Universität Ulm

Universitätsklinik für Anästhesiologie

Leitung:

Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. Michael Georgieff

Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung (APV)

Sektionsleiter:

Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. Peter Radermacher

Effekte einer therapeutischen Hypothermie auf die Parameter des oxidativen und nitrosativen Stress im Modell eines hämorrhagischen Schocks beim Schwein

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Elisabeth Catharina Ilgner

geboren in Bonn

2013

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

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

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

Tag der Promotion: 25.10.2013

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VI
1 Einleitung 1
1.1 Stress durch Radikale 2
1.2 Hypothermie 7
2. Material und Methoden 11
2.1 Verwendete Materialien und Geräte 11
2.2 Aufbau und Ablauf des Experiments 18
2.3 Der Comet Assay 22
2.4 Histologische Aufarbeitung der Nierenpräparate 30
2.5 Nitrotyrosinfärbung 30
2.6 Messung von 8-Isoprostan 33
2.7 Messung von Nitrit und Nitrat 34
2.8 Western Blot 37
2.9 Der Elektromobility Shift Essay (EMSA) 41
2.10 Statistische Auswertung 43
3 Ergebnisse 44
3.1 Allgemeine Erhebungsdaten 44
3.2 Temperatur 44
3.3 Hämodynamische Parameter 44
3.4 Metabolische Parameter 46
3.5 Die Nitrotyrosinfärbung 48
3.6 Biochemische Analyse 51
3.7 Der Comet Assay 56
3.8 Ergebnisse der Nitratmessung: 57
3.9 Ergebnisse der 8-Isoprostan Messung: 58
4 Diskussion 59
4.1 Das Studienmodell 59
4.2 Temperatur 60
4.3 Hämodynamische und metabolische Parameter 60
4.4 Nitrosativer Stress 61
4.5 Oxidativer Stress 63
4.6 Schlussfolgerung 68

5 Zusammenfassung 70
6 Literaturverzeichnis 72
Anhang 85
Abbildungsverzeichnis 85
Tabellenverzeichnis 86
Danksagung 87
Lebenslauf 88

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampère
A.	Arteria (Arterie)
Aa.	Arteriae (Arterien)
Abb.	Abbildung
AChE	Acteylcholinesterase
APV	Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung
ATP	Adenosin-5‘- Triphosphat
BE	Base Excess (Basenabweichung)
bidest.	bidestilliert
ca.	circa
CCD	Charge Coupled Device (Digitaler Kamerasensor)
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO_2	Kohlendioxid
cpm	counts per Minute (Zerfälle pro Minute)
dH_2O	bidestilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	enzyme-immunoassay
EKG	Elektrokardiographie
et al.	und Kollegen
FiO_2	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
g	Gramm
h	Stunde(n)
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HES	Hydroxyethylstärke

H_2O	Wasser
H_2S	Hydrogen Sulfid (Schwefelwasserstoff)
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
in vivo	in einem lebenden Organismus
i.v.	intravenös
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
kg/KG	Kilogramm/Körpergewicht
kPa	Kilopascal
LH	Lithium Heparin
LMP	low melting point
M	Molar
mA	Milliampère
MAP	mittlerer arterieller Druck
MEEO	medium-electro-endoosmosis
mg	Milligramm
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
µg	Mikrogramm
min	Minute
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MZP	Messzeitpunkt
N_2	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat (Natriumbikarbonat)
NaOH	Natronlauge
NF-$_\kappa$B	nuclear factor $_\kappa$B

nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
$NO^{\bullet}$	Stickstoffmonoxidradikal
NO_2^-	Nitrit
NO_3^-	Nitrat
NOA	Nitric Oxyde Analyzer
NOS	NO-Synthase
$O_2^{\bullet -}$	Superoxid
$OH^{\bullet}$	Hydroxylradikal
$ONOO^-$	Peroxynitrit
p	Druck
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
Pa	Pascal
paO_2	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphat basierte Saline, Phosphat gepufferte Saline
pCO_2	Kohlendioxidpartialdruck
PEEP	positive endexpiratory pressure
pg	Pikogramm
Poly-dIdC	Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic) saures Natriumsalz
pO_2	Sauerstoffpartialdruck
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute = Umdrehung pro Minute
s	Sekunde
SCGE	single cell electrophoresis (Einzelzell-Gelelektrophorese)
SOD	Superoxid-Dismutase
SpO_2	periphere Sauerstoffsättigung des Hämoglobins
T	Temperatur
TBS	Tris gepufferte Saline
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor 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)
U	Protein-Aktivitätseinheiten (Units)
V	Volt
V.	Vena (Vene)
Vv.	Venae (Venen)
v.a.	vor allem
VCl_3	Vanadiumchlorid
vs.	Versus (gegen, gegenüber gestellt)
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVD	Zentraler Venendruck

1 Einleitung

Diese Dissertation untersucht die Effekte einer therapeutischen Hypothermie auf den oxidativen und nitrosativen Stress im Modell eines hämorrhagischen Schocks im Schwein.

Der hämorrhagische Schock entsteht am häufigsten durch Traumata und ist als die Todesursache Nummer eins für bis zu 45-jährige in der westlichen Welt ein für die Medizin relevantes Untersuchungsgebiet (Adams et al. 2007, Bardenheuer et al. 2000, Keel et al. 2006). Während eines hämorrhagischen Schocks kommt es mit steigendem Schweregrad zur Zentralisation des Kreislaufs und kardiovaskulärem Versagen, Aktivierung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Entstehung von oxidativem und nitrosativem Stress (Pacher et al. 2007). Die lebensbedrohlichen Organschäden, die sich im Zuge des hämorrhagischen Schocks entwickeln, entstehen durch das Zusammenspiel zweier Pathomechanismen:

Erstens führt die Hypovolämie zu einer Minderperfusion der Organe, die bei fortlaufendem Bestehen im Multiorganversagen (MOT) mündet (Herold 2009). Um die Durchblutung der vitalen Organe zu verbessern wird der Kreislauf durch Freisetzung von Katecholaminen zentralisiert.

Zweitens begünstigt die Hypoxämie durch anaeroben Stoffwechsel und Schädigung der Mitochondrien das Entstehen von oxidativen und nitrosativen Radikalen (Pacher et al. 2007). Diese Radikale können die Zellfunktionen maßgeblich schädigen, allerdings reagieren sie auch mit den freigesetzten, vasoaktiven Metaboliten. Das Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet -}$), das man verstärkt in entzündlichem Gewebe und bei oxidativem Stress findet (Crow et al. 1995, Halliwell 1982, McCord et al. 1979) ist ein Reaktionspartner des NO. Beide reagieren zum hochreaktiven, zellschädigenden Peroxynitrit-Anion ($ONOO^{\bullet}$). $ONOO^{\bullet}$ führt zur Peroxidation von Membranlipiden, oxidierten Purinmodifikationen wie 8-Hydroxyguanin (7,8-Dihydro-8-oxo-deoxyguanosin) und damit zu Einzelstrangbrüchen (Inoue et al. 1995). Außerdem werden die Katecholamine durch Radikale oxidiert und ihre Wirkung somit inaktiviert (Macarthur et al. 2000, Pacher et al. 2007, Szabó et al. 1997).

Nachdem bereits in der Kardiochirurgie die Ischämiezeit von Herzmuskelgewebe unter Hypothermie verlängert werden kann und somit ein längeres Zeitfenster zur

Behandlung dieser Patienten besteht, ergibt sich die Frage, ob eine prophylaktische Hypothermie das Ausmaß des oxidativen und nitrosativen Stress im hämorrhagischen Schock herabsetzen kann und eine bessere Versorgung durch reduzierten Metabolismus der Gewebe möglich ist. Um dieses zu untersuchen wurden die Versuchstiere dieser Studie in zwei hypotherme Gruppen (32°C und 35°C) und eine normothermen Gruppe (38°C) randomisiert und einem hämorrhagischen Schock unterzogen. Die kontinuierliche Überwachung der Temperatur, Hämodynamik und metabolischen Stoffwechsellage diente dem Ausschluss von Störfaktoren in der abschließenden Interpretation der Ergebnisse. Um das Ausmaß des oxidativen und nitrosativen Stresses nachzuweisen wurden acht repräsentative Parameter erhoben. Auf die Bedeutung von Radikalstress und die Auswahl der hier bestimmten Parameter wird im Folgenden näher eingegangen.

1.1 Stress durch Radikale

Freie Radikale sind hochreaktive Moleküle oder Ionen, die durch Reaktion mit anderen Molekülen versuchen einen stabilen Zustand zu erreichen. Hierbei kommt es zu einer Kettenreaktion in der erneut Radikale entstehen. Radikale entstehen endogen in der mitochondrialen Atmungskette, Eicosanoidsynthese oder als Abwehrmechanismus mittels Makrophagen und Neutrophilen („respiratory burst“) (Magder 2006), sowie bei Reperfusionsschäden nach ischämischen Ereignissen (Halliwell et al. 2007).

Die drei radikalischen Hauptgruppen werden von reaktiven Sauerstoff- (ROS), Stickstoff- (RNS) und Schwefelverbindungen (RSS) gebildet (Halliwell 2007). Tabelle zwei zeigt die Angriffspunkte der Radikale und deren Konsequenzen für die Integrität des Zellstoffwechsels.

Tabelle 1: Bedeutung freier Radikale und ihrer sekundären Produkte (verändert nach Elmadfa[35]**)**

Angriffsort	Konsequenz
Proteine	Erhöhte Tumorgefahr Verminderte Enzymaktivität Zellschädigung
Lipide	Membranschädigung LDL-Oxidation Atherosklerose
DNA	Mutation
Kohlenhydrate	Veränderung der Rezeptoren

1.1.1 Oxidativer Stress:

Reaktive Sauerstoffverbindungen werden in der mitochondrialen Atmungskette und Cytochrom P450-Oxidasen im Körper gebildet (Valko et al. 2007). Hierbei handelt es sich vor allem um das Superoxidradikal (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (OH). Unter physiologischen Umständen werden bereits 1-5% des Sauerstoffs, der für die Energiegewinnung in Mitochondrien genutzt wird, zum Superoxidradikal reduziert (Mandavilli et al. 2002). Die Radikale schädigen die Atmungskette, was zu einer Abnahme der zellulären Energieproduktion und weiterhin vermehrter Sauerstoffradikalbildung führt (Pacher et al. 2007). Mit zunehmender Produktion von ROS wird die Membranintegrität der Mitochondrien zerstört, freigesetzte Radikale wandern in den Zellkern und führen dort zu DNA-Modifikationen. Da Mitochondrien den Zellkern umgeben, wird der Transfer von ROS zur DNA begünstigt (Collins et al. 1993, Kasai 1997). Zu den möglichen DNA-Reaktions- und Folgeprodukten gehören Basenmodifikationen und DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche.

Der gesunde Organismus schützt sich vor den Folgen der Produktion von freien Radikalen mit einem antioxidativen Schutzsystem. Oxidativer Stress stellt also eine Imbalance zugunsten von prooxidativen Aktivitäten dar (Dalle-Donne et al. 2006). Während milder Stress in gesunden Zellen zu gesteigerter Proliferation und Aktivierung des Schutzsystems führt, kommt es bei Versagen der Schutzenzyme zu Schädigungen, die zu dauerhaft bestehenden Mutationen führen und im Zelltod münden (Magder 2006).

Um den oxidativen Stress nachzuweisen wurden in dieser Studie fünf Parameter erhoben, die im Folgenden kurz hinsichtlich ihrer Schädigungsmechanismen vorgestellt werden.

Der erste Parameter ist die Bestimmung von DNA-Strangbrüchen. Mit zunehmender Produktion von ROS wird die Membran der Mitochondrien zerstört, freigesetzte Radikale wandern in den Zellkern und führen dort zu DNA-Modifikationen. Besonders schädigend ist die Bildung von 8-Hydroxyguanin, das anstelle von Cytosin an Adenin bindet und zu DNA-Strangbrüchen führt (Abu-Quare et al. 2001, Collins et al. 1996). Um diese zu untersuchen, wurden diese durch Einzel-Zell-Gelelektrophorese nachgewiesen.

Als zweiter und dritter Parameter und Nachweis der Stress- und Entzündungslage in diesem Modell wurden eine biochemische Analyse mittels Electromobility Shift Essay (EMSA) von nuclear factor κB (NFκB) und ein Westernblot von Inhibitor κBα (IκBα) im Nierengewebe angefertigt. Die Stoffwechselkaskade von NFκB kann durch oxidativen Stress aktiviert werden (Block-Damti et al. 2005) und vermittelt durch die folgende Aktivierung der Gentranskription die Entstehung von Entzündungen und Zelltod (Collins et al. 1995, Hellerbrand et al. 1998). In nicht stimulierten Zellen liegt NFκB in Bindung an Inihibitionsfaktor-κBα (IκBα) im Zytosol vor, der dessen nukleären Transport verhindert (Zwacka et al. 1998). In dieser Studie wurden monomeres NFκB und IκBα quantitativ bestimmt, die damit Aufschluss über das Ausmaß der Aktivierung von NFκB geben. Obwohl beide als Nachweis der inflammatorischen Lage gelten, induziert NFκB auch neben oxidativem Stress und Hypoxie die Genexpression der Häm-Oxygenase-1 (HO-1), die den vierten erhobenen Parameter darstellt (Kurata et al. 1996, Takahashi et al. 1999, Rizzardini et al. 1993). Die HO-1 ist eine Isoform der Hämoxygenasen, die zur Familie der Hitzeschockproteine gehört und hauptsächlich in Milz und Leber vorkommt (Maines 1997). Physiologischerweise katalysiert die HO-1 die Oxidation von Häm zu Biliverdin (Liu et al. 2000), wobei neben einem Eisen-II-Ion auch Kohlenmonoxid (CO) freigesetzt wird (Bonkovsky et al. 1996, Liu et al. 2000), das dann wiederum ähnlich dem später eingehend besprochenen NO die Vasodilatation von Gefäßen vermitteln kann (Morita et al. 1995). Neben der vermittelten Vasodilatation konkurriert CO aber auch mit Sauerstoff um die Bindungsstelle am Hämoglobin und verstärkt so die Hypoxämie. Die Messung der

HO-1 Konzentration in der Niere mittels Western Blot gibt hauptsächlich Aufschluss über die Intensität der Stressoren, die ihn induzieren. Als fünfter Parameter wurde die 8-Isoprostane Konzentration im Blut gewählt, deren Bestimmung als zuverlässiger Marker der Lipidperoxidation durch oxidative Radikale gilt (Basu et al. 1998, Montuschi et al. 2004) und bereits in der Bestimmung von oxidativen Schäden bei Ischämie-Reperfusions-Verletzungen Anwendung fand (Sakamoco et al. 2002, Basu et al. 1998). Im Zuge der Abwehrreaktion auf hypovoläme und andere Schockformen produziert der Körper Arachidonsäure (Keel et al. 2005). Freie Radikale vermitteln dann die Peroxidation von Arachidonsäure, bei der 8-Isoprostan entsteht. Bei Schockzuständen diente die 8-Isoprostane Konzentration nicht nur als Korrelat von freien Radikalen, sondern sogar als Prognosefaktor für das Outcome (Mishra et al. 2005). Innerhalb dieser Studie gibt die Konzentration von 8-Isoprostane im Blut Aufschluss über die Peroxidation von Lipiden, die als Bestandteil aller Zellmembranen zur Aufrechterhaltung des physiologischen Milieus und somit zur Barriere für ROS und RNS beitragen.

1.1.2 Nitrosativer Stress:

Neben dem oxidativen Stress kennt man auch Radikale, die sich von Stickstoffmolekülen ableiten, so genannte reaktive Stickstoffspezies (Stamler et al. 1998, Hausladen et al. 1996). Viele zytopathologische Veränderungen beruhen auf dem Einwirken von Stickstoffmonoxidradikalen ($NO^{\cdot}$) und Peroxynitrit ($ONOO^{\bullet}$).

Im hämorrhagischen Schock freigesetztes NO kann abhängig von Angriffspunkt und Zelle gegensätzliche Wirkungen zeigen: in niedrigen Konzentrationen dient es als intrazellulärer Botenstoff, der frei über die Zellmembran diffundiert und vasorelaxierend wirkt, in höheren Konzentrationen zeigt NO dagegen zytotoxische Effekte. Es reagiert unter anderem direkt mit Eisen, und Eisenclustern, Enzymen der Glykolyse und DNA-Biosynthese-Enzymen. Durch Reaktion mit den SH-Gruppen dieser Enzyme werden sie inaktiviert. Außerdem interagiert NO mit den Nucleinsäuren, wobei in Gegenwart von Sauerstoff hier sogar Basenaustausch und Strangbrüche in der DNA nachgewiesen wurden (Chen et al. 1997, Didier et al. 1996, Salgo et al. 1995). Zum Nachweis des nitrosativen Stresses wurden drei Parameter bestimmt:

Der erste beinhaltet die Bestimmung der NO-Synthase (NOS) im Western Blot. Das Enzym NOS katalysiert die Biosynthese von NO und kommt in drei verschiedenen Isoformen vor (Moncada et al. 1993). Zu diesen zählen neben einer induzierbaren NO-Synthase (iNOS), die nur nach Zytokinstimulation durch Endotoxine, TNF und Interleukine von Geweben exprimiert wird, dann aber starke Entzündungsprozesse fördert, auch zwei konstitutiv exprimierte NO-Synthasen. Die zwei letzteren sind die endotheliale NOS (eNOS), die in Endothelzellen und Neuronen nachgewiesen wurde, und die neuronale NOS (nNOS), die in neuronalen Zellen des Zentralen Nervensystems nachgewiesen wurde (Nathan et al. 1994, Pacher et al. 2007). Während die Aktivität der konstitutiven eNOS und nNOS durch Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration reguliert werden, wird die iNOS durch pro-inflammatorische Stimuli induziert. Durch verstärkte Exprimierung der iNOS kann die NO-Produktion innerhalb kürzester Zeit stark gesteigert werden (Pacher et al. 2007). Ihre Bestimmung gibt damit sowohl Hinweis auf das Vorliegen pro-inflammatorischer Stimuli, als auch auf die mögliche Produktion großer Mengen NO, dessen Bestimmung den zweiten Parameter darstellt. NO hemmt in der Atmungskette reversibel die Cytochorm-C-Oxidase und konkurriert mit Sauerstoff um dessen Bindungsstelle (Palacios-Callender et al. 2004). Bei vermehrter NO-Produktion und Hypoxämie, die im hämorrhagischen Schock auftreten, kommt es zu gesteigertem Verlust von Elektronen aus der Atmungskette, die die Formation von Superoxid und Peroxynitrit begünstigen. Gleichzeitig wird nicht genügend Energie durch die Atmungskette für den Zellstoffwechsel bereitgestellt (Brown 1999, Brown et al. 1999). Als Reaktionspartner von $O_2^{\bullet -}$ birgt NO schädigende Wirkung durch das entstehende $ONOO^{\bullet}$. Dieses nitriert den Phenolring von Tyrosin und liegt dann intra- und extrazellulär, an Proteine gebunden als 3-Nitro-L-Tyrosin (Nitrotyrosin) und damit als nachweisbare Form vor, die wir als dritten Parameter bestimmten. $ONOO^{\bullet}$ reagiert mit fast allen Zellbestandteilen, deren Konversion oder Zerstörung in Apoptose oder Nekrose münden (Virag et al. 2003). $ONOO^{\bullet}$ stört die Signaltransduktionen der Zelle und führt zu Lipidperoxidation, die in der Zerstörung von Membranlipiden mündet (Hogg et al. 1999). Hierdurch entsteht auch eine Permeabilisation der äußeren Mitochondrien Membran, über die anschließend pro-apoptotische Signalmoleküle in das Zytoplasma ausgeschüttet

werden und so den Zelltod einleiten (Bouchier-Hayes et al. 2005). Es oxidiert weiterhin Gluthation, das damit der Zelle nicht mehr als Radikalfänger zur Verfügung steht und begünstigt die Bildung von 8-Hydroxyguanin, das zu Strangbrüchen führt (Cuzzocrea et al. 2001, Pacher et al. 2007). Der Nachweis von Nitrotyrosin bedeutet in erhöhter Konzentration, dass auch angehobene Spiegel von $ONOO^{\cdot}$ vorgelegen haben müssen und auf Grund der geschilderten Pathomechanismen stellt es einen umfangreichen Biomarker des nitrosativen Stresses dar (Mohiuddin et al. 2006, Pacher et al. 2007, Van der Vliet et al. 1993).

1.2 Hypothermie

Neben den aufgezeigten zellulären Schädigungen durch die Produktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies ist die Letalität des hämorrhagischen Schocks vor allem auf die Ischämiezeit der vitalen Organe zurückzuführen. Bei Hypoxie kommt es bereits nach wenigen Minuten zu einem Niedergang des Hirngewebes, während das Herzmuskelgewebe nach etwa zwanzig Minuten erste Schäden erleidet (Alam et al. 2006, Kumar et al. 2012). In der Kardiochirurgie wird eine therapeutische Hypothermie zur Verlängerung der tolerierbaren Ischämiezeit des Myokards bereits angewendet (Seekamp et al. 1999, Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group 2002). In der Notfallversorgung des hämorrhagischen Schocks wird dieser Ansatz hingegen bislang kontrovers diskutiert. Während zunächst starke Absenkungen der Körpertemperatur zum Schutz des Organismus propagiert wurden, ist man nach heutigen Erkenntnissen der Forschung dazu übergegangen, eine geringere Hypothermie über einen längeren Zeitraum anzustreben (Koizumi et al. 1998, Polderman 2004). Alam et al postulierten, dass kontrollierte Hypothermie den Metabolismus vitaler Organe während der Versorgung lebensgefährdender Verletzungen aufrechterhält (Alam et al. 2004), andere Studiengruppen skizzierten jedoch einen „Teufelskreis“ aus Hypothermie mit Azidose und Koagulopathie (Krause et al. 2000, Martini et al. 2005, Mikhail 1999). Wesentliche Unterschiede in diesen bislang durchgeführten Untersuchungen bestehen im Startzeitpunkt der Hypothermie. Besonders die Durchführung einer prophylaktischen Hypothermie ist im Kontext des hämorrhagischen Schocks bisher unerforscht. Den Einfluss einer solchen Therapie auf die Ausbildung von oxidativem und nitrosativen Stress wird die vorliegende Studie zeigen.

Neben dem günstigsten Zeitpunkt einer hypothermen Behandlung muss auch das Ausmaß abgewogen werden. Grundsätzlich besteht Hypothermie ab einer Körperkerntemperatur von weniger als 35°C (Segers et al. 1998) wobei drei verschiedene Formen der Hypothermie unterschieden werden:

Tabelle 2: Einteilung der Hypothermieformen (verändert nach Segers (Segers et al. 1998)

	Traditionell	**Trauma Patient**
Milde Hypothermie	35 – 32 °C	35 – 34 °C
Moderate Hypothermie	32 – 28 °C	34 – 32 °C
Schwere Hypothermie	< 28 °C	< 32 °C

Die Ursachen für eine Hypothermie werden als endogen, kontrolliert oder akzidentell klassifiziert (Segers et al. 1998). Während die endogene Hypothermie durch Dysfunktion im thermoregulatorischen Zentrum entsteht, kommt es bei der akzidentellen Hypothermie im Rahmen eines Unfalls oder Exposition in kalter Umgebung zum Abfall der Körpertemperatur ohne primäre Störung in diesem Zentrum. Die kontrollierte Hypothermie wird auch als therapeutische Hypothermie bezeichnet und bedeutet die aktive Kühlung eines Patienten.

Für die Festlegung der Temperaturen der gekühlten Versuchsgruppen ist die Berücksichtigung der Ergebnisse aus der bestehenden Literatur wegweisend. Grundsätzlich kommt es bei milder Hypothermie (35-32°C) zu gesteigerter sympathikoadrenergen Aktivität mit resultierender Vasokonstriktion, Tachykardie und Steigerung des Herzminutenvolumens (Segers et al. 1998). Bei weiterem Temperaturabsinken unter 32°C, im Sinne einer schweren Hypothermie, nehmen Herzfrequenz und Herzminutenvolumen bei erhöhtem Gefäßwiderstand ab, außerdem sinken die Atemfrequenz und die Sauerstofftransportkapazität und es kommt zu Herzrhythmusstörungen (Parkash et al. 1978). Es wurden weiterhin unterhalb von 33°C starke Beeinträchtigungen der Gerinnungsfaktoren und Thrombozytenfunktion zugunsten einer Hypokoagulabilität beobachtet (Johnston et al, 1994; Valeri et al, 1995; Watts et al 1998, Martini et al. 2008). Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte eine induzierte Hypothermie nicht kälter als 32°C gewählt werden (Fox et al.2010).

In Zusammenhang der therapeutischen Hypothermie wird in der Forschung auch der Aspekt der „suspended animation“ diskutiert. Dies bedeutet wortwörtlich „ausgesetzte Belebung“ und beschreibt einen winterschlafähnlichen Zustand, wobei Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch bei begleitender Hypothermie reduziert sind (Blackstone et al. 2005). Um mehr Zeit für die Behandlung schwerer Traumata zu gewinnen, wurde in Studien unseres Labors erprobt, diese Lage mit Schwefelwasserstoff (H_2S) zu induzieren (Blackstone et al. 2008, Bracht (Publikation in Vorbereitung), Wagner et al. 2009). Dieser Ansatz ist allerdings durch die ausgeprägte Toxizität von H_2S limitiert (Simon et al. 2008).

In der Zusammenschau der bislang verfügbaren Literatur konnten durch induzierte Hypothermie zwischen 32-35°C Erfolge in der Behandlung von Kontusionsverletzungen mit Hirnödem in der Neurochirurgie und in der verlängerten Ischämiezeit des Myokards in der Kardiochirurgie erzielt werden. Das hier verwendete Modell eines hämorrhagischen Schocks im Schwein soll nun zeigen, ob eine Hypothermie von 32°C oder 35°C benefizielle oder deletäre Effekte auf die Bildung oxidativer und nitrosativer Radikale im Blut und Nierengewebe gegenüber der 38°C-Gruppe zeigt. Um Relevanz für den klinischen Alltag zu erreichen wurden die Tiere unter analogen Bedingungen einer Intensivstation überwacht und therapiert. Hierunter versteht man die invasive Messung von Vital- und Druckparametern sowie die Möglichkeit zur Gabe von Infusionen und Medikamenten über einen zentralvenösen Katheter. In dieser Studie wurde die Hypothermie über einen in der Vena jugularis platzierten Ballonkatheter, der gekühlte Flüssigkeit enthielt, erreicht und kontinuierlich überwacht. In vorangegangen Studien anderer Labore wurde die Hypothermie zum Teil durch gekühlte Infusionen oder durch Auflegen von Eisbeuteln herbeigeführt (Chen et al. 2005, Krause et al. 2000). Während diese Modelle mit starken Schwankungen der Körperkerntemperatur einhergingen, ermöglicht das hier verwendete Modell eine kontinuierliche, exakte Einstellung der Körperkerntemperatur. Als Versuchstier eignet sich das Schwein besonders, da es hohe physiologische, anatomische und metabolische Analogie zum Menschen aufweist (Deitch 1998, Dodds 1982, Hannon et al. 1990, Howe et al. 1968). Es besteht darüber hinaus große Homologie bezüglich der Prädisposition gegenüber

oxidativem wie nitrosativem Stress und den antioxidativen Schutzeigenschaften des Parenchyms (Dodds 1982). Im Vergleich zu kleineren Versuchstieren überzeugt außerdem die bessere Möglichkeit der Instrumentalisierung.

Im Rahmen dieser Studie sollen folgende Fragestellungen untersucht werden und Aufschluss über die Effekte einer hypothermen Therapie bei 32°C und 35°C auf die Entstehung von oxidativem und nitrosativen Stress im Vergleich zu einer normothermen Gruppe bei 38°C geben.

1) Führen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies bei der hypothermen Behandlung mit 32°C oder 35°C zu vermehrten oder verringerten DNA-Strangbruchbildung im Blut und Nierengewebe im Vergleich zur 38°C-Gruppe?

2) Kommt es zu einer verminderten Radikallast und deren Vorstufen in den hypothermen Gruppen, gemessen an 8-Isoprostane und NO im Blut, iNOS und HO-1 in der quantitativen Proteinanalyse im Nierengewebe?

3) Kommt es in den hypothermen Gruppen zu einer verminderten inflammatorischen Lage im Nierengewebe, gemessen an NFκB im EMSA shift und IκBα im Western Blot?

4) Wird in der Nitrotyrosinfärbung in den hypothermen Gruppen weniger nitrosativer Stress, der durch die Bildung von Peroxynitrit verursacht wird nachgewiesen als in der Kontrollgruppe?

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

2.1.1 Operationsmaterialien

▪ Atropin	Atropinsulfat®, Braun, Melsungen
▪ Azaperon	Stresnil®, Janssen, Neuss
▪ Buprenorphin	Temgesic®, Reckitt Benckiser, UK
▪ Cystofix-Katheter	Freka®, Cyst Standard 8 cm - CH 10 Fresenius Kabi, Bad Homburg
▪ Heparin	Heparin-Natrium, Braun AG, Melsungen
▪ Hydroxyethylstärke	Vitafusal® 6%, Serumwerk, Bernburg
▪ Indocyaningrün	ICG-Pulsion®, Mulsion Medical Systems, München
▪ Intubationstubus	8,5 Magill, Mallinckrodt Medical, Athlone, Ireland
▪ Kaliumchlorid	KCL-Lösung Fresenius, Fresenius Kabi, Bad Homburg
▪ Katheter	
○ Arrow, Katheterschleuse	9Fr, SI 11142, Arrow GmbH, Erdingen
○ Arrow, venöser Katheter	4Fr, CS-16402, Teleflex Medical GmbH, Kernen
○ High Flow Cordis	7Fr, 527-784, Cordis Corp., Miami, Florida, USA
○ Alsius-Kühlkatheter	IC-3893 AE, Zoll Circulation, California USA
○ PICCO-Katheter	5µV/V/mmHg, PV2015L20, Pulsion Medical Systems, München
○ Super-Arrow-Flex® Einführbesteck	10Fr, CL-07011, Arrow GmbH, Erdingen 5Fr, CP-07511, Arrow GmbH, Erdingen 7Fr, SI-09700, Arrow GmbH, Erdingen
○ Swan-Ganz Katheter	7Fr, 111F7, Edward Lifescience, California, USA

○ Thermodilkatheter	4Fr, PV2014L, Pulsion Medical System, München
○ Messsonden	Größe 8,4,3, Transonic Systems Inc., New York, USA
▪ Ketamin	Ketavet®, Pharmacia GmbH, Karlsruhe
▪ Magensonde	CH16, 125cm, Duodenalsonde nach Levin, Braun AG, Melsungen
▪ Midazolam	Midazolam® Ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm
▪ Natrium-Pentobarbital	Narkoren®, Merial, Hallbergmoos
▪ Natriumchloridlösung	Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% NaCl, Braun AG, Melsungen
▪ Noradrenalin	Arterenol® 25ml, Sanofi-Aventis Deutschlang GmbH, Frankfurt
▪ Pancuronium	Pancuronium duplex-Actavis, Actavis, Langenfeld
▪ Propofol	Propofol-Lipuro 2%, Braun AG, Melsungen
▪ Ringer-Lösung	Ringerlösung Fresenius®, Fresenius Kabi, Bad Homburg
▪ Transfusionsbeutel	500ml, Maco Pharma International GmbH, Langen
▪ Venenverweilkanüle	Vasofix Braunüle, Braun AG, Melsungen

2.1.2 Operationsgeräte

▪ Absaugpumpe	Wisa Absaugpumpe W.Sauer GmbH& CoKG, Wuppertal
▪ Beatmungsgerät	Siemens Servo Ventilator 900B®, Siemens, Erlangen
▪ BGA-Gerät	ABL System 625, Radiometer, Copenhagen, Dänemark
▪ COLD-System	Pulsion COLD Z-021®, Pulsion Medical Systems, München
▪ Infusomat	Infusomat secura, B. Braun, Melsungen

▪ Injektomat	Perfusor secura, B. Braun, Melsungen
▪ Umlaufkühler	Julabo FC600S, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
▪ Pulsoxymeter	Datex Capnomac® Ultima ULT-S-3301 Datex, Instrumentation Corp., Helsinki, Finland
▪ Überwachungseinheit	66S™-Monitor, Hewlett Packard, Palo Alto, California, USA

2.1.3 Laborgeräte

▪ Eismaschine	Scotsman Ice Systems AF80, Mailand, Italien
▪ Elektrophoresekammer	Sub-Cell GT Basic, Bio-Rad, Hercules, California, USA
▪ Elektrophorese WB	Mini-Protean Tetra cell, Bio-Rad, München
▪ Heizblock	Mixing Block MB-102, BIOER, Biozym Scientific GmbH, Olendorf
▪ Heizrührer	RTC Basic, IKA Labortechnik, Staufen
▪ Kühlschrank	Glass Line, Liebherr, Bulle, Schweiz
▪ Mikroskop	Olympus BX41; U-LH100HG; U-RLF-T, Olympus, Tokyo, Japan
▪ Mikrowelle	Bosch Mikrowellenherd 842C, Robert Bosch GmbH, Gerlingen
▪ Nitratanalysegerät	Sievers 280 NOA, FMI GmbH, Seeheim/ Ober-Beerbach
▪ Photo Prozessor	Eastman Kodak Company, Rochester,NY
▪ pH-Meter	Mettler MP220, Mettler Toledo, Giessen
▪ Pipette 10-1000µl	Eppendorf Research®, Eppendorf, Hamburg
▪ Spannungsversorgung	Consort E835, LTF Labortechnik, Wasserburg/Bodensee
▪ Vortex Genie	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA

▪ Waage	Mettler Toledo, XS603S Delta Range, Mettler-Toledo GmbH, Giessen
▪ Wasserbad	Haake C1, FMI GmbH Seeheim/Ober-Beerbach
▪ Zentrifugen	
○ Eppendorf 5415C	Eppendorf Research®, Hamburg
○ Haemofuge	Heraeus, Osterode
○ Hettich Rotina 38R	Hettich, Bäch, Osterode

2.1.4 Chemikalien, Reagenzien

▪ Acrylamid EC-890	Fa. National Diagnostics, UK
▪ Ammoniumpersulfat #A7460	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ DMSO	Merck, Darmstadt
▪ Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
▪ Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ LMP-Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ MEEO-Agarose	Merck, Darmstadt
▪ Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
▪ Na_2-EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Natriumbikarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Natriumnitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Natronlauge 1M	Merck, Darmstadt
▪ PBS-Puffer	Invitrogen Cooperation, Paisley, Schottland
▪ Salzsäure 1M	Merck, Darmstadt
▪ Sauerstoff	MTI Industriegase, Ulm
▪ Stickstoff (gasförmig)	MTI Industriegase, Ulm
▪ Stickstoff (flüssig)	MTI Industriegase, Ulm
▪ Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
▪ Tris-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim

- Triton X-100 — Sigma-Aldrich, Steinheim
- Vanadiumchlorid — Merck, Darmstadt

2.1.5 Käuflich erhältliche Analysekits und Antikörper

- Antikörper für Western Blot
  - HO-1-1°AK: ADI-OSA-111-F — Enzo Life Sciences, Lörrach
  - HO-1-2°AK: #7076 — Cell Signaling Technology, USA
  - iNOS-1°AK: 610333 — BD Transduction Laboratories, Europe
  - iNOS-2°AK: #7071 — Cell Signaling Technology, USA
  - IKB-α-1°AK: sc371 — Santa Cruz Biotech., Europe
  - IKB-α-2°AK: sc-2004 — Santa Cruz Biotech., Europe
- Gesamtprotein in Plasma — SYS1 BM/Hitachi 704/911, Roche Diagnostics, Mannheim
- Proteingrößenstandard
  - Kaleidoscope #161-0375 — Bio-Rad, München
- 8-Isoprostane EIA Kit — Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan, USA

2.1.6 Medien, Standardlösungen und Puffer

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Lösungen und Puffer mit bidest H_2O hergestellt.

2.1.6.1 Materialien für den Comet Assay

- Lyse-Stammlösung
  - NaCl: 2,5 M
  - Na_2EDTA: 100 mM
  - Tris-Base: 10 mM
- Lysepufferlösung
  - Triton X-100: 42,5 mM in Lyse-Lösung
  - DMSO: 1,41 M in Lyse-Lösung
- Alkali-Elektrophoresepuffer
  - NaOH: 300 mM
  - Na_2EDTA: 1mM

- Neutralisationspuffer — Tris-Base: 48,5 mg/ml
- Färbelösung — Ethidiumbromid: 20 µg/ml
- LMP-Agarose — LMP-Agarose: 5 mg/ml PBS
- Vanadiumchloridlösung — VCL_3: 50 mM in HCL (1 M)

2.1.6.2 Materialien für den Western Blot

- Ammoniumpersulfat — 1g APS in 10 ml Auqa dest. Lösen
- Bromphenolblau — 50 mg Bromphenolblau, 100 ml Aqua dest.
- Ponceau S — 0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure
- 1M Tris-HCL — 121,14 g Tris Base, 500 ml Aqua dest., mit 32%iger HCl auf pH 6,8 einstellen

2.1.7 Sonstige Verbrauchsmaterialien

- Adapter für Monovette — Sarstedt, Nürmbrecht
- Bechergläser — Schott Glas, Mainz
- Deckgläser — Menzel-Gläser, Braunschweig
- Einmalpipettierspitzen — Corning Incorporated, New York
- Erlenmeyerkolben — Schott Glas, Mainz
- Färbeküvetten nach Hellendahl — VWR International, Darmstadt
- Küvette 4ml 1cmx1cm, PS — Sarstedt, Nürmbrecht
- Micro Test Tubes 1,5 ml — Eppendorf, Hamburg
- Objektträger mit Mattrand — Marienfeld, Lauda-Königshofen
- Perfusor-Spritzen 50 ml — Braun AG, Melsungen
- Pipettenspitzen — VWR, VWR International GmbH, Darmstadt
- Probengefäße 20 ml — Sarstedt, Nürmbrecht
- Röntgenkassette — Amersham Biosciences, Buckingamshire, England

▪ Saranfolie	Dow Chemical Company, Schwalbach
▪ Serum-Monovetten 2,7 ml LH	Sarstedt, Nürmbrecht
▪ Zentrifugenröhrchen 14 ml	Sarstedt, Nürmbrecht

2.1.8 Versuchstiere

Deutsche Landschweine, beiderlei Geschlechts, ca. 16 Wochen alt, durchschnittliches Gewicht 52,2 kg (38-64 kg).

2.1.9 Software

▪ Axio Vision Software rel. 8.4	Zeiss, Jena
▪ Comet Assay II 2.11	Perceptive Instruments, Haverhill, UK
▪ Excel 2010	Microsoft, Redmond, Washington, USA
▪ Sigma Plot 2002 2.03	Systat Software Inc., Richmond, California, USA
▪ Sigmastat 8.0	Systat Software Inc., Richmond, California, USA
▪ Windows XP	Microsoft, Redmond, Washington, USA
▪ Windows 95	Microsoft, Redmond, Washington, USA
▪ Word 2010	Microsoft, Redmond, Washington, USA

2.2 Aufbau und Ablauf des Experiments

2.2.1 Versuchsaufbau und ethische Grundlagen

Das Versuchsprotokoll wurde sowohl vom Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm, als auch vom Regierungspräsidium Tübingen, Baden-Württemberg genehmigt. Der Versuch wurde basierend auf den Deutschen und Europäischen Richtlinien zum Umgang mit Labortieren des „Bundesinstituts für Gesundheit“ durchgeführt.

Zur Durchführung der Versuchsreihe wurden 20 deutsche Landschweine beiderlei Geschlechts mit einem mittleren Körpergewicht von 52,2 kg (38-64 kg) verwendet.

Vor dem Versuchstag lebten die Schweine jeweils eine Woche im Tierforschungszentrum der Universität Ulm. Für insgesamt 12 Stunden vor Operationsbeginn wurde den Tieren die Nahrung entzogen, Wasser stand ihnen aber in dieser Zeit uneingeschränkt zur Verfügung.

Die Tiere wurden per Randomisation in drei Gruppen eingeteilt. Alle Gruppen erhielten die gleiche operative Behandlung und erlitten einen blutvolumenadaptierten hämorrhagischen Schock. Unterschiedlich war hingegen die über einen Kühlkatheter induzierte Körperkerntemperatur. Als Kontrollgruppe wurde die 38°C-Gruppe (n=6) verwendet. Als Versuchsgruppen galten die 32°C-Gruppe (n=7) und die 35°C-Gruppe (n=7).

2.2.2 Prämedikation und Anästhesie während der OP:

Im Versuchstierzentrum erhielten die Tiere eine intramuskuläre Injektion von 5 mg/kg/KG Azaperon mit 2,5 mg Atropin, die sedierend wirkt. Die Tiere wurden schlafend in einer Transportbox in den Tier-OP der Sektion „Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung“ in der Parkstraße 11, 89073 Ulm gebracht. Hier erfolgte noch in der Transportbox eine Präoxygenierung. Außerdem wurde ein periphervenöser Zugang über eine der Ohrvenen geschaffen, um hierüber die Narkose mit 1mg/kg/KG Ketamin und 2 mg/kg/KG Propofol einzuleiten. Anschließend wurden die Tiere auf dem Rücken auf den OP-Tisch gelagert. Unter dem Rücken befand sich die Nullelektrode für den intraoperativ verwendeten Couter. Nach der orotrachealen Intubation folgte die Relaxation mit 10 mg/kg/KG Pancuronium, Analgesierung mit 1,5 mg Buprenorphin und die

kontrollierte Beatmung. Das Atemzugvolumen betrug hierbei 8 ml/kg/KG, die inspiratorische O_2-Konzentration (FiO_2) von 21% und die Atemfrequenz 10-12 min^{-1} um einen arteriellen pCO_2-Wert von 35-40 mmHg einzustellen. Das Inspirations- zu Expirations-Verhältnis betrug 1:1,5. Da Schweine keine alveoläre Kollateralventilation aufweisen, sind sie besonders gefährdet für die Bildung von beatmungsassoziierten Atelektasen, deshalb wurde der positive endexspiratorische Druck (PEEP) auf 10 cmH_2O eingestellt [110].

Um die Narkose aufrecht zu erhalten bekamen die Tiere eine Dauerinfusion von Pentobarbital 4,5mg/kg/h und intermittierend eine Buprenorphingabe zur Analgesierung. Eine Infusion von Pancuronium 0,1 mg/kg/h sorgte perioperativ für die Relaxation. Während des gesamten Versuchs wurden das EKG, der zentrale Venendruck, die Atemfrequenz und der arterielle Mitteldruck der Tiere überwacht. Außerdem wurde die Körperkerntemperatur rektal bestimmt und die Sauerstoffsättigung mittels transkutaner Pulsoxymetrie am Schwanz der Tiere gemessen.

Die Tiere erhielten während der Operation und den nachfolgenden Stunden Ringer-Laktat Infusionslösungen. Während der Operation wurde auch Hydroxyethylstärke (HES) infundiert, um das Blutvolumen und den Blutdruck zu stabilisieren. Nach der Schockphase wurde zur Stabilisierung, bzw. Einstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) Noradrenalin verwendet, gleichzeitig wurde nie eine Frequenz von 160 Schlägen/min überschritten, um ischämische Myokardschäden durch Tachykardie zu vermeiden.

2.2.3 Chirurgische Präparation:

Vor Beginn der Operation wurde das Tier rasiert und gewaschen. Nach dem Legen einer Magensonde und Befestigung von EKG-Elektroden an den Läufen wurde das Schwein steril abgedeckt. Zu Beginn der Operation wurde das jeweilige Tier per Losentscheid einer der drei Versuchsgruppen von 32°C, 35°C oder 38°C zugeordnet.

Die rechte Vena jugularis wurde präpariert und mit einer zwei-lumigen Schleuse versehen. Durch eines der Lumina wurde die Narkosemedikation zusammen mit einer Ringer-Laktat-Lösung als Trägerstoff infundiert, durch das andere bei Bedarf die HES- Lösung.

Über diese Schleuse wurde außerdem ein 7F-Swan-Ganz-Katheter in die Arteria pulmonalis eingeschwemmt, der zur pulmonalarteriellen Druckmessung diente. Über das distale Lumen erfolgte die PAP-Messung.
In die linke Vena jugularis wurde der drei-lumige Kühlkatheter gelegt, der gleichzeitig zur zentralen Venendruckmessung diente. Ein anderes seiner Lumina wurde als zentralvenöser Zugang genutzt, um Noradrenalin oder andere Medikamente herznah zu infundieren. Der Kühlkatheter besaß einen mit kalter Flüssigkeit befüllbaren Ballon, welcher das im Gefäß vorbeifließende Blut auf die gewünschte Temperatur absenkte. In die Arteria carotis communis dexter wurde eine 5F- Schleuse gelegt. Dieser Katheter diente der Messung des Herzzeitvolumens mit Hilfe von Indocyanin-Grün.
Die Venae femorales wurden zu beiden Seiten präpariert. Beide wurden mit einer 7F- Schleuse versehen, in die ein High-Flow 7F- Katheter geschoben wurde. Auf der rechten Seite reichte dieser bis in die Vena hepatica, während der Katheter der linken Seite bis zur Vena renalis vorgeschoben wurde. Diese beiden Katheter dienten später zur Blutabnahme. Die Arteria femoralis wurde zur arteriellen Druckmessung mit einer Schleuse versehen, in die wiederum ein 10F-Katheter eingeführt wurde. Dieser hatte ein großes Lumen, in das anschließend ein 5F-PICO-Katheter geschoben wurde, über den der Druck kontinuierlich gemessen werden konnte. Dass beide letzteren Katheter den gleichen Durchmesser haben war wichtig, um die Dichtung dieses Systems zu gewährleisten.
Zur Blutabnahme in der Vena porta wurde diese mit einem zwei-lumigen-Katheter versehen. An der Portalvene, sowie der Arteria renalis dexter und Arteria hepatica wurde die Flussgeschwindigkeit im Gefäß mit Hilfe von Flussköpfen, die bei eröffneter Bauchhöle eingesetzt werden, gemessen.
Die Blase des Tieres wurde mit einem Katheter versehen, und ermöglichte so die Überwachung des Urinvolumens.
Am Ende des Versuches wurden die Tiere in tiefer Narkose mittels intravenöser Gabe von 20 ml Kaliumchlorid getötet. Zur Auswertung der Organmorphologie und Anfertigung einer TUNEL-Färbung wurden von allen großen Thorax- und Abdominalorganen Proben entnommen, die nach Formalinfixierung als Gewebeschnitte auf Objektträgern konserviert wurden. Auch für den Comet Assay

der Niere wurde etwas Organmaterial entnommen und umgehend, wie im Materialteil beschrieben, verarbeitet.

2.2.4 Zeitlicher Ablauf der Probenentnahme:

Auf die operative Katheter- und Messsondenversorgung folgte eine zweistündige Ruhephase. Gegen 16 Uhr erfolgte die erste Blutentnahme zur Bestimmung des Comet Assays (Messzeitpunkt 1, MZP 1). In unserem Modell führten wir den hämorrhagischen Schock herbei, indem Blut aus der Arteria femoralis in einen 500 ml Transfusionsbeutel gefüllt wurde bis ein arterieller Mitteldruck (MAP) von 30±3 mmHG erreicht wurde. Zuvor wurde außerdem ein maximal zu entnehmendes Blutvolumen in Abhängigkeit des Körpergewichts des jeweiligen Versuchstieres bestimmt. Das Zielvolumen zur Simulation des hämorrhagischen Schocks richtete sich damit nicht ausschließlich nach einem festgelegten Blutvolumen sondern auch nach dem MAP. Um diesen aufrecht zu erhalten waren zum Teil weitere Blutentnahmen- bzw. Retransfusionen notwendig. Die Stärken eines sowohl Druck- als auch Volumen abhängigem Hämorrhagie Modells liegen in der Reproduzierbarkeit und Vorhersagbarkeit des Ausmaßes und der Dauer des Schocks. Die Schockphase überdauerte vier Stunden. Nach einer erneuten Blutentnahmen (Messzeitpunkt 2, MZP 2) wurde das vorher entnommene Blut retransfundiert. Außerdem wurden HAES und gegebenenfalls Noradrenalin gegeben. In der Beobachtungsphase blieb das Tier bis 8 Uhr am Morgen des zweiten Versuchstages unter Überwachung, nur bei Bedarf wurden Stabilisierende Medikamente verabreicht. Am Morgen des zweiten Versuchstages erfolgte die dritte Blutentnahme (Messzeitpunkt 3, MZP 3). Zehn Stunden später wurde das Tier nach der vierten Blutentnahme (Messzeitpunkt 4, MZP 4) getötet. Anschließend wurden, wie bereits beschrieben, Organteile entnommen und in Formalin fixiert. Eine Biopsie der Nierenrinde wurde sofort gekühlt und homogenisiert da sie für die Durchführung des Comet Assays benötigt wurde, die im Material und Methoden Teil genauer beschrieben ist.

Zur Blutentnahme an den einzelnen Messzeitpunkten wurden zwei mal 9 ml Vollblut in einer Lithium-Herparin-Monovette entnommen. Eine Monovette wurde für 10 min bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Blutplasma wurde in Eppendorfgefäße pipettiert und bei -80°C gefroren, bis Nitrit, Nitrat sowie die Gesamtproteinkonzentration gemessen wurde. Die zweite Monovette benötigte

man ebenfalls zur Erstellung des Comet Assays, dessen Durchführung im nachfolgenden Kapitel nachzulesen ist. Die Abbildung 2 verdeutlicht den zeitlichen Ablauf:

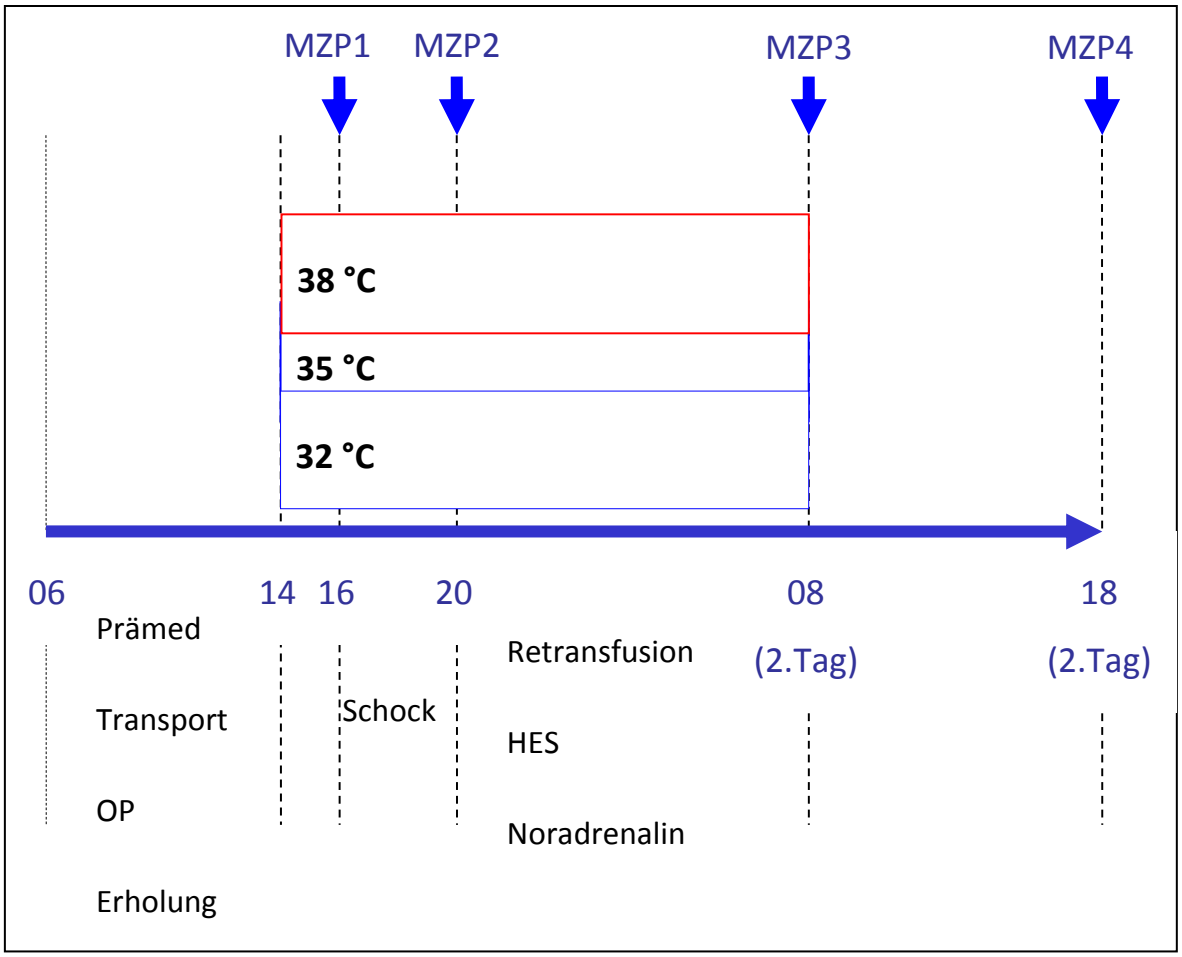

Abbildung 2: Schemazeichnung zum zeitlichen Ablauf des Experiments.

2.3 Der Comet Assay

2.3.1 Comet Assay von Vollblutproben

Der Comet Assay misst die DNA-Schädigungen einzelner Zellen und ist daher auch als „single-cell gel electrophoresis“ (SCGE) bekannt. Gegenüber vergleichbaren Verfahren ist er schnell durchführbar, zudem werden verhältnismäßig wenige Zellen pro Probe benötigt (10.000-100.000), (Bowers et al. 1999, McKelvey-Martin et al. 1993, Singh et al. 1988, Tebbs et al. 1999, Tice et al. 1995, Tice et al. 2000), bei dennoch hoher Sensitivität gegenüber wenigen DNA-Schäden (Tice et al. 2000).

Neben dem Protokoll der ursprünglich schwach alkalischen Form werden heute häufig eine neutrale und eine alkalische Variante angewendet.
Die alkalische Version des Comet Assays bei einem pH-Wert >13 bietet wesentliche Vorteile gegenüber der ursprünglich entwickelten Version von Östling und Johanson, die nur primäre DNA-Läsionen wie Einzel- und Doppelstrangbrüche nachweisen kann (Östling et al. 1984). In der alkalischen Ausführung werden sowohl die primären DNA-Läsionen als auch alkalilabile Stellen und Basenveränderungen nachgewiesen und als „Tailmoments“ dargestellt (Rothfuss et al. 2001). Die alkalilabilen Stellen in der DNA werden in Strangbrüche überführt, welche wiederum als Tailmoment darstellbar sind (Rothfuss et al. 2001). Der Comet Assay wird schon seit einigen Jahren im Bereich der Grundlagenforschung von DNA-Schäden eingesetzt (Burlinson et al. 2007, Hartmann et al. 2003, Tice et al. 2000). Tabelle 3 zeigt die hauptsächlich gemessenen DNA-Schädigungen im Comet Assay je nach pH-Wert der Lyse und Elektrophorese.

Tabelle 3: Übersicht der hauptsächlich gemessenen DNA-Schäden im Comet Assay in abhängigkeit des pH-Werts in Lysis und Elektrophorese. (nach Östling, Johanson, Olive, Singh (Olive et al. 1990, Östling et al. 1984, Singh et al. 1988)

Comet Assay etabliert von:	Lysis:	Elektrophorese:	DNA-Schadenstyp:
Östling und Johanson	schwach alkalisch	neutral	Doppelstrangbrüche
Olive et al.	alkalisch	neutral, schwach alkalisch	Doppelstrangbrüche
Singh et al.	alkalisch	alkalisch	Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche, Basenschäden Alkali-labile Seiten

Zur Durchführung benutzt man Vollblutproben der vier Messzeitpunkte, die in Lithium-Herparin-Monovetten (LH-Monovetten) aus peripherem Blut abgenommen wurden. Aus diesen Proben wurden jeweils 5 µl Blut mit 125 µl flüssigen LMP-Agarose, die auf 37°C temperiert wurden, gemischt und auf einen Objektträger gegeben. Diese Objektträger wurden zuvor mit MEEO-Agarose beschichtet, um die Haftung der Blut-LMP-Agarosemischung zu verbessern. Mit einem Deckglas

versehen, ruhten die mit der Blutmischung bedeckten Objektträger für 5 min bei 4°C, was dazu führte, dass die LMP-Agarose wieder in eine feste Phase überging. Die Deckgläser wurden seitlich abgezogen und die Proben in vorbereitete Lysebehälter gegeben. Zum Auflösen der Zellmembranen mussten diese für mindestens eine Stunde, bzw. maximal 48 Stunden ruhen. Nach der Lyse wurde eine Alkalidenaturierung mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Dem folgten das Beschichten mit Neutralisationspuffer und das Trocknen der Objektträger in 99,9% Ethanol. Anschließend wurden die mit Ethidiumbromid angefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.
Wird im Folgenden von messbaren Zellen gesprochen, so sind kernhaltige Zellen wie Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten gemeint. Da Erythrozyten und Thrombozyten keinen Zellkern enthalten wurden ihre Membranen wie bei den anderen Zellarten in der Lyse aufgelöst, hinterließen dabei aber keinen Zellkern und somit kein messbares Tailmoment. .

2.3.2 Herstellung beschichteter Objektträger

Die verwendeten Objektträger wurden vor ihrem Gebrauch mit Agarose beschichtet, damit die in LMP-Agarose gemischte Blutprobe besser auf dem Objektträger hielt. Zunächst wurden die Objektträger am Mattrand mit Bleistift markiert um die Oberseite festzulegen. Zur Beschichtung wurde 1,5% MEEO-Agarose (medium electro-endoosmosis) verwendet, die wie folgt hergestellt wurde: 1,5 g MEEO-Agarose wurden mit 100 ml PBS-Puffer in einem Erlenmeyerkolben zweimal sprudelnd aufgekocht, bis die Agarose sich ganz gelöst hatte; anschließend wurde diese Mischung in ein 60°C warmes Wasserbad gestellt.
Die Objektträger wurden von beiden Seiten durch Abstreifen auf einem Papiertuch gereinigt, dann wurden sie in die Agarosemischung eingetaucht. Hierbei galt es zu beachten, dass auch der Mattrand mitbeschichtet wurde, da so die Haftung der Agarose besser gewährleistet war. Die Agarosemischung wurde auf der Rückseite entfernt, indem man den Objektträger erneut mit einem frischen Papiertuch reinigte, zum Abschluss wurden sie zum Trocknen auf eine Ablageplatte gelegt. Um zu verhindern, dass die noch warme Beschichtung ungleichmäßig trocknet, musste mit Hilfe einer Wasserwaage darauf geachtet werden, dass die Platte

horizontal ausbalanciert lag. Nach zwei Tagen Trocknen bei Zimmertemperatur waren die Objektträger fertig zum Gebrauch.

2.3.3 Vorbereitung der LMP-Agarose und der Lyselösung

Zur Aufbereitung der heparinisierten Vollblutproben wurde LMP-Agarose benötigt. Zur Herstellung wurden 100 mg LMP-Agarose in 20 ml PBS zweimal aufgekocht, um die LMP-Agarose zu lösen. Anschließend wurden jeweils 125 µl in Eppendorf-Gefäße (Eppendorf Micro-Test-Tubes) aliquotiert, und diese bei 4°C im Kühlschrank bis zum Gebrauch gelagert.

Für die Lysepufferlösung wurden 1 ml Triton X-100, 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und 89ml Lysestammlösung gemischt und im Kühlschrank bei 4°C temperiert. Dimethylsulfoxid wurde verwendet um bei Kälteprozessen die Kristallbildung zu vermindern. Dadurch verhinderte es die zusätzliche Beschädigung der Zellbestandteile aufgrund der Kühlung.

2.3.4 Aufbereitung der Blutproben

Bevor das Blut zu den Messzeitpunkten in LH-Monovetten gewonnen wurde musste die LMP-Agarose verflüssigt werden. Dazu erhitzte man die mit LMP-Agarose gefüllten Eppendorfgefäße im heißen Wasserbad bis die Agarose flüssig war. Anschließend stellte man die Eppendorfgefäße in den Heizblock um sie auf 37°C zurückzukühlen, da sonst das anschließend beigefügte Blut in der heißen Agarose geronnen wäre.

Die Blutprobe wurde durch peripherven öse Punktion in eine LH-Monovette gewonnen. Dann wurden jeweils 5 µl peripheres Vollblut pro Messzeitpunkt mit 125µl warmer, verflüssigter LMP-Agarose im Eppendorfgefäß gemischt und anschließend auf einen beschichteten Objektträger pipettiert. Mit einem Deckglas versehen wurden sie dann im Kühlschrank für 5 min bei 4°C ausgehärtet. Nachdem die Blut-Agarosemischung durch den Temperaturabfall auf dem Objektträger fest geworden war, zog man das Deckglas zur Seite ab. Die DNA wanderte in der Gel-Elektrophorese entlang des elektrischen Feldes in Längsrichtung des Objektträgers. Würde das Entfernen des Deckglases Artefakte verursachen, könnten diese durch die Ausrichtung im rechten Winkel zur Laufrichtung später als solche erkannt werden.

Die Objektträger wurden nun für mindestens eine Stunde, bzw. maximal 48 Stunden in einer Küvette mit vorbereiteter 4°C kalter Lyselösung belassen. In diesem Schritt wurden die Zellmembranen abgebaut. Da die Agarose allerdings die Blutbestandteile in sich fixiert hielt, verblieben die Kerne an ihrem ursprünglichen Ort. Dies ist in der Auswertung und Entstehung des Tailmoments von Bedeutung.

2.3.5 Alkalidenaturierung und Gelelektrophorese

Nun wurden die Objektträger in gleichsinniger Ausrichtung in eine vorbereitete Phoresekammer gelegt. Diese stand in einer mit Eiswasser gefüllten Wanne und war mit einem 4°C kalten alkalischen Phoresepuffer mit pH-Wert >13 gefüllt. Die Elektrophoresekammer war immer vollständig zu bestücken; eventuelle Lücken wurden durch unbeschichtete Objektträger aufgefüllt.



Abbildung 3: Die Elektrophoresekammer (verändert nach Michael Gröger [42])

Nachdem die Objektträger in der Kammer lagen, wurde der Elektrophoresepuffer aufgefüllt, sodass er alle Objektträger dünn mit Flüssigkeit beschichtete. Die Objektträger ruhten für 40 Minuten in einem vor Lichteinfall geschützten Elektrophoresebehälter. Diese Schutzmaßnahme verhinderte, dass der Proben-DNA weitere Schäden durch die UV-Strahlenanteile des Lichts zugeführt wurden, wie es zum Beispiel bei der Bildung von Thymin-Dimeren der Fall ist.

Die Alkalidenaturierung führte dazu, dass die DNA sich aus ihrer natürlichen kompakten Doppelhelixstruktur entspiralisierte und eine relaxiertere Strukturform einnahm. Außerdem wurden die alkalilabilen Stellen und Einzelstrangbrüche in quantifizierbare Doppelstrangbrüche überführt, die dann im Comet Assay detektierbar waren.

Anschließend folgte eine 40 minütige Gelelektrophorese im selben Puffermedium, das bereits vorher zur Alkalidenaturierung verwendet wurde. Damit die Elektrophorese bei 25 Volt und 300 mA erfolgen konnte, musste man gegebenenfalls Puffer hinzufügen oder entnehmen, bis die gewünschte Kalibrierung erreicht war.

Da das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA in seiner Gesamtstruktur eine negative Ladung aufweist, wanderte diese insgesamt entlang des elektrischen Gradienten der Elektrophorese zur Anode. In denjenigen Zellkernen, deren DNA Strangbrüche enthielt, kam es zu einer Formation, die sich später unter dem Mikroskop als „Kometenschweif“ darstellte. Die Strangbrüche führten dazu, dass die DNA eines Zellkerns in kürzere Stränge zerfiel, die wiederum aufgrund ihres niedrigeren Molekulargewichts im elektrischen Feld weiter als die intakte DNA wanderten. Um zu gewährleisten, dass alle später gemessenen Tailmoments auf den Objektträgern in die gleiche Richtung ausgeprägt sind, war darauf zu achten, den Mattrand immer für alle Präparate in die gleiche Richtung zu orientieren.

Nach Beendigung des Migrationsprozesses wurden die Objektträger aus der Elektrophoresekammer auf ein Plastikgitter gelegt, und dreimal für fünf Minuten mit einem Neutralisationspuffer beschichtet. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser abgewaschen. Sowohl der Neutralisationspuffer, als auch das destillierte Wasser mussten mittels einer Pipette vorsichtig über die Objektträger gegeben werden, um zu verhindern, dass sich die Agarosebeschichtung löste. Der Neutralisationspuffer entfernte mögliche Reste von Basen, Salzen oder Tensiden, die in den zuvor verwendeten Materialien vorhanden waren.

Um die Objektträger zu Dehydrieren, wurden sie für fünf Minuten in einen Glasbehälter mit 99,9% Ethanol gestellt, und anschließend unter Lichtausschluss in einer Schublade zum Trocknen verwahrt. Die getrockneten Objektträger wurden anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Um eventuellen Messfehlern und Beschädigungen vorzubeugen, wurden zu jedem Messzeitpunkt jeweils zwei Objektträger angefertigt, von denen im Regelfall nur einer ausgewertet wurde. Kam es zur Beschädigung des ersten Objektträgers wurde dann der zweite unter dem Mikroskop ausgezählt.

2.3.6 Auswertung des Comet Assays

Die getrockneten Objektträger wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop computerassistiert ausgewertet. Diese ließen sich mit einer speziell dafür entwickelten Software ausmessen und in Rohdaten überführen.

Um die DNA anzufärben bedarf es eines spezifischen Farbstoffes, der an diese binden kann. Hierzu wurden 50 µl Ehtidiumbromidlösung (1%, 1:2500fach verdünnt) verwendet. Nachdem der Farbstoff gleichmäßig auf dem Objektträger verteilt war, wurde dieser mit einem Deckglas versehen und war somit auswertbar. Die Auswertung erfolgte für alle Proben bei 400facher Vergrößerung.

Das verwendete Fluoreszenzmikroskop enthält eine Quecksilberdampflampe, die Licht im gesamten sichtbaren Spektrum und ultraviolettes Licht emittiert. Wichtig ist hierbei, dass es sich im Grundaufbau um ein Auflichtmikroskop handelt. Der Objektträger wird also nicht durchstrahlt, sondern durch das Objektiv beleuchtet. Die für die Anregung der Fluoreszenz nötige Wellenlänge wird mit einem Anregungsfilter von 515-560 nm isoliert. Das emittierte, länger wellige Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt. Der Sperrfilter von 590 nm befindet sich im Strahlengang hinter dem Präparat und eliminiert das energiereiche Anregungslicht vom Fluoreszenzlicht. An das Mikroskop ist eine CCD-Kamera angeschlossen, welche die erfasste Fluoreszenz auf einem PC überträgt. Mit Hilfe des Bildanalyseprogramms (Comet II V2.11) konnten die Kometen ausgemessen werden. Um möglichst korrekte Ergebnisse zu erzielen, wurde es vermieden, den Randbereich der Objektträger auszuwerten. Es wurde immer im gleichen Abstand vom Mattrand und vom Längsrand mit der Auswertung begonnen, um pro Objektträger das Fluoreszenzmuster der ersten 50 auswertbaren Kerne zu messen. Hiervon wurden Kerne ausgeschlossen, die so nahe beieinander lagen, dass sich ihre Muster überschneiden. Die auswertende Person war dabei gegenüber der Versuchsgruppe und dem Messzeitpunkt verblindet.



Abbildung 4: Auswertung des Comet Assays: Das Fluoreszenzmikroskop mit angeschlossener CCD-Kamera als Teil der Auswertungseinheit.

Die DNA zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie als Komet auf schwarzem Hintergrund. Dieser ist Grundlage für das zu bestimmende Tailmoment und besteht aus einem Kometenkopf und einem Kometenschweif (Nelms 1997).
Die intakten Anteile der DNA haben den Zellkern nicht verlassen, und bilden so eine kreisrunde Struktur- den Kometenkopf. Die fragmentierte, beschädigte DNA ist aufgrund ihres kleineren Molekulargewichts im elektrischen Feld gewandert, und wurde so bildlich gesprochen „aus dem Kern herausgezogen“ (Nelms 1997). Das Bildanalyseprogramm vergleicht die Fluoreszenzintensität des Kometenkopfes mit dem des Schweifs, und den Durchmesser des Kopfes mit der Länge des Schweifs. Das hieraus errechnete Tailmoment ist definiert als das Produkt der relativen Fluoreszenzintensität des Schweifes gegenüber der des Kopfes und der auf den Schwerpunkt des Kopfes korrigierten Wanderungslänge der DNA (Fairbairn et al. 1996, Nelms 1997, Olive et al. 1990, Olive et al. 1993). Pro Messzeitpunkt wurde der arithmetische Mittelwert der 50 Tailmomente als Anhalt für das Ausmaß der Schädigung der DNA bestimmt.

2.3.7 Der Comet Assay von Nierengewebe

Das oben beschriebene Protokoll des Comet Assay wurde nicht nur an Vollblutproben, sondern auch an Nierengewebe durchgeführt. Hierzu wurde zum Zeitpunkt des Versuchendes ein 1cm x 2mm messendes Stück aus dem apikalen Rindenareal der rechten Niere entnommen. Dieses wurde umgehend in ein Reagenzglas mit 1 ml Na_2EDTA gegeben, und auf Eis gelagert. Mit einem Stößel wurde das Nierenparenchym mit dem Na_2EDTA homogenisiert. Nun konnten mittels einer Pipette 5µl des Homogenisats in ein Eppendorfgefäß mit erwärmter, flüssiger LMP-Agarose gegeben werden. Die darauf folgenden Schritte der Elektrophorese bis zur Auswertung entsprechen denen mit Vollblutproben und werden deswegen hier nicht erneut aufgeführt.

2.4 Histologische Aufarbeitung der Nierenpräparate

Die Färbungen und Auswertung der histologischen Präparate wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universität Ulm (Leitung: Herr Prof. Dr. med. P. Möller) durchgeführt.

Um die Nitrotyrosinfärbung durchzuführen mussten zuvor Paraffinschnitte von Leber- und Nierengewebe hergestellt werden. Dazu wurden die Organe unmittelbar nach ihrer Entnahme aus dem Versuchstier in ein Behältnis mit Formalin (4% neutral gepuffertes Formaldehyd) gelegt, und dort für sieben Tage belassen. Anschließend wurden die Gewebestücke dehydriert, in Paraffin eingebettet, am Mikrotom (Leika Mikrotom 2030 Mot) in einzelne 2-4 µm dicke Präparate geschnitten und auf Objektträgern fixiert.

2.5 Nitrotyrosinfärbung

Zu Beginn der Färbung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur viermal für jeweils 5 min in Xylol-Bädern inkubiert. Es folgte die Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit zweimal 5 min 100% ETOH und nachfolgend jeweils 5 min in 90%,70% und 40%igem ETOH. Nachdem die Objektträger für weitere 5 min in destilliertem Wasser rehydriert wurden konnte das „heat-induced epitop retrieval“ (HIER) mittels 10 mM Citratpuffer (pH6) durchgeführt werden. In diesem Puffer wurden die Präparate zweimal für 5 min bei höchster Wattzahl in der Mikrowelle inkubiert bis sie zweimal aufkochten, und danach 10 min zum

Auskühlen ruhen gelassen. Es folgte die erneute Spülung der Präparate mit destilliertem Wasser für 2-3 min.
Während dieser Zeit wurden die Vorbereitungen für die Antikörperreaktion und den später folgenden Waschvorgang getroffen. Als Waschmedien gibt man in das erste und dritte Gefäß TBS-Puffer (pH8), für das zweite Gefäß mischte man zunächst 50 ml TBS-Puffer mit 1 µl Tween 20, schüttelte dies auf, und füllte diese Mischung nochmals mit 50 ml TBS-Puffer auf. Die Dilutionslösung für den Antikörper wurde mit 10 ml TBS-Puffer, 10 µl Ziegenserum und 1 µl Tween 20, einem anionischen Tensid, hergestellt. Zur Herstellung der Antikörpermischung wurde der primäre Antikörper Anti-Nitrotyrosin, ein polyklonaler Rabbit Antikörper, in einer 1:250 Verdünnung mit der Dilutionslösung vermischt.
Auf diese Vorbereitungsschritte folgte die Waschung der Gewebeschnitte in TBS-Puffer für 2-3 min. Anschließend wurde die Rückseite der Objektträger mit einem Tuch getrocknet, und TBS auf die Präparate gegeben, damit sie nicht austrockneten. Um das Austrocknen der Gewebeschnitte weiterhin zu verhindern, wurden die Präparate mit einem PAP-Pen umrandet, der aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften eine Barriere für die aufpippetierten Flüssigkeiten schafft. Außerdem wurde ein befeuchtetes Papiertuch mit in die Objektträgerbox gelegt, damit die Reagenzien während der Inkubation nicht eintrockneten.
Anschließend wurden 100 µl Substanz A auf die Gewebeschnitte gegeben, und für 15 min. bei Zimmertemperatur inkubiert; überschüssige Flüssigkeit wurde verworfen. Der vorher hergestellte primäre Antikörper wurde für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine Waschung in den vorbereiteten Gefäßen durchgeführt: 1,5 min TBS-Puffer, 3 min Tween20 und TBS Mischung, 1,5 min TBS-Puffer. Um das Antigen zu detektieren wurde die alkaline Phosphatase antialkalische Phosphatase (APAAP) Methode eingesetzt und mit rotem Chromagen zur Visualisierung behandelt. Diese Reaktion wurde mit dem Dako REAL Detection System APAAP nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Inhalt des Kits wird vom Hersteller wie folgt angegeben:
Substanz A: biotynilierter sekundärer Antikörper Ziege/ anti-Rabbit
Substanz B: Strepavidin-Alkaline-Phosphatase
Substanz C,D,E: nicht näher angegeben
Substanz F: reagiert mit Substanz B zu rotem Chromagen

Substanz G: Levamisol

Um die sekundäre Antikörperreaktion durchzuführen wurden die Objektträger mit 100 µl Substanz A beschichtet. Nach der Inkubationszeit von 30 min wurden die Präparate in wie bereits beschrieben in den drei vorbereiteten Gefäßen mit TBS-Puffer und Tween20 gewaschen. Anschließend wurden 100 µl Substanz B auf die Präparate gegeben und ebenfalls für 30 min inkubiert, die ebenfalls in den drei Gefäßen abgewaschen wurde.

Um die als nächstes benötigte Reagenz herzustellen wurden 1500 µl Substanz F und 4 µl Substanz G in ein 2 ml Eppendorfgefäß gegeben. Unter Schütteln wurden dieser Mischung jeweils 60 µl der Substanz C, D und E nacheinander zugegeben.

Diese Mischung wurde für 9 min zur Reaktion auf die Objektträger pipettiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit ruhten die Gewebeschnitte für 2-3min in TBS-Puffer.

Die Gegenfärbung der Präparate erfolgte durch Eintauchen in Hämalaun-Lösung für 20 sek und nachfolgendes gründliches Abwaschen des überschüssigen Reagenz mit demineralisiertem H_2O. Zur Dehydrierung wurden die Objektträger für zweimal zwei Minuten und einmal vier Minuten in Ethanol inkubiert. Hierzu wurde die Ethanolreihe in aufsteigender Reihenfolge (70%, 90%,100%) genutzt; anschließend wurden die Objektträger zweimal für 5 min in Xylol getaucht. Zum Schutz der Präparate wurden zuletzt mittels Neo-Mount Deckgläser auf die Objektträger geklebt.

2.5.1 Auswertung der Nitrotyrosinfärbung

Die Objektträger wurden an einem Zeiss Axio Imager A1 Mikroskop bei 10facher Vergrößerung ausgewertet. Hierzu betrachtete man vier repräsentative 800,000 μm^2 große Regionen, zwei davon im Cortex der Niere, und zwei in der Medulla. Diese wurden dann hinsichtlich der Intensität und Fläche der immunoreaktiven Reaktion mit Hilfe der Axio Vision Software (rel. 4.8) ausgewertet. Die Bestimmung der Daten für die Intensität und für die Fläche ergab jeweils vier Messdaten pro Objektträger, bzw. Versuchstier. Aus den jeweiligen vier Messdaten eines Tieres wurde der Mittelwert bestimmt, der anschließend in die Statistik einging. Die Werte wurden anschließend statistisch hinsichtlich Intensität und Fläche ausgewertet.

2.6 Messung von 8-Isoprostan

8-Isoprostan dient als Marker für das Vorliegen einer oxidativen Degradation von Lipiden, der so genannten Lipidperoxidation (Baker et al. 2006, Basu et al. 1998). Es entsteht im Gewebe durch Oxidation von Zellmembranen, und im Plasma durch die Oxidation von Lipoproteinen, und kann sowohl im Plasma als auch im Urin gemessen werden.

Um die Konzentration von 8-Isoprostan (8-Epiprostaglandin F_2) bei den verschiedenen Versuchsgruppen zu messen, wurde zu allen Messzeitpunkten arterielles Vollblut in LH-Monovetten gewonnen. Diese wurden bei 4°C und 3000 rpm für 10min zentrifugiert. Anschließend konnte das Serum von den Proben in Eppendorfgefäße gewonnen und bis zur Messung bei -80°C verwahrt werden.

Zur Quantifizierung der Isoprostanwerte wurde der „8-Isoprostane EIA Kit“ der Firma Cayman Chemical verwendet. Es handelt sich hierbei um ein immunologisches Nachweisverfahren, dem eine enzymatisch vermittelte Farbreaktion zu Grunde liegt.

Der 8-Isoprostan Nachweis basiert auf der Konkurrenz zwischen dem mitgelieferten 8-Isoprostane-Acetylcholin Konjugat (Tracer) und dem zu messenden 8-Isoprostan aus einer Probe. Beide binden an limitierte Bindungsstellen von Anti-Kaninchen-IgG-Maus Antikörper. Da die Konzentration des Tracers immer gleich bemessen wird, die des 8-Isoprostanes aber in den verschiedenen Proben variiert, kann so die Konzentration des 8-Isoprostan bestimmt werden. Die Menge des gebundenen Tracers ist umgekehrt proportional zur Konzentration des im Reaktionsgefäß vorhandenen 8-Isoprostan. Zunächst müssen die Antikörper an das Reagenzgefäß gebunden werden. Anschließend werden diese mit einer Mischung aus dem Tracer und der Probe beschichtet.

Nachdem der Tracer und freie 8-Isoprostane Gelegenheit hatten an die Anti-Kaninchen-IgG zu binden, wurden überflüssige, ungebundene Reagenzien ausgespült. Im letzten Schritt wurde das Ellmans’ Reagenz hinzugefügt, dass das Substrat für die Acetylcholinesterase des Tracers enthielt. Das Produkt dieser Reaktion hat eine gelbliche Färbung und absorbiert stark bei 412 nm. Die Intensität dieser Farbe wird spektralphotometrisch bestimmt, und ist proportional zur Menge des Tracers, und umgekehrt proportional zur Menge des freien 8-Isoprostan. Je höher die gemessene Extinktion und somit die Gelbfärbung war,

desto niedriger war die Menge an freiem 8-Isoprostan in der vorhandenen Probe. Bei einer Wellenlänge von 405 nm wurden die Mikroplatten mit den Reagenzgefäßen ausgelesen. Um die Konzentrationen von 8-Isoprostan in den Proben zu bestimmen, wurden die ermittelten Extinktionen auf eine bekannte Standardreihe bezogen. Die beschriebene Durchführung basiert auch auf den Erfahrungen unserer Forschungsgruppen (Kick et al. 2007, Simon et al. 2008). Eine schematische Darstellung dieses Enzym-Assays zeigt Abbilung 5.

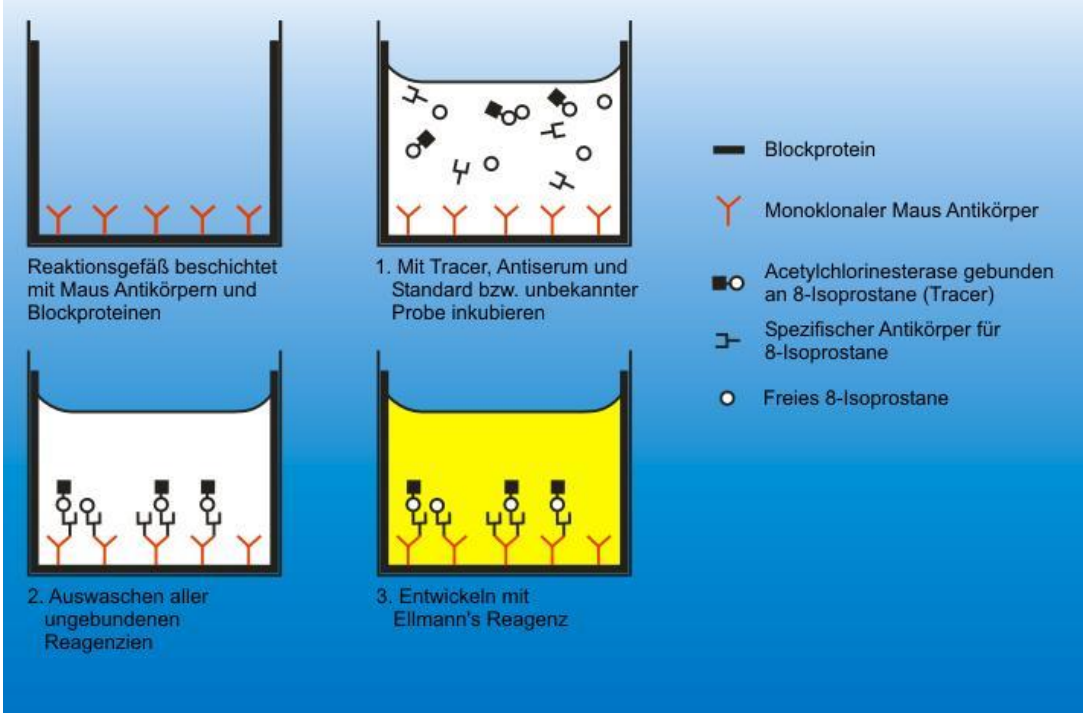

Abbildung 5: 8-Isoprostane Bestimmung: Schema des Enzym-Immuno-Ansatzes (EIA) (aus M. Gröger (Gröger 2008))

2.7 Messung von Nitrit und Nitrat

2.7.1 Nitratbestimmung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein geruchloses, farbloses Gas und wird von der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) unter Verbrauch von Arginin, NADPH und Sauerstoff synthetisiert. Als stabile Endprodukte entstehen hierbei Nitrit (NO_2^-) bzw. Nitrat (NO_3^-). Damit man in den Plasmaproben die Konzentration von NO messen kann, müssen vorher NO_2^- und NO_3^- wieder in NO reduziert werden. Dies wurde in einem an den Nitric Oxide Analyzer (NOA) angeschlossenes

Reaktionsgefäß unter Verwendung einer 0,05 M Vanadiumchloridlösung in Salzsäure (HCl) 1M erreicht.
Nach dem Auftauen der Proben, wurden sie bei 12000 rpm für 5 min zentrifugiert. Um die Proteine vom Plasma zu trennen wurden vom Überstand 100 µl abpipettiert und mit 400µl Methanol 99,8% vermischt. Das ausgeschiedene Eiweiß wurde durch Zentrifugation bei 12000 rpm für 10 min entfernt. Der verbleibende Überstand wurde für die Messung des Nitrats verwendet.
Vor der Messung der eigentlichen Probe musste eine Eichgerade erstellt werden. Dazu verwendete man Natriumnitrat-Lösungen, die in folgenden Konzentrationen vorbereitet werden mussten: 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM und 75 µM.

2.7.2 Nitrit- und Nitratreduktion und Bestimmung der NO-Konzentration

In der Glasapparatur des NOA findet die Reduktion des NO_2^- und NO_3^- zu NO statt. Die Apparatur beinhaltet die Reaktionskammer, die mit 59°C heißem Wasser umgeben ist, und die Rekondensationskammer, die von kaltem Wasser umspült wird.

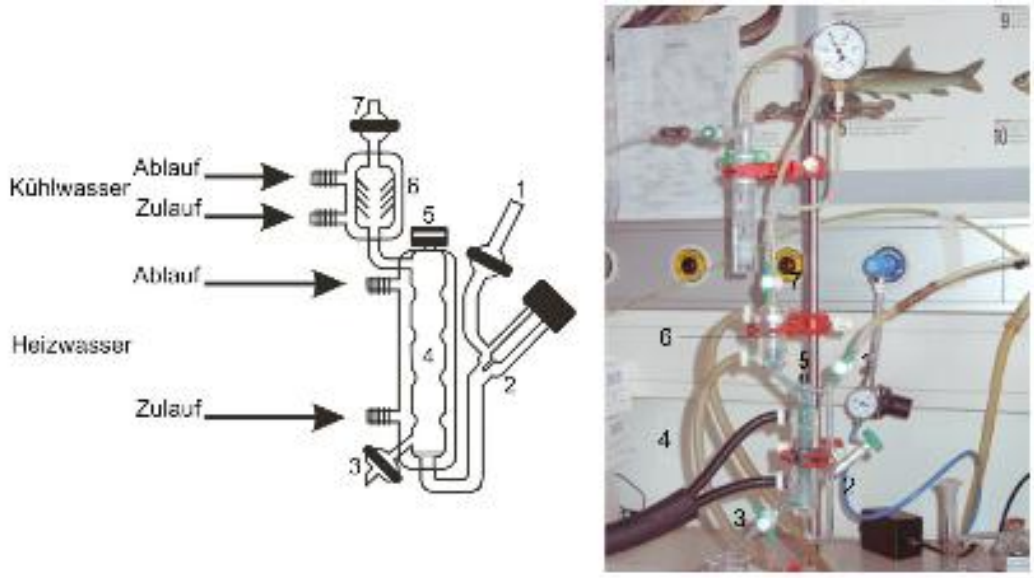

Abbildung 6: Nitrat- und Nitritmessung: Aufbau des NOA-Reaktionsapparates (links): 1. Trägergasanschluss, 2. Haarnadelventil, 3. Ablass, 4. Reaktionskammer, 5. Septum, 6. Rekondensationskammer, 7. Ausströmöffnung; Aufgebaute Apparatur (aus M. Gröger 2008)

Die gesamte Glasapparatur wurde vor Beginn der Messung mit Vanadiumchlorid (VCl_3 – Lösung) von innen gespült, um mögliche Verunreinigungen mit NO_2^- und NO_3^- zu entfernen. Anschließend wurde die Reaktionskammer mit VCl_3 – Lösung

gefüllt, bevor das entstandene NO dem Nitric Oxide Analyzer zugeführt wurde. Das NO wurde über ein Trägergas an den NOA überführt. Hierzu wird N_2 benutzt, das über ein Haarnadelventil so einfließt, dass die durchspülte VCl_3 – Lösung nicht in die Rekondensationskammer gelangen kann. Zwischen dem Eingang des Analysators und dem Ausgang der Reaktionskammer wurde zur Neutralisation eine mit 1 M Natronlauge gefüllte Waschflasche geschaltet. Von jeder Probe und von den Eichlösungen wurden dreimal jeweils 5 µl mittels einer Hamiltonpipette durch das Septum in die Reaktionskammer gegeben. Damit die Gesamtkonzentration von Nitrit und Nitrat im Plasma errechnet werden konnte, wurde durch Einsetzen bekannter Konzentrationen eine Eichgerade erstellt. Anhand dieser wurde die Menge an enthaltenem NO in den Proben bestimmt.

2.7.3 Bestimmung der Nitratkonzentration bezogen auf die Proteinkonzentration im Plasma

Die zuvor ermittelten Nitratkonzentrationen müssen auf den Gesamtproteingehalt der eingesetzten Blutplasmaproben bezogen werden um eine mögliche Veränderung der Messwerte durch Hämodilution aufgrund vermehrter Gabe von Infusionen auszuschließen. Die Biuret-Reaktion nach Weichselbaum ermöglicht eine quantitative Eiweißbestimmung (Josephson et al. 1957). Es handelt sich hierbei um ein photometrisches Testprinzip bei dem die Proteine im Plasma mit Kupferionen in wässrig alkalischer Lösung zu einem farbigen Produkt reagieren. Das Biuret-Reagenz enthält Kaliumjodid, Kalium- und Natriumtartrat, Kupfersulfat und Natronlauge. Das Reagenz reagierte zusammen mit der Plasmaprobe zunächst zu einem hellblauen Niederschlag, der aus schwer löslichem Kupferhydroxid besteht. Das Kupferhydroxid ist das Produkt einer Reaktion von Kupferionen des Sulfats mit Hydroxidionen der Natronlauge. Nach leichtem Schütteln entstand ein rotviolleter Komplex durch eine Reaktion bei der sich Kupferionen in alkalischer Umgebung an die Peptidbindungen der Proteine der Plasmaprobe binden. Die Menge der in der Probe enthaltenen Peptidbindungen ist proportional zur Intensität der Farbreaktion. Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte bei 546 nm.

Der Gesamtproteingehalt in den Plasmaproben wurde mit Hilfe der Biuretmethode ermittelt. Dazu wurde der SYS1 BM/Hitachi 704/911 Analysekit der Firma Roche Diagnostics verwendet.

Von jeder Plasmaprobe wurden 100 µl abpipettiert und mit 5 ml Biuretreagenz vermengt. Anschließend wurde diese Probe für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Photometrische Messung erfolgt bei 546 nm gegenüber einer Leerwertprobe, die im Kit mitgeliefert wird. Die Proteinkonzentration in den Proben in g/l entsprach dem 190fachen der ermittelten Extinktion.
Aus der Nitratkonzentration in µM und dem in der Plasmaprobe enthaltenen Proteingehalt in g/l konnte die Nitratkonzentration in µmol/g Protein errechnet werden.

2.8 Western Blot

2.8.1 Herstellung des Zellhomogenats für Western Blot sowie EMSA

Das Nierengewebe wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C konserviert. Zur Proteinisolation wurden die Gewebeproben leicht angetaut und in eiskaltem PBS mit Proteaseinhibitoren (0,1 mM Na-Vanadat, 2 mM PNPP, 2 mM DTT, 1 mM β-Glycerolphosphat, 10 µM Leuceptin sowie einer Tablette Complete) mit einem Ultra Turrax 25 homogenisiert. Die Proteaseinhibitoren schützten das Gewebe. Das Homogenat wurde in einer 1:2 Verdünnung in 2x Lysepuffer (50 mM Tris-HCL pH 7,5, 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,5% NP40 und 10% Glycerol) mit Proteaseinhibitoren versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden für 30 min bei 4°C bei 20000g_E zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abgenommen und zweimal für 10 sec gesonicated, das verbleibende Pellet aus Zellresten wurde verworfen. Das Sonicaten löste weitere Membranen, die noch in den Proben enthalten waren. Die in der Probe enthaltene Menge Protein wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay bei 595 nm photometrisch bestimmt.
Um die Konzentration der Proben auf 20 µg/5 µl Gesamtprotein für den Western Blot einzustellen, wurden sie mit 1 x EMSA Puffer (10 mM Tris-HCl pH 7,9, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% Glycerol und 100 µg BSA) verdünnt.
Für den Westernblot wurden die Proben in einer 1:2 Verdünnung mit 2fachem Sample Buffer versetzt, der aus 6% SDS, 250 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% Glycerol, 6,7% β-Mercaptoethanol und Bromphenolblau bestand. Diese Mischung wurde für 10 min bei 95°C gekocht und anschließend bei -20°C bis zur Verwendung

aufbewahrt. Für die Durchführung des EMSA wurden die Proben auf 10 µg/5 µl EMSA-Puffer entsprechend 2 mg/ml mit einer Toleranz von 5% eingestellt.

2.8.2 Grundlagen des Western Blots

Der Western Blot, auch als Immunoblot bezeichnet, ist eine Methode zur Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran, die anschließend z.B. durch markierte Antikörper nachgewiesen werden können (Mathrubutham et al. 2005). Aus den Gewebeproben, die in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt waren, wurden Proteinproben durch Homogenisierung in PBS-Puffer und Lyse gewonnen. Diese wurden mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese in einer Trägermatrix, hier SDS Page (sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis) entsprechend ihrer Größe und Ladung mit der Methode nach Laemmli aufgetrennt (Laemmli 1970). Bei dieser Methode wird dem Trenngel ein Sammelgel vorgeschaltet, durch das eine Verschärfung der Proteinbanden erfolgt.
Das elektrische Feld wurde senkrecht zum Trägergel angelegt. Die aufgetrennten Proteinproben wurden nach der Elektrophoese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wobei das Muster der Auftrennung vorhanden blieb, die Proteine konnten nun durch Antikörper detektiert und durch einen zweiten Antikörper sichtbar gemacht werden.
Für die quantitative und qualitative Bewertung von HO-1, IKBα und iNOS wurde das folgende Western Immunoblotting Protokoll durchgeführt, dabei variierten die Antikörper und Chemikalien zur Detektion, wie im folgenden Abschnitt beschrieben.

2.8.3 Durchführung des Western Blots:

Zur Herstellung des SDS-Page wurden zunächst ein Sammel- und ein Trenngel, vorbereitet. Mittels eines Kamms wurden Taschen für die Proben angelegt, anschließend härtete die Mischung mindestens eine Stunde lang zum Gel aus. Die Taschen wurden dreimal mit Laufpuffer gewaschen. Der Laufpuffer wurde aus 1,9 M Glycin, 250 mM Tris-Base und 35 mmol SDS gemischt und mit destilliertem Wasser auf fünf Liter aufgefüllt, bis ein pH-Wert von 8,8 erreicht war. Die Beladung des Gels mittels einer Mikroliterspritze begann und endete mit 10 µl Sample Buffer, der verhindern soll, dass die zu untersuchenden Proben am Rand des Gels einen smiley-Effekt erzeugen. Zur Herstellung des Sample Buffers

wurden 12% SDS, 250 mM Tris-HCl (pH 6,8), 40% Glycerol, 13,5% β-Mercaptoethanol und eine Spatelspitze Bromphenolblau gemischt. Es folgte ein Color Marker, der die unterschiedlichen Molekulargewichte farbkodiert auftrennte. In die erste Tasche wurden hiervon 10 µl pipettiert, in die vorletzte Tasche 5 µl, damit die Reihenfolge bzw. Nummerierung der Taschen zu jedem Zeitpunkt eindeutig erkennbar blieb. Außerdem wurde immer eine positiv Kontrolle in das Gel gegeben, um den Erfolg der Reaktion nachzuweisen. In die verbliebenen mittigen Taschen wurden die Proteinproben gegeben. Nach Beladung des Gels wurde es in das Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell System, die Elektrophoresekammer, gegeben und mit Laufpuffer aufgefüllt. Zum Start der Elektrophorese wurde Strom mit 90 V für die ersten 15 min und 180 V für weitere 45 min angelegt. In den ersten 15 min wurden die Proteingemische gesammelt, bevor sie in das Trenngel eintraten.

Während die Elektrophorese lief wurde die 0,45 µm starke Nitrozellulosemembran beschriftet und in eine Schale mit Blotting-Puffer gegeben, der aus 2,4 M Trisbase, 1,9 M Glycin, 64,5 mM SDS, 200 ml Methanol und destilliertem H_2O bestand. Anschließend wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran übertragen und in den Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell von Bio-Rad zum Blottingprozess gelegt. Über und unter die Membran wurden jeweils acht Whatman-Filterpapiere, die ebenfalls in Blotting-Puffer getränkt wurden, gestapelt. Durch Walzen wurde der gesamte Stapel von eventuellen Luftblasen befreit; nachfolgend wurde eine senkrechte Spannung von 20 V für eine Stunde angelegt. Durch hydrophobe Wechselwirkungen hefteten sich die Proteinproben an die Membran.

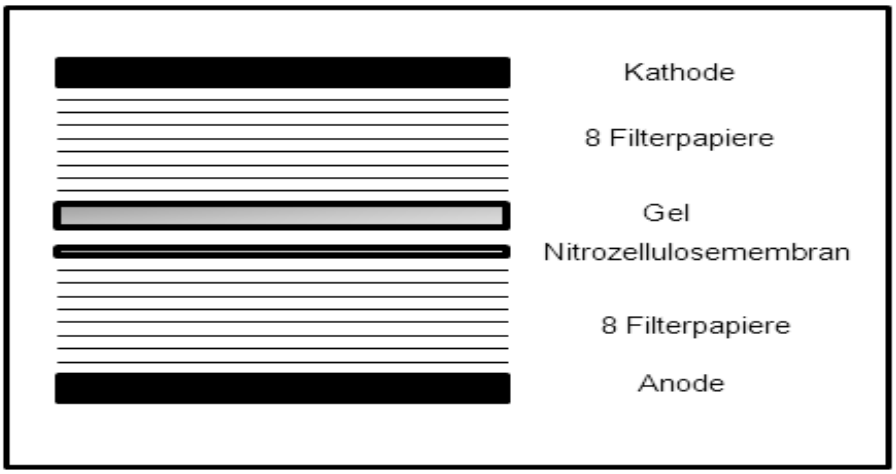

Abbildung 7: Schema zum Aufbau des Blottingprozesses

Nach dem Blotting-Prozess wurde die Nitrozellulose zunächst in 25 ml TBS-Puffer für 5 min gewaschen. Der Proteintransfer und die gleichmäßige Proteinbeladung wurden durch eine reversible Färbung mit Ponceau S für 2 min kontrolliert. Dieser Farbstoff ist ein Natriumsalz, das an positiv geladene Aminogruppen bindet, und die Banden besser sichtbar macht. Nach dem Färben wurde die Membran unter Schwenken für 5 min in TBS-Puffer gewaschen und danach mit einem blockierendem Puffer aus 5% Milchpulver, TBS, und 0,1% Tween20 beschichtet. Der blockierende Puffer diente dem Absättigen unspezifischer Bindungsstellen. Nach einer Stunde Inkubation im Milchpuffer wurde die Membran noch dreimal unter Schwenken für 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Danach konnte der primäre Antikörper (AK) aufgetragen werden. Es folgt eine Liste der primären wie sekundären AK für die einzelnen Nachweise:

- IKB-α: 1.AK= IKB-α (C21) Hase, 2.AK= goat anti-rabbit IgG-HRP
- HO-1: 1.AK=mAB (HO-1-2) Maus, 2. AK= Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody
- iNOS: 1.AK= Polyclonal Rabbit Anti-iNOS/NOS TypII, 2.AK= Anti-rabbit IgG, HRP- linked Antibody

TBS-Puffer, 0,1% Tween20 und 5% BSA wurden zusammen mit dem verdünnten Antikörper auf die Membran gegeben und über Nacht unter leichtem Schwenken bei 4°C inkubiert. Danach wurde der jeweilige sekundäre Antikörper in einer

1:15000 Dilution für IKB-α und HO-1, 1:2000 für iNOS in Milchpuffer zusammen mit 10 ml Blotting Puffer auf die Nitrozellulosemembran aufgetragen. Dieser inkubierte für eine Stunde, bevor die Membran erneut dreimal für 5 min mit 15 ml einer TBS/Tween20 Mischung gewaschen wurde.
Damit die Proteinbanden auf einem Foto Film chemilumineszent entwickelt werden konnten musste eine Detektionslösung im Verhältnis 1:1 hergestellt werden, die auf eine gereinigte Glasplatte geträufelt wurde. Die Nitrozellulosemembran wurde in destilliertem H_2O geschwenkt und dann in der Detektionslösung für 5 min inkubiert. In Frischhaltefolie gewickelt, wurde die Membran in einer Röntgenkassette befestigt. Ein Röntgenfilm wurde für 2 min exponiert und anschließend in einer Dunkelkammer entwickelt. Hierbei entstand ein Abbild der Membran mit den einzelnen Banden auf einem Röntgenfilm.

2.8.4 Auswertung des Western Blots

Für die Auswertung der Western Blots wurde das Programm Image J verwendet. Die Einstellungen mussten so adaptiert werden, dass ein invertes Bild des Röntgenfilms entstand, die Banden erschienen also weiß, während der Hintergrund schwarz wurde. Die einzelnen Banden wurden hinsichtlich ihrer „Area“, „Mean gray value“ und „integrated density“ ausgemessen und das Programm erstellte hieraus eine densitometrische Analyse. Die Werte dividierte man zuletzt durch den Mittelwert zweier nativ-Proben.

2.9 Der Elektromobility Shift Essay (EMSA)

2.9.1 Grundlagen des EMSA

Mit Hilfe des EMSA konnte die Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren an DNA-Konsensus Sequenzen im Bereich von Promoter Regionen im Nierengewebe gemessen werden. Hierzu wurden Proteine mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Protein-Oligonukleotid-Komplexe in einem Polyarcylamidgel aufgetrennt, und autoradiographisch dargestellt. Ungebundene DNA wanderte schneller im Polyacrylamidgel als DNA-Protein-Komplexe und konnten so voneinander getrennt werden.
Synthetische Kompetitoren wie Poly.dIdC verhinderten dabei unspezifische DNA-Bindungen durch andere Proteine

2.9.2 Annealing

Die DNA-Einzelstränge mussten zuerst annealed, also aneinander gelagert werden. Dazu wurden die synthetisierten Oligos in einer Konzentration von 1µg/µl in 10 mM Tris-HCL (pH8, 0) gelöst. Jeweils 10 µl Oligonukleotide (10 µl reverse Einzelstrang + 10 µl sense Einzelstrang) wurden mit H2O auf 100 µl aufgefüllt und im Wasserbad auf 94°C erhitzt. Danach ruhten sie im ausgeschalteten Wasserbad um auf Raumtemperatur herunter zu kühlen. Das Oligonukleotid weist eine sogenannte blunt-end-Sequenz auf, die mittels γATP markiert wurde. Zur Markierung wurde ein Reaktionsgemisch aus 1 µl doppelsträngigem Oligonukleotid mit 5 µl (^{32}P) γ-ATP (50 µCurie), 1 µl T4 Polynukleotidkinase, 2,0 µl eines 10-fach Polynukleotid Kinase Puffers ad 20 µl Aqua dest. hergestellt und für 30 min bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung des neu synthetisierten Oligonukleotids wurde mit dem QIA quick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um abschließend die Radioaktivität zu überprüfen wurden die Proben mit 10 mM Tris Puffer (pH 8,5) eluiert und anschließend im Szintilationscounter ausgezählt. Pro Ansatz wurden jeweils 50.000 counts eingesetzt.

2.9.3 Durchführung des EMSA

Zur Durchführung des EMSA wurden radioaktiv gelabelte Oligonukleotide benötigt, die die spezifische Erkennungssequenz der NFκB Familie aufweisen. Es wurde hierfür folgende Sequenzen verwendet:

HIV- κB-Site Consens: 5‘- AGTTGA**GGGGACTTTCCC**AGGC-3‘

HIV- κB-Site Mutante: 5‘-AGTTGA**GGCGACTTTCCC**AGGC-3‘

10 µg Proteingemisch in 5µl 1 x EMSA Puffer wurden mit 50000 cpm 32P-markierten Oligonukleotid unter Zugabe von 1 µg Poly-dIdC und 1 mM DTT für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden auf einem 7%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt, das zuvor für 30 min bei 100 V äquilibriert wurde. Als Laufpuffer wurde ein 0,5facher TBE-Puffer (10xTBE Puffer wurde aus 890 mM Borsäure, 892 mM Tris, 0.5 M EDTA-Lösung (pH 8.0) ad 1000 ml hergestellt) verwendet. Die Taschen des Gels wurden mit jeweils 10 µl entsprechend 10 µg Gesamtprotein geladen und im Laufpuffer (0,5 x TBS) bei 200 V für drei Stunden aufgetrennt. Danach wurde das Gel für 30 min fixiert (15% Methanol, 5% Eisessig, 5% Glycerol ad Aqua dest. 1000 ml) und danach für 5 min gewässert.

Anschließend wurde das Gel auf ein Whatmanpapier aufgezogen und 1 h bei 80°C auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet. Danach wurden die Gele in einer Autoradiographiekassette für 3 Tage mit einem Agfa Cronex-5-Film bei -80°C exponiert. Für die densitometrische Auswertung wurden die Gele über Nacht auf einer Phosphor-Imager-Platte exponiert und am Fuji 3000 Phosphorimager eingescannt. Die Auswertung erfolte mit dem Aida Image Analyzer (Version 4.25).
Da der Komplex aus NFκB und Oligonukleotid eine geringere elektrophoretische Mobilität zeigt als das isolierte Oligonukleotid, wanderte die Bande des Komplexes weniger ausgeprägt im Gel, sie wird also geshiftet. Die Intensität der geshifteten Bande gibt hierbei Hinweis auf die Menge an NFκB, das im untersuchten Proteinlysat vorhanden war.

2.10 Statistische Auswertung

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden für die Ergebnisse der Versuchsgruppen von 32°C, 35°C und 38°C die Minimal- und Maxiamlwerte sowie der Median berechnet. Zur graphischen Darstellung wurden Box-Plots erzeugt. Die Box wird jeweils durch das 25%- und 75%- Quantil begrenzt, der Median, Minimal- und Maximalwert sind als Mittellinie und Ober- bzw. Unterbegrenzungen eingezeichnet.
Zunächst wurde eine Normalverteilung der Daten durch den Kolmogorov-Smirnov Test ausgeschlossen. Unterschiede in den Versuchsgruppen vor, während und nach Induktion des hämorrhagischen Schocks wurden anhand des Friedman ANOVA on ranks Tests und anschließendem Dunn’s Test für multiple Vergleiche untersucht. Für alle Testungen wurde als Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ festgelegt.
Zur Dokumentation der Daten wurde das Programme Microsoft Office Excel 2010 benutzt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm Sigma Plot Version 2.03, die Berechnung und statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Sigma Stat Version 8.0.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Erhebungsdaten

Für die Versuche wurden 20 deutsche Landschweine beiderlei Geschlechts verwendet. Per Randomisation wurden 7 Schweine der 32°C-Versuchsgruppe zugewiesen, durchschnittlich wogen diese 52 kg (38-62 kg). Das durchschnittliche Gewicht der 7 Tiere, die der 35°C-Versuchsgruppe zugwiesen wurden, betrug 51 kg (42-64 kg). In der 38°C-Gruppe, die gleichzeitig als Kontrollgruppe diente betrug das durchschnittliche Gewicht 53 kg (44-63 kg).

3.2 Temperatur

Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht über den Verlauf der Körpertemperatur der Versuchstiere. Die Tabelle zeigt, dass die gewünschte Körpertemperatur zum jeweiligen Versuchszeitpunkt erreicht wurde und konstant blieb. Zum Ende des Versuchs erfolgte eine Wiedererwärmung, die die ansteigenden Werte erklärt. Analog zum Versuchsaufbau zeigten sich signifikante Unterschiede von MZP 1-MZP3 für die 32°C- und 35°C-Gruppe gegenüber der 38°C-Gruppe. Außerdem waren die Endwerte der 32°C- und 35°C-Gruppe zum MZP4 signifikant gegenüber deren Ausgangswerten (MZP 1) erhöht.

Tabelle 4: Körperkerntemperatur der Versuchsgruppen in °C. Dargestellt sind jeweils der Median, sowie die 25. und 75. Quartile der 32°C-Gruppe (n=7), 35°C-Grupppe (n=7) und der 38°C-Gruppe (n=6). #= p<0,05 versus Messzeitpunkt 1 der gleichen Versuchsgruppe. §= p<0,05 versus 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

Körperkern-temperatur		Vor Hämorrhagie (MZP1)	4 Stunden nach hämorrhagischem Schock (MZP2)	12 Stunden nach Reperfusion (MZP3)	22 Stunden nach Reperfusion (MZP4)
[°C]	32°C	31.9 (31.9; 32.2)§	32.2 (32.2; 32.4)§	32.1 (32; 32.4)§	36.8 (35.7; 37.4)#§
	35°C	34.9 (34.8; 35)§	35.1 (35; 35.2)§	35.1 (34.9; 35.2)§	38 (37.8; 38.2)#
	38°C	37.5 (36.8; 38)	37.7 (37.4; 38.1)	37.6 (37.4; 38)	37.9 (37.5; 38.2)

3.3 Hämodynamische Parameter

Während der gesamten Versuchsdauer wurden grundlegende systemische Parameter der Hämodynamik für alle Versuchsgruppen bestimmt. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse dieser Erhebungen. Betrachtet man die Herzfrequenz, so gab es bereits 4 Stunden nach der Einleitung des hämorrhagischen Schocks (MZP 2) signifikante Unterschiede zum jeweiligen

Ausgangswert in jeder Gruppe. In der 35°C-Gruppe erstreckten sich signifikante Frequenzzunahmen gegenüber dem Ausgangswert über die gesamte Versuchsdauer. Für die 32°C-Gruppe zeigten sich signifikante Frequenzanhebungen zum Ausgangswert bei 4 Stunden nach Hämorrhagie (MZP 2) und 22 Stunden nach Reperfusion (MZP 4). Grundsätzlich zeigten alle Versuchsgruppen nach der Hämorrhagie gesteigerte Herzfrequenzen, die in den hypothermen Gruppen annähernd gleich blieben und in der 38°C-Gruppe zum Versuchsende auf durchschnittlich 115/min absanken.

Das Herzzeitvolumen nahm im Vergleich zum Ausgangswert (MZP 1) 4 Stunden nach hämorrhagischem Schock (MZP 2) in allen Gruppen signifikant ab, dabei erreichten diese ein annähernd gleiches Volumen. Im Verlauf der Versuchsdauer stieg es in allen Gruppen wieder an, um schließlich den Ausgangswert zu übersteigen. Ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert ließ sich hierbei nur in der 38°C-Gruppe zum MZP 3 und MZP 4, jeweils nach Reperfusion, feststellen.

In Bezug auf den mittleren arteriellen Blutdruck zeigte sich ein Abfall zum MZP 2, analog zum hämorrhagischen Schock, der für alle Gruppen signifikante Unterschiede zum Ausganswert darstellt. Im Verlauf der Volumenreperfusion stieg der mittlere arterielle Druck wieder an, um sich für die 35°C- und 38°C-Gruppe zum Versuchsende auf ein, dem Ausgangswert ähnliches Level wieder einzustellen. Die 32°C-Gruppe ist die einzige, die signifikante Endwerte unterhalb dem Ausgangsniveau erreichte. Außerdem war der MAP der 32°C-Gruppe zu MZP 3 und 4 signifikant im Vergleich zur 38°C-Gruppe erniedrigt. Die Ergebnisse des zentral venösen Drucks (ZVD) zeigten für alle hier gemessenen Werte signifikante Unterschiede zum Ausgangswert der jeweiligen Gruppe. Die niedrigsten zentral venösen Drücke wurden analog des Studienaufbaus zum für alle Gruppen zur vierten Stunde nach hämorrhagischem Schock (MZP 2) gemessen.

Tabelle 5: Hämodynamische Parameter der Versuchsgruppen. Für die hämodynamischen Parameter sind jeweils der Median, sowie die 25. und 75. Quartile der 32°C-Gruppe (n=7), 35°C-Grupppe (n=7) und der 38°C-Gruppe (n=6) dargestellt. #= p<0,05 versus Messzeitpunkt 1 (vor Hämorrhagie) §= p<0,05 versus 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

Hämodynamische Parameter		Vor Hämorrhagie (MZP1)	4 Stunden nach Hämorrhagischem Schock (MZP2)	12 Stunden nach Reperfusion (MZP3)	22 Stunden nach Reperfusion (MZP4)
Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]	**32°C**	82 (76; 91)	31 (28; 35)#	76 (74; 78)§	66 (57; 72)#§
	35°C	98 (87; 108)	30 (28; 33)#	95 (78; 111)	93 (75; 109)
	38°C	93 (89; 104)	28 (26; 30)#	100 (93; 105)	94 (77; 96)
Herzfrequenz [1·/ min^{-1}]	**32°C**	88 (78; 98)	141 (130; 152)#	150 (80; 159)	148 (117; 157)#
	35°C	99 (87; 106)	147 (139; 153)#	118 (113; 146)#	145 (142; 155)#
	38°C	97 (87; 116)	166 (151; 176)#	118 (110; 120)	115 (103; 140)
Zentral venöser Druck [mmHg]	**32°C**	10 (8; 11)	1 (0; 2)#	15 (13; 17)#	15 (13; 21)#
	35°C	9 (8; 9)	1 (0; 3)#	15 (14; 16)#	14 (12; 17)#
	38°C	9 (7; 10)	1 (0; 2)#	15 (13; 16)#	17 (16; 19)#
Herzzeit-volumen [$mL \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$]	**32°C**	115 (105; 154)	43 (36; 53)#	116 (90; 128)	165 (93; 184)
	35°C	128 (177; 133)	40 (38; 46)#	119 (95; 141)	145 (107; 161)
	38°C	101 (89; 110)	41 (39; 48)#	140 (135; 151)#	143 (128; 190)#

3.4 Metabolische Parameter

Die Werte des arteriellen pCO_2, pO_2, Laktat, Base Excess und pH-Wert sind in der nachfolgenden Tabelle 5 dargestellt. Die arteriellen pCO_2-Werte stiegen in allen Versuchsgruppen zum letzten Messzeitpunkt gegenüber dem Ausganswert an. Die 35°C-Gruppe zeigte signifikante Unterschiede während der letzten zwei Messzeitpunkte im Vergleich zum MZP 1. In der 32°C-Gruppe zeigten alle Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zum Ausgangswert. Der Anstieg der pCO_2-Werte verlief für alle Versuchsgruppen in ähnlichem Ausmaß.

Der Horovitz-Quotient (PaO_2/FiO_2) zeigte für alle Versuchsgruppen gegenüber den Ausgangswerten gesunkene Endwerte zum MZP 4. Hierbei waren die Endwerte der hypothermen Gruppen signifikant niedriger als zum MZP 1. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigten sich für die 32°C-Gruppe zum MZP 1 und 3; für die 35°C-Gruppe zum MZP 4. Obwohl die Werte aller Gruppen zum MZP 4 gesunken waren, zeigten sich in den hypothermen Gruppen keine Absenkung

unter kritische Normwerte, die allerdings für die Kontrollgruppe zu verzeichnen sind.

Die arterielle Laktatkonzentration in mmol/L zeigte signifikante Erhöhungen zum zweiten MZP für alle Gruppen gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert. Außerdem zeigten die Werte der hypothermen Gruppen Signifikanz gegenüber der Kontrollgruppe zu MZP 2. Die Laktatazidose war zum MZP 2 in der 32°C-Gruppe am geringsten ausgeprägt, blieb im Vergleich mit den anderen Gruppen jedoch bis zum Ende des Versuchs bestehen.

Der arteriell bestimmte Base Excess war für die 32°C-Gruppe begleitend herabgesetzt. Die letzten zwei Messzeitpunkte waren zudem signifikant im Vergleich zur 38°C-Gruppe erniedrigt.

Bezüglich des pH-Wertes zeigten alle Gruppen zu allen Messzeitpunkten signifikante Erniedrigungen gegenüber den jeweiligen Ausgangswerten. Die 32°C-Gruppe zeigte Absenkungen ins azidotische Niveau ab dem zweiten MZP, die alle signifikant gegenüber der Kontrollgruppe waren.

Tabelle 6: Metabolische Parameter der Versuchsgruppen. Dargestellt sind jeweils der Median, sowie die 25. und 75. Quartile der 32°C-Gruppe (n=7), 35°C-Grupppe (n=7) und der 38°C-Gruppe (n=6). #= p<0,05 versus Messzeitpunkt 1 der gleichen Versuchsgruppe. §= p<0,05 versus 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

Metabolische Parameter		Vor Hämorrhagie (MZP1)	4 Stunden nach Hämorrhagischem Schock (MZP2)	12 Stunden nach Reperfusion (MZP3)	22 Stunden nach Reperfusion (MZP4)
Arterieller pCO_2 [mmHg]	**32°C**	35 (34; 35)	38 (37; 40)#	39 (38; 40)#	41 (38; 46)#
	35°C	35 (32; 36)	36 (34; 41)	37 (36; 40)#	39 (36; 44)#
	38°C	37 (35; 41)	40 (36; 47)	38 (36; 39)	39 (35; 41)
PaO_2/FiO_2 [mmHg]	**32°C**	574 (558; 590)§	491 (413; 507)#	520 (493; 593)§	393 (357; 427)#
	35°C	531 (490; 538)	469 (417; 501)	533 (413; 573)	471 (430; 499)#§
	38°C	429 (393; 449)	405 (379; 431)	361 (329; 425)	272 (215; 379)
Lactat arteriell [$mmol \cdot L^{-1}$]	**32°C**	1,4 (0,8; 2,5)§	4,0 (3,2; 5,2)#§	3,0 (0,7; 8,5)	1,2 (0,6; 5,4)
	35°C	0,7 (0,5; 0,8)	5,1 (4,6; 6,4)#§	0,5 (0,5; 3,4)	0,5 (0,5; 0,9)
	38°C	0,7 (0,5; 0,8)	9,1 (8,5; 9,2)#	0,7 (0,6; 0,8)	0,6 (0,4; 0,7)
Base Excess arteriell [$mmol \cdot L^{-1}$]	**32°C**	-2,7 (-3,1; -2)	-7,5 (-10,2; -4,4)#	-10,4(-17,8 -2,7)#§	-8,3(-11,8; -4,4)#§
	35°C	-1 (-1,9; 0,6)	-9,2 (-12,9; -6,8)#	-1,4 (-7,6; -0,2)	-1,4 (-4,6; 4,7)
	38°C	-0,8 (-1,5; 1,4)	-12,9(-14,3;- 11,6)#	-1,6 (-2,2; -1,2)	-2,7 (-4,7; -0,3)
pH	**32°C**	7,41 (7,39; 7,41)	7,29 (7,23; 7,35)#§	7,22(7,11; 7,33)#§	7,28 (7,18; 7,32)#
	35°C	7,44 (7,42; 7,45)	7,25 (7,21; 7,32)#	7,33 (7,31; 7,4)#	7,35 (7,35; 7,43)#
	38°C	7,42 (7,42; 7,45)	7,17 (7,12; 7,2)#	7,37 (7,33; 7,4)#	7,36 (7,27; 7,41)#

3.5 Die Nitrotyrosinfärbung

Nitrotyrosin wurde als nachweisbares Endprodukt der Aktivität von Peroxynitrit im Nierengewebe immunhistochemisch für jedes Tier bestimmt. Die Gewebeschnitte, die sowohl kortikale wie medulläre Nierenzellen enthielten, wurden wie unter 2.4 beschrieben gefärbt. Anschließend wurde die Färbung computerassistiert ausgewertet.

Die folgende Abbildung 8 soll ein Beispiel dafür geben wie das Programm die positiv gefärbten Areale eines histologischen Schnitts detektiert:

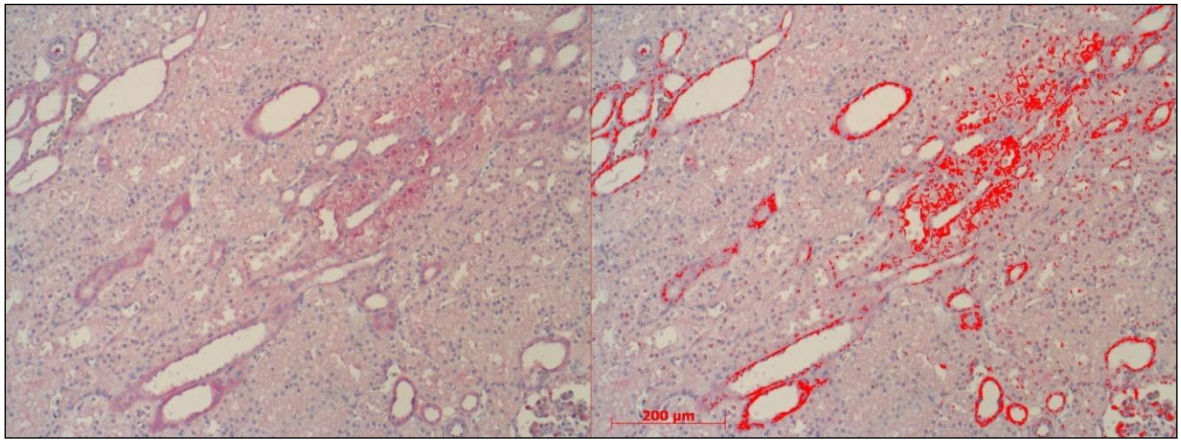

Abbildung 8: Beispiel der Nitrotyrosinfärbung des Nierengewebes vom Schwein. Links der gefärbte Gewebeschnitt, rechts der gleiche Gewebeschnitt nach Auswertung mit der Software: die hellroten Areale zeigen die positiv gefärbten, zu messenden Zellen an.

In die Auswertung flossen die Intensität der Färbung und die Fläche der angefärbten Zellen ein. Innerhalb der drei Versuchsgruppen zeigten sich ansteigende Werte, wobei in der 32°C-Gruppe am wenigsten Nitrotyrosin nachweisbar war. Das Vorliegen Nitrotyrosin-positiver Zellen scheint sich also proportional zur Temperatur zu Verhalten, wobei Kälte mit weniger positiven Zellen einhergeht.

Es war kein Unterschied der Mediane der 32°C-Gruppe und der 35°C-Gruppe zu verzeichnen, während der Maximalwert der 35°C-Gruppe deutlich höher als in der 32°C-Gruppe lag. In beiden Auswertungen wurden Unterschiede von der 32°C zur 38°C-Gruppe gemessen, die nur marginal die statistische Signifikanz verfehlten.

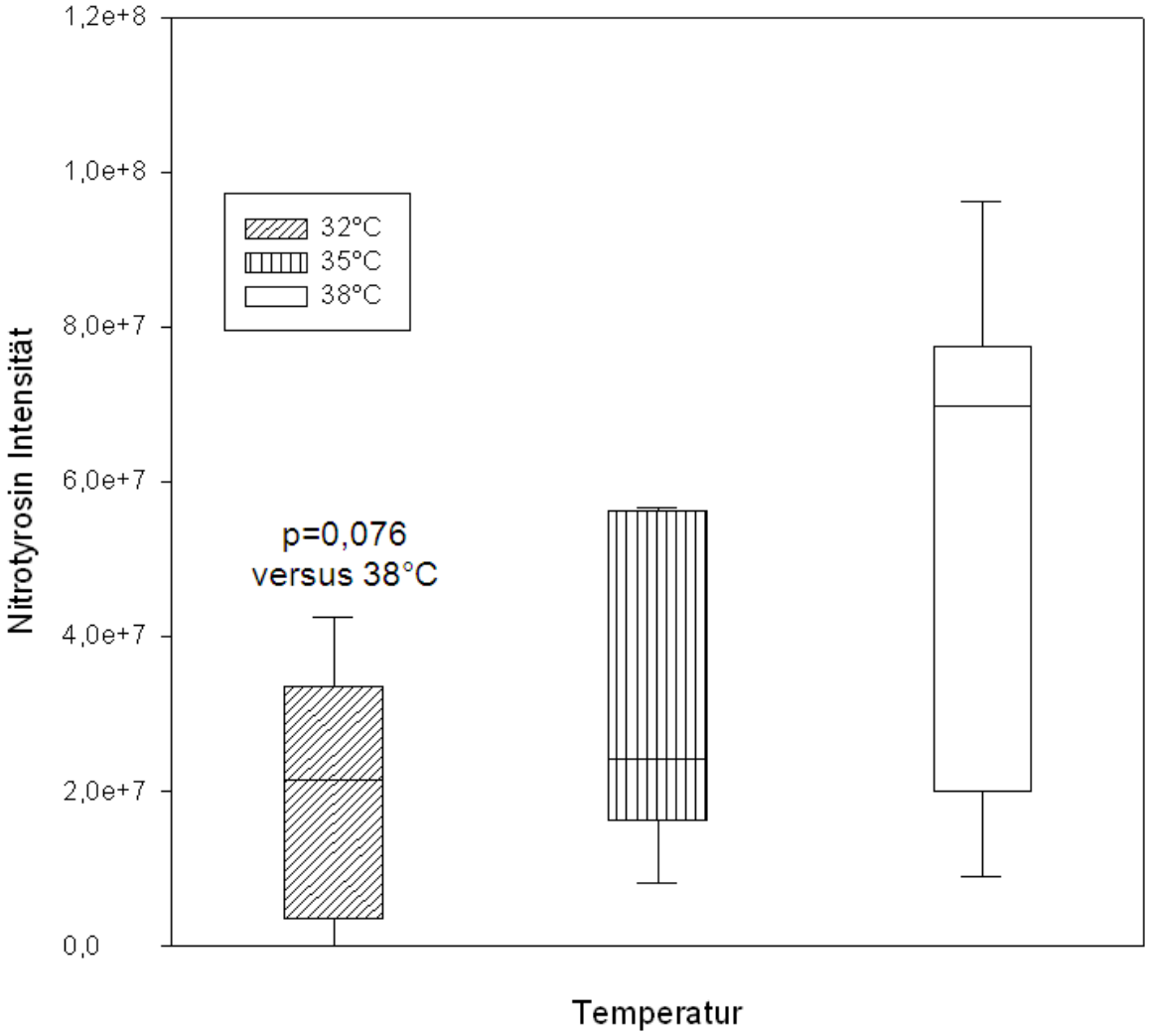

Abbildung 9: Nitrotyrosinfärbung der Nierengewebeproben vom Schwein: Graphische Darstellung der Intensität der Färbung in den drei Versuchsgruppen. Die Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), werden in aufsteigender Reihenfolge von links beginnend gezeigt. Die Box Plots zeigen den Median, Minimal- und Maximalwert, sowie die 25. Und 75. Quartile der einzelnen Gruppen. p= 0,076 zur 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

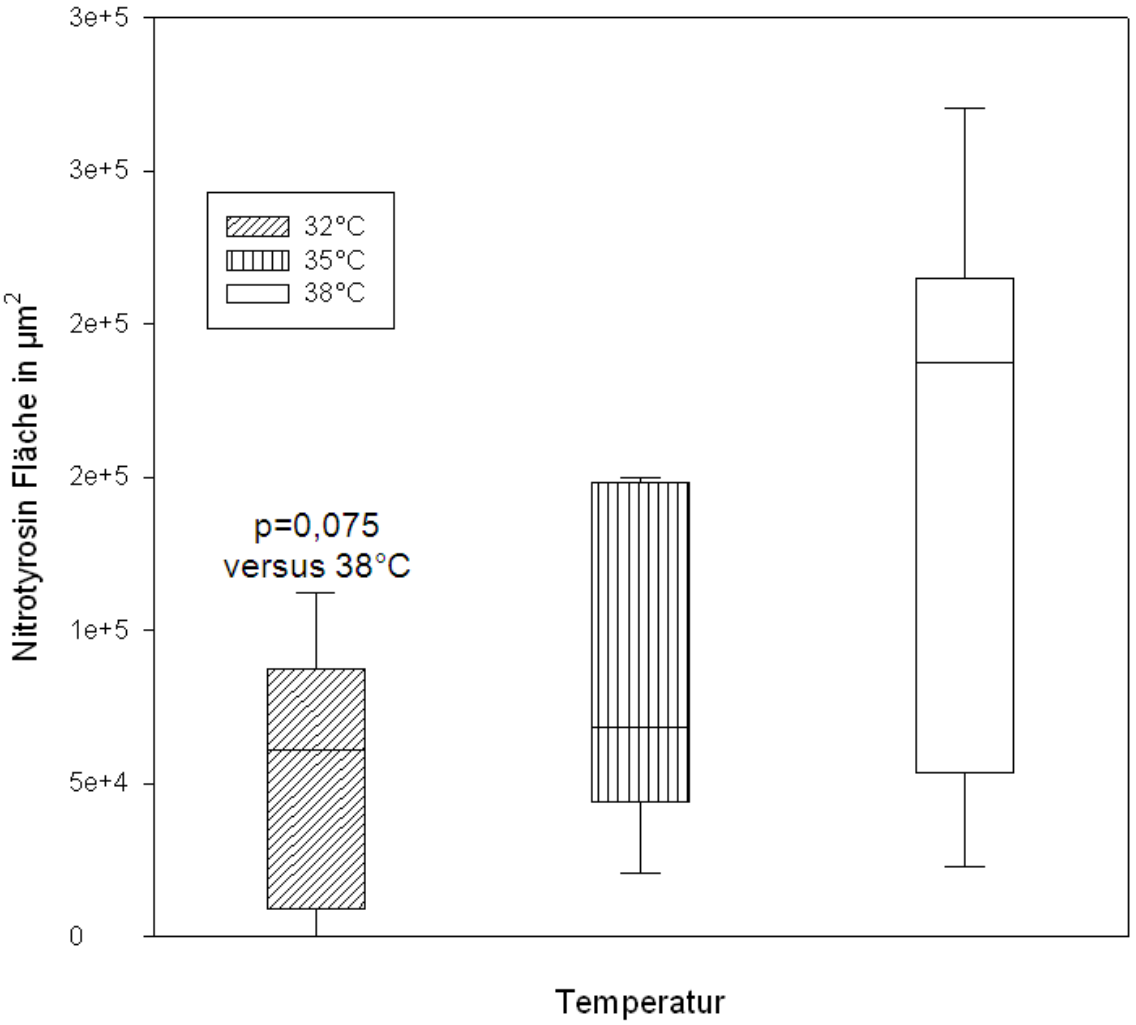

Abbildung 10: Nitrotyrosinfärbung der Nierengewebeproben vom Schwein: Graphische Darstellung der Fläche der Färbung in µm^2 pro Objektträger. Die Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), werden in aufsteigender Reihenfolge von links beginnend gezeigt. Die Box Plots zeigen den Median, Minimal- und Maximalwert, sowie die 25. Und 75. Quartile der einzelnen Gruppen. p= 0,075 zur 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

3.6 Biochemische Analyse

3.6.1 Der Westernblot zur Bestimmung der iNOS

Mit Hilfe eines polyklonalen Rabbit Antikörpers gegen iNOS wurde der Western Blot zur Detektierung und Quantifizierung von iNOS im Nierengewebe durchgeführt. Die Bestimmung der iNOS-Proteinkonzentration wurde für alle Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe durchgeführt, und bei Bedarf wiederholt. Die Banden wurden computerassistiert hinsichtlich der „Integrated Density“, einem Dichteparameter ausgewertet. Diese wurde dann in Daten überführt, die anschließend mit nativ Tieren aus vorangegangenen Studien verglichen und

statistisch ausgewertet wurden. Die Ergebnisse des entwickelten Röntgenfilms zeigt Abbildung 11. Die Positivkontrolle zeigt ein deutliches Signal bei 130 kDa, der erwarteten Molekülmasse für das iNOS-Protein.

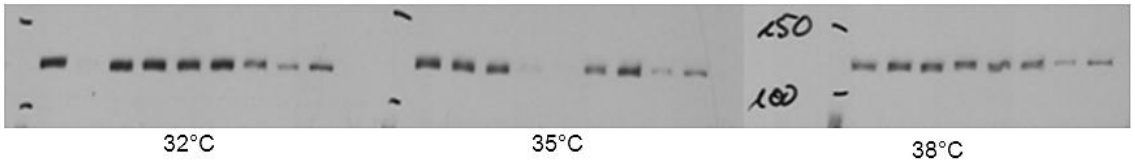

Abbildung 11: Die Proteinkonzentration der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) im Nierengewebe des Schweins, repräsentativer Westernblot mit aufgereinigten Proteinextrakten: die einzelnen Banden stellen Versuchstiere der jeweiligen Gruppe (32°C-35°C-38°C) dar. Verbliebene Taschen wurden mit Colormarker geladen. Zur Abgrenzung der Proteingröße wurden die Signale eines Proteingrößenstandards in den einzelnen Blots markiert, und auf dem letzten Blot beschriftet (150 kDa, 100 kDa)

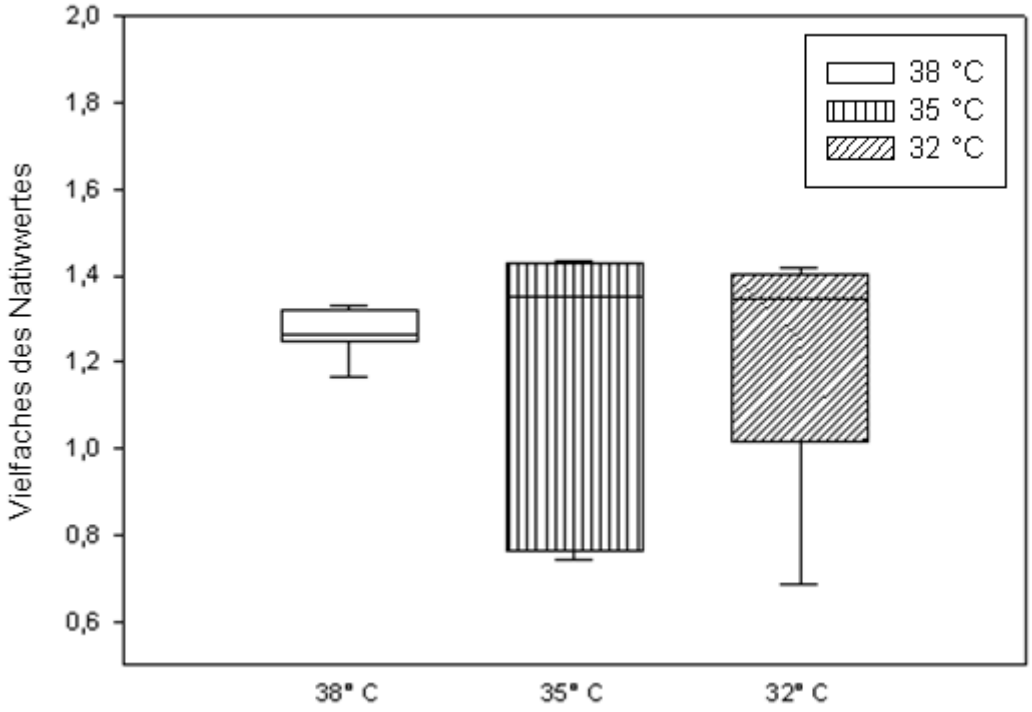

Abbildung 12: Die Proteinkonzentration der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) im Nierengewebe des Schweins. Graphische Darstellung der Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), mit Median, 25.- und 75.-Quartile. Der statistische Vergleich ergab keine Signifikanz. Die Messergebnisse wurden gegenüber Nativproben verglichen, und sind hier als Vielfaches der Ergebnisse der Nativprobe aufgeführt.

Die Mediane der drei Gruppen zeigten hinsichtlich der Vervielfachung gegenüber der Nativprobe keine signifikanten Unterschiede.

3.6.2 Der Westernblot für die Bestimmung von IκBα

Unter Verwendung eines IKB-α (C21) Hase Antikörpers wurde die Messung von IκBα durchgeführt. Wie erwartet zeigten sich in allen Versuchsgruppen positive Banden bei 37 kD, die somit den Nachweis des Proteins erbringen. Die Auswertung erfolgte computerassistiert, wie bereits in der Bestimmung der iNOS beschrieben.

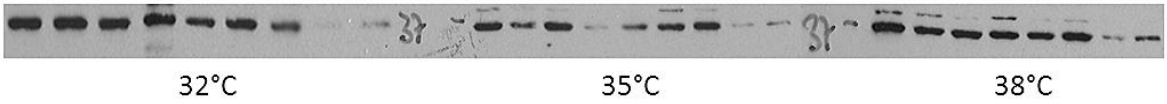

Abbildung 13: Die Inhibitor-κBα-Proteinkonzentration im Nierengewebe des Schweins, repräsentativer Westernblot mit aufgereinigten Proteinextrakten: die einzelnen Banden stellen Versuchstiere der jeweiligen Gruppe (32°C-35°C-38°C) dar. Verbliebene Taschen wurden mit Colormarker geladen. Zur Abgrenzung der Proteingröße wurden die Signale eines Proteingrößenstandards in den einzelnen Blots markiert, und auf den letzteren zwei Blots beschriftet (37 kDa).

In den Versuchsgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede der 32°- und 35°C-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Mit abfallender Körperkerntemperatur zeigten sich die höchsten IκBα-Konzentrationen.

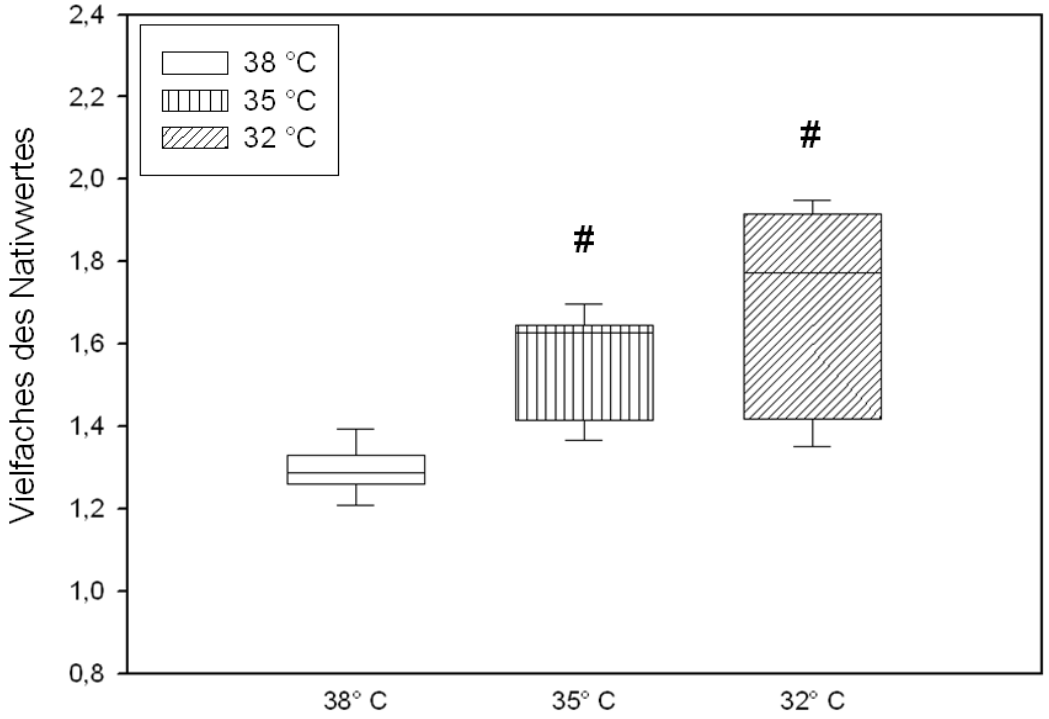

Abbildung 14: Die Inhibitor-κBα-Proteinkonzentration im Nierengewebe des Schweins. Graphische Darstellung der Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), mit Median, 25.- und 75.-Quartile. Die Messergebnisse wurden mit Nativproben verglichen, und sind hier als Vielfaches der Ergebnisse der Nativprobe aufgeführt. #= p< 0,05 zur 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

3.6.3 Der Westernblot für die Bestimmung von HO-1

Für die Konzentrationsbestimmung der HO-1 wurde ein mAB (HO-1-2) Maus Antikörper verwendet. Das erwartete Molekulargewicht von HO-1 liegt bei 32 kD.
Die Banden der HO-1 sind im Verlgeich zu denen der anderen Bestimmung etwas blasser.

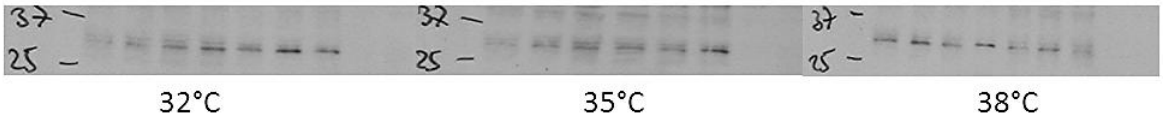

Abbildung 15: Die Hämoxygenase-1 Proteinkonzentration im Nierengewebe des Schweins, repräsentativer Westernblot mit aufgereinigten Proteinextrakten: die einzelnen Banden stellen Versuchstiere der jeweiligen Gruppe (32°C-35°C-38°C) dar. Verbliebene Taschen wurden mit Colormarker geladen. Zur Abgrenzung der Proteingröße wurden die Signale eines Proteingrößenstandards in den einzelnen Blots markiert, und auf den Blots beschriftet (25 kDa, 37 kDa).

Es zeigten sich signifikante Unterschiede der beiden hypothermen Gruppen gegenüber der 38°C-Gruppe. Allerdings zeigte sich in dieser Messung, dass die kälteren Gruppen weniger HO-1 Expression aufwiesen, als die Kontrollgruppe. Die Mediane der 32°- und 35°C-Gruppe unterschieden sich nicht.

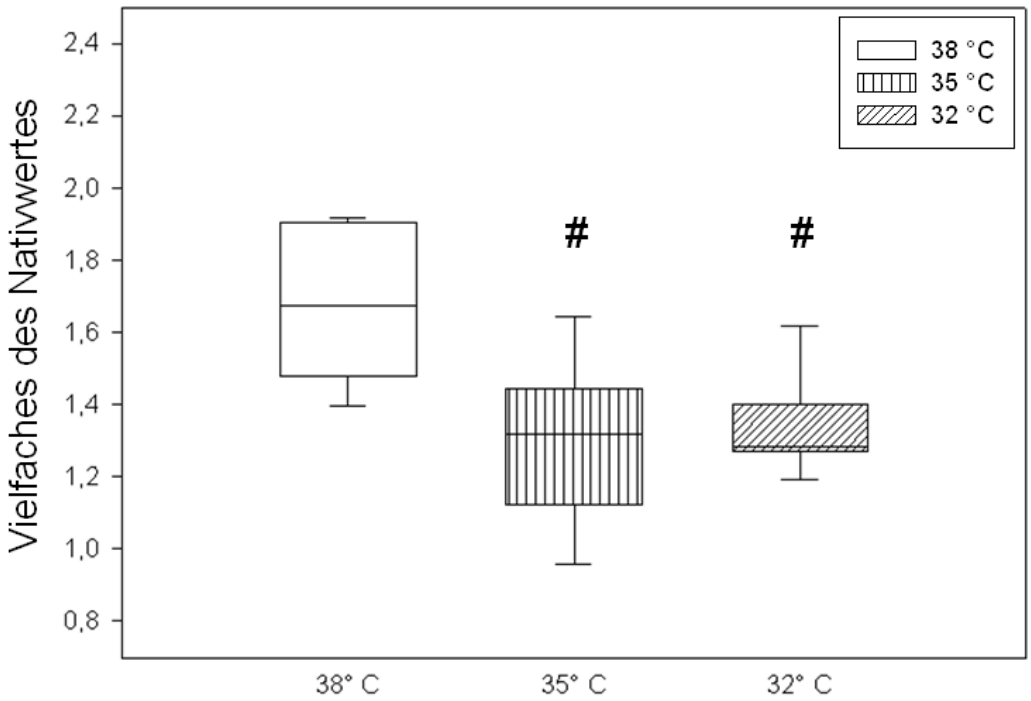

Abbildung 16: Die Hämoxygenase-1 Proteinkonzentration im Nierengewebe des Schweins. Graphische Darstellung der Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), mit Median, 25.- und 75.-Quartile. Die Messergebnisse wurden gegenüber Nativproben verglichen, und sind hier als Vielfaches der Ergebnisse der Nativprobe aufgeführt. #= p< 0,05 zur 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

3.6.4 Der EMSA für die Bestimmung von NFκB

Zur Bestimmung der Konzentration von NFκB aus dem Nierengewebe wurde der Electric Mobility Shift Assay durchgeführt. Die radioaktiv gelabelten NFκB-Proteine stellen sich wie folgt dar.

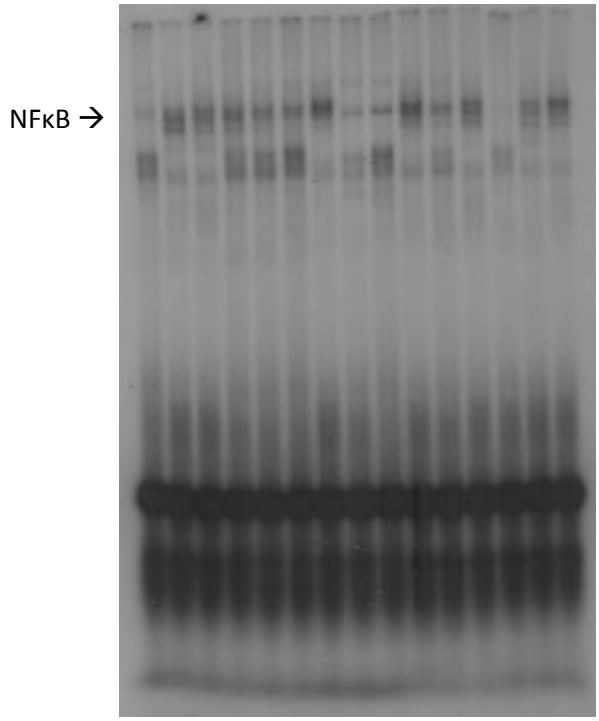

Abbildung 17: Der Electric Mobility Shift Assay aus Nierengewebe vom Schwein. Die einzelnen Banden stellen exemplarisch Versuchstiere aus allen drei Versuchsgruppen dar. Die erwartete Wanderungslänge für NFκB wurde markiert.

Innerhalb der Versuchsgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Messergebnissen. Die Mediane erreichten alle ein ähnliches Niveau. Es scheint hier kein Einfluss durch Temperatur zu bestehen.

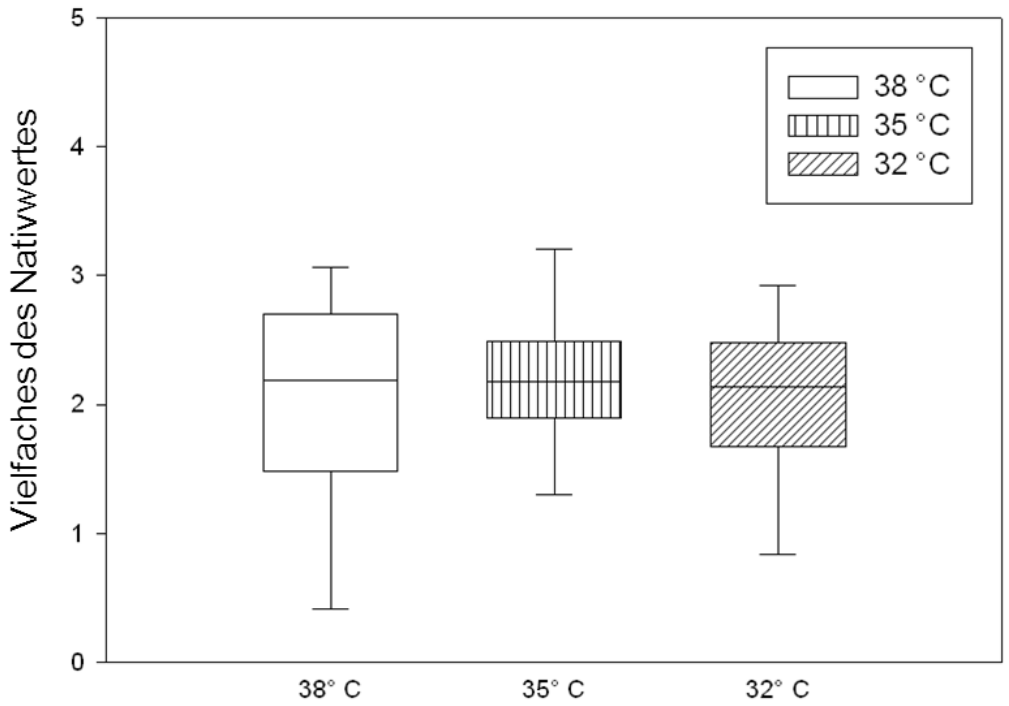

Abbildung 18: Electric Mobility Shift Assay für die Konzentration von NFκB aus Nierengewebe vom Schwein. Graphische Darstellung der Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), mit Median, 25.- und 75.-Quartile. Der statistische Vergleich ergab keine Signifikanz. Die Messergebnisse wurden gegenüber Nativproben verglichen, und sind hier als Vielfaches der Ergebnisse der Nativprobe aufgeführt.

3.7 Der Comet Assay

Im Folgenden werden die Auswirkung der induzierten Hypothermie der Versuchsgruppen und der normothermen Kontrollgruppe auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen und oxidative Schäden in vivo dargestellt. Zu sehen sind jeweils der Median, sowie die 25.- und 75.-Quartile der einzelnen Gruppen. Der Median aller drei Gruppen war zum MZP 4 gegenüber dem MZP 1 erhöht. Der MZP 1 erfolgte zwei Stunden nach Beendigung der Operation, die spontane DNA-Migration zeigte sich zu diesem Zeitpunkt in Tailmomenten um 0,2. In der 35°C Gruppe zeigte sich eine kontinuierliche Erhöhung des durchschnittlichen Tailmoments über die gesamte Versuchsdauer hinweg, die Messzeitpunkte zwei bis vier zeigten hierbei signifikante Erhöhungen gegenüber dem Ausgangswert. Zum MZP 3 wurden in der 35°C-Gruppe signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe erzielt. Insgesamt wurde in dieser Gruppe zum letzten Versuchszeitpunkt das höchste Tailmoment erreicht. Die 32°C-Gruppe zeigte zum MZP 2 ein niedrigeres Tailmoment als der Ausgangswert. Auch gegenüber den anderen Versuchsgruppen war dieses der niedrigste Wert.

Die Ergebnisse des Comet Assays von Nierengewebe sind in Tabelle 8 zu sehen. Hier konnte nur die 35°C-Gruppe signifikante Unterschiede zur 38°C-Gruppe erzielen.

Tabelle 7: Comet Assay des Blutes in Tailmoments. Für die Messzeitpunkte 1-4 werden für die Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), der Median und die Quartile (25; 75) angegeben. #= p<0,05 versus dem Ausgangswert innerhalb einer Gruppe, §= p<0,05 zur 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

Comet Assay (Tail-moments)	Vor Hämorrhagie (MZP 1)	4 Stunden nach hämorrhagischem Schock (MZP 2)	12 Stunden nach Reperfusion (MZP 3)	22 Stunden nach Reperfusion (MZP 4)
32°C	0,23 (0,18; 0,27)	0,21 (0,17; 0,34)	0,28 (0,20; 0,47)§	0,29 (0,14; 0,33)
35°C	0,19 (0,18; 0,22)	0,25 (0,23; 0,34)#	0,29 (0,21; 0,46)#§	0,49 (0,42; 0,76)#
38°C (Kontrolle)	0,20 (0,18; 0,25)	0,27 (0,22; 0,32)	0,19 (0,17; 0,21)	0,25 (0,21; 0,77)

Tabelle 8: Comet Assay der Niere in Tailmoments. Für die Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), werden der Median und die Quartile (25; 75) angegeben. §= p<0,05 zur 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

Comet Assay (Tailmoments)	**32°C**	**35°C**	**38°C (Kontrolle)**
CA Niere	0,83 (0,52; 0,91)	1,69 (1,50; 2,83)§	0,93 (0,81; 1,51)

3.8 Ergebnisse der Nitratmessung:

Die Nitratkonzentration in µmol/g Protein wurde aus den Ergebnissen der Nitratbestimmung im Plasma in µmol/l, und denen der Proteinkonzentration der jeweiligen Plasmaproben in g/l bestimmt. Sowohl die 32°C-Gruppe, als auch die 35°C-Gruppe zeigten signifikante Unterschiede zum MZP 4 gegenüber ihrem jeweiligen Ausgangswert. Die 35°C-Gruppe zeigte während der ersten beiden Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe desselben Zeitpunkts. In allen Gruppen ist eine stetige Zunahme der Messwerte zu verzeichnen. Zum MZP 3 stieg die Nitratkonzentration in der 32°C-Gruppe deutlich weniger als in den übrigen Versuchsgruppen an.

Tabelle 9: Nitratkonzentration in Blutproben vom Schwein in µmol/g Protein. Für die Messzeitpunkte 1-4 werden für die Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), der Median und die Quartile (25; 75) angegeben. #= p< 0,05 versus dem Ausgangswert innerhalb einer Gruppe, §= p<0,05 zur 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

Nitratwert (µmol/g)	Vor Hämorrhagie (MZP 1)	4 Stunden nach hämorrhagischem Schock (MZP 2)	12 Stunden nach Reperfusion (MZP 3)	22 Stunden nach Reperfusion (MZP 4)
32°C	0.5 (0.4; 0.7)	0.6 (0.5; 0.8)	0.8 (0.6; 1.5)	2.9 (1.3; 3.3)#
35°C	0.8 (0.7; 1.4)§	0.9 (0.8; 1.1)§	1.5 (1.1; 2.1)	3.3 (2.4; 4.1)#
38°C (Kontrolle)	0.5 (0.3; 0.7)	0.5 (0.4; 0.7)	1.4 (1.2; 1.8)#	2.4 (1.3; 3.1)#

3.9 Ergebnisse der 8-Isoprostan Messung:

Der Isoprostanspiegel gibt Hinweis auf Lipidperoxidation und damit oxidativen Stress. Die Endwerte aller Gruppen waren im Vergleich zur Ausgansmessung annähernd verdoppelt. Die 32°C-Gruppe erreichte die höchsten Werte, die auch gegenüber der Kontrollgruppe zum gleichen Messzeitpunkt signifikant waren.

Tabelle 10: 8-Isoprostankonzentration in Blutproben vom Schwein in µmol/g Protein. Für die Messzeitpunkte 1-4 werden für die Versuchsgruppen, 32°C (n=7), 35°C (n=7) und 38°C (n=6), der Median und die Quartile (25; 75) angegeben. #= p< 0,05 versus dem Ausgangswert innerhalb einer Gruppe, §= p<0,05 zur 38°C-Gruppe desselben Messzeitpunktes.

8-Isoprostane (ng/g)	Vor Hämorrhagie (MZP 1)	4 Stunden nach hämorrhagischem Schock (MZP 2)	12 Stunden nach Reperfusion (MZP 3)	22 Stunden nach Reperfusion (MZP 4)
32°C	1.8 (1.6; 2.6)	2.8 (2.0; 3.0)	7.3 (5.2; 9.6)#§	11.1 (4.4; 22.9)#§
35°C	2.0 (1.8; 2.2)	3.0 (2.6; 3.1)#	4.8 (4.3; 5.2)#§	3.6 (3.1; 6.7)#
38°C (Kontrolle)	2.2 (1.6; 2.9)	2.3 (1.9; 2.8)	3.7 (3.5; 3.9)#	3.9 (3.4; 5.1)#

4 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden die Effekte einer prophylaktischen, hypothermen Therapie in Bezug auf die Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies bei einem hämorrhagischen Schock im Schwein untersucht. Dabei wurde die Radikallast einer 32°C und 35°C-Gruppe mit der normothermen Kontrollgruppe bei 38°C verglichen um zu untersuchen, ob eine der hypothermen Therapieformen zu verringerter Bildung reaktiver Spezies führte. Bevor die einzelnen Ergebnisse aufgeführt werden soll ein kurzer Überblick über das Studienmodell und die hämodynamischen- bzw. metabolischen Parameter und deren möglichen Einfluss auf die Ergebnisse gegeben werden.

4.1 Das Studienmodell

Die vorliegende Studie wurde an einem Großtiermodell unter intensivmedizinischen Bedingungen durchgeführt, die laut Literaturrecherche bisher in diesem Kontext noch nicht zum Einsatz kamen. Das Studienmodell soll die Behandlung eines Menschen mit hämorrhagischem Schock repräsentieren, hierfür eignet sich das Schwein als Versuchstier, da es nicht nur hohe physiologische, anatomische und metabolische Analogie zum Menschen aufweist, sondern auch bezüglich der Prädisposition gegenüber Radikalstress und den antioxidativen Schutzeigenschaften des Parenchyms Ähnlichkeiten zeigt (Deitch 1998, Dodds 1982, Hannon et al. 1990, Howe et al. 1968).

In unserem Modell führten wir den hämorrhagischen Schock herbei, indem Blut bis zu einem arteriellen Mitteldruck (MAP) von 30±3 mmHG über vier Stunden entnommen wurde. Zuvor wurde außerdem ein maximal zu entnehmendes Blutvolumen in Abhängigkeit des Körpergewichts bestimmt. Die Stärken eines solchen sowohl Druck- als auch Volumen abhängigem Studienmodells liegen in der Reproduzierbarkeit des Ausmaßes und der Dauer des Schocks. Als Nachteil ist hierbei zu werten, dass der hämorrhagische Schock im klinischen Alltag oft binnen Minuten eintritt und dabei kritische MAP-Werte erreicht werden, die eine effektive Kompensation erschweren. Die Ergebnisse der hämodynamischen Parameter zeigen, dass der angestrebte MAP-Wert zum Schockzeitpunkt in allen Versuchsgruppen erzielt wurde. Zu den übrigen Messzeitpunkten wurden stabile MAP-Werte, zum Teil durch die Gabe von Noradrenalin, erreicht.

Die Hypothermie wurde über einen in der Vena jugularis platzierten Ballonkatheter, der mit gekühlter Flüssigkeit gefüllt wurde, herbeigeführt. Dieses Verfahren ermöglicht im Gegensatz zu anderen Studiengruppen, die gekühlte Infusionen oder Kühlung durch aufwendige Operationsverfahren verwendeten (Chen et al. 2005, Krause et al. 2000), die kontinuierliche, exakte Beeinflussung der Körpertemperatur bei gleichzeitig schnell applizierbarem Katheter. Ein Nachteil für die Übertragung in den klinischen Alltag stellt die frühzeitige Kühlung der Tiere dar, da in der Notfallversorgung dieser Patienten keine präemptive Kühlung möglich ist. Allerdings wurde innerhalb einer anderen Dissertation aus unserer Studie eine Thrombelastographie durchgeführt, zu deren Messung frühzeitig eine konstante Temperatur eingestellt werden musste.

Da es bei einer Abkühlung unter 32°C zu Kreislaufinstabilität, Herzrhythmusstörungen und Hypokoagulabilität kommt, verwendeten wir 32°C versus 35°C (Johnston et al. 1994, Martini et al. 2008, Valeri et al, 1995; Watts et al 1998). Studiengruppen, die sich mit neurologischen Traumata beschäftigten konnten innerhalb dieses Temperaturintervalls reduzierte Azidose, Metabolismus und verbessertes Outcome gegenüber normothermen Bedingungen zeigen (Fox et al. 2010).

Um die nachfolgenden Ergebnisse dieser Studie auf die therapeutische Hypothermie zurück führen zu können muss zunächst gewährleistet sein, dass das Studienmodell eingehalten wurde und keine Störfaktoren entstanden sind.

4.2 Temperatur

In unserer Studie wurden zwei hypotherme Gruppen bei 32°C und 35°C mit einer normothermen Gruppe bei 38°C verglichen. Die Tiere waren während der ersten drei Messzeitpunkte auf die gewünschte Temperatur eingestellt, zum Ende des Versuches (MZP 4) erfolgte für die kalten Gruppen eine Aufwärmung auf normothermes Niveau. Die Überprüfung erfolgte mittels rektaler Messung und zeigte, dass alle Gruppen während der gesamten Versuchsdauer die gewünschte Temperatur hatten und somit das Studiendesign erfüllt wurde.

4.3 Hämodynamische und metabolische Parameter

Als Verlaufskontrolle der Hämodynamik wurden systemische Parameter wie Herzzeitvolumen, MAP, ZVD und Herzfrequenz überwacht. In allen

Versuchsgruppen zeigten sich ähnliche Veränderungen während der Versuchsdauer. In Anbetracht des verminderten zirkulierenden Volumens sind zwischenzeitlich abfallende arterielle und zentral venöse Druckwerte bei ansteigender Herzfrequenz in allen Gruppen durch Kompensationsmechanismen zu erklären.

Repräsentativ für den metabolischen Zustand der Tiere wurden zu allen Messzeitpunkten arterielle Blutgasanalysen durchgeführt. Vier Stunden nach dem hämorrhagischen Schock (MZP 2) zeigten die 35°C- und die 38°C- Gruppe eine Laktatazidose, die in der 32°C-Gruppe signifikant geringer ausgeprägt war. Begleitend wurden in der 32°C-Gruppe die niedrigsten Base Excess-Werte verzeichnet. Polderman beschrieb in einer Studie, dass bei hypoxämisch bedingtem Umschalten zur anaeroben Glykolyse die intrazellulären Laktatspiegel ansteigen (Polderman 2009). Darüber hinaus konnte in einer Studie von Seekamp et al. gezeigt werden, dass in einer anaeroben Stoffwechsellage erhöhte Plasma-Laktatspiegel mit einer Erniedrigung des Plasma- Adenosintriphosphats (ATP) einhergehen. Bei gleichzeitig herabgesetzter Synthese von ATP unter Hypothermie führt dies zu einer negativen Energiebilanz der Zellen (Seekamp et al. 1999). In Betracht des Zelltods wurde von Lelli et al. und Bradbury et al. beschrieben, dass in Zellen, die über ausreichend ATP verfügen das Einleiten der Apoptose überwiegt, während in Zellen mit niedrigen ATP-Spiegeln die Nekrose und damit vergesellschaftete lokale Inflammation nachgewiesen wurde (Lelli et al. 1998, Bradbury et al. 2000).

Trotz diesen Erkenntnissen zeigte die 32°C-Gruppe innerhalb unserer Studie weniger Belastung durch oxidative und nitrosative Radikale im Vergleich zur 35°- und 38°C-Gruppe, die nachfolgend anhand der gemessenen Parameter besprochen werden.

4.4 Nitrosativer Stress

Zur Interpretation der erhobenen Parameter muss deren Zusammenhang und Auswirkung auf den Organismus rekapituliert werden. In der frühen Schockphase wird die Bildung von NO vor allem durch die eNOS vermittelt, die aber bald durch die induzierte Exprimierung der iNOS durch pro-inflammatorische Zytokine abgelöst wird (Feihl et al. 2001, Liaudet et al. 2000). Die iNOS gibt also Aufschluss über die Fähigkeit NO freizusetzen, das dann in der Atmungskette reversibel die

Cytochrom-C-Oxidase hemmt und mit Sauerstoff um dessen Bindungsstelle konkurriert (Palacios-Callender et al. 2004). Bei vermehrter NO-Produktion und Hypoxämie, die im hämorrhagischen Schock auftritt, kommt es zu vermehrtem Verlust von Elektronen aus der Atmungskette, die die Formation von Superoxid und Peroxynitrit begünstigen. Gleichzeitig wird nicht genügend Energie durch die Atmungskette für den Zellstoffwechsel bereitgestellt (Brown 1999, Brown et al. 1999). Reagiert NO mit $O_2^{\bullet-}$ zu $ONOO^{\bullet}$ führt dieses zur Bildung von DNA-Strangbrüchen und zu Lipidperoxidation, die die Zerstörung von Membranlipiden bedeutet (Hogg et al. 1999). Die Zerstörung der Zellmembranen begünstigt weiterhin das Einleiten der Apoptose durch Austreten von pro-apoptotischen Signalmolekülen aus den Mitochondrien (Bouchier-Hayes et al. 2005). Durch die verursachten DNA-Strangbrüche wird die poly(ADP-ribosyl)polymerase aktiviert, ein DNA Reparaturenzym, das NAD^+ verbraucht und somit weiteren Energieverlust für die Zelle bedeutet (Seija et al. 2012). Der Nachweis dieser drei Parameter führte zu folgenden Ergebnissen:

4.4.1 iNOS

Die quantitative Bestimmung der iNOS-Konzentration zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die iNOS ist allerdings kein finales Produkt, sondern ein Enzym, das abhängig von der angebotenen Menge L-Arginin dieses zu Citrullin umwandelt, wobei NO als Nebenprodukt entsteht (Pacher et al. 2007). Zur Einschätzung seiner Bedeutung, müssen die Ergebnisse mit denen der NO-Messung kombiniert werden.

4.4.2 Nitrat

Der Nitratspiegel umfasst in dieser Studie den Gesamtgehalt von Nitrat und Nitrit im Plasma, da bei der hier verwendeten Messung beide Spezies zu NO reduziert wurden. Zum Ende des Versuchs zeigte sich in allen Gruppen ein signifikanter Anstieg der NO Produktion gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert. In allen Versuchsgruppen wurde im Versuchsverlauf NO erhöht bereitgestellt, um der Vasokonstriktion im hypovolämischen Schock entgegenzuwirken und somit die Sauerstoffversorgung der Gewebe wiederherzustellen. Auffallend ist jedoch, dass die 32°C-Gruppe zum MZP 3 wesentlich geringere NO-Werte vorwies, als die beiden anderen Gruppen. Da NO zu zytotoxischen Effekten führt wenn es mit

Sauerstoffradikalen zu ONOO˙ reagiert muss die NO-Konzentration zusammen mit dem Vorliegen von oxidativen Radikalen bewertet werden. Zusätzlich wird die Betrachtung der immun-histochemischen Färbung des Nierengewebes den Nachweis von entstandenem ONOO˙ erbringen. Die reduzierte NO-Konzentration in der 32°C-Gruppe zum MZP 3 lässt aber vermuten, dass in dieser Gruppe der nitrosative Stress weniger ausgeprägt war.

4.4.3 Nitrotyrosin

Mit Hilfe von 3-Nitrotyrosin kann man die Bildung von Peroxynitrit detektieren, da dieses den Phenolring von Tyrosin nitriert und dann intra- und extrazellulär, an Proteine gebunden, vorliegt. Es handelt sich also um einen Nachweis von nitrosativem Stress der durch die Bildung von ONOO˙ verursacht wird.
Die Ergebnisse für die 32°C- und 35°C-Gruppe waren hinsichtlich der positiv gefärbten Fläche und Intensität deutlich niedriger als in der 38°C-Gruppe. Die 32°C-Gruppe erreichte hierbei Ergebnisse, die bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von <0,05 mit p=0,075 für die Fläche und p=0,076 für die Intensität der Färbung nur knapp statistische Signifikanz verfehlten. In Analogie zur erniedrigten NO-Konzentration zum MZP 3 in der 32°C-Gruppe konnte hier zum Versuchsende verminderte Nitrotyrolisation nachgewiesen werden. Im Vergleich mit den anderen Versuchsgruppen wurde in der 32°C-Gruppe also weniger ONOO˙ aus NO unter Sauerstoffradikalbelastung gebildet.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse für die Parameter des nitrosativen Stresses einen Vorteil für die hypothermen Gruppen, der sich am deutlichsten für die 32°C-Gruppe bei einer reduzierten NO-Konzentration zum MZP 3 und reduziertem Nachweis von Nitrotyrosin im Nierengewebe darstellte, wobei hier nur knapp statistische Signifikanz verfehlt wurde.

4.5 Oxidativer Stress

Die Betrachtung der Parameter des oxidativen Stresses soll zusätzlich zu den zuvor besprochenen Ergebnissen Aufschluss über die Belastung durch ROS geben. Mit zunehmender Produktion von ROS wird die Membranintegrität der Mitochondrien zerstört, freigesetzte Radikale wandern in den Zellkern und führen dort zu DNA-Modifikationen. Da Mitochondrien den Zellkern umgeben, wird der

Transfer von ROS zur DNA begünstigt (Collins et al. 1993, Kasai 1997). Zu den möglichen DNA-Reaktions- und Folgeprodukten, die durch ROS verursacht werden, gehören DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche und Basenmodifikationen, ausgelöst vor allem durch die Bildung von 8-Hydroxyguanin (Collins et al. 1996), die durch den Comet Assay beurteilt wurden.
Zum Nachweis der antioxidativen Schutzmechanismen gehört neben Gluthation die Induktion der HO-1, die innerhalb dieser Studie quantitativ mittels Western Blot bestimmt wurde. Deren Induktion durch inflammatorische Zytokine und die allgemeine Entzündungslage wurden durch die Bestimmung von NFκB und IκBα beurteilt (Rizzardini et al. 1993). Zusätzlich wurde das Vorliegen von ROS durch den Nachweis der Lipidperoxidation durch 8-Isoprostan nachgewiesen.

4.5.1 8-Isoprostan

Es handelt sich hierbei um eine prostaglandinähnliche Verbindung, die durch Peroxidation von Arachidonsäure durch freie Radikale entsteht und deren Bestimmung als zuverlässiger Marker des oxidativen Stresses gilt (Basu et al. 1998, Basu et al. 2001, Sakamoco et al. 2002). Bei Schockzuständen wurde die 8-Isoprostan Bestimmung nicht nur als Korrelat zur angestiegenen Konzentration von freien Radikalen beschrieben, sondern diente sogar als Prognosefaktor für das Outcome (Mishra et al. 2005). Als Limitation dieser Messung sind eventuelle Kreuzreaktionen des hier verwendeten Immunoassay Kits mit Prostaglandin $F_{2\alpha}$ aufgrund struktureller Verwandtschaft zu nennen (Bessard et al. 2001).
In unserer Studie erreichten alle Versuchsgruppen zum MZP 3 und 4 signifikant höhere Isoprostankonzentrationen als zum jeweiligen Ausgangspunkt. Die 32°C-Gruppe zeigte den höchsten Anstieg der Messergebnisse, die auch gegenüber der Kontrollgruppe zum Versuchsende (MZP 3+4) signifikant erhöht waren. Diese Tatsache könnte durch eine verlängerte Persistenz dieses Markers durch Hypothermie verursacht worden sein, da ähnliche Effekte bereits durch Fairchild et al. in der Messung von inflammatorischen Parametern beschrieben wurden (Fairchild et al. 2004, 2005). Obwohl die Ergebnisse der 32°C-Gruppe in dieser Messung zu den letzten zwei Messzeitpunkten auf erhöhten oxidativen Stress durch Radikale hinweisen, wurde wie bereits geschildert weniger $ONOO^{\bullet}$ gebildet. Dies könnte auf die erniedrigte NO-Konzentration zum MZP 3 zurückgeführt werden, denn sowohl die 35°C- als auch die 38°C-Gruppe zeigten zu den gleichen

Messzeitpunkten deutlich niedrigere 8-Isoprostan-Werte, dafür aber höhere NO-Konzentrationen und erhöhten Nachweis von $ONOO^{\cdot}$ in der Nitrotyrosinfärbung.

4.5.2 HO-1

Die HO-1 ist eine durch oxidativen Stress induzierbare Isoform der Hämoxygenasen (Maines 1997), die ubiquitär im Organismus vorkommt. Ob HO-1 überwiegend protektive oder deletäre Mechanismen beeinflusst, bleibt bislang umstritten. Mehrere Studiengruppen zeigten, dass eine vermehrte Induktion oder sogar Überexprimierung der HO-1 einen Schutz vor prooxidativen Substanzen darstellt (Choi et al. 1996, Motterlini et al. 1996). Kohlenmonoxid, ein Metabolit des HO-1 Stoffwechsels, hemmt proinflammatorische Zytokine und zeigt so anti-inflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften (Otterbein et al. 2000, Sass et al. 2003). Im Gegensatz hierzu tritt CO aber auch in Konkurrenz mit Sauerstoff um die Bindung an Cytochrom P450, Myoglobin, Hämoglobin und Komplex IV der Atmungskette, dessen Hemmung zur erhöhten Bildung von ROS führt (Miro et al. 2004, Weaver 2009).

In der quantitativen Bestimmung der HO-1 wurden in den kalten Gruppen gegenüber der normothermen Gruppe signifikant niedrigere Ergebnisse erzielt. Es ist anzunehmen, dass es in der 32°C- und 35°C- Gruppe in Adaptation an den anaeroben Stoffwechsel zu verminderter Freisetzung der HO-1 kam.

4.5.3 NFκB und IκBα

NFκB, ein Transkriptionsfaktor, der im Ruhezustand als Dimer mit der inhibitorischen Einheit IκBα im Zytoplasma vorliegt, spielt eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Entzündungen und Zelltod, und wird durch ROS aktiviert. Diese Aktivierung führt zur Phosphorylierung von IκBα, das anschließend ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut wird. Das so freigesetzte NFκB kann in den Nukleus translozieren, wo es an die entsprechende Konsensussequenz der DNA bindet und die Expression der NFκB regulierten Gene initiiert (Mattson et al. 2006). Zu diesen Genprodukten gehören die anti- und pro-apoptotischen Mediatoren Bcl-2 und Bcl-xl sowie die HO-1 (Bhakar et al. 2002, Middleton et al. 2000). NFκB zeigt durch Genaktivierung pro-inflammatorische und zum Teil antiapoptotische Wirkung (Barkett et al. 1999, Kaltschmidt et al. 2005).

Für die Bestimmung von NFκB aus Nierengewebe zeigte keine der Versuchsgruppen signifikante Ergebnisse, die Werte befanden sich alle auf ähnlichem Niveau. In der Bestimmung von IκBα war eine signifikante Erhöhung der hypothermen Gruppen, vor allem der 32°C-Gruppe gegenüber der 38°C-Kontrollgruppe zu verzeichnen. Aufgrund der vorher beschriebenen biochemischen Gegebenheiten, würde man erwarten, dass ähnliche Mengen NFκB und IκBα in den Versuchsgruppen zu messen sind. Allerdings können Zellen durch zusätzlich synthetisiertes IκBα das freigesetzte NFκB im Zellkern wieder binden und dessen Bindung an die DNA verhindern (Arenzana-Seisdedos et al. 1995). Trotz dieses Mechanismus wurde in unserer Bestimmung nur aktiviertes NFκB nachgewiesen, wodurch eine direkte Beziehung der Ergebnisse der beiden Monomere nicht zulässig ist. Darüber hinaus sind die durch NFκB vermittelten Signalwege so vielfältig, dass eine eindeutige Interpretation dieses Parameters in der derzeitigen Literatur kontrovers diskutiert wird.

4.5.4 Der Comet Assay zum Nachweis von DNA-Schäden in vivo

Da ROS und $ONOO^{\cdot}$ zu DNA-Strangbruchschädigungen führen, wurden diese im Comet Assay bestimmt. Dieses Verfahren ist als sensitiver Test für Einzel- wie auch Doppelstrangbrüche in eukaryontischen Zellen bekannt. Er wird seit geraumer Zeit in der Messung von Genotoxizität und Grundlagenforschung von DNA-Schädigungen eingesetzt. In der hier verwendeten alkalischen Version des Comet Assays können sowohl DNA-Strangbrüche als auch alkalilabile DNA-Modifikationen detektiert werden. Diese werden durch reaktive Spezies ausgelöst und in dieser Methode in Strangbrüche überführt. Alle aufgetretenen Strangbrüche werden als gesteigerte DNA-Migration detektiert und als Tailmoment hinsichtlich ihrer Intensität und Größe ausgewertet (Speit et al. 1999). Die untersuchten Zellen im Blut umfassen hauptsächlich Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten. Da es sich bei dieser Methode um eine Einzelzellgelelektrophorese handelt, muss in der Auswertung zwischen Zellen differenziert werden, die durch das Experiment geschädigt wurden, und Zellen die schon vor Beginn des Versuchs apoptotisch waren. Diese Differenzierung ist anderen Forschungsgruppen bereits erfolgreich gelungen (Olive et al. 1995). Die für Apoptosegeschehen charakteristische Fragmentierung der DNA bietet im Comet Assay eine charakteristische Morphologie. Die Zellkerne sind gegenüber den zu messenden Zellen nicht glatt

begrenzt. Zum Teil kam es auf Objektträgern zur grauen Anfärbung des gesamten Hintergrundes, was vermutlich durch Eigenschaften der Agarose oder in den Nierenpräparaten durch die homogenisierten Reste des Nierenparenchyms zu erklären ist. Um falsche Messergebnisse zu vermeiden, wurden deswegen nur Zellen ausgewertet, die sich deutlich gegen einen schwarzen Hintergrund abgrenzen ließen. In den Nierenpräparaten kam es fast ausschließlich zu grauem Hintergrund, weswegen die Messergebnisse nur bedingt aussagekräftig sind. Im Rahmen einer vollständigen Lyse des Parenchyms vor dem Auftragen auf die Objektträger wäre dieser Zustand möglicherweise zu verbessern.

Die Bewertung der Ein- und Ausschlusskriterien der einzelnen Kometenschweife kann sich der Subjektivität des Betrachters nicht entziehen. Deswegen erfolgte die vollständige Auswertung durch eine Person, die gegenüber der Gruppenzuteilung der Tiere verblindet war. Verschiedene Personen würden nie zu identischen Messergebnissen kommen, deswegen sind die Ergebnisse hinsichtlich der Tendenz über den Verlauf mit anderen Gruppen vergleichbar, nicht aber in der tatsächlichen Messgröße des Tailmoments.

Innerhalb aller Versuchsgruppen war ein Anstieg der Tailmoments zum Versuchsende gegenüber dem Ausgangswert zu verzeichnen, der für die 35°C-Gruppe Signifikanz erreichte. Vier Stunden nach Einleitung des hämorrhagischen Schocks zeigte die 32°C-Gruppe im Vergleich mit den anderen Gruppen zum selben MZP die niedrigsten gemessenen Tailmoments. Die 32°C-Gruppe zeigte zum MZP 2 sogar niedrigere Tailmoment-Werte in Bezug auf den eigenen Ausgangswert.

Da der gemessene Tailmoment-Wert mit der Kumulation von DNA-Strangbrüchen ansteigt, wurden in der 32°C-Gruppe die wenigsten Strangbrüche zum MZP 2 verzeichnet. Die signifikant ansteigenden Tailmoments in der 35°C-Gruppe und damit gehäuften DNA-Strangbrüche könnten im Verlauf durch Reparaturenzyme behoben werden, allerdings benötigen diese Enzyme NAD^+, was einen zusätzlichen Verbrauch von Energielieferanten bedeutet und im Schockgeschehen wahrscheinlich zu einer negativen Energiebilanz der Zelle und deren Untergang führen würde (Pacher et al. 2007, Seija et al. 2012).

In Betrachtung des Nierengewebes konnten keine verwertbaren Ergebnisse generiert werden, da zu viele Störfaktoren, wie inhomogener Hintergrund und unklare Abgrenzung zwischen den einzelnen Zellen vorlagen.

4.6 Schlussfolgerung

Die Anwendung einer therapeutischen Hypothermie im hämorrhagischen Schock wird bislang kontrovers diskutiert. Obwohl verschiedene Studiengruppen bereits versuchten die Ischämiezeit vitaler Organe durch Hypothermie zu verlängern und somit die Versorgung eines hämorrhagischen Patienten zu optimieren, lassen sich bisher gegensätzliche Ergebnisse in der Literatur finden.

Während Alam et al. protektive Effekte einer kontrollierten Hypothermie beschrieben, kam es in anderen Studiengruppen zu ausgeprägter Azidose und Hypokoagulabilität (Alam et al. 2004, Krause et al. 2000, Martini et al. 2008, Watts et al. 1998). In den genannten Studien wurden Tiere zum Teil durch gekühlte Infusionen oder durch das Auflegen von Kühlkompressen auf die gewünschte Temperatur eingestellt. Für die angestrebten Temperaturen wählten einige Studiengruppen eine milde bis moderate Hypothermie, andere strebten eine schwere Hypothermie an. Aufgrund des absinkenden Herzminutenvolumens, der Sauerstofftransportkapazität und der Beeinträchtigung der Koagulation sollte eine Hypothermie jedoch nicht kälter als 32°C gewählt werden.

Um die Einflüsse einer therapeutischen Hypothermie auf den Organismus während eines hämorrhagischen Schocks zu untersuchen wurde in unserem Labor ein Modell entwickelt, das eine exakte Steuerung der Körperkerntemperatur über einen Ballonkatheter ermöglicht. Außerdem wurden die Versuchstiere per Randomisation einer milden oder moderaten Hypothermie unterzogen. Bereits erwähnte Störfaktoren der oben genannten Studien konnten hierdurch ausgeschlossen werden.

In einer vorausgegangenen Studie unseres Labors wurde versucht durch die Gabe von H_2S einen hypometabolischen Zustand im hämorrhagischen Schock herbeizuführen, von dem man sich mehr Zeit für die Behandlung des Schocks und protektive Effekte auf vitale Organe erhoffte (Bracht et al. Publikation in Vorbereitung). Eine begleitende, durch H_2S induzierte, Hypothermie zeigte reduzierte Zytokinkonzentrationen und auch insgesamt konnten Organ protektive Effekte beobachtet werden. Um zu differenzieren ob eine therapeutische

Hypothermie oder die Gabe von H_2S Organ protektiv wirkt, wurde die hier vorliegende Studie angeschlossen.

Besonders in der Schockphase konnten wir benefizielle Effekte einer therapeutischen Hypothermie bei 32°C zeigen. Die hier im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen erniedrigte Laktatkonzentration ging mit vermindertem nitrosativen Stress in der 32°C-Gruppe einher. In Betracht der Nierenhistologie konnte sogar nach der Wiedererwärmung, im Rahmen einer anderen Doktorarbeit aus dieser Studie und der hier verwendeten Nitrotyrosinfärbung weniger Belastung durch Radikale nachgewiesen werden. Auch der Comet Assay als Nachweis von DNA-Strangbrüchen zeigte weniger DNA-Schädigung für die 32°C-Gruppe.

Obwohl innerhalb dieser Studie protektive Effekte einer therapeutischen Hypothermie gezeigt werden konnten, bleibt zu beachten, dass in diesem Modell die Einstellung der gewünschten Körpertemperatur vor dem Schockereignis vorgenommen wurde. Für den klinischen Alltag ist diese Art der Behandlung nicht anwendbar, deswegen soll in einer Folgestudie nun untersucht werden, ob die therapeutische Hypothermie auch unter Einleitung nach dem hämorrhagischen Schock verminderte Belastung durch oxidativen und nitrosativen Stress zeigt und Organ protektive Effekte beobachtet werden können.

5 Zusammenfassung

Unsere Studie sollte Aufschluss darüber geben, ob eine moderate Hypothermie zu weniger oxidativen und nitrosativem Stress und damit zu weniger irreversibler Organschädigungen im hämorrhagischen Schock beim Schwein führt. Dazu führten wir ein Modell des hämorrhagischen Schocks in zwei verschiedenen prophylaktischen Hypothermie-Therapiegruppen (32°C und 35°C) und einer 38°C warmen Kontrollgruppe durch.

Der hämorrhagische Schock stellt einen häufigen und schwer therapierbaren Zustand dar, bei dem es zu mangelhafter Durchblutung vitaler Organe, hoher Radikallast und darüber hinaus Bildung von hoch potenten Radikalen zu Multiorganversagen kommt. In der Kardiochirurgie wird bereits seit vielen Jahren versucht die Ischämiezeit des Herzmuskels durch das Absenken der Körpertemperatur zu verlängern. Verschiedene Studiengruppen versuchten diese protektiven Effekte auch beim hämorrhagischen Schock zu erzielen, allerdings wurde die Kühlung entweder durch Kanülierung der Aorta oder extrakorporal mit ungenügender Steuerbarkeit der Temperatur durchgeführt. In unserer Studie wurde eine kontinuierliche, exakte Beeinflussung der Körperkerntemperatur durch einen Ballonkatheter in der Vena jugularis ermöglicht.

Um die Radikallast nachzuweisen bestimmten wir als Parameter für nitrosativen Stress die Konzentration der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase im Nierengewebe durch Western Blot sowie die Nitratkonzentration im Blut. Außerdem erfolgte eine immun-histochemische Anfärbung von Nitrotyrosin im Nierengewebe. Eine Anhäufung von Nitrat, das durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase synthetisiert wird, kann zu erhöhter Formation von Peroxynitrit führen, das über Interaktion mit verschiedenen Organellen und Metaboliten die Apoptose induzieren kann und als Nitrotyrosin nachweisbar ist.

In der Blutgasanalyse zeigten die 35°C- und 38°C-Gruppe vier Stunden nach hämorrhagischem Schock eine Laktatazidose, die in der 32°C-Gruppe signifikant geringer ausgeprägt war. In der Nitratmessung aus Blutproben konnten für denselben Messzeitpunkt, sowie 12 Stunden nach Reperfusion erniedrigte Werte für die 32°C-Gruppe gegenüber den anderen Versuchsgruppen verzeichnet werden. Eine verminderte Belastung durch nitrosativen Stress, der durch die Bildung von Peroxynitrit verursacht wird, wurde in der Nitrotyrosinfärbung des

Nierengewebes zum Versuchsende für die hypothermen Gruppen beobachtet, wobei die Ergebnisse für die 32°C-Gruppe nur knapp statistische Signifikanz verfehlten.

Um den oxidativen Stress zu messen bestimmten wir 8-Isoprostan, Hämoxygenase-1, nuclear-factor-κB (NFκB), Inhibitor-κBα (IκBα) und den Comet Assay. Sauerstoffradikale führen zur Oxidation von Proteinen, Lipiden und zur DNA-Strangbruchbildung. Die 8-Isoprostankonzentration des Blutes, als Marker der Lipidperoxidation, zeigte für die 35°C- und 38°C-Gruppe ähnliche, niedrige Werte. Die 32°C-Gruppe war gegenüber der Kontrollgruppe stark erhöht, was möglicherweise eine protrahierte Persistenz dieses Markers als Folge der Hypothermie bedeutet. Die Hämoxygenase-1, ein Stressprotein, dem in der Literatur sowohl protektive als auch deletäre Effekte zugesprochen werden, wurde in den Nierengewebeproben der hypothermen Gruppen signifikant weniger produziert. Sauerstoffradikale führen auch zur verstärkten Freisetzung von NFκB, das sich dazu aus einem Dimer mit IκBα löst. Wir beobachteten keine Unterschiede bezüglich NFκB zwischen den Versuchsgruppen. IκBα war allerdings in den hypothermen Gruppen signifikant erhöht. Die Interpretation dieser beiden Parameter wird in der Literatur kontrovers diskutiert und lässt keine eindeutige Schlussfolgerung zu. Der Comet Assay zur Messung von DNA-Strangbrüchen im Blut zeigte für die 32°C-Gruppe zu allen Messzeitpunkten niedrige Tailmoments, die zum Zeitpunkt vier Stunden nach Schock gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt waren. Insgesamt zeigte die 32°C-Gruppe weniger DNA-Strangbrüche als die 35°C-Gruppe. Es lässt sich annehmen, dass damit weniger Belastung der Energiebilanz durch DNA-Reparaturprozesse für die 32°C-Gruppe bestand.

In der Zusammenschau der hier erhobenen Parameter ergibt sich eine Reduktion der Belastung durch oxidative- und nitrosative Spezies, vor allem in der 32°C-Gruppe, die zusammen mit einer verminderten Laktatazidose vier Stunden nach hämorrhagischem Schock beobachtet wurden.

Obwohl das durchgeführte Studienmodell durch die Einleitung der Hypothermie vor dem hämorrhagischen Schock nicht in den klinischen Alltag überführbar ist, konnten wir im Sinne einer prä-klinischen Studie protektive Effekte einer therapeutischen Hypothermie, besonders bei 32°C, nachweisen.

6 Literaturverzeichnis

1 **Abu-Quare A W, Abou-Donia M B:** Biomarkers of apoptosis: release of cytochrome c, activation of caspase 3, induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, increased 3-nitrotyrosine, and alterations of p53 gene. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 4: 313-332 (2001)

2 **Adams H A, Flemming A, Friedrich L, Ruschulte H:** Taschenatlas Notfallmedizin. *Georg Thieme Verlag,Stuttgart New York,* S.52-60 (2007)

3 **Alam H B, Chen Z, Honma K, Koustova E, Querol R I, Jaskille A, Inocencio R, Ariaban N, Toruno K, Nadel A, Rhee P:** The rate of induction of hypothermic arrest determines the outcome in a Swine model of lethal hemorrhage. *J Trauma* 57: 961-969 (2004)

4 **Alam H B, Chen Z, Li Y, Velmahos G, DeMoya M, Keller C E, Toruno K, Mehrani T, Rhee P, Spaniolas K:** Profound hyothermia is superior to ultraprofound hypothermia in imrpoving survival in a swine model of lethal injuries. *Surgery* 140: 307-314 (2006)

5 **Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez M S, Bachelerie F, Thomas D, Hay R T:** Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. Mol Cell Biol 15: 2689-2696 (1995)

6 **Baker R C, Armstrong M A, Young I S, McClean E, O'Rourke D, Campbell F C, D'Sa A A, McBride W T:** Methylprednisolone increases urinary nitrate concentrations and reduces subclinical renal injury during infrarenal aortic. *Ann Surg* 244: 821-826 (2006)

7 **Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D:** Epidemiology of the severly injured patient. A prospective assessment of preclinical and clinical management. AG Polytrauma of DGU. *Unfallchirurg* 103: 355-363 (2000)

8 **Barkett M, Gilmore T D:** Control of apoptosis by Rel/NFκB transcription factors. *Oncogene* 18: 6910-6924 (1999)

9 **Basu S, Eriksson M:** Oxidative injury and survival during endotoxemia. *FEBS Lett* 438: 159-160 (1998)

10 **Basu S, Hellberg A, Ulus A T, Westman J, Karacagil S:** Biomarkers of free radical injury during spinal cord ischemia. *FEBS Lett* 508: 36-38 (2001)

11 **Bessard J, Cracowski J L, Stanke-Labesque F, Bessard G:** Determination of isoprostaglandine F2alpha type III in human urine by gas chromatography-electronic impact mass spectrometry. Comparison with enzyme immunoassay. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 754: 333-343 (2001)

12 **Bhakar A L, Tannis L L, Zeindler C, Russo M P, Jobin C, Park D S, MacPherson S, Barker P A:** Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neuroscience* 22: 8466-8475 (2002)

13 **Blackstone E, Morrison M, Roth M B:** H2S induces a suspended animation-like state in mice. *Science* 308: 518 (2005)

14 **Blackstone E, Simon F, Giudici R, Duy C N, Schelzig H, Öter S, Gröger M, Wachter U, Vogt J, Speit G, Szabó C, Radermacher P, Calzia E:** Hemodynamic and metabolic effects of hydrogen sulfide during porcine ischemia/reperfusion injury. *Shock* 30: 359-364 (2008)

15 **Block-Damti A, Bashan N:** Proposed Mechanism for the Induction of Insulin Resistance by Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* 7: 1553-1567 (2005)

16 **Bonkovsky H L, Ponka P, Bacon B R, Drysdale J, Grace N D, Tavill A S:** An update on iron metabolism: summary of the Fifth International Conference on Disorders of Iron Metabolism. *Hepatology*. 24: 718-729 (1996)

17 **Bouchier-Hayes L, Lartigue L, Newmeyer D D:** Mitochondria: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115: 2640-2647 (2005)

18 **Bracht H, Scheuerle A, Gröger M, Hauser B, Matallo J, McCook O, Seifritz A, Wachter U, Vogt J A, Asfar P, Matejovic M, Möller P, Calzia E, Szabó C, Stahl W, Hoppe K, Stahl B, Lampl L, Georgieff M, Wagner F, Radermacher P, Simon F:** Effects of intravenous sulfide during resuscitated porcine hemorrhagic shock. *Critical Care Magazine (Publikation in Vorbereitung).*

19 **Bradbury D A, Simmons T D, Slater K J, Crouch S P M:** Measurement of the ADP:ATP ration in human leukaemic cell lines can be used as an

indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J Immunol Methods* 240:79-92 (2000)

20 **Brown, G C:** Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1411: 351-369 (1999)

21 **Brown G C, Borutaite V:** Nitric oxide, cytochrome c and mitochondria. *Biochem Soc Symp* 66: 17-25 (1999)

22 **Burlinson B, Tice R R, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab S Y, Collins A R, Escobar P, Honma M, Kumaravel T S, Nakajima M, Sasaki Y F, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A:** In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: results of the in vivo Comet Assay workgroup. *Mutat Res* 627: 31-35 (2007)

23 **Chen J, Jin K L, Chen M Z, Pei W, Kawaguchi K, Greenberg D A, Simon R P:** Early detection of DNA breaks in the brain after transient focal ischemia: Implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J Neurochem* 69: 232-245 (1997)

24 **Chen Z, Chen H, Rhee P,Koustova E, Ayuste EC, Honma K, Nadel A, Alam H B:** Induction of profound hypothermia modulates the immune/inflammatory response in a swine model of lethal hemorrhage. *Resuscitation* 66: 209-216 (2005)

25 **Choi A M, Alam J:** Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 9-19 (1996)

26 **Collins A R, Dusinska M, Gedik C M, Stetina R:** Oxidative Damage to DNA: Do we have a reliable Biomarker. *Environmental Health Perspectives* 104: 465-469 (1996)

27 **Collins A R, Duthie S J, Dobson V L:** Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14: 1733-1735 (1993)

28 **Collins M A, Neish A S, Witley M Z, Thanos D, Maniatis T:** Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- KB and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* 9: 899-909 (1995)

29 **Crow J P, Beckman J S:** Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: Footprints of peroxynitrite in vivo. Nitric Oxide-Biochemistry, Molecular Biology and Therapeutic Implications. *Adv Pharmacol 34:* 17-43 (1995)

30 **Cuzzocrea S, Riley D P, Caputi A P, Salvemini D:** Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53: 135-159 (2001)

31 **Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A:** Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry* 52: 601-623 (2006)

32 **Deitch, E A:** Animal models of spesis and shock: a review and lessons learned. *Shock* 9: 1-11(1998)

33 **Didier M, Bursztajn S, Adamec E, Passani L, Nixon R A, Coyle J T, Wie J Y, Berman S A:** DNA strand breaks induced by sustained glutamate excitotoxicity in primary neuronal cultures. *J. Neuroscience* 16: 2238-2250 (1996)

34 **Dodds, J W:** The pig model for biochemical research. *Fed. Proc* 41: 247-256 (1982)

35 **Elmadfa I, Leitzmann C:** Ernährung des Menschen. *Eugen Ulmer, Stuttgart,* S. 330-333 (2004)

36 **Fairbairn D W, Walburger D K, Fairbairn J J, O'Neill K L:** Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* 18: 407-416 (1996)

37 **Fairchild K D, Singh I S, Carter H C, Hester L, Hasday J D:** Hypothermia enhances phosphorylation of I {kappa} B kinase and prolongs nuclear localization of NF-{kappa} B in lipopolysaccharide-activated macrophages. Am J Physiol Cell Physiol 289: 1114-1121(2005)

38 **Fairchild K D, Singh I S, Patel S, Drysdale B E, Viscardi R M, Hester L, Lazusky H M, Hasday J D:** Hypothermia prolongs activation of NF-{kappa}B and augments generation of inflammatory cytokines.Am J Physiol Cell Physiol 287: 422-431(2004)

39 **Feihl F, Waeber B, Liaudet L:** Is nitric oxide overproduction the target of choice in management of septic shock? *Pharmacol Ther* 91: 179-213 (2001)

40 **Fox J L, Vu E N, Doyle-Waters M, Brubacher J R, Abu-Laban R, Hu Z:** Prophylactic hypothermia for traumatic brain injury: a quantitative systematic review. *CJEM* 12: 355-364 (2010)

41 **Godin D V, Garnett M E:** Species-related variations in tissue antioxidant status -- I. Differences in antioxidant enzyme profiles. *Comp. Biochem. Physiol* 103: 737-742 (1992)

42 **Godin D V, Garnett M E:** Species-related variations in tissue antioxidant status—II. Differneces in susceptibility to oxidative challenge. *Comp. Biochem. Physiol* 103: 743-748 (1992)

43 **Gröger M:** Einfluss einer Beatmung mit 100% Sauerstoff auf die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen und die Parameter des oxidativen Stress im Langzeitmodell des septischen Schocks am Schwein. Med. Dissertation, Universität Ulm (2008)

44 **Halliwell B, Gutteridge J:** Free radicals in biology and medcine. *Oxford University Press, New York.* S 19-22 (2007).

45 **Halliwell, B:** Production of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical by phagocytic cells: A cause of chronic inflammatory disease? *Cell Biol Int Rep* 6: 529-541 (1982)

46 **Hannon J P, Bossone C A, Wade C E:** Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab Anim Sci* 40: 293-298 (1990)

47 **Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice R R:** 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet Assay *Mutagenesis* 18: 45-51 (2003)

48 **Hausladen A, Privalle C T, Keng T, DeAngelo J, Stamler J S:** Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell* 8: 719-729 (1996)

49 **Hellerbrand C, Jobin C, Limuro Y, Licato L, Sartor B, Brenner D A:** Inihibition of NF- ΚΒ in Activated Rat Hepatic Stellate Cells by

Proteasome Inihibitors and IkappaB Super-Repessor. *Hepatology* 27: 1285-1295 (1998)

50 **Herold, G:** Innere Medizin*. Gerd Herold Köln,* S. 300 (2009)

51 **Hogg N, Kalyanaraman B:** Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1411: 378-384 (1999)

52 **Howe B B, Fehn P A, Pensinger R R:** Comparative anatomical studies of the coronary arteries of canine and porcine hearts. *Acta Anat* 71: 13-21(1968)

53 **Hypothermia after cardiac Arrest Study Group:** The Hypothermia after cardiac Arrest Study Group. *N Engl J Med* 346: 549-556 (2002)

54 **Inoue S, Kawanishi S:** Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett* 371: 86-88 (1995)

55 **Johnston, T D, Chen, Y, Reed, R L**: Functional equivalence of hypothermia to specific clotting factor deficiencies. J Trauma 37: 413- 417 (1994)

56 **Josephson B, Gyllensward C:** The development of the protein fractions and of cholesterol concentration in the serum of normal infants and children. *Scand J Clin Lab Invest* 9: 29-38 (1957)

57 **Kaltschmidt B, Widera D, Kaltschmidt C:** Signaling via NFκB in the nervous system. *Biochem Biophys Acta* 1745: 287-299 (2005)

58 **Kasai, H:** Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidatvie stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 387: 147-163 (1997)

59 **Keel M, Trentz O:** Pathophysiology of polytrauma (Review). *Injury, Int J Care Injured* 36: 691-709 (2005)

60 **Keel M, Wanner G A:** Die systematische Traumareaktion. In: Berchtold R, Hamelmann H, Peiper H-J: Chirurgie. *Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München Jena,* S. 85-87 (2006)

61 **Kick J, Hauser B, Bracht H:** Effects of a cantaloupe melon extract/wheat gliadin biopolymer during aortic cross-clamping. *Intensive Care Med* 33: 694-702 (2007)

62 **Koizumi H, Povlishock J T:** Posttraumatic hypothermia in the treatment of axonal damage in an animal model of traumatic axonal injury. *J Neurosurg* 89: 303-309 (1998)

63 **Krause K R, Howells G A, Buhs C L, Hernandez D A:** Hypothermia-induced coagulopathy during hemorrhagic shock/ Discussion. *Am Surg* 66: 348-354 (2000)

64 **Kumar V, Abbas A K:** Robbin's Basic Pathology. 9. Aufl, *Saunders, an imprint of Elsevier Inc.* P*hiladelphia, USA,* S. 365-369 (2012)

65 **Kurata S, Matsumoto M, Tsuji Y, Nakajima H:** Lipopolysaccharide activates transcription of the heme oxygenase gene in mouse M1 cells through oxidative activation of NF-kappa B. *Eur J Biochem* 239:566-571 (1996)

66 **Laemmli, KU:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature* 277: 680-685 (1970)

67 **Lelli J L Jr, Becks L L, Dabrowska M I, Hinshaw D B:** ATP converts necorsis to apoptosis in oxidant-injured endothelial cells. *Free Radical Biology & Medicine* 25: 694-702 (1998)

68 **Liaudet L, Soriano F G, Szabo C:** Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 28: N37-52 (2000)

69 **Liu Y, Ortiz de Montellano P R:** Reaction intermeadiates and single turnover rate constatns fort he oxidation of heme by human heme oxygenase-1. *J Biol Chem* 275: 5297-5307 (2000)

70 **Macarthur H, Westfall T C, Riley D P, Msiko T P, Salvemini D:** Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci* 97: 9753-9758 (2000)

71 **Magder, S:** Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Crit Care* 10: 208-216 (2006)

72 **Maines, D M:** The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554 (1997)

73 **Mandavilli B S, Santos J H, Van Houten B V:** Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res* 509: 127-151 (2002)

74 **Martini, W Z, Cortez, D S, Dubick, M A, Park, M S, Holcomb, J B:** Thrombelastography is better than PT, aPTT, and activated clotting time in

detecting clinically relevant clotting abnormalities after hypothermia, hemorrhagic schock and resuscitation in pigs. J Tauma 65: 535-543 (2008)

75 **Martini W Z, Pusateri A E, Uscilowicz J M, Delgado A V, Holcomb J B:** Independent Contributions of Hypothermia and Acidosis to Coagulopathy in Swine. *J Trauma* 58: 1002-1010 (2005)

76 **Mathrubutham M, Vattem K:** Methods and considerations for quantitative Western blotting using SuperSignal Chemiluminescent Substrates. *Thermo Scientific* Application Note #12, AN0012.1 (2005)

77 **Mattson M P, Meffert M K:** Roles for NFκB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 13: 852-860 (2006)

78 **McCord J M, Stokes S H, Wong K:** Superoxide radical as a phagocyte-produced chemical mediator of inflammation. Advances in Inflammation Research. In: Weissman G, Samuelsson B, Paoletti R (Hrsg) Advances in Inflammation Research, Bd 1, 1. Aufl, *Raven Press New York* S. 273-280 (1979)

79 **McKelvey-Martin V J, Green M H, Schmezer P, Pool-Zobel B L, De Méo M P, Collins A:** The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res* 288: 47-63 (1993)

80 **Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, Hay R T, Davies A M:** Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol* 148: 325-332 (2000)

81 **Mikhail, J:** The trauma triad of death: hypothermia, acidosis, and coagulopathy. *AACN Clin Issues* 10: 85-94 (1999)

82 **Miro O, Alonso JR, Lopez S, Beato A, Casademont J, Cardellach F:** Ex vivo analysis of mitochondrial function in patients attended in an emergency derpartment due to carbon monoxide poisoning. *Med Clin (Barc)* 122: 401-406 (2004)

83 **Mishra V, Baines M, Wenstone R, Shenkin A:** Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients. *Ann Clin Biochem* 42: 269-276 (2005)

84 **Mohiuddin I, Chai H, Lin P H, Lumsden A B, Yao Q, Chen C:** Nitrotyrosine and chlorotyrosine: clinical significance and biological functions in the vascular system. *J Surg Res* 133: 143-149 (2006)

85 **Moncada S, Higgs A:** Mechanism of desease: the L-arginine-nitric oxide pathway. *New England J of Med* 329: 2002-2012 (1993)

86 **Montuschi P, Barnes P J, Roberts L J:** Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 18: 1791-1800 (2004)

87 **Morita T, Perella M A, Lee M E, Kourembanas S:** Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1475-1479 (1995)

88 **Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM:** NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 270: H107-114 (1996)

89 **Nathan C, Xie Q:** Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269: 13725-13728 (1994)

90 **Nelms, E B:** Measuring Apoptosis in Individual Cells with the Comet Assay. *Promega Notes Number* 64*:* 13 (1997)

91 **Olive P L, Banath J P, Durand R E:** Heterogeneity in radiation- induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet assay". *Radiat Res* 122: 86-94 (1990)

92 **Olive P L, Banath J P:** Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. *Int J Radiat Biol* 64: 349-358 (1993)

93 **Olive P L, Banath J P:** Sizing highliy fragmented DNA in individual apototic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Exp Cell Res* 221: 19-26 (1995)

94 **Östling O, Johanson K J:** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298 (1984)

95 **Otterbein L E, Bach F H, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, Davis RJ, Flavell R A, Choi A M:** Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med* 6: 422-428 (2000)

96 **Pacher P, Beckman J S, Liaudet L:** Nitritc Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol Rev* 87: 315-424 (2007)

97 **Palacios-Callender M, Quintero M, Hollis VS, Springett R J, Moncada S:** Enodgenous NO regulates superoxide production at low oxygen concentrations by modifying the redox state of cytochrome c oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7630-7635 (2004)

98 **Palmer R M J, Ashton D S, Moncada S:** Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-666 (1988)

99 **Parkash O, Jonson B, Bos E, Meij S, Hugenholtz P G, Hekman W:** Cardiorespiratory and metabolic effects of profound hypothermia. *Crit Care Med* 6: 340-346 (1978)

100 **Polderman, K H:** Application of therapeutic hypothermia in the intensive care unit. Opportunities and pitfalls of a promising treatment modality-Part 2: Practical aspects and side effects. *Intensive Care Med* 30: 757-769 (2004)

101 **Polderman K H:** Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. Crit Care Med 37: Suppl No.7 (2009)

102 **Rizzardini M, Terao M, Falciani F, Cantoni L:** Cytokine induction of haem oxygenase mRNA in mouse liver: Interleukin 1 transcriptionally activates the haem oxygenase gene. *Biochem J* 290: 343- 347 (1993)

103 **Rothfuss A, Radermacher P, Speit G:** Involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) in the adaptive protection of human lymphocytes after hyperbaric oxygen (HBO) treatment. *Carcinogenesis* 22: 1979-1985 (2001)

104 **Sakamoco H, Corcoran T B, Laffey J G, Shorten G D:** Isoprostanes-markers of ischemia reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol* 19: 550-559 (2002)

105 **Salgo M G, Bermudez E, Squadrito G L, Pryor W A:** DNA damage and oxidation of thiols peroxynitrite causes in rat thymocytes. *Arch Biochem Biophys* 322: 500-505 (1995)

106 **Sass G, Soares M C, Yamashita K, Seyfried S, Zimmermann W H, Eschenhagen T, Kaczmarek E, Ritter T, Volk H D, Tiegs G:** Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent

inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology* 38: 909-918 (2003)

107 Seekamp A M, van Griensven M, Hildebrandt F, Wahlers T., Tscherne H: Adenosine-triphosphate in trauma-related and elective hypothermia. *J trauma* 47: 673-683 (1999)

108 Segers M J, Diephuis J C, Van Kesteren R G, van der Werken C: Hypothermia in trauma patients. *Unfallchirurg* 101: 742-749 (1998)

109 Seija M, Baccino C, Nin N, Sánchez-Rodríguez C, Granados R, Martínez-Caro A F L, Ruíz-Cabello J, de Paula M, Noboa O, Esteban A, Lorente J A: Role of Peroxynitrite in sepsis-induced acute kidney injury in an experimental model of sepsis in rats. *Shock* 38: 403-410 (2012)

110 Shibahara S, Muller R M, Taguchi H: Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J Biol Chem* 262: 12889-12892 (1987)

111 Simon F, Scheuerle A, Calzia E, Bassi G, Oter S, Duv C N, Kick J, Brückner U B, Radermacher P, Schelzig H: Erythropoietin during aortic balloon occlusioninduced ischemia/reperfusion injury. *Crit Care Med* 36: 2143-2150 (2008)

112 Simon F, Scheuerle A, Gröger M, Vcelar B, McCook O, Möller P, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Schelzig H: Comparison of carbamylated erythropoietin-FC fusion protein and recombinant human erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced spinal cord ischemia/reperfusion injury. *Intensive Care Med* 37: 1525-1533 (2011)

113 Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191 (1988)

114 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)

115 Stamler J S, Hausladen A: Oxidative modifications in nitrosative stress. *Nat Struct Biol* 5: 247-249 (1998)

116 Szabó C, Ohshima H: DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects. *Nitric Oxide* 1: 373-385 (1997)

117 **Takahashi S, Takahashi Y, Ito K, Nagano T, Shibahara S, Miura T:** Positive and negative regulation of the human heme oxygenase-1 gene expression in cultured cells. *Biochem Biophys Acta* 1447: 231-235 (1999)

118 **Tebbs R S, Cleaver J E, Pedersen R A, Hartmann A:** Modification of the Comet assay for the detection of DNA strand breaks in extremely small tissue samples. *Mutagenesis* 14: 437-438 (1999)

119 **Tice R R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J C, Sasaki Y F:** Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221 (2000)

120 **Tice R R, Strauss G H:** The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13: 207-214 (1995)

121 **Valeri, CR, MacGregor, H, Cassidy, G, Tinney, R, Pompei, F**: Effects of temperature on bleeding time and clotting time in normal male and female volunteers. Crit Care Med 23: 698- 704 (1995)

122 **Valko M, Leibfritz D, Monocol J, Cronin M, Mazur M, Telser J:** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84 (2007)

123 **Van der Vliet A, O'Neill C, Cross C E, Halliwell B:** Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanin and tyrosine by peroxynitrite. *FEBS Lett* 399: 89-92 (1993)

124 **Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C:** Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 140-141: 113-124 (2003)

125 **Wagner F, Asfar P, Calzia E, Radermacher P, Szabó C:** Bench-to-bedside review: Hydrogen sulfide- the third gaseous transmitter: applications for critical care. *Crit Care* 13: 213 (2009)

126 **Watts, D D, Trask, A, Soeken, K, Perdue, P, Dols, S, Kaufmann, C:** Hypothermic coagulopathy in trauma: effect of varying levels of hypothermia on enzyme speed, platelet function, and fibrinolytic activity. J Trauma 44: 846- 854 (1998)

127 **Weaver, L K:** Clinical practice. Carbon monoxide poisoning. *N Engl J Med* 360: 1217-1225 (2009)

128 **Wiggers, C:** The present status of the shock problem. *Physiol Rev* 22: 74-123 (1942)

129 **Zwacka R M, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt J F:** Ischemia/Reperfusion Injury in the Liver of BALB/c Mice Activates AP-1 and NF ΚB Independently of I ΚB Degradation. *Hepatology* 28: 1022-1030 (1998)

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: zeitlicher Ablauf des Experiments 22
Abbildung 2: Schemazeichnung zum zeitlichen Ablauf des Experiments 22
Abbildung 3: Die Elektrophoresekammer 26
Abbildung 4: Auswertung des Comet Assays 29
Abbildung 5: 8-Isoprostane Bestimmung 34
Abbildung 6: Nitrat- und Nitritmessung 35
Abbildung 7: Schema zum Aufbau des Blottingprozesses 40
Abbildung 8: Beispiel der Nitrotyrosinfärbung des Nierengewebes 49
Abbildung 9: Nitrotyrosinfärbung der Nierengewebeproben (Intensität) 50
Abbildung 10: Nitrotyrosinfärbung der Nierengewebeproben (Fläche) 51
Abbildung 11: Die iNOS Proteinkonzentration im Nierengewebe (Western Blot) . 52
Abbildung 12: Die iNOS-Proteinkonzentration im Nierengewebe 52
Abbildung 13: Die IκBα-Proteinkonzentration im Nierengewebe (Western Blot) .. 53
Abbildung 14: Die IkBa-Proteinkonzentration im Nierengewebe 53
Abbildung 15: Die HO-1 Proteinkonzentration im Nierengewebe (Western Blot) . 54
Abbildung 16: Die Hämoxygenase-1 Proteinkonzentration im Nierengewebe 54
Abbildung 17: Der Electric Mobility Shift Assay (exemplarisch) 55
Abbildung 18: Electric Mobility Shift Assay für NFκB im Nierengewebe. 56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bedeutung freier Radikale und ihrer sekundären Produkte 3
Tabelle 2: Einteilung der Hypothermieformen 8
Tabelle 3: Übersicht der hauptsächlich gemessenen DNA-Schäden 23
Tabelle 4: Körperkerntemperatur der Versuchsgruppen in °C..... 44
Tabelle 5: Hämodynamische Parameter der Versuchsgruppen 46
Tabelle 6: Metabolische Parameter der Versuchsgruppen..... 48
Tabelle 7: Comet Assay des Blutes in Tailmoments 57
Tabelle 8: Comet Assay der Niere in Tailmoments 57
Tabelle 9: Nitratkonzentration in Blutproben vom Schwein 58
Tabelle 10: 8-Isoprostankonzentration in Blutproben vom Schwein..... 58

Danksagung

In erster Linie möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. P. Radermacher danken, der mir diese Dissertation in der Sektion APV ermöglichte. Während der gesamten Versuchszeit betreute er mich sehr umfassend und führte mich in verschiedene OP-Techniken am Schwein ein. Nicht zuletzt möchte ich mich bei ihm für den effizienten Dissertationsverlauf und seine konstruktive Kritik während der gesamten Betreuungszeit bedanken.

An zweiter Stelle danke ich Herrn Prof. M. Huber-Lang für seine Bereitschaft, als zweiter Berichterstatter für diese Dissertation zur Verfügung zu stehen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn O. McCook und Dr. M. Gröger für die geduldigen Instruktionen im Labor, die vielen anregenden Gespräche und die konstruktive Kritik an dieser Arbeit.

Dem gesamten Team der Sektion APV, insbesondere Frau Christa Klein, Frau Tanja Schulz, Frau Andrea Seifritz, Frau Bettina Stahl, Frau Rosemarie Mayer und Herrn Ulrich Wachter spreche ich meinen Dank für die lehrreiche Zusammenarbeit und die freundliche Aufnahme in das Team aus.

Den übrigen Doktoranden meiner Studiengruppe, Frau Karoline Granse und Frau Nicole Strobel, danke ich herzlich für die gegenseitige Hilfe während der Versuche und die Motivation im Schreibprozess der Dissertation. Frau Anne Stelgens stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

An letzter Stelle danke ich meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre moralische Unterstützung und Geduld!

Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt