausgehend von dem zu therapierenden Aortenaneurysma entspricht dem klinischen Vorgehen zur Ausschaltung eines aneurysmatischen Aortensegmentes und Interposition einer Gefäßprothese.

Eine transversale Laparotomie war nötig, um die rechte Niere und deren Nierengefäße darzustellen. Ein über die V. femoralis eingebrachter 4F-Katheter (Multipurpose[®] A1, Cordis, Roden, Niederlande) in die V. renalis diente zur Entnahme von Blutproben. Anschließend wurde eine Thoraxdrainage eingelegt und die Thorakotomie verschlossen.

Zusätzlich wurde bei den Schweinen mit einer Alcuronium-Infusion (10-15 mg/h; Alloferin[®], Hoffmann- La Roche, Basel, Schweiz) die Relaxation erreicht.

Im Anschluss folgte eine Ruhephase von einer Stunde.

2.2 Studienmedikament

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Substanz IK-1001 (Ikaria, Seattle, WA) verwendet, um den Zustand der suspended animation auszulösen. Dabei handelt es sich um einen H₂S-Donor in Form von Na₂S (Di-Natrium-Sulfid), der zur parenteralen Gabe hergestellt wird. Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Na₂S wurde H₂S-Gas (Mattheson, Newark, California) verwendet. Dieses Gas wurde in eine wässrige Lösung bestehend aus NaOH und NaCl eingebracht und zu einem neutralen pH und einer Isoosmolarität gebracht [39]. Dies war notwendig, da Sulfid bei physiologischem pH gasförmig und als Hydrogensulfid-

Anion (HS) vorliegt. Diese Lösung wurde anschließend gefiltert und unter Schutzgasatmosphäre in Glasfläschchen gegeben.

2.3 Versuchsablauf

Nach einer Stunde der Ruhephase wurde die erste Blutentnahme vorgenommen (MZP 1), also noch vor Beginn der Infusion des Studienmedikamentes IK-1001.

2 Stunden vor dem Clamping der thorakalen Aorta erfolgte die Applikation des Studienmedikaments IK-1001 bzw. des Placebos. IK-1001 wurde in 5% Glucose gelöst und als Bolus von 0,2 mg/kg gefolgt von einer Dauerinfusion von 2 mg/kg/h bis zum Ende des Versuches verabreicht. Als Placebo diente 0,9% NaCl (isotone Kochsalz-Lösung 0,9% NaCl Braun, Melsungen).

Unmittelbar vor dem Aortenclamping erfolgte die zweite Blutentnahme (MZP 2). Die Okklusion der thorakalen Aorta nach Abgang der A. subclavia sinistra und der distalen Aorta unterhalb der Nierenarterien mittels des transfemoral eingeführten Ballonkatheters hielt 30 Minuten an.

Während der Clampingphase erhielten die Tiere über den zentralvenösen Zugang Nitroglycerin (1.7 mg/min, Nitrolingual[®] infuse, Pohl-Boskamp GmbH & Co, Hohenlockstedt, Deutschland) und Esmolol (16.5 mg/min, Brevibloc[®], Baxter Healthcare, Unterschleißheim, Deutschland) sowie den ultrakurz wirksamen Vasodilatator Adenosin-5'-Triphosphat (ATP, 2-10 mg/min, Striadyne[®], Wyeth-Lederle, Paris, Frankreich), um den mittleren arteriellen Blutdruck zwischen 80 und 120 % des Ausgangswertes vor Aortenokklusion zu halten. Nach 30 Minuten wurde der Ballonkatheter entblockt und die Aortenstrombahn wieder freigegeben. Daraufhin schloss sich eine 8-stündige Nachbeobachtungszeit an. In diesem Zeitraum erfolgten die weiteren Blutentnahmen jeweils 1 (MZP 3), 2 (MZP 4), 4 (MZP 5) und 8 Stunden (MZP 6) nach dem Declamping. Nach Freigabe der Aorta wurde Noradrenalin (Arterenol[®] 25 ml, Sanofi-Aventis, Deutschland GmbH, Frankfurt) nach Bedarf kontinuierlich infundiert, um in der frühen Reperfusionphase den arteriellen Blutdruck auf über 80% des Initialwertes zu halten. Die hieraus entstandene individuelle Dosis und Applikationsdauer von Nordrenalin (Arterenol[®] 25 ml, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt) wurden als unabhängige Variablen registriert. Des Weiteren wurde den Versuchstieren während des Clampings und bis eine Stunde nach Freigabe der

Material und Methoden

Aortenstrombahn zur Stabilisierung des Kreislaufes eine 6%ige HydroxyäthylstärkeLösung mit 1000 ml/h (HAES-steril® 6 % 200/0,5, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland; ITBV maximal 30-35 ml/kg; ITBV= intrathorakales Blutvolumen) verabreicht. Diese Infusion wurde bis zum Ende des Versuches mit einer Dosierung von 250 ml/h fortgesetzt. Die Dauerinfusion des Studienmedikamentes IK-1001 bzw. des Placebos wurde mit konstanter Geschwindigkeit bis zum Versuchsende fortgesetzt. Am Ende des Versuchs erfolgte die Tötung der Tiere in tiefer Narkose durch einen Pentobarbital-Bolus und eine nachfolgende Injektion von 20 mmol Kaliumchlorid (KCl- Lösung Fresenius, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland).

In der sich anschließenden Abbildung ist der gesamte Versuchsablauf graphisch dargestellt (Abbildung 2).

Material und Methoden

-23 h	Futterentzug
-5 h	Prämedikation (Azaperon, Atropin) + Transport + Narkoseeinleitung + Intubation
-4 h	Chirurgische Präparation
-1 h	Ruhe- und Erholungsphase
0 h	MZP 1 (Initialwert) Blutentnahme: -Vollblut
0 h – 2 h	Applikation des Studienmedikaments/Placebos Bolus 0,2 mg/kg, gefolgt von Dauerinfusion 2 mg/kg/h
2 h	MZP 2 vor Clamping Blutentnahme: -Vollblut -HBO
2 h – 2,5 h	30 min Clamping
3,5 h	MZP 3 (1h nach Clamping) Blutentnahme: -Vollblut
4,5 h	MZP 4 (2h nach Clamping) Blutentnahme: -Vollblut -HBO
6,5 h	MZP 5 (4h nach Clamping) Blutentnahme: -Vollblut -HBO
10,5 h	MZP 6 (8h nach Clamping) Blutentnahme: -Vollblut
Versuchsende	Pentobarbital und Kaliumchlorid (KCl)

Abbildung 2:

Graphische Darstellung des Versuchsablaufes mit Messzeitpunkten (MZP).
KCl= Kaliumchlorid, h= Stunde/Stunden, HBO= Hyperbare Oxygenierung

2.4 Comet Assay mit Vollblutproben in vivo

Die zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Vollblutproben in Lithium-Heparin-Monovetten (S-Monovetten 9 ml LH, Sarstedt, Nürnberg) dienten der Bewertung der DNA-Schädigung hinsichtlich der Ischämie-Reperfusionsequenz. Die Beurteilung erfolgte mittels der Auswertung des „Tailmoments“ in der alkalischen Version des Comet Assays (Einzelzellgelelektrophorese).

Je 5 µl des heparinisierten Blutes wurden in 120 µl LMP-Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim), welche auf 37 °C temperiert wurde, pipettiert und vermischt. Die so entstandene Agarose-Zellsuspension wurde anschließend auf einen präparierten Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) aufgetragen und mit einem Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig) versehen. Nach ungefähr vierminütigem Ausgelieren im Kühlschrank (Glass Line, Liebherr, Bulle, Schweiz) wurde das Deckglas seitlich abgezogen. Anschließend wurde das Präparat in eine 4 °C kalte gebrauchsfertige Lyselösung (42,5 mM Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 1,41 M DMSO (Merck, Darmstadt) in Lyse-Stammlösung) gegeben, in der es mindestens 1 Stunde jedoch nicht länger als 48 Stunden verblieb. Um weitere DNA-Schäden zu vermeiden, wurde auf lichtarme Bedingungen bei der Bearbeitung geachtet. Nach der Alkalidenaturierung wurden alle Vollblutproben einer Gelelektrophorese unterzogen und nach anschließender Anfärbung der DNA fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

2.5 Hyperbare Sauerstoffexposition (HBO) - ex vivo

Durch die zweistündige Exposition mit hyperbarem Sauerstoff (HBO) bei 4 bar in einer temperierten Druckkammer wurden die induzierbaren DNA-Schäden in den Lymphozyten untersucht. Die Vollblutproben für die Lymphozytenisolierung wurden dem Versuchstier zu den Messzeitpunkten 2, 4 und 5 ebenfalls in Lithium-Heparin-Monovetten (Sarstedt, Nürnberg) entnommen.

2.5.1 Isolierung der Lymphozyten aus dem Vollblut

Zu den Messzeitpunkten 2, 4 und 5 wurden jeweils 4 Monovetten Vollblut entnommen, welche auf 8 bereits vorbereitete Verdünnungsröhrchen, die je mit 2,5 ml PBS-Puffer (Phosphat-gepufferte Saline, (Invitrogen Cooperation, Paisley,

Schottland)) gefüllt waren, aufgeteilt und vermischt wurden. Mit Hilfe einer Einmal-Pasteurpipette (Sarstedt, Nürmbrecht) wurde anschließend das Blut-Puffer-Gemisch von jedem Verdünnungsröhrchen auf 5ml Ficoll (Biocoll Separating Solution, Biochrom AG, Berlin) in einem Reagenzröhrchen (Sarstedt, Nürmbrecht) langsam aufgeschichtet. Die so entstandenen 8 aufgeschichteten Proben wurden 30 Minuten lang zentrifugiert (Biofuge 28 RS, Heraeus, Osterode).

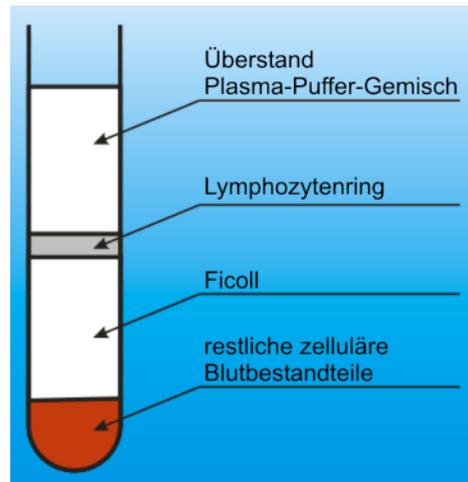


Abbildung 3: Lymphozytenisolation auf Ficoll-Gradienten

Dadurch trennte sich das aufgeschichtete Blut-Puffer-Gemisch, wie in Abbildung 3 dargestellt, auf. Durch die Zentrifugation bildete sich ein Plasma-Puffer-Überstand über dem Leukozytenring. Dieser Überstand wurde durch eine Absaugpumpe (Wisa Absaugpumpe, W. Sauer GmbH&Co KG, Wuppertal) bis ca. 0,5 cm über dem Leukozytenring entfernt. Der Leukozytenring wurde anschließend mit Hilfe einer Einmal-Pasteurpipette abgetragen und in 4 weitere Reagenzröhrchen, die bereits mit 2,5 ml PBS-Puffer befüllt waren, gegeben. Diese wurden 10 Minuten zentrifugiert. Die so entstandenen Lymphozytensedimente wurden durch das Abschütten des Überstandes von diesem getrennt. Die Lymphozytensedimente wurden in insgesamt 5 ml PBS-Puffer resuspendiert und in einem Röhrchen gepoolt.

Nach erneutem 10-minütigem Zentrifugieren wurde der entstandene Überstand wiederum abgeschüttet und das verbliebene Leukozytensediment mit 5 ml RPMI 1640-Puffer (Biochrom AG, Berlin) resuspendiert und in ein Gewebekulturfläschchen (Sarstedt, Nürmbrecht) überführt.

2.5.2 HBO-Exposition mittels Druckkammer

Die Lymphozytensuspension wurde zur Beurteilung der durch HBO-Exposition induzierbaren DNA-Schäden in einer auf 37 °C temperierten Druckkammer (Werkstatt Universität Ulm, Ulm) einer zweistündigen HBO-Exposition bei 4 Atmosphären unterzogen. Verwendet wurde hierfür ein Gasgemisch mit 98% Sauerstoff und 2% Kohlenstoffdioxid (Gasgemisch 98% O₂, 2% CO₂, MTI Industriegase, Ulm).

Zur Untersuchung der durch die HBO-Exposition herbeigeführten DNA-Schäden wurden vor und nach der Druckkammerbehandlung Comet Assays mit Aliquoten der Lymphozytensuspensionen durchgeführt. Hierfür wurden Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshofen) mit Lymphozytensuspension mit Hilfe von Agarose hergestellt durch dasselbe Vorgehen wie zuvor mit den Vollblutproben beschrieben. Nach Lyse, Elektrophorese, Färbung und Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurden sie auf der Basis ihres Tailmoments bewertet.

Die Gewebefläschchen wurden ohne Deckel in die Druckkammer (Abbildung 4) gestellt. Die hierfür benutzte Druckkammer besitzt Ein- und Ausgänge, durch die das Gasgemisch ein- bzw. ausströmen kann. In den Deckel der Kammer sind ein Überdrucksicherheitsventil, ein Temperaturfühler und ein Barometer integriert, das den in der Kammer herrschenden Überdruck anzeigt. Die Druckkammer steht in einer Edelstahlwanne. Das in der Wanne befindliche Wasser wurde durch einen Durchlauferhitzer (Lauda Typ B 1,6 kW, LAUDA DR.R. Wobser GmbH&Co. KG, Lauda-Königshofen) vor Beginn der hyperbaren Sauerstoffexposition auf 34 °C erhitzt. Durch die Kompression des Gases in der Kammer zu Beginn des Versuchs steigt die Temperatur im Inneren der Kammer gemäß des Gesetzes von Gay-Lussac, nach welchem der Druck einer Gasmenge im gleichen Verhältnis wächst wie die absolute Temperatur ($p/T = \text{const.}$), an und erreicht die gewünschte Endtemperatur von physiologischen 37°C. Nachdem die Kammer mit den Proben beladen worden war, wurde der Deckel fest verschlossen und die Kammer etwa 30 Sekunden mit dem Gasgemisch durchspült. Dieses hatte zum Ziel, die Luft im Inneren der Druckkammer komplett durch das Gasgemisch zu ersetzen. Die Auslassventile wurden anschließend verschlossen, während das Gasgemisch weiterhin durch die Einlassventile in die Kammer gelangen konnte, sodass sich

Material und Methoden

allmählich ein Überdruck in der Kammer aufbaute. Dieser Überdruck von 4 bar absolut wurde für 2 Stunden bei 37 °C aufrechterhalten.



Abbildung 4: Druckkammer im Wasserbad zur Durchführung der HBO-Exposition

Durch Öffnen eines regulierbaren Auslassventils wurde anschließend die Kammer kontrolliert druckentlastet. Nach Erreichen des Normaldruckes wurde die Kammer geöffnet und das Gewebefläschchen wurde entnommen. Durch leichtes Schütteln wurden die inzwischen sedimentierten Lymphozyten resuspendiert. Daraufhin wurden 5 µl der Suspension mit 120 µl 37 °C warmer LMP-Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim) vermengt und, wie bereits beschrieben, zur Durchführung der Einzelzell-Gelelektrophorese behandelt.

2.6 Methodischer Ablauf des Comet Assays

Die Einzelzell-Gelelektrophorese ist ein geeignetes Verfahren zur Charakterisierung von DNA-Schäden auf Einzelzellebene [102] (Abbildung 5). Für die Versuche der vorliegenden Arbeit wurde die alkalische Version des Comet Assays verwendet, wodurch DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen nachweisbar sind [102].

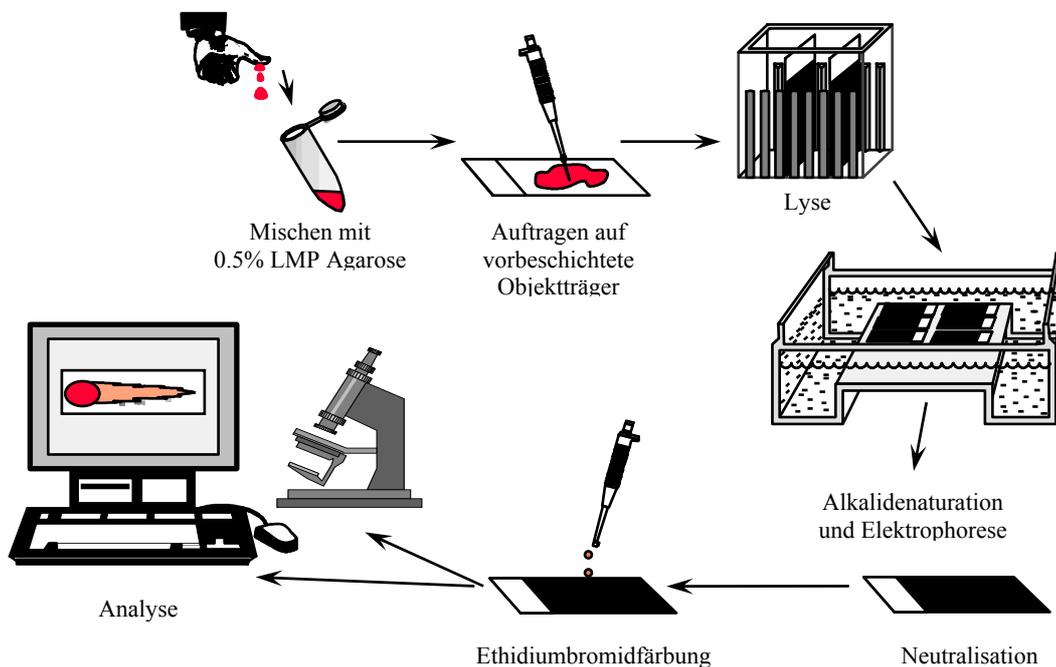


Abbildung 5: Schematischer Ablauf des Comet Assays (Einzelzell-Gelelektrophorese) in der alkalischen Version (verändert nach Speit und Hartmann [102]), LMP-Agarose= low melting point Agarose

2.6.1 Herstellung der für die Präparate verwendeten, mit Agarose benetzten Objektträger

Für die Herstellung wurden Objektträger mit Mattrand (Marienfeld, Lauda-Königshofen) verwendet. Eine Seite dieser Objektträger wurde durch einen Bleistiftstrich als Oberseite markiert, bevor sie mit 70%-igem Alkohol (Ethanol, Sigma-Aldrich, Steinheim) gereinigt wurden. Anschließend, nach der Trocknung des Alkohols, wurden sie in flüssiger 1,5%iger MEEO-Agarose (medium-electro-endoosmosis, Merck, Darmstadt) eingetaucht.

Zur Herstellung der Agarose wurden jeweils 1,5 g MEEO-Agarose in 100 ml PBS-Puffer in einem Erlenmeyerkolben (Schott Glas, Mainz) in der Mikrowelle (Bosch Mikrowellenherd 842C, Robert Bosch GmbH, Gerlingen) zweimal sprudelnd aufgekocht. Anschließend wurde die MEEO-Agarose in einem Becherglas (Schott Glas, Mainz) mit temperiertem Wasser auf 60°C heruntergekühlt.

Die Objektträger (etwa 100 Stück) wurden einzeln mit dem klaren Ende voran in 100 ml MEEO-Agarose eingetaucht, wobei das Beschriftungsfeld etwa bis zur Hälfte benetzt wurde, um eine bessere Haftung der MEEO-Agarose zu gewährleisten. Danach wurde die Unterseite abgewischt und die Objektträger horizontal auf Ablageplatten zur Trocknung abgelegt. Dort verblieben sie für mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur zum vollständigen Trocknen. Die so präparierten Objektträger konnten über mehrere Monate hinweg bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

2.6.2 Präparation der LMP-Agarose-Eppendorf-Reaktionsgefäße und Lyse-Vorbehandlung nach Blutprobenentnahme

Für die Untersuchung der Vollblut- und Lymphozytenproben der verschiedenen Messzeitpunkte wurden LMP-Agarose-Eppendorf-Reaktionsgefäße vorbereitet. Hierfür wurde 100 mg LMP-Agarose (Sigma-Aldrich, Steinheim) in 20 ml PBS (Invitrogen Cooperation, Paisley, Schottland) zweimal aufgekocht. Hiervon wurden je 125 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Micro Test Tubes 1,5 ml, Eppendorf, Hamburg) pipettiert. Die so hergestellten LMP-Agarose-Eppendorf-Reaktionsgefäße konnten mehrere Monate im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

Zur Vorbereitung für die Blutabnahmen wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße im Wasserbad zur Verflüssigung der Agarose aufgekocht und in einen auf 37 °C temperierten Heizblock (Thermostat 5320, Eppendorf, Hamburg) gegeben. Nach den jeweiligen Blutentnahmen wurden 6 µl heparinisiertes Vollblut in die 37°C heiße LMP-Agarose pipettiert, vermischt und gleichmäßig auf die präparierten Objektträger aufgetragen. Anschließend wurde der Objektträger mit einem Deckglas (Menzel-Gläser, Braunschweig) versehen und zur Ausgelierung der Agarose für ca. 4 Minuten in den Kühlschrank gelegt. Danach wurde das Deckglas im 90 Grad Winkel zur späteren Laufrichtung der DNA in der Elektrophoresekammer vom Objektträger abgezogen, um Artefakte bei der

Auswertung erkennen und aus der Wertung nehmen zu können. Für mindestens eine Stunde beziehungsweise höchstens 2 Tage lang wurden die so entstandenen Objektträger nun in eine mit 4 °C kalter gebrauchsfertiger Lysepufferlösung (Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim): 42,5 mM in Lyse-Stammlösung, DMSO (Merck, Darmstadt): 1,41 M in Lyse-Stammlösung) gefüllte, lichtgeschützte Küvette (Sarstedt, Nürmbrecht) gestellt. In diesem Schritt vollzieht sich ein Abbau sämtlicher Zellmembranen, wodurch die DNA freigesetzt wird, jedoch noch in Form des vormaligen Zellkernes in der Agarose fixiert bleibt. Die Lyse wurde unter Lichtabschluss durchgeführt, um zusätzliche DNA-Schäden zu verhindern. Die Lyse-Stammlösung besteht aus NaCl (2,5 M, Sigma-Aldrich, Steinheim), Na₂EDTA (100mM, Sigma-Aldrich, Steinheim) und Tris-Base (10mM, Sigma-Aldrich, Steinheim). Zur Herstellung der Lysepufferlösung wurden zu 89 ml dieser Lyse-Stammlösung 1 ml Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Steinheim) und 10 ml DMSO (Merck, Darmstadt) zugegeben und vermischt. Vor Gebrauch wurde sie für mindestens eine Stunde bei 4 °C temperiert. Zu den Messzeitpunkten 2, 4 und 5 wurde mit den isolierten Lymphozyten direkt vor und direkt nach der HBO-Exposition in gleicher Weise verfahren, wie hier mit den Vollblutproben beschrieben.

Es wurde darauf geachtet, dass die Verarbeitungszeit der Vollblut-beziehungsweise Lymphozytenproben 10 Minuten nicht überschritt, um eine Reparatur der DNA-Schäden zu vermeiden.

2.6.3 Alkalidenaturierung und anschließende Elektrophorese

Nach der Lyse wurde eine Elektrophoresekammer (Sub-Cell GT Basic, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), in welcher die Objektträger in horizontaler Lage positioniert worden waren (Abbildung 6), in ein Eisbad gestellt. Die Objektträger wurden für die Alkalidenaturierung mit dem auf 4 °C gekühlten Alkali-Elektrophoresepuffer (NaOH (Merck, Darmstadt): 300 mM, Na₂EDTA: 1 mM) bei einem pH-Wert von größer als 13 überschichtet und 40 Minuten lang unter Schutz direkter Lichteinstrahlung so belassen. Im Zuge der Alkalidenaturierung kommt es zu einer Entspiralisierung der DNA und zu einer Überführung von alkalilabilen Stellen in DNA-Strangbrüche. Dies ist nötig, da mit dem Comet Assay nur Strangbrüche quantifiziert werden und mit Hilfe dieses Umweges auch die alkalilabilen Stellen erfasst werden können, die ansonsten nicht berücksichtigt werden würden. Somit

Material und Methoden

können mehr Informationen über vorhandene DNA-Schäden gewonnen werden [71]. Dies ist eine sinnvolle Modifikation des Comet Assays, da oxidative DNA-Schäden nicht nur in Form von Strangbrüchen sondern auch als Basenmodifikationen und Veränderungen am Zuckerphosphatgerüst der DNA imponieren, die nicht unmittelbar zu Strangbrüchen führen, jedoch durch die Alkalibehandlung in diese überführt werden können.

Im Anschluss an die Alkalibehandlung wurde eine 40-minütige Elektrophorese im selben Elektrophoresepuffer durchgeführt. Hierzu wurde die Pufferhöhe so reguliert, dass bei einer angelegten Spannung von 25 V ein Strom von 300 mA floss (Spannungsversorgung: Consort E835, LTF Labortechnik, Wasserburg/Bodensee).



Abbildung 6: Elektrophoresekammer im Eiswasserbad zur Durchführung des Comet Assays mit Spannungsquelle im Hintergrund

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger neutralisiert. Hierfür wurden sie aus der Elektrophoresekammer entnommen, um sie dann anschließend dreimal hintereinander je 5 Minuten lang mit Neutralisationspuffer (Tris-Base (Sigma-Aldrich, Steinheim): 48,5 mg/ml) zu überschichten. Danach wurden die Präparate mit dH₂O abgespült und anschließend 5 Minuten lang in

einer Küvette mit 99,8% Ethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim) dehydriert. Zuletzt wurden sie unter Lichtabschluss horizontal für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet.

2.6.4 Anfärbung der DNA und fluoreszenzmikroskopische Auswertung der Präparate

Um die Präparate auszuwerten, wurden diese zunächst mit 50 µl DNA-bindendem Farbstoff Ethidiumbromid (20 µg/ml, Carl Roth, Karlsruhe) überschichtet und mit einem Deckglas versehen. Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Tokyo, Japan) wurde bei 400-facher Vergrößerung die Auswertung vorgenommen. Dabei war das Mikroskop über eine CCD-Kamera an einem PC angeschlossen (Abbildung 7). So konnte mit dem Bildanalyseprogramm Comet Assay II V2.11 (Perceptive Instruments, Haverhill, UK) das „Tailmoment“ jeder einzelnen zu untersuchenden Zelle ermittelt werden. Die Betrachtung der Präparate erfolgte mit einem Anregungsfilter der Wellenlänge 515 nm - 560 nm und einem Barrierefilter von 590 nm. Das Tailmoment setzt sich zusammen aus dem Produkt der relativen Fluoreszenzintensität des Kometenschweifes gegenüber dem Kometenkopf und der auf den Schwerpunkt des Kopfes korrigierten Wanderungslänge der DNA aus dem Kernbereich. Die vom Programm hierzu ermittelten Messgrößen sind Schweif- und Kopflänge sowie Leuchtintensität von Schweif und Kopf. Der Kometenschweif entsteht dadurch, dass chromosomale DNA aus dem Bereich des ehemaligen Zellkernes in Richtung Anode wandert.



Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera und PC-Bildanalysesoftware zur Auswertung der mit Ethidiumbromid angefärbten DNA-Präparate

Pro Objektträger wurden 50 Zellen ausgewählt und ausgewertet. Dabei wurden jedoch nur Zellkerne betrachtet, die eine runde und abgegrenzte Form aufwiesen und im zentralen Bereich des Präparats lagen. Zellkerne in den Randbereichen des Objektträgers wurden nicht zur Auswertung herangezogen, da diese erfahrungsgemäß unspezifische DNA-Effekte aufweisen können [92]. Des Weiteren wurden diejenigen Zellen nicht ausgewertet, die so nahe beieinander lagen, dass sie nicht mehr einzeln ins Auswerteraster der Software passten oder deren Abbilder sich überschneiden. Nach der Vermessung von 50 Zellen wurde ein Mittelwert der Tailmoments für das jeweilige Präparat berechnet und als Maß der DNA-Schädigung herangezogen (Abbildung 8).

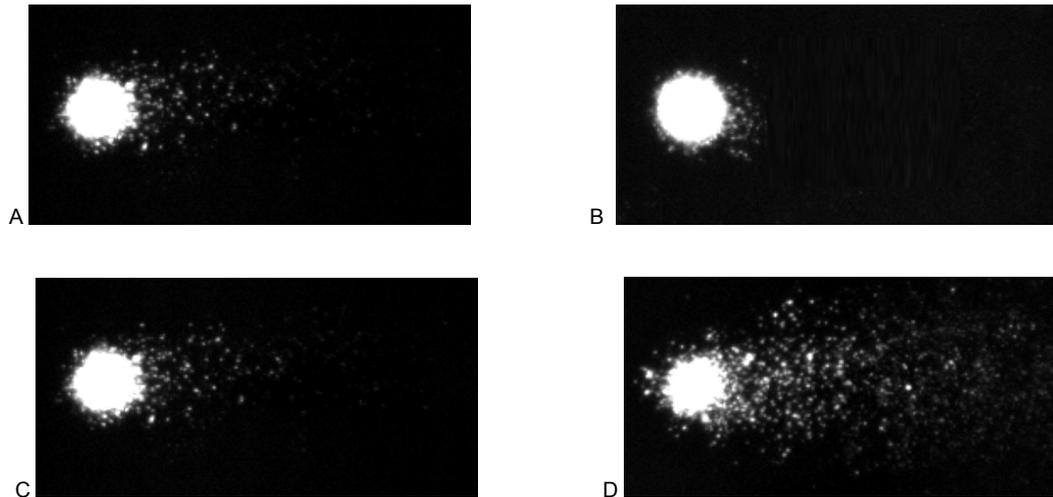


Abbildung 8: Ergebnisse des Comet Assays bei unterschiedlich starken DNA-Schadigungsgraden. Im mikroskopischen Bild erkennt man bei einer 400-fachen Vergrößerung einen „Kometen“, wobei es sich beim „Kometenkopf“ um den ursprünglichen Zellkern und beim „Kometenschweif“ um die in Richtung Anode gewanderte chromosomale DNA handelt.

(A) ungeschädigte (Tailmoment $\sim 0,1$), (B) schwach geschädigte (Tailmoment $\sim 0,4$), (C) mittel geschädigte (Tailmoment $\sim 0,8$) und (D) stark geschädigte DNA (Tailmoment > 1)

2.7 Statistische Auswertung

Im Rahmen einer deskriptiven Statistik wurden für die Messergebnisse der verschiedenen Versuchsgruppen und der verschiedenen Messzeitpunkte der Median, das 1. und 3. Quartil sowie das 10 %- und 90 %- Quantil ermittelt. Signifikante Ergebnisse sind in den Diagrammen mit Symbolen gekennzeichnet.

Die statistische Auswertung wurde durchgeführt, indem zuerst mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests ausgeschlossen wurde, dass es sich bei den ermittelten Messdaten um normalverteilte Werte handelt. Danach wurde unter Verwendung des Mann-Whitney Rank Sum Test überprüft, ob sich die Ergebnisse der beiden Medikamentengruppen bei gleichem MZP signifikant voneinander unterscheiden. Ein p-Wert unter 0,05 wurde hierbei als signifikant erachtet.

Für die Vergleiche der verschiedenen MZP einer Medikamentengruppe wurde der Friedman-Test angewandt.

Beim Vergleich der Messergebnisse vor HBO- mit denen nach HBO-Behandlung einer Medikamentengruppe kam der Wilcoxon Signed Rank Test zur Anwendung. Zur Berechnung und statistischen Auswertung wurde das Programm Sigmastat[®] in der Version 3.0, für die graphische Darstellung der Ergebnisse das Programm Sigma Plot[®] in der Version 8.0 verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Erhebungsdaten

Für die Versuche wurden 21 deutsche Landschweine beiderlei Geschlechts verwendet. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der IK-1001-Gruppe kamen 8 Tiere zur Verwendung. Ein Tier verstarb bereits während des Versuchs. Die 4 übrigen Tiere wurden vor Studienbeginn für Vorversuche verwendet. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Schweinen betrug in der Kontrollgruppe 5:3. In der IK-1001-Gruppe betrug dieses Verhältnis m:w = 7:1

3.2 Hämodynamik, Gasaustausch, Säure-Base- und metabolische Parameter

Wie aus der Tabelle 1 zu entnehmen ist, waren der mittlere arterielle Druck und der zentralvenöse Druck weder innerhalb noch zwischen den beiden Gruppen signifikant verändert. Bei der Betrachtung der Herzfrequenz erkennt man innerhalb der Gruppen signifikante Schwankungen. Es zeigten sich in der IK-1001-Gruppe zu allen Messzeitpunkten nach Clamping signifikant niedrigere Herzfrequenz-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Schlagvolumen änderte sich nicht signifikant im zeitlichen Verlauf des Versuches innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppen und war zu keinem Messzeitpunkt signifikant zwischen den beiden Gruppen verändert. Ab dem Zeitpunkt 2h nach Clamping ergaben sich signifikant niedrigere Werte in der IK-1001-Gruppe für die Sauerstoffaufnahme und die Kohlendioxidproduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Vergleich zum jeweiligen Initialwert waren Signifikanzen der Sauerstoffaufnahme in beiden Gruppen vor Clamping und 8h nach Clamping sowie in der IK-1001-Gruppe 4h nach Clamping zu beobachten. Die Tiere der Kontrollgruppe produzierten zu den Zeitpunkten 1h und 2h nach Clamping signifikant höhere Mengen an Kohlendioxid im Vergleich zum Initialwert. In der IK-1001-Gruppe war dies nur zum Zeitpunkt 2h nach Clamping der Fall. Der arterielle Pa_{O_2} -Wert war in der Ikaria-Gruppe am Ende des Experiments signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Beim Vergleich mit dem Initialwert der jeweiligen Gruppe waren alle Pa_{O_2} -Werte nach Clamping signifikant erniedrigt.

Ergebnisse

Der arterielle Pa_{CO₂}-Wert und der Säure-Base-Status (pH und BE) waren innerhalb der Gruppen jeweils signifikant verändert im Vergleich zum Initialwert, wobei es zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen kam.

Tabelle 1: Hämodynamik, Gasaustausch, Säure-Base- und metabolische Parameter.

MAP=mittlerer arterieller Blutdruck, ZVD=zentraler Venendruck, HF=Herzfrequenz, SV=Schlagvolumen, O₂=Sauerstoff, CO₂=Kohlendioxid, Pa_{O₂}=arterieller Sauerstoffpartialdruck, Pa_{CO₂}=arterieller Kohlendioxidpartialdruck, pH=Kennzahl für den Säuregrad einer Flüssigkeit, BE=Base Excess. Aufgeführt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil. * = p< 0.05 für Kontrolle vs. IK-1001. # = p< 0.05 vs. Initialwert

		Initial	Vor Clamping	1h nach Clamping	2h nach Clamping	4h nach Clamping	8h nach Clamping
MAP (mmHg)	<i>Kontrolle</i>	94 (85-112)	97 (90-108)	94 (82-99)	96 (89-106)	91 (84-96)	90 (83-105)
	<i>IK-1001</i>	98 (93-104)	100 (90-101)	95 (87-97)	93 (89-97)	91 (87-103)	94 (79-96)
ZVD (mmHg)	<i>Kontrolle</i>	10 (9-11)	10 (9-10)	11 (10-11)	10 (9-10)	10 (10-12)	12 (10-13)
	<i>IK-1001</i>	11 (10-12)	10 (10-12)	12 (10-12)	12 (11-13)	12 (12-13)	12 (12-14)
HF (1/min)	<i>Kontrolle</i>	80 (72-82)	69 # (55-73)	115 #* (95-133)	103 #* (72-109)	78 * (65-82)	56 #* (51-66)
	<i>IK-1001</i>	71 (59-78)	53 # (48-65)	76 (59-83)	56 # (43-66)	46 # (39-58)	46 # (41-52)
SV (ml)	<i>Kontrolle</i>	75 (66-82)	72 (63-81)	83 (68-88)	77 (68-86)	81 (62-88)	90 (73-94)
	<i>IK-1001</i>	73 (61-83)	82 (71-92)	95 (82-110)	96 (82-101)	83 (77-90)	82 (69-92)
O₂ Aufnahme (ml/kg/min)	<i>Kontrolle</i>	5.0 (4.2-5.6)	4.5 # (3.5-5.1)	5.2 (4.3-5.6)	5.1 * (4.5-5.9)	5.0 * (3.9-5.8)	4.5 #* (3.5-5.2)
	<i>IK-1001</i>	4.4 (4.2-4.8)	4.1 # (3.8-4.2)	4.6 (4.4-4.8)	4.2 (4.0-4.5)	3.9 # (3.6-4.1)	3.8 # (3.2-3.9)
CO₂ Produktion (ml/kg/min)	<i>Kontrolle</i>	3.0 (2.6-3.9)	2.8 (2.6-3.5)	3.9 # (3.4-4.4)	3.9 #* (3.1-4.3)	3.6 * (2.9-4.1)	3.3 * (2.5-3.6)
	<i>IK-1001</i>	2.6 (2.2-3.1)	2.6 (2.2-2.9)	3.2 # (2.8-3.5)	2.9 (2.4-3.2)	2.6 (2.5-3.0)	2.4 (2.4-2.6)
Pa_{O₂} (mmHg)	<i>Kontrolle</i>	152 (145-156)	154 (150-159)	127 # (119-135)	128 # (116-131)	132 # (121-145)	144 #* (135-150)
	<i>IK-1001</i>	150 (148-158)	154 (152-158)	114 # (109-126)	134 # (124-139)	140 # (125-143)	92 # (66-107)
Pa_{CO₂} (mmHg)	<i>Kontrolle</i>	34 (31-38)	34 (33-38)	48 # (39-52)	46 # (39-51)	44 # (37-48)	40 # (38-40)
	<i>IK-1001</i>	37 (34-37)	36 (35-38)	44 # (41-46)	40 # (39-42)	37 (36-40)	40 # (37-45)

Fortsetzung siehe nächste Seite (S.29)

Ergebnisse

Fortsetzung Tabelle 1: Hämodynamik, Gasaustausch, Säure-Base- und metabolische Parameter.

MAP=mittlerer arterieller Blutdruck, ZVD=zentraler Venendruck, HF=Herzfrequenz, SV=Schlagvolumen, O₂=Sauerstoff, CO₂=Kohlendioxid, P_{aO₂}=arterieller Sauerstoffpartialdruck, P_{aCO₂}=arterieller Kohlendioxidpartialdruck, pH=Kennzahl für den Säuregrad einer Flüssigkeit, BE=Base Excess. Aufgeführt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil. * = p< 0.05 für Kontrolle vs. IK-1001. # = p< 0.05 vs. Initialwert

pH	Kontrolle	7.6 (7.5-7.6)	7.6 (7.5-7.6)	7.4 # (7.3-7.4)	7.4 # (7.3-7.5)	7.5 # (7.4-7.5)	7.5 # (7.4-7.5)
	IK-1001	7.6 (7.5-7.6)	7.6 (7.5-7.6)	7.4 # (7.3-7.4)	7.5 # (7.4-7.5)	7.5 # (7.5-7.6)	7.5 # (7.4-7.6)
BE (mmol/l)	Kontrolle	12 (10-13)	10 (8-11)	1 # (0-5)	3 # (-1-9)	8 # (6-9)	8 # (7-10)
	IK-1001	13 (10-13)	10 (8-11)	3 # (2-5)	6 # (5-8)	7 # (6-10)	7 # (6-9)

3.3 IK-1001 Konzentrationen

An 7 verschiedenen Zeitpunkten wurde die Blutkonzentration von IK-1001 bestimmt, um zu gewährleisten, dass die Applikation des Studienmedikaments in der IK-1001-Versuchsgruppe erfolgreich war. In Abbildung 9 sind die Daten aller Blutkonzentrationen jeweils mittels Median, 1. und 3. Quartil sowie 10%- und 90%-Quantil dargestellt.

2 Stunden vor dem Aorten-Clamping wurde mit der ersten Verabreichung des Studienmedikaments begonnen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte eine Bolusgabe von 0,2 mg/kg. Auf diese Gabe folgte eine Dauerinfusion von 2 mg/kg/h bis zum Versuchsende. Zur Überprüfung der Applikation wurden jeweils die Initialwerte erhoben gefolgt von den Daten zu den Messzeitpunkten 2 Stunden nach Infusionsstart (vor Clamping), nach Clamping, sowie 1h, 2h, 4h und 8h nach Clamping. Dabei lagen die Werte in Bereichen zwischen 0,6 µM und 1,5 µM vor Clamping und zwischen 0,9 µM und 1,9 µM nach Clamping. Im weiteren Verlauf der Reperfusionphase stiegen die Blutkonzentrationen des Studienmedikaments stetig an bis auf Werte zwischen 1,4 µM und 3 µM gegen Ende des Versuches.

Ergebnisse

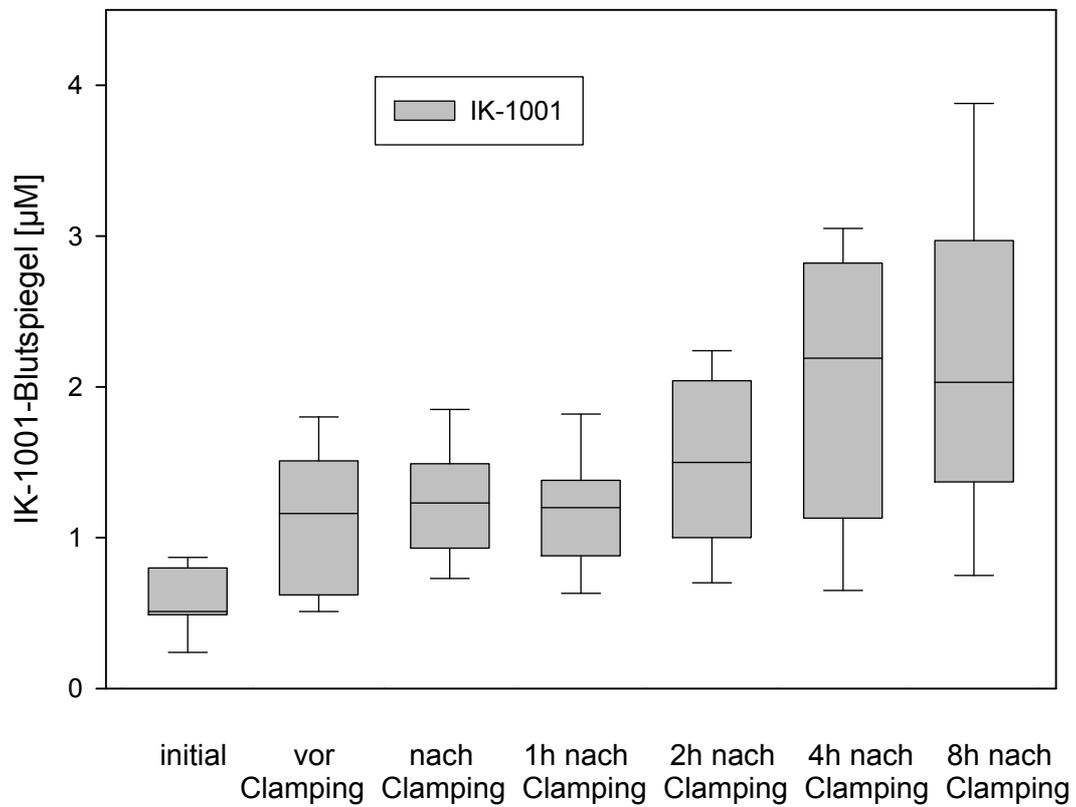


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der IK-1001-Blutkonzentrationen in μM bei den mit IK-1001 behandelten Tieren. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil sowie das 10 %- und 90 %- Quantil.

3.4 Vollblutproben und Comet Assays

Die spontane DNA-Migration zeigte vor dem Clamping in der IK-1001-Gruppe und in der Kontrollgruppe Tailmoment-Werte um 0.15. Eine Stunde nach Clamping zeigte sich in beiden Versuchsgruppen ein sehr leichter Anstieg mit Werten bis zu 0,2. Zwei Stunden nach Clamping wurden Werte bis zu 0.3 erreicht. Im weiteren Verlauf, 4 und 8 Stunden nach Clamping, ließ sich eine Abnahme verzeichnen bis auf Werte nahe des Ausgangswertes. Zu keinem der Messzeitpunkte war eine Signifikanz zwischen den Werten innerhalb einer Gruppe zu erkennen. Zwischen den beiden Versuchsgruppen war ebenfalls zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied festzustellen.

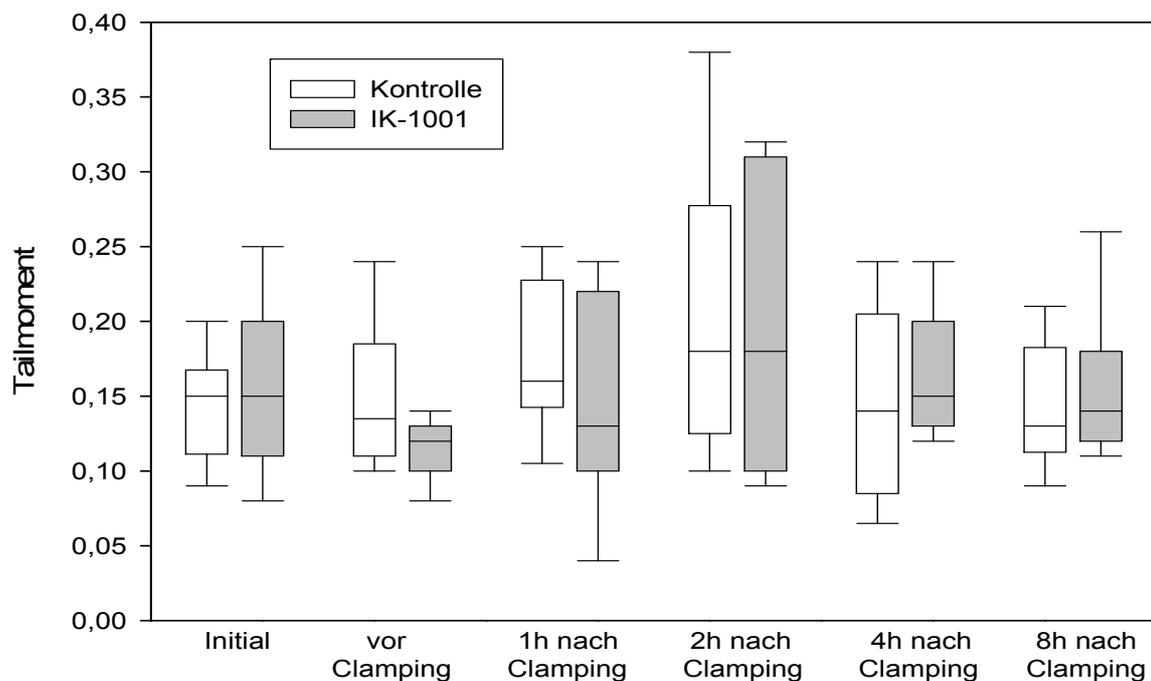


Abbildung 10: Darstellung des Zeitverlaufes der durch Operationsbedingungen und Ischämie-Reperfusionsequenzen induzierten DNA (deoxyribonucleic acid)-Schädigungen im Vollblut in der Kontroll- und in der IK-1001-Tiergruppe. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil sowie das 10 %- und 90 %- Quantil.

3.5 HBO-Exposition von Lymphozyten und Comet Assay

Sowohl innerhalb der Kontrollgruppe als auch innerhalb der IK-1001-Gruppe konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Vor-HBO-Werte mit den Nach-HBO-Werten erkannt werden. Im zeitlichen Verlauf konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede sowohl innerhalb der Vor-HBO-Werte als auch innerhalb der Nach-HBO-Werte innerhalb einer Gruppe festgestellt werden. Es konnte auch zu keinem Messzeitpunkt eine Signifikanz zwischen den beiden Gruppen beobachtet werden.

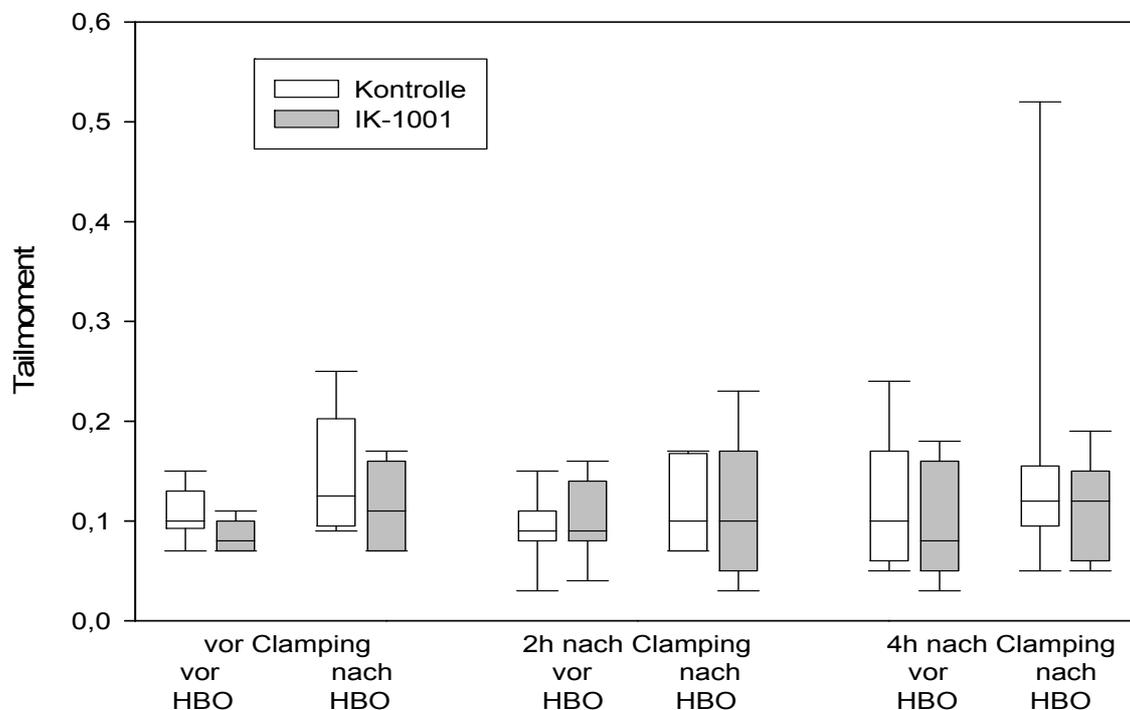


Abbildung 11: Darstellung des Zeitverlaufes der durch Operationsbedingungen und Ischämie-Reperfusionen-Sequenzen sowie durch hyperbare Oxygenierung (HBO) induzierten DNA (deoxyribonucleic acid) -Schädigungen in Leukozyten in der Kontroll- und in der IK-1001-Tiergruppe. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil sowie das 10 %- und 90 %-Quantil.

3.6 TNF- α

Im zeitlichen Verlauf des Versuches kam es innerhalb der Kontrollgruppe zu einem stetigen Anstieg des TNF- α -Wertes. Dies führte jedoch nur zu einem Messzeitpunkt, 8h nach Clamping, zu einem signifikanten Anstieg im Vergleich zum Initialwert. Innerhalb der IK-1001-Gruppe waren zu jedem Messzeitpunkt signifikante höhere Werte gegenüber dem Initialwert zu beobachten. Zwischen den beiden Versuchsgruppen ergab sich zu keinem Messzeitpunkt eine Signifikanz bezüglich der TNF- α -Werte.

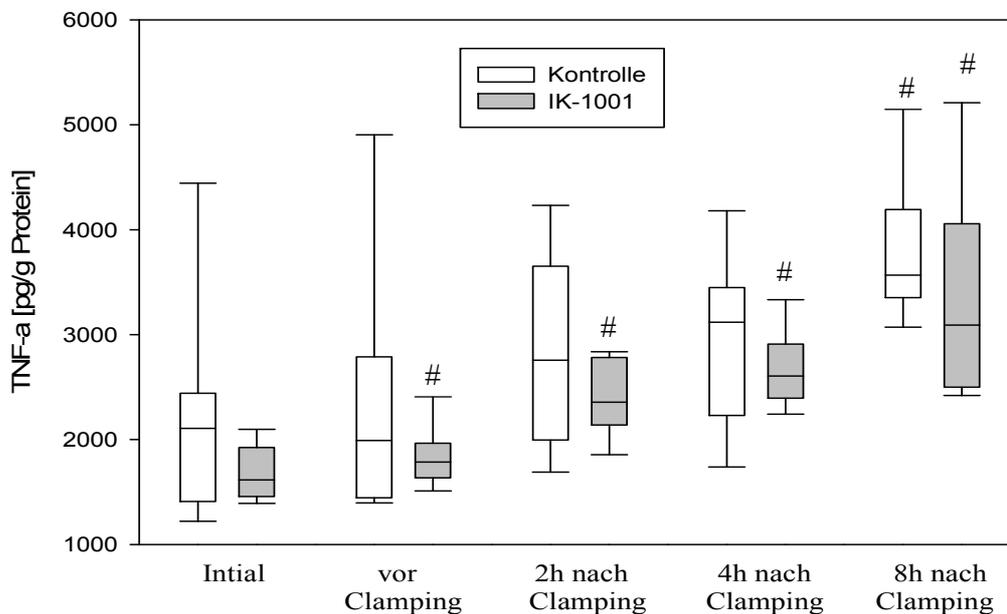


Abbildung 12: Darstellung des TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) in pg/g Protein. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil sowie das 10 %- und 90 %- Quantil. # = $p < 0,05$ für IK-1001 vor Clamping, 2h, 4h und 8h nach Clamping sowie für Kontrolle 8h nach Clamping vs. initial.

3.7 8-Isoprostan-Konzentrationen

Wie in der Abbildung 13 dargestellt ist, kam es über den Versuchszeitraum bei den Tieren der Kontrollgruppe bei jedem Messzeitpunkt zu einem signifikanten Anstieg der 8-Isoprostane-Level gegenüber dem Initialwert. Bei der IK-1001-Gruppe kam es auch zu einem Anstieg, der jedoch nur in zwei Fällen, 4h und 8h nach Clamping, signifikant gegenüber dem Ausgangswert erhöht war. Zu keinem Zeitpunkt waren die 8-Isoprostane-Level der Kontrollgruppe signifikant gegenüber der IK-1001-Gruppe verschieden.

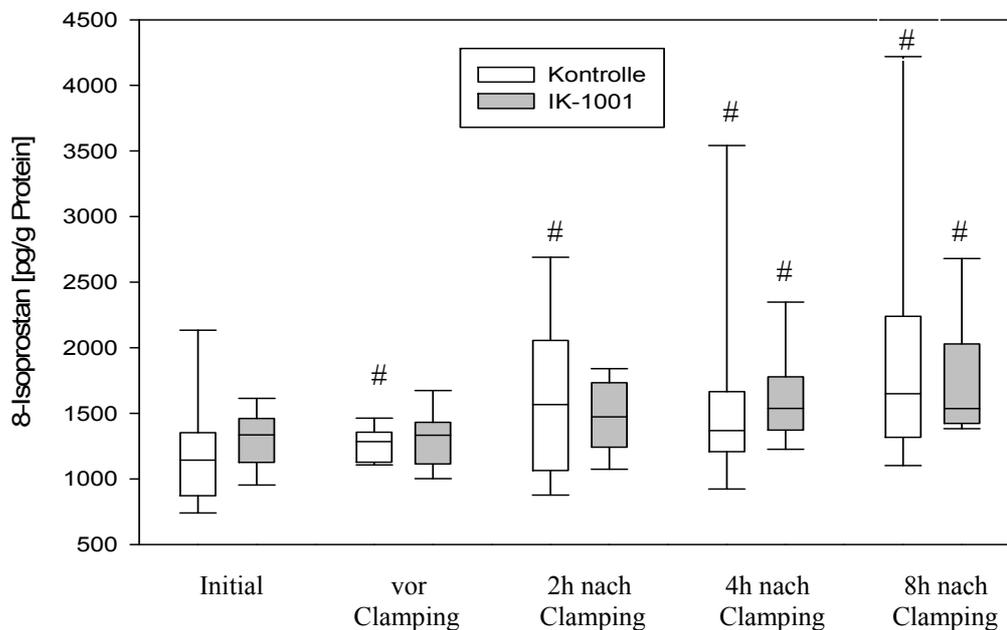


Abbildung 13: Darstellung der 8-Isoprostan-Level im Plasma bezogen auf den Gesamtproteingehalt in pg/g Protein. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil sowie das 10 %- und 90 %- Quantil. # = $p < 0,05$ für Kontrolle vor Clamping, 2h, 4h und 8h nach Clamping sowie für IK-1001 8h nach Clamping vs. initial.

3.8 Temperatur

Im zeitlichen Verlauf des Versuches ist in beiden Versuchsgruppen eine Abnahme der Temperatur festzustellen. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der IK-1001-Gruppe ist die Temperatur zu allen Messzeitpunkten signifikant gegenüber den Initialwerten erniedrigt. Es lässt sich zudem eine stärkere Senkung der Temperatur in der IK-1001-Gruppe als in der Kontrollgruppe feststellen. Dieser Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen weist jedoch nur zu einem Messzeitpunkt, 8h nach Clamping, eine Signifikanz auf.

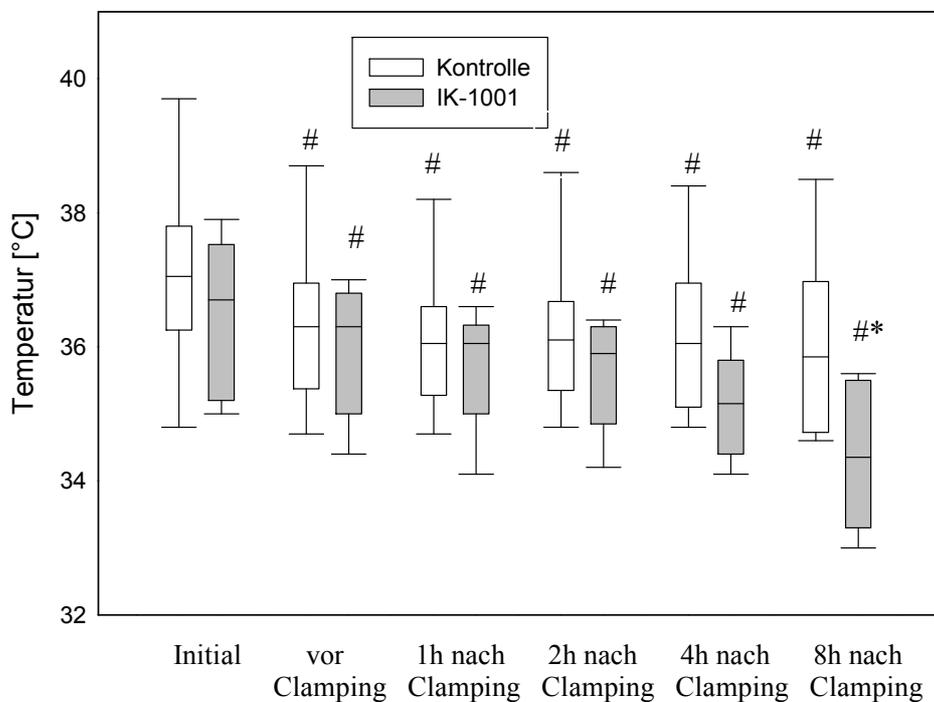


Abbildung 14: Darstellung der Temperatur in °C. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil sowie das 10 %- und 90 %- Quantil. # = $p < 0.05$ für Kontrolle vor Clamping, 1h, 2h, 4h und 8h nach Clamping sowie für IK-1001 vor Clamping, 1h, 2h, 4h und 8h nach Clamping vs. Initial. * = $p < 0,05$ für IK-1001 8h nach Clamping vs. Kontrolle.

3.9 Noradrenalingabe zur Kreislaufstabilisierung

Nach Freigabe der Aorta wurde Noradrenalin nach Bedarf kontinuierlich infundiert, um in der frühen Reperfusionphase den arteriellen Blutdruck auf über 80% von dem Wert vor Clamping zu halten. In der Abbildung 15 sind die bei den verschiedenen Gruppen im Mittel benötigten Noradrenalinmengen in Mikrogramm pro Kilogramm Körpergewicht gegenübergestellt. Die in der IK-1001-Gruppe verabreichte Menge an Noradrenalin ist signifikant niedriger als die in der Kontrollgruppe.

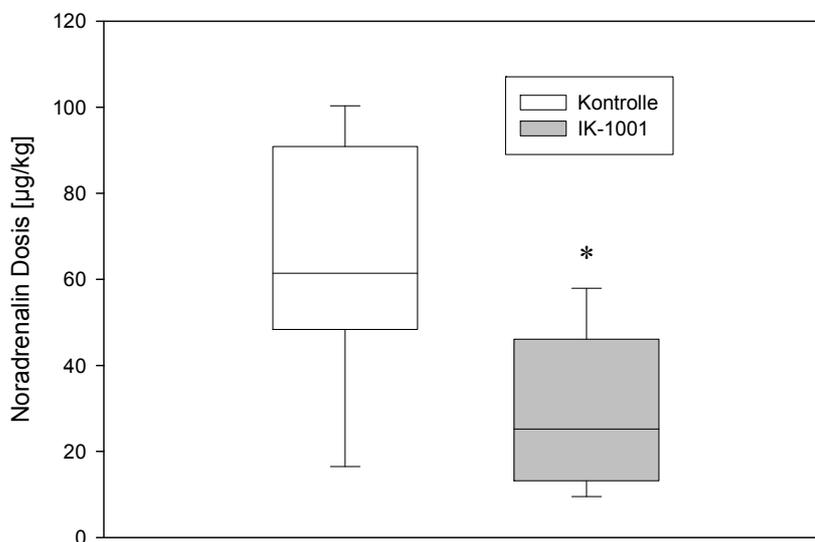


Abbildung 15: Darstellung der verabreichten Mengen Noradrenalin zur Kreislaufstabilisierung in µg/kg. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil sowie das 10 %- und 90 %-Quantil. * = $p < 0,05$ für IK-1001 vs. Kontrolle.

3.10 Noradrenalin-Zeit

Aus der Grafik (Abbildung 16) wird deutlich, dass die Tiere aus der IK-1001-Gruppe über einen signifikant kürzeren Zeitraum Noradrenalin verabreicht bekommen haben im Vergleich zu den Tieren in der Kontrollgruppe.

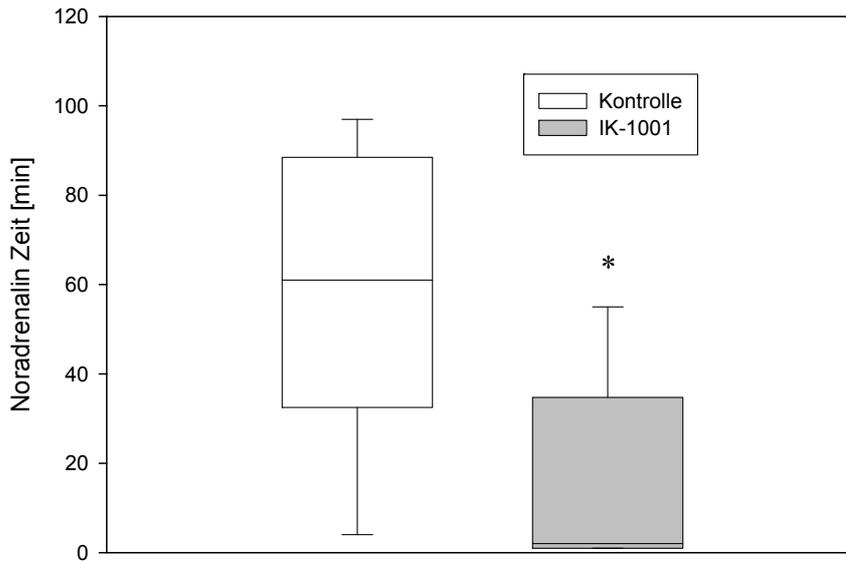


Abbildung 16: Darstellung der Noradrenalin-Zeit in min. Dargestellt sind jeweils der Median, das 1. und 3. Quartil sowie das 10 %- und 90 %- Quantil. * = $p < 0,05$ für IK-1001 vs. Kontrolle.

4 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob das Studienmedikament IK-1001 (Na_2S), ein Sulfid-Donor, den beim thorakalen Aorten-Clamping an Schweinen zu erwartenden Ischämie- und Reperfusionsschaden in irgendeiner Weise beeinflusst.

Es wurde geprüft, ob der Sulfid-Donor einen Einfluss auf DNA-Strangbrüche in vivo und Auswirkungen auf die Induktion der DNA-Schädigung bei dem oben genannten operativen Verfahren und dessen Folgen hat.

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob IK-1001 im Rahmen einer HBO-Exposition ex vivo einen Einfluss auf die Induktion oxidativer DNA-Schäden besitzt.

Im Folgenden sollen neben den Charakteristika dieser Studie die diesbezüglichen Ergebnisse beleuchtet und diskutiert werden.

4.1 Das Studienmodell

In dieser Studie wurde beim Schwein ein aortales Crossclamping durchgeführt und ein Zustand der suspended animation durch Applikation des Studienmedikaments IK-1001 induziert. Dafür kamen Hausschweine beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht, das im Median bei 44 (42-54) kg lag, zur Verwendung. Das Studienmodell sollte der klinischen Routine möglichst nahe kommen. Es wurde daher die Tierspezies Schwein ausgewählt, da sie sich für die Realisierung dieser Studie hervorragend eignet. Schweine wurden aufgrund ihrer großen Ähnlichkeit zum Menschen bezüglich ihrer Prädisposition gegenüber oxidativem Stress und ihrem antioxidativen Profil des Gewebes ausgewählt [47, 48]. Zum einen ist es bei diesen Tieren sehr gut möglich, die erforderlichen Organ- und Gefäßpräparationen zu vollziehen, die speziellen Katheter und verschiedenen Messgeräte einzubringen und ausreichend Blut zu entnehmen, um damit die nötigen Analysen durchzuführen und die entscheidenden Ergebnisse zu gewinnen. Zum anderen besitzt das Schwein allen möglichen Spezies voran die größte Homologie mit dem Menschen, sei es anatomisch bezüglich Gefäßversorgung sowie Lage und Konfiguration der abdominellen und thorakalen Organe, biochemisch, physiologisch, pathophysiologisch oder metabolisch. Viele Parameter und physiologisch gemessene Werte ähneln denen des Menschen [12, 36, 37, 52, 67, 98].

4.2 Hämodynamik, Gasaustausch, Säure-Base- und metabolische Parameter

Wie aus der Tabelle 1 zu entnehmen ist, waren der mittlere arterielle Druck und der zentralvenöse Druck in den beiden Gruppen vergleichbar. In Studien an Mäusen konnte bereits gezeigt werden, dass unter der Behandlung mit H₂S der MAP unverändert blieb [39, 106, 112].

Das Schlagvolumen änderte sich nicht signifikant im zeitlichen Verlauf des Versuches. Zudem fiel eine Abnahme der Herzfrequenz auf, welche in der IK-1001-Versuchsgruppe signifikant ausgeprägter war. Dieser Effekt könnte auf eine durch H₂S hervorgerufene Depression der Sinusknotenaktivität zurückgeführt werden, welche in der Folge eine Bradykardie auszulösen vermag [112].

Die Senkung der Herzfrequenz wurde von einer reduzierten Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidproduktion begleitet. Dies deckt sich mit dem Erkenntnis, dass das Unclamping der Aorta mit einem vorübergehenden Anstieg der Kohlendioxid-Freisetzung [2] und des Sauerstoffverbrauchs [85] assoziiert ist. Dies spiegelt sich auch in den erhöhten Pa_{CO₂}- und erniedrigten Pa_{O₂}-Werten in der Zeit nach dem Clamping in beiden Versuchsgruppen gleichermaßen wieder.

Am Ende des Versuches war in den Tieren der IK-1001-Gruppe ein signifikant niedriger Pa_{O₂}-Wert zu finden, was vermuten lässt, dass eine gewisse Lungentoxizität vorhanden war. Es ist gut belegt, dass gasförmiges H₂S ein Reizmittel der Lunge ist [33]. Aus diesem Grund wurde bei diesem Experiment der parenteral verabreichbare H₂S-Donor Na₂S verwendet. Nichtsdestotrotz scheint eine gewisse Lungentoxizität vorhanden gewesen zu sein.

Während der Ischämie kommt es zur Ausbildung einer Azidose [80]. Dieser pH-Abfall durch die Ischämie-Phase spiegelt sich auch in den Werten dieser Studie wieder. Zwischen den Gruppen gibt es zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied, sodass in Hinsicht auf den pH-Wert bei beiden Gruppen vergleichbare Bedingungen herrschten. Nach der Ischämie-Phase ist der Pa_{CO₂}-Wert in beiden Gruppen gleichermaßen signifikant erhöht im Vergleich zu davor. Einhergehend mit der durch die Ischämie bedingten Azidose ist der BE in beiden Gruppen erhöht. Folglich waren der arterielle P_{CO₂}-Wert und der Säure-Base-Status (pH und BE) in beiden Gruppen vergleichbar. Insgesamt ist aus der Abbildung 10 ersichtlich, dass es in Bezug auf Hämodynamik, Gasaustausch,

Säure-Base- und metabolische Parameter zu keinen größeren signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Versuchsgruppen kam, die nicht erwartet gewesen wären. Aufgrund dieser Beobachtung kann man sagen, dass zwischen den Versuchsgruppen vergleichbare Bedingungen herrschten.

4.3 IK-1001 Konzentrationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Blutkonzentrationen von IK-1001 untersucht, um zu gewährleisten, dass die Applikation des Studienmedikaments in der IK-1001-Versuchsgruppe erfolgreich war.

Es gibt Parameter in dieser Studie, die darauf hinweisen, dass die hier erreichten Na_2S -Konzentrationen ausreichten, um wirksam zu werden. So fiel die Körpertemperatur (Abbildung 14) in beiden Gruppen ab, obwohl die äußere Wärmezufuhr bei allen Versuchstieren identisch war. Dieser Effekt war jedoch, entsprechend anderer Studien [21, 61, 112], in der IK-1001-Gruppe bis zum Ende des Versuches ausgeprägter. Zudem war in der IK-1001-Gruppe die Sauerstoff-Aufnahme und die Kohlendioxidproduktion in den letzten 6 Stunden der Reperfusion niedriger [21, 61, 112]. In dieser Studie wurde des Weiteren ein signifikanter Abfall der Herzfrequenz in der IK-1001-Versuchsgruppe festgestellt. Es gibt einige Studien, die diese Beobachtung im Zusammenhang mit H_2S sehen [106, 112, 120]. Dies lässt vermuten, dass H_2S auch in dieser Studie einen Effekt darauf hatte. Allerdings liegen die in dieser Studie gemessenen Konzentrationen im Bereich bis zu 3 μMol . Aus der Studie von Furne et al geht hervor, dass Konzentrationen von mindestens 100 μM gemessen werden müssen, um die zelluläre Funktion zu verändern [43]. Es wäre daher auch möglich, dass die Herzfrequenz unabhängig von H_2S absinkt. Für eine von H_2S -unabhängige Veränderung der Herzfrequenz spricht in der hier durchgeführten Studie, dass die Herzfrequenz eher kontinuierlich sinkt, wohingegen der Verlauf des Anstiegs der H_2S -Konzentration nicht dem kontinuierlichen Sinken der Herzfrequenz entspricht. Folglich stellt sich die Frage, was dann für die Herzfrequenzveränderung verantwortlich ist. Aus der Studie von Whitfield NL geht hervor, dass eine Bradykardie allein durch die Hypoxie verursacht wurde, ohne dass im Blut signifikante Mengen an H_2S gemessen wurden [116]. Gegen die Annahme, das Absinken der Herzfrequenz sei allein durch die Hypoxie hervorgerufen worden,

spricht jedoch, dass dadurch der signifikante Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht erklärt werden kann. Schließlich herrschte Hypoxie in beiden Gruppen gleichermaßen vor.

Des Weiteren stellt sich die Frage, warum die H₂S-Konzentrationen im Blut niedrig waren. Laut Whitfield NL verbraucht das Blut selbst exogenes H₂S schnell. Der schnelle Abfall des Sulfids reflektiert möglicherweise den Eintritt in die roten Blutzellen, wo es vermutlich an Hämoglobin gebunden oder metabolisiert wird [116]. Darüber hinaus stellte Whitfield NL fest, dass es unter Hypoxie nur zu einem lokalen Anstieg von H₂S kam, während im Blut kein signifikanter Spiegel nachgewiesen werden konnte. Dies weist auf einen sofortigen Verbrauch des H₂S im Blut hin. Denkbar wäre daher, dass systemisch verabreichtes H₂S keine Wirkung an Endorganen zeigt. Trotz der systemisch niedrig gemessenen Konzentration wäre es aber möglich, dass es zu punktuellen Effekten des H₂S kommt, deren Mechanismen noch erforscht werden müssen [43].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei der Betrachtung einzelner Parameter wie Herzfrequenz und Temperatur auf eine wirksame IK-1001-Konzentration geschlossen werden kann. Aus bereits durchgeführten Studien ging allerdings hervor, dass höhere Konzentrationen benötigt werden, um eine Wirkung zu erreichen. Es ist daher fraglich, ob die in dieser Studie erreichten Konzentrationen ausreichen, um auf Ebene der DNA-Schädigung einen Effekt erzielen zu können.

4.4 Nachweis von DNA-Schäden in vivo in Vollblutproben

Durch aortales Clamping kommt es zur Entstehung von Ischämie/Reperfusionsschäden, wodurch eine Überproduktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) zu DNA- [62, 66] und/oder Organschädigungen führen kann [44, 46]. Obwohl Zellschädigung während der Ischämie vorkommt, geschieht der meiste Verlust der Zellviabilität während der Reperfusion [14].

DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche wurden in dieser Arbeit mit Hilfe des Comet Assays quantifiziert, der als ein sensitiver Genotoxizitätstest bekannt ist. In seiner alkalischen Version, wie er in der vorliegenden Studie angewandt wurde, bietet er die Möglichkeit, zusätzlich zu den DNA-Strangbrüchen und den unvollständigen

Diskussion

Exzisionsreparaturstellen auch alkalilabile Stellen zu erfassen und durch eine Steigerung der DNA-Migration zu detektieren [102].

Die Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophoresen von Zellen aus Vollblutproben, die kontinuierlich im Verlaufe unserer Versuche vor und nach der Clampingphase abgenommen wurden, wiesen darauf hin, dass es aufgrund der chirurgischen Präparation, des Abklemmens der thorakalen Aorta sowie der stattgefundenen Ischämie- und Reperfusionsverletzung zu keinem signifikanten Anstieg des DNA-Schadens weder in der Kontrollgruppe, die kein Na₂S erhalten hatte, noch in der IK-1001-Versuchsgruppe gekommen ist. Diese Feststellung deckt sich nicht mit Ergebnissen aus Studien von Willy C et al. und Andreassi MG et al., die in ihren Arbeiten das Auftreten von DNA-Schäden mittels der gleichen Messmethodik untersucht haben. Bei ihnen konnte ein signifikanter Anstieg an DNA-Schäden in menschlichen Leukozyten durch Ischämiesequenzen nach Torniquet [117] und koronarer Angioplastie [7] beobachtet werden.

In anderen experimentellen Versuchen an Schweinen wurden bereits oxidativ verursachte DNA-Schäden bei Ischämiezuständen durch Leber- und Dünndarmtransplantationen [63] festgestellt. Hierbei kam es zu Funktionsstörungen der intestinalen Wandstruktur [58] und zu Organschäden, die sich als akutes Nierenversagen [70] und Paraplegien [11, 69] manifestierten. Diese Ergebnisse konnten im Rahmen der hier durchgeführten Studie nicht bestätigt werden.

Darüber hinaus konnte in diesen Versuchen kein signifikanter Unterschied zwischen der IK-1001-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe bei der Induktion von DNA-Schäden in Proben, die direkt vor dem Clamping abgenommen wurden, beobachtet werden. Damit konnten wir zeigen, dass IK-1001 keinen Einfluss auf die im Zuge der Operationsphase entstandenen Bedingungen genommen hat.

Im Verlauf des Versuches kam es in beiden Versuchsgruppen durch den Vorgang des Clampings zu keiner signifikanten Schädigung der DNA. D.h. selbst in der Placebo-Versuchsgruppe kam es aufgrund des Clampingvorganges entgegen der Erwartungen zu keinen signifikanten DNA-Schäden. Daher kann nicht beurteilt werden, ob das Studienmedikament eine protektive Einwirkung auf diese Schäden

gehabt hätte oder nicht. Andere Autoren berichten von einer protektiven Wirkung von H_2S im Zustand von Ischämie und Reperfusion. So wurde gezeigt, dass H_2S oxidativen Stress und darauf folgende hepatische Ischämie-Reperfusionsschäden mindert, indem H_2S reaktive Sauerstoff- und Nitrogen-Spezies direkt einfängt sowie die Apoptose während der Entwicklung von Ischämie/Reperfusionsschäden inhibiert und dadurch Gewebeschaden verhindert [57]. Während der Reperusionsphase fielen in dieser genannten Studie in der Placebo-Gruppe im Vergleich zu der H_2S -behandelten Gruppe signifikant höhere Werte des Parameters für oxidativen Stress (Lipid Peroxygenase) auf, was in diesen hier durchgeführten Versuchen nicht reproduziert werden konnte (siehe 5.6 Isoprostan). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass H_2S vor myokardialen Ischämie/Reperfusionsschäden schützt. Hier wurde der Effekt zurückgeführt auf die Limitierung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [39]. Es ist bekannt, dass H_2S ein potenter und reversibler Inhibitor der Cytochrom c Oxidase (Komplex IV der mitochondrialen Elektronen-Transport-Kette) ist [77]. Dadurch hat H_2S die Fähigkeit, die zelluläre Atmung während Ischämie und Reperfusion zu modulieren. Es wurde bereits gezeigt, dass die Inhibition von mitochondrialer Respiration und die daraus folgende Limitierung der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies gegen myokardiale Ischämie/Reperfusionsschäden schützt [28, 29].

Auch wenn in dieser Studie die positiven Wirkungen von H_2S auf Ischämie/Reperfusionsschäden im Gewebe nicht auf die DNA-Ebene übertragen werden konnten, kann man jedoch an den Ergebnissen sehen, dass es in der IK-1001-Versuchsgruppe durch das Studienmedikament zumindest zu keiner DNA-Schädigung gekommen ist.

An dieser Stelle muss nämlich auch erwähnt werden, dass es Hinweise auf eine negative Wirkung von H_2S auf die DNA gibt. Attene-Ramos et al. [10] zeigten in vitro, dass H_2S erhöhte oxidative DNA-Basen-Schäden verursachte, jedoch keine Strangbrüche im Standard Comet Assay induzierte. Baskar et al. [13] unterstützten diese Ergebnisse, dass H_2S genotoxisch sei. Diese zuletzt genannte Studie zeigt, dass Sulfid direkt mit der DNA reagiert und DNA-Schäden induzieren kann.

Darüber hinaus wurde eine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies nach einer Sulfidbehandlung in Zellkulturen und Gewebeexplantaten beobachtet [10].

Diskussion

Zusammenfassend kann man sagen, dass in diesen hier durchgeführten Versuchen zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der IK-1001-Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe bei der Induktion von DNA-Schäden beobachtet werden konnte. Innerhalb einer Versuchsgruppe konnte im Verlauf des Clampingvorganges entgegen vorangegangener Studien [7, 117] auch keine Signifikanz bezüglich einer DNA-Schädigung festgestellt werden.

Dies könnte folgende Ursachen haben:

- 1) Um eine übermäßige Entzündungsreaktion und übermäßigen oxidativen Stress zu vermeiden, wurde explizit eine relativ kurze ischämische Periode von nur 30 Minuten gewählt. Da Sauerstoffradikale aber hauptsächlich durch Ischämie- und Reperfusionsschädigung gebildet werden, die letztlich zu den oxidativen DNA-Strangbrüchen führen, könnte es durch diese kurze Clampingzeit zu einer nur kurzen Sauerstoffradikal-Bildung gekommen sein. Es ist bekannt, dass die Dauer des Clampings die Folgen des Eingriffes beeinflusst [105]. In anderen Clampingstudien konnte in diesem Zusammenhang eine starke Korrelation zwischen der Dauer der Aortenokklusion und der Hypoxanthin-Konzentrationen festgestellt werden [95]. Bei der Umwandlung von diesem Hypoxanthin in Xanthin entstehen, wie in der Einleitung bereits erwähnt, Superoxide und Wasserstoffperoxid, die daraufhin zum Entstehen von oxidativem Stress und DNA-Schäden beitragen [1, 22, 84, 122]. Höchstwahrscheinlich aus diesem Grund, der Kürze der Clamping-Dauer, wurden keine Unterschiede in den Tailmoments des Comet Assays gefunden. Dies würde die ausbleibende DNA-Schädigung durch das Clamping in diesen Versuchen erklären.
- 2) Ein anderer möglicher Erklärungsansatz wäre folgender: Während der einzelnen Tierversuche wurde der mittlere arterielle Druck vor und nach dem Clamping konstant gehalten. Zu diesem Zweck wurde kontinuierlich Esmolol, Nitroglycerin und Adenosin-Triphosphat (ATP) während der Clampingphase infundiert. Vermutlich trägt gerade die Verabreichung von Adenosin-Triphosphat (ATP) zu einer verminderten Zellschädigung und einem erniedrigten Grad an DNA-Strangbrüchen bei. In anderen Studien über Ischämie/Reperfusionsschädigungen konnte vergleichsweise gezeigt

werden, dass eine Applikation von ATP die Organfunktion beträchtlich verbesserte [53, 75]. Da ATP jedoch nur während des Clampingvorganges appliziert wurde, kann nur nach Öffnung des Clampings die Substanz im Körper verteilt worden sein. Es ist unwahrscheinlich, dass diese noch vorhandenen Mengen einen dermaßen großen Effekt gehabt haben.

4.5 Effekt der Noradrenalin-gabe zur Kreislaufstabilisierung

Nach Freigabe der Aorta wurde Noradrenalin nach Bedarf kontinuierlich infundiert, um in der frühen Reperfusionphase den arteriellen Blutdruck auf über 80% zu halten. Ein interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass den Tieren der IK-1001-Gruppe signifikant weniger Noradrenalin verabreicht werden musste, um die hämodynamischen Werte aufrecht zu erhalten, als den Tieren der Kontrollgruppe (Abbildung 16).

Vermutlich wurde die geringere erforderliche Menge an Noradrenalin während der frühen Reperfusionphase durch eine verbesserte Reaktion auf die Noradrenalininfusion verursacht. Diese Erkenntnis ist von besonderem Interesse, da berichtet wurde, dass H₂S ein endogener Vasodilatator sei [19, 42, 106]. Dies geschieht durch eine durch H₂S induzierte Aktivierung von Adenosin-Triphosphat-sensitiven Kalium-Kanälen (K_{ATP}-Kanäle) [112], was zu einer Hypopolarisation der zellulären Membran führt [30, 109] und schließlich die Relaxierung glatter Muskelzellen bewirkt. H₂S aktiviert K_{ATP}-Kanäle sowohl im Herzen [45] als auch in vaskulärem Gewebe [20]. Somit wurde in verschiedenen Nagetiermodellen in vivo [45, 125] bereits gezeigt, dass H₂S eine Hypotension verursachte. Da das Aufheben des Clampings mit einer zunächst hypotensiven Reaktion verbunden ist [44], hätte man aus den zuletzt genannten Erkenntnissen erwartet, dass durch H₂S diese hypotensive Reaktion verstärkt werden würde. Somit hätte man erwartet, dass größere Mengen an Noradrenalin zur Aufrechterhaltung der hämodynamischen Werte in der IK-1001-Gruppe nötig gewesen wären. Schließlich wurde Noradrenalin nach dem Clamping verabreicht, um dem zu erwartenden Abfall des Blutdruckes entgegen zu wirken. Interessanterweise konnte genau das Gegenteil in dieser Studie beobachtet werden, da weniger Noradrenalin benötigt wurde.

Darüber hinaus war eine signifikant kürzere Applikationsdauer von Noradrenalin in der IK-1001-Gruppe notwendig. Das Studienmedikament senkte also merklich die erforderliche Zeit und die Dosis von Noradrenalin um die hämodynamischen Zielwerte zu erreichen.

4.6 8-Isoprostan: Parameter für oxidativen Stress

- in vivo und TNF- α : Entzündungsparameter

Zur Untermauerung oder Widerlegung der Ergebnisse des Comet Assays der Vollblutproben wurden als Parameter für das Vorliegen von oxidativem Stress die 8-Isoprostan-Spiegel im Plasma, bezogen auf den Proteingehalt, ermittelt.

Da oxidativer Stress zudem proinflammatorische Effekte hat und, wie durch Aragno et al. [8] bereits gezeigt, die Ausschüttung verschiedener Faktoren wie TNF- α durch oxidativen Stress initiiert wird, kann dieser Parameter auch herangezogen werden bei der Beurteilung, ob oxidativer Stress vorhanden war.

Im Verlauf des Clamping-Versuches kam es zu keinem Zeitpunkt zu einem signifikanten Unterschied der 8-Isoprostan-Spiegel im Plasma zwischen der Kontroll- und der IK-1001-Gruppe. Analog zu den ausgebliebenen Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen beim Grad der DNA-Schädigung, konnten also auch bei diesem Parameter keine signifikanten Unterschiede der IK-1001-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe gefunden werden. Die Ergebnisse der 8-Isoprostan-Bestimmungen stützen damit die Erkenntnisse, die im Rahmen der Untersuchung der Vollblutproben auf DNA-Strangbrüche gewonnen wurde. Als Schlussfolgerung kann hieraus gezogen werden, dass es durch die Behandlung mit dem Studienmedikament IK-1001 zu keinem Unterschied bezüglich dem Ausmaß des oxidativen Stresses gekommen ist. An Mäusen wurde dagegen bereits gezeigt, dass durch eine Behandlung mit H₂S eine signifikante Reduktion der Lipidperoxidation unter Reperusionsbedingungen erzielt werden kann [57]. Dieses Ergebnis konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden.

Der 8-Isoprostan-Wert, der Marker für oxidativen Stress, stieg durch das Clamping innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe im zeitlichen Verlaufe des Versuches an.

Diskussion

Daraus lässt sich schließen, dass der Vorgang des Clampings korrekt durchgeführt wurde. Allerdings scheint der induzierte oxidative Stress nicht ausgereicht zu haben, um DNA-Schäden zu verursachen.

Dies wird auch durch die TNF- α -Werte unterstützt, von denen auch bekannt ist, im Zusammenhang mit Ischämie- und Reperfusionsvorgängen signifikant anzusteigen [26]. Diese zeigen im Verlauf des Versuches ansteigende Werte, die in der IK-1001-Gruppe zu jedem Zeitpunkt signifikant auffallen. In der Kontrollgruppe ist auch deutlich ein Anstieg der Werte im zeitlichen Verlauf zu erkennen, obwohl hier bis auf den Wert 8h nach Clamping die Signifikanz ausbleibt. Dies zeigt, wie oben schon erwähnt, dass ein möglicher Fehler des Versuches nicht in der Durchführung des Clampings zu suchen ist, sondern eher in der Dauer des Clampingvorganges. Denn es ist bekannt, dass die Dauer des Clampings die Folgen des Eingriffes beeinflusst [105].

Bei den TNF- α -Werten bleibt, korrespondierend zu den Ergebnissen der Untersuchung der Vollblutproben auf DNA-Strangbrüche, eine Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen aus. Diese fehlende intergrupale Signifikanz des TNF- α -Wertes findet sich auch in einer Studie mit H₂S behandelten Mäusen wieder [39]. Hiermit wird die Schlussfolgerung, gezogen aus den Isoprostan-Werten, untermauert, dass das Clamping korrekt aber vermutlich zu kurz durchgeführt wurde.

Aufgrund der Ausbleibenden Signifikanz zwischen den beiden Versuchsgruppen gibt es keinen Hinweis auf einen protektiven Effekt des Studienmedikaments IK-1001 im Hinblick auf Entstehung von oxidativem Stress.

Somit konnten durch diese Versuchsreihe die Ergebnisse anderer Experimente nicht bestätigt werden, aus denen hervorging, dass H₂S antioxidative Wirkung hat. So wurde u.a. festgestellt, dass H₂S die Produktion von Glutathion, was bekanntermaßen zu den wichtigsten als Antioxidans wirkenden Stoffen im Körper gehört, erhöht [60, 106]. Glutathion kann helfen, zelluläre Makromoleküle, wie etwa Proteine und Membranlipide, vor „freien Radikalen“ (reaktive Sauerstoffspezies, ROS) zu schützen.

Beide hier aufgeführten Parameter, die über verschiedene Mechanismen, einerseits über die Lipidperoxidase und andererseits über den Entzündungspfad, entstehen, kommen zu dem gleichen Ergebnis. Daher ist also zusammenfassend davon auszugehen, dass das Ausbleiben einer Signifikanz zwischen den Gruppen

nicht in einem Fehler im Durchführen des Clampings zu suchen ist. Es ist eher ein Hinweis darauf, wie bereits erwähnt, dass der vorhandene oxidative Stress nicht groß genug war, um DNA-Schäden auszulösen. Die Auswirkungen des Studienmedikaments auf DNA-Schäden konnte somit in diesem Versuchsmodell nicht beurteilt werden.

4.7 Hyperbare Sauerstoffexposition - ex vivo

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden isolierte Lymphozyten unter definierten Bedingungen einer hyperbaren Sauerstoffexposition unterzogen, um die Auswirkungen des Sulfid-Donors IK-1001 auf die Sensitivität der DNA gegenüber einem zusätzlichen oxidativen Stress zu beurteilen. Die ex vivo HBO-Exposition isolierter Lymphozyten repräsentiert hierbei ein bewährtes Modell für die Induktion oxidativer DNA-Schädigungen [50, 91, 101, 103].

Die HBO-Exposition wurde in dieser Studie für 2 Stunden bei einem absoluten Druck von 4 bar in einer auf 37°C temperierten Kammer unter Verwendung eines Gasgemisches aus 98% Sauerstoff und 2% Kohlendioxid durchgeführt. Derart hohe Sauerstoffpartialdrücke haben bekanntermaßen toxische Eigenschaften und führen durch die erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zur Induktion von Zellschäden [55, 68]. Es wird angenommen, dass die Produktion von ROS durch das Leck in der mitochondrialen Atmungskette proportional dem steigenden Sauerstoffpartialdruck anwächst [68].

Die Ergebnisse der Druckkammerversuche haben zu keinem Zeitpunkt gezeigt, dass eine Behandlung mit HBO zu einer signifikanten Induktion oxidativer DNA-Schäden führt. Die erste Isolierung der Lymphozyten erfolgte zu dem Zeitpunkt, nachdem die Infusion mit dem Studienmedikament IK-1001 oder mit dem Placebo NaCl 2 Stunden lang infundiert wurde, um einen möglichst hohen Spiegel an IK-1001 intrazellulär zu gewährleisten.

Im Verlauf des Versuches kam es bei der Kontroll- und bei der IK-1001-Gruppe zu allen Messzeitpunkten, also sowohl vor Clamping, als auch 2 und 4 Stunden danach, zu keiner signifikanten DNA-Schädigung aufgrund der HBO-Behandlung. Zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen traten hierbei auch keine signifikanten Differenzen der Tailmomentwerte auf. In der vorliegenden Studie konnte also kein Einfluss von H₂S auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen im

Diskussion

HBO-Versuch unter diesen experimentellen Bedingungen nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis deckt sich mit dem Ergebnis der in vivo Untersuchungen.

Da bei beiden Versuchsgruppen kein deutlicher Anstieg der DNA-Schädigung durch HBO-Exposition mittels Comet Assay nachgewiesen werden konnte, konnten durch diese Versuche die Ergebnisse früherer Studien nicht reproduziert werden, nach denen eine HBO-Exposition eine gute Möglichkeit darstellt, genotoxische Auswirkungen von oxidativen Stress zu untersuchen [101].

Mögliche Ursachen für die hier entstandenen Ergebnisse könnten folgende sein:

- 1) Die Dauer der HBO-Exposition wurde zu kurz gewählt. In vitro besteht bekanntlich eine Dosis–Wirkungs–Beziehung zwischen HBO und DNA-Schäden: Je länger die Expositionszeit, desto stärker und häufiger sind die DNA-Einzelstrangbrüche ausgeprägt [91]. Daher wäre es denkbar, dass eine zu kurz gewählte Dauer der Exposition in diesem Versuch der Grund sein könnte für das Ausbleiben der DNA-Schäden in den Lymphozyten. Dagegen spricht jedoch, dass in anderen Versuchen unter denselben Bedingungen und derselben Dauer der Exposition signifikante DNA-Schäden in Leukozyten im Comet Assay detektiert werden konnten [54]. Selbst eine kürzere Behandlung der Leukozyten von einer Dauer von 30 Minuten hatte in anderen bereits durchgeführten Versuchen einen merklichen Effekt auf die Toxizität der HBO-Behandlung [91].

Da sich diese 2-stündige Dauer des HBO-Versuches schon in anderen Studien bewährt hat, ist es nicht möglich, dieses Argument als Ursache für die ausbleibenden Signifikanzen aufrecht zu erhalten.

- 2) Der Druck in der Kammer wurde zu niedrig gewählt, um signifikante Schäden an der DNA auszulösen. Auch in diesem Zusammenhang gilt eine Dosis–Wirkungs–Beziehung in vitro zwischen HBO und DNA-Schäden: Je höher der Sauerstoffpartialdruck, desto stärker und häufiger sind die DNA-Einzelstrangbrüche ausgeprägt. Es ist bekannt, dass die Bildung von ROS und somit die Schädigung der DNA mit höheren Sauerstoffdrücken ansteigt [55].

Diskussion

Aus früheren Versuchen geht zudem hervor, dass ein höherer Druck in der Kammer zu einer erhöhten DNA-Migration im Comet Assay führt [91]. Hier lässt sich wiederum die bereits oben genannte Studie [54] anführen, bei der unter vergleichbaren Bedingungen, also mit dem gleichen Sauerstoffpartialdruck und demselben Druck in der Kammer, signifikant angestiegene Werte nach HBO im Vergleich zu vor HBO erarbeitet werden konnten. Selbst in Versuchen mit niedrigerem Druck (3 bar) als in dieser Arbeit (4 bar) und mit derselben Expositionsdauer von 2 Stunden kam es bereits zu einer klaren und reproduzierbaren Induktion von DNA-Schäden [92, 104]. Hierbei kam es zu einem 3-fachen Anstieg der Tailmomentwerte [92]. Da in diesen vorhergehenden Experimenten ein DNA-Schaden bereits aus einer Behandlung der Leukozyten mit einer niedrigeren Druckhöhe jedoch gleicher Expositionsdauer resultierte, ist das Argument nicht haltbar, dass der Druck in der Kammer zu niedrig gewählt war.

- 3.) Die Anzahl der Tiere in den Gruppen war zu niedrig gewählt, sodass sich keine Signifikanz ergab. Bei einer niedrigen Fallzahl kommt es zu stark schwankenden Medianwerten, was man bei der Richtigkeit dieses Arguments erwarten würde. Betrachtet man die Werte aus diesem Blickwinkel, so stellt man fest, dass keine stark voneinander abweichenden Medianwerte vorhanden sind. Dies scheint folglich auch nicht die gesuchte Ursache für die ausbleibenden Signifikanzen zu sein.

Als Erklärung für das Ausbleiben der zu erwartenden Ergebnisse lässt sich daher nur die Annahme heranziehen, dass das hier verwendete Verfahren das falsche Modell war, um die zu untersuchenden Fragen zu klären.

4.8 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der protektive Effekt des Studienmedikaments IK-1001 auf DNA-Schäden, verursacht durch die Operationsbedingungen und Ischämie/Reperfusionen-Verletzungen in vivo, nicht beurteilt werden konnte. Ursächlich hierfür ist die Tatsache, dass es unter diesen experimentellen Bedingungen selbst in der Kontrollgruppe zu keinen nachweisbaren DNA-Schäden kam, auf die das Medikament protektiv einwirken hätte können.

Ein protektiver Einfluss des Studienmedikaments auf die Induktion von DNA-Schäden in isolierten Lymphozyten ex vivo, welche einer HBO ausgesetzt wurden, konnte aufgrund ausbleibender Schädigung in Folge der HBO-Behandlung ebenfalls nicht beurteilt werden.

Da zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zu erkennen war, kann daraus geschlossen werden, dass mit dem Sulfid-Donor IK-1001 die zelluläre genomische Integrität weder negativ noch positiv beeinflusst wird. Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse zeigen folglich, dass IK-1001 unter unseren experimentellen Bedingungen als nicht schädlich für die DNA anzusehen ist.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das Studienmedikament keinen intergruppalen Unterschied des Parameters für oxidativen Stress (8-Isoprostan) herbeigeführt hat. Dies trifft auch für den Entzündungsparameter TNF- α zu. So kann konstatiert werden, dass H₂S keinen Einfluss auf den durch Ischämie und Reperfusion entstandenen oxidativen Stress und der damit zusammenhängenden Entzündung hatte.

Dies liefert durchaus Ansatzpunkte, IK-1001 einsetzen zu können, ohne dabei ein Risiko genomischer Schäden und somit von erhöhtem Mutationspotenzial eingehen zu müssen.

Interessant wären die Ergebnisse weiterer Studien, bei denen man die Dauer der Clampingzeit erhöhen würde, um die Effekte von IK-1001 unter diesen Bedingungen erneut zu überprüfen.

5 Zusammenfassung

Nahezu 30% aller Patienten, die im thorakoabdominellen Übergang der Aorta gefäßchirurgisch therapiert werden müssen, leiden postoperativ an den Folgen der perioperativ unumgänglichen Ischämie- und Reperfusionsschäden der unteren Körperhälfte. Die hierdurch auftretenden Sauerstoffradikale verursachen oxidative DNA (desoxyribonucleic acid)-Schäden. Ein viel versprechender Ansatz zur Protektion, der auf dem im englischen Sprachgebrauch als „suspended animation“ bezeichneten Funktionszustand beruht, könnte eine innovative Methode darstellen, um die Komplikationsrate dieser Eingriffe zu senken.

In dieser Studie wurde nun durch Einsatz des Sulfid-Donors IK-1001 (Na_2S = Di-Natrium Sulfid) der Zustand der suspended animation hergestellt. Es sollten die Fragen geklärt werden, wie der durch H_2S ausgelöste Zustand der suspended animation die im Rahmen der Ischämie/Reperfusionsschäden zu erwartenden DNA-Schäden in vivo in Form von DNA-Strangbrüchen beeinflusst und ob es einen Unterschied bei der Sensitivität gegenüber eines „Second Hits“ ex vivo durch einen zusätzlichen oxidativen Stressfaktor in Form einer HBO (hyperbare Oxygenation)-Exposition gibt.

Für die Studie wurden 16 narkotisierte, beatmete Schweine randomisiert in eine IK-1001-Versuchsgruppe und eine Kontrollgruppe aufgeteilt. 2 Stunden vor dem 30-minütigen Clamping der thorakalen Aorta erfolgte die Applikation des Studienmedikaments IK-1001 bzw. des Placebos. IK-1001 wurde in 5% Glucose gelöst und als Bolus von 0,2 mg/kg gefolgt von einer Dauerinfusion von 2 mg/kgxh bis zum Ende des Versuches verabreicht. Als Placebo diente 0,9% NaCl (isotone Kochsalz-Lösung). Die Beurteilung der DNA-Schäden in vivo fand anhand von Vollblutproben statt, die zu Operationsbeginn, vor der Clampingphase sowie 1h, 2h, 4h und 8h nach der Clampingphase abgenommen wurden und mit denen jeweils ein Comet Assay durchgeführt wurde. Oxidative DNA-Schädigung ex vivo wurde anhand von Lymphozyten, die vor dem Clamping sowie 2h und 4h nach der Clampingphase mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten aus den Vollblutproben isoliert wurden, beurteilt. Dafür wurden Comet Assays vor und nach einer 2-stündigen Exposition mit hyperbarem Sauerstoff (HBO: 98% O_2 mit 4 bar) durchgeführt.

Anhand der Analyse der Vollblutproben konnte gezeigt werden, dass die Operationsbedingungen und die Ischämie-Reperfusions-Bedingungen im

Zusammenfassung

Rahmen des Clampingvorganges zu keiner DNA-Schädigung führten. Es konnte dabei kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen vor OP, vor Clamping sowie 1h, 2h, 4h und 8 Stunden nach Clamping beobachtet werden. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es ex vivo im Zeitverlauf zu keinem signifikanten Unterschied der Induktion oxidativer DNA-Schädigung zwischen der IK-1001- und der Kontrollgruppe kam. Dies konnte aufgrund der Lymphozyten, die einer HBO ausgesetzt wurden, sowohl vor dem Clamping als auch 2h und 4 Stunden danach beobachtet werden.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das Studienmedikament keinen Einfluss auf die Entstehung von oxidativem Stress aufgrund des Ischämie/Reperfusionvorganges hat. Es zeigte sich weder bei den 8-Isoprostan-Werten noch bei den TNF- α -Werten zu irgendeinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Ein interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass den Tieren der IK-1001-Gruppe signifikant weniger Noradrenalin verabreicht werden musste, um die hämodynamischen Werte aufrecht zu erhalten, als den Tieren der Kontrollgruppe. Vermutlich wurde die geringere erforderliche Menge an Noradrenalin während der frühen Reperusionsphase durch eine verbesserte Reaktion auf die Noradrenalininfusion verursacht. Diese Erkenntnis ist von besonderem Interesse, da berichtet wurde, dass H₂S ein endogener Vasodilatator sei, was mit den hier vorliegenden Ergebnissen nicht konform geht.

Im Gegensatz zu anderen Studien, in denen H₂S einen zytoprotektiven oder aber einen zytotoxischen Effekt aufwies, kann in dieser Studie zusammenfassend gesagt werden, dass das Studienmedikament unter diesen experimentellen Bedingungen weder protektiven noch schädlichen Einfluss auf die DNA hatte. Andere Experimente, z.B. mit Veränderung der Clampingzeit, könnten in Zukunft weitere Erkenntnisse bezüglich der Wirkungen von H₂S zeigen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Adkinson D, Hollwarth ME, Benoit JN, Parks DA, McCord JM, Granger DN: Role of free radicals in ischemia-reperfusion injury to the liver. *Acta Physiol Scand* 126: 101-108 (1986)
- [2] Akata T, Tominaga M, Sagiya M, Taniyama T, Inaba S, Takahashi S, Yoshitake J: Changes in end-tidal CO₂ level following tourniquet deflation during orthopedic surgery. *J Anesth* 6: 9-16 (1992)
- [3] Alam HB, Bowyer MW, Koustova E, Gushchin V, Anderson D, Stanton K, Kreishman P, Cryer CM, Hancock T, Rhee P: Learning and memory is preserved after induced asanguineous hyperkalemic hypothermic arrest in a swine model of traumatic exsanguination. *Surgery* 132: 278-288 (2002)
- [4] Alam HB, Chen Z, Ahuja N, Chen H, Conran R, Ayuste EC, Toruno K, Ariaban N, Rhee P, Nadel A, Koustova E: Profound hypothermia protects neurons and astrocytes, and preserves cognitive functions in swine model of lethal hemorrhage. *J Surg Res* 126: 172-181 (2005)
- [5] Alam HB, Chen Z, Li Y, Velmahos G, DeMoya M, Keller CE, Toruno K, Mehrani T, Rhee P, Spaniolas K: Profound hypothermia is superior to ultraprofound hypothermia in improving survival in swine model of lethal injuries. *Surgery* 140: 307-314 (2006)
- [6] Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922 (1993)
- [7] Andreassi MG, Botto N, Rizza A, Colombo MG, Palmieri C, Berti S, Manfredi S, Masetti S, Clerico A, Biagini A: Desoxyribonucleic acid damage in human lymphocytes after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 40: 862-868 (2002)

Literaturverzeichnis

- [8] Aragno M, Cutrin JC, Mastrocola R: Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: attenuation by dehydroepiandrosterone. *Kidney Int* 64: 836-43 (2003)
- [9] Aruoma OI, Halliwell B: *Molecular Biology of free radicals in human diseases*. OICA International, Saint Lucia, London (1998)
- [10] Attene-Ramos MS, Wagner ED, Gaskins HR, Plewa MJ: Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Mol Cancer Res* 5: 455-459 (2007)
- [11] Backstrom T, Saether OD, Norgren L, Aadahl P, Myhre HO, Ungerstedt U: Spinal cord metabolism during thoracic aortic cross-clamping in pigs with special reference to the effect of allopurinol. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 22: 410-417 (2001)
- [12] Bähr KH, Schulze W: The swine as standardized experimental animal. *Z Rheumaforsch* 31: 99-104 (1972)
- [13] Baskar R, Li L, Moore PK: Hydrogen sulfide-induces DNA damage and changes in apoptotic gene expression in human lung fibroblast cells. *FASEB J* 21: 247-255 (2007)
- [14] Becker LB: New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res* 61: 461-470 (2004)
- [15] Behringer W, Prueckner S, Kentner R, Tisherman SA, Radovsky A, Clark R, Stezoski SW, Henchir J, Klein E, Safar P: Rapid hypothermic aortic flush can achieve survival without brain damage after 30 minutes cardiac arrest in dogs. *Anesthesiology* 93: 1491-1499 (2000)

Literaturverzeichnis

- [16] Behringer W, Safar P, Wu X, Kentner R, Radovsky A, Kochanek PM, Dixon CE, Tisherman SA: Survival without brain damage after clinical death of 60 – 120 mins in dogs using suspended animation by profound hypothermia. *Crit Care Med* 31: 1523-1531 (2003)
- [17] Bellamy R, Safar P, Tisherman SA, Basford R, Bruttig SP, Capone A, Dubick MA, Taylor MJ, Zar H, Ernster L, Hattler BG Jr, Hochachka P, Klain M, Kochanek PM, Kofke WA, Lancaster JR, McGowan FX Jr, Oeltgen PR, Severinghaus JW: Suspended animation for delayed resuscitation. *Crit Care Med* 24: 24-47 (1996)
- [18] Berguer R, Porto J, Fedoronko B, Dragovic L: Selective deep hypothermia of the spinal cord prevents paraplegia after aortic cross-clamping in the dog model. *J Vasc Surg* 15: 62-71 (1992)
- [19] Bhatia M: Hydrogen sulfide as a vasodilator. *IUBMB Life* 57: 603-606 (2005)
- [20] Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou S, Moore PK: Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 670-678 (2005)
- [21] Blackstone E, Morrison M, Roth MB: H₂S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* 308: 518 (2005)
- [22] Brawn K, Fridovich I: Superoxide radical and superoxide dismutases: Threat and defense. *Acta Physiol Stand Suppl* 492: 9-18 (1980)
- [23] Burcham PC: Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis* 13: 287-305 (1998)
- [24] Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL: Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 131: 1-87 (1997)

Literaturverzeichnis

- [25] Carden DL, Granger DN: Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol* 190: 255-266 (2000)
- [26] Caty MG, Guice KS, Oldham KT, Remick DG, Kunkel SI: Evidence for tumor necrosis factor-induced pulmonary microvascular injury after intestinal ischemia-reperfusion injury. *Ann Surg* 212: 694-700 (1990)
- [27] Cerutti PA: Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227: 375-381 (1985)
- [28] Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ: Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myokardial injury following reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 319: 1405-1412 (2006)
- [29] Chen Q, Camara AK, Stowe DF, Hoppel CL, Lesnefsky EJ: Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 292: C137-C147 (2007)
- [30] Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R: Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287: H2316-H2323 (2004)
- [31] Chua CC, Hamdy RC, Chua BH: Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 25: 891-897 (1998)
- [32] Collins AR: The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261 (2004)
- [33] Couch L, Martin L, Rankin N: Near death episode after exposure to toxic gases from liquid manure. *N Z Med J* 118: 1-4 (2005)

Literaturverzeichnis

- [34] Crawford ES, Svensson LG, Hess KR, Shenaq SS, Coselli JS, Safi HJ, Mohindra PK, Rivera V: A prospective randomized study of cerebrospinal fluid drainage to prevent paraplegia after high-risk surgery on the thoracoabdominal aorta. *J Vasc Surg* 13: 36-45 (1991)
- [35] Dennog C, Hartmann A, Frey G, Speit G: Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis* 11: 605-609 (1996)
- [36] Dodds WJ: The pig model for biochemical research. *Fed Proc* 41: 247-256 (1982)
- [37] Douglas WR: Of pigs and men and research: a review of applications and analogies of the pig, *sus scrofa*, in human medical research. *Space Life Sci* 3: 226- 234 (1972)
- [38] Drew KL, Rice ME, Kuhn TB, Smith MA: Neuroprotective adaptations in hibernation: therapeutic implications for ischemia-reperfusion, traumatic brain injury and neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 31: 563-573 (2001)
- [39] Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ: Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of myocardial function. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 15560-15565 (2007)
- [40] Epe B: DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127: 223-249 (1996)
- [41] Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13: 341-390 (1992)
- [42] Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL: The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131: 259-271 (2006)

Literaturverzeichnis

- [43] Furne J, Saeed A, Levitt MD: Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1479-R1485 (2008)
- [44] Gelman S: The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. *Anesthesiology* 82: 1026-1060 (1995)
- [45] Geng B, Yang J, Qi Y, Zhao J, Pang Y, Du J, Tang C: H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 362-368 (2004)
- [46] Gloviczki P: Surgical repair of thoracoabdominal aneurysms: patient selection, techniques and results. *Cardiovasc Surg* 10: 434-441 (2002)
- [47] Godin DV, Garnett ME: Species-related variations in tissue antioxidant status-I. Differences in antioxidant enzyme profiles. *Comp Biochem Physiol B* 103: 737-742 (1992)
- [48] Godin DV, Garnett ME: Species-related variations in tissue antioxidant status-II. Differences in susceptibility to oxidative challenge. *Comp Biochem Physiol B* 103: 743-748 (1992)
- [49] Granger DN: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 255: H1269-H1275 (1988)
- [50] Groger M, Speit G, Radermacher P, Muth CM: Interaction of hyperbaric oxygen, nitric oxide, and heme oxygenase on DNA strand breaks in vivo. *Mutat Res* 572: 167-172 (2005)
- [51] Halliwell B: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344: 721-724 (1994)
- [52] Hannon JP, Bossone CA, Wade CE: Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab Anim Sci* 40: 293-298 (1990)

Literaturverzeichnis

- [53] Harkema JM, Chaudry IH: Magnesium-adenosine triphosphate in the treatment of shock, ischemia, and sepsis. *Crit Care Med* 20: 263-275 (1992)
- [54] Hauser B, Gröger M, Ehrmann U, Albicini M, Brückner UB, Schelzig H, Venkatesh B, Li H, Szabó C, Speit G, Radermacher P, Kick J: The parp-1 inhibitor INO-1001 facilitates hemodynamic stabilization without affecting DNA repair in porcine thoracic aortic cross-clamping-induced ischemia/reperfusion. *Shock* 6: 633-40 (2006)
- [55] Jamieson D, Chance B, Cadenas E, Boveris A: The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu Rev Physiol* 48: 703-719 (1986)
- [56] Janssen YM, Van Houten B, Borm PJ, Mossman BT: Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest* 69: 261-274 (1993)
- [57] Jha S, Calvert JW, Duranski MR, Ramachandran A, Lefer DJ: Hydrogen sulfide attenuates hepatic ischemia-reperfusion injury: role of antioxidant and antiapoptotic signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H801-806 (2008)
- [58] Juel IS, Solligard E, Lyng O, Stromholm T, Tvedt KE, Johnsen H, Jynge P, Saether OD, Aadahl P, Gronbech JE: Intestinal injury after thoracic aortic cross-clamping in the pig. *J Surg Res* 117: 283-295 (2004)
- [59] Kamoun P: Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 26: 243-254 (2004)
- [60] Kimura Y, Kimura H: Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *FASEB J* 18: 1165-1167 (2004)
- [61] Li J, Zhang G, Cai S, Redington AN: Effect of inhaled hydrogen sulfide on metabolic responses in anesthetized, paralyzed, and mechanically ventilated piglets. *Pediatr Crit Care Med* 9: 110-112 (2008)

Literaturverzeichnis

- [62] Liu H, Uno M, Kitazato KT, Suzue A, Manabe S, Yamasaki H, Shono M, Nagahiro S: Peripheral oxidative biomarkers constitute a valuable indicator of the severity of oxidative brain damage in acute cerebral infarction. *Brain Res* 1025: 43-50 (2004)
- [63] Loft S, Larsen PN, Rasmussen A, Fischer-Nielsen A, Bondesen S, Kirkegaard P, Rasmussen LS, Ejlersen E, Tornøe K, Bergholdt R: Oxidative DNA damage after transplantation of the liver and small intestine in pigs. *Transplantation* 59: 16-20 (1995)
- [64] Loft S, Poulsen HE: Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 74: 297-312 (1996)
- [65] Lowicka E, Beltowski J: Hydrogen sulfid (H₂S) - the third gas of interest for pharmacologists. *Pharmacol Rep* 59: 4-24 (2007)
- [66] Maulik G, Cordis GA, Das DK: Oxidative damage to myocardial proteins and DNA during ischemia and reperfusion. *Ann N Y Acad Sci* 793: 431-436 (1996)
- [67] McClellan RO: Applications of swine in biomedical research. *Lab Anim Care* 18: 120- 126 (1968)
- [68] McCord JM: The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 108: 652-659 (2000)
- [69] Meylaerts SA, De Haan P, Kalkman CJ, Jaspers J, Vanicky I, Jacobs MJ: Prevention of paraplegia in pigs by selective segmental artery perfusion during aortic cross-clamping. *J Vasc Surg* 32: 160-170 (2000)
- [70] Miller Q, Peyton BD, Cohn EJ, Holmes GF, Harlin SA, Bird ET, Harre JG, Miller ML, Riley KD, Hogan MB, Taylor A: The effects of intraoperative fenoldopam on renal blood flow and tubular function following suprarenal aortic cross-clamping. *Ann Vasc Surg* 17: 656-662 (2003)

Literaturverzeichnis

- [71] Miyamae Y, Iwasaki K, Kinoshita N, Tsuda S, Murakami M, Tanaka M, Sasaki YF: Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat Res* 393: 107-113 (1997)
- [72] Moller P, Wallin H: Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutat Res* 410: 271-290 (1998)
- [73] Moore PK, Bhatia M, Mochhala S: Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol Sci* 24: 609-611 (2003)
- [74] Morrow JD: The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev* 32: 377-385 (2000)
- [75] Nalos M, Asfar P, Ichai C, Radermacher P, Leverve XM, Froba G: Adenosine triphosphate-magnesium chloride: relevance for intensive care. *Intensive Care Med* 29: 10-18 (2003)
- [76] Narkowicz CK, Vial JH, McCartney PW: Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans. *Free Radic Res Commun* 19: 71-80 (1993)
- [77] Nicholls P: Inhibition of cytochrome c by sulphide. *Biochem Soc Trans* 3: 316-319 (1975)
- [78] Nozari A, Safar P, Wu X, Stezoski WS, Henschler J, Kochanek P, Klain M, Radovsky A, Tisherman SA: Suspended animation can allow survival without brain damage after traumatic exsanguination cardiac arrest of 60 minutes in dogs. *J Trauma* 57: 1266-1275 (2004)
- [79] Nystul TG, Roth MB: Carbon monoxide-induced suspended animation protects against hypoxic damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 9133-9136 (2004)

Literaturverzeichnis

- [80] Opie LH: Reperfusion injury-fad, fashion, or fact? *Cardiovasc Drugs Ther* 5 (Suppl. 2): 223– 4 (1991)
- [81] Orend KH, Liewald F, Kirchdorfer B, Sunder-Plassmann L: Management of descending aortic dissection. *Ann Ital Chir* 66: 821-4 (1995)
- [82] Padilla PA, Roth MB: Oxygen deprivation causes suspended animation in the zebrafish embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7331-7335 (2001)
- [83] Padilla PA, Nystul TG, Zager RA, Johnson AC, Roth MB: Dephosphorylation of cell cycle-regulated proteins correlates with anoxia-induced suspended animation in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 13: 1473-1483 (2002)
- [84] Parks DA, Granger DN: Ischemia-induced vascular changes: Role of xanthine oxidase and hydroxyl radicals. *Am J Physiol* 245: G285-G289 (1983)
- [85] Perkins RJ, Roberts KW, Shah DM, Feustel PJ, Cohen IL: Estimation of oxygen deficit and debt resulting from abdominal aortic cross-clamping in humans. *Anesthesiology* 75: A113 (1991)
- [86] Rao GN, Runge MS, Alexander RW: Hydrogen peroxide activation of cytosolic phospholipase A2 in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta* 1265: 67-72 (1995)
- [87] Rhee P, Talon E, Eifert S, Anderson D, Stanton K, Koustova E, Ling G, Burris D, Kaufmann C, Mongan P, Rich NM, Taylor M, Sun L: Induced hypothermia during emergency department thoracotomy: an animal model. *J Trauma* 48: 439-447 (2000)
- [88] Roberts LJ 2nd, Morrow JD: Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Mol Life Sci* 59: 808-820 (2002)

Literaturverzeichnis

- [89] Roth MB, Nystul T: Buying time in suspended animation. *Sci Am* 292: 48-55 (2005)
- [90] Rothfuss A, Dennog C, Speit G: Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis* 19: 1913-1917 (1998)
- [91] Rothfuss A, Stahl W, Radermacher P, Speit G: Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro. *Environ Mol Mutagen* 34: 291-296 (1999)
- [92] Rothfuss A: Untersuchungen zur Induktion von Mutationen und antioxidativen Schutzmechanismen in Zellkulturen nach Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff. Humanbiologische Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Ulm (2001)
- [93] Safar P, Tisherman SA, Behringer W, Capone A, Prueckner S, Radovsky A, Stezoski WS, Woods RJ: Suspended animation for delayed resuscitation from prolonged cardiac arrest that unresuscitatable by standard cardiopulmonary-cerebral resuscitation. *Crit Care Med* 28; N214-N218 (2000)
- [94] Schelzig H, Sunder-Plassmann, Träger K, Georgieff M, Radermacher P, Fröba G: Ischämie und Reperfusion des intestinalen und hepatischen Stromgebiets. In: Allenberg J-R, Gürke L, Schweiger H, Trubel W (Hrsg), *Gefäßchirurgie*, Bd 8, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, S. 92-99 (2003)
- [95] Schoenberg MH, Fredholm BB, Hohlbach G: Changes in acid-base status, lactate concentration and purine metabolites during reconstructive aortic surgery. *Acta Chir Scand* 151:227-233 (1985)
- [96] Serteser M, Koken T, Kahraman A: Changes in hepatic TNF-alpha levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res* 107:234-40 (2002)

Literaturverzeichnis

- [97] Sies H: Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Academic Press, London, S.15-22 (1991)
- [98] Simon GA, Maibach HI: The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations – an overview. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 13: 229- 234 (2000)
- [99] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191 (1988)
- [100] Sodha NR, Clements RT, Feng J, Liu Y, Bianchi C, Horvath EM, Szabo C, Sellke FW: The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg* 33: 906-913 (2008)
- [101] Speit G, Dennog C, Lampl L: Biological significance of DNA damage induced by hyperbaric oxygen. *Mutagenesis* 13: 85-87 (1998)
- [102] Speit G, Hartmann A: The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 113: 203-212 (1999)
- [103] Speit G, Dennog C, Radermacher P, Rothfuss A: Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat Res* 512: 111-119 (2002)
- [104] Speit G, Bonzheim I: Genotoxic and protective effects of hyperbaric oxygen in A549 lung cells. *Mutagenesis* 18: 545-548 (2003)
- [105] Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ: Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. *J Vasc Surg* 17: 357-370 (1993)
- [106] Szabo C: Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6: 917-935 (2007)

Literaturverzeichnis

- [107] Tice RR, Strauss GH: The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13: 207-214 (1995)
- [108] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221 (2000)
- [109] Ufnal M, Sikora M, Dudek M: Exogenous hydrogen sulfide produces hemodynamic effects by triggering central neuroregulatory mechanisms. *Acta Neurobiol Exp* 68: 382-388 (2008)
- [110] Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M: Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 274: 22699-704 (1999)
- [111] Virag L, Szabo C: The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54: 375-429 (2002)
- [112] Volpato GP, Searles R, Yu B, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Ichinose F, Zapol WM: Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic function in the mouse. *Anesthesiology* 108: 659-668 (2008)
- [113] Wang R: Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter ? *FASEB J* 16: 1792-1798 (2002)
- [114] Wendelborn DF, Seibert K, Roberts LJ 2nd: Isomeric prostaglandin F₂ compounds arising from prostaglandin D₂: a family of icosanoids produced in vivo in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 304-308 (1988)
- [115] Whiteman M, Armstrong JS, Chu SH, Jia-Ling S, Wong BS, Cheung NS, Halliwell B, Moore PK: The novel neuromodulator hydrogen sulfide: an endogenous peroxynitrit "scavenger"? *J Neurochem* 90: 765-768 (2004)

Literaturverzeichnis

- [116] Whitfield NL, Kreimier EL, Verdial FC, Skovgaard N, Olson KR: Reappraisal of H₂S/sulfide concentration in vertebrate blood and its potential significance in ischemic preconditioning and vascular signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1930-R1937 (2008)
- [117] Willy C, Dahouk S, Starck C, Kaffenberger W, Gerngross H, Plappert UG: DNA damage in human leukocytes after ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 28: 1-12 (2000)
- [118] Wirleitner B, Schröcksnadel K, Winkler C, Frick B, Fuchs D: In Vivo Determination of Oxidative Stress. *Aktuel Ernaehr Med* 28: 363-370 (2003)
- [119] Woods RJ, Prueckner S, Safar P et al. Hypothermic aortic arch flush for preservation during exsanguination cardiac arrest of 15 minutes in dogs. *J Trauma* 47: 1028-1036 (1999)
- [120] Xiao L, Wu YM, Zhang H, Liu YX, He RR: Hydrogen sulfide facilitates carotid sinus baroreflex in anesthetized rats. *Acta Pharmacol Sin* 27: 294-298 (2006)
- [121] Yamaguchi KT, Stewart RJ, Wang HM, Hudson SE, Vierra M, Akhtar A, Hoffman C, George D: Measurement of free radicals from smoke inhalation and oxygen exposure by spin trapping and ESR spectroscopy. *Free Radic Res Commun* 16: 167-174 (1992)
- [122] Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA, Parks DA: Circulating xanthine oxidase: Potential mediator of ischemic injury. *Am J Physiol* 258: G564-G570 (1990)
- [123] Yonezawa D, Sekiguchi F, Miyamoto M, Taniguchi E, Honjo M, Masuko T, Nishikawa H, Kawabata A: A protective role of hydrogen sulfide against oxidative stress in rat gastric mucosal epithelium. *Toxicology* 241: 11-18 (2007)

Literaturverzeichnis

[124] Zhang Z, Huang H, Liu P, Tang C, Wang J: Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening K_{ATP} -channels. *Can J Physiol Pharmacol* 85: 1248-1253 (2007)

[125] Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R: The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} -channel opener. *EMBO J* 20: 6008-6016 (2001)

[126] Zvara DA: Thoracoabdominal aneurysm surgery and the risk of paraplegia: contemporary practice and future directions. *J Extra Corpor Technol* 34: 11-17 (2002)

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Radermacher danken. Er hat mir die Möglichkeit gegeben, an dieser Studie mitzuwirken und mir dieses Thema für meine Doktorarbeit überlassen. Seine Antworten auf jegliche Fragen haben mir sehr weitergeholfen und zusätzlich gebührt ihm mein Dank für seine schnellen Korrekturen dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Michael Gröger, der mich sowohl während der experimentellen Phase der Doktorarbeit als auch danach bei Fragen bezüglich Grafik und Statistik tatkräftig unterstützte.

Weiterhin möchte ich mich bei Sukru Oter für seine Hilfe bei der Durchführung der Versuche bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Ingrid Eble, Tanja Schulz und Florian Simon für ihre stets freundliche und schnelle Hilfe bedanken.

Des Weiteren gilt mein Dank allen aus dem Tier-OP und allen anderen Laborassistentinnen und –assistenten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Schwester. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Gedanken bezüglich dieser Doktorarbeit. Ihre Unterstützung und Motivation waren immer sehr hilfreich und enorm wichtig.

Ganz besonders wichtig ist mir zu guter Letzt ein riesiger Dank an meine Eltern. Sie haben mir das Medizinstudium ermöglicht, unterstützen mich bei allem auf jede erdenkliche Art und Weise und stehen mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Vielen herzlichen Dank!

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Grupp, Simone
Geburtsdatum: 18. März 1985
Geburtsort: Aalen

Schulbildung

1991- 1995 Grundschule (Parkschule Essingen)
1995- 2004 Gymnasium (Schubart- Gymnasium Aalen)
2004 Abitur

Studium

Oktober 2004 Beginn Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
Herbst 2006 Ärztliche Vorprüfung
Herbst 2010 Staatsexamen

Famulaturen

02/07 - 04/07 Allgemein-, Visceral- und Gefäßchirurgie,
Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
(Ostalbkrankenhaus Aalen)
07/07 - 08/07 Anästhesiologie und Intensivmedizin
(Ostalbkrankenhaus Aalen)
02/08 - 03/08 Innere Medizin, Gastroenterologie
(Internistische Gemeinschaftspraxis Dr. med. Aucher und
Dr. med. Bopp, Aalen)
08/08 - 09/08 Dermatologie und Allergologie
(Praxis Dr. med. Hehl, Aalen)

Praktisches Jahr

8/2009 - 7/2010 Ostalbkrankenhaus Aalen
1. Terial Anästhesie
2. Terial Innere Medizin
3. Terial Chirurgie