Universitätsklinikum Ulm
-Klinik für Anästhesiologie-

Leiter: Prof. Dr. med Dr. med. h. c. M. Georgieff

Sektion Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung

Leiter: Prof. Dr. med. Peter Radermacher

Auswirkungen des PARP-1 Inhibitors INO-1001 auf Ischämie-Reperfusionsbedingte Organschädigungen nach thorakalem Aortencrossclamping am Schwein

Dissertation

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

vorgelegt von
Christian Frank Maier
aus Tettnang

2007

gewidmet
meinen lieben Eltern

Ingrid Maier

und

Manfred Maier

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1.Berichterstatter: Prof. Dr. med. Radermacher

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Schelzig

Tag der Promotion: 19.06.08

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1 EINLEITUNG ..... - 1 -

1.1 PROBLEME DER OPERATIVEN BEHANDLUNG DES THORAKALEN AORTENANEURYSMAS ..... - 1 -

1.2 DER ISCHÄMIE-REPERFUSIONSCHADEN AUF ZELLULÄRER EBENE ..... - 3 -

1.3 DIE POLY(ADP-RIBOSYL)IERUNG ..... - 5 -

1.3.1 Die Funktionen der Poly(ADP-Ribosyl)ierung ..... - 6 -

1.3.2 Die Rolle der PARP-1 am Zelltod ..... - 8 -

1.3.3 Das Yin-Yang der PARP-Aktivierung ..... - 10 -

1.4 DIE PARP-INHIBITION UND DAS STUDIENMEDIKAMENT INO-1001 ..... - 12 -

1.5 DER ZELLZYKLUS UND SEINE REGULATION DURCH CYCLIN-ABHÄNGIGE KINASEN ..... - 12 -

1.6 DIE CDK-INHIBITOREN-P21$^{WAF1/CIP1}$ UND P27^{KIP1} ..... - 14 -

2 FRAGESTELLUNG ..... - 15 -

3 MATERIAL UND METHODEN ..... - 17 -

3.1 DER VERSUCHSABLAUF AM GROßTIERMODELL ..... - 17 -

3.1.1 Versuchsaufbau und Präparation der Versuchstiere ..... - 17 -

3.1.2 Anästhesie und Medikation während der Operation ..... - 20 -

3.1.3 Chirurgische Präparation ..... - 21 -

3.1.4 Die Clamping- und Declampingphase ..... - 23 -

3.2 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DER GEWEBEPROBEN ..... - 26 -

3.2.1 Die Vorbereitung der Gewebsbiopsien für die Immunhistochemie ..... - 26 -

3.2.2 Die Haematoxylin-Eosin-Färbung ..... - 26 -

3.2.3 Der Nachweis der CDKI Genexpression p21 und p27 ..... - 27 -

3.2.4 Die TUNEL-Färbung ..... - 31 -

3.2.5 Die Nissl-Färbung ..... - 32 -

3.3 AUSWERTUNG DER GEWEBEPROBEN ..... - 33 -

3.3.1 Die Auswertung der Haematoxylin-Eosin Färbung ..... - 33 -

3.3.2 Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate ..... - 34 -

3.3.3 Die Auswertung der TUNEL-Färbung ..... - 35 -

3.3.4 Die Auswertung der Nissl-Färbung des Rückenmarks ..... - 35 -

3.3.5 Die statistische Auswertung der Ergebnisse ..... - 36 -

4 ERGEBNISSE ..... - 37 -

4.1 DIE ERGEBNISSE DER HAEMATOXYLIN-FÄRBUNG ..... - 37 -

4.2 IMMUNHISTOCHEMISCHE ERGEBNISSE ..... - 41 -

4.2.1 Darm-p21Waf1/Cip1 Expression ..... - 41 -

4.2.2 Niere-p21Waf1/Cip1 Expression ..... - 44 -

4.2.3 Rückenmark-p21Waf1/Cip1 Expression ..... - 47 -

4.2.4 Darm-p27Kip1 Expression ..... - 50 -

4.2.5 Niere-p27Kip1 Expression ..... - 53 -

4.2.6 Rückenmark-p27Kip1 Expression ..... - 56 -

4.3 DIE ERGEBNISSE DER TUNEL-FÄRBUNG ..... - 59 -

4.4 DIE ERGEBNISSE DER NISSL-FÄRBUNG DES RÜCKENMARKS ..... - 63 -

5 DISKUSSION ..... - 67 -

5.1 DAS VERSUCHSTIER UND DER VERSUCHSABLAUF ..... - 68 -

5.2 DIE HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGSMETHODEN ..... - 70 -

5.3 DIE ERGEBNISSE DER HISTOLOGISCHEN UNTERSUCHUNG ..... - 74 -

5.3.1 Dünndarm und Niere ..... - 74 -

5.3.2 Rückenmark ..... - 81 -

5.4 GRENZEN DER STUDIE ..... - 85 -

5.5 KANN INO-1001 FÜR EINE KLINISCHE ANWENDUNG EMPFOHLEN WERDEN? ..... - 86 -

6 ZUSAMMENFASSUNG ..... - 88 -

7 LITERATURVERZEICHNIS ..... - 90 -

8 PUBLIKATION ..... - 104 -

9 ANHANG ..... - 105 -

9.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS ..... - 105 -

9.2 TABELLENVERZEICHNIS ..... - 108 -

10 DANKSAGUNG ..... - 109 -

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
AAA	Abdominelles Aortenaneurysma
Abb.	Abbildung
3-AB	3-Aminobenzamid
ADAM	Aneurysm detection and management – Studie
ADP	Adenosindiphosphat
ADPRT	Gen mit chromosomaler Lokalistion 1q41-q42
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIF	Apoptose induzierender Faktor
5-AIQ	5-Aminoisoquinolinon
Aqua.dest.	aqua destillata
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Base excess
BG	Blutgefäße
BRCT	Breast Cancer Carboxyterminal Motiv
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CDK	Cyclin dependent kinase
CDKI	Cyclin dependent kinase inhibitors
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CIP-1	CDK-interacting protein 1
CO^*	Cardiac output
CO	Kohlenmonoxid
CO_2	Kohlendioxid
Cdc	Cell division cycle
DAB	Diaminobenzidin
dest.	Destilliert

1,5-DIQ	1,5-Dihydroxyisoquinolin
dMAP	Distaler mittlerer arterieller Druck
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxy-Uridin-Triphosphat
EEG	Elektro-Encephalogramm
EIA	Enzyme-linked assay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et. alterii
F	French (Maßeinheit)
FiO_2	Inspiratorische O2 Konzentration
GES	Gesamt
GLOM	Glomeruli
G_0	Gap 0 Phase des Zellzyklus
G_1	Gap 1 Phase des Zellzyklus
G_2	Gap 2 Phase des Zellzyklus
GS	Graue Substanz
h	Stunde
H^+	Wasserstoffion
HE	Haematoxylin-Eosin
HES	Hydroxyethylstärke
H_2O_2	Hydrogenperoxid
HO-1	Hämoxygenase-1
HPLC	High performance liquid chromatography
HZV	Herzzeitvolumen
ICU	Intensive Care Unit
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
I/R	Ischämie/Reperfusion
IU	Internationale Einheit
i.v.	intravenös
K^+	Kalium
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KIP	Kinase Inhibitor Protein
M	Mitose Phase des Zellzyklus
m	männlich
mg	Milligramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MAP_{prox}	Proximaler mittlerer arterieller Druck
MAP_{dist}	Distaler mittlerer arterieller Druck
Mg	Magnesium
min	Minute
µM	Mikromolar
MPAP	Mittlerer pulmonalarterieller Druck
MRC	Multiprotein-Replikations-Komplex
mval	millival
MZP	Messzeitpunkt
n	Anzahl der Versuchstiere
NaCl	Natriumchlorid
NAD^+	Nicotinamidadenindinucleotid
NF-κB	Nuclear factor B
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
O_2	Sauerstoff
O_2^-	Superoxidanion
OH^+	Hydroxylradikale
$ONNO^-$	Peroxynitrit
p	p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PAOP	Pulmonalarterieller Okklusionsdruck
PARG	Poly(ADP-Ribose)Glucohydrolase
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase

pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate buffered saline
pCO_2	Partialdruck Kohlendioxid
PCWP	Pulmonary capillary wedge pressure
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDR	Plasma disappearance rate
PEEP	Positive end-expiratory pressure
pH	Maß für die saure bzw. basische Wirkung einer wässrigen Lösung
pMAP	Proximaler mittlerer arterieller Druck
PMN	Polymorph nuclear leukozyte
pO_2	Partialdruck Sauerstoff
pRb	Phosphoryliertes Retinoblastom-Protein
$p21^{waf1/cip1}$	Zellzyklusregulatorisches Protein 21-kDalton
$p27^{kip1}$	Zellzyklusregulatorisches Protein 27-kDalton
p53	Zellzyklusregulatorisches Protein 53-kDalton
S	Synthese Phase des Zellzyklus
SD	Standardabweichung
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SK-N-MC	humane Neuroblastomzellinie
SpO_2	Sauerstoffsättigung im Blut
TDT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TNF_{alpha}	Tumornekrosefaktor alpha
TUNEL	TdT-mediated nick-end labelling technique
TxA_2	Thromboxan A_2
U.K.	United Kingdom
U-Test	Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
V.	Vena
VO_{2sys}	Systemische O_2-Aufnahme
ZVD	Zentraler Venendruck

1 EINLEITUNG

1.1 Probleme der operativen Behandlung des thorakalen Aortenaneurysmas

Das thorakale Aortenaneurysma oder die Aortendissektion, welche durch Risikofaktoren wie Hypertonie, Nikotinkonsum, Hyperlipoproteinämie, Arteriosklerose aber auch durch ein fortgeschrittenes Lebensalter entstehen können, führen nicht selten zu einer lebensbedrohlichen Blutung durch ein Rupturieren der Gefäßwandaussackung. Bei asymptomatischen Aneurysmen muss eine Abwägung zwischen dem Behandlungsrisiko und einer Rupturgefahr stattfinden.

Das Risiko einer Spontanruptur wird dabei vor allem durch den maximalen Aneurysmadurchmesser bestimmt. Die *U.K. Small Aneurysma Trial* hat gezeigt, dass 76% aller rupturierten Aortenaneurysmen einen maximalen Durchmesser von 5 cm und mehr aufweisen. Ein jährliches Rupturrisiko von 1% fand sich bei einem maximalen Durchmesser von 3,5 bis 5 cm. In einem Beobachtungszeitraum von 3 Jahren lag das jährliche Rupturrisiko hier bei 2,2% [9]. Andere Untersuchungen sprechen von Rupturrisiken von bis zu 20,5% innerhalb von 5 Jahren [127;151]. Große Aneurysmen mit einem Durchmesser von mehr als 7 cm rupturieren dabei zwei- bis dreimal häufiger als kleinere Aneurysmen [109].

Eine akute Dissektion eines Aortenaneurysmas ist mit einer Mortalität von über 50% behaftet [18;94]. Stellt sich ein Aortenaneurysma symptomatisch dar, besteht normalerweise eine Behandlungsindikation.

Zur Prävention einer Ruptur und anderer Komplikationen wird im Allgemeinen eine operative Versorgung des Aortenaneurysmas angestrebt. Diese wird in einigen Fällen, abhängig von der Lokalisation der Aneurysmata, von der Dringlichkeit des Eingriffs und vom Alter des Patienten über eine stentgestützte Prothese (Stent), welche über die Leistenarterie in die Aorta eingebracht wird und somit das Aneurysma ausschalten kann

[125], vorgenommen. In den meisten Fällen ist aber eine operative Resektion des Aneurysmas bzw. der Dissektion notwendig. Während eines operativen Eingriffs wird die Aorta unterhalb und oberhalb der Gefäßläsion abgeklemmt und somit der Blutfluss durch das betroffene Gefäßsegment vorübergehend unterbrochen [108]. Die Aorta wird dann eröffnet und eine Prothese in die Gefäßwand eingenäht.

Die Patienten sind dabei perioperativ durch erhebliche Änderungen der hämodynamischen Verhältnisse gefährdet. Das Aortenclamping führt zu einem fulminanten Anstieg des Blutdrucks, wobei die Auswurfleistung des Herzens ohne pharmakologische Blutdrucksenkung schnell um bis zu 40% gesteigert wird. Aus dieser Überbelastung resultiert nicht selten eine Überdehnung des linken Ventrikels mit einer daraus folgenden Minderdurchblutung der innersten Herzmuskelanteile, einer Mitralklappeninsuffizienz, einem Lungenödem bis hin zu einem Kreislaufstillstand [157]. Während des Clampings kommt es durch eine Minderversorgung der Organe unterhalb des Abklemmens häufig zu einer Ischämie der Leber, der Milz, der Nieren, des Darms wie auch des Rückenmarks. Diese Ischämie führt desöfteren zu einer Insuffizienz der minderdurchbluteten Organe. Beim Rückenmark beispielsweise zu gefürchteten neurologischen Defiziten bis hin zu einer Paraplegie. Ein Verlust der Organfunktion hängt dabei vor allem von der Abklemmzeit ab. Mehr als 30 Minuten Abklemmzeit erhöhen exponentiell das Auftreten einer Paraplegie als Folge einer Rückenmarksischämie [52;123;156]. Bisher wurden unter anderem die Ischämie während der Klemmphase, die Ödembildung durch einen Liquordruckanstieg während der Klemmphase und der Reperfusionsschaden nach dem Öffnen der Aortenklemmen beschrieben [7;165]. Bis zu 20% der Patienten leiden an nachfolgenden neurologischen Ausfällen durch die spinale Ischämie. Auch heute noch wird dieses Szenario im Deutschen Ärzteblatt als das „Dilemma der spinalen Ischämie“ beschrieben [39].

1.2 Der Ischämie-Reperfusionschaden auf zellulärer Ebene

Auf zellulärer Ebene bedeutet eine Ischämie nicht selten ein Verlust von ATP (Adenosintriphosphat), eine Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts, wie auch eine Funktionseinschränkung ATP-abhängiger Ionenpumpen. Durch veränderte intrazelluläre Elektolytkonzentrationen, vor allem durch das stark ansteigende Calcium, können dabei eine intrazelluläre Azidose sowie eine Zellschwellung entstehen. Nebenbei werden Phospholipasen, Proteasen und Leukozyten aktiviert, die besonders in der Reperfusionsphase eine anhaltende Zellschädigung auslösen können [97]. Die Ischämie vermag zusammen mit der Reperfusion das Gewebe noch stärker zu schädigen [115].
Eine durch den Ischämie-Reperfusionsschaden hervorgerufene gesteigerte Expression von P-Selectin auf den Endothelien bedingt eine verstärkte Endothel-Leukozyten-Adhäsionen und Migration der immunkompetenten Zellen in das Gewebe. Eine vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen kann dabei eine Schädigung der Lipid-Zellmembran zur Folge haben. Durch eine Stimulation der Plasmamembran-Phospholipase wird wiederum die Arachidonsäureproduktion stimuliert, was eine Leukozytenaktivierung und Chemotaxis herbeiführt [149].Die Zellen können jetzt Sauerstoffradikale, Proteasen und Elastasen ausschütten, was eine Gewebsschädiung verstärkt [11;111]. Diese zelluläre Zerstörung von vitalem, ischämischem Gewebe nennt man Ischämie-Reperfusionsschaden. Aortales Clamping löst dabei vielfach eine lokale wie auch systemische Entzündungsreaktion, im schlimmsten Fall ein Multi-Organ-Versagen aus.
Die Ischämie- und Reperfusionphase vermag aber auch eine Schädigung der DNA (Desoxyribonukleinsäure) in Form von DNA-Einzelstrangbrüchen hervorzurufen [129]. Diese Einzelstrangbrüche führen wiederum zu einer Aktivierung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) einem der wichtigsten DNA-Reparaturenzyme [152].
Aus der Aktivierung der PARP resultiert jedoch, abhängig vom Schweregrad der Schädigung, ein erheblicher Energieverbrauch der Zelle, was schlimmstenfalls eine Zelldysfunktion zu Folge hat und letztlich in einem nekrotischen Zelltod enden kann. Damit kann die Aktivierung der PARP eine energetisch sehr ungünstige Situation für die einzelne Zelle hervorrufen, aber auch ein Überleben der Zelle ermöglichen.

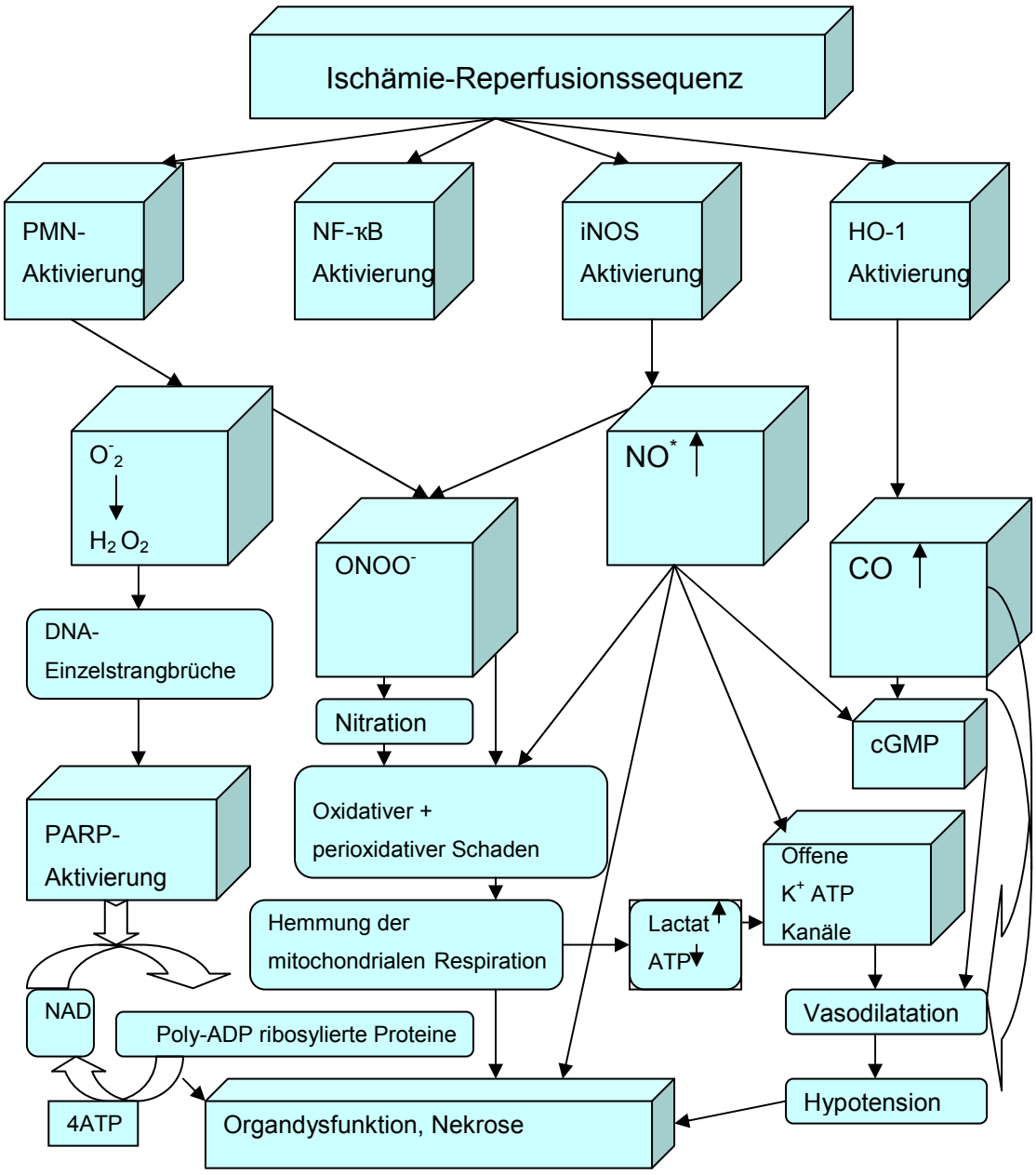


Abb. 2: Die Ischämie-Reperfusionssequenz
Eine Ischämie-Reperfusionssequenz kann über mehrere Wege zu einer Organdysfunktion und einer Nekrose führen. DNA=Desoxyribonucleinsäure. PARP=Poly-ADP-Polymerase. HO-1=Hämoxygenase1. ATP=Adenosintriphophat. NAD^+=Nicotinamidadenindinucleotid)) TNF=Tumornekrosefaktor alpha. iNOS=induzierbare Sticksoffmonoxidsynthase. PMN=Polymorph nuclear leukozyte. K^+=Kalium. cGMP= cyclisches Guanosinmonophosphat. $ONOO^-$=Produkt Stickstoffmonoxid mit freiem Sauerstoffradikal (O^-_2). NO=Stickstoffmonoxid. H_2O_2=.Wasserstoffperoxid. CO=Kohlenmonoxid, Pfeil nach oben=Anstieg, Pfeil nach unten =Abfall.
(modifiziert nach: Asfar P, Bracht H, Fröba G, Hauser B, Matejovic M, Träger K, Radermacher P. Microcirculation disorder vs. mitochondrial function: the role of the mediator orchestra NO, ROS, HO-1, ATP. in large animal studies. Shock 2005;23 suppl, 1:85-87) [3].

1.3 Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Vor ungefähr 40 Jahren wurde die Existenz von Poly(ADP-Ribose)-Molekülen im Zellkern von Säugetierzellen als eine bis dahin noch unbekannte „dritte Art von Nukleinsäuren“ beschrieben [14;24]. Nach mehr als 10 Jahren konnte diese Struktur vollständig aufgeklärt werden und sie stellte sich als ein hochverzweigtes Molekül dar [90;91].

Bei der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 handelt es sich um ein im Zellkern von Eukaryoten vorkommendes Enzym. Die PARP-1 ist ein 116-kDa (Kilodalton) großes Protein, welches sich aus drei Domänen zusammensetzt. Diese sind eine N-terminale DNA-Bindungsdomäne, bestehend aus zwei Zinkfingerstrukturen, eine Automodifikationsdomäne sowie eine C-terminale (carboxyterminale) katalytische Domäne [152]. Die katalytische Domäne enthält die sogenannte PARP-Sequenz, eine aus 50 Aminosäuren bestehende Kette, welche eine 100%ige Homologie bei Wirbeltieren zeigt. Die Funktion dieser PARP-1 besteht im Binden an beschädigte DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, über eine 42-kDa große aminoterminale Region mit Hilfe der Zink-Finger-Motive. Diese führen zu einer sofortigen Aktivierung des katalytischen Zentrums der carboxyterminalen NAD^+ (Nicotinamidadenindinucleotid)-bindenden Domäne. Dabei bildet die PARP-1 Homodimere und katalysiert die Spaltung von NAD^+ in Nikotinamid und ADP (Adenosindiphosphat)-Ribose. Diese werden dazu verwendet, verzweigte nukleinsäureähnliche Polymere herzustellen, welche kovalent an Akzeptorproteine im Kern binden [152]. Die Größe dieser verzweigten Polymere variiert von wenigen bis zu 200 ADP-Riboseeinheiten. Durch ihre starke negative Ladung können diese Polymere nun die Funktion von Zielproteinen beeinflussen.

Histone werden beispielsweise als Akzeptorproteine der Poly(ADP-Ribose)-Polymere angesehen. Darüber hinaus werden mehrere Transkriptionsfaktoren, DNA-Replikationsfaktoren und Signalproteine von der PARP-1, poly-ADP-ribosyliert. Hier kommt es zu nichtkovalenten Protein-Proteinverbindungen wie auch zur kovalenten Poly-ADP-Ribosylierung. Diese Ribosylierung stellt einen dynamischen Prozess dar, welcher durch die kurze Halbwertszeit des Polymers (< 1 min) bestimmt ist [152].

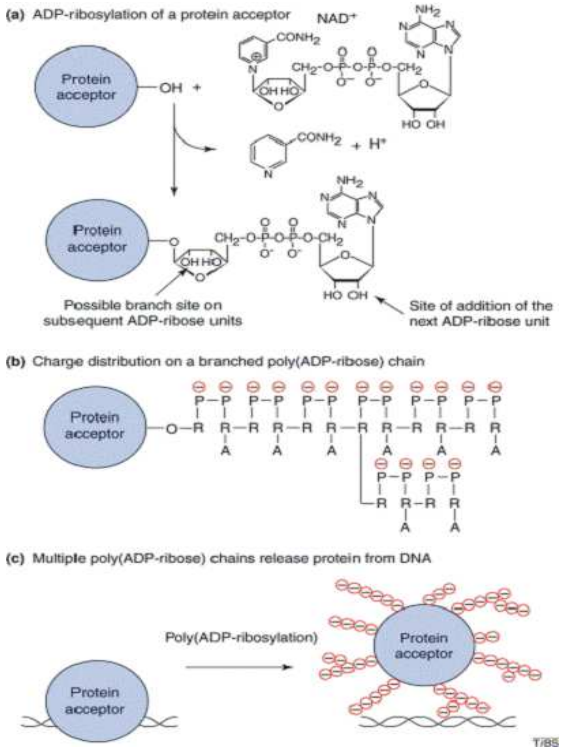
Codiert wird die PARP-1 vom humanen ADPRT-Gen, auf dem Chromosom 1q41-1q42 [124].

Am Abbau der Poly(ADP-Ribose) nehmen zwei Enzyme teil. Die Poly(ADP-Ribose)-Glucohydrolase (PARG), welche die Poly(ADP-Ribose) zu freier ADP-Ribose abbaut, und ebenfalls im Zellkern lokalisiert ist, sowie die ADP-Ribosyl-Protein-Lyase welche die ADP-Ribose-Polymere vom Akzeptorprotein abspaltet.

Abb.1: Die Poly(ADP)-Ribosylierung
a) Die ADP (Adensoindiphosphat) Ribosylierung eines Akzeptor-Proteins: Die PARP (Poly(ADP-Ribose)Polymerase) überträgt ADP-Ribose aus NAD+(Nicotinamidadenindinucleotid) auf einen Glutamat-Rest an einem Akzeptor-Protein. Hier kann die an das Protein gebundene ADP-Einheit jetzt als Akzeptor für weitere ADP-Ribose-Einheiten dienen.

b) Die Synthese des hochgradig negativ geladenen langen, linearen und verzweigten ADP-Ribose-Polymers.

c) Viele kovalent gebundene hochgradig negativ geladene ADP-Ribose-Polymere lösen das so modifizierte Protein von der DNA (Desoxyribonukleinsäure) ab. (aus Smith S.: The world according to PARP. Trends in Biochemical Science 26, 176, 2001) [135].



1.3.1 Die Funktionen der Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Zur gundsätzlichen Funktion der Poly(ADP-Ribosyl)ierung gehört zum einen die direkte kovalente Modifikation von Aminosäurenketten durch die Synthese von Poly-ADP-Ribose-Ketten, zum anderen aber auch die nichtkovalente Bindung der Poly-ADP-Ribose-Ketten der automodifizierten PARP-1 an Effektorproteine [118].

Eine Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Histonen führt zu einer Chromatindekondensation [37], was eine Voraussetzung für die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA darstellt. Wird die Poly(ADP)-Ribose abgebaut, hat dies wiederum eine Kondensation des Chromatins zur Folge [102]. Eine Verhinderung der Bindung und Interaktion genetischer Rekombinationssysteme oder DNA-bindender Proteine mit geschädigter DNA kann durch die schnelle Bindung der PARP-1 an DNA-Schädigungen effektiv verhindert werden [17;158]. Eine fehlerhafte Translation vermag die PARP somit durch ein Binden an Stellen der Transkriptionsinitiation, auch „nick-protection“ genannt, zu vermeiden. Nach einer Abdiffusion der PARP-1 unter Mitnahme von nichtkovalent-gebundenen Histonen können DNA-Reparationsenzyme der geschädigten DNA frei zugänglich gemacht werden [25].
Diese Aktivierung der PARP, hervorgerufen durch schädigende Substanzen aber auch Ischämie-Reperfusionssequenzen, führt allerdings, wie oben beschrieben, nicht selten zu einer beträchtlichen NAD^+-Depletion und einem hohen ATP-Verbrauch der Zelle, welcher bei einer Vorschädigung der Zellen durch verschiedene Noxen deren Tod bedeutet [6].
Pro 1000 DNA-Basenpaare [77] befindet sich etwa ein PARP-1 Molekül im Zellkern, welches nach einer Schädigung der DNA daran bindet und auf Grund einer massiven Aktivitässteigerung innerhalb von Minuten große Mengen an ADP-Ribose-Polymeren herstellt. Dies wiederum endet in wenigen Minuten schlimmstenfalls in einer Hydrolyse von über 80% des gesamten zellulären NAD^+-Pools, wobei die Zelle einen durch ATP-Mangel verursachten nekrotischen Zelltod stirbt [6;48]. Hierbei handelt es sich sicherlich um eine extreme Variante. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung vermag ebenso gut das Überleben von proliferierenden Zellen zu ermöglichen, die beispielsweise oxidativem Stress ausgesetzt wurden. Eine Bindung der automodifizierten PARP wurde beispielsweise an Checkpointproteine wie p53 oder $p21^{CIP1/WAF1}$ nachgewiesen [152]. Somit ist die PARP-1 einerseits in der Lage über ein Binden an DNA–Schädigungen eine DNA-Reparatur einzuleiten, andererseits aber auch die Zelle durch den hohen Verbrauch an NAD^+ und ATP zu töten. Für jede Zelle bedeutet die Art und Stärke der Schädigung jetzt entweder eine Reparatur des genomischen Materials oder aber den Tod der Zelle.
Eine nicht unwesentliche Rolle spielt die PARP-1 auch durch ihre Beteiligung an der Transkriptionskontrolle. Einige Interaktionen zwischen der automodifizierten PARP-1 mit Transkriptionsfaktoren zeigten positive wie auch negative Effekte auf den

Transkriptionsprozess [134]. Untersuchungen an PARP-1$^{-/-}$ Mäusen konnten eine verminderte Expression von Genen der Zellzyklus-Progression und der Mitose belegen.
Gene, die in das vorzeitige Altern involviert sind, wurden vermutlich verstärkt exprimiert [47].
Die zelluläre Poly(ADP-Ribolylierungs)-Kapazität nimmt bei Ratten wie auch beim Menschen mit dem Alter ab [47]. Die Progeria, welche bei Patienten zu einem beschleunigten Altern und dem Phänotyp eines Greisen schon im späten Jugendalter führt, zeigt eine deutlich verminderte PARP-1 Expression in Fibroblasten [83]. Dies wurde nicht nur bei der Progeria sondern auch abhängig vom Lebensalter gezeigt. Statistische Untersuchungen wiesen hier im Speziesvergleich bei Säugern eine hohe Poly(ADP-Ribolylierungs)-Kapazität nach, welche mit der Lebensdauer korreliert [47;93].

1.3.2 Die Rolle der PARP-1 am Zelltod

Im letzten Jahrzehnt wurde die PARP-1 unter Zellbiologen als „death substrate“ bekannt [143], da sie früh als ein Substrat der Caspasen identifiziert werden konnte. Der PARP-1 wird bei der Apoptose wie auch der Nekrose eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Unter Apoptose (griechisch: Abfallen) versteht man eine genetisch programmierte Elimination von Zellen, auch „programmierter Zelltod“ genannt. Die Apoptose stellt die natürliche Auslese der Zellen dar, welche dafür sorgt, dass ein Gleichgewicht zwischen Zellvermehrung und Zellelimination gewährleistet wird. Einige Schritte der Apoptose sind ATP abhängig.
Die Caspasen 3 und 7 spalten bei der Apoptose die PARP-1 in der DNA-bindenden Domäne in ein 89-kDa und ein 24-kDa Fragment [67]. Dadurch wird eine Verbindung der DNA-bindenden Domäne zu der katalytischen Domäne aufgehoben. Das 89-kDa Fragment interagiert nun über ein BRCT (Breast Cancer Carboxaterminal)-Motiv mit der Automodifikations-Domäne, was eine Hemmung der PARP-1 Aktivität bedingt [70]. Eine Hemmung der Poly(ADP-Ribosyl)ierungs-abhängigen Chromatin-gebundenen Ca/Mg (Calcium/Magnesium)-Endonuclease, trägt wiederum zur DNA-Fragmentierung während der Apoptose bei [162]. Aus energetischen Gründen würde eine DNA-Fragmentierung, wie

sie bei der Apoptose auftritt, im Falle einer bestehenden PARP-1 Funktion sehr schnell in einem metabolischen Tod in Form einer Zellnekrose enden [56]. Eine Spaltung der PARP-1 ermöglicht die so verbliebene Energie in Form von ATP für den Apoptosevorgang zu nutzen. Die PARP-1 scheint für die meisten Formen der Apoptose entbehrlich zu sein, jedoch ist die Spaltung der PARP-1 wichtig für den Ablauf des Apoptosevorgangs [152]. Auch in Caspase-unabhängigen Apoptosewegen, vermittelt durch Apoptose-induzierenden Faktor (AIF), soll die PARP-1 eine Rolle spielen. Eine Translokation des AIF von den Mitochondrien in den Zellkern war dabei in Neuronen und Fibroblasten, die mit DNA-schädigenden Substanzen behandelt wurden, abhängig von der PARP-Aktivierung [163].
Zahlreiche Stimuli wie beispielsweise eine Ischämie-Reperfusionssequenz vermögen sowohl den Vorgang der Apoptose als auch eine Nekrose einzuleiten.
Die Summe aller Veränderungen, welche dem Zelltod in einem Gewebe oder Organ folgen, nennt man Nekrose. Begleitet wird die Nekrose von einer entzündlichen Reaktion mit einem Überwiegen von neutrophilen Granulozyten. Bedeutend ist, dass der nekrotische Zelltod im Vergleich zum apoptotischen Zelltod eine Form des Zelltodes darstellt welche über eine Entzündungsreaktion häufiger eine Organschädigung auslöst. An NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-und Peroxynitrit behandelten Neuronen wurde untersucht, dass Apoptose eher durch leichte Stimuli, Nekrose aber durch starke Stimuli getriggert wird [163].
Wenn die PARP, NAD^+ verstoffwechselt entstehen H^+ (Wasserstoff)-Ionen als Nebenprodukt. Dies führt wiederum eine intrazelluläre Übersäuerung herbei und wirkt sich negativ auf die Überlebensfähigkeit der Zelle aus. Womöglich vermag hier eine pharmakologische Hemmung der PARP Zellen vor deren Dysfunktion zu bewahren und dabei der Zelle eine Wiederherstellung ihrer Funktion zu ermöglichen [152].
Selbst 30 Jahre nach der Entdeckung der PARP wird noch immer sehr kontrovers darüber diskutiert, welche Rolle das Enzym bei einem durch eine Schädigung der DNA induzierten Zelltod spielt.

1.3.3 Das Yin-Yang der PARP-Aktivierung

Einerseits wird die PARP als ein unentbehrlicher Überlebensfaktor der Zelle angesehen, andererseits aber als Mitverursacher des Zelltodes [152].

Dabei wurden drei Wege beschrieben, welche die Zellen nach einer Behandlung mit DNA-schädigenden Wirkstoffen, abhängig von deren Intensität, beschreiten können [152].

Nach einer leichten DNA-Schädigung kann die PARP-1 eine DNA-Reparatur durch ein Stoppen des Zellzyklus oder durch Interaktionen mit DNA-Reparaturenzymen erleichtern.

Eine stärkere Schädigung der DNA führt zu einem apoptotischen Zelltod, bei welchem Caspasen die PARP-1 spalten. Dieser Vorgang könnte einem sicheren Entfernen irreparabler, DNA-geschädigter Zellen dienen. Man nimmt an, dass hierbei die Spaltung der PARP-1 zu der bevorzugten Apoptose führt, die keine Entzüdungsreaktion mit sich bringt. Bei einer sehr starken Schädigung der DNA, welche meist durch massiven oxidativen Stress ausgelöst wird, kommt es durch eine Überreaktion der PARP-1 zu einem Verbrauch der Zellvorräte an NAD^+ und ATP. Dies wiederum bedingt einen nekrotischen Zelltod.

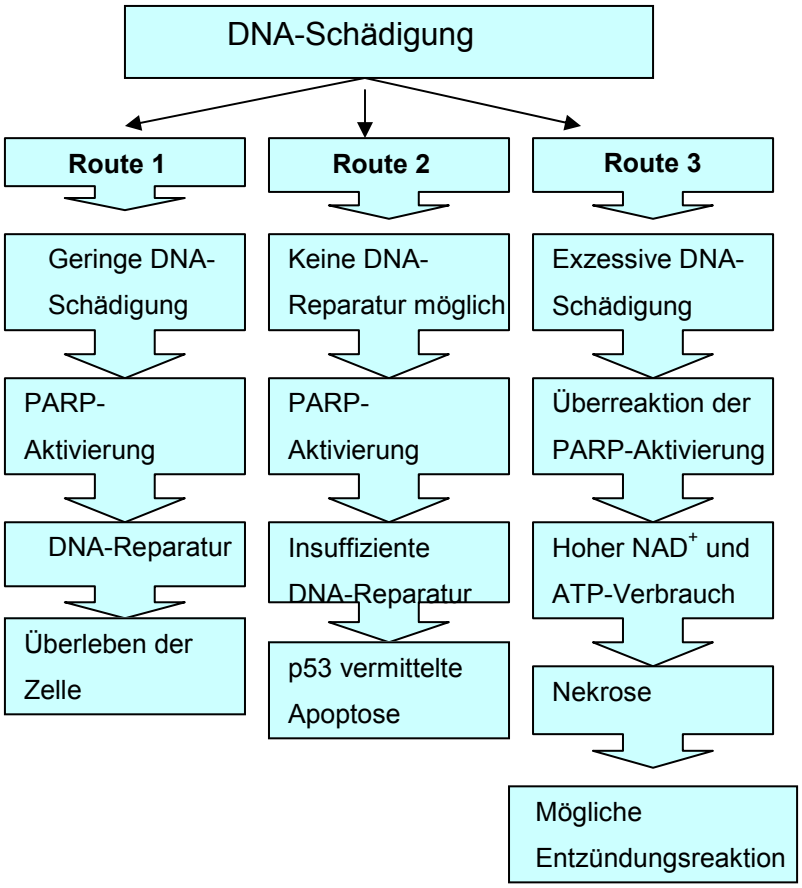


Abb. 4: Drei Wege der PARP-Aktivierung
Die drei Wege der Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) Aktivierung. Verschiedene Stärken von Zellschädigung, wie oben beschrieben, können unterschiedliche Wege der PARP aktivieren und somit zu verschiedenen Szenarien führen. NAD^+(Nicotinamidadenindinucleotid). P53=Protein 53 Kilodalton ATP(Adenosintriphosphat) (modifiziert nach: Virag L, Szabo C: The therapeutic potential of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. Pharmacol Rev 54:384, 2002)[152].

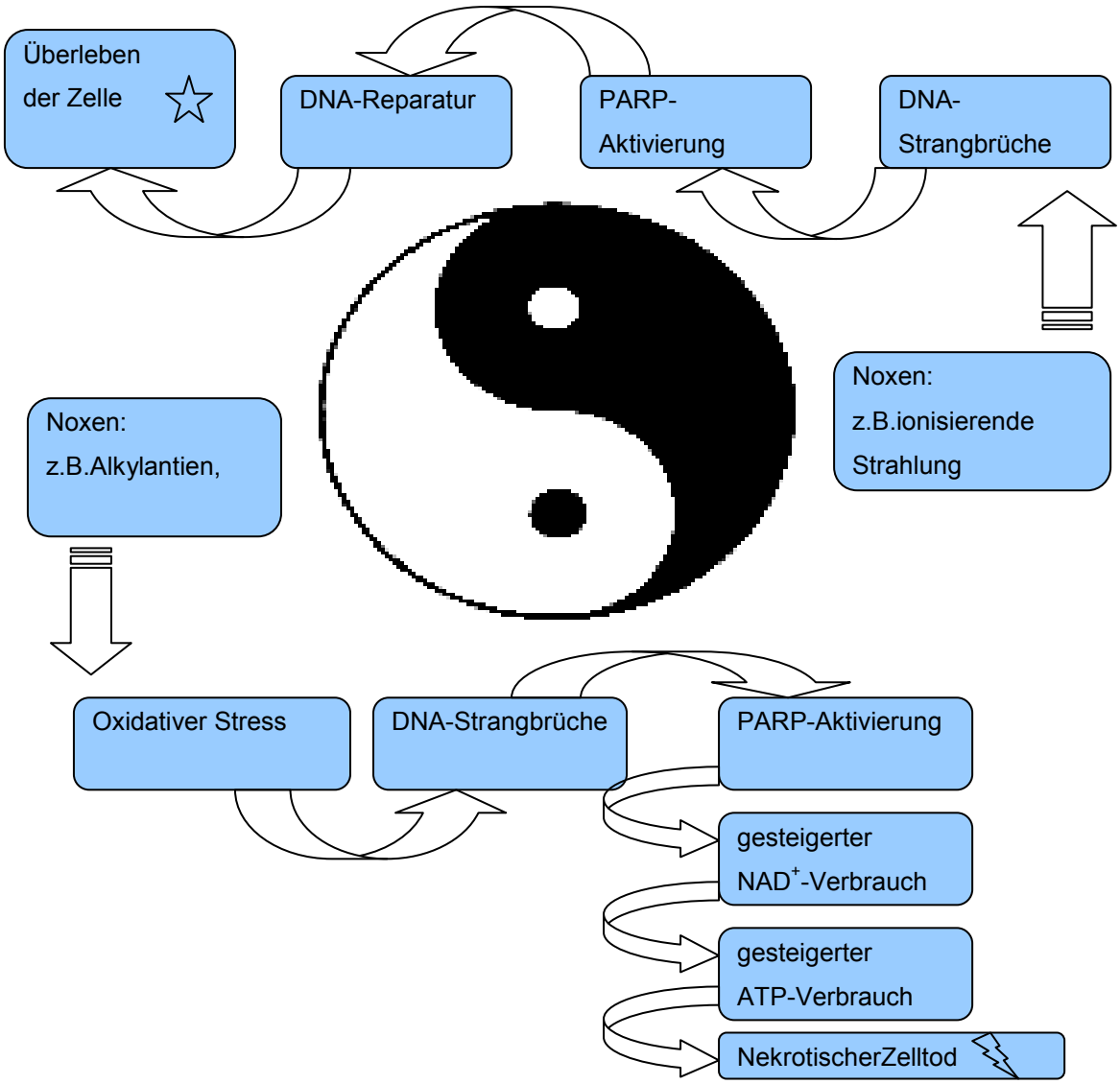


Abb. 3: Das Yin-Yang der PARP-Inhibition
Oxidativer Stress, wie auch Alkylantien und ionisierende Strahlung können über DNA-Strangbrüche zu einer Aktivierung der PARP(Poly(ADP-Ribose)Polymerase) führen. Durch diese Aktivierung wiederum kann es über einen gesteigerten NAD^+(Nicotinamidadenindinucleotid)- wie auch ATP(Adenosintriphosphat)-Verbrauch zu einer Zellnekrose kommen und die Zellen sterben an einen nekrotischen Tod. Durch eine Schädigung der DNA kann es aber ebenso gut über eine Aktivierung der PARP zu einer DNA-Reparatur und einem Überleben der zuvor geschädigten Zelle kommen. Diese Situation stellt das „Yin-Yang der PARP-Aktivierung“ dar. (modifiziert nach: Virag L, Szabo C: The therapeutic potential of poly(ADP-ribose)polymerase inhibitors. Pharmacol Rev 54:384, 2002) [152].

1.4 Die PARP-Inhibition und das Studienmedikament INO-1001

Wie oben beschrieben endet eine überschiessende PARP-Aktivierung nicht selten in einer Art „Suizidmechanismus“ der Zelle [152], so dass einer selektiven PARP-Hemmung eine große therapeutische Bedeutung zukommen könnte [144;145;152]. In experimentellen Modellen wurde an Nagern wie auch in Großtiermodellen die Rolle der PARP-Aktivierung untersucht und die therapeutische Wirksamkeit der PARP-Inhibitoren an verschiedenen akuten [1;23;34;44;68;95;96;110;152;159] und chronischen [110] Erkrankungen nachgewiesen. Als besonders effizient erwiesen sich die PARP-Inhibitoren 5-Aminoisoquinolinon (5-AIQ) [15;23] und die Phenantridinone [44;60]. Die meisten dieser Inhibitoren bestehen aus Monoarylamid und bi,- tri,- oder tetrazyklischen Laktamen. Gemeinsames Merkmal ist eine Carboxyamid- oder eine Imidgruppe, gebunden an einen aromatischen oder polyaromatischen Ring.
INO-1001, ein neuer, äußerst wirksamer, wasserlöslicher PARP-Inhibitor wurde in dieser Studie verwendet [145]. Eine gute Wasserlöslichkeit sollte hier die intravenöse Verabreichung des Medikaments erleichtern. Die PARP-Inhibitoren sind im Stande, das Enzym PARP kompetitiv zu hemmen, wie z.B. durch das Blockieren von NAD^+, welches an die katalytische Domäne des Enzyms bindet. Eine Bindung der PARP an die DNA soll dadurch verhindert werden können. Hochpotente, selektive PARP-Inhibitoren verbesserten die Organfunktionen in zahlreichen Tiermodellen [16;146].

1.5 Der Zellzyklus und seine Regulation durch Cyclin-abhängige Kinasen

Für die Aufrecherhaltung allen Lebens ist es notwendig, dass sich Zellen teilen können. Allein um die roten Blutzellen zu ersetzen sind beim Erwachsenen mehr als drei Millionen Zellteilungen pro Sekunde notwendig. Dieser Vorgang muss aber kontrolliert und gut überwacht ablaufen, da eine fehlerhafte Regulation des Zellzyklus in einer großen Zahl von hypo- oder hyperproliferativen Erkrankungen enden kann. Diese Regulation findet im Zellkern mit Hilfe sogenannter Cyclin-abhängiger Kinasen statt. Die Expression dieser

Proteine oszilliert und nur zu bestimmten Phasen des Zellzyklus werden Cycline hoch- oder herunterreguliert [57].

Die Cycline regulieren wiederum die Enzymaktivität Cyclin-abhängiger Kinasen [55;79;133], die über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus koordinieren und regulieren. Die CDK (Cyclin-abhängige Kinase)-Inhibitoren (CDKIs) entscheiden am Ende von Signalketten über die Zellproliferation. Im Verlauf des Zellzyklus zeigen die Cyclin-abhängigen Kinasen eine relativ lange Halbwertszeit, während die Expressionsspiegel der Cycline in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus oszillieren und die Phasen-spezifischen Cycline schnell beim Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus nach Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut werden [61;130].

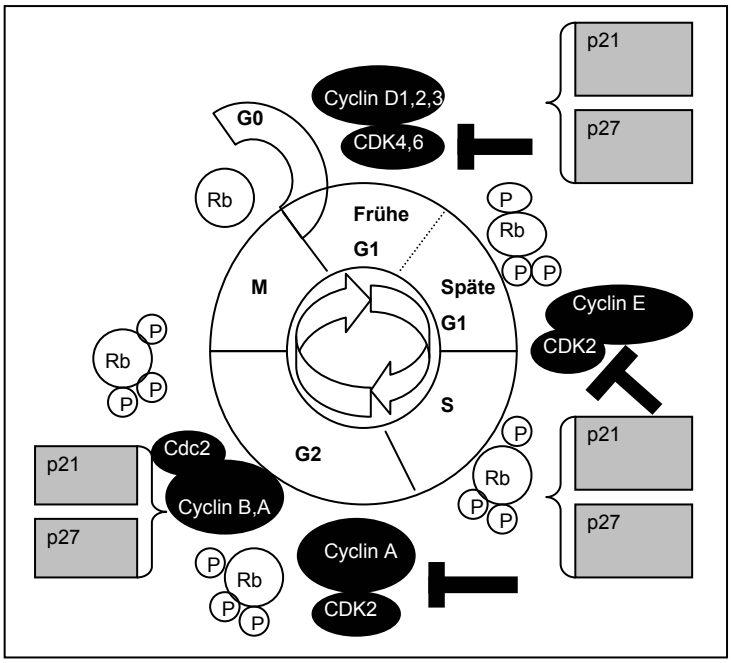


Abb. 5: Zellzyklusphasen und CDKIs

In jeder der Zellzyklusphasen sind spezifische Cycline exprimiert, die mit spezifischen CDKs (Cyclin dependent kinase) interagieren und sie hierdurch aktivieren. Diese CDKs phosphorylieren (P), Rb (Retinoblastom) und ermöglichen den Fortschritt der Zelle durch den Zellzyklus bis Rb gegen Ende des Zellzyklus durch Phosphatasen dephosphoryliert wird und die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen nach Ende der M(Mitose)-Phase erneut in der G1(Gap 1)-Phase sind. CDKIs (Cyclin dependent kinase inhibitors) können diese Cyclin/CDK-Komplexe in jeder Zellzyklusphase hemmen und Zellzyklusarrest auslösen. Dargestellt wurden die in den Versuchen verwendeten CDKIs, p21(Protein 21k Dalton), p27 (Protein 27k Dalton). G2-Phase= Gap 2 Phase. P= Phosphat. Cdc= Cell Division Cycle. S-Phase= Synthese Phase.G0-Phase= Gap 0 Phase. Die frühen G1-Phase Cycline beinhalten Cyclin D1, D2 und D3 die mit Cdk 4 oder Cdk6 einen Komplex bilden können. In der späten G1-Phase wird Cyclin E exprimiert, welches Cdk2 binden kann. Die Synthese-Phase wird durch eine Interaktion von Cyclin A mit Cdk 2 reguliert. Zuletzt wird dann die G2-Phase durch Cyclin B, mit Cdk1 interagierend, reguliert.

1.6 Die CDK-Inhibitoren-p21$^{Waf1/Cip1}$ und p27^{Kip1}

Es wurden zwei Proteinfamilien entdeckt, welche die Zellproliferation in der G1-Phase hemmen können. Zum einen die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21, p27 und p53, die über eine aminoterminale Domäne die Cyclin-D und E CDK-Komplexe binden und deren Aktiviät hemmen. Und zum anderen die Ink4 Familie mit p15, p16, p18 und p19, die an CDK 4 binden können [49]. Das Tumorsuppressorprotein p53 kann bei einer DNA-Schädigung an die Promotorregion von p21 binden und dessen Expression stark erhöhen [51;78;119;161]. Das Protein p21$^{Waf1/Cip1}$ hat ein Molekulargewicht von 21-kDa und inhibiert die Aktivität von Cyclin-abhängigen Kinasen, an die es direkt binden kann (Cip 1, „CDK-interacting protein 1“) [51]. Es dient auch als Vermittler des durch p53 induzierten Wachstumsarrests („wild-type p53-activated fragment) [32]. Zur Familie der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren gehören des Weiteren die Proteine p27^{Kip1} und p53^{Kip2}, die eine signifikante Sequenzhomologie in ihrem N-terminalen Bereich aufweisen und eine Vielzahl von CDKs des Zellzyklus erkennen [133]. Mithilfe der N- und C-terminalen Domäne bindet p21 nun verschiedene Proteine wie Cycline, Transkriptionsfaktoren, DNA-Syntheseinitiatoren, Proteinkinasen aber auch Caspasen [31]. P21 stellt ein Zielgen des p53 dar, welches im Promotorbereich von zwei konservierte Bindestellen besitzt und seine Expression hochreguliert [5]. Auch zahlreiche Transkriptionsfaktoren können die p21 Transkription aktivieren [38]. Eine Überexpression von p21 führt zu einem G1- und S-Phase Arrest [101]. Durch Bildung von Komplexen ermöglicht p21 an einen DNA-Schaden zu binden, Endonucleasen an einer Bindung zu hemmen und sich an einer DNA-Reparatur zu beteiligen [36].

Der CDKI p27 wird in vielen Zelltypen exprimiert und ermöglicht ebenfalls eine Hemmung des Zellzyklus. Dieses Protein wird in der G1-Phase exprimiert und abgebaut, wenn die Zelle in die Synthesephase eintritt. In Zellen, die sich in der G1- oder G0-Phase befanden wurden erhöhte Mengen gefunden. Der Abbau von p27 soll in einem ubiquitinabhängigen Vorgang ermöglicht werden.

Der Zellzyklus wird von den CDKI-Genen p21$^{waf1/cip1}$ wie auch p27^{kip1}, die wiederum die Proteine p21 und p27 kodieren, negativ reguliert wird

Dabei werden die CDK-Inhibitoren als Marker der Zellalterung (cellular senescence) und einer DNA-Schädigung betrachtet [126].

2 FRAGESTELLUNG

Thorakales Aortencrossclamping stellt wie oben beschrieben ein typisches Beispiel für einen Ischämie-Reperfusionsschaden dar, bei dem es durch eine Überproduktion an reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen (O_2^-), Hydrogenperoxid (H_2O_2), Hydroxylrakikale (OH^+) und Peroxynitite ($ONOO^-$) zu einer DNA-Schädigung [86;98;147] und anschließender Organschädigung [40;41] kommen kann.
Auf molekularer Ebene kann eine Schädigung der Zelle, bedingt durch eine Ischämie-Reperfusionsequenz (I/R), über eine Aktivierung der PARP zu einem enormen Verbrauch der Zelle an ATP und NAD^+, letztendlich zum Zelltod führen. In verschiedenen I/R-Modellen an Versuchstieren, bei denen durch oxidativen Stress verursachte DNA- und Gewebsschädigungen eine anschließende PARP-Aktivierung erfolgte, konnte eine Inhibition der PARP großen Nutzen bringen [152]. Die Effekte einer PARP-Inhibition auf die Organhistologie, die DNA sowie die Zellalterung in Geweben wie Rückenmark, Niere und Dünndarm waren jedoch in einem Großtiermodell nach thorakalem Aortenclamping bisher weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurden in diesem Ischämie-Reperfusions-Modell am Schwein bei thorakalem Aortencrossclamping die Folgen der Gabe des Studienmedikaments INO-1001 mit einer Ischämiezeit von 45 Minuten auf die minderdurchbluteten Organe histologisch untersucht.

Hieraus ergeben sich folgende Fragen:

1. **Ist es möglich, durch die Verwendung von INO-1001 Ischämie/ Reperfusionsbedingte Organschädigungen der Nieren zu reduzieren?**

2. **Kann der PARP-Inhibitor INO-1001 eine Ischämie-Reperfusionsbedingte Organschädigung am Dünndarm reduzieren?**

3. **Zeigt der PARP-Inhibitor INO-1001 einen wesentlichen zytoprotektiven Effekt in Hinblick auf das Gewebe des Rückenmarks?**

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Der Versuchsablauf am Großtiermodell

3.1.1 Versuchsaufbau und Präparation der Versuchstiere

Die Versuche wurden nach den Richtlinien „Umgang mit Labortieren“ des *Bundesinstituts für Gesundheit* durchgeführt. Das Versuchsprotokoll wurde sowohl von dem Tierschutzbeauftragten der Universität Ulm als auch vom Regierungspräsidium Tübingen, Baden-Württemberg, genehmigt. Für die Versuchsreihe verwendeten wir 18, drei Monate alte deutsche Landschweine männlichen sowie weiblichen Geschlechts mit einem mittleren Körpergewicht von 47 Kilogramm. Die Tiere lebten etwa eine Woche im Tierforschungszentrum der Universität Ulm. Zu der Versuchsvorbereitung gehörte ein Futterentzug über 24 Stunden vor dem Operationsbeginn. Wasser stand den Tieren aber in unbegrenzter Menge zur Verfügung. Es handelt sich um eine randomisierte, prospektive Studie. Insgesamt gab es 2 Versuchsgruppen, die INO-1001 sowie die Placebogurppe. Je neun Tiere bekamen das Studienmedikament INO-1001. Das Studienmedikament wurde 90 Minuten vor der Clampingzeit erstmals verabreicht. Nach der Gabe einer initialen Dosis von 2 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ über 30 Minuten wurde 1 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ über 60 Minuten bis zur Abklemmung infundiert. Während des Aortenclampings wurde die Infusion gestoppt. Danach fand erneut eine vierstündige Gabe von 0,5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$, gelöst in 5% Glucose, über eine zentralvenöse Infusion, bis zum Versuchsende statt. Die neun Placebotiere bekamen jeweils nur den Trägerstoff, also 5% Glucose in äquivalenter Dosierung vor dem Clamping verabreicht.

Tabelle 1: Medikamentöse Therapie der Versuchsgruppen
Aufteilung der zwei Versuchsgruppen in eine Placebogruppe mit neun Tieren, sowie eine INO-1001 Versuchsgruppe mit ebenfalls neun Tieren, sowie deren therapeutische Behandlung mit 5% Glucose oder aber dem PARP ((Poly(ADP)Ribose)-polymerase))-Inhibitor INO-1001 gebunden an 5% Glucose. n= Anzahl der Versuchstiere.

Gruppe	Behandlung
Kontrollgruppe: Placebo n=9	Unbehandelte Kontrollgruppe erhält während der Operation identische Volumina von 5% Glucose intravenös infundiert.
Versuchsgruppe: INO-1001 n=9	Versuchsgruppe erhält nach der Gabe einer initialen Dosis von 2 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ über 30 Minuten, 1 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ über 60 Minuten bis zur Abklemmung. Während des Aortenclampings wurde die Infusion gestoppt und erneut 4 Stunden bis zum Versuchsende mit 0,5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$, gelöst in 5% Glucose, über eine zentralvenöse Infusion.

Tabelle 2: Angaben zu den einzelnen Versuchstieren
Auflistung der genauen Angaben wie Tiernummer, Gewicht, Geschlecht, medikamentöse Therapie und Gruppenzugehörigkeit der Versuchstiere.

Versuchstier	Gewicht	Geschlecht	Therapie	Gruppe
1203	51,1 kg	männlich	5% Glucoselsg.	Placebo
1204	43 kg	männlich	INO - 1001	INO - 1001
1205	44 kg	männlich	INO - 1001	INO - 1001
1206	50 kg	weiblich	INO - 1001	INO - 1001
1207	47,5 kg	männlich	5% Glucoselsg.	Placebo
1208	44,5kg	weiblich	INO - 1001	INO - 1001
1209	47 kg	männlich	5% Glucoselsg.	Placebo
1210	54,4 kg	männlich	5% Glucoselsg.	Placebo
1211	57,5 kg	männlich	5% Glucoselsg.	Placebo
1212	60 kg	männlich	INO - 1001	INO - 1001
1213	44 kg	männlich	INO - 1001	INO - 1001
1214	47 kg	weiblich	INO - 1001	Drop out
1215	47 kg	männlich	5% Glucoselsg.	Placebo
1216	47,5 kg	weiblich	5% Glucoselsg.	Placebo
1217	45,5 kg	weiblich	5% Glucoselsg.	Placebo
1218	47,5 kg	weiblich	INO - 1001	INO - 1001
1219	46 kg	weiblich	INO - 1001	INO - 1001
1220	46 kg	weiblich	5% Glucoselsg.	Placebo

3.1.2 Anästhesie und Medikation während der Operation

Eine Stunde vor der Narkose erhielten die Versuchstiere im Tierforschungszentrum eine intramuskuläre Prämedikation mit Azaperon (4 $mg \cdot kg^{-1}$ Stresnil®; Janssen, Neuss, Deutschland) und Atropin (0,05 $mg \cdot kg^{-1}$ Atropinsulfat®; Braun, Melsungen, Deutschland). Nachdem die Tiere schlafend in einer Transportkiste in den Tier-OP der Sektion „Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung“ der Parkstrasse 11, 89073 Ulm, transportiert wurden, erhielten die Tiere einen intravenösen Zugang in eine Ohrvene und es erfolgte eine Präoxygenierung. Zur Einleitung wurde die Sauerstoffsättigung pulsoxymetrisch über einen „Fingerclip“ am Schwanz überwacht (Datex Capnomac Ultima® ULT-S-3301; Datex Instrumentarium Corp, Helsinki, Finland). Unter Sauerstoffgabe wurde die Narkose über den i.v.-Zugang der Ohrvene mit Atropin (0,5 mg Atropinsulfat®; Braun, Melsungen, Deutschland), Ketamin (2 $mg \cdot kg^{-1}$, Ketavet®; PharmaCOa und Upjohn, Erlangen, Deutschland) und Natrium-Pentobarbital (6-8 $mg \cdot kg^{-1}$ Narkoren®; Merial, Hallbergmoos, Deutschland) eingeleitet. Das Versuchstier wurde auf den Rücken gelegt, orotracheal intubiert, mit Alcuronium (10 mg Alloferin®; Hoffmann- La Roche, Basel, Schweiz) paralysiert und kontrolliert beatmet (Servo 900B®; Siemens, Erlangen, Deutschland). Maschinell beatmet wurde das Tier mit einer inspiratorischen O_2-Konzentration von (FiO_2): 0.35, einem Tidalvolumen von 15 $ml \cdot kg^{-1}$, einer Atemfrequenz von 10-12/min, sowie einem Positiv-End-Expiratorischen Druck (PEEP) von 4 cm H_2O. Zur Überwachung der Beatmung wurde kontinuierlich die expiratorische CO_2-Konzentration gemessen. Die Beatmung wurde so eingestellt, dass ein arterieller PCO_2 zwischen 35-40 mmHg und eine SpO_2 > 90% erreicht werden konnten. Für die kontinuierliche Entlastung des Magens wurde ein orogastraler Tubus gelegt. Zur Aufrechterhaltung der Narkose bekamen die Tiere ein Luft-Sauerstoffgemisch (FiO_2 0,35), eine Dauerinfusion von Pentobarbital (6-12 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ Narkodorm®; Alvetra, Neumünster, Deutschland), das Analgetikum Buprenorphin intravenös (0,9-1,5 mg Temgesic®; Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) und eine Muskelrelaxierung mit Alcuronium (14 $mg \cdot h^{-1}$). Die Überwachung der Tiefe der Anästhesie konnte durch ein kontinuierliches EEG-Monitoring (Neurotrac®; Interspec Inc., Ambler, PA) gewährleistet werden. Die Tiere konnten zusätzlich mit Hilfe eines ICU-Monitors (10 $ml \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$; 66S™-Monitor, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) überwacht werden. Während des

gesamten Versuchsablaufs wurde Ringer-Lösung (Ringerlösung Fresenius®; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) infundiert. Zusätzlich wurde Hydroxyethylstärke (HAES-steril® 6% 200/0,5; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) während des instrumentelles Zeitintervalls gegeben, um kardiale Füllungsdrücke konstant zu halten. Die Körpertemperatur wurde durchgehend rektal gemessen, und durch eine Heizmatte und OP-Leuchten in einem physiologischen Bereich von 37,5-38,5 °C gehalten. Um Thrombosen vorzubeugen, erhielten die Tiere zusätzlich unfraktioniertes Heparin 1000 $IE \cdot h^{-1}$ intravenös.
Zur weiteren Vorbereitung gehörten die Säuberung des Tieres, das Rasieren der Haare, die Desinfektion sowie das sterile Abdecken.

3.1.3 Chirurgische Präparation

Der weitere operative Ablauf richtete sich nach einem bereits in dem Institut für Pathophysiologie und Verfahrenstechnik etablierten Modell. Unter sterilen Bedingungen wurde die rechte A. carotis communis chirurgisch dargestellt und ein 4 F-Katheter für die Blutdruckmessung proximal des Aortenclampings (pMAP) und der Blutentnahme eingebracht. Die rechte V. jugularis sowie die V. submandibularis wurden freipräpariert, um Einführungsschleusen darin zu platzieren. Über die Schleuse in der V. jugularis wurde ein Thermodilutionskatheter (7 F 93A754™; Baxter Healthcare, Irvine, CA, USA) als Pulmonalkatheter eingebracht. Dadurch war es möglich, kontinuierlich den zentralvenösen Druck (ZVD) sowie den mittleren pulmonalarteriellen Druck (MPAP) zu messen (8,5 F SI-09880 Arrow International, Reading, PA, USA). Unter sonographischer Sichtkontrolle konnte ein Katheter (7 F Multipurpose®; A-1Cordis, Roden, Niederlande) über die zweite 8,5 F Schleuse in eine Lebervene eingelegt werden. Um Medikamente und Flüssigkeit infundieren zu können wurde ein dreifacher Lumenkatheter in die V. cava superior gelegt. Anschließend wurden die rechte und linke Aa. Femoralis freigelegt. In die rechte A. femoralis wurde eine Katheterschleuse zur Messung des distalen arteriellen Blutdrucks sowie zur Blutentnahme unterhalb der Clampingebene eingebracht. In die linke A. fermoralis wurde eine Katheterschleuse (4 F Introducer-Set; PV3240; Pulsion, München,

Deutschland) wie auch ein fiberoptischer Katheter (Pulsiocath® PV2023) eingelegt. Auch die rechte V. femoralis wurde dargestellt und eine Einführungsschleuse platziert um einen Angiographie Katheter (7 F OPTA CSI; Cordis®; Cordies, Roden, Niederlande) einzuführen. Dieser Katheter wurde während der Laparotomie mechanisch in die rechte V. renalis eingeführt um Blutproben entnehmen zu können. Nach einer links-anterioren Thorakotomie und dem Anzügeln der Aorta descendens mit einem Torniquet (Mersilene®; Johnson & Johnson Intl., Brüssel, Belgien) unmittelbar distal des Abgangs der A. subclavia sinistra wurde über eine Plastikkanüle das Kunsttstoffbändchen transkutan über die Thorakotomiewunde ausgeleitet. Zusätzlich wurde eine Thoraxdrainage gelegt, um einem Spannungspneumothorax vorzubeugen. Des Weiteren erfolgte die Präparation und das Anschlingen der A. renalis dextra und das Anbringen eines Ultraschallflussmesskopfs (Transonic Systems; Ithaca, NY) an den Gefäßen. In die V. renalis wurde über den venösen femoralen Zugang ein 7 F-Katheter eingebracht. Anschließend wurden die A. hepatica, die gemeinsame hepatische Arterie distal des Abgangs der A. gastroduodenalis, sowie die V. portae zur Anlage von Flussmesssonden präpariert und ein 4 F-Katheter (CS-16402, Arrow™; Reading, PA) in die V. portae eingelegt. Sämtliche Katheter wurden auf gute Fluss-und Aspirationsverhältnisse überprüft.

Nach Anlage eines Ileostomas und dem Bedecken mit einem Stomabeutel (Stomadres plus®; Bristol-Myers, Baar, Schweiz) wurde die Thorakotomie und Laparotomie verschlossen. Eine Ileum-Tonometriesonde zur Messung des intramukosalen PCO_2 wurde eingebracht und mit einem Monitor verbunden (Paratrend 7®; Biomedical Sensors, Highwycombe, UK). Ein Cystofixkatheter (Cystofix Suprapubic Catheter FG 15™; Medicalproducts, Australia) diente der Urinableitung. Zur Vermeidung einer Katheterthrombose wurde Heparin (1000 $IU \cdot h^{-1}$ Heparin-Natrium; Braun, Melsungen, Deutschland) verwendet. Um einen normoglykämischen Zustand beizubehalten wurde die Blutglucosekonzentration kontrolliert und bei Bedarf Glucose (Glukose/Xylit® 20%; PharmaCOa &Upjohn, Erlangen, Deutschland) substituiert.

Im Anschluss daran folgte eine Ruhephase von 120 Minuten.

3.1.4 Die Clamping- und Declampingphase

Im Anschluss an die Ruhephase wurden die Tiere randomisiert den Gruppen zugeteilt, um entweder Glucose 5% als Trägerstoff oder den PARP-Inhibitor INO-1001 zu erhalten. Ausserdem konnten die Basisdaten erhoben werden, was als Messzeitpunkt 1 (MZP1) bezeichnet wurde. Jetzt begann das 45-minütige Clamping der thorakalen Aorta mittels Torniquet. Diese Clamping-Zeit wurde gewählt, um eine klinische Situation möglichst gut simulieren zu können und um große, sich über mehrere Segmente erstreckende Infarkte des Rückenmarks zu vermeiden, wie sie bei Schweinen bei 60-minütigem und längerem Abklemmen beobachtet wurden [88]. Der vollständige Aortenverschluss konnte mit Hilfe der intraarteriellen Blutdruckmessung distal des Clampings (A. fermoralis und A. renalis) überprüft werden. Während der Clampingzeit wurde eine Kombination aus Nitroglycerin (1.7 $mg \cdot min^{-1}$ Nitrolingual® infuse; Pohl- Boskamp GmbH & Co, Hohenlockstedt, Deutschland), Esmolol (16.6 $mg \cdot min^{-1}$ Brevibloc; Baxter Healthcare®, Unterschleißheim, Deutschland) und Adenosin-5'-triphosphat (2-10 $mg \cdot min^{-1}$ Striadyne®; Wyeth-Lederle, Paris, Frankreich) gegeben, um einen pMAP zwischen 80 und 120% des Ausgangswertes zu erhalten. Die Auswahl dieser Medikamente basiert auf Erfahrungen von Vorgängerstudien. Um die Vorlast im Hinblick auf die Declampingphase zu verbessern, wurde den Tieren während der Clampingzeit 1500 ml Hydroxyethylstärke gegeben. Fünf Minuten vor dem Declamping begann eine erneute Datenerhebung und das Torniquet wurde langsam für ca. eine Minute gelöst. Diese Datenerhebung wurde als MZP 2 bezeichnet. Um eine Hypotension in Folge des Declampings zu vermeiden, wurden erneut 1500 ml Hydroxyethylstärke über einen Zeitraum von 30 Minuten infundiert. Zusätzlich bekamen die Versuchstiere bei Bedarf Noradrenalin (Arterenol®; Aventis Pharma, Frankfurt, Deutschland), damit ein pMAP > 80% des Ausgangswerts gewährleistet werden konnte. Eine weitere organabhängige wie auch organunabhängige Datenerhebung fand 120 Minuten und 240 Minuten nach dem Declamping statt, was den MZP 3 und 4 entspricht.
Während des Versuchsablaufs konnten INO-1001 Plasmaspiegel mittels HPLC in isolierten Lymphozyten zu verschiedenen Messzeitpunkten bestimmt werden.
Zu Versuchsende wurden die Tiere dann in tiefer Narkose unter zusätzlicher Bolusgabe von Pentobarbital- Natrium und einer Kaliumchlorid-Injektion (20 mval) getötet.

Direkt im Anschluss konnten Organproben für die histologische Gewebeaufarbeitung entnommen werden.

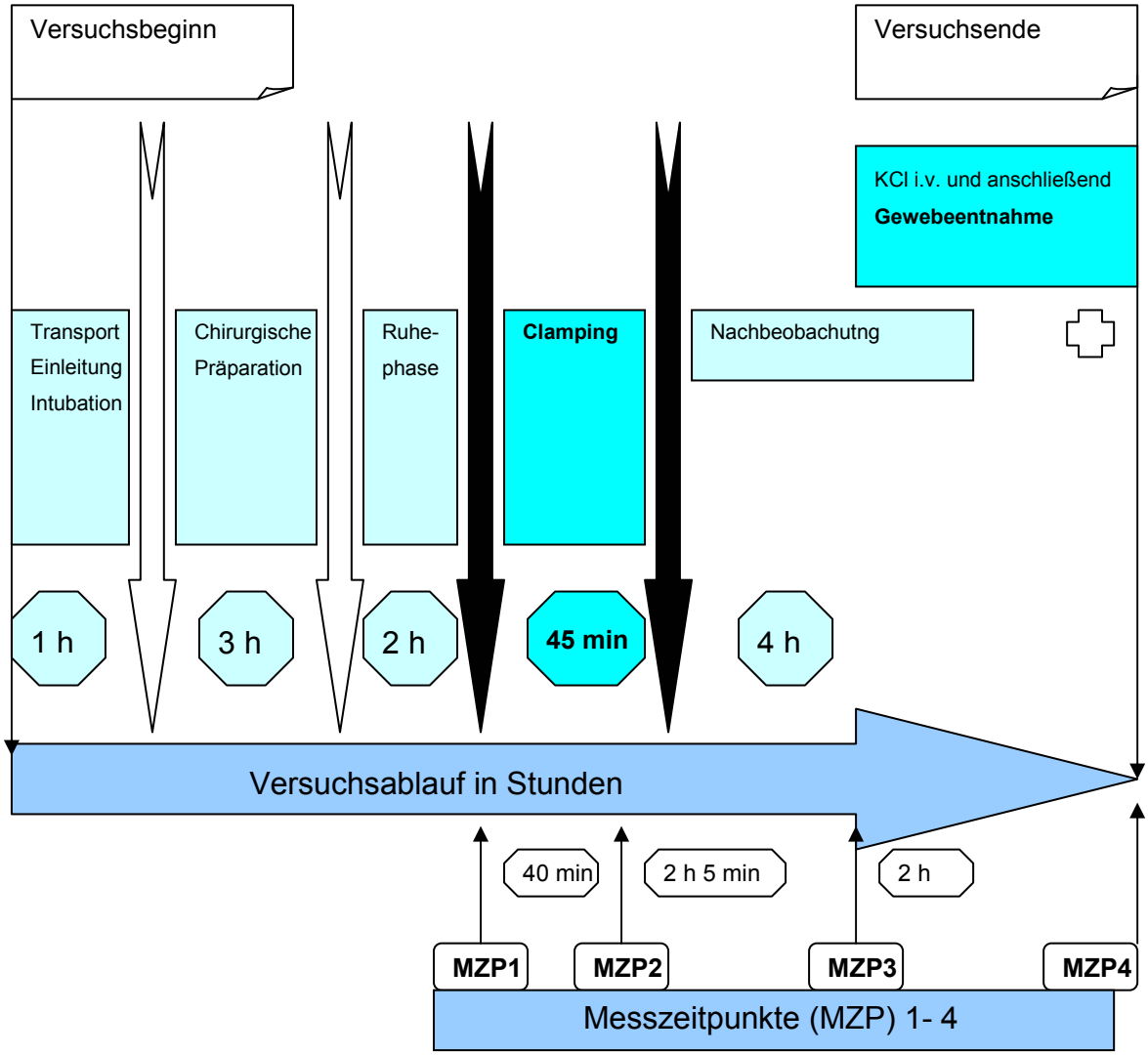


Abb. 6: Schema des Versuchsablaufs
Schema des Versuchsablaufs mit den Messzeitpunkten (MZP 1-4) und der Dauer (h=Stunden, min= Minuten) der einzelnen Versuchsphasen sowie des Zeitpunktes der Gewebeentnahme. Vor der Gewebeentnahme wurde KCl (Kaliumchlorid) i.v. (intravenös) verabreicht.

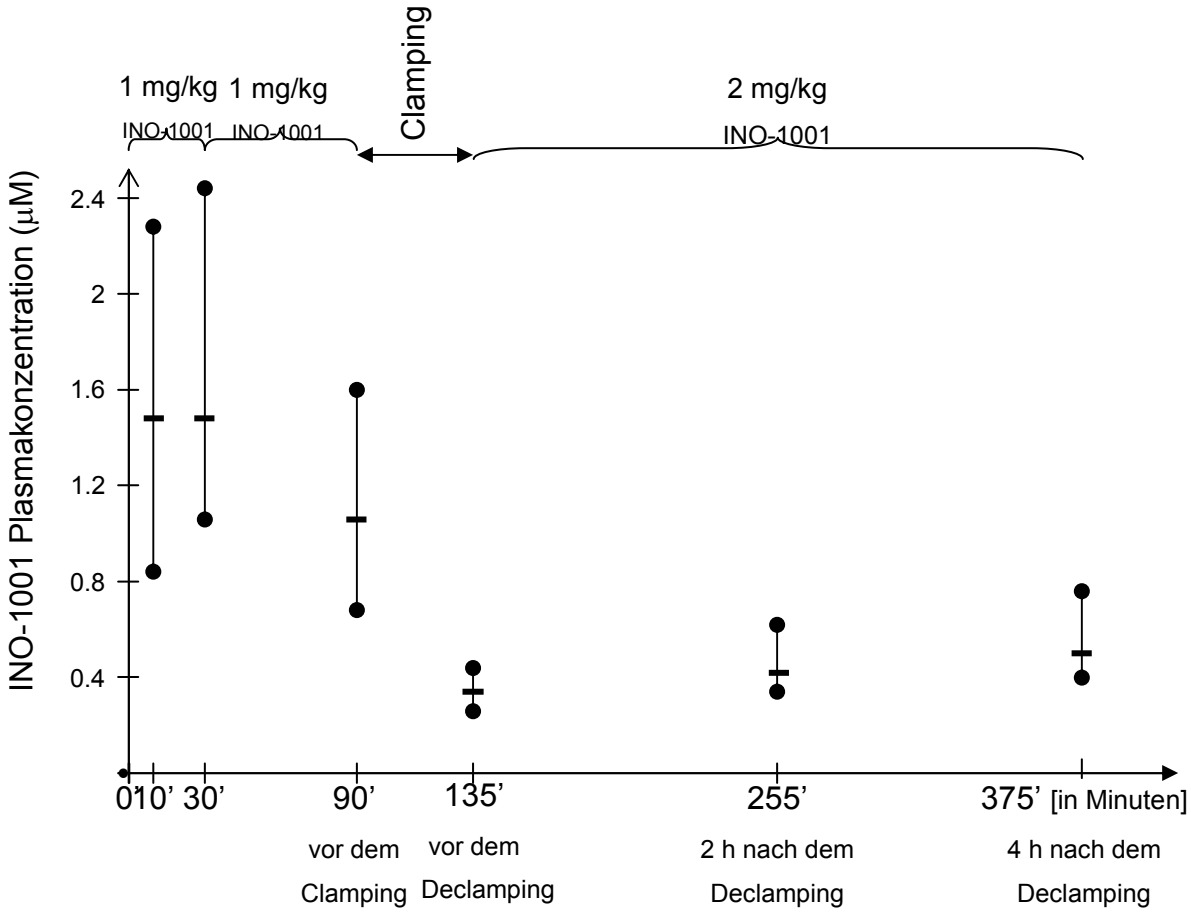


Abb. 7: INO-1001 Plasmakonzentrationen in Lymphozyten
INO-1001 Plasmakonzentrationen in isolierten Lymphozyten gemessen mit Hilfe eines HPLC (High performance liquid chromatography).
Zusätzlich sind die Zeitpunkte (in Minuten) der Verabreichung der Einzeldosen (in mikromol) von INO-1001 angegeben, welche sich insgesamt auf 4 mg/ kg belaufen.

3.2 Histologische Untersuchungen der Gewebeproben

3.2.1 Die Vorbereitung der Gewebsbiopsien für die Immunhistochemie

Die unmittelbar nach dem Tod der Versuchstiere entnommenen Gewebeproben vom lumbalen Rückenmark, der rechten Niere und dem Dünndarm dienten einer histologischen Aufarbeitung, der Anfertigung eines HE-Schnittes, dem Nachweis der CDKI Genexpression von p21 und p27, einer TUNEL-Färbung (TdT-mediated nick-end labelling technique) zum Nachweis von Apoptose sowie einer Nissl-Färbung des Rückenmarks zum Nachweis neuronaler Schädigungen. Diese Vorgehensweise ist eine Modifizierung des Vorgehens von PD. Dr. med Schelzig und wurde bereits im Universitätsklinikum Ulm etabliert [126]. Die Gewebsbiopsien wurden unverzüglich nach dem Tod der Versuchstiere in Formalin (6%) fixiert und in dieser Lösung für 13-15 Stunden belassen. Anschließend konnten die Biopsien mittels eines Automaten mit aufsteigender Alkoholreihe entwässert und mit Xylol wieder vom Alkohol befreit werden. Die Präparate wurden schließlich in Paraffin eingebettet und bei einer Schichtdicke von 2 µm auf Objektträger aufgebracht (SuperFrost® Plus; Menzel-Gläser®; Art. nr. J1800AMNZ; Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland), fixiert und bei 56 °C über Nacht im Brutschrank getrocknet.

3.2.2 Die Haematoxylin-Eosin-Färbung

Die Standard HE-Färbung des lumbalen Rückenmarks, des Dünndarms sowie der rechten Niere wurden zum einen zur Beurteilung der Gewebsmorphologie sowie dem Nachweis von Ischämie-und Reperfusionsschäden durchgeführt, zum anderen aber auch um ein Abdriften der histologischen Schnitte bei den sich anschließenden Gewebsfärbungen ausschließen zu können.

Für die Durchführung der HE-Färbung stand ein HE-Automat (Tissue Tek II; Färbeautomat, Histo Tek) zur Verfügung. Mit Hilfe der weiteren histologischen Schnitte

konnte die Genexpression von p21 (Clone F-5™; Code: SC-6246, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA) sowie p27 (Clone 57™; Code: K25020, Transduction laboaratories, USA) immunhistologisch dargestellt werden.

3.2.3 Der Nachweis der CDKI Genexpression p21 und p27

Die vorbereiteten Proben wurden nun in drei Zyklen von je 10 Minuten Dauer in Xylolbädern (Xylol Isomerengemisch; Prod.nr. 16446; Riedel-de-Haen, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) deparaffiniert. Für die Immunhistochemie wurden von jedem Organ je zwei Objektträger für die p21 Bestimmung sowie je zwei Objektträger für die p27 Bestimmung verwendet. Zusätzlich wurden Negativkontrollen gemacht. Nachdem die Gewebeschnitte vom Paraffin befreit waren, durchliefen sie eine absteigende Alkohlreihe mit Isopropanol (2-Propanol für Analyse; Prod.nr. 33539; Riedel-de-Haen, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) von je zwei mal 100%-igem Propanol, einer 70%-igen Propanollösung verdünnt mit Aqua dest. sowie einer 50%-igen Propanollösung verdünnt mit Aqua dest. für jeweils drei Minuten. Nach dieser Rehydrierung der Gewebeschnitte verweilten diese dann fünf Minuten lang in Aqua dest. Im Anschluss daran folgte eine Mikrowellenbehandlung der Objektträger über einen Zeitraum von 20 Minuten. Zur besseren Entfaltung der Antigene und einer Reduktion der Hintergrundfärbung befanden sich die Objektträger in einem Citratpufferbad (Target Retrieval Solution 10x Konzentrat; Dako Cytomation; Prod.nr. S1699; Carpinteria, CA, USA) bei pH 6. Dieses wurde nach je zweiminütiger Mikrowellenbehandlung auf den vorherigen Pufferstand aufgefüllt, damit eine konstante Benetzung der Schnitte gewährleistet und das Gewebe vor einer Austrocknung geschützt werden konnte. Danach wurden die Objektträger bei Raumtemperatur 20 Minuten lang in Citratpuffer abgekühlt. Nach dem Abkühlen folgte eine je fünf minütige Aqua dest. und PBS Behandlung (PBS (10x) Dulbeccos Phosphate Buffered Saline; Prod.nr.: 14080-048 Gibco™; Invitrogen Corporation, Praisley, Scotland, UK). Eine Blockierung der endogenen Peroxidase konnte nun erreicht werden, indem die Schnitte in ein Methanolbad (Methanol zur Analyse; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) kamen, in welches kurz zuvor acht Milliliter

Wasserstoffperoxid (Wasserstoffperoxid 30%; „Baker Analyzed“; Prod.nr. 7047; J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V. Deventer, Nierderlande) gegeben wurden. Im Anschluss daran wurden die Objektträger mit einem p27-bzw. p21-Antikörper (p27 (C19) sc-528 rabbit polyklonal IgG; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in PBS plus 1% Rinderserumalbumin (Albumin; bovine Serum≥96%; Prod.nr. A6003-106;essentially fatty acid free, Sigma- Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) verdünnt, benetzt und inkubiert. Es wurden 1:50 Verdünnungen des Antikörpers für alle Organe außer für die p27 Darm Färbung (1:100 Verdünnung) hergestellt. Das Serumalbumin kann dabei eine verstärkte Hintergrundfärbung verhindern. Die Objektträger konnten anschließend bei Raumteperatur für eine Stunde in einer Feuchtkammer mit den Antikörpern inkubiert werden. Um die Antikörperlösung möglichst kompakt auf dem Gewebsschnitt zu halten, wurde dieser mit Hilfe eines Fettstiftes markiert. Die Negativkontrollen wurden nur mit der Trägerlösung (1% BSA) behandelt. Nachdem der Antikörper die Möglichkeit hatte, an das Antigen zu binden, wurde der Überschuss an Antikörper mit Hilfe einer drei mal fünf Minuten dauernden PBS Behandlung (PBS (10x) Dulbeccos Phosphate Buffered Saline; Gilbco^{TM}, Invitrogen Corporation, Praisley, Scotland, UK) gespült. Der PBS Puffer sowie das Aqua dest. wurden nach jedem Objektträgerdurchlauf während des gesamten Versuchs erneuert. Mit Hilfe eines monoklonalen Detektionssystems (Envision^{TM} System Labeled Polymer-HRP Anti- Rabbit; Prod.nr. K4003; Dako Cytomation, Carpinteria, CA) konnten die Schnitte nun für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert werden. Auch hier wurde anschließend jeder Objektträger dreimal fünf Minuten lang in PBS (PBS (10x) Dulbeccos Phosphate Buffered Saline; Gilbco^{TM}; Invitrogen Corporation, Praisley, Scotland, UK) gewaschen. Der letzte Schritt bestand darin, den Antikörper darzustellen, was durch die Behandlung mit Diaminobenzidin Substrate Chromogen System (Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Prod.nr. K3468, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) gelang. Unter mikroskopischer Sichtkontrolle wurde Diaminobenzidin auf den Objektträger aufgetragen bis sich die Expression von p21 und p27 in den Zellkernen deutlich darstellen ließ. Um eine zu starke Hintergrundfärbung zu vermeiden wurde diese Reaktion mit Leitungswasser gestoppt. Eine im Anschluss daran stattfindende Gegenfärbung des Gewebes mit Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie; Prod.nr. 1.09249.2500; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) dauerte eine Minute. Das Säubern der Schnitte mit Aqua dest. sowie eine Rehydrierung in einer aufsteigenden

Propanolreihe (2-Propanol für Analyse, Prod.nr. 33539, Riedel-de- Haen, Sigma–Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) begann mit je drei Minuten in einer 50%-igen Propanolverdünnung, verdünnt mit Aqua dest., einer 70%-igen Propanollösung und 100%-igem Propanol, sowie einem zwei mal drei Minuten dauerndem Entparaffinieren im Xylolbad (Xylol Isomerengemisch; Prod.nr. 16446, Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland). Das Eindeckeln (ENTELLAN® neu; Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie; Prod.nr. 1.07961.0100; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) der Objektträger beendete den Versuchsablauf.
Nach einer fünfzehnstündigen Trockenphase in Raumluft konnten die Objektträger ausgewertet werden.

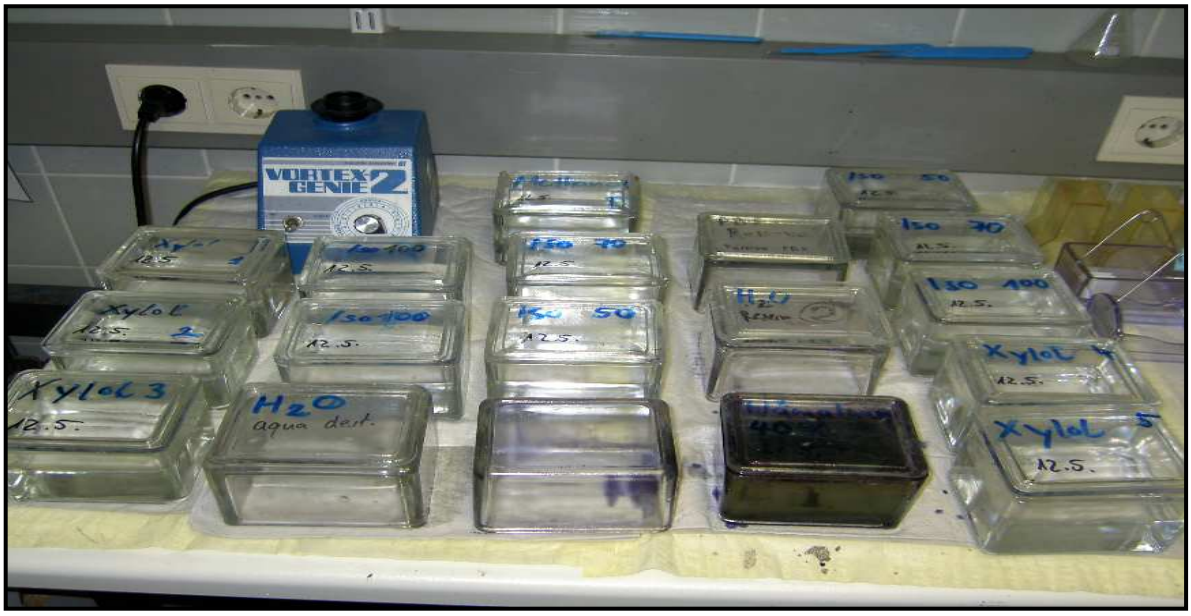


Abb. 8: Durchlaufen der Gewebsschnitte durch verschiedene Bäder
Durchlaufen der Gewebsschnitte durch ein Xylol-, Alkohol,- Methanol, sowie ein Hämalaunbad wie im Text beschrieben.



Abb. 9: Trockenphase der gefärbten Präparate
Trockenphase der gefärbten, eingedeckelten Präparate.



Abb. 10: Auswertung der Gewebsschnitte am Mikroskop
Auswertung der Gewebsschnitte unter dem Mikroskop nach ca. fünfzehnstündiger Trockenphase.

3.2.4 Die TUNEL-Färbung

Zur Darstellung apoptotischer Zellkerne wurde bei den Organen Niere, Rückenmark und Darm ein TUNEL-Test durchgeführt.

Die Schnitte wurden mittels Xylol (Xylol Isomerengemisch; Prod.nr. 16446; Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) in vier Zyklen von fünf Minuten Dauer entparaffiniert. Anschließend wurden sie in 100%-igem Ethanol (Apotheke, Universitätsklinikum Ulm) gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 Minuten in 100%, 90%, 70% Ethanol) rehydriert. Nach einem Waschen mit Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0; Tris; Prod.nr. 108382.2500; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für fünf Minuten konnten die Gewebeschnitte mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet und für exakt 15 Minuten mit Proteinkinase K (Firma ICN; Bestell-Nr. 193504; 20 mg/ml; Verdünnung 1:1000 mit Tris- Puffer auf 20 µl/ml) in einer Feuchtkammer bei 37 ˚C inkubiert werden. Nach dieser Zeit wurden die Schnitte zweimal in Aqua dest. gespült und für 5 Minuten in TBS-Puffer (50 mM; pH 7.6; 0,9% NaCl) gewaschen und nachfolgend für weitere 30 Minuten mit 0,1%-igem Wasserstoffperoxid (verdünnt in TBS; 200 ml TBS + 666 µl Wasserstoffperoxid) inkubiert. Durch diesen Vorgang konnte die endogene Peroxidase unterbunden werden. Nach dem Spülen mit TBS-Puffer wurden die einzelnen Proben fünf Minuten lang mit TdT-Spülpuffer inkubiert. Der TdT-Spülpuffer bestand aus 0,36 g 30 mM Tris (Tris, Prod.nr. 108382.2500, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland); 2,996 g 140 mM Na-Cacodylat (Na-Cacodylat, Prod.nr. 15540.02, Serva), 0,0238 g 1 mM Cobaltchlorid (Cobaltchlorid, Prod.nr. C-2644, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland), 0,25 g BSA (Bovine Serum Albumin, Prod.br. 11930, Serva), aufgefüllt auf 100 ml mit Aqua dest.. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt.

Die Inkubationslösung bestand pro Schnitt aus 0,5 µl Terminal Desoxynucleotidyl Transferase (TdT 15 U, Prod.nr. M187B, Fa. Promega, Madison, USA) plus 2,0 µl Digoxigenin-11-dUTP (Roche Boehringer-Mannheim, Prod.nr.:1093088, 1:20) plus
47,5 µl TdT-Puffer (5fach, Promega). Der Ansatz wurde dann für 90 Minuten in einer Feuchtkammer bei 37 ˚C im Brutschrank inkubiert. Die Negativkontrollen wurden nur mit dem TdT-Spülpuffer inkubiert. Es folgte ein Spülen mit TBS-Puffer und im Anschluss ein fünfminütiges Spülen mit 2%-igem Pferdeserum (in TBS-Puffer verdünnt). Jetzt konnte

ein Anti-Dig Fab Schaf Antikörper (Anti-Dig Fab Schaf, 1:200 in TBS-Puffer verdünnt) aufgetragen werden und eine Stunde lang bei Raumteperatur inkubiert werden. Nach einem weiteren Spülvorgang mit TBS-Puffer wurde für eine weitere Stunde ein Anti-Schaf-Antikörper (anti-Schaf POD, Jackson, Prod.nr. 713-036-147, 1:500 in TBS-Puffer verdünnt, plus 2% Pferdeserum) aufgetragen, der anschließend wieder mit TBS-Puffer abgespült wurde. Als Dedektionssystem wurde AEC verwendet. Die AEC-Lösung (10 ml) wurde folgendermaßen hergestellt: 2,1 ml Essigsäure 0,1 M wurden mit Natriumacetat 0,1 M auf 10 ml aufgefüllt und anschließend 500 ml davon verworfen. Diese Mischung wurde zu 4 mg AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Prod.nr. A-5754, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) gemischt mit 500 µl DMF (N, N-Dimethylformamid, Prod.nr. 40240, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) gegeben. Kurz vor Gebrauch wurde noch 5 µl H_2O_2 zu den 10 ml AEC-Lösung gegeben.
Die Reaktion konnte mit Leitungswasser gestoppt, und danach mit Hämalaun (Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie, Prod.nr. 1.09249.2500, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) eine Minute gegengefärbt werden. Die gefärbten Proben wurden anschließend für 10 Minuten mit Leitungswasser ausgewaschen. Am Versuchsende wurden die Gewebsschnitte mit auf 70 °C erhitzter Kaiser´s Glyceringelatine eingedeckelt (Kaiser´s Glyceringelatine, Prod.nr. 1.09242.0100, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

3.2.5 Die Nissl-Färbung

Um oxidativ geschädigte Nervenzellen im Rückenmark darzustellen und eine eindeutige statistische Auswertung geschädigter wie gesunder Nervenzellen machen zu können, wurde eine Nissl Färbung angefertigt. Die Schnitte wurden mittels Xylol (Xylol Isomerengemisch; Prod.nr. 16446; Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) in vier Zyklen von fünf Minuten Dauer entparaffiniert. Anschließend wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 10 Minuten in 100%, 96%, 75% Ethanol) rehydriert. Jetzt wurden die Gewebeschnitte in Aqua.dest. und anschließend noch in Essigsäure (Essigsäure zur Analyse 100%, Merck KG, Darmstadt, Deutschland) gespült. Nun erfolgte die Färbung der Schnitte mit Hilfe der Nissl-Lösung (Kresylviolett, Certistain, Merck KG, Darmstadt, Deutschland) für ein bis drei Minuten.

Die Nissl-Lösung bestand aus 1 g Kresylviolett, 1000 ml Aqua.dest. und 0,5 ml 100%ige Essigsäure zu Analyse.
Anschließend wurden die Gewebeschnitte erneut in 1% Essigsäure (Essigsäure zur Analyse 100%, Merck KG, Darmstadt, Deutschland) gespült. Nach dem Durchlaufen eines 100%igem Alkoholbads und einem Spülen in Xylol (Xylol Isomerengemisch; Prod.nr. 16446; Riedel-de-Haen; Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) wurden die Schnitte dann automatisiert eingedeckelt (Kaiser´s Glyceringelatine, Prod.nr. 1.09242.0100, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

3.3 Auswertung der Gewebeproben

3.3.1 Die Auswertung der Haematoxylin-Eosin Färbung

Die HE-Gewebsschnitte wurden in Zusammenarbeit mit der Pathologin Dr. Hasel der Universitätsklinik Ulm am Mikroskop ausgewertet. Es wurden Auffälligkeiten im histologischen Schnitt gesucht und anschließend die Schnitte der beiden Versuchsgruppen miteinander verglichen. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf Ischämie-Reperfusionsbedingte, oder durch Zellstress hervorgerufene Zellveränderungen gelegt. Als chronisch identifizierte Veränderungen der Gewebe werden in dieser Arbeit nicht erwähnt, da sie in keinem Zusammenhang mit den Ischämie-Reperfusionsschäden nach thorakalem Aortenclamping stehen. Die HE-Schnitte des Rückenmarks wurden zusätzlich noch zusammen mit der Neuropathologin Dr. Scheuerle des Klinikums Günzburg mikroskopiert.

3.3.2 Die Auswertung der immunhistochemischen Präparate

Die Schnitte wurden verblindet am Mikroskop in 20-40-facher Vergrößerung ausgewertet. Hierbei wurde nur eine Färbung des Zellkerns als positiv bewertet. Die Vorgehensweise, Beurteilung und Auswertung der Präparate wurde in Zusammenarbeit mit dem Pathologen PD Dr. Straeter der Universitätsklinik Ulm gemacht.

Für das ***Rückenmark*** konnte für p21 ein kompletter Querschnitt in der 20-fachen Vergrößerung ausgewertet werden. Dazu wurden in jedem Querschnitt, aufgeteilt nach weißer Substanz, grauer Substanz und Blutgefäßen, jeweils die Anzahl der positiven Zellkerne bestimmt.
Für p27 wurden jeweils fünf Gesichtsfelder unter dem Mikroskop in der 20-fachen Vergrößerung ausgezählt, da wegen der höheren Anzahl an positiven Zellkernen eine Auszählung eines gesamten Querschnittes nicht möglich war.

Für die ***Niere*** wurde bei p21 ein Feld von 0,5 cm x 0,5 cm in der Nierenrinde gewählt und in der 20-fachen Vergrößerung in diesem Feld die Anzahl der positiven Zellkerne in den Glomeruli, den Tubuli, den Blutgefäßen und dem Interstitium bestimmt.
Für p27 wurden jeweils fünf Gesichtsfelder in der 20-fachen Vergrößerung ausgezählt.

Für den ***Darm*** wurde bei p21 jeweils ein Feld von 0,5 cm x 0,5 cm der Darmwand ausgezählt. Hierbei wurden Zellkerne der Tunica mukosa, der Tunica submukosa, der Tunica muskularis und der Blutgefäße unterschieden.
Für p27 wurden wiederum jeweils fünf Gesichtsfelder in der 40-fachen Vergrößerung gezählt, um positive Kerne besser identifizieren zu können.

Tabelle 3: Mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Präparate
Auswerung der immunhistochemisch angefärbten Schnitte mit der Angabe der Größe des ausgezählten Bereichs sowie der mikroskopischen Vergrößerung. P21 entpricht dem Protein mit 21-kDalton. P27 entsrpicht dem Protein mit 27-kDalton.

CDKI Expression	Größe	Objektiv
p21 Darm	0,5 cm × 0,5 cm Feld	20 fach
p21 Niere	0,5 cm × 0,5 cm Feld	20 fach
p21 Rückenmark	1 Rückenmarksquerschnitt	20 fach
p27 Darm	5 Gesichtsfelder	40 fach
p27 Niere	5 Gesichtsfelder	20 fach
p27 Rückenmark	5 Gesichtsfelder	20 fach

3.3.3 Die Auswertung der TUNEL-Färbung

Die Auswertung des TUNEL-Tests erfolgte entsprechend der immunhistochemischen Auswertung. Auch hier sollten positive Zellkerne ausgezählt werden.

3.3.4 Die Auswertung der Nissl-Färbung des Rückenmarks

Die Auswertung der Nissl-Färbung erfolgte am Mikroskop bei 20-40 facher Vergrößerung. Dabei wurden nur gesamte Rückenmarksquerschnitte ausgewertet. Durch die anfänglichen Probeläufe des Versuchs und wegen der Optimierung der Färbung bei diesen Versuchtieren standen hier letztendlich leider nicht mehr alle Rückenmarksquerschnitte der Auswertung zur Verfügung. Deshalb wurde hier eine geringere Anzahl (n=10) von Versuchsschnitten mikroskopiert und statistisch ausgewertet.

3.3.5 Die statistische Auswertung der Ergebnisse

Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden für die Messergebnisse der Placebogruppe wie auch der INO-1001 Gruppe der Median, die Minimal- und Maximalwerte, der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet und in Tabellen aufgeführt. In den Diagrammen wurde bei der Darstellung der Auswertung der Nissl Färbung zugunsten der Übersichtlichkeit die INO-1001 Gruppe im selben Diagramm wie die Placebogruppe dargestellt.

Für die Auswertung wurde folgendes statistisches Testverfahren verwendet:

- *Mann-Whitney Rank Sum Test:* Vergleich der Messergebnisse der beiden Medikamentengruppen bei gleichem MZP.

Als Irrtumswahrscheinlichkeit wurde $p < 0,05$ festgelegt. Mit p^* wurde ein signifikantes Ergebnis dargestellt.

Die statistische Beratung erfolgte durch PD Dr. Rainer Muche (*Abteilung Biometrie und Medizinische Dokumentation der Universität Ulm*). Zur Dokumentation der Daten wurde das Programm Microsoft® Access 2000 benutzt. Die Berechnung und statistische Auswertung, wie auch die Darstellung der Tabellen erfolgte mit dem Programm WinSTAT (Version 2003.1, R. Fitch Software) in Kombination mit dem Programm Microsoft® Excel (Version 2002) und Microsoft® Word (Version 2002) und dem Programm SigmaPlot (Version 8.0).

4 ERGEBNISSE

4.1 Die Ergebnisse der Haematoxylin-Färbung

In der Haematoxylin Färbung konnten bei den histologischen Schnitten vom Darm und der Niere keine Unterschiede in der Gewebsmorhologie zwischen Placebo- und INO-1001 Versuchstieren festgestellt werden.
Bei den Rückenmarksquerschnitten zeigte sich eine vermehrte Vakuolenbildung, häufiger Zellkernverlust und auch Zellschwellungen als Zeichen einer durch Zellstress veränderten Gewebsmorphologie. Dabei konnte ein Unterschied in der Größe der intrazellulären Vakuolen sowie der Anzahl und Art der geschädigten Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen erkannt werden. Da aber auch mit Hilfe einer erfahrenen Neuropathologin keine Einteilung der Gewebeschädigungen nach einem Scoringsystem möglich waren, wurde im Anschluß daran eine Nissl-Färbung angeschlossen. Die Nissl-Färbung ermöglichte eine statistische Auswertung der Gewebeschnitte des Rückenmarks.

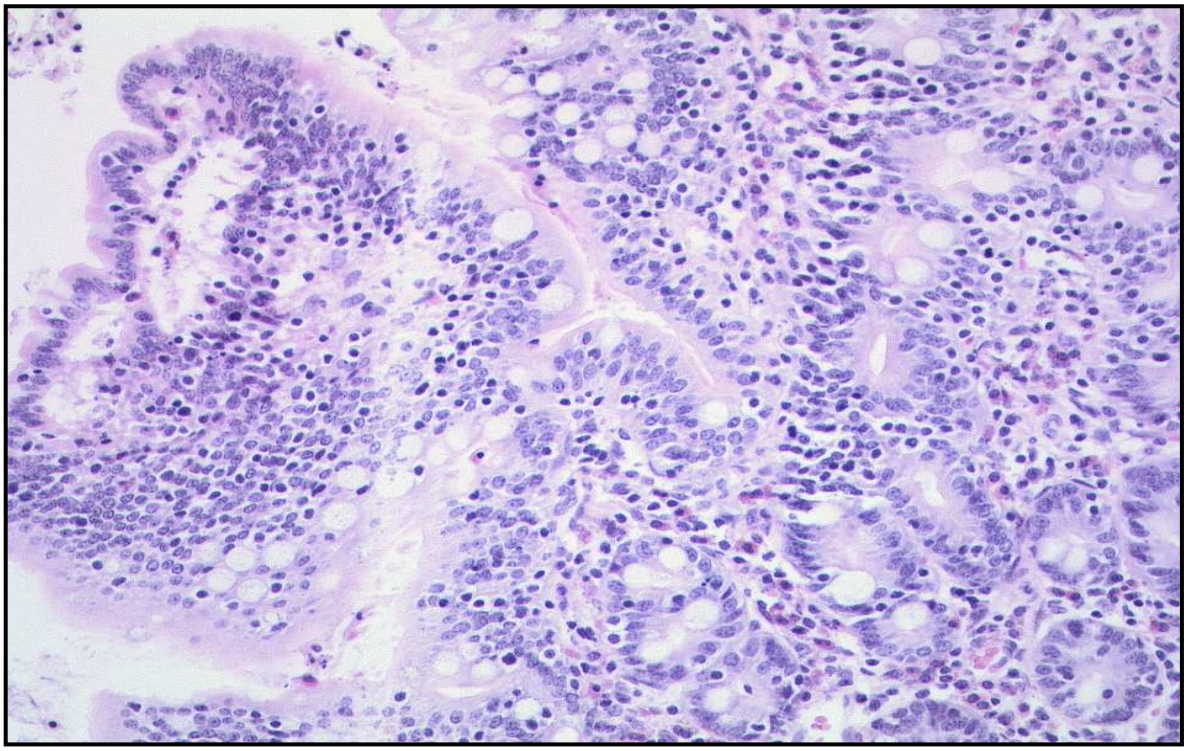


Abb. 11: HE-Färbung des Darms eines Placebotieres
Die HE-Färbung (Haematoxylin) des Darms eines Placebo-Versuchstiers zum Nachweis morhologischer Veränderungen (10x).

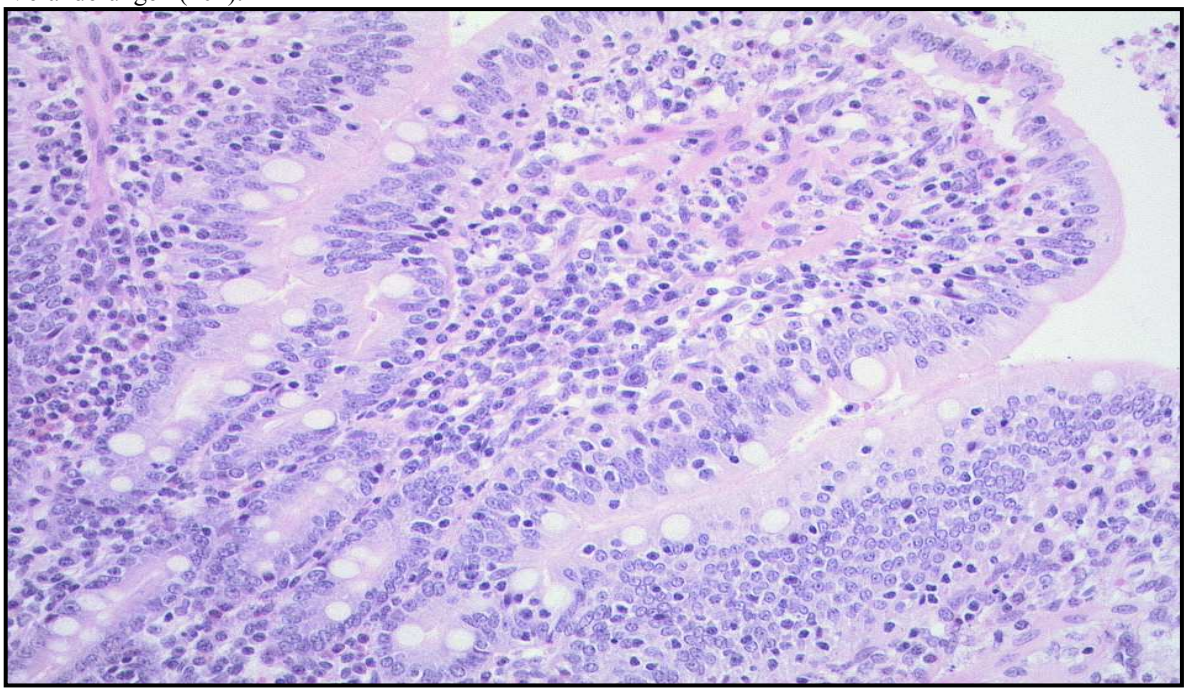


Abb. 12: HE-Färbung des Darms eines INO-1001 Tieres
Die HE-Färbung (Haematoxylin) des Darms eines INO-1001 Versuchstiers zum Nachweis morhologischer Veränderungen (10x).

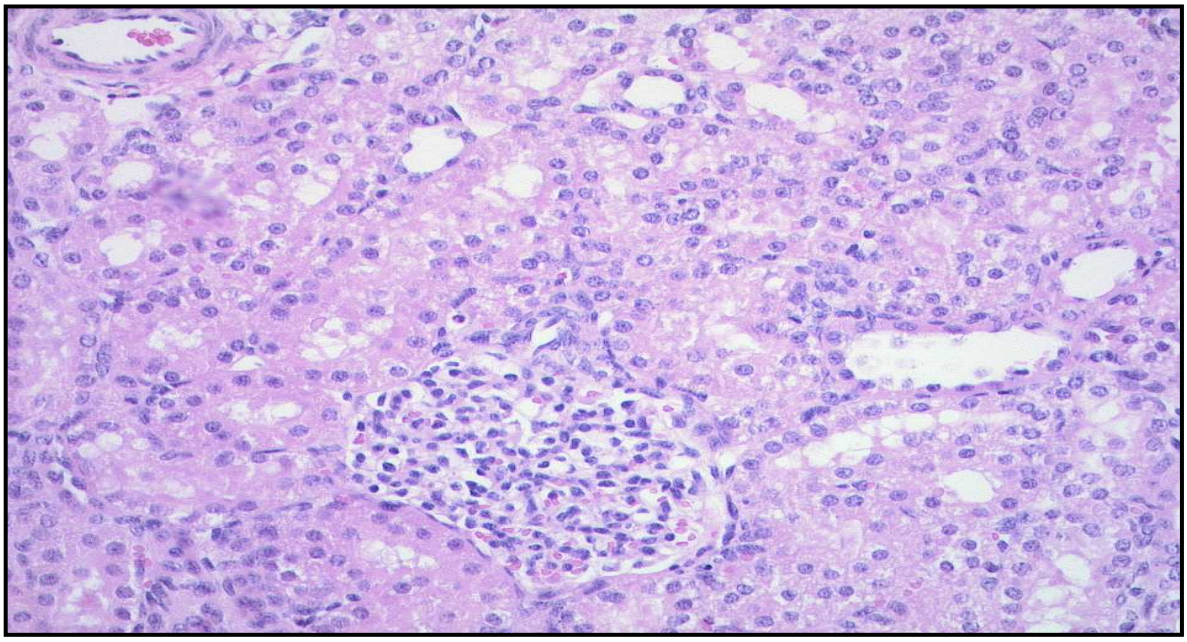


Abb. 13: HE-Färbung des Nierengewebes eines Placebotieres
Die HE-Färbung (Haematoxylin) des Nierengewebes eines Placebo Versuchstiers zum Nachweis morhologischer Veränderungen (10x).

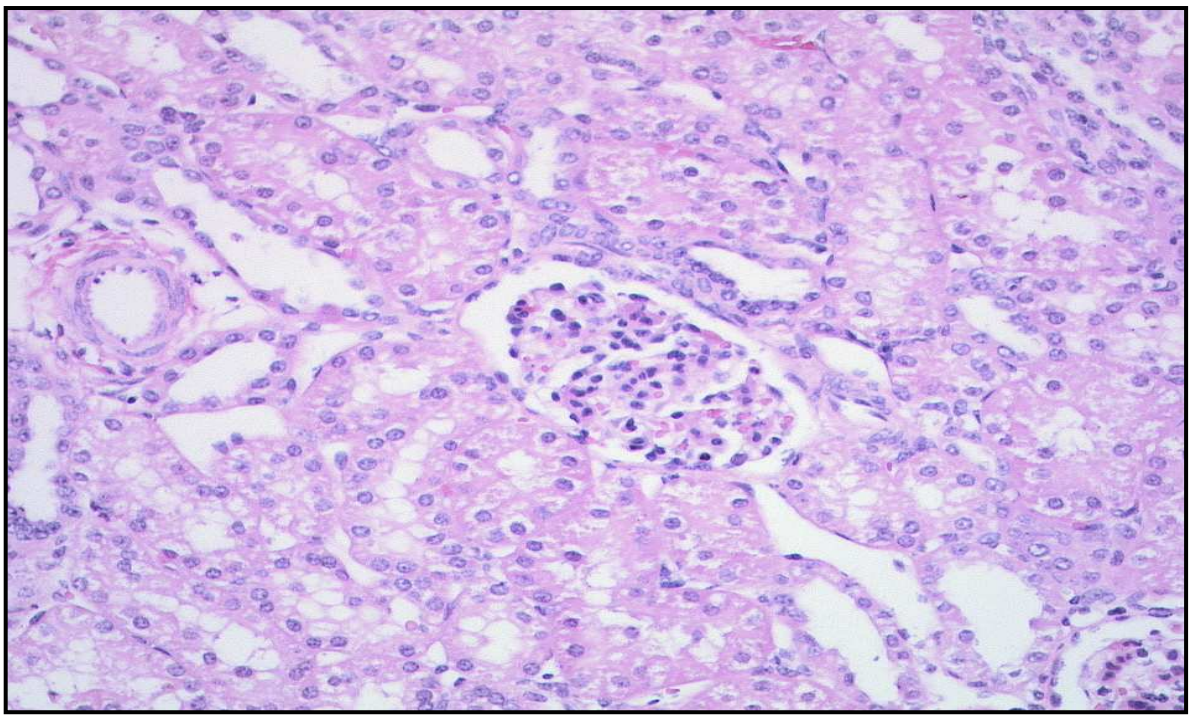


Abb. 14: HE-Färbung des Nierengewebes eines INO-1001 Tieres
Die HE-Färbung (Haematoxylin) des Nierengewebes eines INO-1001 Versuchstiers zum Nachweis morhologischer Veränderungen (10x).

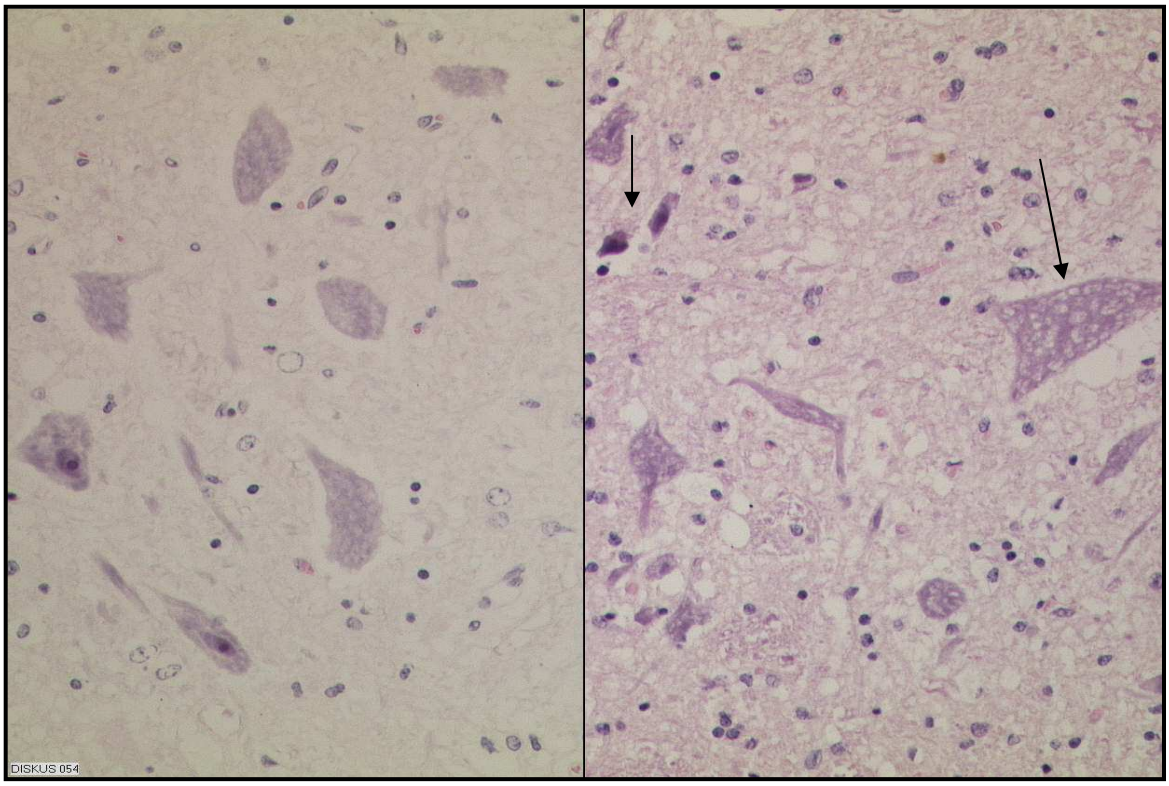


Abb. 15: Vergleich der HE-Färbung des Rückenmarks zwischen den Versuchstieren
Die HE-Färbung (Haematoxylin-Eosin) des Rückenmarks eines INO-1001 Versuchstiers links im Vergleich zu einem Placebotier rechts. Während im linken Bild die gut erhaltenen Neurone sichtbar sind, erkennt man rechts Neuronen mit stark geschwollenem Zytoplasma, einer Vakuolisierung des Zytoplasmas, einer Kondensierung des Zytoplasmas sowie Kernchromatindichteveränderungen einzelner Neuronen (10x).

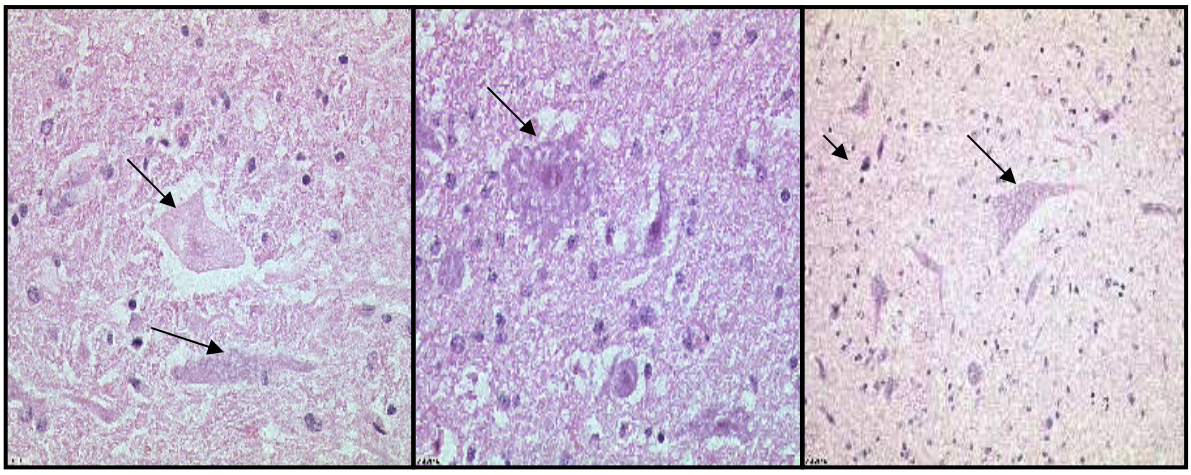


Abb. 16: HE-Färbungen des Rückenmarks von Placebotieren
Die HE-Färbungen (Haematoxylin) des Rückenmarks von Placebotieren mit Zellvakuolisierung, schwach angefärbtem Zytoplasma sowie Kernchromatindichteveränderungen der geschädigten Neurone (10x).

4.2 Immunhistochemische Ergebnisse

4.2.1 Darm-p21Waf1/Cip1 Expression

Tabelle 4: Statistische Auswertung der p21 Expression des Darmgewebes
p21 Protein 21 kDalton
p-Wert (U-Test) Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
n Anzahl der Versuchtiere

p21-Expression Darm	**Placebotiere (n=8)**	**INO-1001 Tiere (n=9)**	**p-Wert * (U-Test)**
	Median (range)	**Median (range)**	
Tunica mucosa	104 (87-275)	102 (40-163)	0,674
Tunica submucosa	4 (1-83)	2 (0-11)	0,600
Tunica muscularis	23 (3-94)	9 (2-43)	0,049
Gefäßendothel	2 (0-26)	2 (0-26)	0,463
Gesamt	144 (92-484)	122 (49-195)	0,128

Die Tabelle stellt einen Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne pro ausgezähltem Dünndarmabschnitt, mit einer Länge von 0,5 cm, untergliedert nach Tunica mucosa, Tunica submucosa, Vaskularis, Tunica muscularis und der Gesamtsumme, zwischen der Placebo- und INO-1001 Gruppe dar. „Gesamt“ entspricht der Summe der angefärbten Zellkerne in der Tunica mucosa, Tunica submucosa, dem Gefäßendothel und der Tunica muscularis. Die Werte sind angegeben als Median und Range. Die Berechnung eines p-Wertes erfolgte mit dem U-Test, mit der Annahme einer Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05. Es zeigen sich für die Tunica mucosa, submucosa, vakularis und muscularis keine signifikanten Unterschiede angefärbter Zellkerne zwischen der Placebogruppe und der INO-1001 Versuchsgruppe.

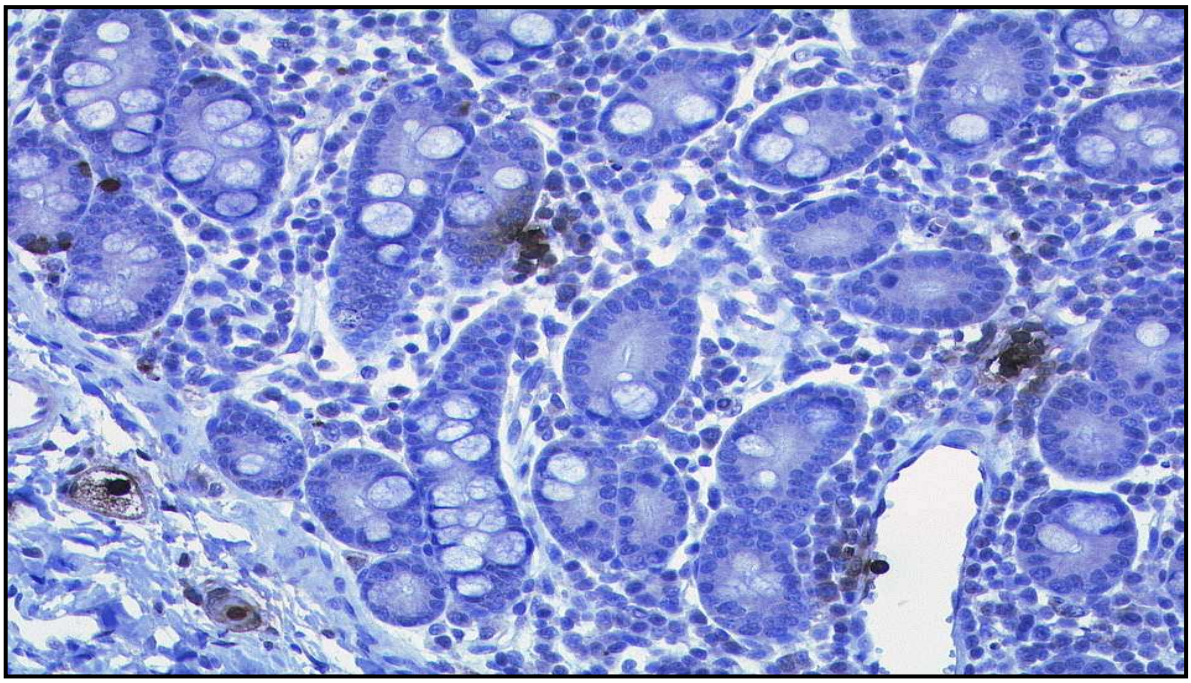


Abb. 17: p21 Expression im Darmgewebe eines Placebotieres
Immunhistologie p21 (Protein 21 kDalton) des Darmgewebes eines Placebo Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p21 exprimieren (10x).

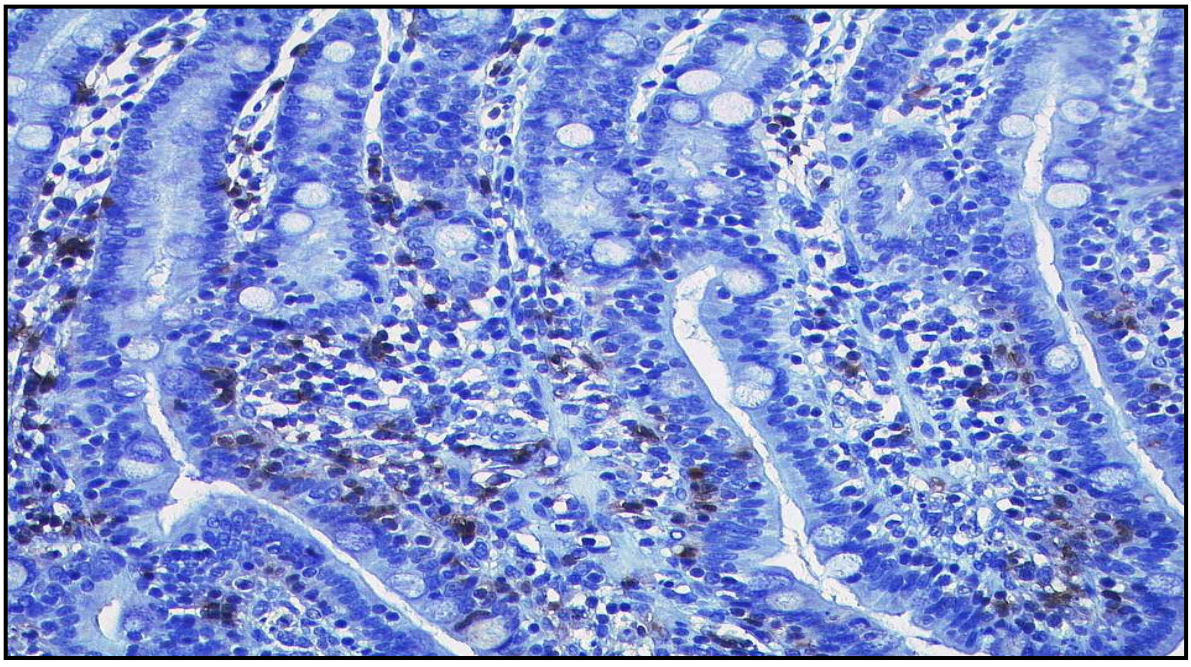


Abb. 18: p21 Expression im Darmgewebe eines INO-1001 Tieres
Immunhistologie p21 (Protein 21 kDalton) des Darmgewebes eines INO-1001 Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p21 exprimieren (10x).

4.2.2 Niere-p21Waf1/Cip1 Expression

Tabelle 5: Statistische Auswertung der p21 Expression des Nierengewebes
p21 Protein 21 kDalton
p-Wert (U-Test) Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
n Anzahl der Versuchtiere

p21-Expression Niere	**Placebotiere (n=8)** **Median (range)**	**INO-1001 Tiere (n=9)** **Median (range)**	**p-Wert * (U-Test)**
Glomerulär	127 (58-303)	75 (68-288)	0,575
Tubulär	171 (77-232)	175 (78-271)	0,161
Interstitiell	0 (0)	0 (0)	-
Gefäßendothel	0 (0-2)	0 (0-3)	0,285
Gesamt	268 (206-535)	289 (149-532)	0,674

Die Tabelle stellt einen Vergleich der Anzahl angefärbter Zellkerne pro ausgezähltem Feld (0,5 cm×0,5 cm) der p21-Expression der Niere, untergliedert nach Glomeruli, Tubuli, Blutgefäßen, interstitiellem Gewebe und der Gesamtsumme, zwischen der Placebo- und der INO-1001 Versuchsgruppe dar. „Gesamt“ entspricht der Summe der angefärbten Zellkerne in den Glomeruli, Tubuli, Gefäßendothel und im interstitiellen Gewebe.
Werte sind angegeben als Median und Range. Die Berechnung eines p-Wertes erfolgte mit dem U-Test, mit der Annahme einer Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05.
Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede für die in den Glomeruli, Tubuli, Blutgefäßen und im interstitiellen Gewebe angefärbten Zellkerne zwischen der Placeboguppe und der INO-1001 Versuchsgruppe.

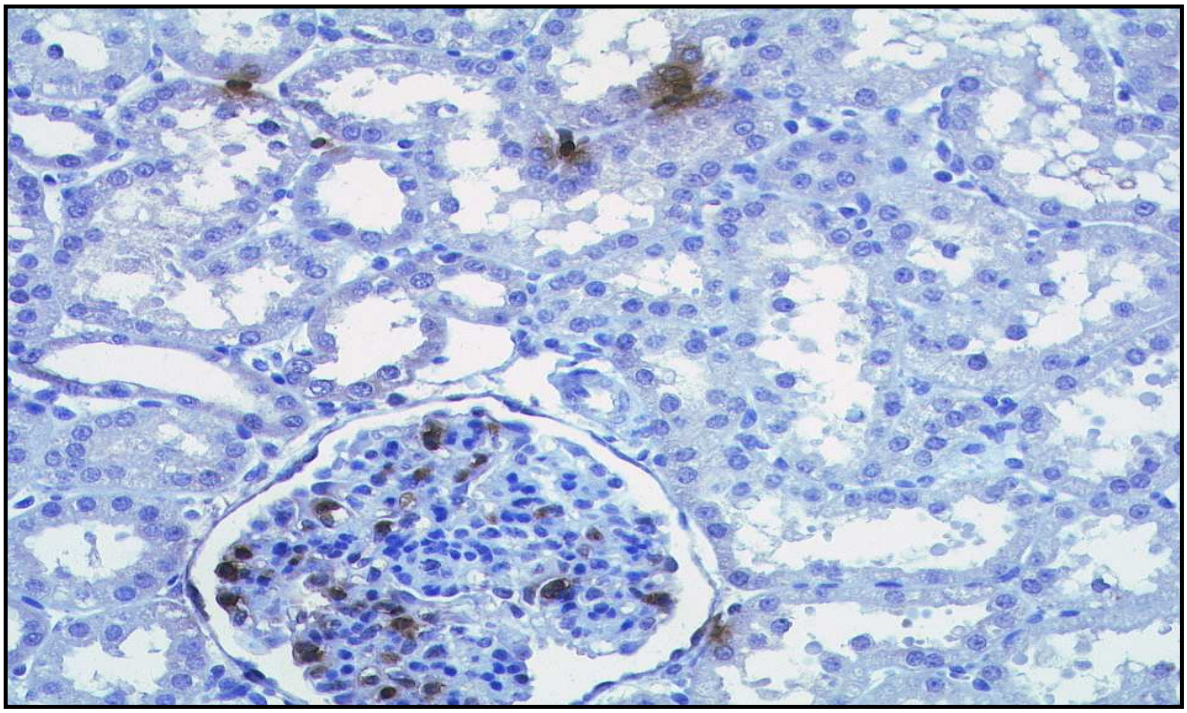


Abb. 19: p21 Expression des Nierengewebes eines Placebotieres
Immunhistologie p21 (Protein 21 kDalton) des Nierengewebes eines Placebo Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p21 exprimieren (10x).

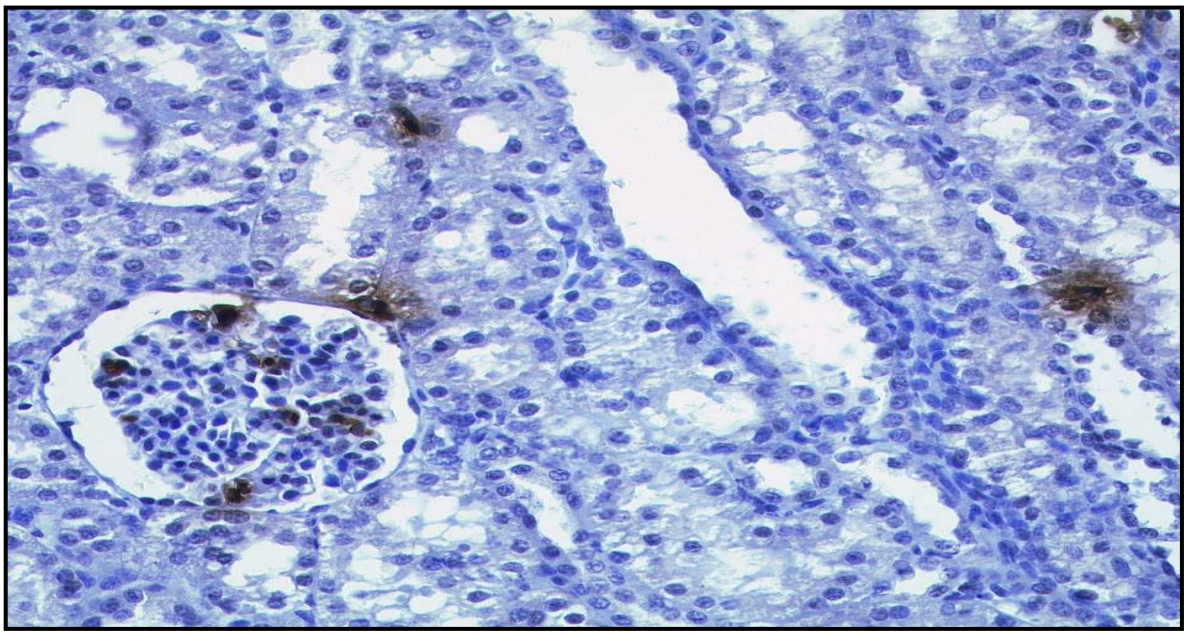


Abb. 20: p21 Expression des Nierengewebes eines INO-1001 Tieres
Immunhistologie p21 (Protein 21 kDalton) des Nierengewebes eines INO-1001 Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p21 exprimieren (10x).

4.2.3 Rückenmark-p21Waf1/Cip1 Expression

Tabelle 6: Statistische Auswertung der p21 Expression des Rückenmarks
p21 Protein 21 kDalton
p-Wert (U-Test) Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
n Anzahl der Versuchtiere

p21-Expression Rückenmark	**Placebotiere (n=8)**	**INO-1001 Tiere (n=9)**	**p-Wert * (U-Test)**
	Median (range)	**Median (range)**	
Graue Substanz	11 (2-28)	11 (3-43)	0,699
Weiße Substanz	10 (1-26)	6 (0-18)	0,288
Gefäßendothel	0 (0-3)	0 (0-3)	0,828
Gesamt	26 (3-43)	14 (6-55)	1,000

Die Tabelle stellt einen Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne pro Rückenmarksquerschnitt, untergliedert nach grauer Substanz, weißer Substanz, Blutgefäßen und der Gesamtsumme zwischen der Placebo- und der INO-1001 Versuchsgruppe dar. „Gesamt“ entspricht der Summe der angefärbten Zellkerne in der grauen Substanz, der weißen Substanz und in dem Gefäßendothel.
Die Werte sind angegeben als Median und Range.
Die Berechnung eines p-Wertes erfolgte mit dem U-Test, mit der Annahme einer Signifikanz bei einem p-Wert $< 0,05$.
Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede für die in der grauen Substanz, weissen Substanz und den, in den Blutgefäßen angefärbten Zellkerne zwischen der Placebogruppe und der INO-1001 Versuchsgruppe.

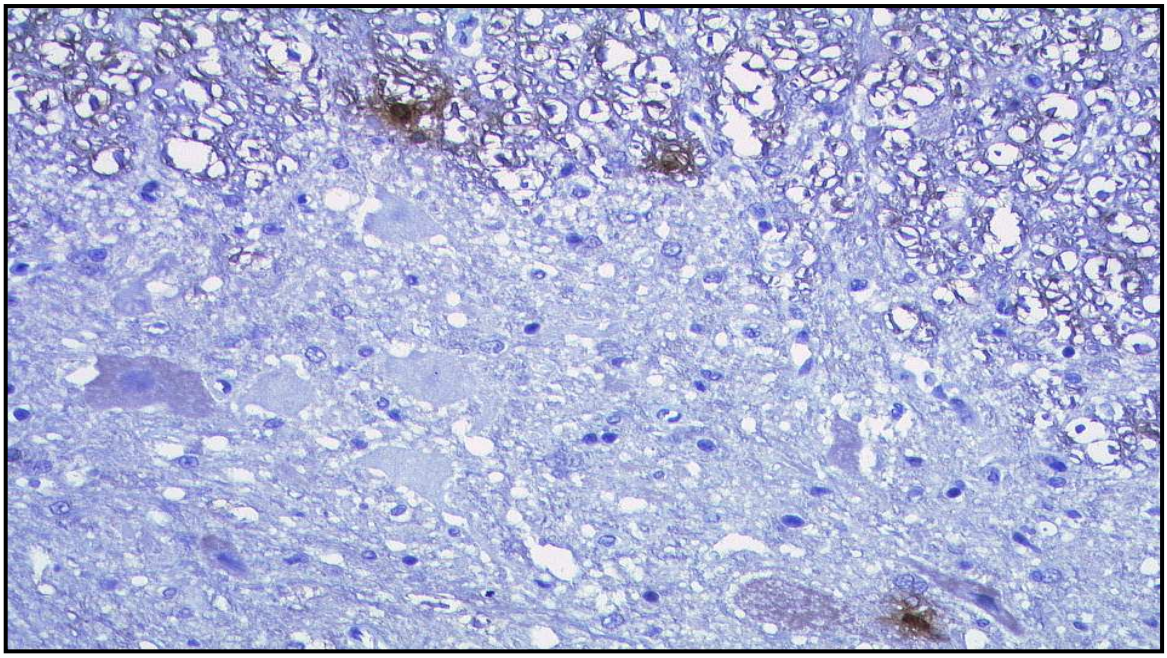


Abb. 21: p21 Expression des Rückenmarks eines Placebotieres
Immunhistologie p21 (Protein 21 kDalton) des Rückenmarks eines Placebo Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p21 exprimieren (20x).

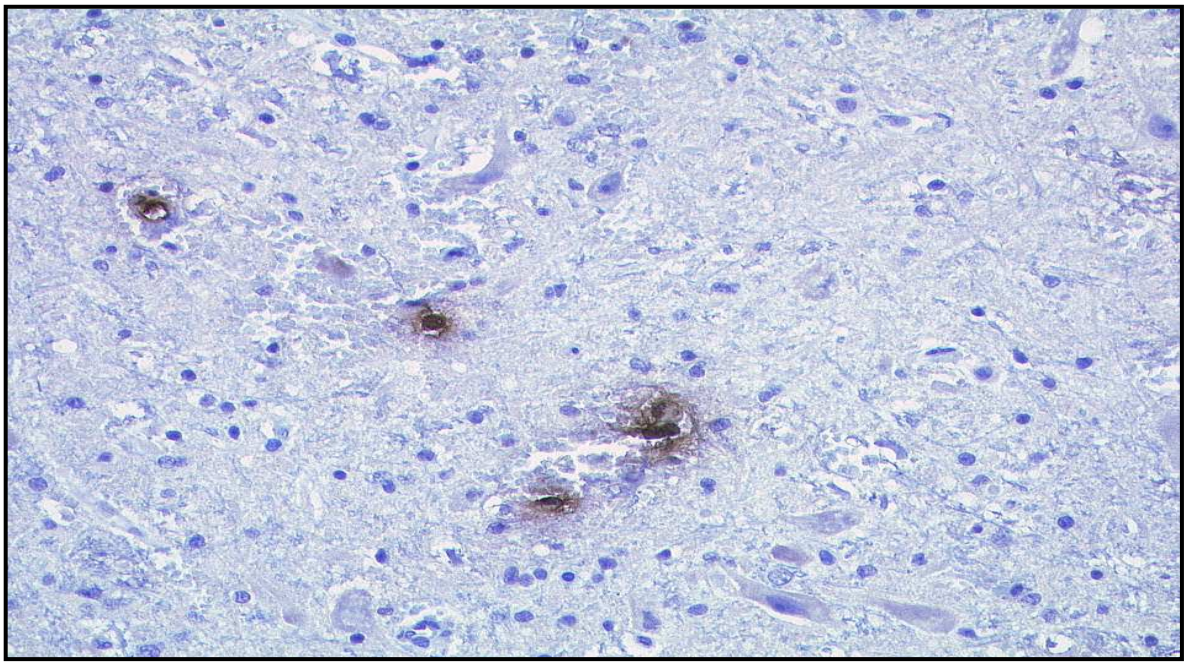


Abb. 22: p21 Expression des Rückenmarks eines INO-1001 Tieres
Immunhistologie p21 (Protein 21 kDalton) des Rückenmarks eines INO-1001 Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p21 exprimieren (20x).

4.2.4 Darm-p27Kip1 Expression

Tabelle 7: Statistische Auswertung der p27 Expression des Darmgewebes
p27 Protein 27 kDalton
p-Wert (U-Test) Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
n Anzahl der Versuchtiere

p27-Expression Darm	**Placebotiere (n=8)** **Median (range)**	**INO-1001 Tiere (n=9)** **Median (range)**	**p-Wert * (U-Test)**
Tunica mucosa	121 (80-637)	133 (85-364)	0,923
Tunica submucosa	73 (53-103)	73 (30-122)	0,923
Tunica muscularis	101 (83-114)	85 (23-119)	0,123
Gefäßendothel	24 (11-53)	26 (11-56)	0,923
Gesamt	330 (243-839)	333 (149-536)	0,847

Die Tabelle stellt einen Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne pro ausgezähltem Dünndarmabschnitt, einer Länge von 0,5 cm, untergliedert nach Tunica mucosa, Tunica submucosa, Blutgefäßen, Tunica muscularis und der Gesamtsumme, zwischen der Placebo- und der INO- 1001 Versuchsgruppe dar. „Gesamt“ entspricht der Summe der angefärbten Zellkerne in der Tunica mucosa, Tunica submucosa, dem Gefäßendothel und der Tunica muscularis.

Die Werte sind angegeben als Median und Range.

Die Berechnung eines p-Wertes erfolgte mit dem U-Test, mit der Annahme einer Signifikanz bei einem p-Wert $< 0,05$.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede für die in der Tunica mucosa, der Tunica submucosa, der Vascularis und der Tunica muscularis angefärbten Zellkerne zwischen der Placebogruppe und der INO-1001 Versuchsgruppe.

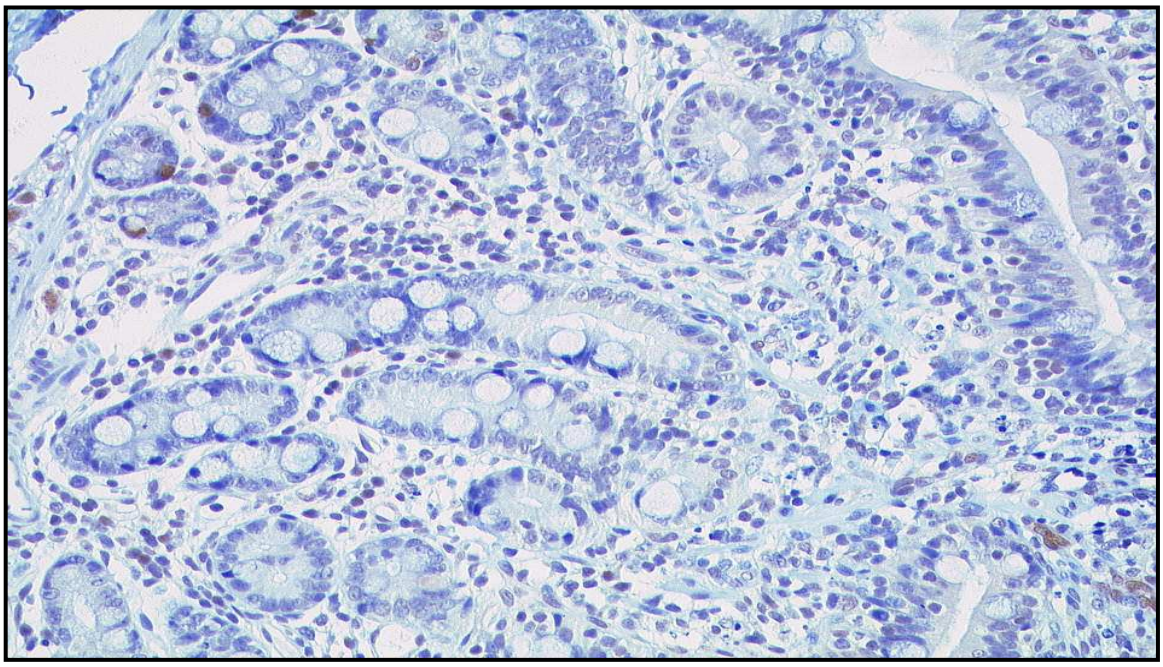


Abb. 23: p27 Expression des Darmgewebes eines INO-1001 Tieres
Immunhistologie p27 (Protein 27 kDalton) des Darmgewebes eines INO-1001 Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p27 exprimieren (10x).

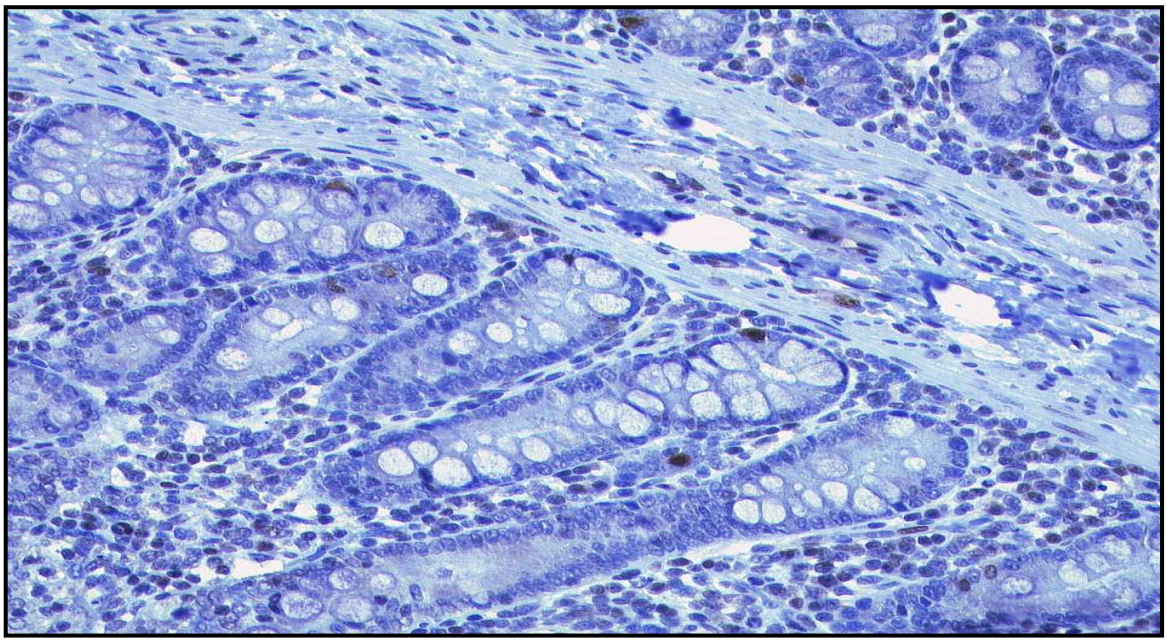


Abb. 24: p27 Expression des Darmgewebes eines Placebotieres
Immunhistologie p27 (Protein 27 kDalton) des Darmgewebes eines Placebo Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p27 exprimieren (10x).

4.2.5 Niere-p27Kip1 Expression

Tabelle 8: Statistische Auswertung der p27 Expression des Nierengewebes
p27 Protein 27 kDalton
p-Wert (U-Test) Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
n Anzahl der Versuchtiere

p27-Expression Niere	**Placebotiere (n=8)** **Median (range)**	**INO-1001 Tiere (n=9)** **Median (range)**	**p-Wert * (U-Test)**
Glomerulär	111 (36-146)	95 (79-121)	0,289
Tubulär	523 (189-768)	470 (177-641)	0,923
Interstitiell	13 (6-13)	23 (3-27)	0,923
Gefäßendothel	13 (0-16)	3 (0-16)	0,923
Gesamt	679 (292-921)	592 (324-763)	0,885

Die Tabelle stellt einen Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne pro ausgezähltem Feld, 0,5 cm×0,5 cm, untergliedert nach Glomeruli, Tubuli, Blutgefäßen, interstitiellem Gewebe und der Gesamtsumme, zwischen der Placebo- und der INO-1001 Versuchsgruppe dar. „Gesamt“ entspricht der Summe der angefärbten Zellkerne in den Glomeruli, Tubuli, Gefäßendothel und im intersritiellen Gewebe.
Die Werte sind angegeben als Median und Range.
Die Berechnung eines p-Wertes erfolgte mit dem U-Test, mit der Annahme einer Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05.
Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede für die in den Glomeruli, Tubuli, Blutgefäßen und im Bindegewebe angefärbten Zellkerne zwischen der Placebogruppe und der INO-1001 Versuchsgruppe.

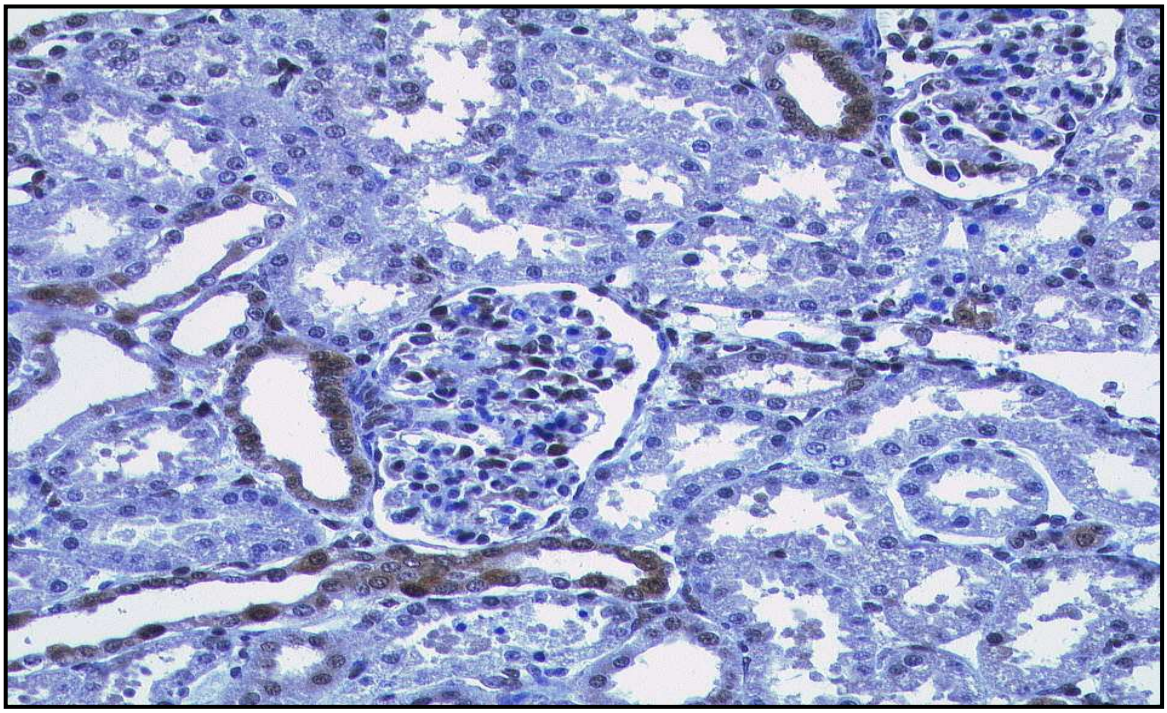


Abb. 25: p27 Expression des Nierengewebes eines Placebotieres
Immunhistologie p27 (Protein 27 kDalton)des Nierengewebes eines Placebo Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p27 exprimieren (10x).

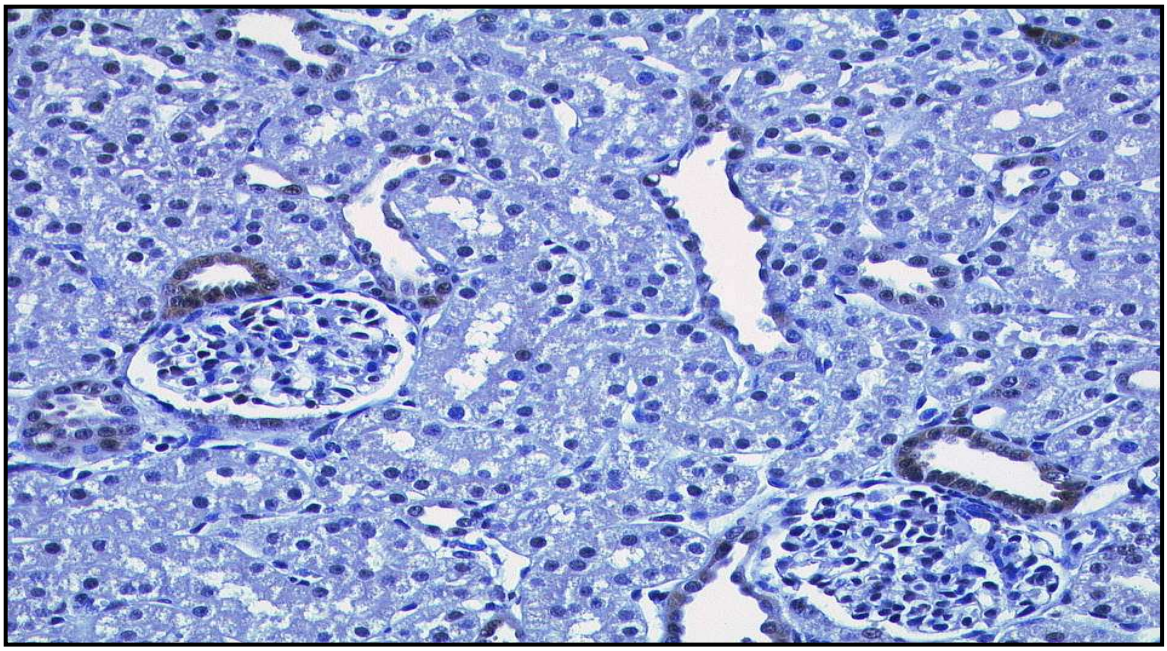


Abb. 26: p27 Expression des Nierengewebes eines INO-1001 Tieres
Immunhistologie p27 (Protein 27 kDalton) des Nierengewebes eines INO-1001 Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p27 exprimieren (10x).

4.2.6 Rückenmark-p27Kip1 Expression

Tabelle 9: Statistische Auswertung der p27 Expression des Rückenmarks
p27 Protein 27 kDalton
p-Wert (U-Test) Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben
n Anzahl der Versuchtiere

p27-Expression Rückenmark	**Placebotiere (n=8)** **Median (range)**	**INO-1001 Tiere (n=9)** **Median (range)**	**p-Wert * (U-Test)**
Graue Substanz	646 (447-749)	621 (453-781)	1,000
Weiße Substanz	539 (296-599)	527 (431-699)	1,000
Gefäßendothel	0 (0)	0 (0)	-
Gesamt	1214 (743-1259)	1152 (884-1398)	0,772

Die Tabelle stellt einen Vergleich der Anzahl der angefärbten Zellkerne pro ausgezähltem Feld, 0,5 cm × 0,5 cm, untergliedert nach grauer Substanz, weißer Substanz, Blutgefäßen und der Gesamtsumme zwischen der Placebo- und der INO-1001 Versuchsgruppe dar. „Gesamt“ entspricht der Summe der angefärbten Zellkerne in der grauen Substanz, weißen Substanz und in dem Gefäßendothel.
Die Werte sind angegeben als Median und Range.
Die Berechnung eines p-Wertes erfolgte mit dem U-Test, mit der Annahme einer Signifikanz bei einem p-Wert < 0,05.
Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede für die in der grauen Substanz, der weißen Substanz und den Blutgefäßen angefärbten Zellkerne zwischen der Placebogruppe und der INO-1001 Versuchsgruppe.

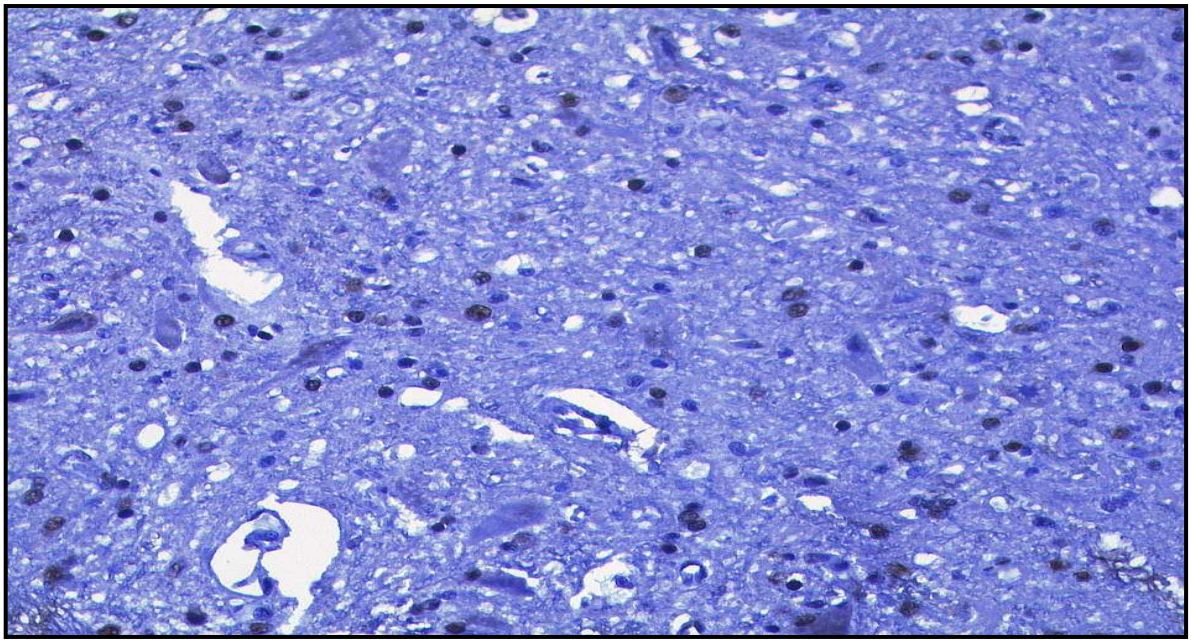


Abb. 27: p27 Expression des Rückenmarks eines Placebotieres
Immunhistologie p27 (Protein 27 kDalton) des Rückenmarks eines Placebo Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p27 exprimieren (10x).

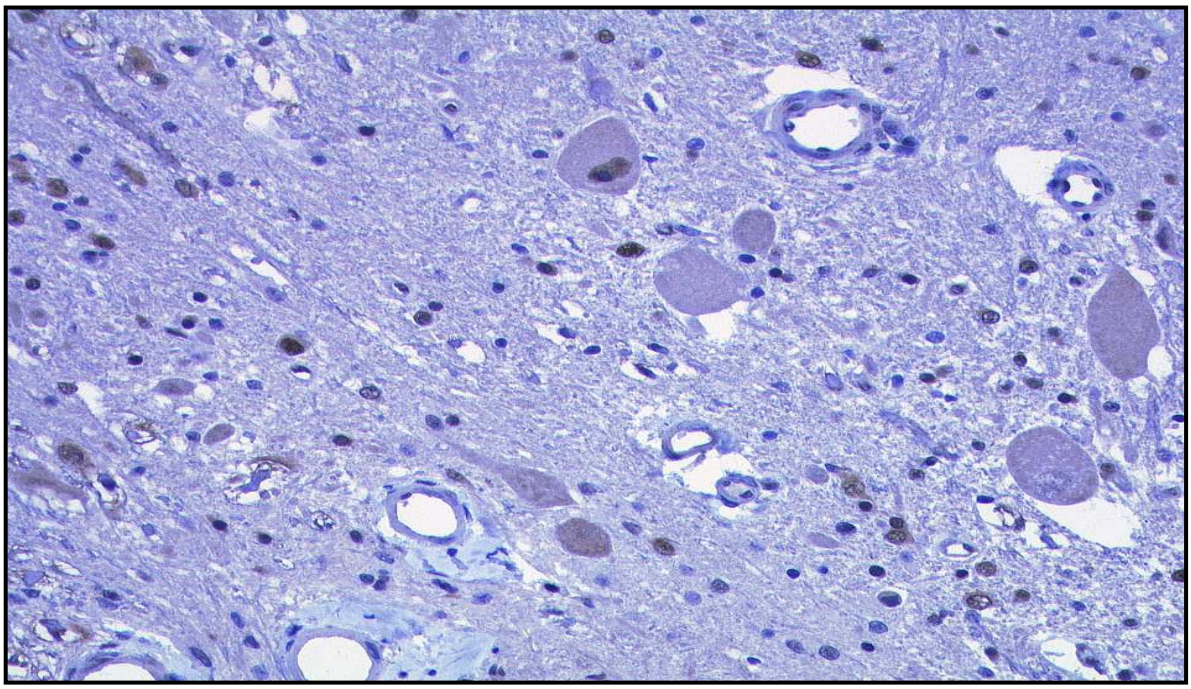


Abb. 28: p27 Expression des Rückenmarks eines INO-1001 Tieres
Immunhistologie p27 (Protein 27 kDalton)des Rückenmarks eines INO-1001 Versuchstiers. Angefärbt zeigen sich die Nuclei, welche das Gen p27 exprimieren (10x).

4.3 Die Ergebnisse der TUNEL-Färbung

Die TUNEL- Färbung zeigte nur eine sehr geringe Anfärbung an apoptotischen Zellkernen im Darm, dem Rückenmark wie auch dem Nierengewebe. Diese vereinzelten Apoptosen zeigen sich in beiden Versuchsgruppen und stellen, laut Aussage des Pathologen, am ehesten einen physiologischen Zustand der Gewebe dar. Somit war eine sinnvolle statistische Auswertung zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht möglich. Es zeigten sich aber keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen der Placebo- und der INO-1001 Gruppe.

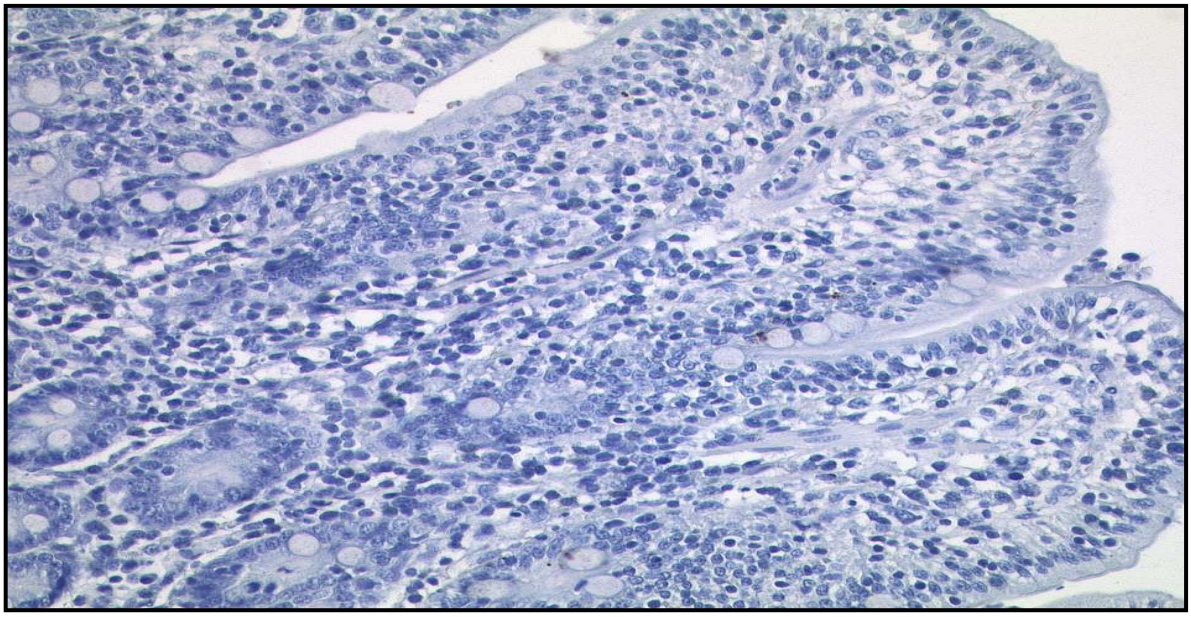


Abb. 29: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Darmgewebe eines Placebotieres
Beispiel des TUNEL- Tests (TdT-mediated nick-end labelling technique) zum Nachweis der Apoptoserate im Darmgewebe bei einem Placebo Versuchstier (10x).

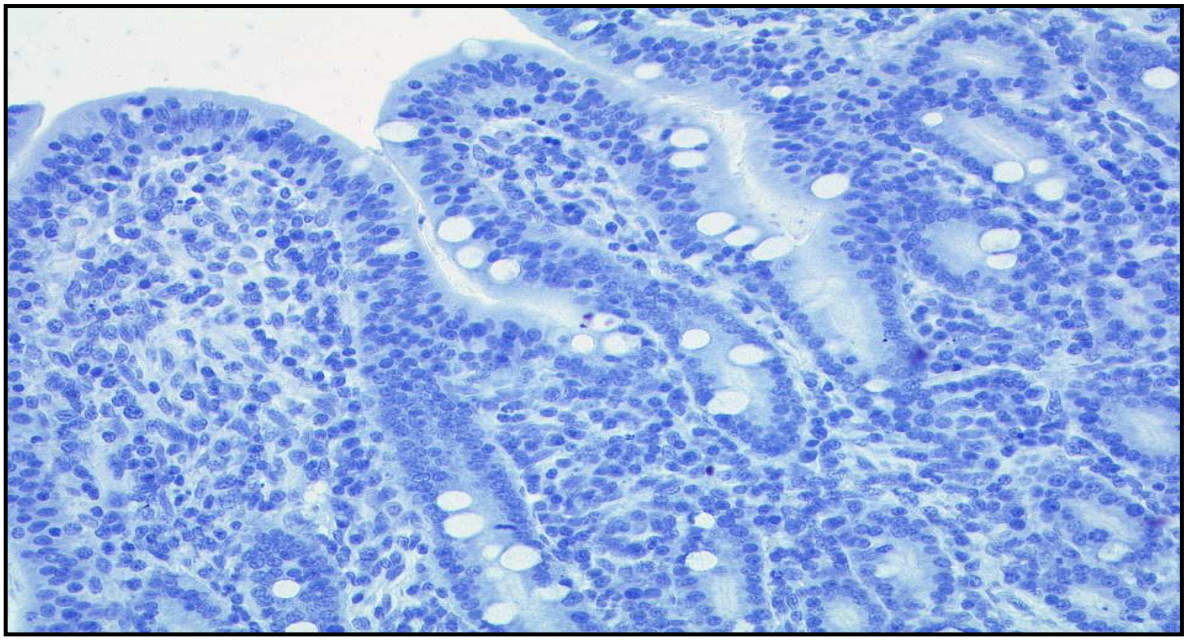


Abb. 30: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Darmgewebe eines INO-1001 Tieres
Beispiel des TUNEL-Tests (TdT-mediated nick-end labelling technique) zum Nachweis der Apoptoserate im Darmgewebe bei einem INO-1001 Versuchstier (10x).

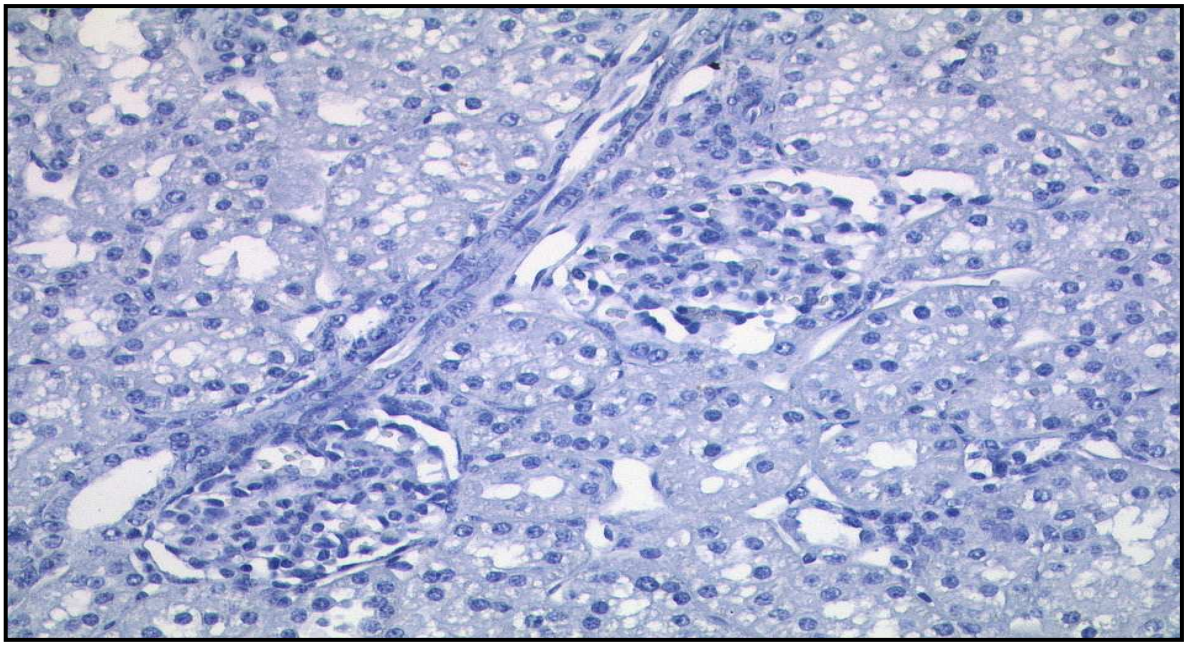


Abb. 31: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Nierengewebe eines Placebotieres
Beispiel des TUNEL-Tests (TdT-mediated nick-end labelling technique) zum Nachweis der Apoptoserate im Nierengewebe bei einem Placebo Versuchstier (10x).

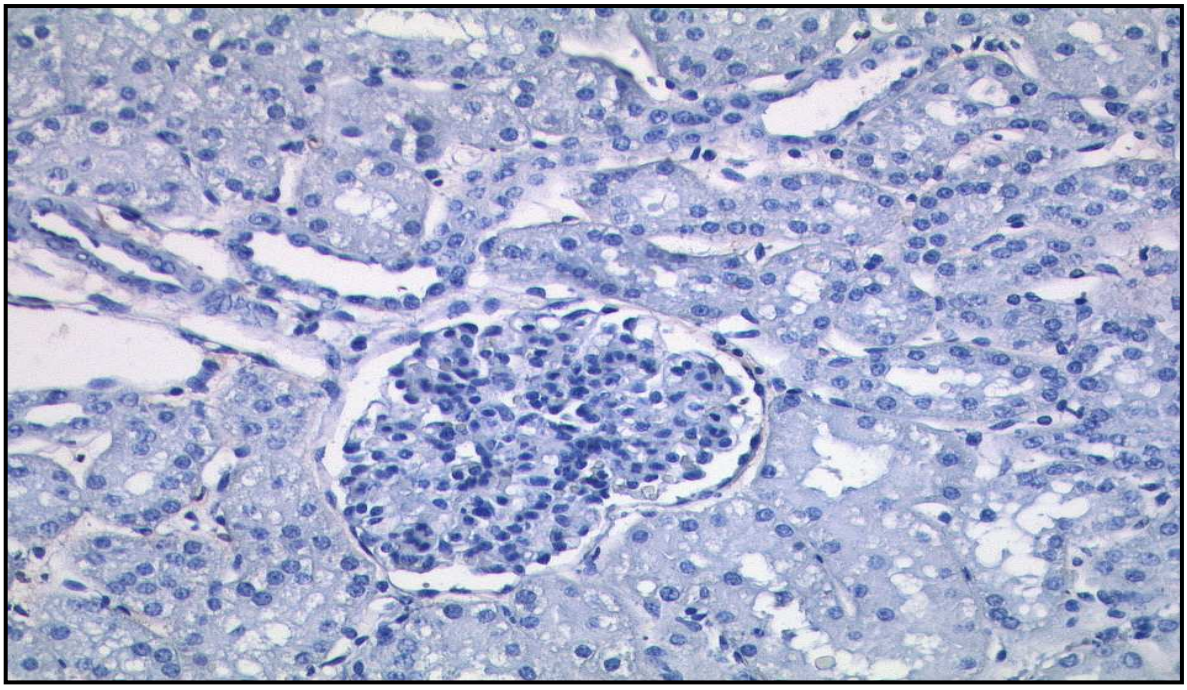


Abb. 32: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Nierengewebe eines INO-1001 Tieres
Beispiel des TUNEL- Tests (TdT-mediated nick-end labelling technique) zum Nachweis der Apoptoserate im Nierengewebe bei einem INO-1001 Versuchstier (10x).

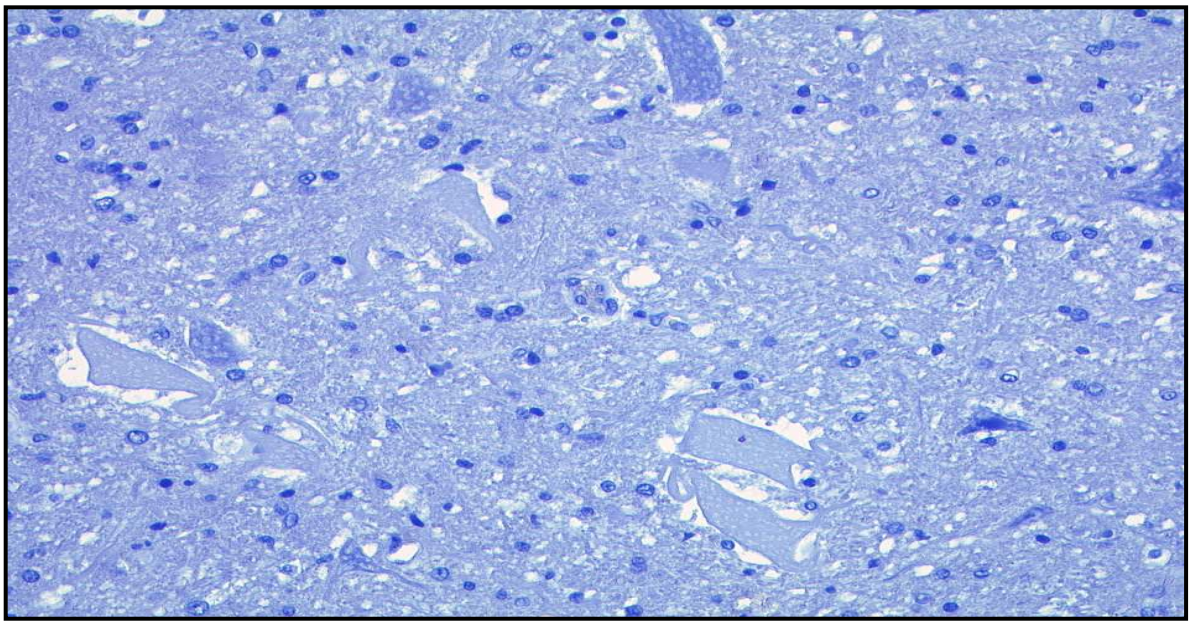


Abb. 33: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Rückenmark eines Placebotieres
Beispiel des TUNEL-Tests (TdT-mediated nick-end labelling technique) zum Nachweis der Apoptoserate im Rückenmark bei einem Placebo Versuchstier (10x).

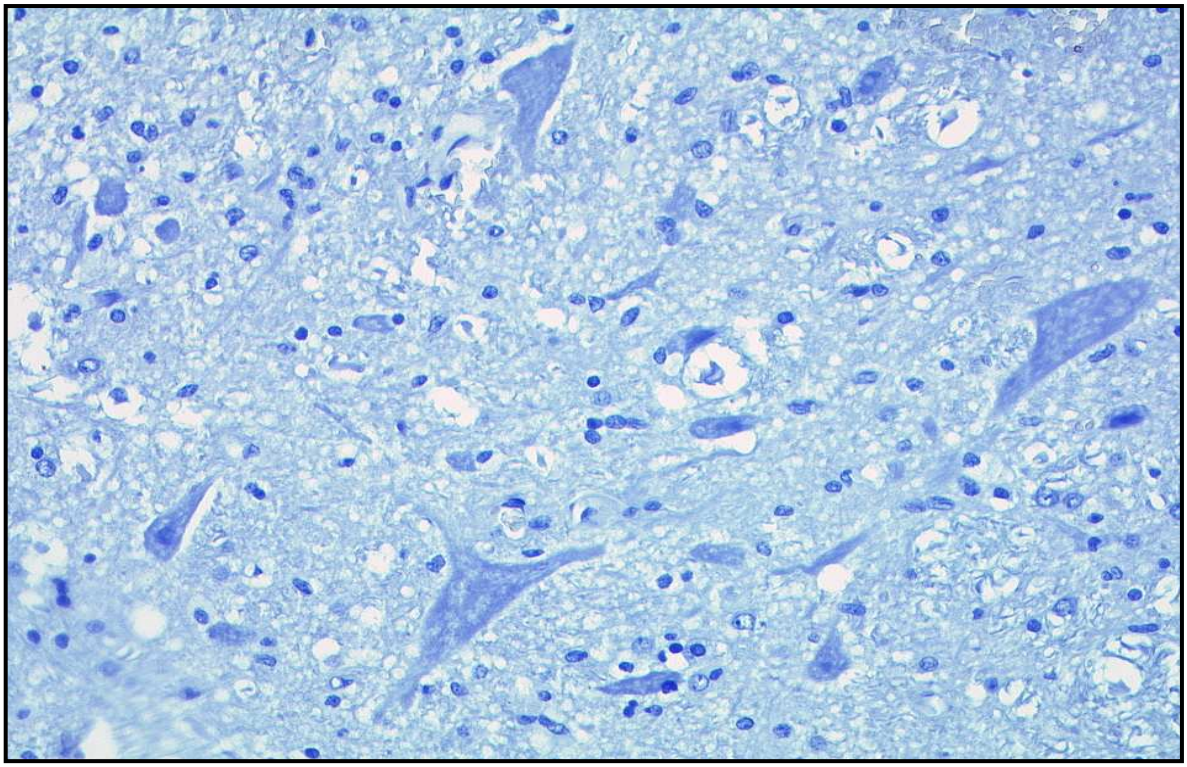


Abb. 34: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Rückenmark eines INO-1001 Tieres
Beispiel des TUNEL-Tests (TdT-mediated nick-end labelling technique) zum Nachweis der Apoptoserate im Rückenmark bei einem INO-1001 Versuchstier (10x).

4.4 Die Ergebnisse der Nissl-Färbung des Rückenmarks

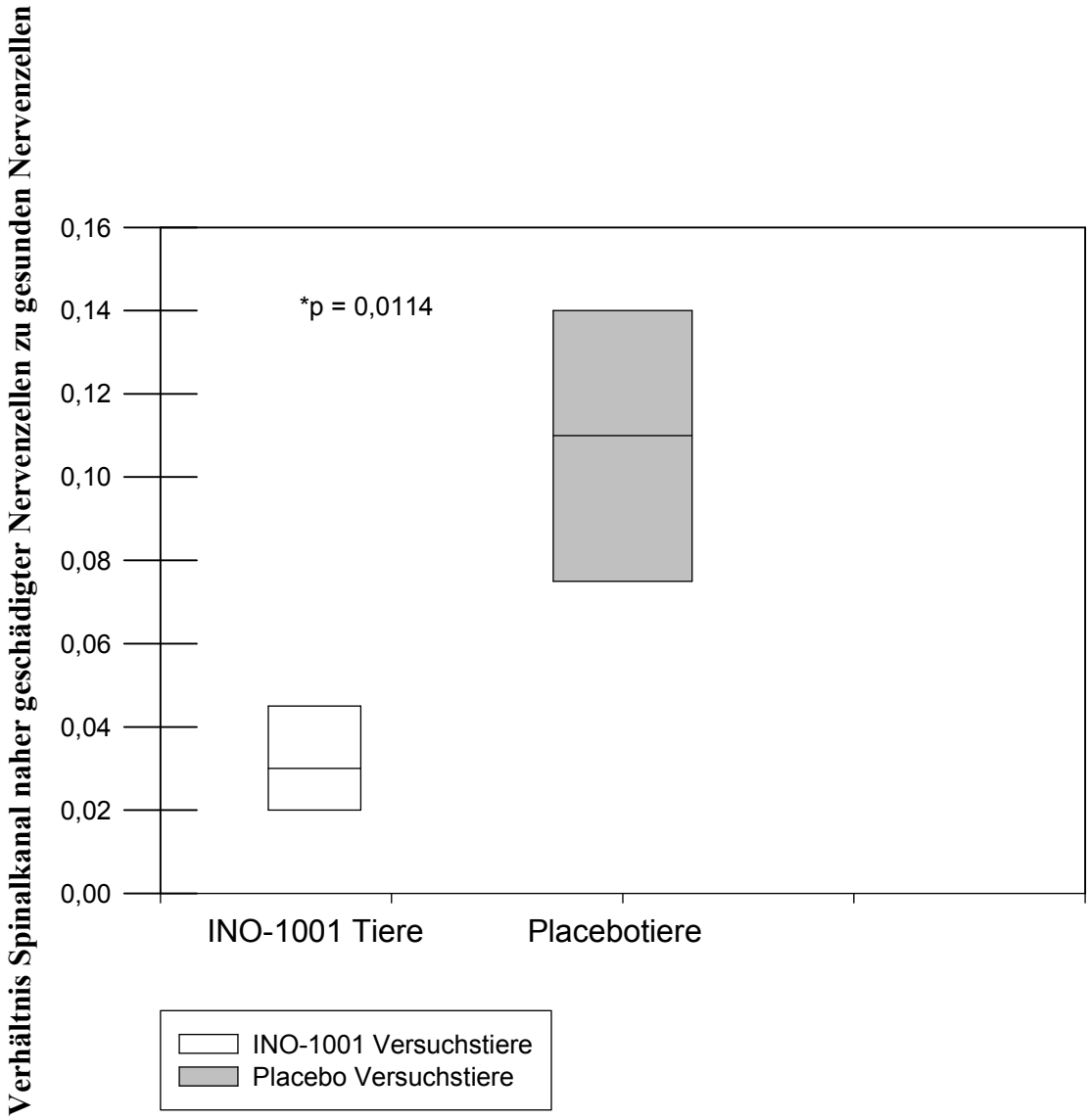


Abb.35: Graphische Darstellung der Verhältnisse Spinalkanal naher geschädigter zu gesunden Nervenzellen
Graphische Darstellung der Verhältnisse Spinalkanal naher geschädigter Nervenzellen zu gesunden Nervenzellen zwischen der INO-1001 Versuchsgruppe links im Bild und der Placebogruppe Versuchsgruppe rechts im Bild. Der p- Wert (Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben) zeigt ein signifikantes Ergebnis. Die Boxplots demonstrieren den minimalen, maximalen Wert sowie den Median, der Verhältnisse wie oben beschrieben, der insgesamt 10 Versuchstiere. p*=signifikanter Wert des Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben.

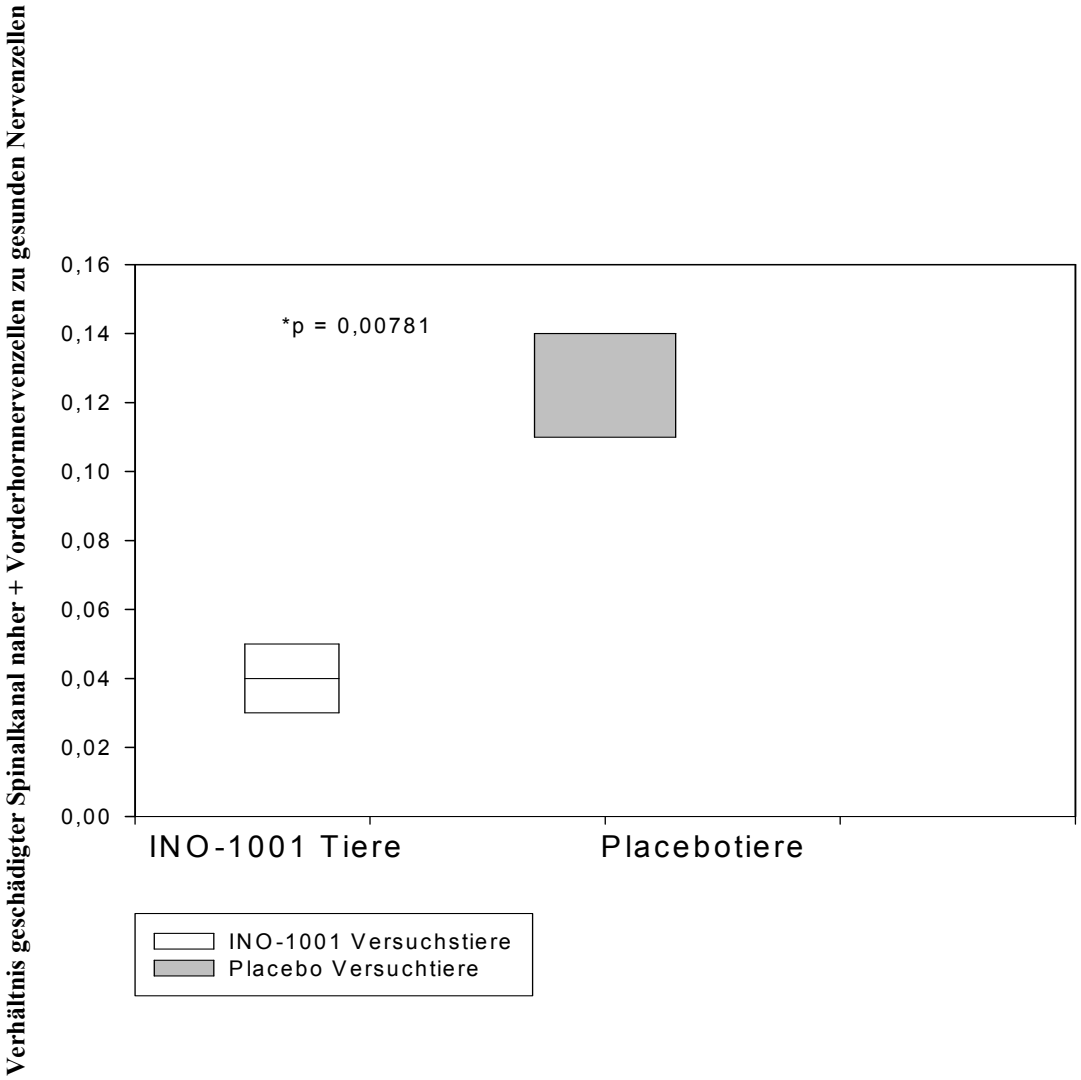


Abb.36.: Graphische Darstellung der Verhältnisse geschädigter Spinalkanal naher und Vorderhornnervenzellen zu gesunden Nervenzellen
Verhältnis der geschädigten Nervenzellen die spinalkanal nahe mikroskopiert wurden sowie die geschädigten Vorderhornnervenzellen zu den gesamten, gesunden ausgezählten Nervenzellen. Der p^*- Wert (Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben) zeigt ein signifikantes Ergebnis. Die Boxplots demonstrieren den minimalen, maximalen Wert sowie den Median, der Verhältnisse wie oben beschrieben, der insgesamt 10 Versuchstiere. p*=signifikanter Wert des Wilcoxon-Test für unverbundene Stichproben.

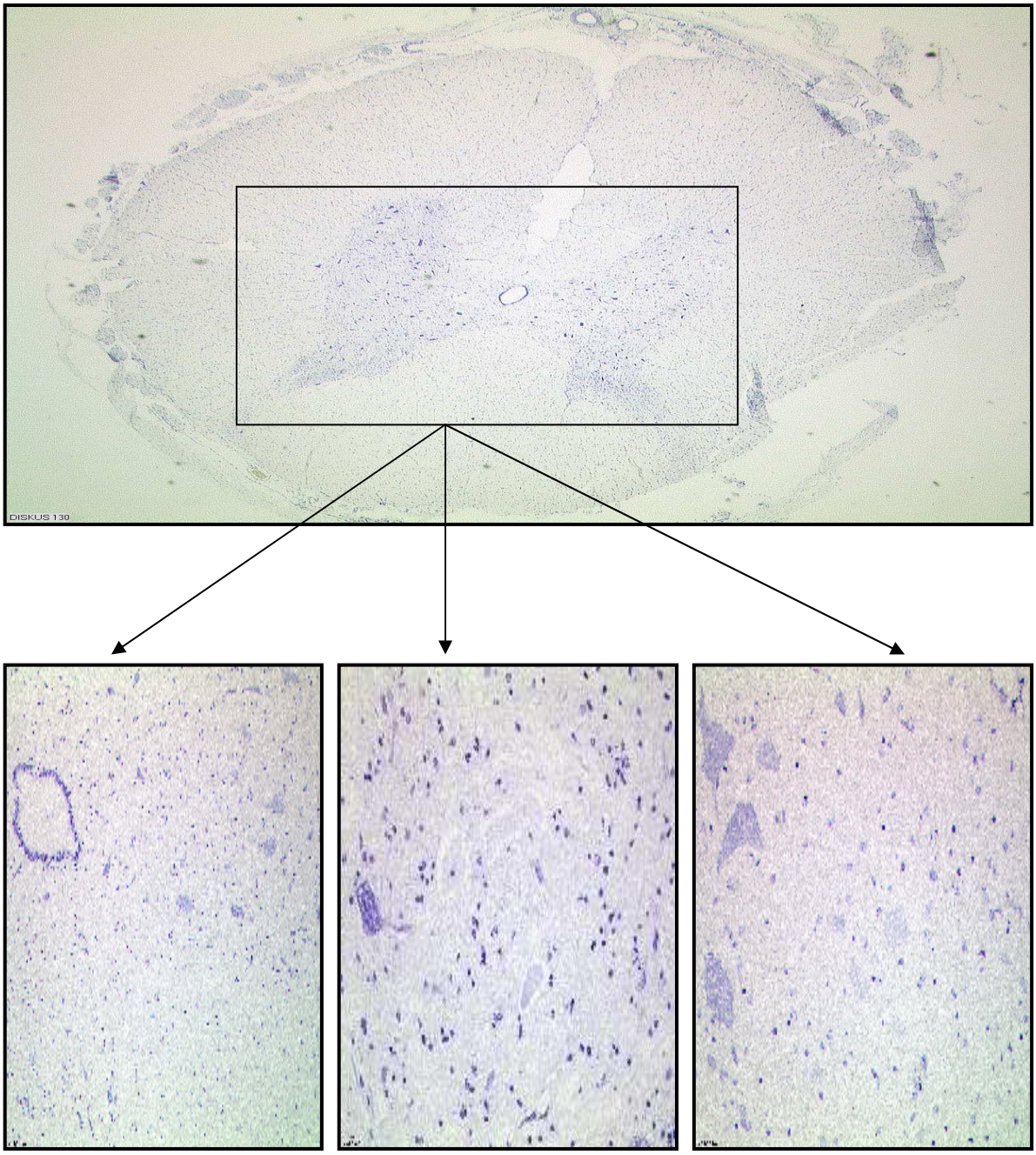


Abb.37: Rückenmarksnervenzellen von Placebotieren in der Nissl-Färbung
Darstellung der Rückenmarksneurone von Placebotieren angefärbt mit Hilfe der Nissl-Färbung. Im ersten Bild von links eine 10x Vergrößerung. In den anderen beiden Bildern eine 20x Vergrößerung. Es sind mehrere Neurone mit abgeblasstem Zytoplasma sowie einem Zellkernverlust zu erkennen.

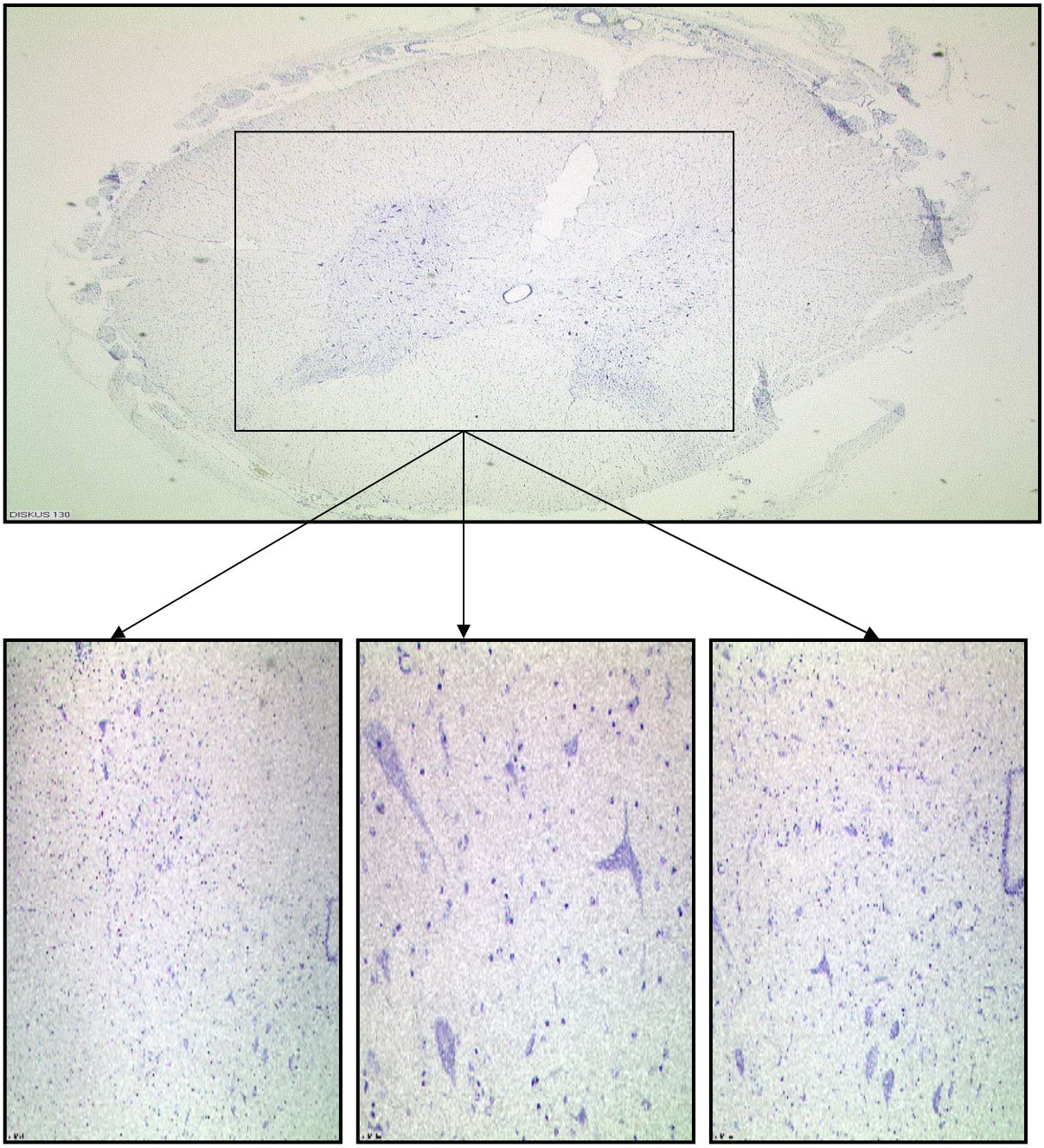


Abb.38: Rückenmarksnervenzellen von INO-1001 Tieren in der Nissl-Färbung
Darstellung der Rückenmarksneurone von INO-1001 Versuchstieren mit Hilfe der Nissl-Färbung. Im ersten Bild von links eine 10x Vergrößerung. Im Bild in der Mitte eine 20x Vergrößerung. Im Bild rechts eine 10x Vergrößerung. Es sind mehrere Neurone mit normaler Zellstuktur zu erkennen.

5 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, in einer klinisch relevanten Ischämie-Reperfusionsstudie am Großtiermodell nach thorakalem Aortencrossclamping die Auswirkungen des neuen, hochpotenten PARP-1 Inhibitors INO-1001 auf das minderdurchblutete Gewebe zu untersuchen. Mit Hilfe einer HE-Färbung wurde hier besonderes Augenmerk auf die Gewebsmorhologie des Dünndarms, der Niere, des lumbalen Rückenmarks, die Expression der CDKI-Gene in diesen Geweben sowie deren Apoptoserate nach dem thorakalen Aortenclamping gelegt. Mit Hilfe einer Nissl-Färbung wurden Schädigungen der Rückenmarksnervenzellen nachgewiesen. Dabei versuchten wir zu klären, ob das Studienmedikament INO-1001 einen zytoprotektiven Effekt auf das Gewebe des Rückenmarks, der Nieren und des Intestinaltraktes zeigt.

Die Hauptergebnisse der Studie können wie folgt zusammengefasst werden:

- Die INO-1001 Versuchstiere zeigten am Dünndarm und der Niere im Vergleich zu den Versuchstieren der Placebogruppe weder bei der Untersuchung der Gewebsmorphologie noch bei der CDKI Genexpression noch dem Nachweis der Apoptoserate signifikante Unterschiede.

- Die INO-1001 Versuchstiere wiesen am Rückenmark im Vergleich zu den Versuchstieren der Placebogruppe ebenso keine signifikanten Unterschiede in der CDKI Genexpression sowie dem Nachweis der Apoptoserate auf.

- Die INO-1001 Versuchstiere zeigten am Rückenmark im Vergleich zu den Versuchstieren der Placebogruppe bei der Haematoxylin Eosin Färbung deutlich weniger Zeichen eines oxidativen Zellstresses. Hier kam es zu einer wesentlich geringeren Ausprägung an Vakuolisierungen der Zellen mit Anschwellen der Lysosomen, teilweisem Zellkernverlust, Abblassen von Zellkernen, Zellschwellungen sowie Kernchromatindichteveränderungen.

- Die INO-1001 Versuchtiere wiesen am Rückenmark im Vergleich zu den Versuchstieren bei der Nissl-Färbung eine signifikant reduzierte Anzahl an geschädigten Nervenzellen auf. Während 3-5% der spinal geschädigten Nervenzellen in der INO-1001 Versuchsgruppe irreversibel geschädigt waren, zeigte sich in der Placebogruppe eine 3-mal so hohe Rate der neuronalen Zellschädigungen.

5.1 Das Versuchstier und der Versuchsablauf

Das Schwein war für diese Studie sehr gut geeignet, da es aufgrund von anatomischen, metabolischen und physiologischen Gesichtspunkten die größte Homologie mit dem Menschen besitzt [30]. In der Sektion für angewandte Pathophysiologie und Verfahrenstechnik werden schon seit mehreren Jahren Versuche an diesem Großtiermodell durchgeführt. Die Methodik galt daher bereits als etabliert. Erwähnenswert ist, dass die Abklemmzeit der thorakalen Aorta bei uns nur 45 Minuten betrug, während Forschergruppen in vielen anderen Studien Abklemmzeiten von 60-120 Minuten untersuchten [4;63;82;88;89]. Unsere Abklemmzeit wurde bewusst so gewählt, um den klinischen Ablauf einer Operation mit thorakaler Aortenabklemmung nachzuahmen. Unser Großtiermodell ermöglichte uns darüberhinaus durch das Clamping der Aorta, eine gezielte I/R-Schädigung über einen festgelegten Zeitraum zu untersuchen, was in anderen Modellen wie beispielsweise bei einem hämorrhagischen Schock nicht in dieser Genauigkeit untersucht werden kann. Darüberhinaus war eine Rekonvaleszenz der ischämischen Organe zu erwarten. Die Gabe des Studienmedikaments begann 90 Minuten

vor der Clampingzeit. Nach Verabreichung einer initialen Dosis von 2 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ über 30 Minuten konnte 1 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ über 60 Minuten bis zur Abklemmung infundiert werden. Während des Aortenclampings wurde die Infusion gestoppt und erneut 4 Stunden bis zum Versuchsende mit 0,5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ gegeben. Insgesamt erhielten die INO-1001 Tiere demnach 4 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$. Diese Vorgehensweise erschien uns richtig, um höhere Plasmalevel des Medikaments vor dem Clamping zu erreichen und um ein effizientes *„loading up“* der Gewebe mit dem Studienmedikament gewährleisten zu können. Andere Studiengruppen vermochten sowohl mit gleichen, wie auch niedrigeren Gesamtdosen des PARP-1 Inhibitors bei Hunden [137-139] und Schweinen [68] den Nachweis der Poly(ADP-Ribose) zu unterbinden. Nach einer kardiopulmonalen Bypass Reperfusion konnte durch eine Färbung von Lungen-, Herz-, und Darmgewebe gezeigt werden, dass der PARP Inhibitor 3-AB bei Schweinen die Poly(ADP)-Ribosylierung in den einzelnen Organen hemmt [8]. Xiao et al. demonstrierten in einem Mäusemodell, dass eine orale Gabe von 1,25 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ INO-1001 eine Hemmung der PARP-Aktivität in Blutproben wie auch in Proben der Herzmuskelzelle bewirkt [160]. Bei Versuchen mit Hamster Ovarialzellen [116] und menschlichen neuronalen SK-N-MC (humane Neuroblastomzellinie) Zellen [73] löste eine Inkubation mit 0,05 µM INO-1001 eine Blockade von fast 90% der PARP-Aktivität aus.

In unserer Studie gibt es keinen direkten Nachweis einer Poly(ADP-Ribose) durch eine Färbung oder Messung der PARP-Aktivität in den Geweben, so dass man mit einer eindeutigen Blockade der PARP rechnen könnte. Das Studienmedikament wurde aber mit Hilfe eines HPLC in isolierten Lymphozyten intrazellulär, wie auch zytoplasmatisch nachgewiesen. Daher kann mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer PARP-Hemmung durch INO-1001 im Gewebe des Rückenmarks, des Darms und der Nieren ausgegangen werden.

Durch Erkenntnisse vorausgegangener Studien versuchten wir außerdem, den arteriellen Blutdruck mit Hilfe von i.v. Esmolol, Nitroglycerin und Adenosintriposphat in engen Grenzen zu den Werten vor der Abklemmung zu halten. Desweiteren substituierten wir während der frühen Reperfusionsphase genügend Flüssigkeit und Vasopressor. Zusätzlich erfolgte eine ATP-Gabe, welche die Organfunktion in anderen Ischämie-Reperfusionsmodellen beträchtlich verbessern konnte [50;100]. Die histologische Aufarbeitung der Gewebe erfolgte unmittelbar nach der Organentnahme. Spüllösungen wie

Puffer oder Aqua dest. wurden während eines Versuchs ständig gewechselt und die Inkubationszeiten der Gewebe genau eingehalten. Die durchgeführten Methoden waren erprobt und bereits etabliert [126].

5.2 Die histologischen Untersuchungsmethoden

P21 und p27 zählen zu den Genen, welche für Proteine kodieren, die als CDK-Inhibitoren bezeichnet werden. Der Zellzyklus wird teilweise von dieser Gruppe von Proteinen negativ reguliert. Die CDK-Inhibitoren können den Zellzyklus dabei in der G1-Phase blockieren, und damit die weitere Entwicklung bis hin zur Mitose stoppen. Außerdem gelten $p21^{waf1/cip1}$ und $p27^{kip1}$ als Marker der Zellalterung sowie einer DNA-Schädigung [126]. Der Begriff *„cellular senescense“* steht für die Zellalterung. Da sich eukaryote somatische Zellen nicht beliebig oft teilen können, gehen diese nach einer bestimmten Anzahl von Zellzyklen in einen irreversiblen Ruhezustand über [2;10;45]. Hierbei handelt es sich um einen physiologischen Vorgang, wobei die Zellen in diesem Zustand sehr wohl noch metabolisch aktiv sind und sogar zu anhaltenden Entzündungen beitragen [132]. An dem Vorgang der Zellalterung sind häufig auch Telomere beteilig. Eine Telomerlängenverkürzung vermag unter anderem über die Aktivierung von p21 ein Altern der Zelle herbeizuführen [62].

Mit Hilfe von Antikörpern gegen die CDKI-Gene ist es nun möglich, immunhistochemisch die Marker der Zellalterung sowie einer DNA-Schädigung nachzuweisen. Dabei wollten wir wissen, ob es durch die Gabe des PARP-Inhibitors im Vergleich zur Placebogruppe zu einer geringeren Expression der CDKI-Gene kommt.

Vorangegangene Studien wiesen in alternden Zellen eine progressive Anreicherung von p21 in humanen diploiden Fibroblasten nach [136]. Auch nach Ischämie-Reperfusionssequenzen kam es, wie nachfolgend beschrieben, zu einer gesteigerten Expression von p21 und p27. Im Mäusemodell stieg beispielsweise bei einer DNA-Schädigung durch Hyperoxie die Expression von p21 im Lungengewebe an und verblieb mehere Tage erhöht, was Reparaturvorgänge an der DNA ermöglicht haben könnte [107]. Bei vorgealterten Zellen wurde eine vermehrte Expression von p27 als Antwort auf

Stressoren wie beispielsweise eine Ischämie nachgewiesen [114;117]. Ebenso scheint ein normaler Zellalterungsprozess zu einer Expression von p21 und p27 zu führen. Da die Versuchstiere aber erst drei Monate alt waren, können wegen des Alters der Tiere wesentliche Unterschiede in der Expression von p21 und p27 sowie eine Hochregulierung dieser Marker ausgeschlossen werden.
Auf molekularer Ebene entstehen durch verschiedene Mechanismen eine Aktivierung und Überexpression der CDKI-Gene. Der Anstieg an reaktiven Sauerstoffmetaboliten nach einer Ischämie-Reperfusionssequenz kann DNA-Strangbrüche auch an Telomeren [153;154] hervorrufen, welche wiederum eine Aktivierung von p21 ermöglichen. Über p53, den „Wächter des Genoms“, führen diese DNA-Strangbrüche häufig zu einer Aktivierung der CDKI Familie und enden schließlich in einem G1-Phase Zellarrest [58]. Auf direktem Wege vermag eine Ischämie-Reperfussionsequenz eine Aktivierung der Inhibitoren der Cyclin E und A abhängigen Kinasen auszulösen [133]. Somit kommt es durch eine Ischämie mit anschließender Reperfusionsphase über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies nicht selten zu einer Schädigung von DNA und letztlich dem Gewebe selbst. Diese Schädigung löst durch eine gesteigerte Expression der CDKI-Gene wiederum eine Zellalterung sowie einen Zellarrest aus.
Die gesteigerte Expression der CDKI-Gene kann somit Ausdruck einer Schädigung der einzelnen Zelle sein, in dieser Studie bedingt durch die I/R-Sequenz. Sie könnte aber genauso als protektiver Mechanismus gegen eine Replikation der durch Ischämie-und Reperfusion geschädigten Zellen angesehen werden [126].

Grundsätzlich kann eine gesteigerte Expression von p21 und p27 folgendes bedeuten:

- Eine vermehrte Expression der CDKI-Gene als Folge einer Ischämie-Reperfusionssequenz kann zu einer vermehrten und verfrühten Zellalterung führen und in einem Zellarrest enden. Durch die entstandenen DNA-Strangbrüche können Defekte im Genprodukt auftreten. Diese wiederum enden schlimmstenfalls in einer malignen Entartung. Die Hinderung der Zellen durch die gesteigerte Expression der CDKI-Gene wird daher als Schutzmechanismus gegen eine Weitergabe geschädigter Erbsubstanz betrachtet.

- Die gesteigerte Expression von p21 und p27 kann aber auch als Zeichen einer abgelaufenen Zellschädigung angesehen werden. Falls der PARP-Inhibitor INO-1001 eine durch die Ischämie-Reperfusionssequenz bedingte Zellschädigung reduziert, so müsste eine geringere Anzahl an p21 und p27 positiven Zellkernen in den Geweben vorkommen. In unserem Fall war dabei nur von Interesse, ob INO-1001 eine veränderte Expression der CDKIs zeigt. Dass hier eine mögliche Schutzfunktion stattfindet, oder die Zelle in einen endgültigen Zellstopp eintritt, wurde außer Acht gelassen, da eine ungeschädigte Zelle diese Schutzfunktion nicht benötigt.

Es gibt bisher noch keine Studien, welche einen Zusammenhang einer CDKI-Genexpression mit einer PARP-Aktivierung oder PARP-Inhibition untersucht haben.
Eine mögliche Aktivierung der PARP ist aber bei einer Ischämie-Reperfusionssequenz sehr wahrscheinlich, wobei für die einzelne Zelle je nach Stärke der Schädigung ein apoptotischer oder aber nekrotischer Zelltod resultiert [152].
Eine Hemmung der PARP könnte die Zellen vor dem hohen Verbrauch von NAD^+ und ATP und einem sich anschließenden „energetischen Chaos“ bis hin zum Zelluntergang schützen. Der Preis dafür wäre möglicherweise eine gesteigerte Anzahl von Zellen genomischer Instabilität. Die Weitergabe des geschädigten Erbmaterials kann wiederum sogar kanzerogene Folgen nach sich ziehen. Neben der PARP-1 werden noch weitere DNA-Reparaturenzyme, wie beispielsweise die PARP-2, beschrieben [71]. Da in der Literatur bisher noch über keine Zusammenhänge zwischen einer PARP-Inhibition mit INO-1001 und einer Expression der CDKI Gene p21 und p27 berichtet wurde, sollte genau dies in unserer Studie untersucht werden. Kann INO-1001 im Vergleich zu der Placebogruppe im Rahmen der Ischämie-Reperfusionssequenz zu einer geringeren Expression von p21 und p27 führen?

Zusätzlich wollten wir mit einem TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) eine Vorstellung der Apoptoseraten in den Geweben bekommen. Dabei sollte geklärt werden, ob eine PARP-Inhibition mit INO-1001 eine unterschiedliche Apoptoserate zwischen den Versuchsgruppen hervorruft.

Apoptose, oder auch der „programmierte Zelltod“, ist im Gegensatz zur Nekrose ein im Organismus physiologisch auftretender Prozess. Dieser Mechanismus spielt sowohl in der Embryonalentwicklung als auch in der Erwachsenenzeit bei der Einstellung eines Gleichgewichts zwischen Zellverlust und Proliferation eine große Rolle. Außerdem ist die Apoptose bei der Carcinogenese bzw. der Elimination von mutierten sowie anderweitig geschädigten Zellen, die potentiell carcinogen entarten können, von besonderer Bedeutung.

Die Apoptose läuft nach einem festen Schema ab, bei dem es in einem späteren Stadium zur DNA-Fragmentierung kommt. Diese DNA-Fragmente macht man sich zunutze, um mit Hilfe des TUNEL-Tests apoptotische Zellen zu identifizieren. Die TUNEL-Methode weist dabei freie 3'-OH-Endgruppen auf. Zusätzlich vermag sie es teilweise, 5'-OH-Enden der DNA zu erkennen [81]. Dabei soll eine Ischämie den Prozess der Apoptose anstoßen können [81].

Weiteres Augenmerk legten wir auf die Gewebsmorphologie nach der I/R-Sequenz. Hier diente eine HE-Färbung der Beurteilung der Morphologie sowie dem Nachweis oxidativ geschädigten Gewebes zwischen den beiden Versuchsgruppen. Daraus entstand die Frage, ob sich die beiden Versuchsgruppen in der Gewebsmorphologie nach durchgemachter I/R unterscheiden.

Zur genaueren Untersuchung der Rückenmarksnervenzellen wurde zusätzlich eine Nissl-Färbung durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können gezielt neuronale Schädigungen der Rückenmarksnervenzellen dargestellt werden. Auch andere Studiengruppen verwendeten diese Methode zum Nachweis alternder Rückenmarksnervenzellen sowie mechanisch geschädigter Neuronen des Rückenmarks bei Ratten [35;46;99].

5.3 Die Ergebnisse der histologischen Untersuchung

5.3.1 Dünndarm und Niere

Das Gewebe des Dünndarms wie auch das Nierengewebe wiesen in der HE-Färbung keine auffälligen I/R-bedingten Schädigungen auf. Zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigten sich keine Unterschiede in der Gewebsmorphologie.

Die immunhistochemische Färbung des Dünndarms und auch der Niere konnte die Expression von p21 und auch p27 eindeutig nachweisen, allerdings bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der INO-1001 und der Placebogruppe. Beim Nierengewebe waren es allerdings bei beiden Versuchsgruppen die tubulären Zellkerne, die am häufigsten angefärbt wurden, was auf eine hohe Empfindlichkeit der Tubuluszellen bei einer Ischämie-Reperfusionssequenz hindeutet.

Die Auswertung am Dünndarm bei p21 erwies sich als etwas leichter, da es hier zu einer geringeren Hintergrundfärbung als bei p27 kam. Die Verdünnung der Antikörper betrug 1:100, im Gegensatz zu den restlichen Geweben mit einer Verdünnung von 1:50. Diese hohe Verdünnung wurde gewählt, da die Anfärbung und die Hintergrundfärbung bei 1:50 zu stark waren. Ausgewertet wurde bei der p21 wie auch der p27 Färbung ein 0,5 cm langer Darmabschnitt mit der Breite der gesamten Darmwand. Hier wurde darauf geachtet, im auszuwertenden Bereich möglichst keine Falten zu haben. Während die p21 Färbung mit 20-facher Vergrößerung mikroskopiert wurde, musste bei der p27 Färbung zur besseren Unterscheidung angefärbter Zellkerne eine 40-fache Vergrößerung verwendet werden. Auch hier gab es Unterkategorien wie die Tunica mucosa, Tunica serosa, Tunica muscularis, und das Gefäßendothel. Die Summe aller angefärbten Zellkerne wurde zur Kategorie „Gesamt“ zusammengefasst. Angefärbte Zellkerne im Darmlumen wurden nicht ausgezählt.

In der p21 Färbung der Niere konnte ein 0,5 cm × 0,5 cm großes Feld in 20-facher Vergrößerung ausgezählt werden. Die Hintergrundfärbung war nicht sehr stark ausgeprägt.
Die p27 Färbung ließ bei der Auswertung mit 20-facher Vergrößerung wiederum nur fünf Gesichtsfelder zu, da auch hier zahlreiche Zellkerne angefärbt waren. Deshalb gestaltete sich die Unterscheidung von angefärbten Zellkernen und Zytoplasma manchmal etwas schwieriger. Allerdings waren in Vorgängerstudien zahlreiche andere Antikörper getestet worden, wobei auch diese keine bessere Auswertung der Ergebnisse erlaubten. Laut dem Pathologen PD Dr. Sträter der Universität Ulm gelang mit den hier verwendeten Antikörpern die beste Darstellung und Auswertung der CDKI-Genexpression.
Die Zellen wurden in die Unterkategorien tubuläre Zellen, glomeruläre Zellen, Gefäßendothelzellen und interstitielle Zellen eingeteilt und schließlich als Summe angefärbter Zellkerne, als „Gesamt“, zusammengefasst.

Mit Hilfe der TUNEL-Färbung wiesen wir am Darm und dem Nierengewebe kaum Apoptosen nach. Die geringe Anzahl der Apoptosen am Dünndarm kann dabei am ehesten als ein physiologischer Zustand an Zellen des Darms betrachtet werden, da es durch den programmierten Zelltod zu einer Erneuerung von Darmepithel kommt.
Somit verzichteten wir in dieser Studie bei der Auswertung der TUNEL-Färbung auf eine statistische Auswertung.

Dass es im Rahmen von Ischämie-Reperfusionssequenzen zu gravierenden Schäden am Dünndarm [63] und dem Nierengewebe kommen kann, zeigt eine Inzidenz der viszeralen Ischämie zwischen 1% und 10% mit einer Mortalität von bis zu 50% sowie einer renalen Komplikationsrate von 15-17% bei Aortenclamping [40].
Mit Hilfe dieser Studie wollten wir klären, ob die mit dem PARP-Inhibitor behandelte Versuchsgruppe nach der I/R-Sequenz eine geringere Anzahl von Zellschädigungen aufweist als die Placebogruppe.
In unserer Studie zeigten die Versuchstiere am Dünndarm keine Unterschiede in der Gewebsmorphologie zwischen den beiden Versuchsgruppen. Andere Studiengruppen wiesen in einem Schweinemodell Schädigungen des Oberflächenepithels am Darm sowie der Darmbarrierefunktion während einem Abklemmen der Aorta nach [63]. Auch an Nagetiermodellen wurde die Schädigung der Tunica mucosa nach einer Reperfusionsphase

untersucht [27;87]. Im Gegensatz zu unserer Abklemmzeit von 45 Minuten wurden aber bei den bereits durchgeführten Untersuchugen sowohl an Mäusemodellen wie auch am Schweinemodell längere Abklemm- wie auch Reperfusionszeiten von 50-180 Minuten angewendet [63;87]. Unsere Abklemmzeit wurde bewusst so gewählt, um den klinischen Ablauf einer Operation mit thorakaler Aortenabklemmung nachzuahmen.
Studien, welche ein Abklemmen der Aorta unter Verwendung eines PARP-Inhibitors mit Hilfe der Expression der CDKI-Gene untersuchten, liegen aber noch nicht vor. Lediglich ein Rattenmodell mit einer Ischämie-Reperfusionssequenz zeigte eine gesteigerte Expression des CDK-Inhibitors p21 am Darmgewebe, allerdings nach Reperfusioszeiten von 2-12 Stunden [19]. Möglicherweise hätten eine längere Abklemmzeit sowie Reperfusionsphase in unserem Großtiermodell ebenso zu veränderten Genexpressionen von p21 sowie p27 am Darmgewebe geführt.

Auch am Nierengewebe wird beschrieben, dass eine Ischämie-Reperfusionssequenz eine Beeinträchtigung der Organfunktion bedingt, welche bis hin zum akuten Nierenversagen führen kann [11]. Durch das Abklemmen der thorakalen Aorta nimmt der renale Blutfluss sowie die glomeruläre Filtrationsrate stark ab [40]. Unsere Versuchstiere entwickelten kein akutes Nierenversagen. Die Urinproduktion wie auch die Serumkreatininkonzentrationen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen [53]. Genauso führte die CDKI-Genexpression in unserem Großtiermodell zu keiner unterschiedlichen Expression von p21 und p27 zwischen den Versuchsgruppen. Möglicherweise deutet dies auf eine zu geringe Schädigung des Gewebes hin. Da aber keine Ergebnisse einer CDKI-Expression von Nierengewebe gleichaltriger Schweine ohne I/R-Sequenz vorliegen, könnte die nachgewiesene CDKI-Genexpression durchaus aufgrund I/R-bedingter Schädigung entstanden sein. Dabei kam es aber durch die Verwendung des PARP-Inhibitors zu keiner geringeren Expression von p21 und p27 zwischen den Versuchsgruppen. Über dieses Ergebnis kann aufgrund der aktuellen Studienlage nur spekuliert werden.
Andere Studien beschreiben den Zustand einer gesteigerten Expression der CDKI-Gene nach einer I/R-Sequenz. So konnten beispielsweise an xenoperfundierten Makkakennieren nach einer I/R-Sequenz signifikant erhöhte Expressionslevel von p21 und p27 in Glomerulumzellen, Tubuluszellen wie auch in interstitiellen Zellen gefunden werden,

welche als Marker einer DNA-Schädigung bezeichnet werden und als Zellalterungsindikator gelten [126]. Eine vor kurzem veröffentlichte Studie beschreibt mit Hilfe eines I/R-Modells am Nierengewebe eine Abhängigkeit der Überexpression der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27 vom Zeitpunkt der Reperfusion. In Glomerulumzellen kam es hier 15 Minuten nach der Reperfusion zu einer p27 Expression, welche sich nach 60 und 180 Minuten der Reperfusion signifikant erhöht zeigte. In den Tubuluszellen stieg die Expression des Markers nach 15 Minuten an und verblieb danach weiterhin erhöht. P21 dagegen wurde in allen Zellen der Niere signifikant überexprimiert [20]. An Rattennieren verschiedener Altersgruppen stellte man ebenfalls eine Überexpression von p21 fest [29]. Während ein durch Cisplatin hervorgerufenes akutes Nierenversagen bei Ratten in einer Überexpression von p21 endete [92], konnte an menschlichen T-Zellen eine durch Cyclosporin hervorgerufene gesteigerte Bildung von p21 mRNA gezeigt werden [69]. Nach Clamping der Nieren wiesen $p21^{-/-}$-Mäuse eine verstärkte Mortalität und eine stärkere Anfälligkeit gegenüber ischämischer Schädigung der Nieren auf [87]. Sowohl in alternden Zellen als auch als Antwort auf verschiedene Stressoren [2], wie beispielsweise eine ischämische Schädigung [113], wurde auch eine Überexpression von p27 festgestellt.

Diese Ergebnisse stimmen nicht mit unseren Ergebnissen überein, bei denen es zu keiner unterschiedlichen Expression der CDKI nach 45-minütigen thorakalen Aortenclamping und anschließender 4-stündiger Reperfusionszeit kommt. Dabei unterscheiden sich die Tiermodelle jedoch durch Verwendung von ex vivo Modellen [20;126] und die Verwendung nephrotoxischer Medikamente [69] beträchtlich von unserem Tiermodell. Ein I/R-Großtiermodell, welches eine CDKI-Genexpression am Nierengewebe unter Verwendung eines PARP-Inhibitors untersucht hat, ist mir bisher nicht bekannt. Daher liegen keine Ergebnisse vor, welche im Vergleich veranschaulichen könnten, ob eine PARP-Inhibition nach einer I/R-Sequenz zu einer geringeren Expression an CDKI-Genen führen kann.

Beim Nierengewebe wie auch am Gewebe des Dünndarms wurden zwar gesteigerte Aktivitäten der PARP nach I/R nachgewiesen, aber auch hier wurde keine CDKI-Genexpression untersucht. Bekannt ist, dass eine Ischämie-Reperfusionssequenz dabei am Darmgewebe zu einer gesteigerten Permeabiliät der Tunica mucosa führen kann, welche in einem Tiermodell mit $PARP^{-/-}$ Mäusen durch eine PARP-Inhibition verringert wurde. Die

PARP-Inhibition zeigte dabei eine verminderte Infiltration von Neutrophilen in die Darmwand [152]. Eine Sepsisstudie an Schweinen konnte durch eine PARP-Inhibition niedrigere arterielle PCO_2 Drücke in der Mucosa darstellen, welche mit niedrigen Laktatwerten einhergingen. [59].
Auch in Ischämie-Reperfusionsmodellen an Rattennieren erfolgte ein Nachweis einer PARP-Aktivierung, wobei durch eine PARP-Inhibition ein schnelleres Erreichen einer normalen Nierenfunktion zustande kam [85]. $PARP^{-/-}$-Mäuse wiesen im Vergleich mit $PARP^{+/+}$-Mäusen nach einer Ischämiezeit der Nieren deutlich geringere morphologische Schädigungen im Nierengewebe auf [164].

Unser Großtiermodell unterscheidet sich von den bisher durchgeführten Studien sowohl durch die Verwendung des Schweins als Versuchstier, wie auch durch kürzere Ischämie- und Reperfusionszeiten. Das Schwein wurde verwendet, da es aufgrund anatomischer, metabolischer und physiologischer Gesichtspunkte die größte Homologie mit dem Menschen besitzt [30]. Andere Studien verwendeten bevorzugt Nagetiere [85;164]. Dass eine längere I/R-Sequenz zu einer Expression von p21 in den untersuchten Geweben führt, konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden [20;126;152]. Weiterhin konnte untersucht werden, dass eine I/R-bedingte Schädigung des Gewebes je nach Grad der Stärke der Gewebsschädigung eine PARP-Aktivierung auslöst [152]. Somit wurde das Gewebe in unserer Studie eventuell nicht lange genug geschädigt, um mit Hilfe unserer histologischen Nachweise das Maximum an Zellschädigungen untersuchen zu können. Andere Studiengruppen verwendeten wesentlich längere Ischämie- und Reperfusionszeiten [4;63;82;88;89]. Auch hätte eine längere Nachbeobachtungszeit bei uns von Nutzen sein können, um eventuell ein Maximum einer CDKI-Genexpression untersuchen zu können und eine genauere Differenzierung zwischen den Placebotieren und den INO-1001 Versuchstieren darzustellen.

Die Apoptoserate im Nieren-und Darmgewebe in unserem Großtiermodell zeigte lediglich einzelne Apoptosen in beiden Versuchsgruppen. Dieser Zustand einer physiologischen, rapiden Erneuerung der Zellen der Tunica mucosa durch den programmierten Zelltod wurde bereits von anderen Studiengruppen beschrieben [120;121].

Desweiteren wurde aufgezeigt, dass eine I/R-Sequenz am Darmgewebe eine Apoptose der Enterozyten induzieren kann [131]. Die Induktion von Apoptose läuft bei einer intestinalen Ischämie während der ischämischen Phase ab und schreitet auch noch in der frühen Reperfusionsphase fort. Die maximale DNA-Fragmentierung findet dabei eine Stunde nach der Reperfusion statt. Sechs Stunden danach sollen schon wieder die Ausgangswerte erreicht sein [103]. Die maximale DNA- Fragmentierung müsste in unserer Studie also bereits erreicht und überschritten sein, dennoch ist ungewiss, ob bereits alle von der DNA-Fragmentierung betroffenen apoptotischen Zellen nach vier Stunden Reperfusion sichtbar und nachweisbar sind. Außerdem wurden auch hier im Gegensatz zu unseren Versuchstieren Nagetiere untersucht.

Auch am Nierengewebe wird in der Literatur beschrieben, dass bei Mäusenieren der apoptotische Zelltod eine frühe Konsequenz von I/R sein kann [104], doch ließ sich bei uns nicht nachweisen, dass die Gabe von INO-1001 vor dem Clamping die Anzahl der Apoptosen in der Niere reduziert.

Die PARP spielt aber bei einer ischämischen Schädigung der Niere, bei der eine Inhibition der PARP Verbesserungen der Nierenfunktion erbringen konnte, eine wichtige Rolle. Neben dem nekrotischen Zelltod kommt es auch zu Apoptosen, wobei die Inhibition der PARP das Outcome verbessern kann und dies dabei wesentlich vom nekrotischen Zelltod abhängen soll [26]. Die meisten Studien beschreiben ein Vorkommen sowohl apoptotischer wie auch nekrotischer Zellen nach einer Ischämie-Reperfusionssequenz der Niere [74;75]. Dabei kommt es häufig zu einer beschleunigten Zellalterung [80]. An einem Mäusemodell wurde gezeigt, dass nach einer I/R Sequenz bei $p53^{-/-}$ Mäusen und älteren Mäusen mehr tubuläre Schädigungen auftraten als bei jungen Mäusen. Die Zahl apoptotischer Zellen stieg bei $p53^{+/+}$ Tieren sieben Tage nach der I/R Sequenz stärker an als bei $p53^{-/-}$ Mäusen. Sowohl Apoptosen wie auch Nekrosen wurden vermehrt nachgewiesen [80]. Studien, welche einen Ischämie-Reperfusionsschaden mit einem PARP-Inhibitor am Nierengewebe untersucht haben, um Apopotosen nachzuweisen, sind kaum zu finden. Bisher gibt es zwar Hinweise dafür, dass eine Inhibition am Nierengewebe nach I/R weniger Schädigungen auslöst, und diese verminderten Schädigungen eher nekrotischen Ursprungs sind, doch sind die komplexen Vorgänge der PARP-Inhibition dabei jedoch keineswegs vollständig verstanden [26]. Auch in unserer

Studie zeigen sich nach der I/R-Sequenz unter Verwendung von INO-1001 kaum Apoptosen.

Zusammenfassend können mehrere Erklärungsmöglichkeiten erörtert werden.
Die Organe Niere und Dünndarm können weder in der HE-Färbung, noch in der Expression von p21 und p27 und der Apoptoserate signifikante Unterschiede aufweisen.
Was das Gewebe der Niere und des Dünndarms anbelangt, so kann angenommen werden, dass die Abklemmzeit von 45 Minuten im Ischämie-Reperfusionsmodell nicht ausgereicht hat, um in der histologischen Aufarbeitung eine maximale Schädigung an den Geweben feststellen zu können. In anderen Ischämie-Reperfusionsstudien wurden Abklemmzeiten zwischen 60 und 120 Minuten verwendet [4;63;82;88;89]. Auch die Zeit der Gewebeentnahme war möglicherweise zu früh, um die Schäden darstellen zu können.
Nichtsdestotrotz wurde hier versucht, das klinisch relevante Szenario so genau wie möglich nachzuahmen. Eine Expression von p21 und p27, die in anderen Studien als Marker für eine DNA- Schädigung und *cellular senescence* angesehen werden [126], zeigt sich auch in unserer Studie im Nieren- und Darmgewebe, allerdings ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Eine erhöhte physiologische Expression dieser Marker dürfte, wie oben beschrieben, bei unseren drei Monate alten Versuchstieren keine große Rolle spielen. Da aber kein Gewebe von Tieren ohne thorakales Aortenclamping untersucht werden konnte, bleibt eine gesteigerte Expression dieser Gene bei den Versuchstieren auch hier nicht ganz ausgeschlossen. Die Anreicherung des Studienmedikaments INO-1001 konnte in verschiedenen Studien in den oben genannten Konzentrationen sowohl in Blutzellen wie auch in Geweben des Dünndarms und der Niere nachgewiesen werden. Die in unserer Studie verwendeten Konzentrationen von INO-1001 wurden ausschließlich mit Hilfe eines HPLC in isolierten Lymphozyten intrazellulär, wie auch zytoplasmatisch nachgewiesen. Da eine Anreicherung von INO-1001 in dieser Studie aber nicht direkt in dem untersuchten Gewebe gemessen wurde, kann nicht mit absoluter Sicherheit davon ausgegangen werden, dass im Dünndarm und der Niere eine Anreicherung und PARP-Blockade stattgefunden hat.
Da mittlerweile mehrere Subtypen der PARP bekannt sind, könnte die Funktion der PARP-1, die in dieser Studie durch INO-1001 spezifisch gehemmt wurde, wie auch in anderen Studien beschrieben, durch die PARP-2 kompensiert worden sein [13].

Neben der histologischen Untersuchung der Gewebe wurden in dieser Studie außerdem laborchemische Parameter wie beispielsweise die Serumkreatininkonzentrationen gemessen. Diese Werte zeigen ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen [53], was die Ergebnisse der CDKI-Genexpression unterstreicht.

5.3.2 Rückenmark

Die HE-Färbung des Rückenmarks zeigte im Gegensatz zu den anderen untersuchten Geweben deutliche Zeichen von Zellstress. Dabei ließen sich sowohl bei der Placebogruppe wie auch bei der INO-1001 Versuchsgruppe Vakuolisierungen der Zellen mit Anschwellen der Lysosomen als Zeichen eines Zellödems, ein teilweiser Zellkernverlust, ein Abblassen von Zellkernen, Kernchromatindichteveränderungen sowie Zellvergrößerungen nachweisen. Diese Veränderungen stellen eindeutige Zeichen von Zellstress dar und können als neuronale Zellschädigung gewertet werden. Bei den INO-1001 Versuchstieren war die neuronale Schädigung allerdings wesentlich geringer ausgeprägt als bei den Placebotieren. Vor allem im Bereich um den Zentralkanal sowie im Vorderhorn des Rückenmarks konnten diese gewebsmorphologischen Veränderungen bei beiden Versuchsgruppen besonders deutlich dargestellt werden. In Zusammenarbeit mit der Pathologin Dr. Hasel der Universitätsklinik Ulm sowie der Neuropathologin Dr. Scheuerle des Klinikums Günzburg wurden die Gewebeschnitte immer vollständig mikroskopiert. Eine statistische Auswertung der HE-Färbung konnte aber auch mit der Unterstützung einer erfahrenen Neuropathologin nicht durchgeführt werden, da die morphologischen Unterschiede mit einem Scoring System nicht statistisch auswertbar waren. Um diese Unterschiede am Rückenmark zwischen den Versuchsgruppen deutlicher darstellen zu können, wurde hier zusätzlich eine Nissl-Färbung durchgeführt.

Mit Hilfe der Nissl-Färbung können Veränderungen und Schädigungen von Nervenzellen des Rückenmarks eindeutiger dargestellt werden als in der HE-Färbung. Diese Färbung wird seit vielen Jahren von Neuropathologen in Günzburg und auch anderen Studiengruppen [35;46;99] durchgeführt und gilt als eine anerkannte Methode zur

Untersuchung von Neuronen und zum Nachweis geschädigter Nervenzellen. Durch die Nissl-Färbung konnte die bereits bestehende Vermutung einer deutlich unterschiedlichen Schädigung der Nervenzellen zwischen der INO-1001 und der Placebogruppe, wie bereits in der HE-Färbung vermutet, bestätigt werden. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Es wurde immer ein vollständiger Rückenmarksquerschnitt ausgewertet. Gezählt wurden dabei aber nur sehr stark geschädigte sowie schon untergegangene Nervenzellen. Die statistische Auswertung der Nissl-Färbung zeigte in der INO-1001 Versuchsgruppe, dass nur 3-5% der Neuronen irreversibel geschädigt waren, während der neuronale Zellschaden in der Placebogruppe drei mal so hoch war. Auch hier traten die gewebsmorphologischen Veränderungen besonders im Bereich um den Zentralkanal sowie im Vorderhorn des Rückenmarks auf.

Zusätzlich wurde ein Nachweis der Expression von p21 und p27 durchgeführt. Hier konnte bei der p21 Färbung pro Versuchstier je ein Rückenmarksquerschnitt in 20-facher Vergrößerung ausgewertet werden. In der p27 Färbung war es aufgrund der hohen Anzahl an angefärbten Zellkernen nicht möglich, einen gesamten Querschnitt auszuzählen. Deshalb wurden in Absprache mit dem Pathologen PD Dr. Sträter des Universitätsklinikums Ulm fünf Gesichtsfelder ausgewertet. Die Einteilung erfolgte in drei Unterkategorien: graue Substanz, weiße Substanz und Gefäßendothel. Zusammenfassend wurden alle angefärbten Zellkerne als „Gesamt“ beschrieben.
Eine Anfärbung der Rückenmarkshäute konnte nicht berücksichtigt werden, da diese im Verlauf der Gewebeaufbereitung nicht vollständig erhalten waren und es bei den noch übrigen Rückenmarkshäuten zu einer starken und undifferenzierten Anfärbung kam. Diese übermäßig starke Anfärbung in den Randbereichen könnte durch die Färbemethode und die Verwendung eines Fettstiftes erklärt werden.
In der immunhistochemischen Untersuchung zeigten sich zwischen den beiden Versuchsgrupppen weder signifikante Unterschiede in der Gesamtanzahl der angefärbten Zellkerne noch in der Anzahl angefärbter Zellkerne in den Unterkategorien.

Der TUNEL-Test ergab am Rückenmark weder bei den Versuchstieren, noch bei den INO-1001 Tieren eine Darstellung verstärkter Apoptoseraten. Die Rückenmarksquerschnitte

wurden mit Unterstützung der Pathologin Dr. Hasel und der Neuropathologin Dr. Scheuerle ausgewertet.

Es gilt als anerkannt, dass die PARP während einer ischämischen Hirnschädigung eine Schlüsselfunktion einnimmt. Der selektive PARP-Inhibitor PJ34 konnte im Kleintiermodell nach Aortenclamping I/R-assozierte Rückenmarksschäden reduzieren, da eine PARP-Aktivierung durch hohen Energieverlust als Einleitung eines zellulären „Suizide“ Mechanismus betrachtet wird. Aus diesem Grund testeten wir in dem klinisch relevanten Großtiermodell den Effekt von INO-1001 auf I/R-assozierte Clampingschäden am Rückenmark. Da das Schwein besonders in Hinblick auf die arterielle Durchblutung des Rückenmarks [155] und die Empfindlichkeit des Rückenmarks gegenüber oxidativem Stress [42;43] dem Menschen sehr ähnelt war diese Spezies das ideale Versuchstier.
Der PARP-Inhibitor, PJ34, reduzierte eine Schädigung des Rückenmarks in einem Modell an Mäusen bei thorakoabdominellem, aortalem Ischämie-Reperfusionsschaden [12]. Verschiedene andere Studien beschreiben, dass PARP-Inhibitoren Gewebsschädigungen nach vorübergehender zerebraler Ischämie verringern können [33;72;140;141]. Bei durch Ischämie verursachtem Schlaganfall beispielsweise zeigte INO-1001 neuroprotektive Effekte und verhinderte sogar Nekrosen [73;76].
Die Ergebnisse unserer Studie stimmen hier mit denen vorangegangener Studien insofern überein, als dass auch bei uns mit Hilfe der HE- und Nissl-Färbung durch die Verwendung des PARP-Inhibitors INO-1001 im Vergleich zu der Placebogruppe eine signifikant geringere Anzahl an neuronalen Rückenmarksnervenzellen auftrat. Jedoch wurden in unserer Studie keine Unterschiede in der CDKI-Genexpression sowie der Apoptoserate zwischen den Versuchsgruppen untersucht.
Andere Forschergruppen zeigten, dass eine Schädigung von neuronalen Zellen durch DNA-schädigende Substanzen zu einer verstärkten Expression von CDKI-Genen sowie zu einer vom DNA-Schaden abhängigen Apoptose der Zellen führt [113]. Verschiedene Arten von Zellstress lösten am Rattenkortex eine vermehrte p21 Expression als Zeichen einer DNA-Schädigung aus [28]. Bekannt ist auch, dass Ischämien des Rückenmarks eine Apoptose der Motoneurone zur Folge haben können [54;84]. Bei der Schädigung des Nervengewebes nach Ischämie des Rückenmarks sollen unter anderem die freien Radikale

(oxygen-derived free radicals) sowie Prozesse wie Apoptose und Entzündung eine Rolle spielen [122].

In unserer Studie wurden kaum apoptotische Zellkerne gefunden. Die wenigen nachweisbaren Apoptosen könnten einen physiologischen Zustand darstellen und wurden deshalb nicht gewertet. Möglicherweise war allerdings das Maximum der Anzahl der apoptotischen Zellen noch nicht vollständig ausgeprägt, da vermutlich die Anzahl TUNEL-positiver Zellen nach Ischämie ein Maximum erst nach 24 Stunden erreicht [84].

Auf den ersten Blick scheinen die Beobachtungen der Apoptoserate, wie sie in unserer Studie untersucht wurde, nicht mit denen der Literatur übereinzustimmen. Hier wird berichtet, dass bei Ratten nach vorausgegangener Behandlung mit dem PARP-Inhibitor 3-AB sowie zweistündigem Abklemmen der mittleren Zerebralarterie wenige TUNEL-positive Zellen 24 Stunden postischämisch, auftraten [72]. Trotz einer reduzierten Gesamtzahl an TUNEL-positiven Zellen, welche eine geringere Infarktgröße bei $PARP^{-/-}$-Mäusen sowie bei Tieren, welche mit dem PARP-Inhibitor 3-AB vorbehandelt wurden, wiederspiegeln, haben andere Autoren jedoch keine Unterschiede an TUNEL-markierten Zellen gefunden [33].Tatsächlich gibt es mehrdeutige Berichte über das Auftreten von apoptotischen Zellen nach einem Ischämie-Reperfusionschaden des Rückenmarks. Eine kurzzeitige Abklemmung von 15- 40 Minuten war bei Ratten [64-66] und Kaninchen [84] eng verbunden mit einer Apoptose der Nervenzellen. Neuere Studie können diese Ergebnisse allerdings nicht mehr bestätigen. Unsere Beobachtungen des deutlichen neuronalen Schadens ohne TUNEL-positive Nervenzellen korrelieren jedoch gut mit den kürzlich erschienenen Daten von *Papakostas et al.*. Nach 45-minütigem Abklemmen der Aorta bei Schweinen konnten auch diese Autoren keine TUNEL-positiven Neuronen finden, was darauf zurückgeführt wurde, dass die Motoneuronen einen nekrotischen Zelltod starben [112].
Letztlich werden unsere Ergebnisse auch durch das dazu korrelierende Verhalten der p21 wie auch p27 Expression bei den Versuchsgruppen unterstrichen. Auch wenn eine gesteigerte Expression von p21 in neuronalen Zellen, welche eine vorübergehende Ischämie des Vorderhirns überlebten, als eine Folgereaktion auf die zerebrale Ischämie und Reperfusion [150] sowie als Folgereaktion einer Demyelinisierung des Rückenmarks

beschrieben wird [22], stand die p21 und p27 Expression in anderen Geweben, welche einem Ischämie- Reperfusionsschaden ausgesetzt waren, in direktem Zusammenhang mit dem Ausmaß des DNA-Schadens und/ oder der Apoptoserate [21;27;87]. Aus der Onkologie gibt es Studien die eine Korrelation zwischen der p27 Genexpression und dem Auftreten von Apoptosen in Zellen des kolorektalen Karzinoms untersucht haben [105]. Auch an Zellen des Mammakarzinoms wurde die Korrelation der Expression der CDKIs p21 und p27 dargestellt sowie ein günstigeres Outcome für die Patienten mit höheren Apoptoseraten nachgewiesen [128]. Ein lokaler Anstieg des zytoplasmatischen p21 steigerte eine axonale Regeneration nach einer Rückenmarksschädigung bei Ratten [142].
Da eine gesteigerte Expression der Zellzyklusregulatoren eher dafür steht, eine DNA-Reparatur [106] zu erleichtern, als einen Marker für einen neuronalen Zelltod [148] darzustellen, ist es unwahrscheinlich, dass verschiedene CDKI-Genexpressionen beobachtet werden, wenn nur geringfügige Apoptosen auftreten.

5.4 Grenzen der Studie

In dieser Studie müssen auch Aspekte diskutiert werden, die Teile der Auswertung hätten verbessern können. Wie bereits beschrieben, kann ein direkter Nachweis der Poly(ADP-Ribose) Aktivität in den verschiedenen Geweben eine Inhibition der PARP eindeutig bestätigen. Wir hatten nicht die Möglichkeit, die PARP direkt in den Geweben des Rückenmarks, des Dünndarms und der Niere zu bestimmen. Somit besteht kein eindeutiger Beweis einer effizienten PARP Blockade.
Die Clampingzeit von 45 Minuten mit anschließender Reperfusionsphase von 4 Stunden war im Vergleich mit anderen Studien womöglich zu kurz, um alle Schädigungen an den Geweben darzustellen zu können.
Zusätzlich hätte die CDKI-Genexpression bei einer Reihe von gleichaltrigen Versuchstieren ohne Ischämie-Reperfusionsschaden an den im Versuch verwendeten Organen bestimmt werden können, um einen Vergleich zu erhalten und die Unabhängigkeit der CDKI-Genexpression nach der I/R-Sequenz vom Alter der Tiere zu beweisen.

Weiterhin hätte eine höhere Gesamtzahl an auswertbaren Rückenmarksschnitten letztlich zur Auswertung der Nissl-Färbung, ein noch repräsentativeres Ergebnis ergeben können.
Während den Untersuchungen des Rückenmarks hatten wir außerdem nicht die Möglichkeit, die Funktion des Rückenmarks, beispielsweise mit Hilfe von neurologischen Scores oder evozierten Potentialen, zu beurteilen. Deshalb können wir nur darüber spekulieren, ob die Schädigung der Rückenmarksneuronen mit einem verbesserten neurologischen Ergebnis assoziert werden kann.
In diesem Zusammenhang muss noch angeführt werden, dass mehrere vorangegangene Studien mit Schweinemodellen und Abklemmungen der Aorta von 30-60 minütiger Dauer eine enge Korrelation zwischen dem Grad des histomorphologischen Schadens des Rückenmarks und des Schweregrades der neurologischen Schädigung aufwiesen. Diese wurden mit Hilfe der Tarlovskala und der Messung von evozierten Potentialen bestimmt [88;116]. Schließlich zeigten unlängst erschienene Studien, dass nach 45-minütiger Abklemmung der Aorta ein vollständiger Verlust an evozierten Potentialen sowie eine Paraplegie auftraten.
Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die ausgeprägte Reduzierung des neuronalen Schadens, welche wir in dieser Studie darstellen konnten, mit einer verbesserten Funktion des Rückenmarks verbunden ist.

5.5 Kann INO-1001 für eine klinische Anwendung empfohlen werden?

Nach den Ergebnissen der histologischen Untersuchung kann eine klinische Anwendung erst nach weiteren experimentellen Studien in Betracht gezogen werden. Die Ergebnisse am Darm und der Niere zeigen zwar weder eine vermehrte DNA-Schädigung, noch eine Behinderung einer DNA-Reparatur, jedoch weisen sie auch keine erwünschten Effekte an diesen Organen auf.
Somit müsste durch weitere Studien vorab geklärt werden, ob dieses Medikament im klinischen Alltag den gewünschten Nutzen erbringen kann. Da hierzu jedoch bereits viele Studien durchgeführt wurden, welche die verschiedensten positiven Möglichkeiten einer PARP-Inhibition bei unterschiedlichen Krankheiten untersuchten [152], und auch in

unserer Studie keine unerwarteten Nebenwirkungen auftraten, kann eine klinische Testung nach weiteren experimtentellen Untersuchungen erwogen werden.

Der selektive PARP-Inhibitior INO-1001 reduzierte Clamping-assoziierte I/R Schäden am Rückenmark signifikant. Bestätigt sich dieser neuroprotektive Effekt der PARP-Inhibition für die Funktion des Rückenmarks, könnte INO-1001 die Erholung des Rückenmarks nach thorakalem Clamping der Aorta ermöglichen. Durch weitere Studien kann diese Fragestellung genauer erörtert und untersucht werden. Besteht dieser neuroprotektive Effekt der PARP-Inhibition am Rückenmark weiterhin, so wäre eine spätere klinische Testung sicher vorteilhaft, da gerade aortenkranke Patienten davon profitieren könnten.

.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Chirurgische Eingriffe, bei denen ein thorakales Abklemmen der Aorta erforderlich wird, gehen mit einem erhöhten Risiko der Folgen einer spinalen Ischämie, Niereninsuffizienzen sowie einer ischämischen Schädigung des Gastrointestinaltrakts einher. Auf molekularer Ebene kann eine Schädigung der Zelle, bedingt durch eine Ischämie-Reperfusionsequenz (I/R), über eine Aktivierung der PARP ((Poly(ADP-Ribose)-Polymerase), einem DNA-Reparaturenzym (Desoxyribonukleinsäure), zu einem enormen Verbrauch der Zelle an ATP (Adenosintriphosphat) und NAD^+ (Nicotinamidadenindinucleotid), letztendlich zum Zelltod führen. In verschiedenen I/R-Modellen an Versuchstieren, bei denen durch oxidativen Stress verursachte DNA- und Gewebsschädigungen eine anschließende PARP-Aktivierung erfolgte, konnte eine Inhibition der PARP großen Nutzen bringen. Die Effekte einer PARP-Inhibition auf die Organhistologie, die DNA sowie die Zellalterung in Geweben wie Rückenmark, Niere und Dünndarm waren jedoch in einem Großtiermodell nach thorakalem Aortenclamping bisher weitgehend unbekannt. Aus diesem Grund wurden in einem Ischämie-Reperfusions-Modell am Schwein bei thorakalem Aortencrossclamping die Folgen der Gabe des Studienmedikaments INO-1001 mit einer Ischämiezeit von 45 Minuten auf die minderdurchbluteten Organe des lumbalen Rückenmarks, der Niere und des Dünndarms histologisch untersucht.

Material und Methoden: Nach einer Vorbereitungszeit erhielten narkotisierte, mechanisch beatmete deutsche Hausschweine bis zur thorakalen Aortenabklemmung entweder 5% Glucoselösung (n=9) oder nach einer initialen Dosis des PARP-Inhibitors INO-1001 von 2 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ über 30 Minuten, jeweils 1 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ über 60 Minuten, gebunden an eine 5% Glucoseträgerlösung (n=9), infundiert. Während des Aorten-clampings wurde die Infusion gestoppt und nach der Clampingphase erneut vier Stunden bis zum Versuchsende mit 0,5 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ INO-1001 weiterinfundiert. Insgesamt erhielten die INO-1001 Tiere demnach 4 $mg \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$. Im Laufe des Versuchs konnten die Auswirkungen des PARP-Inhibitors auf die Hämodynamik, Parameter des oxidativen Stresses, sowie die DNA-Schädigung dargestellt werden. Biochemische Parameter der untersuchten Organe wurden sowohl vor als auch während der ischämischen Phase sowie

während der Reperfusion erhoben. Nach vier Stunden Beobachtungszeit erfolgte die Entnahme der Organe, um morphologische Veränderungen der Gewebe, eine Zellalterung, DNA-Schädigungen sowie Zellschädigungen darzustellen. Dies geschah mit Hilfe einer HE-Färbung (Haematoxylin-Eosin), dem immunhistologischen Nachweis einer CDKI (Cyclin dependent kinase inhibitor) Genexpression ($p21^{Waf1/Cip1}$ / $p27^{Kip1}$) als Marker einer DNA-Schädigung sowie der Zellalterung, einem TUNEL-Test (TdT-mediated nick-end labelling technique) zum Nachweis der Apoptoserate, sowie einer Nissl-Färbung zum Nachweis oxidativ geschädigter Rückenmarksnervenzellen. Mit Hilfe der Gewebe vom lumbalen Rückenmark, dem Dünndarm und der rechten Niere sollte untersucht werden, ob das Studienmedikament INO-1001 wesentliche zytoprotektive Effekte zeigt und sich daraus die Möglichkeit ergibt, durch die Verwendung dieses PARP-Inhibitors eine I/R-bedingte Organschädigung der minderdurchbluteten Organe zu reduzieren.

Ergebnisse: Die INO-1001 Versuchsguppe wies am Darm und der Niere im Vergleich zu der Placebogruppe weder bei der Untersuchung der Gewebsmorphologie, der CDKI-Genxpression noch bei dem Nachweis der Apoptoserate signifikante Unterschiede auf. Auch die CDKI-Genxpression und der Nachweis der Apoptoserate des Rückenmarks zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Allerdings ergab bereits die HE-Färbung des Rückenmarks Zeichen von Zellstress, wie Zellschwellungen, Vakuolisierungen und Kernchromatindichteveränderungen mit ausgeprägten Unterschieden zwischen den Gruppen. Die statistische Auswertung der Nissl-Färbung konnte dies bestätigen und zeigte, dass in der INO-1001 Versuchsgruppe nur 3-5% der Neuronen irreversibel geschädigt waren, während der neuronale Zellschaden in der Placebogruppe drei mal so hoch war.

Schlussfolgerung: Der PARP-Inhibitior INO-1001 konnte in diesem Großtiermodell am Schwein nach 45-minütigem thorakalem Aortenclamping mit Hilfe der histologischen Untersuchungen beim Darm und der Niere keine zytoprotektiven Effekte aufweisen. Der selektive PARP-Inhibitior INO-1001 reduzierte signifikant Clamping-assoziierte I/R Schäden am Rückenmark. Bestätigt sich dieser neuroprotektive Effekt der PARP-Inhibition für die Funktion des Rückenmarks, kann INO-1001 die Erholung des Rückenmarks unterstützen. Gerade der Patient mit einem Aortenaneurysma und bevorstehendem Aortenersatz sowie damit verbundener I/R-Sequenz könnte letztlich von den neuroprotektiven Effekten einer PARP-Inhibition profitieren.

7 Literaturverzeichnis

[1] Abdelkarim GE, Gertz K, Harms C, Katchanov J, Dirnagl U, Szabo C, Endres M: Protective effects of PJ34, a novel, potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in in vitro and in vivo models of stroke. Int J Mol Med 7:255-260, 2001

[2] Alexander K, Hinds PW: Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence. Mol Cell Biol 21:3616-3631, 2001

[3] Asfar P: Microcirculation disorder vs. mitochondrial function: the role of the mediator orchestra NO, ROS, HO-1, ATP in large animal studies. Shock, 2005

[4] Backstrom T, Saether OD, Norgren L, Aadahl P, Myhre HO, Ungerstedt U: Spinal cord metabolism during thoracic aortic cross-clamping in pigs with special reference to the effect of allopurinol. Eur J Vasc Endovasc Surg 22:410-417, 2001

[5] Bargonetti J, Manfredi JJ: Multiple roles of the tumor suppressor p53. Curr Opin Oncol 14:86-91, 2002

[6] Berger NA: Poly(ADP-ribose) in the cellular response to DNA damage. Radiat Res 101:4-15, 1985

[7] Berguer R, Porto J, Fedoronko B, Dragovic L: Selective deep hypothermia of the spinal cord prevents paraplegia after aortic cross-clamping in the dog model. J Vasc Surg 15:62-71, 1992

[8] Bowes J, Ruetten H, Martorana PA, Stockhausen H, Thiemermann C: Reduction of myocardial reperfusion injury by an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase in the pig. Eur J Pharmacol 359:143-150, 1998

[9] Brown LC, Powell JT: Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. Ann Surg 230:289-296, 1999

[10] Campisi J: Replicative senescence: an old lives' tale? Cell 84:497-500, 1996

[11] Carden DL, Granger DN: Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. J Pathol 190:255-266, 2000

[12] Casey PJ, Black JH, Szabo C, Frosch M, Albadawi H, Chen M, Cambria RP, Watkins MT: Poly(adenosine diphosphate ribose) polymerase inhibition modulates spinal cord dysfunction after thoracoabdominal aortic ischemia-reperfusion. J Vasc Surg 41:99-107, 2005

[13] Chalmers A, Johnston P, Woodcock M, Joiner M, Marples B: PARP-1, PARP-2, and the cellular response to low doses of ionizing radiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 58:410-419, 2004

[14] CHAMBON P, WEILL JD, MANDEL P: Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. Biochem Biophys Res Commun 11:39-43, 1963

[15] Chatterjee PK, Chatterjee BE, Pedersen H, Sivarajah A, McDonald MC, Mota-Filipe H, Brown PA, Stewart KN, Cuzzocrea S, Threadgill MD, Thiemermann C: 5-Aminoisoquinolinone reduces renal injury and dysfunction caused by experimental ischemia/reperfusion. Kidney Int 65:499-509, 2004

[16] Chatterjee PK, Zacharowski K, Cuzzocrea S, Otto M, Thiemermann C: Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase reduce renal ischemia-reperfusion injury in the anesthetized rat in vivo. FASEB J 14:641-651, 2000

[17] Chatterjee S, Berger SJ, Berger NA: Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination. Mol Cell Biochem 193:23-30, 1999

[18] Chavan A, Galanski M, Pichlmaier M: [Minimally invasive therapy options in aortic dissections]. Rofo 172:576-586, 2000

[19] Chen W, Fu XB, Ge SL, Li WJ, Sun TZ, Sheng ZY: Exogenous acid fibroblast growth factor inhibits ischemia-reperfusion-induced damage in intestinal epithelium via regulating P53 and P21WAF-1 expression. World J Gastroenterol 11:6981-6987, 2005

[20] Chkhotua AB, Abendroth D, Froeba G, Schelzig H: Up-regulation of cell cycle regulatory genes after renal ischemia/reperfusion: differential expression of p16(INK4a), p21(WAF1/CIP1) and p27(Kip1) cyclin-dependent kinase inhibitor genes depending on reperfusion time. Transpl Int 19:72-77, 2006

[21] Corbucci GG, Perrino C, Donato G, Ricchi A, Lettieri B, Troncone G, Indolfi C, Chiariello M, Avvedimento EV: Transient and reversible deoxyribonucleic acid damage in human left ventricle under controlled ischemia and reperfusion. J Am Coll Cardiol 43:1992-1999, 2004

[22] Crockett DP, Burshteyn M, Garcia C, Muggironi M, Casaccia-Bonnefil P: Number of oligodendrocyte progenitors recruited to the lesioned spinal cord is modulated by the levels of the cell cycle regulatory protein p27Kip-1. Glia 49:301-308, 2005

[23] Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Dugo L, Serraino I, Threadgill M, Caputi AP, Thiemermann C: Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase, in a rodent model of lung injury. Biochem Pharmacol 63:293-304, 2002

[24] D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG: Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. Biochem J 342 (Pt 2):249-268, 1999

[25] de Murcia G, Menissier dM: Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. Trends Biochem Sci 19:172-176, 1994

[26] Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ: Poly(ADP-ribose) polymerase-mediated cell injury in acute renal failure. Pharmacol Res 52:44-59, 2005

[27] Didenko VV, Wang X, Yang L, Hornsby PJ: Expression of p21(WAF1/CIP1/SDI1) and p53 in apoptotic cells in the adrenal cortex and induction by ischemia/reperfusion injury. J Clin Invest 97:1723-1731, 1996

[28] Didenko VV, Wang X, Yang L, Hornsby PJ: DNA damage and p21(WAF1/CIP1/SDI1) in experimental injury of the rat adrenal cortex and trauma-associated damage of the human adrenal cortex. J Pathol 189:119-126, 1999

[29] Ding G, Franki N, Kapasi AA, Reddy K, Gibbons N, Singhal PC: Tubular cell senescence and expression of TGF-beta1 and p21(WAF1/CIP1) in tubulointerstitial fibrosis of aging rats. Exp Mol Pathol 70:43-53, 2001

[30] Dodds WJ. The Pig model for biomedical research. Fed.Proc.41: 247-256 . 1982

[31] Dotto GP: p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? Biochim Biophys Acta 1471:M43-M56, 2000

[32] El Deiry WS: Regulation of p53 downstream genes. Semin Cancer Biol 8:345-357, 1998

[33] Endres M, Wang ZQ, Namura S, Waeber C, Moskowitz MA: Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose)polymerase. J Cereb Blood Flow Metab 17:1143-1151, 1997

[34] Faro R, Toyoda Y, McCully JD, Jagtap P, Szabo E, Virag L, Bianchi C, Levitsky S, Szabo C, Sellke FW: Myocardial protection by PJ34, a novel potent poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor. Ann Thorac Surg 73:575-581, 2002

[35] Finazzo C: Neuronal populations in the spinal cord during ageing. Ital J Anat Embryol 99:243-262, 1994

[36] Flores-Rozas H, Kelman Z, Dean FB, Pan ZQ, Harper JW, Elledge SJ, O'Donnell M, Hurwitz J: Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme. Proc Natl Acad Sci U S A 91:8655-8659, 1994

[37] Frechette A, Huletsky A, Aubin RJ, de Murcia G, MANDEL P, Lord A, Grondin G, Poirier GG: Poly(ADP-ribosyl)ation of chromatin: kinetics of relaxation and its effect on chromatin solubility. Can J Biochem Cell Biol 63:764-773, 1985

[38] Gartel AL, Tyner AL: Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. Exp Cell Res 246:280-289, 1999

[39] Gawenda M, Zähringer M, Görg C, Südkamp M, Haupt W, Koebke J, Brunkwall J. Das Dilemma der spinalen Ischämie: Interdisziplinäre Strategien zum Schutz vor spinaler Ischämie bei Aortenchirurgie. 2005. Dtsch Arztebl 2005; 102: A 201–208

[40] Gelman S: The pathophysiology of aortic cross-clamping and unclamping. Anesthesiology 82:1026-1060, 1995

[41] Gloviczki P: Surgical repair of thoracoabdominal aneurysms: patient selection, techniques and results. Cardiovasc Surg 10:434-441, 2002

[42] Godin DV, Garnett ME: Species-related variations in tissue antioxidant status--I. Differences in antioxidant enzyme profiles. Comp Biochem Physiol B 103:737-742, 1992

[43] Godin DV, Garnett ME: Species-related variations in tissue antioxidant status--II. Differences in susceptibility to oxidative challenge. Comp Biochem Physiol B 103:743-748, 1992

[44] Goldfarb RD, Marton A, Szabo E, Virag L, Salzman AL, Glock D, Akhter I, McCarthy R, Parrillo JE, Szabo C: Protective effect of a novel, potent inhibitor of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase in a porcine model of severe bacterial sepsis. Crit Care Med 30:974-980, 2002

[45] Goldstein S: Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. Science 249:1129-1133, 1990

[46] Gonzalez SL, Labombarda F, Deniselle MC, Mougel A, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF: Progesterone neuroprotection in spinal cord trauma involves up-regulation of brain-derived neurotrophic factor in motoneurons. J Steroid Biochem Mol Biol 94:143-149, 2005

[47] Grube K, Burkle A: Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. Proc Natl Acad Sci U S A 89:11759-11763, 1992

[48] Ha HC, Snyder SH: Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion. Proc Natl Acad Sci U S A 96:13978-13982, 1999

[49] Hall M, Bates S, Peters G: Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. Oncogene 11:1581-1588, 1995

[50] Harkema JM, Chaudry IH: Magnesium-adenosine triphosphate in the treatment of shock, ischemia, and sepsis. Crit Care Med 20:263-275, 1992

[51] Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ: The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 75:805-816, 1993

[52] Hatori N, Yoshizu H, Shimizu M, Hinokiyama K, Takeshima S, Kimura T, Iizuka Y, Tanaka S: Prognostic factors in the surgical treatment of ruptured abdominal aortic aneurysms. Surg Today 30:785-790, 2000

[53] Hauser B, Groger M, Ehrmann U, Albicini M, Bruckner UB, Schelzig H, Venkatesh B, Li H, Szabo C, Speit G, Radermacher P, Kick J: The parp-1 inhibitor ino-1001 facilitates hemodynamic stabilization without affecting DNA repair in porcine thoracic aortic cross-clamping-induced ischemia/reperfusion. Shock 25:633-640, 2006

[54] Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K, Itoyama Y: Apoptosis of motor neurons with induction of caspases in the spinal cord after ischemia. Stroke 29:1007-1012, 1998

[55] Hengstschlager M, Braun K, Soucek T, Miloloza A, Hengstschlager-Ottnad E: Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. Mutat Res 436:1-9, 1999

[56] Herceg Z, Wang ZQ: Failure of poly(ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases leads to induction of necrosis and enhanced apoptosis. Mol Cell Biol 19:5124-5133, 1999

[57] Hunt T: Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. Semin Cell Biol 2:213-222, 1991

[58] Itahana K, Dimri G, Campisi J: Regulation of cellular senescence by p53. Eur J Biochem 268:2784-2791, 2001

[59] Ivanyi Z, Hauser B, Pittner A, Asfar P, Vassilev D, Nalos M, Altherr J, Bruckner UB, Szabo C, Radermacher P, Froba G: Systemic and hepatosplanchnic hemodynamic and metabolic effects of the PARP inhibitor PJ34 during hyperdynamic porcine endotoxemia. Shock 19:415-421, 2003

[60] Jagtap P, Soriano FG, Virag L, Liaudet L, Mabley J, Szabo E, Hasko G, Marton A, Lorigados CB, Gallyas F, Jr., Sumegi B, Hoyt DG, Baloglu E, VanDuzer J, Salzman AL, Southan GJ, Szabo C: Novel phenanthridinone inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase: potent cytoprotective and antishock agents. Crit Care Med 30:1071-1082, 2002

[61] Johnson DG, Schneider-Broussard R: Role of E2F in cell cycle control and cancer. Front Biosci 3:d447-d448, 1998

[62] Joosten SA, van H, V, Nolan CE, Borrias MC, Jardine AG, Shiels PG, van Kooten C, Paul LC: Telomere shortening and cellular senescence in a model of chronic renal allograft rejection. Am J Pathol 162:1305-1312, 2003

[63] Juel IS, Solligard E, Lyng O, Stromholm T, Tvedt KE, Johnsen H, Jynge P, Saether OD, Aadahl P, Gronbech JE: Intestinal injury after thoracic aortic cross-clamping in the pig. J Surg Res 117:283-295, 2004

[64] Kanellopoulos GK, Kato H, Wu Y, Dougenis D, Mackey M, Hsu CY, Kouchoukos NT: Neuronal cell death in the ischemic spinal cord: the effect of methylprednisolone. Ann Thorac Surg 64:1279-1285, 1997

[65] Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW, Kouchoukos NT: Protection of rat spinal cord from ischemia with dextrorphan and cycloheximide: effects on necrosis and apoptosis. J Thorac Cardiovasc Surg 114:609-618, 1997

[66] Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, Kouchoukos NT, Choi DW: Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat. Exp Neurol 148:464-474, 1997

[67] Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG: Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res 53:3976-3985, 1993

[68] Khan TA, Ruel M, Bianchi C, Voisine P, Komjati K, Szabo C, Sellke FW: Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition improves postischemic myocardial function after cardioplegia-cardiopulmonary bypass. J Am Coll Surg 197:270-277, 2003

[69] Khanna AK, Hosenpud JD: Cyclosporine induces the expression of the cyclin inhibitor p21. Transplantation 67:1262-1268, 1999

[70] Kim JW, Kim K, Kang K, Joe CO: Inhibition of homodimerization of poly(ADP-ribose) polymerase by its C-terminal cleavage products produced during apoptosis. J Biol Chem 275:8121-8125, 2000

[71] Kofler J, Otsuka T, Zhang Z, Noppens R, Grafe MR, Koh DW, Dawson VL, de Murcia JM, Hurn PD, Traystman RJ: Differential effect of PARP-2 deletion on brain injury after focal and global cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 26:135-141, 2006

[72] Koh SH, Park Y, Song CW, Kim JG, Kim K, Kim J, Kim MH, Lee SR, Kim DW, Yu HJ, Chang DI, Hwang SJ, Kim SH: The effect of PARP inhibitor on ischaemic cell death, its related inflammation and survival signals. Eur J Neurosci 20:1461-1472, 2004

[73] Komjati K, Mabley JG, Virag L, Southan GJ, Salzman AL, Szabo C: Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition protect neurons and the white matter and regulates

the translocation of apoptosis-inducing factor in stroke. Int J Mol Med 13:373-382, 2004

[74] Kunduzova OR, Bianchi P, Pizzinat N, Escourrou G, Seguelas MH, Parini A, Cambon C: Regulation of JNK/ERK activation, cell apoptosis, and tissue regeneration by monoamine oxidases after renal ischemia-reperfusion. FASEB J 16:1129-1131, 2002

[75] Kunduzova OR, Escourrou G, De La FF, Salvayre R, Seguelas MH, Leducq N, Bono F, Herbert JM, Parini A: Involvement of peripheral benzodiazepine receptor in the oxidative stress, death-signaling pathways, and renal injury induced by ischemia-reperfusion. J Am Soc Nephrol 15:2152-2160, 2004

[76] LaPlaca MC, Zhang J, Raghupathi R, Li JH, Smith F, Bareyre FM, Snyder SH, Graham DI, McIntosh TK: Pharmacologic inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase is neuroprotective following traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma 18:369-376, 2001

[77] Lautier D, Lagueux J, Thibodeau J, Menard L, Poirier GG: Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism. Mol Cell Biochem 122:171-193, 1993

[78] Lee MH, Reynisdottir I, Massague J: Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. Genes Dev 9:639-649, 1995

[79] Li A, Blow JJ: The origin of CDK regulation. Nat Cell Biol 3:E182-E184, 2001

[80] Li KL, Du XL, Song RH, Zhao L, He YN, Zhang JG, Chen L: [Effect of p53 on the variation of renal tubular epithelial cells after kidney ischemia/reperfusion injury]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 23:6-10, 2007

[81] Li Y, Chopp M, Jiang N, Zhang ZG, Zaloga C: Induction of DNA fragmentation after 10 to 120 minutes of focal cerebral ischemia in rats. Stroke 26:1252-1257, 1995

[82] Loft S, Larsen PN, Rasmussen A, Fischer-Nielsen A, Bondesen S, Kirkegaard P, Rasmussen LS, Ejlersen E, Tornoe K, Bergholdt R, .: Oxidative DNA damage after transplantation of the liver and small intestine in pigs. Transplantation 59:16-20, 1995

[83] Ly DH, Lockhart DJ, Lerner RA, Schultz PG: Mitotic misregulation and human aging. Science 287:2486-2492, 2000

[84] Mackey ME, Wu Y, Hu R, DeMaro JA, Jacquin MF, Kanellopoulos GK, Hsu CY, Kouchoukos NT: Cell death suggestive of apoptosis after spinal cord ischemia in rabbits. Stroke 28:2012-2017, 1997

[85] Martin DR, Lewington AJ, Hammerman MR, Padanilam BJ: Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 279:R1834-R1840, 2000

[86] Maulik G, Cordis GA, Das DK: Oxidative damage to myocardial proteins and DNA during ischemia and reperfusion. Ann N Y Acad Sci 793:431-436, 1996

[87] Megyesi J, Andrade L, Vieira JM, Jr., Safirstein RL, Price PM: Positive effect of the induction of p21WAF1/CIP1 on the course of ischemic acute renal failure. Kidney Int 60:2164-2172, 2001

[88] Meylaerts SA, de Haan P, Kalkman CJ, Jaspers J, Vanicky I, Jacobs MJ: Prevention of paraplegia in pigs by selective segmental artery perfusion during aortic cross-clamping. J Vasc Surg 32:160-170, 2000

[89] Miller Q, Peyton BD, Cohn EJ, Holmes GF, Harlin SA, Bird ET, Harre JG, Miller ML, Riley KD, Hogan MB, Taylor A: The effects of intraoperative fenoldopam on renal blood flow and tubular function following suprarenal aortic cross-clamping. Ann Vasc Surg 17:656-662, 2003

[90] Minaga T, Kun E: Spectral analysis of the conformation of polyadenosine diphosphoribose. Evidence indicating secondary structure. J Biol Chem 258:725-730, 1983

[91] Miwa M, Ishihara M, Takishima S, Takasuka N, Maeda M, Yamaizumi Z, Sugimura T, Yokoyama S, Miyazawa T: The branching and linear portions of poly(adenosine diphosphate ribose) have the same alpha(1 leads to 2) ribose-ribose linkage. J Biol Chem 256:2916-2921, 1981

[92] Miyaji T, Kato A, Yasuda H, Fujigaki Y, Hishida A: Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. J Am Soc Nephrol 12:900-908, 2001

[93] Muiras ML, Burkle A: Defending genomic stability over life span: a proposed role for PARP-1. Exp Gerontol 35:703-709, 2000

[94] Muller BT, Grabitz K, Furst G, Sandmann W: [Acute aortic dissection. Diagnosis and therapy of ischemic complications]. Chirurg 71:209-214, 2000

[95] Murakami K, Enkhbaatar P, Shimoda K, Cox RA, Burke AS, Hawkins HK, Traber LD, Schmalstieg FC, Salzman AL, Mabley JG, Komjati K, Pacher P, Zsengeller Z, Szabo C, Traber DL: Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase attenuates acute lung injury in an ovine model of sepsis. Shock 21:126-133, 2004

[96] Murthy KG, Xiao CY, Mabley JG, Chen M, Szabo C: Activation of poly(ADP-ribose) polymerase in circulating leukocytes during myocardial infarction. Shock 21:230-234, 2004

[97] Mustafa NA, Yandi M, Turgutalp H, Ovali E, Aydemir V, Albayrak L: Role of diltiazem in ischemia-reperfusion injury of the intestine. Eur Surg Res 26:335-341, 1994

[98] Nagayama T, Lan J, Henshall DC, Chen D, O'Horo C, Simon RP, Chen J: Induction of oxidative DNA damage in the peri-infarct region after permanent focal cerebral ischemia. J Neurochem 75:1716-1728, 2000

[99] Nakahara S, Yone K, Sakou T, Wada S, Nagamine T, Niiyama T, Ichijo H: Induction of apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1) after spinal cord injury in rats: possible involvement of ASK1-JNK and -p38 pathways in neuronal apoptosis. J Neuropathol Exp Neurol 58:442-450, 1999

[100] Nalos M, Asfar P, Ichai C, Radermacher P, Leverve XM, Froba G: Adenosine triphosphate-magnesium chloride: relevance for intensive care. Intensive Care Med 29:10-18, 2003

[101] Niculescu AB, III, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI: Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. Mol Cell Biol 18:629-643, 1998

[102] Niedergang CP, de Murcia G, Ittel ME, Pouyet J, MANDEL P: Time course of polynucleosome relaxation and ADP-ribosylation. Correlation between relaxation and histone H1 hyper-ADP-ribosylation. Eur J Biochem 146:185-191, 1985

[103] Noda T, Iwakiri R, Fujimoto K, Matsuo S, Aw TY: Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. Am J Physiol 274:G270-G276, 1998

[104] Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, Saito T, Abe K, Saito H, Nakane PK, Nakanishi Y, Koji T: Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: possible involvement of Fas. J Am Soc Nephrol 9:620-631, 1998

[105] Noguchi T, Kikuchi R, Ono K, Takeno S, Moriyama H, Uchida Y: Prognostic significance of p27/kip1 and apoptosis in patients with colorectal carcinoma. Oncol Rep 10:827-831, 2003

[106] O'Reilly MA: DNA damage and cell cycle checkpoints in hyperoxic lung injury: braking to facilitate repair. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 281:L291-L305, 2001

[107] O'Reilly MA, Staversky RJ, Watkins RH, Maniscalco WM: Accumulation of p21(Cip1/WAF1) during hyperoxic lung injury in mice. Am J Respir Cell Mol Biol 19:777-785, 1998

[108] Orend KH, Liewald F, Kirchdorfer B, Sunder-Plassmann L: Management of descending aortic dissection. Ann Ital Chir 66:821-824, 1995

[109] Ouriel K, Green RM, Donayre C, Shortell CK, Elliott J, DeWeese JA: An evaluation of new methods of expressing aortic aneurysm size: relationship to rupture. J Vasc Surg 15:12-18, 1992

[110] Pacher P, Cziraki A, Mabley JG, Liaudet L, Papp L, Szabo C: Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in endotoxin-induced cardiac collapse in rodents. Biochem Pharmacol 64:1785-1791, 2002

[111] Panes J, Perry M, Granger DN: Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. Br J Pharmacol 126:537-550, 1999

[112] Papakostas JC, Matsagas MI, Toumpoulis IK, Malamou-Mitsi VD, Pappa LS, Gkrepi C, Anagnostopoulos CE, Kappas AM: Evolution of spinal cord injury in a porcine model of prolonged aortic occlusion. J Surg Res 133:159-166, 2006

[113] Park DS, Morris EJ, Padmanabhan J, Shelanski ML, Geller HM, Greene LA: Cyclin-dependent kinases participate in death of neurons evoked by DNA-damaging agents. J Cell Biol 143:457-467, 1998

[114] Park SK, Kim W, Lee CH, Koh GY: Differential changes of CDK activities in glomeruli and tubules during the active DNA synthetic period after ischemic injury. Nephron 86:306-314, 2000

[115] Parks DA, Granger DN: Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. Am J Physiol 250:G749-G753, 1986

[116] Parsons JL, Dianova II, Allinson SL, Dianov GL: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts. FEBS J 272:2012-2021, 2005

[117] Petermann AT, Hiromura K, Blonski M, Pippin J, Monkawa T, Durvasula R, Couser WG, Shankland SJ: Mechanical stress reduces podocyte proliferation in vitro. Kidney Int 61:40-50, 2002

[118] Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M, Althaus FR: Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. J Biol Chem 275:40974-40980, 2000

[119] Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J: Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell 78:59-66, 1994

[120] Potten CS, Merritt A, Hickman J, Hall P, Faranda A: Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. Int J Radiat Biol 65:71-78, 1994

[121] Potten CS, Wilson JW, Booth C: Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. Stem Cells 15:82-93, 1997

[122] Qayumi AK, Janusz MT, Jamieson WR, Lyster DM: Pharmacologic interventions for prevention of spinal cord injury caused by aortic crossclamping. J Thorac Cardiovasc Surg 104:256-261, 1992

[123] Roques X, Remes J, Laborde MN, Guibaud JP, Rosato F, MacBride T, Baudet E: Surgery of chronic traumatic aneurysm of the aortic isthmus: benefit of direct suture. Eur J Cardiothorac Surg 23:46-49, 2003

[124] Sallmann FR, Vodenicharov MD, Wang ZQ, Poirier GG: Characterization of sPARP-1. An alternative product of PARP-1 gene with poly(ADP-ribose) polymerase activity independent of DNA strand breaks. J Biol Chem 275:15504-15511, 2000

[125] Scharrer-Pamler R, Kapfer X, Orend KH, Sunder-Plassmann L: Endoluminal grafting of infrarenal aortic aneurysms. Thorac Cardiovasc Surg 47:119-121, 1999

[126] Schelzig H, Chkhotua AB, Wiegand P, Grosse S, Reis S, Art M, Abendroth D: Effect of ischemia/reperfusion on telomere length and CDKI genes expression in a concordant ex-vivo hemoperfusion model of primate kidneys. Ann Transplant 8:17-21, 2003

[127] Schewe CK, Schweikart HP, Hammel G, Spengel FA, Zollner N, Zoller WG: Influence of selective management on the prognosis and the risk of rupture of abdominal aortic aneurysms. Clin Investig 72:585-591, 1994

[128] Schondorf T, Gohring UJ, Becker M, Hoopmann M, Schmidt T, Rutzel S, Rein DT, Ulrich U, Fechteler R, Bersch A, Mallmann P, Valter MM: High apoptotic index correlates to p21 and p27 expression indicating a favorable outcome of primary breast cancer patients, but lacking prognostic significance in multivariate analysis. Pathobiology 71:217-222, 2004

[129] Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, Cochrane CG: Oxidant-induced DNA damage of target cells. J Clin Invest 82:1040-1050, 1988

[130] Schutte B, Ramaekers FC: Molecular switches that govern the balance between proliferation and apoptosis. Prog Cell Cycle Res 4:207-217, 2000

[131] Sencan A, Yilmaz O, Ozer E, Gunsar C, Genc K, Ulukus C, Taneli C, Mir E: Does sucralfate prevent apoptosis occurring in the ischemia/reperfusion-induced intestinal injury? Eur J Pediatr Surg 13:231-235, 2003

[132] Serrano M, Blasco MA: Putting the stress on senescence. Curr Opin Cell Biol 13:748-753, 2001

[133] Sherr CJ, Roberts JM: CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev 13:1501-1512, 1999

[134] Simbulan-Rosenthal CM, Ly DH, Rosenthal DS, Konopka G, Luo R, Wang ZQ, Schultz PG, Smulson ME: Misregulation of gene expression in primary fibroblasts

lacking poly(ADP-ribose) polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A 97:11274-11279, 2000

[135] Smith S: The world according to PARP. Trends Biochem Sci 26:174-179, 2001

[136] Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V: Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. Mol Cell Biol 19:2109-2117, 1999

[137] Szabo G, Seres L, Soos P, Flechtenmacher C, Zsengeller Z, Sack FU, Szabo C, Hagl S: Poly-ADP-ribose polymerase inhibition reduces mesenteric injury after cardiopulmonary bypass. Thorac Cardiovasc Surg 52:338-343, 2004

[138] Szabo G, Soos P, Mandera S, Heger U, Flechtenmacher C, Bahrle S, Seres L, Cziraki A, Gries A, Zsengeller Z, Vahl CF, Hagl S, Szabo C: INO-1001 a novel poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor improves cardiac and pulmonary function after crystalloid cardioplegia and extracorporal circulation. Shock 21:426-432, 2004

[139] Szabo G, Soos P, Mandera S, Heger U, Flechtenmacher C, Seres L, Zsengeller Z, Sack FU, Szabo C, Hagl S: Mesenteric injury after cardiopulmonary bypass: role of poly(adenosine 5'-diphosphate-ribose) polymerase. Crit Care Med 32:2392-2397, 2004

[140] Takahashi K, Greenberg JH: The effect of reperfusion on neuroprotection using an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase. Neuroreport 10:2017-2022, 1999

[141] Takahashi K, Pieper AA, Croul SE, Zhang J, Snyder SH, Greenberg JH: Post-treatment with an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates cerebral damage in focal ischemia. Brain Res 829:46-54, 1999

[142] Tanaka H, Yamashita T, Yachi K, Fujiwara T, Yoshikawa H, Tohyama M: Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) enhances axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury in rats. Neuroscience 127:155-164, 2004

[143] Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM: Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. Cell 81:801-809, 1995

[144] Thiemermann C: Inhibition of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase in ischemia-reperfusion injury. Shock 14:142-143, 2000

[145] Thiemermann C: Development of novel, water-soluble inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate ribose) synthetase activity for use in shock and ischemia-reperfusion injury. Crit Care Med 30:1163-1165, 2002

[146] Thiemermann C, Bowes J, Myint FP, Vane JR: Inhibition of the activity of poly(ADP ribose) synthetase reduces ischemia-reperfusion injury in the heart and skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci U S A 94:679-683, 1997

[147] Tobita M, Nagano I, Nakamura S, Itoyama Y, Kogure K: DNA single-strand breaks in postischemic gerbil brain detected by in situ nick translation procedure. Neurosci Lett 200:129-132, 1995

[148] Tomasevic G, Kamme F, Stubberod P, Wieloch M, Wieloch T: The tumor suppressor p53 and its response gene p21WAF1/Cip1 are not markers of neuronal death following transient global cerebral ischemia. Neuroscience 90:781-792, 1999

[149] Toyokuni S: Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. Pathol Int 49:91-102, 1999

[150] van Lookeren CM, Gill R: Increased expression of cyclin G1 and p21WAF1/CIP1 in neurons following transient forebrain ischemia: comparison with early DNA damage. J Neurosci Res 53:279-296, 1998

[151] Vardulaki KA, Prevost TC, Walker NM, Day NE, Wilmink AB, Quick CR, Ashton HA, Scott RA: Growth rates and risk of rupture of abdominal aortic aneurysms. Br J Surg 85:1674-1680, 1998

[152] Virag L, Szabo C: The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacol Rev 54:375-429, 2002

[153] von Zglinicki T: Oxidative stress shortens telomeres. Trends Biochem Sci 27:339-344, 2002

[154] von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C: Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? Exp Cell Res 220:186-193, 1995

[155] Wadouh F, Lindemann EM, Arndt CF, Hetzer R, Borst HG: The arteria radicularis magna anterior as a decisive factor influencing spinal cord damage during aortic occlusion. J Thorac Cardiovasc Surg 88:1-10, 1984

[156] Wahlberg E, Dimuzio PJ, Stoney RJ: Aortic clamping during elective operations for infrarenal disease: The influence of clamping time on renal function. J Vasc Surg 36:13-18, 2002

[157] Walther A, Bardenheuer HJ: [The abdominal aortic aneurysm. Anesthesiologic considerations and perioperative management in conservative surgical treatment]. Anaesthesist 49:690-703, 2000

[158] Wang P, Zweier JL: Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart. Evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. J Biol Chem 271:29223-29230, 1996

[159] Wayman N, McDonald MC, Thompson AS, Threadgill MD, Thiemermann C: 5-aminoisoquinolinone, a potent inhibitor of poly (adenosine 5'-diphosphate ribose) polymerase, reduces myocardial infarct size. Eur J Pharmacol 430:93-100, 2001

[160] Xiao CY, Chen M, Zsengeller Z, Li H, Kiss L, Kollai M, Szabo C: Poly(ADP-Ribose) polymerase promotes cardiac remodeling, contractile failure, and translocation of apoptosis-inducing factor in a murine experimental model of aortic banding and heart failure. J Pharmacol Exp Ther 312:891-898, 2005

[161] Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D: p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 366:701-704, 1993

[162] Yakovlev AG, Wang G, Stoica BA, Boulares HA, Spoonde AY, Yoshihara K, Smulson ME: A role of the Ca2+/Mg2+-dependent endonuclease in apoptosis and its inhibition by Poly(ADP-ribose) polymerase. J Biol Chem 275:21302-21308, 2000

[163] Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL: Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. Science 297:259-263, 2002

[164] Zheng J, Devalaraja-Narashimha K, Singaravelu K, Padanilam BJ: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene ablation protects mice from ischemic renal injury. Am J Physiol Renal Physiol 288:F387-F398, 2005

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

8 Publikation

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Intensive Care Med. 2007 May; 33(5): 845-50. Epub 2007 Mar 15.

The selective poly(ADP)ribose-polymerase 1 inhibitor INO1001 reduces spinal cord injury during porcine aortic cross-clamping-induced ischemia/reperfusion injury.

Maier C, Scheuerle A, Hauser B, Schelzig H, Szabo C, Radermacher P, Kick J.

Sektion Anasthesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Universitatsklinikum, 89073, Ulm, Germany, peter.radermacher@medizin.uni-ulm.de.

Shock. 2006 Jun;25(6):633-40.

The parp-1 inhibitor ino-1001 facilitates hemodynamic stabilization without affecting DNA repair in porcine thoracic aortic cross-clamping-induced ischemia/reperfusion.

Hauser B, Groger M, Ehrmann U, Albicini M, Bruckner UB, Schelzig H, Venkatesh B, Li H, Szabo C, Speit G, Radermacher P, Kick J.

Sektion Anasthesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung, Universitatsklinikum, Ulm, Germany.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Die Ischämie-Reperfusionssequenz **S.4**

Abb.2: Die Poly(ADP)-Ribosylierung **S.6**

Abb.3: Drei Wege der PARP-Aktivierung **S.10**

Abb.4: Das Yin-Yang der PARP-Inhibition **S.11**

Abb.5: Zellzyklusphasen und CDKIs **S.13**

Abb.6: Schema des Versuchsablaufs **S.24**

Abb.7: INO-1001 Plasmakonzentrationen in Lymphozyten **S.25**

Abb.8: Durchlaufen der Gewebsschnitte durch verschiedene Bäder **S.29**

Abb.9: Trockenphase der gefärbten Präparate **S.30**

Abb.10: Auswertung der Gewebsschnitte am Mikroskop **S.30**

Abb.11: HE-Färbung Darm Placebotier **S.38**

Abb.12: HE-Färbung Darm INO-1001 Tier **S.38**

Abb.13: HE-Färbung Niere Placebotier **S.39**

Abb.14: HE-Färbung Niere INO-1001 Tier **S.39**

Abb.15: HE-Färbung Rückenmark im Vergleich **S.40**

Abb.16: HE-Färbungen des Rückenmarks von Placebotieren **S.40**

Abb.17: p21 Expression im Darm von Placebotieren **S.43**

Abb.18: p21 Expression im Darm von INO-1001 Tieren **S.43**

Abb.19: p21 Expression im Nierengewebe von Placebotieren **S.46**

Abb.20: p21 Expression im Nierengewebe von INO-1001 Tieren **S.46**

Abb.21: p21 Expression im Rückenmark von Placebotieren **S.49**

Abb.22: p21 Expression im Rückenmark von INO-1001 Tieren **S.49**

Abb.23: p27 Expression im Darmgewebe von INO-1001 Tieren **S.52**

Abb.24: p27 Expression im Darmgewebe von Placebotieren **S.52**

Abb.25: p27 Expression im Nierengewebe von Placebotieren **S.55**

Abb.26: p27 Expression im Nierengewebe von INO-1001 Tieren **S.55**

Abb.27: p27 Expression im Rückenmark von Placebotieren **S.58**

Abb.28: p27 Expression im Rückenmark von INO-1001 Tieren **S.58**

Abb.29: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Darm von Placebotieren **S.59**

Abb.30: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Darm von INO-1001 Tieren **S.60**

Abb.31: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Nierengewebe von Plac.tieren **S.60**

Abb.32: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Nierengewebe von INO Tieren **S.61**

Abb.33: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Rückenmark von Plac.tieren **S.61**

Abb.34: Nachweis apoptotischer Zellkerne im Rückenmark von INO Tieren **S.62**

Abb.35: Graphische Darstellung der Verhältnisse Spinalkanal naher geschädigter zu gesunden Nervenzellen **S.62**

Abb.36: Graphische Darstellung der Verhältnisse geschädigter Spinalkanal naher und Vorderhornnervenzellen zu gesunden Nervenzellen **S.64**

Abb.37: Rückenmarksnervenzellen von Placebotieren in der Nissl-Färbung **S.65**

Abb.38: Rückenmarksnervenzellen von INO-1001 Tieren in der Nissl-Färbung **S.66**

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Medikamentöse Therapie der Versuchsgruppen **S.18**

Tab.2: Angaben zur Tiernummer,Gewicht,Geschlecht und Therapie **S.19**

Tab.3: Mikroskopische Auswertung der immunhistochemien Präparate **S.35**

Tab.4: Statistische Auswertung der p21 Expression des Darmgewebes **S.41**

Tab.5: Statistische Auswertung der p21 Expression des Nierengewebes **S.44**

Tab.6: Statistische Auswertung der p21 Expression des Rückenmarks **S.47**

Tab.7: Statistische Auswertung der p27 Expression des Darmgewebes **S.50**

Tab.8: Statistische Auswertung der p27 Expression des Nierengewebes **S.53**

Tab.9: Statistische Auswertung der p27 Expression des Rückenmarks **S.56**

10 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Radermacher bedanken, der mir diese Doktorarbeit ermöglichte. Ich hatte während meiner Versuche sehr viele Freiheiten und konnte mich immer mit Fragen an Ihn wenden. Auch Dr. Kick hatte immer ein offenes Ohr für mich und hat mich egal zu welcher Tageszeit immer unterstützt. Er war und ist immer mehr als nur ein Kollege für mich. Bàlasz Hauser stand mir bei Fragen zur Auswertung an der Seite und ermöglichte mir einen Besuch in der Klinik in Budapest für 4 Wochen, was eine sehr nützliche Erfahrung für mich war. Auch ihm möchte ich danken.
In der Klinik hatte PD. Dr. Hubert Schelzig immer gute und nützliche Tipps, die mich sehr oft mit meinen Versuchen weiterbrachten.
Zusätzlich hat mich das Team der Parkstraße Tanja Schulz, Ingid Eble und Wolfgang Siegler in der praktischen Umsetzung meiner Versuche jederzeit unterstützt.
Nichtzuletzt gilt aber auch besonderer Dank den Mitarbeitern der Pathologie, Carmen Veneruso, PD Dr. Sträter, Dr. Hasel und Dr. Scheuerle, die stets sehr freundlich und unterstützend waren und mir in schwierigeren Versuchszeiten nützliche Ratschläge gaben.
Frau Dr. Scheuerle habe ich es schließlich zu verdanken, dass mir zusätzlich zu den Versuchsreihen, die Nissl-Färbung ermöglicht wurde. Sie gab mir während diesen Versuchen immer wieder die Möglichkeit zu fragen und unterstützte mich wo es nur ging.
Natürlich möchte ich mich zum Schluß noch bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses Studium erst ermöglicht haben. Ohne Sie wäre ich heute sicherlich nicht an diesem Punkt angelangt! Sie hatten immer Verständnis für das was ich brauchte und machte.
Zuguterletzt noch herzlichen Dank an meine liebe Freundin, Katrin Rasch, die mich in dieser Zeit immer unterstützt und aufgebaut hat und ohne die ich wahrscheinlich auch nicht hier angelangt wäre.
Vielen Dank!