

Aus der Klinik und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Olaf Elert

---

---

AUSWIRKUNG VON ISCHÄMIE UND REPERFUSION  
AUF DIE AKTIVITÄT ANTIOXIDATIVER ENZYME,  
DEN GLUTATHIONGEHALT UND DIE  
LIPIDPEROXIDATION IM RATTENHERZ NACH  
HETEROTOPER TRANSPLANTATION

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von  
Dominik Bengel  
aus Würzburg

Würzburg, im Juli 2005

Referent: Herr Prof. Dr. med. Olaf Elert

Koreferent: Herr Prof. Dr. med. Michael Schmidt

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2006

Der Promovend ist Arzt

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. Die humane Herztransplantation	1
1.2. Biochemische Grundlagen des oxidativen Stresses	7
1.2.1. Sauerstoffradikale	7
1.2.2. Lipidperoxidation	9
1.2.3. Antioxidanzien	11
1.2.3.1. Enzymatische Antioxidanzien	12
1.2.3.2. Nichtenzymatische Antioxidanzien	15
1.3. Myokardialer Ischämie-Reperfusionsschaden	16
1.4. Fragestellung der Arbeit	21
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
2.1. Tierversuch	22
2.1.1. Versuchstiere	22
2.1.2. Versuchsprotokoll	22
2.1.3. Heterotope Herztransplantation	23
2.1.4. Probengewinnung	28
2.2. Erfassung der antioxidativen Enzyme und des Glutathionsystems	29
2.2.1. Proteinbestimmung	29
2.2.2. Bestimmung der Aktivität endogener antioxidativer Enzyme	31
2.2.3. Bestimmung der Aktivität von Enzymen des Glutathionsystems	35
2.2.4. Bestimmung der Konzentrationen von nichtenzymatischen Parametern des Glutathionsystems	38
2.3. Konzentrationsbestimmung von Lipidhydroperoxiden	39
2.4. Statistik	40
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>41</b>
3.1. Auswertung der Operationsprotokolle des Tierversuchs	41

<b>3.2.</b>	<b>Auswirkung von kalter Ischämie auf die myokardialen antioxidativen Schutzsysteme und Lipidhydroperoxidbildung</b>	<b>42</b>
3.2.1.	Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Katalase	42
3.2.2.	Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Superoxiddismutase	42
3.2.3.	Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathionperoxidase	43
3.2.4.	Einfluss von kalter Ischämie auf die Konzentration von Glutathion	44
3.2.5.	Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathion-Reduktase	47
3.2.6.	Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathion-S-Transferase	47
3.2.7.	Einfluss von kalter Ischämie auf die Konzentration von Lipidhydroperoxiden	48
<b>3.3.</b>	<b>Auswirkung von Transplantation und Reperfusion auf die myokardialen antioxidativen Schutzsysteme und Lipidhydroperoxidbildung</b>	<b>48</b>
3.3.1.	Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Katalase	48
3.3.2.	Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Superoxiddismutase	50
3.3.3.	Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Glutathion-Peroxidase	51
3.3.4.	Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Konzentration von Glutathion	52
3.3.5.	Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Glutathion-Reduktase	55
3.3.6.	Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Glutathion-S-Transferase	56
3.3.7.	Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Konzentration von Lipidhydroperoxiden	57
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>58</b>
4.1.	<b>Methoden</b>	<b>58</b>
4.2.	<b>Einfluss von kalter Ischämie auf Veränderungen des antioxidativen Schutzsystems und Bildung von Lipidhydroperoxiden im Myokard</b>	<b>60</b>

<b>4.3.</b>	<b>Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf Veränderungen des antioxidativen Schutzsystems und Bildung von Lipidhydroperoxiden im Myokard</b>	<b>64</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>71</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>73</b>
<b>ANHANG A</b>		<b>81</b>
	Reagenzien	81
	Laborgeräte	83
<b>ANHANG B</b>		<b>85</b>
	Danksagungen	85
	Lebenslauf	86

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ASD	Vorhofseptumdefekt
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bichinonische Säure
BSA	bovine serum albumine
Cu/Zn-SOD	Kupfer/Zink-Superoxiddismutase
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EKG	Elektrokardiogramm
EPR	elektron paramagnetic resonance
F344	Versuchstier vom Ratteninzuchtstamm „Fisher 344“
Glu-Äq	Gesamt-Glutathion
Glu-Ratio	Glutathion-Redoxratio
GSH	reduziertes Glutathion
GSH-Px	Glutathion-Peroxidase
GSSG	oxidiertes Glutathion/Glutathiondisulfid
GSSG-R	Glutathion-Reduktase
GST	Glutathion-S-Transferase
HLTx	Herz-Lungen-Transplantation
HPLC	high performance liquid chromatography
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-(Bretschneider)-Lösung
HTx	Herztransplantation
I	Ischämie
KAT	Katalase
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
LDL	Low-density-lipoprotein
LEW	Versuchstier vom Ratteninzuchtstamm „Lewis“
LOOH	Lipidhydroperoxid
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddismutase

NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBT	Nitrobluetetrazoliumchlorid
Nw	Nullwert
NYHA	New York Heart Association
PL	Ligatur des Truncus pulmonalis
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand
R	Reperfusion
Rw	Referenzwert
SOD	Superoxiddismutase
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TI	Trikuspidalklappeninsuffizienz
TPG	Deutsches Transplantationsgesetz
TVP	Transplantatvaskulopathie

## 1. Einleitung

Die erste erwähnte Herztransplantation wurde 1908 durch den Franzosen Alexis Carrel an zwei Hunden durchgeführt. Im Dezember 1967 nahm Dr. Christiaan Barnard am Groote-Schuur-Hospital in Kapstadt, Südafrika, die erste Herztransplantation am Menschen vor, die wie auch die nachfolgenden Transplantationen durch anfängliche akute Abstoßungsepisoden nur begrenzt erfolgreich waren. So wurde die Herztransplantation erst ab den Achtzigerjahren mit Einführung der Immunsuppression, zur erfolgreichen Therapie der akuten Abstoßungsreaktion, wieder häufiger durchgeführt. [1]  
Heute wird das Langzeitüberleben herztransplantierte Patienten vor allem durch die Entwicklung der chronischen Transplantatabstoßung beeinflusst.

### 1.1. Die humane Herztransplantation

In Deutschland wurden von 1963 bis 2003 nach Angaben der Deutschen Stiftung Organtransplantation (DSO) etwa 7900 Herztransplantationen durchgeführt. Leider sind die Transplantationszahlen aufgrund des Organspendermangels rückläufig. Demgegenüber steht durch verbesserte Herzinsuffizienztherapie eine leicht zurückgehende Anzahl von Patienten, die eine Herztransplantation benötigen würden.

Trotz der Fortschritte in der konservativen Therapie und der Therapie mit mechanischen Herzunterstützungssystemem bleibt aber die Herztransplantation die einzige Therapieform, die die Lebensqualität der Patienten deutlich verbessert und ein annähernd normales Leben ermöglicht.

#### **Indikationen**

Indikation für die Herztransplantation ist die terminale Herzinsuffizienz. Entsprechend der klinischen Einteilung nach der New York Heart Association (NYHA) liegen Beschwerden in Ruhe vor, die bei geringster Belastung verstärkt werden (NYHA VI), und zur Lebenserhaltung eine medikamentöse oder apparative Herzinsuffizienzbehandlung erforderlich machen. Die Lebenserwartung dieser Patienten beträgt im allgemein weniger als ein Jahr.

[2, 3] Als Ursachen für die terminale Herzinsuffizienz sind Kardiomyopathien verschiedener Genese sowie komplexe, operativ nicht korrigierbare Herzfehler zu nennen. Im Fall einer zusätzlichen pulmonalen Hypertonie, welche eine Kontraindikation für eine alleinige Herztransplantation darstellt, besteht die Möglichkeit einer kombinierten Herz-Lungen-Transplantation. [3]

Nach den Richtlinien zur Organtransplantation sind gemäss § 16 des deutschen Transplantationsgesetzes (TPG) in der Neufassung vom Februar 2003, herausgegeben von der Bundesärztekammer, sind nachfolgend aufgeführte Kriterien zu erfüllen. [Tab.1]

### Kontraindikationen

Die Gründe für eine Ablehnung einer Transplantation sind Zusatzerkrankungen und psychosoziale Faktoren, welche entweder ein erhöhtes Operationsrisiko mit sich bringen oder im postoperativen Verlauf längerfristig den Transplantationserfolg vermindern.

Die derzeit gültigen Kontraindikationen hat die Bundesärztekammer in den Richtlinien zur Organtransplantation gemäss §16 des deutschen Transplantationsgesetzes herausgegeben. [Tab. 2]

Tab. 1: Aktuelle Indikationen zur Herztransplantation (gem. § 16 TPG)

Anamnese	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ruhedyspnoe, bei geringster Anstrengung verstärkt (NYHA IV)</li> </ul>
Untersuchung	<ul style="list-style-type: none"> <li>Linksherzdekompensation (Kaltschweißigkeit, schneller und flacher Puls, 3. Herzton, feuchte Rasselgeräusche)</li> <li>Rechtsherzdekompensation (Jugularvenenprominenz, Lebervergrößerung, Ikterus, Aszites, Ödeme)</li> </ul>
Labor	<ul style="list-style-type: none"> <li>Serum-Na<sup>+</sup>-Erniedrigung &lt; 135 mmol/l</li> <li>Serum-Noradrenlin (&gt; 800 pg/ml) / Renin (&gt; 15 ng/ml/h) / ANP (&gt;125 pg/ml)</li> </ul>
EKG	<ul style="list-style-type: none"> <li>Komplexe ventrikuläre Arrhythmien</li> </ul>
Echokardiogramm	<ul style="list-style-type: none"> <li>Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser &gt; 75 mm</li> <li>Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser &gt; 65 mm</li> <li>Verkürzungsfraction &lt; 15 %</li> </ul>

Röntgen-Thorax
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herz-Thorax-Quotient &gt; 0,55</li> </ul>
Hämodynamik
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linksventrikuläre Ejektionsfraktion &lt; 20 %</li> <li>• Herzindex &lt; 2 l/min/m<sup>2</sup></li> <li>• Linksventrikulärer enddiastolischer Druck &gt; 20 mmHg</li> <li>• Zentraler Venendruck &gt; 15 mmHg</li> </ul>
Funktionsdiagnostik
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Maximale O<sub>2</sub>-Aufnahme &lt; 10-14 ml/kg/min (stellt zur Zeit ein entscheidendes Kriterium für die Indikationsstellung dar)</li> </ul>

Tab. 2: Aktuelle Kontraindikationen zur Herztransplantation (gem. § 16 TPG)

Grunderkrankung
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fixierte pulmonale Hypertonie, d.h. pulmonaler Gefäßwiderstand (PVR) &gt; 240 dyn·sek·cm<sup>-5</sup> oder transpulmonaler Gradient &gt;15 mmHg (heterotope HTx oder kombinierte HLTx möglich)</li> </ul>
Begleiterkrankungen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Klinisch manifeste Infektionserkrankung</li> <li>• Akute Lungenembolie</li> <li>• Fortgeschrittene irreversible Nieren- und/oder Leberinsuffizienz</li> <li>• Nichtkurativ behandelte Tumorerkrankung</li> <li>• Bestimmte Systemerkrankungen (vgl. Amyloidose)</li> <li>• Fortgeschrittene chronische Lungenerkrankung</li> <li>• Fortgeschrittene zerebrale/periphere arterielle Gefäßerkrankungen</li> <li>• Bestehender schwerer Nikotin-, Alkohol- oder sonstiger Drogenabusus</li> </ul>
Psychosoziale Anamnese
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unzureichende/fehlende Compliance (bzgl. der Transplantation und der Nachsorge)</li> </ul>

## Technik der Transplantation

### *Voraussetzungen für die Transplantation*

Voraussetzung für die Durchführung der Transplantation sind Blutgruppengleichheit (AB0-System) mit dem Spender, eine Übereinstimmung von Körpergröße und –gewicht von Spender und Empfänger ± 15 % und ein gut erhaltenes Transplantat. Letzteres wird definiert über ein unauffälliges Kontraktionsverhalten bei Ausschluss einer makroskopischen erkennbaren Koronarsklerose.

Schwere systemische Infektion oder Tumorerkrankung des Spenders sowie eine intravenöse Katecholamingabe von kumulativ mehr als 15 µg/kg/min gelten als Kontraindikationen für die Organentnahme. [3]

### *Organkonservierung*

Vor der Entnahme wird das Transplantat antegrad über die kanülierte Aorta ascendens mit kardioplegischer Lösung bis zum Herzstillstand koronar perfundiert, topisch mit Eiswasser gekühlt und nach Exzision in eiskalter Ringerlösung steril verpackt. [2]

Eine entscheidende Rolle spielt dabei die Perfusion mit speziellen kalten Protektionslösungen. Das Ziel dieser Perfusion besteht in der Vermeidung eines interstitiellen und zellulären Ödems, Verhütung einer intrazellulären Azidose, Schutz vor Sauerstoffradikalen und der Regeneration des zellulären Energiehaushalts. [3]

### *Operationstechniken*

Heutzutage wird die Herztransplantation in den meisten Fällen orthotop durchgeführt, d.h. das kranke Herz wird durch das Transplantat ersetzt. Nach medianer Sternotomie und Anschluss der Herz-Lungen-Maschine wird in mäßiger Hypothermie (28-30 °C) das insuffiziente Herz unter Erhalt großer Anteile beider Vorhöfe und der großen Gefäße Aorta ascendens und Truncus pulmonalis exzidiert. Die Transplantation des neuen Organs beginnt nach Lower und Shumway (1966) mit den Anastomosen erst des linken, dann des rechten Vorhofs. Die beiden Ausflussgefäße (Aorta und Arteria pulmonalis) werden end-zu-end anastomosiert. [4] Bei dieser in den Sechzigerjahren entwickelten Operationsmethode kann es durch Veränderungen der Vorhofgeometrie vor allem zu Insuffizienzen der Trikuspidalklappe sowie zu Arrhythmie neigung und erhöhter Thrombembolierate kommen.

Seit 1991 haben Dreyfus et. al. als Alternative zur standardisierten Technik nach Lower und Shumway mit der sogenannten bicavalen Methode die direkte Anastomose auch der systemisch- und pulmonalvenösen Gefäße eingeführt. Dadurch wird die Geometrie der Vorhöfe weniger verändert und führt so insgesamt zu einer geringer gestörten Vorhoffunktion. Die Inzidenz von

Klappenvitien sollte damit ebenso wie auftretende Arrhythmien und dadurch erhöhte Thrombogenesegefahr vermindert werden. [5]

In seltenen Fällen findet die seit 1974 von Barnard und Losman eingeführte heterotop Herztransplantation Anwendung. [6] Das Transplantat wird hier in der rechten Thoraxhälfte liegend zuerst mit linkem und rechtem Vorhof anastomosiert. Danach werden Aorta und Truncus pulmonalis end-zu-seit anastomosiert. Das eigene Herz bleibt in situ. [3] Vorteil dieser Methode ist, dass die Transplantation unabhängig von der Herzgröße und dem Lungengefäßwiderstand des Empfängers durchgeführt werden kann. Außerdem ist bei einem Transplantatversagen die Überlebenschance durch das eigene noch verbliebene Herz größer als bei der orthotopen Transplantation. Dieser Vorteil hat sich heute aber aufgrund der verbesserten immunsuppressiven Therapie relativiert. Es bleibt ein erhöhtes Infektions- und Thrombembolierisiko, so dass wegen der schlechteren Prognose der heterotopen Herztransplantation fast ausschließlich orthotop transplantiert wird. [3, 6]

### **Komplikationen**

Man kann unterscheiden zwischen frühen und späten Komplikationen.

Die Frühkomplikationen ereignen sich noch intraoperativ oder innerhalb der ersten postoperativen Tage. Es handelt sich um allgemeine chirurgische Risiken wie Blutungen oder perioperative Infektionen, Rechtsherzversagen aufgrund zu hohen pulmonalarteriellen Druckes, akutes Nierenversagen bei meist schon vorbestehender eingeschränkter Nierenfunktion oder Herzrhythmusstörungen. Zu den Frühkomplikationen wird ebenso die hyperakute Transplantatabstoßung gezählt, die auf einem immunologisch bedingten Angriff des Empfängers auf das neue Organ durch präformierte Autoantikörper besteht (Allergische Reaktion vom Soforttyp (I)). [3, 7]

Zwischen dem ersten und sechsten Monat nach Implantation besteht die höchste Inzidenz einer akuten Abstoßungsreaktion. Diese beruht meistens auf einer von zytotoxischen T-Lymphozyten-vermittelten Immunreaktion mit allogennem Herzmuskelgewebe (allergische Typ IV-Reaktion). Diese Phase der mittelfristigen Transplantatabstoßung wird immer erfolgreicher durch den Einsatz von potenten Immunsuppressiva verhindert. Regelmäßige Kontrollen

durch Endomyokardbiopsien werden zur frühzeitigen Erkennung von Abstoßungsreaktionen durchgeführt. Daneben werden routinemäßig weitere Untersuchungsverfahren, wie die Echokardiographie, intramyokardiales EKG und immunologische Verfahren (zytoimmunologisches Monitoring) durchgeführt. [3]

Die wichtigste Spätkomplikation ist die chronische Transplantatabstoßung durch die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie (TVP). Weiterhin zählen die arterielle Hypertonie (meist renal bedingt), die Trikuspidalklappeninsuffizienz und die Nebenwirkungen der immunsuppressiven Medikamente (Infektionen, Malignome, Organdysfunktionen) zu den Spätkomplikationen. [2] An der TVP erkranken jährlich 5-10 % der Patienten nach Herztransplantation und sie stellt eine der Haupttodesursachen im Verlauf nach einer Herztransplantation dar. Angiographisch sichtbare Veränderungen an den Koronararterien im Sinne der TVP zeigen sich nach 1 und 2 Jahren posttransplantationem in 11 % bzw. 22 %. [8] Nach 5 Jahren weisen 40-50 % aller Patienten Veränderungen der Morphologie der Koronararterien auf. [9]

Die Genese der TVP ist bislang weitgehend ungeklärt. Es werden immunologische Faktoren (humorale Endothelschädigung) wie auch nicht-immunologische Faktoren diskutiert. Unter Letztere fallen postoperative arterielle Hypertonie und Hypercholesterinämie. [10] Mit großer Wahrscheinlichkeit ist eine länger persistierende Cytomegalievirus-Infektion mitbeteiligt. [11] Auch die Rolle des Ischämie-Reperfusionsschadens gewinnt zunehmend an Bedeutung. Ihm wird vor allem die Induktion einer frühen Endotheldysfunktion epikardialer und mikrovaskulärer Strombahngefäße mit nachfolgender Störung der Vasomotorik zugeschrieben. [8] Einen weiteren Einfluss auf die Entwicklung der TVP scheinen akute Abstoßungen zu haben. [12]

Wenngleich die Ursachen für die Entstehung einer TVP noch nicht genau bekannt sind, so ist das histologische Korrelat der TVP bereits gut untersucht. Die chronische Transplantatvaskulopathie ist definiert über eine diffuse akzelerierte konzentrische Koronarsklerose sowohl der epikardialen Arterien als auch der Gefäße der Mikrozirkulation. Es herrscht ein breites Spektrum

zwischen konzentrischer fibröser Intimaverdickung und atherosklerotischen Plaques vor. [8, 13] Früh nach einer Transplantation wird histopathologisch vor allem eine diffuse, konzentrische Intimaverdickung oder eine Vaskulitis gefunden. Später im Langzeitverlauf dominieren entweder fokale Plaques oder diffuse Intimaverdickung bzw. ein gemischtes Bild beider Veränderungen. [14] Die TVP stellt eine Komplikation dar, die aufgrund der transplantationsbedingten Denervierung des Herzens und somit meist vorliegender Symptomfreiheit nur erschwert diagnostiziert werden kann. Im Gegensatz zur akuten Abstoßungsreaktion ist die chronische Form nicht gut durch eine Endomyokardbiopsie erkennbar. Neben nichtinvasiver Diagnostik wie Volumenbelastung und Stress-Echokardiographie zur Demarkierung einer Herzinsuffizienz kommt mit hoher Sensitivität vor allem die Koronarangiographie sowie auch der intravaskuläre Ultraschall zum Einsatz. [9, 15-17]

## 1.2. Biochemische Grundlagen des oxidativen Stresses

Im Gegensatz zum physiologischen aeroben Metabolismus, in dem Sauerstoff über die Atmungskette zur Energiegewinnung beiträgt, entstehen während der Ischämie und Reperfusion vermehrt reaktive Sauerstoffspezies, die zu erhöhtem oxidativem Stress beitragen. [18] Oxidativer Stress ist dabei definiert als das Ungleichgewicht von schädigenden Oxidanzien und schützenden Antioxidanzien zugunsten ersterer. [19].

### 1.2.1. Sauerstoffradikale

Sauerstoffradikale entstehen durch homolytische Spaltung einer sauerstoffhaltigen Verbindung. Bei einer solchen Reaktion ändert sich die Elektronenverteilung so, dass mit unpaaren Elektronen in der äußeren Schale eine paramagnetische Konfiguration mit antiparallelem Spin vorherrscht. Daher zeichnen sich Sauerstoffradikale durch eine hohe Reaktivität aus. [20, 21]

Sauerstoffradikale entstehen im Myokard in verschiedenen Zellkompartimenten. Beteiligt an der Bildung freier Sauerstoffradikale sind unter anderem

Mitochondrien und Myozytenmembranen, sowie Leukozyten, Endothelzellen, Makrophagen und Erythrozyten. Membranständige Arachidonsäurekaskaden, Autooxidation von Katecholaminen und aktivierte Phospholipasen tragen ebenso zur Radikalentstehung bei. [20, 22]

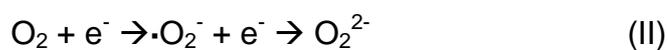
Nach Sies (1986) sind die wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies Superoxidanionen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ), Hydroperoxyradikale ( $\text{HO}_2\cdot$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hydroxylradikale ( $\text{HO}\cdot$ ), Oxyradikale ( $\text{R}\cdot\text{O}\cdot$ ), Dioxyradikale ( $\text{R}\cdot\text{OO}\cdot$ ), Hydroperoxide ( $\text{R}\cdot\text{OOH}$ ) und Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ). Letzterer wird als einziger durch physikalische Einflüsse (Licht und bestimmte Farbstoffe) gebildet und ist aufgrund seiner Elektronenkonfiguration mit am reaktivsten. [23]

Superoxidanionen entstehen durch monovalente Ein-Elektronen-Reduktion eines Sauerstoffmoleküls im Grundzustand (I) und sind im Vergleich mit anderen reaktiven Sauerstoffspezies relativ reaktionsträge.

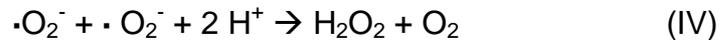


Sie werden im Organismus physiologisch vor allem in Organellen gebildet, die aktiv am aeroben Stoffwechsel teilnehmen. Ihre Bildung wird am Ort der Entstehung durch Oxidoreduktasen wie z. B. die Xanthinoxidase, die Aldehyddehydrogenase, die NADPH-Dehydrogenase und die NAD(P)H-Oxidase begünstigt. [24] Aufgrund ihrer thermodynamischen Eigenschaften können Superoxidanionen keine direkte Lipidperoxidation initiieren. Das bei physiologischem pH-Wert in geringen Mengen aus Superoxidanionen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) entstehende Hydroperoxyradikal ( $\text{HO}_2\cdot$ ) ist hier weitaus aggressiver und fähig Lipide zu oxidieren. [22]

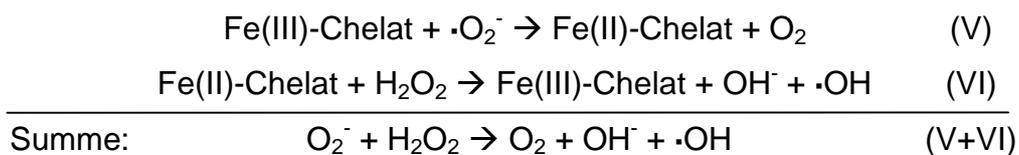
Wird Sauerstoff durch bestimmte Oxidasen (v. a. Glucoseoxidase, Galaktoseoxidase) zweimal reduziert (II), so entsteht das instabile Peroxidion ( $\text{O}_2^{2-}$ ), das sofort mit Protonen zum stabilen Wasserstoffperoxid weiterreagiert (III).



Einen zweiten Weg der Wasserstoffperoxidbildung stellt die Dismutation zweier Superoxidanionen dar (IV).



Wasserstoffperoxid gehört zu den reaktiven Sauerstoffspezies. Obwohl es nicht zu den freien Radikalen gezählt wird spielt es eine zentrale Rolle im Sauerstoffmetabolismus, da es mit einer Vielzahl von organischen und anorganischen Stoffen in Gegenwart von Enzymen, metallhaltigen Porphyrinen, Semichinonen oder Metallionen weiterreagieren kann. Die indirekte Zelltoxizität von Wasserstoffperoxid in Verbindung mit Superoxidanionen kann über die sogenannte „Haber-Weiss-Reaktion“ erklärt werden. Sie wird durch die Übergangsmetallkationen Eisen ((V) und (VI)) oder Kupfer katalysiert.



Das hierbei entstehende Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ) ist ähnlich dem Singulett-Sauerstoff sehr reaktiv. Es besitzt ein hohes Redoxpotential und reagiert so mit fast jeder Art von Molekül und richtet aufgrund seiner nur kurzen Halbwertszeit den größten Schaden am Ort seiner Synthese an. [22, 23]

Die Reaktionskaskade des Sauerstoffs ist mit der Bildung von oben erwähnten radikalischen Sauerstoffverbindungen noch nicht zu Ende. Vielmehr geschehen weitere Reaktionen mit organischen Molekülen zu organischen Sauerstoffspezies (wie Alkylradikalen, Alkoxyradikalen, Hydroperoxyradikalen, Hydroperoxiden, Endoperoxiden und Epoxiden). Diese können bei unzureichenden Schutzmechanismen zu Zell- und Organschäden führen. [23]

### 1.2.2. Lipidperoxidation

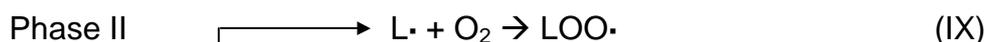
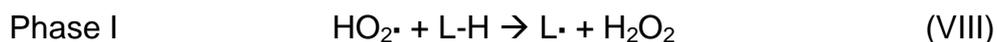
Von besonderer Wichtigkeit im Hinblick auf die chronische Transplantatabstoßung scheint die chemische Veränderung von

Membranlipiden durch Sauerstoffradikale, insbesondere durch Hydroxylradikale, zu sein. Diese Lipidperoxidation betrifft vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren. [22] Dies sind die im Organismus häufig vorkommende Linolsäure (C-18:2,  $\omega$ -6; C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>COOH), Linolensäure (C-18:3,  $\omega$ -3; C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>COOH) und Arachidonsäure (C-20:4,  $\omega$ -6; C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>COOH). [25]

Die Lipidperoxidation kann man in drei Phasen einteilen: Initiation, Kettenreaktion und Abbau/Termination. Phase I (Initiation) kann dabei sowohl von Singulett-Sauerstoff, als auch von radikalischem Sauerstoff ausgelöst werden. Singulett-Sauerstoff greift ungesättigte Fettsäuren an und bildet direkt Hydroperoxide (VII).



Radikalischer Sauerstoff greift ebenfalls die C=C-Doppelbindung an, entzieht jedoch erst ein Wasserstoffatom (VIII), ehe es als konjugiertes Dien unter Addition von molekularem Sauerstoff zum Peroxiradikal weiterreagiert (IX). Am Beispiel des Superoxidanions, das aufgrund des sauren pH-Wertes in der Umgebung von organischen Membranen als Hydroperoxyradikal vorliegt, kann man folgende (Ketten-)Reaktionsgleichungen (Phase II) formulieren:



In Phase III (Termination) zerfallen die normalerweise stabilen Lipidhydroperoxide, katalysiert durch Übergangsmetalle (Eisen, Kupfer), über die Bildung von Alkoxyradikalen, die wiederum Lipidperoxidation auslösen können, zu sekundären Abbauprodukten. Diese sind Aldehyde, Alkane und Alkohole (z.B. Malondialdehyd, 4-Hydroxy-2-nonenal oder Ethan). Termination tritt ein, wenn z. B. zwei Fettsäureradikale miteinander reagieren (=Kettenabbruch) (X). [22, 26-28]



In welchem Ausmaß oben genannte Reaktion (X) abläuft hängt maßgeblich von dem Verhältnis der ungesättigten zu den gesättigten Fettsäuren, vom Verhältnis der Lipidperoxidationssubstrate zu den gebildeten Radikalen (quantitativ und qualitativ) und dem Vorkommen von sogenannten kettenbrechenden Antioxidanzien ab. Wird die Lipidperoxidation durch Sauerstoffradikale nicht durch entsprechend entgegenwirkende Maßnahmen gebremst, kann es zur Schädigung und Dysfunktion der Endothelzellen, zu Veränderungen im Membranfluss und veränderter Membranpermeabilität für Ionen und Proteine, und zur Thrombozytenaggregation mit konsekutiv verstärkter Adhäsion und Aktivierung neutrophiler Granulozyten kommen. Weitere direkte und indirekte Auswirkungen der Lipidhydroperoxide bestehen in vermehrter LDL-Aufnahme in Gefäßwände, Stimulation von Mitogenen und Wachstumsfaktoren, veränderter (modifizierter, destruiertes) Proteinbiosynthese, DNS-Strangbrüchen und Enzyminaktivierung durch vermehrt anfallende toxische Metaboliten des Lipidhydroperoxidabbaus. [21, 28-32]

### 1.2.3. Antioxidanzien

Organismen mit aerobem Stoffwechsel sind neben der Energiegewinnung über die Atmungskette auch den toxischen Neben- und Abbauprodukten des Sauerstoffs ausgesetzt. Unter physiologischen Bedingungen besitzt der Körper ausreichend wirksame Abwehrmechanismen, die aus einem Zusammenspiel von enzymatischen und nichtenzymatischen Antioxidanzien bestehen. Sie sind in der Lage, die Entstehung der toxischen Sauerstoffspezies und ihrer Derivate sowie ihre Reaktion mit Biomolekülen zu hemmen. Somit wird eine massive Schädigung des Organismus verhindert.

Nach Elstner (1990) gibt es grundsätzlich vier verschiedene Abwehrsysteme, die er als „antioxidative Strategie“ der aeroben Zelle bezeichnet:

- 1) Kleine Moleküle, die als Radikalfänger („Scavenger“, „Quencher“ aktiver Zustände) wirken;

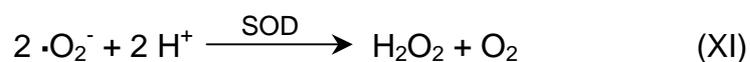
- 2) Enzyme, die mit bestimmten aktivierten Sauerstoffspezies reagieren und diese in weniger toxische Verbindungen überführen;
- 3) Rekonstruktionssysteme (Elektronentransportketten), die Radikalfänger reaktivieren;
- 4) Reparatursysteme, die nach bereits vollzogener Schädigung die Schadstellen reorganisieren und geschädigte Moleküle aus dem Metabolismus entfernen. [22, 23]

Die Vielzahl der antioxidativ wirksamen Substanzen kann unterteilt werden nach ihrer Herkunft (endogen, exogen; tierisch, pflanzlich, synthetisch), nach der chemischen Struktur und ihrer Wasserlöslichkeit, nach dem Aufenthaltskompartiment (intra- und extrazellulär) oder danach, ob es sich um Enzyme handelt oder nicht. [23, 33]

#### 1.2.3.1. Enzymatische Antioxidanzien

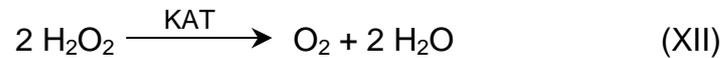
Der hauptsächliche Anteil des enzymatischen antioxidativen Schutzsystems verteilt sich auf die Superoxiddismutase, die Katalase, die Glutathion-Peroxidase und die Glutathion-S-Transferase, die im Folgenden kurz charakterisiert werden sollen. (Abb. 1)

Die Superoxiddismutase (SOD) ist wahrscheinlich das wichtigste intrazellulär und extrazellulär vorkommende antioxidativ wirkende Enzym. Es beschleunigt die Dismutation des physiologisch und im Rahmen von oxidativem Stress auftretenden Superoxidanions um den Faktor  $10^5$  (XI). [23]



Im Organismus kommen zwei Typen dieses Enzyms vor: Zum einen die Cu/Zn-Superoxiddismutase, die im aktiven Zentrum Kupfer- oder Zink-Atome besitzt. Diese Isoform der Superoxiddismutase ist vor allem im Zytoplasma aber auch in Nucleoli, Mitochondrien und an der Endothelzelloberfläche (extrazellulär) lokalisiert. Die Mn-SOD als zweite Isoform hat im aktiven Zentrum ein Mangan-Atom. Sie ist vermehrt in der löslichen Matrix der Mitochondrien nachweisbar. [33]

Das unter anderem bei der Dismutation von Superoxidanionen entstehende Wasserstoffperoxid wird durch die ebenfalls intra- und extrazellulär vorkommende Katalase (KAT) zu Sauerstoff und Wasser detoxifiziert (XII).



Die Katalase findet sich im Organismus vor allem membrangebunden in Peroxisomen und mitochondrialen Membranen.

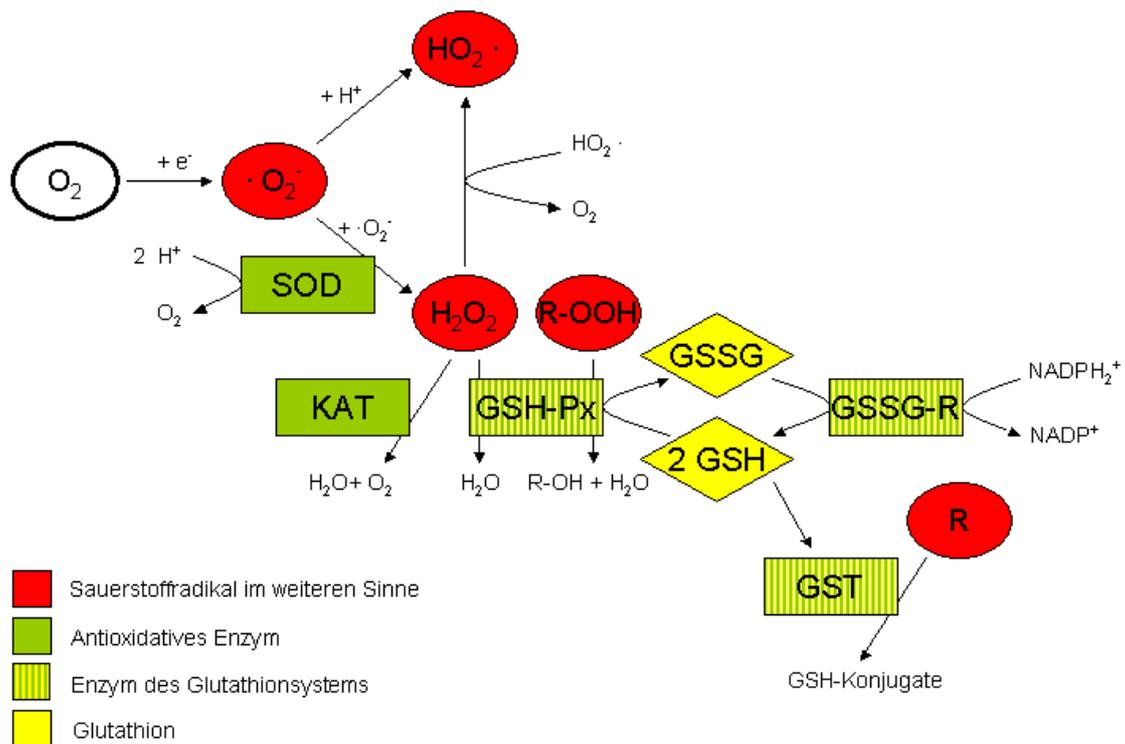
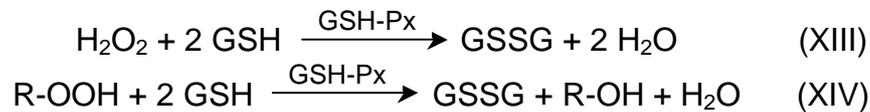


Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Zusammenhänge von Sauerstoffradikalentstehung und Metabolisierung durch antioxidativ wirkende Enzyme und das Glutathionssystem.

$\text{O}_2$  Sauerstoff;  $\cdot\text{O}_2^-$  Superoxidanionradikal,  $\text{H}_2\text{O}_2$  Wasserstoffperoxid,  $\text{R-OOH}$  organisches Peroxid,  $\text{R}$  radikalische Molekül als Substrat der GST; SOD Superoxiddismutase; KAT Katalase; GSH-Px Glutathion-Peroxidase; GSSG-R Glutathion-Reduktase; GST Glutathion-S-Transferase; GSH reduziertes Glutathion, GSSG oxidiertes Glutathion.

Im Gegensatz zur Katalase, die nur Wasserstoffperoxid als Substrat verwendet, katalysiert die Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) darüber hinaus intra- und extrazellulär auch organische Hydroperoxide (XIII und XIV).



Die Glutathion-Peroxidase gehört in die Gruppe der Selenoproteine. Es existieren vier Isoenzyme, die in verschiedenen Kompartimenten (Zytosol, Zytoplasma, membranständig und im Gastrointestinaltrakt) vorkommen. Sie sind in unterschiedlicher Konzentration in den jeweiligen Organen angereichert, haben einen unterschiedlichen Aufbau (Homotetramere oder Monomere), besitzen verschieden große Affinität zu bestimmten Substraten und werden bei Selenmangel in unterschiedlicher Intensität biosynthetisiert. Allen Glutathion-Peroxidasen ist gemeinsam, dass sie zur effizienten Wirkungsweise reduziertes Glutathion (oder vereinzelt auch andere thiolhaltige Reduktionsmittel wie z.B. Thioredoxin) benötigen. [33, 34] Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase scheint vom Selen-Gehalt des Organismus abhängig zu sein. [35]

Die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase haben die Aufgabe der primären Verteidigung gegen reaktive Sauerstoffspezies. [33]

Der Glutathion-Reduktase (GSSG-R) kommt eine wichtige Aufgabe als „Recycler“ von reduziertem Glutathion zu. Dieses Flavoprotein katalysiert die Reduktion von Glutathiondisulfid (=oxidiertes Glutathion; GSSG)(XV).



NADPH aus dem Pentosemonophosphatweg fungiert dabei als Wasserstoffdonator und wird durch diverse Dehydrogenasen (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase oder Lactatdehydrogenase) wieder regeneriert. [23, 33, 36]

Die Glutathion-S-Transferase (GST) kommt vor allem intrazellulär vor. Sie ist in der Lage multifunktional verschiedene radikale Moleküle wie z. B. oxidiertes

Glutathion, Glutathionylradikale und verschiedene andere hydrophobe Agenzien durch die Konjugation mit reduziertem Glutathion und Thioetherbildung zu entgiften (XVI).



Die entstehenden Glutathion-S-Konjugate durch die Glutathion-S-Transferase-Reaktion sowie Abbauprodukte der organischen Peroxide über Glutathion-Peroxidase-Katalyse werden über teils ATP-abhängige Transporter ausgeschieden. [23, 37, 38]

#### 1.2.3.2. Nichtenzymatische Antioxidanzien

Die nichtenzymatischen Antioxidanzien bilden eine heterogene Gruppe niedermolekularer Substanzen. Sie können unterteilt werden in Tocopherole, Flavonoide, Phenolsäuren, synthetische und phenolische Antioxidanzien, aromatische Amine und Heterozyklen und andere Verbindungen. Für den Menschen sind dabei vor allem Glutathion, Tocopherol und Ascorbinsäure von großer Bedeutung. [22]

Unter den lipophilen Substanzen spielt das im Plasma und in LDL-Partikeln vorkommende und membrangebundene Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) die wichtigste Rolle als Radikalfänger, indem es die Biomembranen und Lipoproteine vor Oxidation schützt. Zudem scheint es auch bei der Reparatur oxidierter Aminosäuren (wie Tryptophan, Tyrosin, Methionin oder Histidin) mitzuwirken. [23, 33] Das Vitamin E-Molekül ist in der Lage, die Kettenreaktion der Lipidperoxidation zu unterbrechen, indem es als Reaktionspartner mit den Radikalen interagiert und dabei selbst in zwei Schritten erst als Radikal und schließlich in der oxidierten Form vorliegt. Das so verbrauchte  $\alpha$ -Tocopherol wird an der Außenseite von Membranen durch Ascorbinsäure (Vitamin C) wieder reduziert. [23, 33, 39, 40]

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein ebenso bekanntes intra- wie extrazellulär vorkommendes Antioxidans. Es ist hydrophil und hat so seine Hauptaufgabe im Schutz von Plasmalipiden. Als Reduktionsmittel von Radikalen wird es hierbei

oxidiert. Ferner spielt die Ascorbinsäure eine wichtige Rolle in der Regeneration von oxidiertem Vitamin E und Glutathion. Jedoch kann in Abhängigkeit vom jeweiligen Konzentrationsverhältnis jede der drei Substanzen Glutathion, Vitamin C und Vitamin E als Reduktionsmittel für die jeweils anderen beiden wirken. [21, 22, 33]

Glutathion (L- $\gamma$ -Glutamyl-L-Cysteinglycin), bestehend aus den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin, hat eine wichtige Aufgabe in der intrazellulären Verteidigung gegen oxidativen Stress und elektrophile Moleküle. Es reagiert schnell und nichtenzymatisch mit Hydroxylradikalen und anderen zytotoxischen Produkten. Es nimmt als essentielles Kosubstrat der Glutathionperoxidase und Glutathiontransferase ebenso an der enzymatischen Detoxifikation von Wasserstoffperoxid, Hydroperoxiden und Lipidperoxiden maßgeblich teil. Bei allen Reaktionen reagiert Glutathion als Reduktionsmittel und wird dabei von seiner reduzierten (GSH) in die oxidierte Form (Glutathiondisulfid; GSSG) überführt. [41]

Weitere wichtige nichtenzymatische Antioxidanzien sind das zytoplasmatisch vorkommende  $\beta$ -Karotin (Vitamin A), das die Oxidation von Lipoproteinen (LDL) verhindert und das Koenzym Q10, welches membranständig als redoxaktiver Elektronentransporter arbeitet. [33]

Daneben gibt es noch zahlreiche Plasmaproteine wie Transferrin, Laktoferrin, Coeruloplasmin, Albumin, Haptoglobin, Hämopexin und die Harnsäure, die alle die über Interaktion mit Metallionen initiierte Lipidperoxidation und die Bildung freier Radikale im antioxidativen Sinne verhindern können. [21, 42, 43]

### 1.3. Myokardialer Ischämie-Reperfusions-Schaden

Es ist bekannt, dass ein Organ bei seiner Transplantation einer Phase der Ischämie ausgesetzt ist, die schädigend auf das Gewebe wirkt. Mit nachfolgender Reperfusion ist die wichtigste Voraussetzung für das Organüberleben, nämlich die Sauerstoffzufuhr, wieder hergestellt. Paradoxe Weise ist hier jedoch weiterer Gewebeschaden, der Ischämie-Reperfusions-Schaden, möglich. [18]

Der in der Ischämiephase vorherrschende Sauerstoffmangel bewirkt, dass in der mitochondrialen Atmungskette die Bildung von energiereichem Adenosintriphosphat (ATP) stagniert, und ATP über Adenosindi- (ADP) und Adenosinmonophosphat (AMP) letztlich zu Hypoxanthin und Xanthin abgebaut wird. (Abb. 2) Mit dem Verlust der Energieresourcen (ATP) geht die Fähigkeit der Membran verloren, über ATP-abhängige Transportsysteme die Elektrolytgradienten aufrecht zu erhalten. Es kommt zu einem Kaliumausstrom und Kalziumeinstrom an der Zelle, wodurch die Myozyten elektrisch destabilisiert und in ihrer Kontraktilität beeinträchtigt werden. Weiterhin wird angenommen, dass durch ATP-Verlust und Kalziumeinstrom eine Konversion

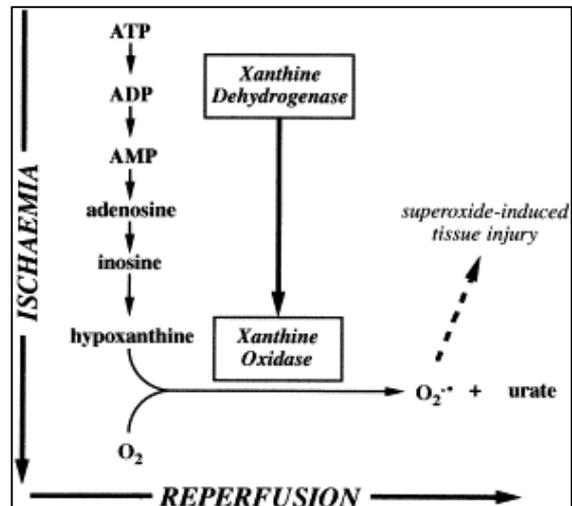


Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der Abläufe in der Ischämie- (vertikal) und Reperfusionphase (horizontal) nach Maxwell (1997) [45]

der Xanthin-Dehydrogenase über kalziumabhängige Proteasen zur Xanthin-Oxidase bewirkt wird. [44] Zusätzlich reduziert die Ischämie die Wirksamkeit zellulärer Abwehrmechanismen gegen die Sauerstofftoxizität. [45]

Während der Reperfusion generiert die Xanthin-Oxidase aus Hypoxanthin bzw. Xanthin und neu zugeführtem Sauerstoff Superoxidanionen. [46] Beim Menschen bestehen bislang Zweifel, ob über diesen Mechanismus relevante Radikalmengen entstehen, da im humanen Myokard nur geringe Mengen der Xanthin-Oxidase nachgewiesen wurden. Dort werden als Orte der Bildung freier Radikale die Elektronentransportkette in den myokardialen Mitochondrien und die NADPH-Oxigenase der neutrophilen polymorphkernigen Leukozyten und Makrophagen diskutiert. Über die ischämisch bedingt niedrigere Eisenbindungskapazität im Blut könnte mehr freies Eisen vorliegen und so über eine gesteigerte Reaktionsgeschwindigkeit in der Haber-Weiss-Reaktion vermehrt Hydroxylradikale aus Superoxidanionen gebildet werden. Auch in den Membranen der Herzmuskel- und Kapillarendothelzellen selbst werden über

den Arachidonsäuremetabolismus reaktive Sauerstoffspezies gebildet. [44] Darüber hinaus wird durch Rekrutierung weiterer aktivierter neutrophiler Granulozyten durch Mediatoren der Endothelzellen die Radikalbildung forciert. [47] Dass es durch Ischämie und Reperfusion tatsächlich zu vermehrtem Anfall von reaktiven Sauerstoffspezies kommen kann, wurde durch „elektron paramagnetic resonanz“(EPR)-Untersuchungen nachgewiesen. [48, 49]

Der Bildung freier Radikale steht ein System von enzymatischen und nichtenzymatischen Antioxidanzien gegenüber, das oxidativen Stress zu kompensieren versucht. Zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen im Herzmuskelgewebe zählen die Superoxiddismutase zur Detoxifizierung von Superoxidanionen sowie die Katalase und die Glutathion-Peroxidase zum Abbau von Wasserstoffperoxiden und von organischen Hydroperoxiden. [33] Die in höherer Aktivität vorliegende Glutathion-Peroxidase scheint dabei vor allem bei geringer Wasserstoffperoxidkonzentration am effektivsten zu arbeiten, wogegen die Katalase ihre Bedeutung eher unter Bedingungen vermehrten oxidativen Stresses zu haben scheint. [33, 50] Die Glutathion-Peroxidase, die auch organische Peroxide reduziert, ist gebunden an das nichtenzymatische Glutathionsystem, in dem Glutathion zu Glutathiondisulfid oxidiert wird. Reduziertes Glutathion ist darüber hinaus zur Aufrechterhaltung der antioxidativ wirksamen Formen der nichtenzymatischen Antioxidanzien Vitamin C und E beteiligt. Die NADPH-abhängige Glutathion-Reduktase reduziert oxidiertes Glutathion. Die Anpassungsfähigkeit ihrer Umsetzungsrate im Myokard ist limitiert und stellt somit laut Elstner (1993) einen Schwachpunkt im antioxidativen Glutathionsystem dar. [23, 51]

Das myokardiale antioxidative Schutzsystem ist in der Lage, sich bei zunehmender Radikalbildung zu adaptieren. Übersteigt das durch postischämische Reperfusion induzierte Radikalaufkommen die Kapazitäten der Abwehrmechanismen, so resultiert daraus Gewebsschädigung. [52] Pathophysiologisch kommt es wahrscheinlich durch freie Sauerstoffradikale zur Lipidperoxidation membranständiger ungesättigter Fettsäuren. Daraus resultierende Lipidhydroperoxide können in einer Kettenreaktion einerseits durch die Bildung neuer Radikale durch Fettsäureoxidation, andererseits durch

sekundäre zytotoxische und zirkulierende Radikalspezies den schädigenden Einfluss aufrecht erhalten und verstärken. Sekundäre Abbauprodukte sind im Gegensatz zu reaktiven Sauerstoffspezies stabiler und können über Diffusion und Zirkulation auch an entfernt gelegenen Orten Schädigungen herbeiführen. [53]

Wie die Antioxidanzien des Organismus auf den Einfluss von Ischämie und Reperfusion reagieren, um Gewebeschaden durch Lipidhydroperoxide zu verhindern, ist zur Zeit Gegenstand der Forschung. In den letzten Jahren wurden verschiedene Studien zur Erfassung der Auswirkungen von oxidativem Stress und der Gabe von verschiedenen Antioxidanzien auf den Ischämie-Reperfusionsschaden des Myokards durchgeführt. [33] Diese wurden meist am isolierten Rattenherzmodell in der Perfusionsanordnung nach Langendorff [54] durchgeführt. Dieses Modell kann isolierte Vorgänge am Herzen zeigen. Einflüsse des Organismus bleiben dabei unbeachtet.

Coudray et al. (1995) konnten am Perfusionsmodell mit Herzen von Wistar-Ratten nach 10, 20 und 30 Minuten „no flow-Ischämie“ bzw. 30, 60 und 90 Minuten „low flow-Ischämie“ (0,1 bzw. 0,35 ml/min Perfusionsfluss) und nachfolgender 10minütiger Reperfusion keinerlei Änderungen der erfassten antioxidativen Enzyme (Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase) weder nach der Ischämiephase noch nach Abschluss der Reperusionsphase nachweisen. [55] Im Gegensatz dazu konnten Porreca et al. (1994) mit ebenfalls ex-vivo perfundierten Sprague-Dawley-Rattenherzen zeigen, dass nach totaler Ischämie von 30 Minuten und nachfolgender 30minütiger Reperfusion die Aktivitäten der selenabhängigen Glutathionperoxidase sowie der Katalase abfallen. [56] Unter ähnlichen Versuchsbedingungen zeigten Kirshenbaum et Singal (1993), dass nach 10minütiger Ischämie und 15 Minuten Reperfusion die Aktivitäten sowohl der Superoxiddismutase als auch der Glutathionperoxidase signifikant gegenüber dem Ausgangswert abnahmen. Die Aktivität der Katalase hingegen blieb unbeeinträchtigt. [57] Haramaki et al. (1998) zeigten ebenfalls im Langendorff-Perfusion-Modell an Sprague-Dawley-Rattenherzen, dass nach globaler Ischämie von 20, 40, und 60 Minuten (no flow) und 20 bzw. 40minütiger

Reperfusion keine Änderung der antioxidativen Enzymaktivitäten vorliegt. Nach 40 Minuten Ischämie zeigte sich aber ein Abfall des reduzierten Gewebeglutathions (GSH), welches nach Ende der Reperfusion wieder angestiegen war. Nach Zugabe von 500 $\mu$ M Wasserstoffperoxid zur exogenen Steigerung des oxidativen Stresses konnten signifikante Aktivitätsverluste der Glutathionperoxidase nach 20 Minuten Ischämie und 40 Minuten Reperfusion gemessen werden. Der Gehalt des Gewebeglutathions sank dabei stark ab. Arduini et al. (1988) stellten am perfundierten Rattenherz (Sprague-Dawley) nach globaler 60minütiger „low flow-Ischämie“ fest, dass die Glutathionperoxidase im Zytosol sowie in den Mitochondrien zusammen mit der Glutathionreduktase einen Aktivitätszuwachs verzeichnet. Nach 30minütiger Reperfusion zeigte die Glutathion-Peroxidase der Mitochondrien einen weiteren Aktivitätszuwachs, wohingegen die Glutathion-Peroxidase des Zytoplasmas keine Änderung mehr erfuhr. Die Aktivität der Glutathion-Reduktase hingegen fiel nach Anstieg während der Ischämie wieder ab. Das in der Ischämiephase schon signifikant gestiegene reduzierte Glutathion konnte nach der Reperfusion in noch höherer Konzentration gemessen werden. Oxidiertes Glutathion hingegen war erst nach der Reperfusion in signifikant höherer Menge messbar. Bei separater Messung der Cu/Zn-SOD und der Mn-SOD fiel nur die Aktivität der mitochondrialen Superoxiddismutase während der Ischämiephase ab. [58]

Reaktive Sauerstoffspezies bilden Lipidhydroperoxide, wenn sie mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren reagieren. [59] Durch Versuche mit exogener Zugabe von Lipidhydroperoxiden oder ihren Abbauprodukten 4-Hydroxynonenal oder Malondialdehyd wurde gezeigt, dass Gewebsschaden und kardiale Dysfunktion verursacht werden können. [60] Eaton et al. (2001) propagierten im Langendorff-Modell, dass Lipidhydroperoxid-Proteine, die über Westernblot quantifiziert wurden, zeitabhängig durch Ischämie gebildet werden. Ein Maximum trat dabei 20 Minuten nach Ischämiebeginn auf. Durch anschließende Reperfusion wurde die Lipidhydroperoxid-Protein-Konzentration nicht beeinflusst. Tavazzi et al. (1998) hingegen haben in einem Langendorff-Versuch gezeigt, dass die Malondialdehydbildung im Rattenherzhomogenat und

–perfusat während der Reperfusion umso höher ist, je länger die Ischämiephase gedauert hat. [61]

Die Ergebnisse der im Langendorff-Apparat untersuchten Rattenherzen hinsichtlich des Verhaltens der antioxidativen Enzyme sowie der Lipidhydroperoxidbildung unter Ischämie und Reperfusion sind konträr. Die Versuchsbedingungen variieren sehr hinsichtlich der Tierart, der Dauer und Art der Ischämie/Reperfusion, der Perfusionslösung in der Langendorffapparatur und der Methode zur Bestimmung der Parameter, so dass ein Vergleich nur bedingt möglich ist.

#### 1.4. Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, umfassend die Auswirkungen von oxidativem Stress, der durch Ischämie und Reperfusion nach heterotoper Herztransplantation an der Ratte induziert wird, zu untersuchen. In diesem Zusammenhang soll die Bildung von freien Sauerstoffradikalen und die damit verbundene Peroxidation von Lipiden in Abhängigkeit von der Ischämiezeit und der Reperfusion in Kurzzeitversuchen ermittelt werden. Ferner soll die Kapazität der antioxidativen Schutzsysteme im Transplantat charakterisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Tierversuch

#### 2.1.1. Versuchstiere

Die heterotope allogene Herztransplantation wurde mit den Ratteninzuchtstämmen Lewis (LEW) und Fischer 344 (F344) der Gattung *rattus norvegicus* durchgeführt, wobei männliche LEW-Tiere als Spender und männliche F344-Tiere als Empfänger dienten. Bezogen wurden die Tiere von der Charles River GmbH aus Sulzfeld/Deutschland. Die Tierhaltung erfolgte in der Abteilung für experimentelle Transplantationsimmunologie der Universitätsklinik Würzburg gemäß dem Deutschen Tierschutzgesetz. Die Tiere unterlagen kontrollierten Tag-Nacht-Zyklen, hatten freien Zugang zu Trockenfutter und Wasser und konnten sich vor der Operation eine Woche lang akklimatisieren.

#### 2.1.2. Versuchsprotokoll

Es wurden 9 Gruppen (G1-G9) zu je 6 Tieren mit festgelegten Ischämie- und Reperusionszeiten gebildet (Abb. 3). Drei Gruppen (G1-G3) wurden ausschließlich kalter Ischämie von 30, 240 und 480 Minuten ohne nachfolgende Reperfusion unterzogen. Die Gruppen G4-G9 wurden kalter Ischämie von 30, 240 und 480 Minuten ausgesetzt und anschließend jeweils 30 oder 240 Minuten reperfundiert.

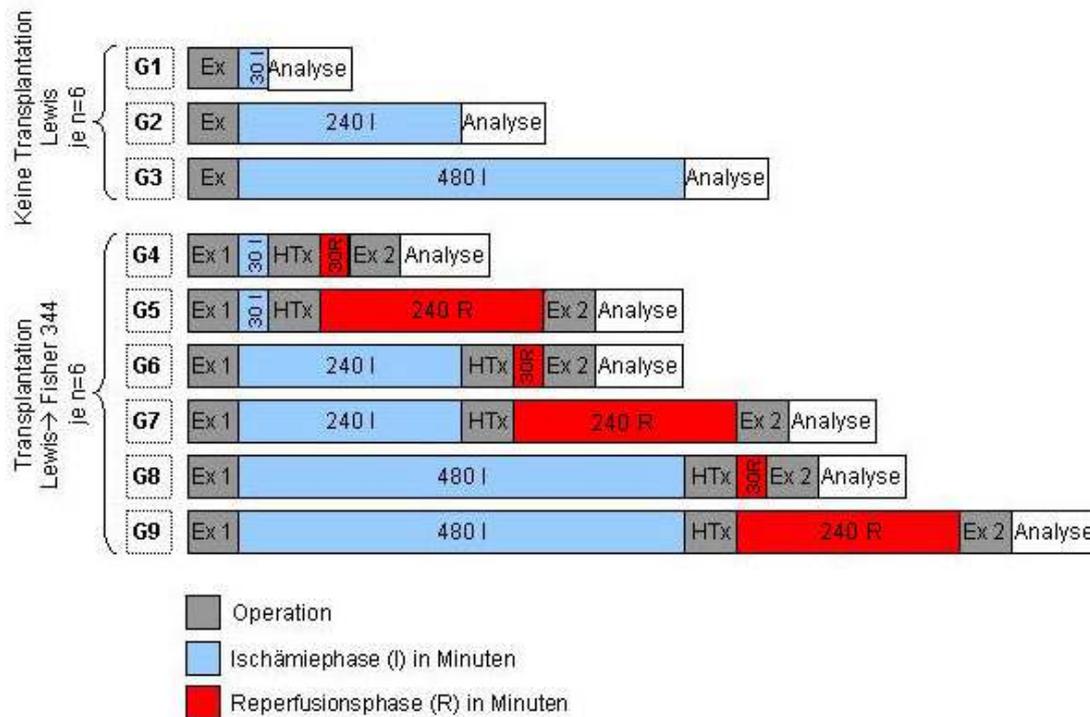


Abb. 3: Versuchsprotokoll:

Gruppen G1-G3:

Explantation (Ex) von Lewis-Ratten-Herzen, gefolgt von kalter (4°C) Ischämie (30, 240 und 480 Minuten) in Bretschneiderlösung, anschließend Analyse der Parameter.

Gruppen G4-G9:

Explantation (Ex 1) von Lewis-Ratten-Herzen, gefolgt von kalter (4°C) Ischämie (30, 240 und 480 Minuten) in Bretschneiderlösung, anschließend Transplantation (HTx) in den Empfänger und warme Reperfusion mit Blut (30 oder 240 Minuten), Explantation (Ex 2) aus dem Empfänger gefolgt von Analyse der Parameter.

### 2.1.3. Heterotope Herztransplantation

Die heterotope Herztransplantation ist nach einem Verfahren von Ono und Lindsey (1969) [62], mit Modifikation nach Yokoyama (1995) [63], in mikrochirurgischer Operationstechnik durchgeführt worden. Die Modifikationen beinhalten einen Vorhofseptumdefekt (ASD), eine Trikuspidalklappeninsuffizienz (TI), die Ligatur des Truncus pulmonalis (PL) und eine Anastomosierung des rechten Atriums mit der Vena cava inferior des Empfängers. Der resultierende Blutfluss (Abb. 4) führt über die Vena cava inferior in das rechte Atrium und von dort über den künstlichen rechts-links-

Shunt (ASD) in den linken Vorhof, dann physiologisch über die Mitralklappe in den linken Ventrikel und über die Aortenklappe und den Aortenstumpf in die Aorta abdominalis des Empfängers. Blut, das über die Trikuspidalklappe in den rechten Ventrikel gelangt, wird bei der Kontraktion wieder retrograd in den rechten Vorhof ausgeworfen, und nimmt so an der intrakardialen Zirkulation teil. Außerdem wird dadurch die rechte Herzkammer vor Überdehnung und Thrombogenese geschützt. Die Modifikationen verbessern erheblich die intrakardiale Hämodynamik (Volumen- und Druckbelastung) des Transplantats. [63]

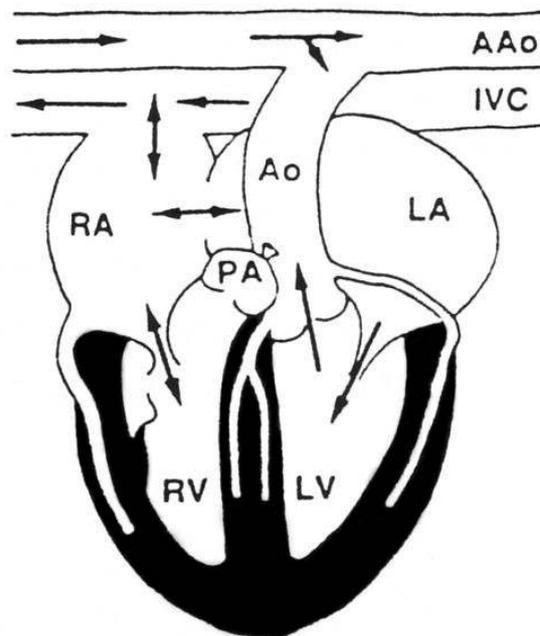


Abb. 4: Blutfluss im Transplantat nach Modifikationen (aus [63]);  
AAo, Aorta abdominalis; IVC, Vena cava inferior; Ao, Aorta; PA, ligierter Truncus pulmonalis; LV, linker Ventrikel; RV, rechter Ventrikel; LA linker Vorhof; RA rechter Vorhof mit Septumdefekt und Trikuspidalklappeninsuffizienz

Zu Beginn jeder Operation wurde die Narkose in einer Anästhesiebox über ca. zwei Minuten bei einem Sauerstoffflow von 2,5 l/min und Narkosegaszumischung von 4 Vol.% Isoflurane<sup>®</sup> eingeleitet. Im narkotisierten Stadium wurden die Tiere rasiert und gewogen.

### *Explantation*

In Narkose bei einem Sauerstoffflow von 2,5 l/min und einer Narkosegaszumischung von 2 Vol.% Isoflurane<sup>®</sup> wurde unter Analgesie mit Tramadol über eine mediane Laparotomie das Abdomen eröffnet. Die Tötung der Tiere erfolgte über die Durchtrennung der großen Bauchgefäße (Aorta abdominalis und Vena cava inferior). Damit wurde bei noch schlagendem Herzen soviel Blutvolumen ausgeworfen, dass einerseits Vor- und Nachlast vor der Entnahme minimiert wurden und andererseits die Gefahr einer Thrombusbildung verringert wurde. Das Zwerchfell wurde von abdominell her eröffnet und der Thorax mit zwei lateralen Schnitten zur Axilla hin eröffnet. Mit Bulldockklemmen wurden die untere und die beiden oberen Hohlvenen abgeklemmt. (Abb. 5) Anschließend wurde das Herz mit vier Grad kalter Bretschneider-Kardioplegielösung (Custodiol<sup>®</sup>, Dr. F. Köhler Chemie, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) zuerst retrograd über die Vena cava inferior (2 ml), dann antegrad über die Aorta ascendens und über die Koronararterien (8 ml) bis zum Stillstand perfundiert.

Die zu- und abführenden Gefäße wurden mit 6-0 Prolene<sup>®</sup>-Fäden ligiert: Vena cava inferior, Vena cava superior dexter und Vena pulmonalis dexter. Das rechte Atrium wurde zwischen der Vena cava superior und inferior inzidiert, danach über den rechten Vorhof das Vorhofseptum im Sinne eines ASD teilreseziert und durch Resektion der Trikuspidalklappensegel eine Insuffizienz erzeugt. (Abb. 6) Nach Ligatur der Vena cava superior sinister, Vena pulmonalis sinister, Vena pulmonalis lobi caudati und Truncus pulmonalis wurde die Aorta proximal des Abgangs des Truncus brachiocephalicus durchtrennt und thrombotisches Material entfernt. (Abb. 7) Nach Explantation des Herzens wurde das Transplantat in 4° C kalter Kardioplegielösung im Kühlschrank aufbewahrt.

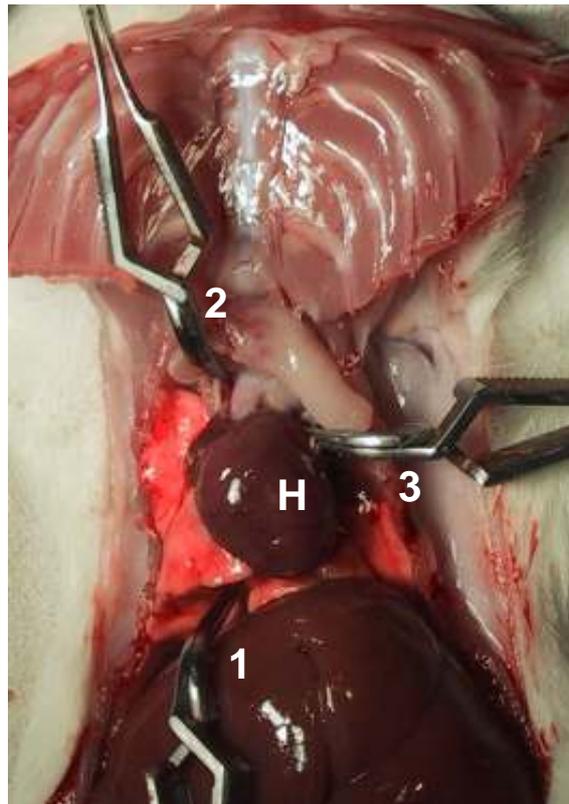


Abb. 5: Operationssitus vor Entnahme des Herzens bei aufgeklapptem Brustkorb; untere (1) und obere rechte (2) sowie obere linke (3) Hohlvene mit Bulldockklemmen verschlossen; Herz (H) umgeben von Thymus (kranial), Leber- (kaudal) und Lungenparenchym (lateral).

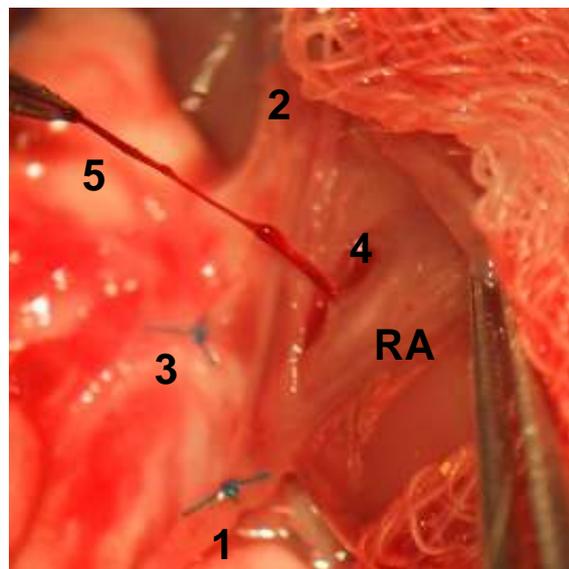


Abb. 6: Sicht durch das Operationsmikroskop auf die rechtsseitige Herzpräparation; untere (1) und obere (2) rechte Hohlvene sowie rechte Lungenvene (3) mit 6-0 Prolene®-Faden ligiert; eröffneter rechter Vorhof (RA) mit künstlichem Vorhofseptumdefekt (4); Entfernung von thrombotischem Material (5) aus dem rechten Vorhof.

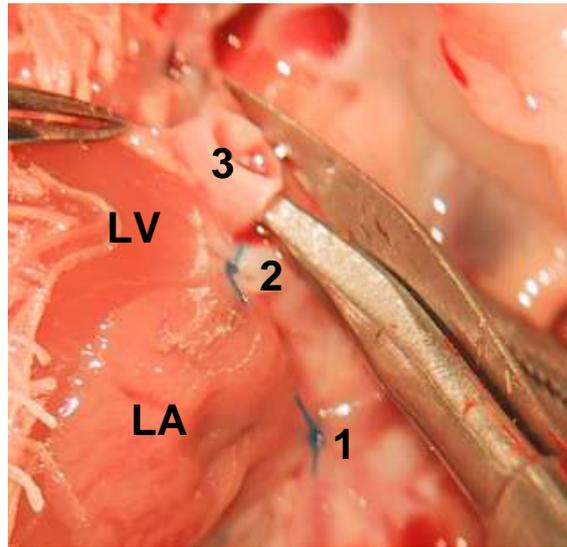


Abb. 7: Sicht durch das Operationsmikroskop auf die linksseitige Herzpräparation; Sammelligatur der linken oberen Hohlvene und der linken Lungenvene (1); ligierter Truncus pulmonalis (2); Durchtrennung der Aorta (3), die dem linken Ventrikel entspringt (LV); linker Vorhof (LA).

### *Implantation*

Die Implantation in die F334-Tiere erfolgte in Narkose bei einem Sauerstofffluss von 2,5 l/min und einer Narkosegaszumischung von 2 Vol.% Isoflurane<sup>®</sup> unter Tramadol-Analgesie. Nach medianer Laparotomie von ca. 5 cm Länge wurde das Darmkonvolut feucht ausgelagert und das Peritoneum über den großen Bauchgefäßen infrarenal stumpf eröffnet. Die kleinen Seitenäste der Aorta abdominalis und der Vena cava inferior nach lateral und dorsal wurden in einem Bereich von ca. 1 cm mit Prolene<sup>®</sup> 6-0 ligiert. Die freigelegten Bauchgefäße wurden mit Bulldockklemmen ausgeklemmt, mit einer Längsinzision über jeweils 4-5 mm eröffnet und mit NaCl-Lösung gespült um Thromben zu entfernen. (Abb. 8) Zuerst wurde die Aorta unter dem Operationsmikroskop bei 10facher Vergrößerung mit einer fortlaufenden evertierenden 9-0 Prolene<sup>®</sup>-Naht end-zu-seit an die Aorta abdominalis anastomosiert, nachfolgend dann der rechte Vorhof an die Vena cava inferior mit derselben Nahttechnik. Nach Kontrolle der Anastomosen wurde die Blutzirkulation wieder freigegeben. Sobald das Transplantat wieder zu kontrahieren begann, wurde das

Darmkonvolut zurückverlagert und die Bauchdecke mit fortlaufenden Nähten verschlossen.

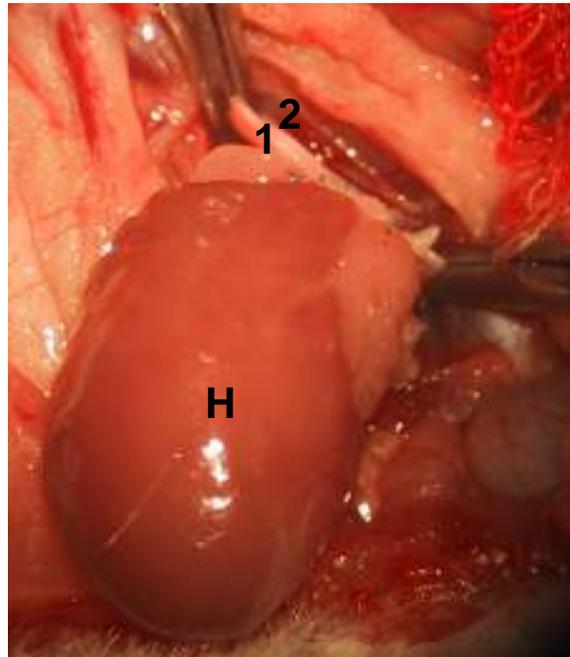


Abb. 8 Implantation des Herzens, Blick durch das Operationsmikroskop: Aorta abdominalis (1) und Vene cava (2) mit Bulldock-Klemmen ausgeklemmt; Herz (H) in Position zur Anastomosierung.

#### 2.1.4. Probengewinnung

##### *Transplantatentnahme*

Vor Entnahme der Transplantate wurden die F344-Tiere erneut unter 2,5 l Sauerstoffflow und 4 Vol.% Isoflurane<sup>®</sup> narkotisiert sowie mit Tramadol analgesiert. Nach der Tötung der Tiere mittels Durchtrennen der großen Bauchgefäße wurde das Transplantat zügig entnommen, in kalter Kochsalzlösung vom Blut gereinigt und anschließend die Vorhöfe über einen Schnitt in der Klappenebene entfernt. Das so präparierte Transplantat wurde nach definierter Teilung in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren und später im Tiefkühlschrank bei -80 °C bis zur Probenanalyse aufbewahrt.

##### *Aufarbeitung der Gewebeschnitte zur Analyse*

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden zuerst unter stetiger Kühlung durch flüssigen Stickstoff in einem speziell dafür angefertigten Gerät durch starke

Kompression in drei Durchgängen zerkleinert. Anschließend wurden die entstandenen Pellets entweder in PBS-Puffer (für KAT, SOD, GSH-Px, GSSG-R, GST) oder in einem Homogenatpuffer aus Orthophosphorsäure und DTPA (für GSH, GSSG) mit einem Glas-Glas-Mörser auf Eis homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 12.000 g für 5 min wurde der Überstand bis zur weiteren Analyse wieder bei -80 °C eingefroren.

## 2.2. Erfassung der antioxidativen Enzyme und des Glutathionsystems

Der Einfluss von kalter Ischämie und Reperfusion auf das endogene antioxidative Schutzsystem der Versuchstiere wurde anhand photometrischer Aktivitätsmessungen der Katalase (KAT), Superoxiddismutase (SOD), Glutathion-Peroxidase (GSH-Px), Glutathion-Reduktase (GSSG-R), und Glutathion-S-Transferase (GST) sowie durch die Messung der Konzentrationen von reduziertem und oxidiertem Glutathion über HPLC-Methode im Rattenherzhomogenat erfasst.

Die Enzymassays zur Aktivitätsermittlung der Katalase und Superoxiddismutase wurden hierbei manuell mit einem Photometer der Firma Pharmacia Biotech, die Assays für die Aktivitätsbestimmung der Glutathion-Enzyme halbautomatisch in einem Zentrifugalanalyzer Cobas Fara der Firma Roche durchgeführt.

Für die Angabe der spezifischen Aktivität wurde von jeder Probe die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.2.1. Proteinbestimmung

*Proteinbestimmung mit dem Pierce-Test für Katalase, Superoxiddismutase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase, Glutathion-S-Transferase*

Für diese Proteinbestimmung wurde der „BCA Protein Assay Kit“ der Firma Pierce, Rockford, IL, USA. verwendet. Diesem liegt ein gekoppelter photometrischer Test zugrunde, dessen erste Reaktion auf einer Komplexbildung von

Protein (Peptidbindung) in basischem Milieu mit Kupfer(II)-Ionen zu einem Kupfer(I)-Komplex (=Biuret-Reaktion) basiert. In einem zweiten Reaktionsschritt bildet das Kupfer(I)-Kation zusammen mit zwei Molekülen bichinonischer Säure (BCA) einen violetten Farbkomplex, der bei 562 nm Wellenlänge photometrisch erfasst wird. Die Absorption des Farbkomplexes ist linear im Bereich von 20 µg/ml bis 2000 µg/ml Protein. Die Menge der Kupfer(II)-Ionen, die zu Kupfer(I)-Ionen reduziert wird ist abhängig von der makromolekularen Proteinstruktur, der Anzahl der Peptidbindungen und der Präsenz der drei Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin und bildet so die Grundlage für die hoch sensitive und selektive Proteinbestimmung.

Durchführung:

Die Proteinbestimmung wurde gemäß Protokoll mit Modifikationen (Messung bei 620 nm; drei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur) durchgeführt. Die Proben wurden 1:10 in PBS-Puffer verdünnt und dann zusammen mit einer Standardverdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (BSA) zu je 25 µl in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 200 µl Arbeitsreagenz, bestehend aus fertig geliefertem BCA-Reagenz A und B im Verhältnis 50:1 gestartet. Die Mikrotiterplatte wurde photometrisch mit einem ELISA-Reader (Spectra II; Tecan) gemessen. Aus diesen Werten wurden die Proteinkonzentrationen anhand einer Standardverdünnungsreihe errechnet.

*Proteinbestimmung nach Bradford für oxidiertes und reduziertes Glutathion*

Der Test nach Bradford (1976) basiert auf einer kolorimetrischen Messung, wobei der Coomassie-Blue-Farbstoff (Serva blue G250) mit den Proteinbindungen eine Reaktion eingeht, die photometrisch erfasst werden kann. [64]

Durchführung:

Die Proteinbestimmung wurde gemäß Protokoll durchgeführt. Je 100 µl vorverdünnte Probe in Homogenatpuffer (150 mM o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) in 500 µM DTPA (=Bis-(2-Aminoethyl)-Amin-N,N,N',N'',N''-Pentaessigsäure-Kalzium-Tri-natriumsalz)) wurden mit 5 ml Bradford-Reagenz gemischt und für 5 Minuten

bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde über Extinktionsmessung der blauen Farbe im Photometer bei 595 nm Wellenlänge nach Abzug des Leerwertes (nur Homogenatpuffer) die Proteinmenge ermittelt. Eine Standardverdünnungsreihe wurde aus BSA hergestellt.

Zusammensetzung des Bradford-Reagenzes:

100 ml	Orthophosphorsäure
50 ml	Ethanol (100%)
100 mg	Serva blue G250
ad 1000 ml	Aqua dest.

### 2.2.2. Bestimmung der Aktivität endogener antioxidativer Enzyme

#### *Aktivitätsbestimmung der Katalase (KAT)*

Die Katalase setzt toxisches Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff um. Die Katalase-Aktivität wurde nach der von Cohen et al. (1970) beschriebenen Methode bestimmt. Der Test beruht auf der Reduktion („Bleichung“) von Kaliumpermanganat durch Wasserstoffperoxid in schwefelsaurem Milieu. Wird dem Reaktionsansatz Probe zugegeben, so vermindert die darin enthaltene Katalase den Gehalt an Wasserstoffperoxid und die Bleichung des Kaliumpermanganats fällt geringer aus. Im Photometer (Ultrospec<sup>®</sup> 3000, Amersham) wird bei 480 nm Wellenlänge die Extinktion von Kaliumpermanganat gemessen und rechnerisch auf die vorhandene Katalase-Aktivität rückgeschlossen. [65]

Für die Bestimmung werden folgende Reaktionsschritte durchgeführt:

Zuerst wurde die maximale Bleichung des Kaliumpermanganats durch 6 mM Wasserstoffperoxid festgestellt [Referenzwert (Rw) - Nullwert (Nw)]. Dann wurde der Reaktion Probe zugegeben und so die durch die Aktivität der Katalase verminderte Bleichung erfasst  $[(\text{Probe} - \text{H}_2\text{O}_2) - (\text{Probe} + \text{H}_2\text{O}_2)]$ .

Aus den Extinktionswerten wird nach folgender Formel die spezifische Aktivität der Katalase in [U/mg Protein] berechnet:

$$\text{spez. Akt.}_{\text{KAT}} = \frac{[(Rw) - (Nw)] - [(Probe - H_2O_2) - (Probe + H_2O_2)] \cdot 6}{3 \cdot [(Rw) - (Nw)]} \cdot \frac{1000}{(\mu\text{l Probe} \cdot \text{Proteinkonzentration})}$$

[(Rw)-(Nw)] entspricht 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; [(Probe - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) - (Probe + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)] stimmt mit dem nach der Reaktion vorhandenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> überein; die Differenz beider Terme entspricht dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verbrauch. Der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verbrauch wird dann ins Verhältnis zur Extinktion der 6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gesetzt und auf µmol/min umgerechnet. 1 U entspricht der Umsetzung von 1 µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 1 Minute.

Durchführung:

Die Reaktion wird wegen der hohen Umsatzrate auf Eis ausgeführt. Als Reaktionsgefäße dienen Reaktions-Röhrchen (Sarstedt® Nr. 55.466). Es wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Dem Testansatz werden 100 µg Protein zugegeben.

Zusammensetzung der Reaktionsansätze:

Nullwert (Nw):

1000 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0))

100 µl Natriumphosphatpuffer

Referenzwert (Rw):

1000 µl Natriumphosphatpuffer

100 µl Natriumphosphatpuffer

Probe + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

1000 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung

100 µl Probe

Probe - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:

1000 µl Natriumphosphatpuffer

100 µl Probe

Nach dreiminütiger Reaktionszeit wird die Reaktion mit 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  (3 M, in Natriumphosphatpuffer) gestoppt. Die Reaktionslösung wird in Küvetten (Sarstedt<sup>®</sup> Nr. 67.741) überführt und im Photometer 30 s nach Zugabe von 1400  $\mu\text{l}$  Kaliumpermanganat-Lösung (2 mM  $\text{KMnO}_4$  in Aqua dest.) gemessen.

#### *Aktivitätsbestimmung der Superoxiddismutase (SOD)*

Die Superoxiddismutase beschleunigt die Dismutation von toxischen Superoxid-anionen zu Wasserstoff.

Die Gesamt-Superoxiddismutase-Aktivität (CuZn-SOD + Mn-SOD) wurde nach der von McCord und Fridovich (1969) beschriebenen Methode bestimmt. Der Test beruht auf der Bildung eines blauen Farbstoffs aus Nitrobluetetrazoliumchlorid (NBT) in Anwesenheit von Superoxidanionen.

Die Superoxidanionen entstammen der Umsetzung einer definierten Menge Hypoxanthin durch die Xanthinoxidase und reduzieren im Anschluss das NBT zum blauen Formazankomplex. Gibt man nun Probe mit Superoxiddismutase-Aktivität hinzu wird der Superoxidanionengehalt vermindert und die Blaufärbung durch Formazan fällt geringer aus. Im Photometer (Ultrospec<sup>®</sup> 3000, Amersham) wird bei 595 nm Wellenlänge die Kinetik erfasst, und über das Verhältnis der Steigungen der Probe ( $a_{\text{Probe}}$ ) und des Kontrollwertes ( $a_{\text{Kontrolle}}$ ) auf die Aktivität der Superoxiddismutase geschlossen. [66]

Zur Bestimmung werden folgende Reaktionsschritte durchgeführt:

Erst wird über die Kontrolle, die keine Probe enthält, die Steigung  $a_{\text{Kontrolle}}$  entsprechend der maximalen Reaktion der Superoxidanionen mit NBT ermittelt. Im nächsten Schritt wird dann einem neuen Ansatz zusätzlich Probe zugegeben und die, um die Aktivität der Superoxiddismutase verminderte, Steigung  $a_{\text{Probe}}$  erfasst. Über das Verhältnis Probe zu Kontrolle ( $a_{\text{Probe}}/a_{\text{Kontrolle}}$ ) ergibt sich ein Prozentwert, der im Bereich von 60% - 80% liegen soll, da hier dann mit einem annähernd linearen Verhältnis der Formazan-Farbkomplexbildung zur Superoxiddismutase-Aktivität gerechnet werden darf (Abb. 9).

Daher bedarf es vorher einer entsprechenden Vorverdünnung der Probe. Über den Prozentwert wird mit folgender Formel die spezifische Aktivität errechnet:

$$\text{spez. Akt.}_{\text{SOD}} = \frac{\ln\left(\frac{a_{\text{Probe}}}{a_{\text{Kontrolle}}}\right)}{-0,693} \cdot \frac{1000}{(\mu\text{lProbe} \cdot \text{Proteinkonzentration})}$$

Hierbei entspricht 1 U SOD-Aktivität einer 50%igen Inhibierung der Formazan-komplexbildung durch Superoxidanionen. [67]

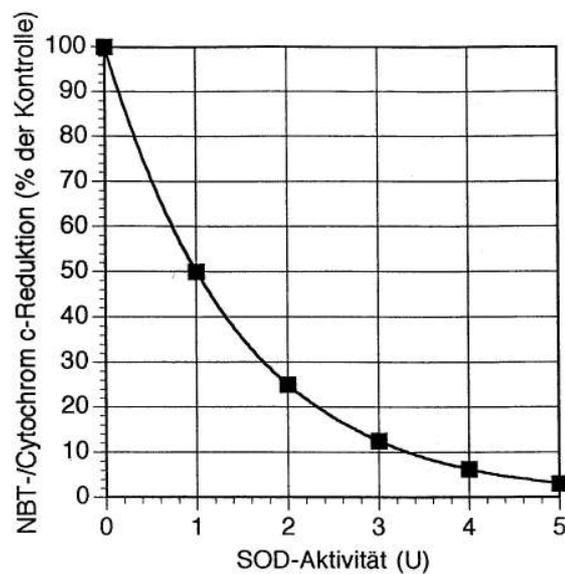


Abb. 9: Graphische Darstellung der logarithmischen Abhängigkeit der NBT-/Cytochrome c-Reduktion (% der Kontrolle) in Abhängigkeit von der SOD-Aktivität (U)  
Formel:  $f(x)=100 \cdot e^{(-0,693x)}$

Durchführung:

Die Reaktion wird bei Raumtemperatur in Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Vorlage aller Reaktionspartner wird die Reaktion durch Zugabe der Xanthinoxidase gestartet. Ein Referenzwert wird für den Nullabgleich benötigt.

Zusammensetzung der Reaktionsansätze:

Referenzwert:

980 $\mu\text{l}$	Natriumphosphatpuffer (50 mM, pH 8,6)
10 $\mu\text{l}$	Hypoxanthin (5 mM Hypoxanthin in Natriumphosphatpuffer)
10 $\mu\text{l}$	NBT (5 mM NBT in Natriumphosphatpuffer)

Kontrollwert:

970 µl	Phosphatpuffer
10 µl	Hypoxanthin
10 µl	NBT
10 µl	Xanthinoxidase (15 mU/ml Assay)

Probenwert:

960 µl	Phosphatpuffer
10 µl	Hypoxanthin
10 µl	NBT
10 µl	Probe
10 µl	Xanthinoxidase (15 mU/ml Assay)

Es erfolgt eine Kinetikmessung im Photometer (Ultrospec 3000; Amersham): Über einen Zeitraum von 300 s wurde alle 20 s eine Messung vorgenommen und aus den Messpunkten zwischen 100 s und 180 s die Steigung berechnet.

### 2.2.3. Bestimmung der Aktivität von Enzymen des Glutathionsystems

#### *Aktivitätsbestimmung der Glutathion-Peroxidase (GSH-Px)*

Die Glutathion-Peroxidase setzt toxisches Wasserstoffperoxid oder organische Hydroperoxide um. Dabei wird reduziertes Glutathion (GSH) als Reaktionspartner verbraucht und in die oxidierte Form (GSSG) überführt.

Die Aktivität der Glutathion-Peroxidase wurde nach dem Test von Paglia und Valentine (1967) bestimmt: Vorgelegtes Wasserstoffperoxid wird durch die Glutathion-Peroxidase katalysiert. Dabei entsteht Glutathiondisulfid aus reduziertem Glutathion. Eine in definierter Menge zugesetzte Glutathion-Reduktase regeneriert reduziertes Glutathion wobei NADPH oxidiert wird. Die Konzentrationsabnahme von NADPH wurde bei 340 nm Wellenlänge photometrisch gemessen und daraus die Aktivität der Glutathion-Peroxidase errechnet. [68]

Durchführung:

Im Cobas Fara Zentrifugalanalyzer werden 270 µl Arbeitsreagenz bei 25 °C 180 s lang inkubiert, ehe die Reaktion mit 20 µl Startreagenz gestartet wird. Nach 30 Messungen im 5 s Intervall wird automatisch anhand einer standardisierten Programmierung die Aktivität [U] errechnet.

Zusammensetzung der Reaktionslösungen:

Arbeitsreagenz:

1 ml            GSSG-R-Lösung (10 U/ml, in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 7))

+

26 ml          GSH-Lösung (5,8 mM GSH, in Kaliumphosphatpuffer (50 mM) mit EDTA (5 mM) und NaN<sub>3</sub>(3,75 mM); pH 7,0)

Startreagenz:

4 ml            H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (2,2 mM in Aqua dest.)

+

4 ml            NADPH-Lösung (8,4 mM NADPH in 0,1% NaHCO<sub>3</sub>)

#### *Aktivitätsbestimmung der Glutathion-S-Transferase (GST)*

Die Glutathion-S-Transferase katalysiert die Reaktionen zwischen elektrophilen hydrophoben Substanzen und reduziertem Glutathion.

Im Versuch nach Warholm et al. (1985) wurde reduziertes Glutathion (GSH) mit 1-Chlor-2,4-Dinitrobenzene (CDNB) konjugiert. In Abhängigkeit von der Glutathion-S-Transferase-Aktivität der Probe werden umso mehr Glutathion-CDNB-Konjugate gebildet, je höher die Aktivität ist. Der Farbkomplex wird dann direkt photometrisch bei 340 nm Wellenlänge quantitativ nachgewiesen. [37]

Durchführung:

Im Cobas Fara Zentrifugalanalyzer werden 275 µl Arbeitsreagenz mit 5 µl Probe bei 25 °C 60 s lang inkubiert. Mit Zugabe von 20 µl Startreagenz wird die Reaktion gestartet. Nach 10 Messungen im 20 s Intervall wird über eine standardisierte Programmierung die Aktivität [U] errechnet.

Zusammensetzung der Reaktionslösungen:

Arbeitsreagenz:

0,5 ml CDNB-Lösung (45 mM CDNB in Ethanol (95%))

+

27 ml Kaliumphosphatpuffer (0,1 M, pH 6,25)

Startreagenz:

GSH-Lösung (15 mM GSH in Aqua dest.)

#### *Aktivitätsbestimmung der Glutathion-Reduktase (GSSG-R)*

Die Glutathion-Reduktase reduziert oxidiertes Glutathion (GSSG) unter NADPH/H<sup>+</sup>-Verbrauch.

Zur Aktivitätsbestimmung wurde der Test nach Carlberg und Mannervik (1985) verwendet: Der Probe wurde eine definierte Menge oxidiertes Glutathion und NADPH/H<sup>+</sup> zugegeben, und die Oxidation von NADPH/H<sup>+</sup> photometrisch bei 340 nm erfasst. Dabei führt eine höhere Glutathion-Reduktase-Aktivität zu einer vermehrten Abnahme des NADPH/H<sup>+</sup>. [36]

Durchführung:

Die Reaktion wird im Cobas Fara Zentrifugalanalyzer bei 30 °C durch die Zugabe von 10 µl Probe zu 290 µl Arbeitsreagenz gestartet. Nach 10 Messungen im 30 s Intervall wird anhand einer standardisierten Programmierung die Aktivität [U] errechnet.

Zusammensetzung des Arbeitsreagenzes:

25 ml EDTA-Kaliumphosphatpuffer (12 mM EDTA in 0,12 M  
Kaliumphosphatpuffer; pH 7,0)

+

2 ml NADPH-Lösung (1,5 mM NADPH in 0,01 M TRIS-HCl; pH 7,0)

+

2 ml GSSG-Lösung (15 mM GSSG in Aqua dest.)

#### 2.2.4. Bestimmung der Konzentrationen von nichtenzymatischen Parametern des Glutathionsystems

##### *Konzentrationsbestimmung von reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion*

Der Gehalt an reduziertem und oxidiertem Glutathion wurde über eine HPLC-Methode bestimmt.

Nach dem Test von Krien et al. (1992) wurde das in Homogenatpuffer (o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> und DTPA) suspendierte Rattenherzgewebe mit Argon oder Helium (20 s) und Ultraschall (60 s; 20 kHz) auf Eis behandelt. Nach Resuspension in Homogenatpuffer (150 mM o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (85%) in 500µM DTPA) und Zentrifugieren bei 44600 g für 20 Minuten wurde der Überstand ultrafiltriert (Ultrafree MC-cartridges, Ausschlussporengröße 5 kD) und anschließend noch einmal bei 10000 g für 90 min zentrifugiert.

Nach Auftrennung über eine Vor- (Bischoff® Guardcartridge K1) und Hauptsäule (Bischoff® NC-04-300) wird reduziertem Glutathion bei 600 mV Spannung und oxidiertes Glutathion bei 900 mV Spannung detektiert (Coulochem Modell 5011). Als Laufmittel diente Natriumdihydrogenphosphatpuffer (2,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 3,0; Flow 1,0 ml/min). 20 µl Probe werden eingesetzt und anhand des Vergleichs mit Standard-GSH- und GSSG-Lösungen die Konzentration in [nmol/mg Protein] bestimmt. [69]

Gesamtglutathion (auch Glutathionäquivalent; Glu-Äq) wird wie folgt berechnet:

$$\text{Glu-Äq} = \text{GSH} + 2 \text{GSSG}$$

Die Redoxratio ist das Verhältnis von reduziertem Glutathion zu Gesamtglutathion und errechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Glu - Ratio} = \frac{\text{GSH}}{\text{GSH} + 2\text{GSSG}}$$

### 2.3. Konzentrationsbestimmung von Lipidhydroperoxiden

Der Test Bioxytech® LPO-560™ (Oxis, Portland, OR; USA) beruht auf einem gekoppelten photometrischen Test. Im ersten Schritt werden durch Lipidhydroperoxide (LOOH) Eisen-II-Ionen im sauren Milieu zu Eisen-III-Ionen oxidiert. Diese wiederum gehen dann mit dem Farbstoff Xylenol-Orange (XO) eine stabile Komplexbindung ein, welche im Photometer bei 560 nm Wellenlänge gemessen wird.

Um Störungen der Reaktion durch in der Probe vorhandenes Wasserstoffperoxid zu vermeiden, wird jede Probe initial mit Katalase versetzt.

Ein Kontrollwert zur Bestimmung der nicht-lipidhydroperoxid-abhängigen Hintergrundaktivität wird nun über Zugabe des Reduktionsmittels Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP), welches die Lipidhydroperoxide zu den korrespondierenden Alkoholen reduziert, in einer separaten Probe erfasst. Im Testwert wird dann TCEP durch destilliertes Wasser (Aqua dest.) ersetzt.

Die Konzentration an Lipidhydroperoxiden wird wie folgt errechnet und auf mg Protein bezogen [nmol/mg Protein]:

$$[\text{LOOH}] = \frac{\text{Ext}_{560}}{\epsilon} \cdot d$$

$\text{Ext}_{560}$  = Extinktion des Testwertes (Probe+KAT+Aqua dest.) abzüglich der Extinktion des Kontrollwert (Probe+KAT+TCEP) bei 560 nm Wellenlänge

$\epsilon$  =  $4,31 \cdot 10^{-5} \text{ nmol}^{-1}$  (Extinktionskoeffizient · Schichtdicke der Küvette (1 cm))

$d$  = 11,2 (Verdünnungsfaktor)

Durchführung:

Das Rattenherzgewebe wird in 20 mM TrisHCl-Puffer (pH 7,6) mit einem Glas-Glas-Mörser homogenisiert. Der Überstand wird nach Zentrifugation (12000 g, 5 min) abgenommen und damit einerseits die Proteinbestimmung nach Pierce

(siehe 2.2.1; jedoch mit TrisHCl-Puffer als Lösungsmittel) und der LOOH-Test gemäß Anleitung ohne Modifikationen durchgeführt.

## 2.4. Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben und als Boxplots mit Median (—), Mittelwert (■), 5%-, 25%-, 75%- und 95%-Perzentilen graphisch dargestellt (Microcal Origin 4.1).

Für die statistische Analyse wurde der für nichtparametrische Stichproben geltende Mann-Whitney-U-Test verwendet (SPSS for windows 9.0). Signifikanz tritt bei  $p < 0,05$  ein.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Auswertung der Operationsprotokolle des Tierversuchs

In diesen Versuch wurden die Daten aus insgesamt 90 Operationen einbezogen. Davon wurde in 36 Fällen eine heterotope Transplantation mit 36 Explantations- und 36 Implantationsoperationen nach vorgeschriebener Ischämiezeit vorgenommen. In 18 Fällen wurde das Herz lediglich dem Spender entommen, um ohne Transplantation einer definierten Ischämiephase ausgesetzt zu werden. Die verwendeten Spendertiere waren  $13,1 \pm 0,1$  Tage alt bei einem Gewicht von  $210 \pm 0,6$  g, die Empfängertiere waren  $14,8 \pm 0,1$  Tage alt und wogen  $195 \pm 0,8$  g. In die Auswertung des Versuchs wurden nur komplikationslose Transplantationen einbezogen. Transplantationen, die aus operations-technischen Gründen diesem Anspruch nicht genügten, wurden wiederholt, um für gleiche Ausgangsbedingungen zu sorgen.

Unmittelbar nach Beginn der Reperfusionphase begannen die transplantierten Herzen wieder global gut zu schlagen. Das Myokard war makroskopisch von rosiger Farbe und frei von infarzierten Arealen bei sinusrhythmischer Kontraktion. Während der Reperfusionphase traten keine Komplikationen auf. Die gesamte Explantationsoperation der Spenderherzen (LEW) wurde in durchschnittlich  $35,0 \pm 1,3$  min durchgeführt. Die Ischämiezeit vom Stillstand bis zur Entnahme des Herzens betrug dabei  $24,3 \pm 0,9$  min.

Die gesamte Implantationsoperation am Empfängertier (F344) wurde in  $45,6 \pm 2,0$  min durchgeführt. Nach Vorbereitung des Empfängers wurde die Aorta dabei für eine Zeitspanne von  $26,2 \pm 1,1$  min abgeklemmt.

## 3.2. Auswirkung von kalter Ischämie auf die myokardialen antioxidativen Schutzsysteme und Lipidhydroperoxidbildung

### 3.2.1. Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Katalase

Mit zunehmender Dauer der Ischämie stieg die Aktivität der Katalase (KAT) im Rattenherzhomogenat stetig an. Dabei war der Anstieg zwischen 30 min ( $1,6 \pm 0,2$  U/mg Protein) und 240 min ( $2,0 \pm 0,4$  U/mg Protein) Ischämie tendenziell und zwischen 30 min und 480 min Ischämie ( $3,2 \pm 0,5$  U/mg Protein;  $p = 0,025$ ) signifikant. (Abb.10)

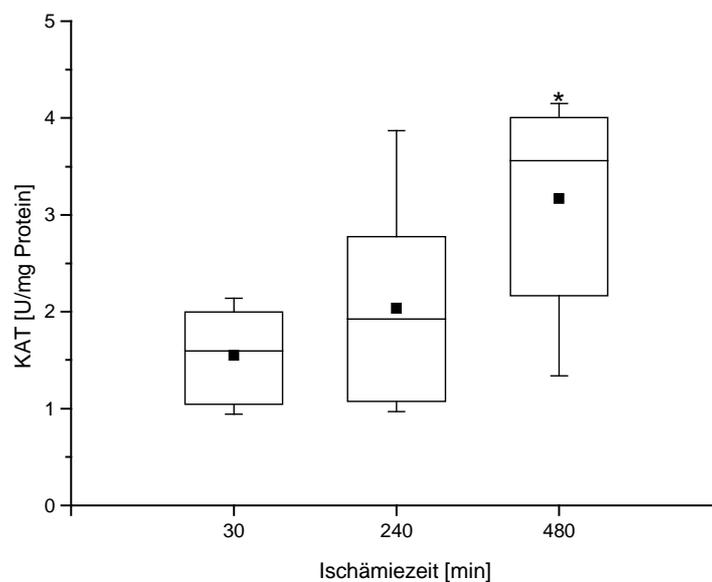


Abb. 10: Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Katalase (KAT) im Rattenherzhomogenat. n = 6  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min kalter Ischämie

### 3.2.2. Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Superoxiddismutase

Die Superoxiddismutase (SOD) zeigte mit zunehmenden Ischämiezeiten einen Aktivitätsanstieg. Zwischen 30 min ( $31,7 \pm 3,6$  U/mg Protein) und 240 min

Ischämie ( $39,5 \pm 0,7$  U/mg Protein) lag ein tendenzieller Anstieg der Aktivität und zwischen 30 min und 480 min Ischämie ( $43,2 \pm 1,6$  U/mg Protein;  $p = 0,039$ ) eine signifikante Aktivitätserhöhung vor. (Abb.11)

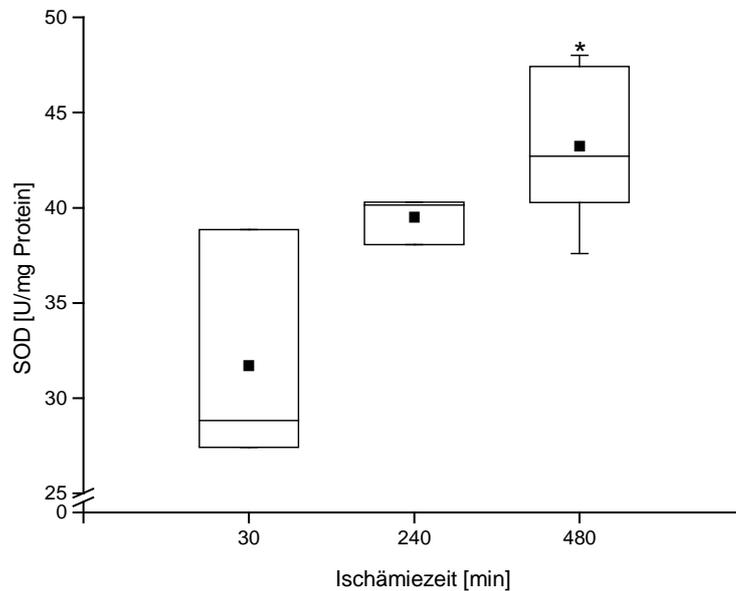


Abb. 11: Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) im Rattenherzhomogenat.  $n = 3$  (30, 240 min I),  $n = 6$  (480 min I)  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min kalter Ischämie

### 3.2.3. Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathionperoxidase

Die Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) zeigte mit steigenden Ischämiezeiten erhöhte Aktivitäten. Zwischen 30 min Ischämie ( $0,27 \pm 0,03$  U/mg Protein) und 240 min Ischämie ( $0,4 \pm 0,10$  U/mg Protein) zeigte sich eine tendenzielle Aktivitätserhöhung, wogegen nach 480 min Ischämie ( $0,36 \pm 0,01$  U/mg Protein;  $p = 0,010$ ) eine signifikant erhöhte Aktivität vorlag. (Abb. 12)

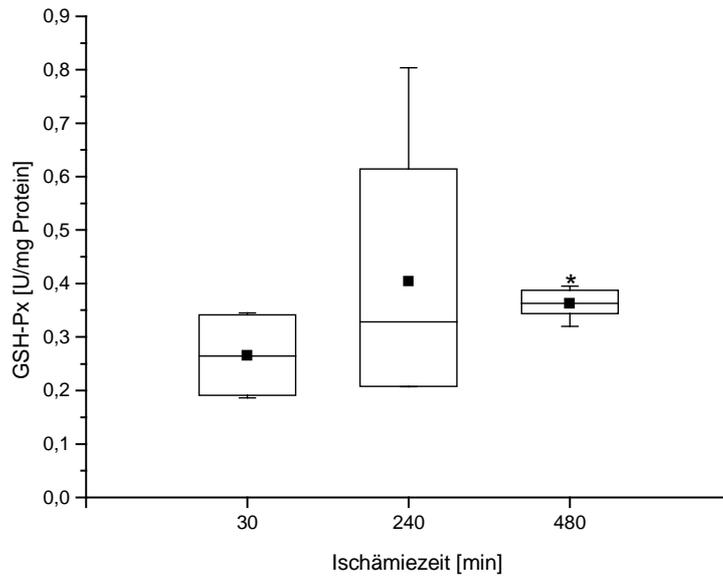


Abb. 12: Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathionperoxidase (GSH-Px) im Rattenherzhomogenat. n = 6

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min kalter Ischämie

#### 3.2.4. Einfluss von kalter Ischämie auf die Konzentration von Glutathion

Die Konzentration von reduziertem Glutathion (GSH) war nach 240 min ( $9,2 \pm 1,2$  nmol/mg Protein) und 480 min Ischämie ( $10,8 \pm 1,3$  nmol/mg Protein) tendenziell zu 30 min Ischämie ( $9,0 \pm 1,6$  nmol/mg Protein) erhöht. (Abb. 13)

Im Gegensatz dazu stieg die Konzentration von oxidiertem Glutathion (GSSG) zwischen 30 min ( $0,42 \pm 0,25$  nmol/mg Protein) und 240 min Ischämie ( $0,71 \pm 0,25$  nmol/mg Protein) tendenziell an und war nach 480 min Ischämie ( $1,29 \pm 0,22$  nmol/mg Protein;  $p = 0,045$ ) signifikant um ca. das 3fache erhöht. (Abb. 14)

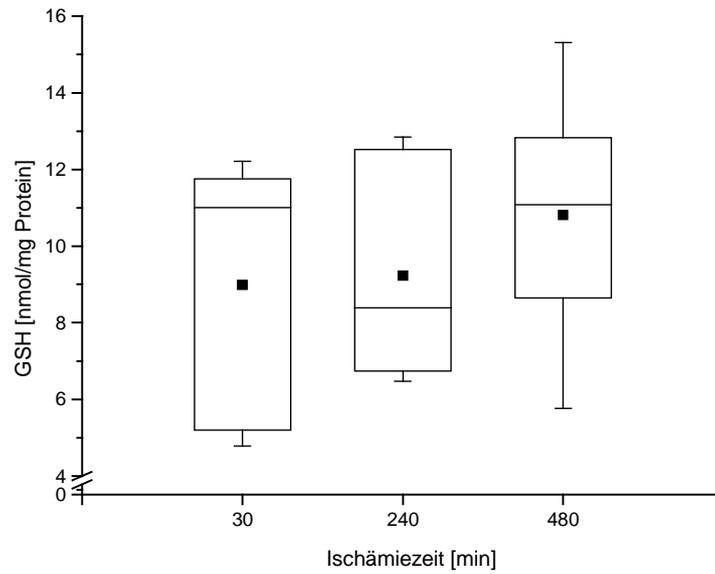


Abb. 13: Einfluss von kalter Ischämie auf die Konzentration von reduziertem Glutathion (GSH) im Rattenherzhomogenat. n = 5 (30min I), n = 6 (240, 480 min I)

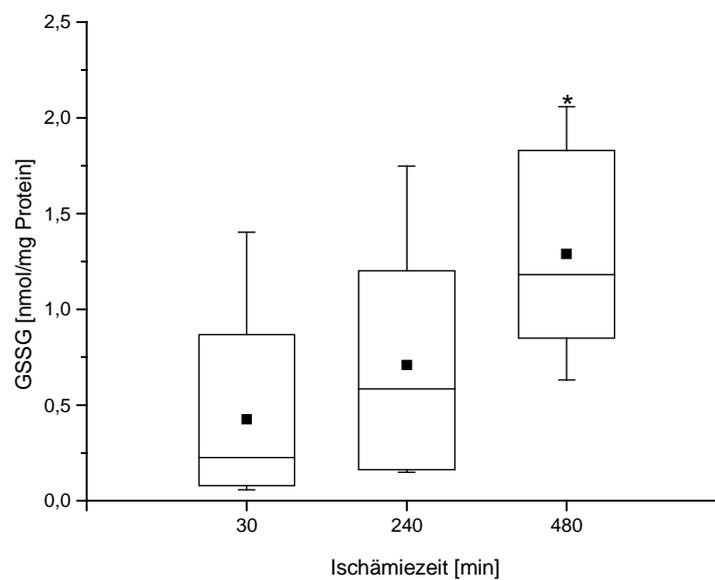


Abb. 14: Einfluss von kalter Ischämie auf die Konzentration von oxidiertem Glutathion (GSSG) im Rattenherzhomogenat. n = 5 (30 min I), n = 6 (240, 480 min I)  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min kalter Ischämie

Die aus den Konzentrationen von reduziertem und oxidiertem Glutathion errechnete Konzentration des Gesamtglutathions (Glutathionäquivalent (Glu-

Äq); entsprechend der stöchiometrischen Formel:  $\text{Glu-Äq} = \text{GSH} + 2 \text{ GSSG}$ ) ergab mit zunehmenden Ischämiezeiten keinen signifikanten Konzentrationsanstieg. (Tab. 3)

Tab. 3: Einfluss von kalter Ischämie auf die Konzentrationen des Gesamtglutathions (Glu-Äq).

Ischämie (min)	30	240	480
Glu-Äq (nmol/mg Protein)	$9,8 \pm 1,7$	$10,6 \pm 1,7$	$13,4 \pm 1,6$

n = 5 (30 min I), n = 6 (240, 480 min I)

Das errechnete Verhältnis des reduzierten Glutathions zum Gesamtglutathion (= Redoxratio =  $\text{GSH} / (\text{GSH} + 2 \text{ GSSG})$ ) sank mit zunehmender Ischämiezeit zwischen 30 min ( $91,6 \pm 3,5 \%$ ) und 240 min Ischämie ( $88,7 \pm 2,7 \%$ ) tendenziell und zwischen 30 min und 480 min Ischämie ( $80,8 \pm 1,8 \%$ ;  $p = 0,44$ ) signifikant ab. (Abb. 15)

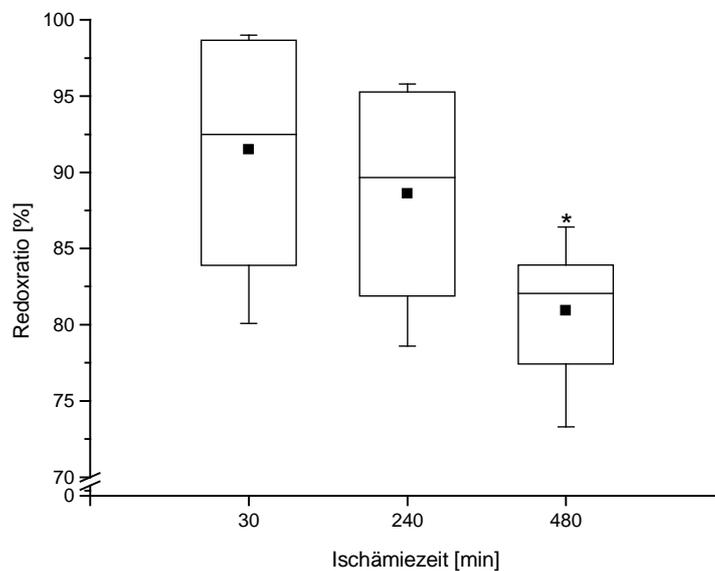


Abb. 15: Einfluss von kalter Ischämie auf die Redoxratio ( $\text{GSH}/(\text{GSH}+2\text{GSSG})$ ) im Rattenherzhomogenat. n = 5 (30 min I), n = 6 (240, 480 min I)  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min kalter Ischämie

### 3.2.5. Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathion-Reduktase

Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GSSG-R) stieg mit zunehmenden kalten Ischämiezeiten zwischen 30 min Ischämie ( $8,1 \pm 0,8$  U/mg Protein) und 240 min Ischämie ( $9,7 \pm 1,0$  mU/mg Protein) tendenziell und zwischen 30 min und 480 min Reperfusion ( $10,5 \pm 0,4$  U/mg Protein;  $p = 0,010$ ) signifikant an. (Abb. 16)

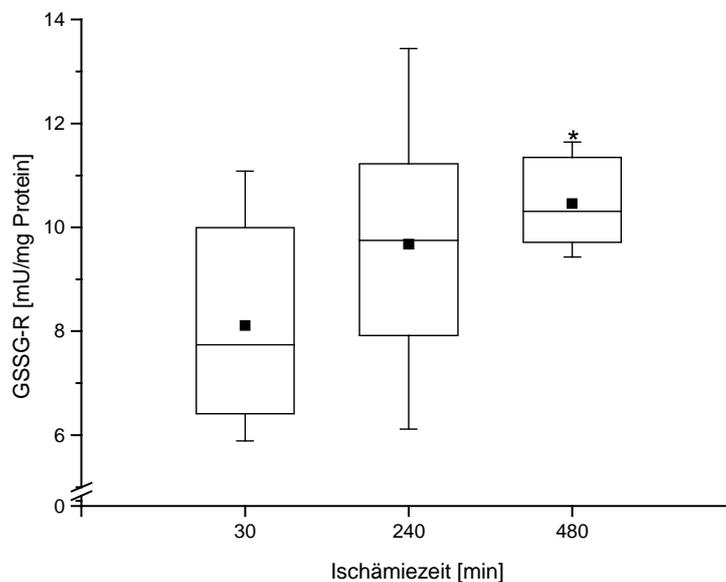


Abb. 16: Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathionreduktase (GSSG-R) im Rattenherzhomogenat.  $n = 6$   
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min kalter Ischämie

### 3.2.6. Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathion-S-Transferase

Kalte Ischämie zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivitäten der Glutathion-S-Transferase (GST). (Tab.4)

Tab. 4: Einfluss von kalter Ischämie auf die Aktivitäten der Glutathion-S-Transferase (GST).

Ischämie (min)	30	240	480
GST (mU/mg Protein)	21,7 ± 0,9	25,3 ± 2,8	23,7 ± 1,2

n = 6

### 3.2.7. Einfluss von kalter Ischämie auf die Konzentration von Lipidhydroperoxiden

Die Konzentration der Lipidhydroperoxide (LOOH) wurde durch verschiedene kalte Ischämiezeiten nicht signifikant verändert. (Tab. 5)

Tab. 5: Einfluss von kalter Ischämie auf die Konzentration von Lipidhydroperoxiden(LOOH).

Ischämie (min)	30	240	480
LOOH (nmol/mg Protein)	2,60 ± 0,94	1,28 ± 0,33	1,90 ± 0,68

n = 6

## 3.3. Auswirkung von Transplantation und Reperfusion auf die myokardialen antioxidativen Schutzsysteme und Lipidhydroperoxidbildung

### 3.3.1. Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Katalase

Sowohl nach vorausgegangener 30minütiger als auch nach 240minütiger Ischämiephase zeigte die Aktivität der Katalase (KAT) mit Einsetzen der Reperfusion einen Anstieg.

Ischämie über 30 Minuten ( $1,6 \pm 0,2$  U/mg Protein) zeigte nach Reperfusion von 30 min ( $4,0 \pm 0,5$  U/mg Protein;  $p = 0,005$ ) und 240 min ( $5,3 \pm 0,9$  U/mg Protein;  $p = 0,004$ ) signifikante Aktivitätserhöhungen.

Nach 240 min Ischämie ( $2,0 \pm 0,4$  U/mg Protein) bewirkte die 30minütige Reperfusion ( $2,3 \pm 0,5$  U/mg Protein) eine tendenzielle und die 240minütige Reperfusion ( $3,8 \pm 0,3$  U/mg Protein;  $p = 0,016$ ) eine signifikante Aktivitätssteigerung.

Ischämie über 480 min ( $3,2 \pm 0,5$  U/mg Protein) führte nach 30 min Reperfusion ( $1,1 \pm 0,3$  U/mg Protein;  $p = 0,02$ ) zu einem signifikanten Aktivitätsverlust. Nach 240 min Reperfusion ( $2,9 \pm 0,2$  U/mg Protein) lag die Katalase tendenziell in niedrigerer Aktivität vor.

Verlängerte Reperfusion von 30 min auf 240 min führte in allen Ischämiegruppen zu einem Aktivitätsanstieg. Signifikante Veränderungen lagen hier nach 240 min ( $p = 0,01$ ) und 480 min ( $p = 0,004$ ) Ischämie vor. (Abb. 17)

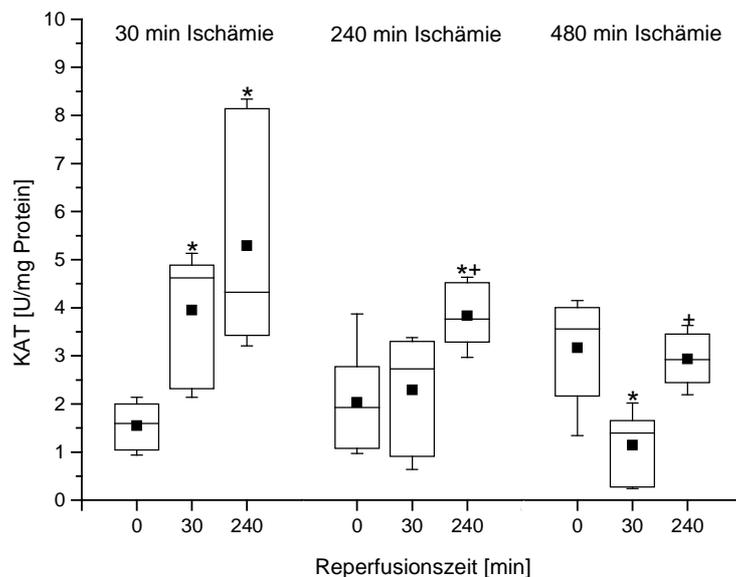


Abb. 17: Einfluss von Reperfusion nach kalter Ischämie auf die Aktivität der Katalase (KAT) im Rattenherzhomogenat.  $n = 6$

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 0 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe

+ signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe

### 3.3.2. Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Superoxiddismutase

Nach 30 min Ischämie ( $31,7 \pm 3,6$  U/mg Protein) und 30 min Reperfusion ( $22,5 \pm 2,0$  U/mg Protein) war die Superoxiddismutase-Aktivität tendenziell erniedrigt. 240 min Reperfusion ( $38,4 \pm 0,8$  U/mg Protein) erbrachte eine tendenzielle Aktivitätssteigerung.

In der 240 min Ischämiegruppe ( $39,5 \pm 0,7$  U/mg Protein) stieg die Aktivität nach 30 min Reperfusion ( $44,7 \pm 1,7$  U/mg Protein) tendenziell an. Nach 240 min Reperfusion ( $25,8 \pm 1,3$  U/mg Protein) war die Aktivität tendenziell erniedrigt.

480 min Ischämie ( $43,2 \pm 1,6$  U/mg Protein) zeigte sich mit 30minütiger Reperfusion ( $46,6 \pm 1,5$  U/mg Protein) eine tendenzielle Aktivitätserhöhung und mit 240minütiger Reperfusion ( $33,8 \pm 1,2$  U/mg Protein;  $p = 0,006$ ) ein signifikanter Aktivitätsabfall, der auch zu 30 min Reperfusion signifikant ( $p = 0,006$ ) war. (Abb. 18)

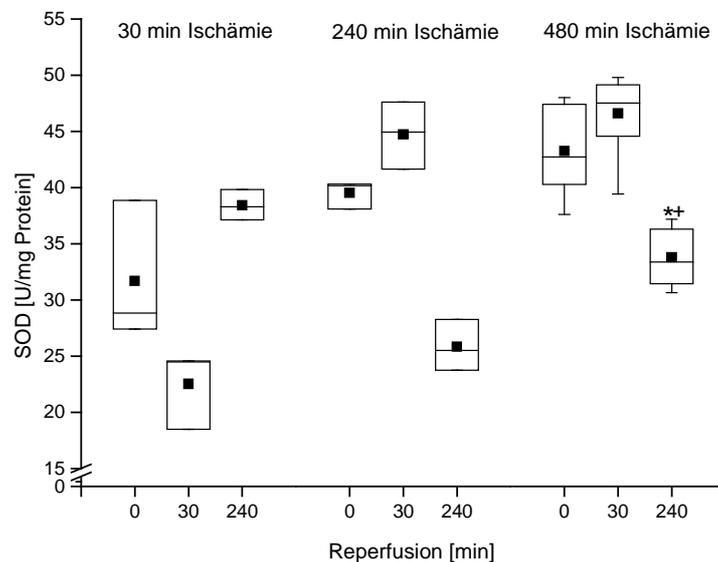


Abb. 18: Einfluss von Reperfusion nach kalter Ischämie auf die Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) im Rattenherzhomogenat.  $n = 3$  (30, 240 min I),  $n = 6$  (480 min I)  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 0 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe  
 † signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe

### 3.3.3. Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Glutathion-Peroxidase

Mit Beginn der Reperfusion war in allen Ischämiegruppen ein tendenzieller Anstieg der Aktivität der Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) erkennbar.

Nach 30minütiger Ischämie ( $0,27 \pm 0,3$  U/mg Protein) wurden nach 30 min ( $0,34 \pm 0,56$  U/mg Protein) und 240 min Reperfusion ( $0,37 \pm 0,32$  U/mg Protein) tendenziell höhere Aktivitäten gemessen.

Nach 240 min Ischämie ( $0,40 \pm 0,98$  U/mg Protein) und anschließender Reperfusion für 30 min ( $0,44 \pm 0,19$  U/mg Protein) und 240 min ( $0,44 \pm 0,54$  U/mg Protein) zeigte sich eine tendenziell höhere Aktivität der Glutathion-Peroxidase-Aktivität.

480 minütige Ischämie ( $0,36 \pm 0,11$  U/mg Protein) zeigte nach 30 min Reperfusion ( $0,46 \pm 0,24$  U/mg Protein;  $p = 0,016$ ) einen signifikanten Aktivitätsanstieg. Nach 240 min Reperfusion ( $0,29 \pm 0,34$  U/mg Protein) war ein tendenzieller Aktivitätsverlust messbar. Der Aktivitätsunterschied zwischen 30 min und 240 min Reperfusion war signifikant ( $p = 0,010$ ). (Abb. 19)

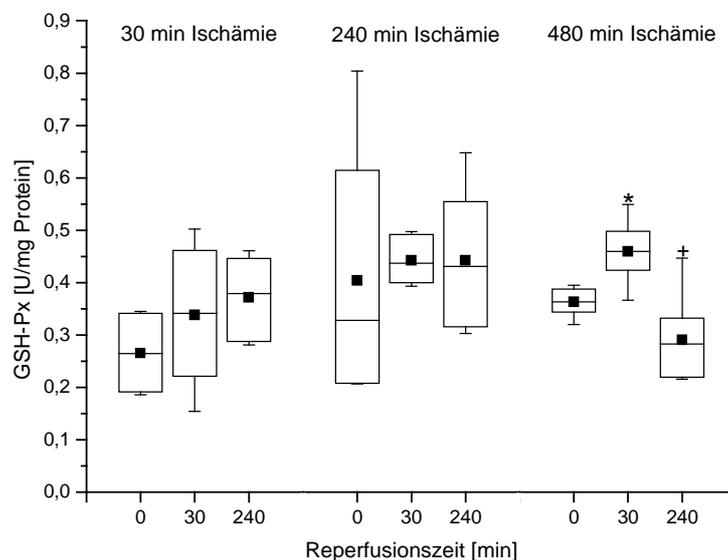


Abb. 19: Einfluss von Reperfusion nach kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) im Rattenherzhomogenat.  $n = 6$

\* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 0 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe,

+ signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe

### 3.3.4. Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Konzentration von Glutathion

Reperfusion nach Ischämie führte in allen Gruppen zu einer starken Abnahme der Konzentration an reduziertem Glutathion (GSH) im Rattenherzhomogenat.

In der 30 min Ischämie-Gruppe ( $9,0 \pm 1,2$  nmol/mg Protein) verringerten sich die GSH-Konzentrationen nach 30 min Reperfusion ( $5,5 \pm 0,4$  nmol/mg Protein) tendenziell und nach 240 min Reperfusion ( $5,0 \pm 0,4$  nmol/mg Protein;  $p = 0,045$ ) signifikant.

Nach 240 min Ischämie ( $9,2 \pm 1,2$  nmol/mg Protein) wurden unabhängig von der Dauer der Reperfusion signifikante Konzentrationsverluste sowohl durch 30minütige ( $4,0 \pm 0,3$  nmol/mg Protein;  $p = 0,004$ ) als auch durch 240minütige Reperfusion ( $4,2 \pm 0,2$  nmol/mg Protein;  $p = 0,004$ ) gemessen.

Ebenso war nach 480minütiger Ischämie ( $10,8 \pm 1,3$  nmol/mg Protein) die Konzentrationen von GSH nach 30 min ( $5,0 \pm 0,3$  nmol/mg Protein;  $p = 0,006$ ) und 240 min Reperfusion ( $6,1 \pm 0,7$  nmol/mg Protein;  $p = 0,006$ ) signifikant um ca. 50% erniedrigt. (Abb. 20)

Die Konzentration von oxidiertem Glutathion (GSSG) war ebenso nach Reperfusion in allen Gruppen vermindert.

So zeigte 30minütige Ischämie ( $0,42 \pm 0,25$  nmol/mg Protein) mit 30minütiger ( $0,27 \pm 0,02$  nmol/mg Protein) bzw. 240minütiger Reperfusion ( $0,20 \pm 0,02$  nmol/mg Protein) tendenzielle GSSG-Verluste. Signifikant unterschiedlich war dabei der Unterschied der Glutathiondisulfid-Konzentrationen zwischen 30 und 240 min Reperfusion ( $p = 0,026$ ).

Nach 240 min Ischämie ( $0,71 \pm 0,25$  nmol/mg Protein) zeigte sich ein tendenzieller Konzentrationsverlust nach 30 min ( $0,17 \pm 0,01$  nmol/mg Protein) und 240 min Reperfusion ( $0,18 \pm 0,02$  nmol/mg Protein).

Die Reperfusion von Herzen nach 480minütiger Ischämie ( $1,29 \pm 0,22$  nmol/mg Protein) wies signifikante Verluste der Konzentration von GSSG nach 30 min ( $0,26 \pm 0,04$  nmol/mg Protein;  $p = 0,004$ ) bzw. nach 240 min Reperfusion ( $0,46 \pm 0,11$  nmol/mg Protein;  $p = 0,010$ ) auf. Der größte Konzentrationsverlust von ca. 80% war in der 480 min Ischämiegruppe nach 30 min Reperfusion messbar. (Abb. 21)

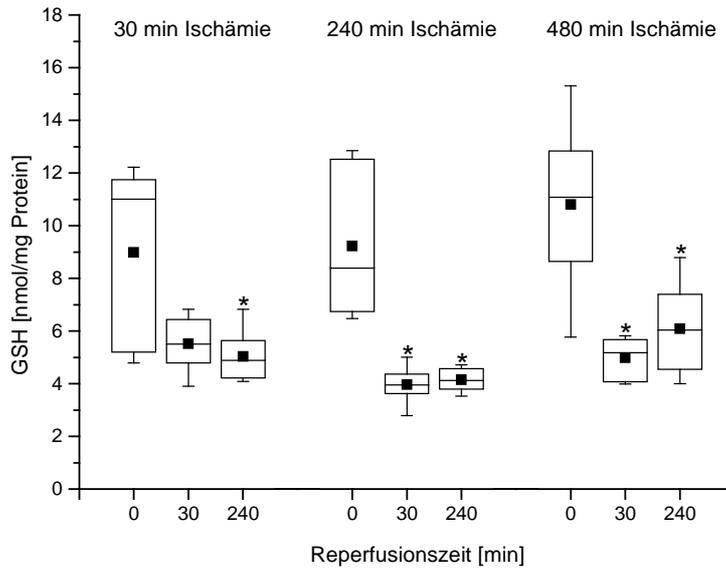


Abb. 20: Einfluss von Reperfusion nach kalter Ischämie auf die Konzentration von reduziertem Glutathion (GSH) im Rattenherzhomogenat.  
 n = 5 (30 min I ohne R), n = 6 (alle anderen Gruppen)  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 0 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe

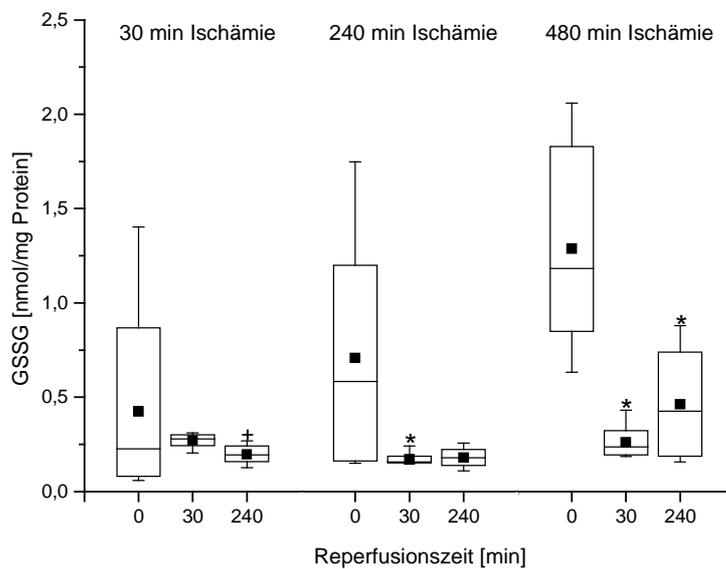


Abb. 21: Einfluss von Reperfusion nach kalter Ischämie auf die Konzentration von oxidiertem Glutathion (GSSG) im Rattenherzhomogenat.  
 n = 5 (30 min I ohne R), n = 6 (alle anderen Gruppen)  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 0 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe,  
 + signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe

Das errechnete Gesamtglutathion ( $\text{Glu-}\ddot{\text{A}}\text{q} = \text{GSH} + 2 \text{ GSSG}$ ) zeigte mit einsetzender Reperfusion in allen Gruppen ebenfalls sinkende Konzentration.

Nach 30 min Ischämie ( $9,8 \pm 1,7 \text{ nmol/mg Protein}$ ) zeigte Reperfusion über 30 min ( $6,1 \pm 0,4 \text{ nmol/mg Protein}$ ) einen tendenziellen Verlust von Glutathion. Nach 240 min Reperfusion ( $5,4 \pm 0,3 \text{ nmol/mg Protein}$ ;  $p = 0,026$ ) wurde ein signifikanter Konzentrationsverlust gemessen.

Ischämie von 240 min ( $10,6 \pm 1,7 \text{ nmol/mg Protein}$ ) mit anschließender Reperfusion von 30 min ( $4,3 \pm 0,3 \text{ nmol/mg Protein}$ ;  $p = 0,004$ ) sowie 240 min ( $4,5 \pm 0,2 \text{ nmol/mg Protein}$ ;  $p = 0,004$ ) zeigte einen signifikant erniedrigten Glutathion-Gehalt im Rattenherzhomogenat.

Ebenso waren die Verluste des Gesamt-Glutathion nach 480minütiger Ischämie ( $13,4 \pm 1,7 \text{ nmol/mg Protein}$ ) und 30 min ( $5,5 \pm 0,4 \text{ nmol/mg Protein}$ ;  $p = 0,004$ ) bzw. 240 min Reperfusion ( $7,0 \pm 0,8 \text{ nmol/mg Protein}$ ;  $p = 0,016$ ) signifikant. (ohne Abbildung)

Die Redoxratio als errechnetes Verhältnis des reduzierten Glutathions zum Gesamtglutathion ( $\text{Ratio} = \text{GSH} / (\text{GSH} + 2 \text{ GSSG})$ ) zeigte in der 30 min Ischämie-Gruppe ( $91,6 \pm 3,5 \%$ ) nach 30 min Reperfusion ( $91,5 \pm 3,5 \%$ ) einen tendenziellen Abfall der Ratio, nach 240 min Reperfusion ( $92,7 \pm 0,6 \%$ ) dagegen einen tendenziellen Ratio-Anstieg. Der Unterschied der Redoxratio zwischen 30 min und 240 min Reperfusion war signifikant ( $p = 0,034$ ).

Nach 240 min Ischämie ( $88,6 \pm 2,8 \%$ ) zeigten sich tendenzielle Erhöhungen der Redoxratio nach 30 min ( $91,9 \pm 0,7 \%$ ) bzw. 240 min Reperfusion ( $91,9 \pm 1,0 \%$ ).

Ischämie über 480min ( $80,9 \pm 1,8 \%$ ) zeigte nach 30 min Reperfusion ( $90,5 \pm 1,0 \%$ ;  $p = 0,004$ ) einen signifikanten und nach 240 min Reperfusion ( $86,8 \pm 2,8 \%$ ) ein tendenzieller Anstieg der Redoxratio. (Abb. 22)

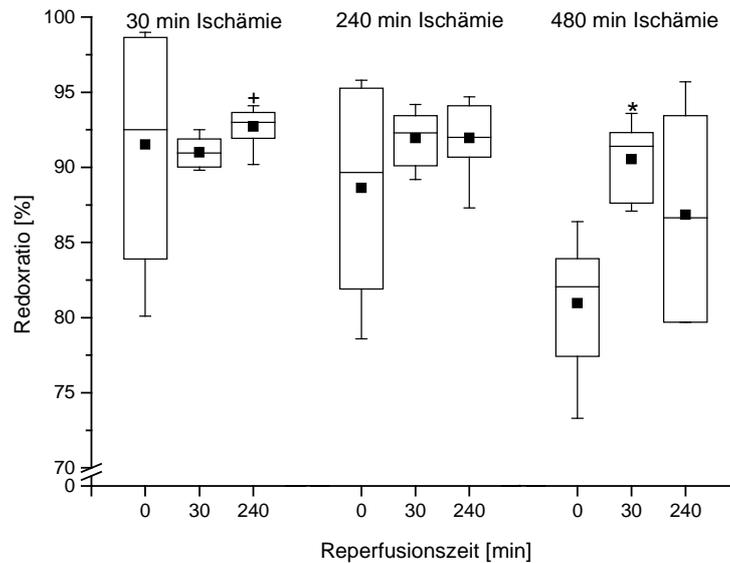


Abb. 22: Einfluss von Reperfusion nach kalter Ischämie auf die Konzentration des Gesamtgluthions (Glu-Äqu) im Rattenherzhomogenat.  
 n = 5 (30 min I ohne R), n = 6 (alle anderen Gruppen)  
 \* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 0 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe,  
 + signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 30 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe

### 3.3.5. Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Glutathion-Reduktase

Die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GSSG-R) war in allen Ischämiegruppen nach Reperfusion vermindert.

Nach 30 min Ischämie ( $8,1 \pm 0,8$  mU/mg Protein) konnten tendenzielle Aktivitätsabnahmen nach 30 min ( $6,0 \pm 0,6$  mU/mg Protein) und 240 min Reperfusion ( $6,5 \pm 0,7$  mU/mg Protein) gezeigt werden.

In der 240 min Ischämie-Gruppe ( $9,7 \pm 1,0$  mU/mg Protein) wurde dagegen nach 30 min ( $6,6 \pm 0,5$  mU/mg Protein;  $p = 0,025$ ) und 240 min Reperfusion ( $7,2 \pm 0,4$  mU/mg Protein;  $p = 0,016$ ) ein signifikanter Unterschied gemessen.

Nach 480minütiger Ischämie ( $10,5 \pm 0,4$  mU/mg Protein) zeigte sich nach 30 min Reperfusion ( $8,7 \pm 0,4$  mU/mg Protein;  $p = 0,016$ ) eine signifikant geringere Enzymaktivität der Glutathion-Reduktase. Nach 240 min Reperfusion ( $9,0 \pm 1,2$  mU/mg Protein) war der Enzymaktivitätsverlust nur noch tendenziell. (Abb. 23)

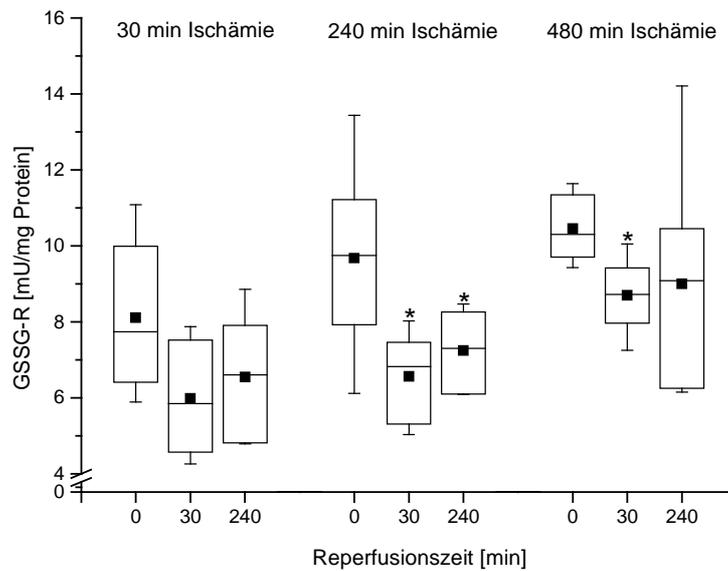


Abb. 23: Einfluss von Reperfusion nach kalter Ischämie auf die Aktivität der Glutathion-Reduktase (GSSG-R) im Rattenherzhomogenat. n = 6  
\* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 0 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe

### 3.3.6. Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Aktivität der Glutathion-S-Transferase

Auch nach einsetzender Reperfusion ergaben sich in den Aktivitäten der Glutathion-S-Transferase (GST) keine signifikante Änderungen. In der 480 min Ischämie-Gruppe war eine tendenzielle Abnahme der Glutathion-S-Transferase-Aktivität mit steigenden Reperfuionszeiten erkennbar. (Tab. 6)

Tab. 6: Einfluss von Reperfusion nach kalter Ischämie auf die Aktivitäten der Glutathion-S-Transferase (GST)

GST (mU/mg Prot.)	Reperfusion (min)			
	0	30	240	
Ischämie (min)	30	21,7±0,9	20,7±1,6	24,2±1,2
	240	25,3±2,8	25,5±1,5	25,1±1,6
	480	23,7±1,2	21,7±1,4	19,3±2,6

n = 6

### 3.3.7. Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf die Konzentration von Lipidhydroperoxiden

In allen Ischämiegruppen stieg die Konzentration der Lipidhydroperoxide (LOOH) mit Beginn der Reperfusion an.

30minütige Ischämie ( $2,6 \pm 0,9$  nmol/mg Protein) und Reperfusion zeigte eine tendenzielle Konzentrationserhöhung in der 30 min- ( $3,6 \pm 0,5$  nmol/mg Protein) und 240 min Reperfusions-Gruppe ( $2,9 \pm 0,9$  nmol/mg Protein).

Nach 240 min Ischämie ( $1,3 \pm 0,3$  nmol/mg Protein) kam es durch 30 min ( $3,5 \pm 0,8$  nmol/mg Protein;  $p = 0,01$ ) und 240 min Reperfusion ( $3,6 \pm 0,5$  nmol/mg Protein;  $p = 0,006$ ) zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg.

Ebenso konnte nach 480 min Ischämie ( $1,9 \pm 0,5$  nmol/mg Protein) in der 30 min Reperfusionsgruppe ( $3,0 \pm 0,3$  nmol/mg Protein;  $p = 0,037$ ) ein signifikanter Konzentrationsanstieg gemessen werden. Nach 240 min Reperfusion ( $3,1 \pm 0,9$  nmol/mg Protein) war der Lipidhydroperoxid-Messwert tendenziell erhöht. (Abb. 24)

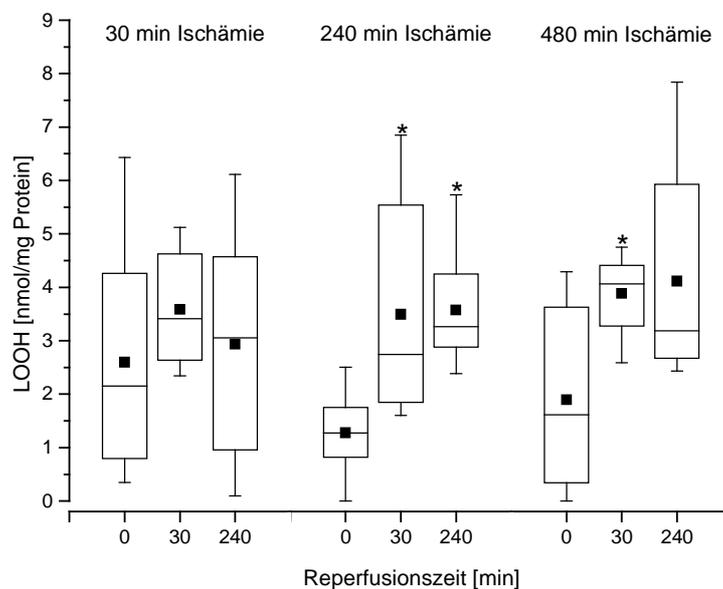


Abb. 24: Einfluss von Reperfusion nach kalter Ischämie auf die Konzentration von Lipidhydroperoxiden (LOOH) im Rattenherzhomogenat.  $n = 5$  (30 min I und 30min R, 480 min I und 30 min R),  $n = 6$  (alle anderen Gruppen) \* signifikant ( $p < 0,05$ ) zu 0 min Reperfusion innerhalb einer Ischämiegruppe

## 4. Diskussion

Bei der Herztransplantation unterliegt das Organ einer Ischämiephase, gefolgt von einer Reperfusionphase. Obwohl die Reperfusion notwendige Voraussetzung für weitere Sauerstoffzufuhr und so den Organerhalt ist, gelten Ischämie mit nachfolgender Reperfusion als gewebeschädigende Ereignisse, die schwerwiegende Organdysfunktionen wie Arrhythmien, kontraktile Dysfunktionen oder progressive Artherosklerose an transplantierten Herzen verursachen können. [18]

Durch Tierversuche der letzten Jahre mehrt sich der Hinweis darauf, dass dem Ischämie-Reperfusionsschaden pathogenetisch oxidativer Stress zugrunde liegen könnte, der über die Bildung von Lipidhydroperoxiden schädigend auf das Myokard wirkt. [18, 70-74]

Dem potentiell schädigenden Einfluss der Sauerstoffradikale steht ein antioxidativ wirkendes Schutzsystem gegenüber. [75] Wie das antioxidative System im Myokard bei anfallendem oxidativem Stress reagiert, wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Die meisten Studien zum Verhalten des antioxidativen Schutzsystems bei Stressbelastung durch Ischämie und Reperfusion wurden am isolierten Rattenherz im Perfusionsmodell nach Langendorff durchgeführt. In der hier vorliegenden Arbeit sollten umfassend die Auswirkungen von oxidativem Stress, der durch Ischämie und Reperfusion nach heterotoper Herztransplantation in Kurzzeitversuchen an der Ratte induziert wurde, auf das intramyokardiale antioxidative Schutzsystem und die Bildung von Lipidhydroperoxiden untersucht werden.

### 4.1. Methoden

Die heterotopen Herztransplantationen wurden an Ratteninzuchtstämmen der Typen Lewis (Lew) als Spender und Fisher (F344) als Empfänger durchgeführt. Beide Stämme haben identische MHC-Klasse I und II-Antigene und unterscheiden sich nur in einigen nicht-MHC-Antigenen. [76] Es ist bekannt, dass bei Transplantationen nicht-MHC-kompatibler Stammkombinationen früh starke Abstoßungsreaktionen auftreten. [77] Bei der hier verwendeten wenig ab-

stoßungsgefährdeten Stammkombination Lew → F344 ist im Kurzzeitversuch keine Immunsuppression nötig. [78]

Die Operationen wurden nach der von Ono und Lindsey 1969 beschriebenen und von Yokoyama 1995 modifizierten Methode (Vorhofseptumdefekt, Trikuspidalklappeninsuffizienz, Ligatur des Truncus pulmonalis und Anastomose des rechten Vorhofs an die abdominelle Vena cava inferior) durchgeführt. [62, 63] Bei der Operationsmethode nach Ono und Lindsey besteht im Transplantat eine unphysiologisch niedrige hämodynamische Belastung des Herzens, die durch die in unserem Modell durchgeführten Modifikationen nach Yokoyama den annähernd physiologischen Belastungsverhältnissen eines orthotop transplantierten Herzens entsprechen. [63]

Im ersten Teil des Versuches wurden die entnommenen Herzen kalter Ischämie ausgesetzt. 30 Minuten Ischämie repräsentierte dabei eine Zeit, die für die Transplantation eines Organs unvermeidbar ist. Vier Stunden kalte Ischämie ist die Zeitspanne, die bei der humanen Herztransplantation eingehalten werden sollte, um schwere Organschäden zu vermeiden. [3] Die lange Ischämiezeit von acht Stunden wurde gewählt, um im Transplantat eine starke Stress-Situation zu induzieren.

Die in dieser Arbeit bestimmten Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase sind wichtige Enzyme mit antioxidativer Kapazität. [79] Zum Glutathionsystem wird neben der Glutathion-Peroxidase das Glutathion gezählt, welches in seiner reduzierten Form ein wichtiges Kosubstrat der Glutathion-Peroxidase und Glutathion-S-Transferase ist. [80] Aus den Konzentrationen von reduziertem und oxidiertem Glutathion wird die Redoxratio ermittelt, die den Redox-Status einer Zelle beschreibt. [81] Die Glutathion-Reduktase bewirkt, dass oxidiertes Glutathion wieder in die wirksame reduzierte Form überführt wird. Um im einzelnen beurteilen zu können, wie die verschiedenen Parameter auf oxidativen Stress reagieren, wurden in dieser Arbeit die Änderungen des gesamten Glutathionsystems und zusätzlich die Aktivitätsänderung der Enzyme Katalase und Superoxiddismutase im Verlauf von Ischämie und Reperfusion untersucht. Die Superoxiddismutase, bestehend

aus zwei Isoformen (Cu/Zn- und Mn-SOD) wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich als Gesamt-Superoxiddismutase gemessen.

Die primären Abbauprodukte der Lipidperoxidation, die Lipidhydroperoxide, dienten in dieser Untersuchung über einen kolorimetrischen Test als direkter Nachweis von oxidativem Stress.

In vielen Studien wird Malondialdehyd, ein sekundäres Abbauprodukt der Lipidperoxidation, im Thiobarbitursäuretest als Nachweis für Lipidperoxidation erfasst. Nachteil der Thiobarbitursäuremethode ist einerseits, dass Malonsäuredialdehyd nur durch die Peroxidation von ungesättigten Fettsäuren mit mehr als zwei Doppelbindungen entsteht und somit ein großer Anteil von oxidierbaren ungesättigten Fettsäuren wie die Linolsäure nicht erfasst werden. Andererseits besteht die Gefahr Aldehyde zu messen, die bei der Durchführung des Tests durch Erhitzung der Probe im sauren pH-Bereich entstehen. [82, 83]

#### 4.2. Einfluss von kalter Ischämie auf Veränderungen des anti-oxidativen Schutzsystems und Bildung von Lipidhydroperoxiden im Myokard

Vier Grad kalter Ischämie ausgesetztes Myokard zeigte einen Anstieg der Enzymaktivitäten der Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase. Dies stellt eine Belastung des antioxidativ wirksamen Schutzsystems, besonders deutlich nach acht Stunden Ischämie, dar.

Das für den antioxidativen Schutz wichtige Enzym Superoxiddismutase kommt in 2 Formen vor. Im Zytoplasma herrscht die Cu/Zn-SOD, in den Mitochondrien die Mn-SOD vor. Die Superoxiddismutase katalysiert die Dismutation von Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid. [23, 84] Die in dieser Untersuchung gemessenen Aktivitätserhöhungen der Superoxiddismutase mit steigender Ischämiezeit deutet auf einen ischämiezeitabhängigen vermehrten Anfall von Superoxidanionen hin. Der mitochondrialen Atmungskette kommt bei der Bildung von Superoxidanionen während der Ischämie eine besondere Bedeutung zu. Die Reduktion der Elektronentransportkette führt dabei zu einer

verstärkten Freisetzung von freien Elektronen, die dann mit molekularem Sauerstoff Superoxidanionen generieren. [20]

Im Gegensatz zu unserer Untersuchung zeigte die von Arduini et al. (1988) an Langendorff-perfundierten Rattenherzen durchgeführte Studie nach milder Ischämie von 60 Minuten eine Verminderung der Aktivität beider Superoxiddismutase-Enzyme. [59] Subramanian et al. (1993) dagegen konnten am Perfusionsmodell keine Veränderungen der Mn-SOD-Aktivität nachweisen. Dieses Ergebnis wurde von den Autoren mit einem nur als gering eingestuften Radikalaufkommen in Zusammenhang gebracht. [85]

Das bei der Reaktion der Superoxiddismutase mit Superoxidanionen entstehende Wasserstoffperoxid wird durch die Katalase und die Glutathion-Peroxidase zu Wasser detoxifiziert. Dabei katalysiert die Katalase Wasserstoffperoxid vorwiegend im millimolaren, die Glutathion-Peroxidase dagegen eher im mikromolaren Bereich. [86]

Die Aktivität der Katalase ist nach 480 Minuten kalter Ischämie signifikant erhöht. Verantwortlich hierfür scheint das vermehrte Wasserstoffperoxid aufkommen zu sein, welches die Folge von primär stark gebildeten Superoxidanionen und erhöhter Superoxiddismutase-Aktivität ist. Die wichtige Funktion der Katalase als antioxidatives Enzym wurde von mehreren Autoren dargestellt. Nach Dhalla et al. (2000) wird die Relevanz dieses Enzyms für den myokardialen antioxidativen Stoffwechsel jedoch kontrovers diskutiert. [33] So ist nach Antunes et al. (2002) die Katalase im Mitochondrium ein zu vernachlässigendes Enzym, dem nur bei in-vitro-Versuchen ein maximaler Anteil von 14% an der Wasserstoffperoxid-detoxifikation zugewiesen werden kann. [50] In unserer Studie deuten die signifikante Aktivitätserhöhungen der Katalase auf eine starke Stresssituation nach langer Ischämie im Myokard hin. Wie die Katalase detoxifiziert auch die Glutathion-Peroxidase Wasserstoffperoxid. Die Glutathion-Peroxidase reduziert Wasserstoffperoxid auf Kosten von Glutathion, welches dabei zu Glutathiondisulfid oxidiert wird. Über die Reaktion der Glutathion-Reduktase wird dieses verbrauchte Glutathion in einer NADPH-abhängige Reaktion dann enzymatisch wieder reduziert. Die Enzymaktivität der Glutathion-Peroxidase war nach 480 Minuten kalter

Ischämie ebenfalls signifikant erhöht. Nach Elstner (1990) hat die Glutathion-Peroxidase eine Michaelis-Menten-Konstante (diese zeigt an, bei welcher Substratkonzentration die Katalysegeschwindigkeit eines Enzyms halbmaximal ist) von  $K_m = 1\mu\text{M}$ . Die Katalase dagegen hat mit  $K_m = 1,1\text{M}$  einen um den Faktor  $10^6$  höher liegenden Konstantenwert. Demzufolge ist bei physiologisch geringer Wasserstoffperoxidstehung die Glutathion-Peroxidase bevorzugt tätig. Bei hohen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid würde jedoch die Katalase bevorzugt und in höherem Maße katalytisch tätig sein, da die Kapazität der Glutathion-Peroxidase dann gesättigt ist. [22] Unter verstärkten Stressbedingungen, wie in unserem Modell nach 480 Minuten Ischämie, scheint das anfallende Wasserstoffperoxid die Kapazität beider Enzyme (KAT und GSH-Px) stark zu beanspruchen.

Das an der Glutathion-Peroxidase-Reaktion beteiligte reduzierte Glutathion zeigte nach kalter Ischämie bis 480 Minuten lediglich tendenziell höhere Konzentration. Der Gehalt an oxidiertem Glutathion hingegen war nach 480 Minuten Ischämie im Sinne einer deutlichen Stress-Reaktion signifikant erhöht. Curello et al. (1986) konnten zeigen, dass erhöhte Konzentrationen von oxidiertem Glutathion sensitiv auf oxidativen Stress hinweisen. [87] Auch Haramaki et al. (1998) deuteten eine verminderte Redoxratio nach externer Zugabe von Wasserstoffperoxid im Langendorff-Perfusionsmodell als Zeichen einer deutlichen Stressreaktion im Rattenmyokard. [88]

Nach Griffith (1999) liegen allgemein erhöhte Werte von Glutathiondisulfid vor, wenn erhöhter oxidativer Stress auftritt oder die Aktivität der Glutathion-Reduktase-Reaktion sinkt. Letzteres wäre zum Beispiel der Fall bei Mangel an reduzierendem NADPH durch Defizienz im Pentosephosphatwegs (z. B. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase). [41] In diesem Zusammenhang deutet die bei uns nach langer Ischämiezeit erhöht gemessene Glutathion-Reduktase-Aktivität darauf hin, dass dieses Enzym adaptativ auf den Verbrauch von reduziertem Glutathion, also auf Stress, reagiert. Arduini et al. (1988) zeigten ebenfalls, dass nach 60minütiger Ischämie durch erhöhte Oxidationsraten von reduziertem Glutathion die Aktivität der Glutathion-Reduktase erhöht war. [58]

Um oxidativen Stress nachzuweisen misst man entweder das Radikalaufkommen direkt mittels „electron paramagnetic resonance spectroscopy“ (EPR) [89] oder weist Produkte der Lipidperoxidation nach. Dafür ist die Messung von primären Peroxidationsprodukten, den instabilen Lipidhydroperoxiden am aussagekräftigsten [92]. In diesem Versuch wurde ein kolorimetrischer Assay angewandt, der auf der Oxidation von Eisen basiert und empfindlich Lipidhydroperoxide radikalischer und nichtradikalischer (z. B. von Wasserstoffperoxid) Entstehung nachweist. [90] Innerhalb von 8 Stunden Ischämie konnte keine signifikante Veränderung der Konzentration von Lipidhydroperoxiden gemessen werden. Im Gegensatz dazu haben Tavazzi et al. [61] bei Untersuchungen am Langendorff-perfundierten Rattenmyokard schon nach 30 min normothermer Ischämie erhöhte Konzentrationen von Malonsäuredialdehyden gemessen. Der Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit ist aber nur eingeschränkt möglich, denn es wurden in unserem Versuch primäre Lipidhydroperoxide gemessen, die instabiler als Lipidhydroperoxid-Abbauprodukte sind. Zudem bleibt, wie bereits unter 4.1. erwähnt, die Unsicherheit bei der Durchführung des Thiobarbitursäure-Tests, unspezifische Ergebnisse zu messen. Ebenso lässt die im dortigen Modell fehlende Kardioprotektion keinen Vergleich zu. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben der Initiierung einer Lipidperoxidationkettenreaktion, die eine Interaktion von mehrfach gesättigten Fettsäuren mit Sauerstoffspezies voraussetzt, könnte in unserem Versuch in der fehlenden Reperfusion und Mikrozirkulation liegen.

Zusammenfassend zeigt sich, dass das antioxidative Schutzsystem des Myokards nach acht Stunden kalter Ischämie deutlich oxidativ belastet ist. Die Erhöhung der Aktivität der antioxidativen Enzyme im Rahmen des zellulären Schutzes sowie Messungen erhöhter Mengen an Glutathiondisulfid weisen auf den anfallenden oxidativen Stress hin. Erhöhte Konzentrationen von Lipidhydroperoxiden konnten dagegen nicht nachgewiesen werden.

### 4.3. Einfluss von Ischämie und Reperfusion auf Veränderungen des antioxidativen Schutzsystems und Bildung von Lipidhydroperoxiden im Myokard

Durch Reperfusion nach Ischämie kommt es mit der Neuaufnahme von Sauerstoff in dem betroffenen Gewebe zu Radikalbildung. [18] Ein Hauptbildungsort der Sauerstoffradikale im Myokard könnte die mitochondriale Elektronentransportkette sein. Als weitere Quellen der Radikalbildung werden aktivierte neutrophile Granulozyten und Makrophagen angesehen. Daneben scheinen der Arachidonsäure- und Eisenmetabolismus eine Rolle bei der Radikalgenerierung zu spielen. [20]

Viele der Studien, die die Auswirkung von Ischämie und Reperfusion auf das Rattenherz untersuchten, haben das am isolierten Präparat mit Hilfe des Langendorff-Perfusionsapparates getan. Dort wird das Herz meist mit dem Krebs-Henseleit-Puffer perfundiert, einer Lösung, die außer Elektrolyten wie Natrium, Kalium, Magnesium, Kalzium, Chlorid und Glucose keine weiteren Bestandteile enthält. In der vorliegenden Arbeit wurde das Rattenherz heterotop abdominal transplantiert und somit an den Blutkreislauf des Empfängertieres angeschlossen. Damit beinhaltet die „Reperfusionslösung“ neben Elektrolyten vor allem korpuskuläre Bestandteile wie Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, sowie weitere Botenstoffe, die als physiologischer Puffer antiazidotisch und antioxidativ wirken. [91]

In der vorliegenden Studie zeigten sich mit einsetzender Reperfusion Veränderungen der gemessenen Parameter in Abhängigkeit von der vorausgegangenen Ischämiedauer.

Das superoxidanionen-detoxifizierende Enzym Superoxiddismutase (SOD) zeigte während der Ischämiephase eine zeitlich abhängige Aktivitätserhöhung. Nach vier- und achtstündiger Ischämie ist dagegen nach 240 Minuten Reperfusion wieder eine fallende Superoxiddismutase-Aktivität messbar.

Zweier et al. (1989) wiesen nach, dass das Maximum der Bildung radikaler Spezies und damit auch das der Superoxidanionen, in den ersten Minuten nach

Reperfusion beginnt liegt. [89] Demnach ist es denkbar, dass nach 240 Minuten Reperfusion die Konzentration der Superoxidanionen abnimmt und so auch die Aktivität der Superoxiddismutase fällt. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass oxidativer Stress antioxidativ wirksame Enzyme hemmt. So haben Pigeolet und Remacle (1991) *in vitro* nachgewiesen, dass die Enzymaktivität der Superoxiddismutase durch Wasserstoffperoxid (in der Konzentration von  $4 \times 10^{-4}$  M), welches Produkt aus der Superoxiddismutase-katalysierten Dismutation von Superoxidanionen ist, um 50% gehemmt wird. [79]

Bei Betrachtung der Katalaseaktivität im zeitlichen Verlauf zeigt sich, dass nach kurzen Ischämiezeiten (30 Minuten) und Reperfusion der höchste Aktivitätsanstieg messbar ist. Verantwortlich dafür scheint eine erhöhte Generierung von Superoxidanionen zu sein. Bei höheren Ischämiezeiten kommt es dann zu keiner weiteren Aktivitätserhöhung der Katalase, im Gegenteil sogar zu einem Aktivitätsverlust. Gleichzeitig ist aber eine höhere Aktivität der Glutathion-Peroxidase nachweisbar, die nach acht Stunden Ischämie und 30 min Reperfusion signifikant ist.

Die Glutathion-Peroxidase hat neben Wasserstoffperoxid organische (Lipidhydro-)Peroxide als Substrat. Bei höheren Ischämiezeiten bis acht Stunden scheint so die Glutathion-Peroxidase vermehrt den Abbau von organischen Peroxiden zu fördern. Dies ist ein Hinweis auf eine erhöhte Stressreaktion mit potentieller Gewebeschädigung. Die gegensätzliche Aktivitätsänderung der Katalase und der Glutathion-Peroxidase scheint auf der Bildung von organischen Peroxiden nach längerer Ischämiezeit zu beruhen.

Antunes et al. (2002) propagieren, dass die Katalase im myokardialen mitochondrialen Antioxidationssystem keine herausragende Rolle spielt. [50] Im Gegensatz dazu scheint in dieser Arbeit die Katalase aber eine relevante Funktion bei der Wasserstoffperoxidentgiftung zu haben. Begründet ist dies in der starken Aktivitätssteigerung nach kurzer Ischämiezeit. Antunes et al. argumentieren, dass für einen relevanten Anteil der Katalase an der Wasserstoffperoxidentgiftung ein extrem hoher oxidativer Stress mit starkem Glutathionverlust vorliegen müsste. In unserer Arbeit zeigte sich ein deutlicher

Konzentrationsverlust von reduziertem Glutathion um 36% nach 30 min Reperfusion.

Neben der tendenziellen Aktivitätssteigerung der Glutathion-Peroxidase nach kurzen und mittellangen Ischämiezeiten wurde die Aktivität des Enzyms nach 8 Stunden Ischämie und 240 Minuten Reperfusion signifikant vermindert gemessen.

Arduini et al. (1988) haben schon nach 60 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion am isoliert perfundierten Rattenherzmodell signifikante Aktivitätserhöhungen vor allem in der mitochondrialen Glutathion-Peroxidase detektiert. Sie führen ihr Ergebnis auf erhöhten oxidativen Stress zurück und erklären die schnelle Aktivitätserhöhung mit Aktivierung aufgrund partieller Proteolyse oder Entfernung eines endogenen Inhibitors. Eine „de novo“-Synthese halten sie aufgrund der kurzen Zeitspanne für unwahrscheinlich. [58] Dem gegenüber berichten einige Autoren über verminderte Glutathion-Peroxidase-Aktivitäten basierend auf der irreversiblen Hemmung des Enzyms durch sein Substrat Wasserstoffperoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies, vor allem bei komplettem Verlust des zellulären Glutathions. [79, 92] Erklärbar wäre eine fallende Glutathion-Peroxidase-Aktivität auch mit nachlassendem oxidativem Stress im fortgeschrittenen Verlauf der Reperusionsphase.

Eine weitere Begründung für einen Aktivitätsverlust der Glutathion-Peroxidase könnte fehlendes Kosubstrat Glutathion sein, da die Konzentration des gesamten zellulären Glutathions in diesem Versuch mit Beginn der Reperusionsphase unabhängig von vorausgegangener Ischämie abfällt. Die gravierendsten Verluste zeigten reduziertes Glutathion (GSH) nach 240 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion (55%) und Glutathiondisulfid (GSSG) nach acht Stunden Ischämie und 30 Minuten Reperfusion (80%).

Der Verbrauch von reduziertem Glutathion findet entweder reversibel über die Glutathion-Peroxidase-Reaktion oder irreversibel bei der Konjugation an freie Radikale statt. Konjugate können über entsprechende Transportmechanismen nach extrazellulär ausgeschleust werden. [80] Ebenso wird der Gesamt-Glutathion-Gehalt der Zelle zum Selbstschutz über ATP-abhängigen Transport von oxidiertem Glutathion nach extrazellulär vermindert. Oxidiertes Glutathion

ist ein zellschädigendes Agens und wird als Schutzmechanismus der Zellen zu Detoxifizierung ausgeschleust. [93]

Cargnoni et. al. (1998) konnten anhand Langendorff-perfundierter Hasenherzen zeigen, dass nach kalter Ischämie bis 24 Stunden ebenfalls ein signifikanter Abfall des reduzierten Glutathions in der Reperfusionsphase eintritt, allerdings mit gleichzeitigem Anstieg der myokardialen Glutathiondisulfid-Konzentration. Der dort nachweisbare Konzentrationsanstieg von Glutathiondisulfid im Gewebe sowie die Exkretion von GSSG kann nach Ferrari et al. (1993) als Nachweis für oxidativen Stress gewertet werden. [20] Cargnoni et al. wiesen nach, dass mit Einsetzen der Reperfusion vermehrt reduziertes und oxidiertes Glutathion ausgeschleust wird. Der größte Verlust an Glutathion lag dabei in den ersten Reperfusionsminuten. [94]

Lazou et. al. (2000) haben Herzen von Wistar-Ratten nach kalziumfreier Bretschneider-Perfusion mit kalziumreicher Lösung reperfundiert. Sie fanden dabei, dass im Rahmen eines möglichen Kalzium-Overloads der Gehalt an reduziertem Glutathion und Glutathiondisulfid im Myokard vermindert war. Im Effluent konnten sie erhöhte Konzentrationen an reduziertem und oxidiertem Glutathion nachweisen. [27] In der vorliegenden Arbeit wurden die Herzen mit kalziumfreier Bretschneider-Lösung kardioplegiert und im Anschluss an die Ischämiezeit mit Blut reperfundiert. Das im Blut enthaltene Kalzium könnte während der Reperfusion des Transplantates im Sinne eines so genannten Kalzium-Paradox die myokardialen Zellen schädigen und so zu einem Verlust von reduziertem und oxidiertem Glutathion führen.

Da Kalzium-Overload vermutlich auch am Ischämie-Reperfusionsschaden beteiligt ist [95], wollten Lazou et al. sekundäre Lipidperoxidationsprodukte über den Thiobarbitursäuretest nachweisen. Bei fehlendem Nachweis vermuteten sie für die Glutathionverluste eine unspezifische Freisetzung aus schwer beschädigten Myozyten. [27]

Eine reduzierte Aktivität der Glutathion-Reduktase (GSSG-R) würde die Hypothese des Glutathionverlustes unterstützen. Die Aktivitäten der Glutathion-Reduktase in dieser Arbeit zeigten nach längeren Ischämiezeiten von vier und acht Stunden mit Beginn der Reperfusion signifikant bis zu 30% geringere

Messwerte. Dies ist mit einem Substratverlust (GSSG) vereinbar. Verringerte Aktivitäten der Glutathion-Reduktase sind auch denkbar, wenn das Kosubstrat NADPH für die Reaktion fehlt. NADPH wird hauptsächlich aus dem Pentosephosphatweg bereitgestellt. [22] Cargnoni et. al. (1999) haben die Veränderung des NADPH-Pools in Abhängigkeit von der Ischämiezeit dargestellt, und fanden eine adaptive Hochregelung der reduzierten Form während der Ischämiephase. [94]

Der Verlust von Gesamt-Glutathion stellt für das Herzmuskelgewebe einen bedrohlichen Zustand hinsichtlich der Abwehr von oxidativem Stress dar. So zeigten Leichtweis et al. (2001), dass experimentell induzierter GSH-Mangel altersunabhängig ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Dysfunktion zu sein scheint. [96]

Neben der enzymatischen Regeneration durch die Glutathion-Reduktase kann der Glutathionpool der Zelle nur noch durch Neu-Synthese aufgestockt werden. Die de novo-Synthese von reduziertem Glutathion erfolgt über zwei aufeinanderfolgende ATPabhängige enzymatische Schritte, wobei zahlreiche umgebende Einflüsse den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beeinflussen können. So kann der GSH-Pool zum Beispiel durch das Einwirken von GSH-Konjugaten, reaktiven Sauerstoffspezies oder Abbauprodukten der Lipidhydroperoxiden auf die Transkription auf Genebene reguliert werden. [80]

Die in diesem Versuch bis zum Endpunkt der Reperfusion aber niedrig bleibenden Konzentrationen an reduziertem Glutathion können über einen hohen unspezifischen Verlust und über eine unzureichende de novo-Synthese von GSH erklärt werden. Bei letzterem könnte ischämisch bedingter ATP-Abfall dazu führen, dass die enzymatische Synthese von reduziertem Glutathion insuffizient verläuft. Starker Verbrauch von GSH durch eine hohe Steigerung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität kann nur nach 8stündiger Ischämie und Reperfusion angenommen werden. Dagegen scheint die Glutathion-S-Transferase bei gleichbleibendem Aktivitätsniveau eine untergeordnete Rolle für den Verbrauch an reduziertem Glutathion zu spielen.

Der niedrig bleibende GSH-Spiegel kann über die Redox-Ratio detaillierter untersucht werden. Die Redox-Ratio gibt den Anteil des reduzierten Glutathions

am Gesamtglutathion an und stellt so ein Maß für den Schutz der Zelle vor oxidativem Stress dar. Signifikante Veränderungen der Redoxratio konnten hier nur nach 480 Minuten Ischämie gemessen werden. Zum einen zeigt sich ein Abfall der Ratio um ca. 11 Prozentpunkte nach der Ischämiephase, zum anderen ein Wiederanstieg nach 30 Minuten Reperfusion. Das Redox-Gleichgewicht ist zwar nach acht Stunden Ischämie und langer Reperfusion wieder hergestellt, der absolute Glutathion-Pool ist jedoch erniedrigt. Wahrscheinlich stellt der Glutathionverlust eine Kompensation dar, die über die Ausschleusung von toxischem Glutathiondisulfid aus dem Kardiomyozyten zum zellulären Selbstschutz erfolgt. [93]

Es zeigt sich, dass während der Ischämiephase ein deutlicher Konzentrationsverlust von reduziertem Glutathion stattgefunden hat und somit die Zelle oxidativem Stress ausgesetzt war. Der Wiederanstieg der Redoxratio während der Reperfusionsphase beruht darauf, dass entweder vermehrt oxidiertes Glutathion zum Schutz der Zelle ausgeschleust worden ist, oder aber durch die Glutathion-Reduktase vermehrt Glutathiondisulfid in reduziertem Glutathion umgewandelt worden ist. Letzteres erscheint bei einer verminderten Aktivität der Glutathion-Reduktase und des reduzierten Gesamtglutathionpools unwahrscheinlich.

Als Nachweis für oxidativen Stress wurden Lipidhydroperoxide gemessen. Es zeigt sich in dem vorliegenden Versuch, dass sich die Konzentration von Lipidhydroperoxiden nach langer Ischämie durch unabhängig lange Reperfusionsdauer ungefähr verdoppelt ist. Dies deutet darauf hin, dass oxidativer Stress bei gleichzeitigem GSH-Verlust bereits zu myokardialer Zellschädigung geführt hat. Der starke Konzentrationsverlust von reduziertem Glutathion scheint so suffiziente antioxidative Abwehrmaßnahmen zu reduzieren.

Tavazzi et al. (1992) und Paradies et al. (1999) konnten in ihren Arbeiten erhöhte Lipidperoxidation in ihrem Ischämie- und Reperfusionsmodell nachweisen. Interessant ist, dass die Versuche, die in der Langendorff-Apparatur isolierte Rattenherzen kristalloid perfundierten, schon nach geringen Ischämiezeiten ein hohes Maß an Lipidperoxidation zeigten. [61, 97] Allerdings handelte es sich dabei um Messungen von sekundären Abbauprodukten der

Lipidhydroperoxidation, um Malondialdehyd. Dieses wurde über den Test für Thiobarbitursäure-reaktive-Substanzen erfasst und ist so mit unseren Messungen der Lipidhydroperoxide nicht direkt vergleichbar. Ferner sind diese vom Organismus isolierten Untersuchungen ohne den Einfluss des antioxidativ wirksamen Blutes und ohne Kardioprotektion durch kalte kardioplegische Lösung durchgeführt worden. Somit ist in den Versuchen von Tavazzi et al. und Paradies et al. von vermehrter Lipidperoxidation auszugehen.

Insgesamt zeigt sich in unserem Ischämie/Reperusionsmodell das myokardiale antioxidative Abwehrsystem vor allem nach langer Ischämiezeit durch den gravierenden Glutathionverlust und die zellschädigende Lipidhydroperoxidbildung deutlich stressbelastet, aber kompensiert. Dies zeigt sich insbesondere durch das Ausbleiben eines Transplantatversagens bis zur Explantation.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, umfassend die Auswirkungen von oxidativem Stress, der durch Ischämie und Reperfusion nach heterotoper Herztransplantation an der Ratte induziert wird, zu untersuchen. Dazu wurde das Modell der heterotopen Transplantation nach Ono und Lindsay (1969) mit Modifikationen nach Yokoyama (1995) für den vorliegenden Versuch etabliert.

Bisherige Studien zu diesem Thema untersuchten fast ausschließlich an Langendorff-Perfusions-Apparaturen isoliert einzelne Parameter des antioxidativen Schutzsystems, des Glutathionsystems oder der Lipidperoxidbildung. In der vorliegenden Arbeit zeigte der Einfluss von langer kalter Ischämie auf das Myokard eine signifikante Aktivitätserhöhung der Enzyme Superoxiddismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase, einhergehend mit einer signifikanten Reduktion der Glutathion-Redoxratio. Die gemessenen Aktivitätserhöhungen sowie die Veränderung des Glutathion-Gleichgewichtes zugunsten von oxidiertem Glutathion weisen auf eine erhebliche oxidative Stressbelastung im ischämischen Myokard hin.

Mit dem Einsetzen der Reperfusion kam es neben ischämie- und reperfusionszeitabhängigen Aktivitätsveränderungen der antioxidativen Enzyme vor allem zu einem dramatischen Verlust von reduziertem (- 55 %) und oxidiertem (- 80 %) Glutathion bei gleichzeitigem Aktivitätsverlust der Glutathion-Reduktase. Diese Veränderungen deuten auf eine erhebliche myokardiale Belastung hin, die in der Bildung von Lipidhydroperoxidationsprodukten und damit unmittelbarer Zellschädigung nach langen Ischämiezeiten deutlich wird.

Insgesamt konnte durch verlängerte Ischämiezeit mit nachfolgender Reperfusion oxidativer Stress induziert werden. Diese myokardiale Stressbelastung wurde durch Schutzmechanismen wie die Regulierung der antioxidativen Enzyme und das Ausschleusen von oxidiertem Glutathion aus dem Myokard im Kurzzeitversuch kompensiert. Auch wenn ein Transplantatversagen ausblieb, ist durch die vermehrte Bildung von Lipidhydroperoxiden von einer initialen Schädigung z. B. des Endothels auszugehen, die möglicherweise im Langzeitverlauf zu einer frühzeitig auftretenden Transplantatvaskulopathie führt.

Parameter wie das reduzierte und oxidierte Glutathion sowie die Lipidhydroperoxide könnten indikativ für die Charakterisierung von transplantationsbedingtem oxidativem Stress im Langzeitverlauf sein. Hierzu sind weitere Untersuchungen mit längerem Verlauf notwendig, die eine Induktion einer Endothelzellschädigung mit folgender Transplantatvaskulopathie durch frühe oxidative Stressexposition des Myokards darlegen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Kirklin JK:** Cardiac Surgery. 1993: Churchill Livingstone.
2. **Ennker J:** Checkliste Herzchirurgie. 2002, Stuttgart: Thieme.
3. **Largiadèr F:** Organtransplantation. 1999, Stuttgart: Thieme.
4. **Shumway NE, Lower RR and Stofer RC:** Transplantation of the heart. Adv Surg. 2:265-84 (1966)
5. **Dreyfus G, et al.:** Total orthotopic heart transplantation: An alternative to the standard technique. Ann Thorac Surg. 52(2):1181-1184 (1991)
6. **Cooper DK and Lanza RP:** Heart transplantation - the present status of orthotopic and heterotopic heart transplantation. 1984: MTP Press limited.
7. **Heizmann WR, et al.:** Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie. 1997, Stuttgart: Schattauer.
8. **Weis M and von Scheidt W:** Cardiac Allograft Vasculopathy - A review. Circ. 96:2069-2077 (1997)
9. **von Scheidt W:** Herztransplantation, in *Klinische Kardiologie*, Erdmann, Editor. 2000, Springer: Stuttgart. p. 1337-1368.
10. **Gross T, et al.:** The effect of hypercholesterinemia on intimal thickness and endothelial function after heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 16:48 (1997)
11. **Grattan MT, et al.:** Cytomegalievirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. JAMA. 261:3561-3566 (1989)
12. **Hayry P:** Chronic allograft vasculopathy: New strategies for drug development. Transpl Proc. 30:3989-3990 (1998)
13. **von Scheidt W:** The clinical dilemma of cardiac allograft vasculopathy - an introduction to the clinical session. Z Kardiol. 89 Supp 9(IX):40-44 (2000)
14. **Johnson ED, Gao SZ and Schroeder JS:** The spectrum of coronary artery pathologic findings in human cardiac allografts. J Heart Transplant. 88:349-359 (1989)
15. **Larsen RL, et al.:** Dobutamine stress echocardiographie for assessing coronary artery disease after transplantation in children. J Am Coll Cardiol. 32:515-520 (1998)

16. **Pahl E, et al.:** Occult restrictive hemodynamics after pediatric heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 14:1109-1115 (1995)
17. **Rickenbacher PR, et al.:** Coronary artery intimal thickening in the transplanted heart. An in vivo intracoronary ultrasound study of immunologic and metabolic risk factors. *Transplantation.* 61:46-53 (1996)
18. **McCord JM:** Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med.* 312(3):159-163 (1985)
19. **Sies H:** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 82(2):291-295 (1997)
20. **Ferrari R, et al.:** Myocardial damage during ischaemia and reperfusion. *Eur Heart J.* 14 Supp G:25-30 (1993)
21. **Halliwell B and Gutteridge JMC:** The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280:1-8 (1990)
22. **Elstner F:** *Der Sauerstoff.* 1990, Mannheim: BI-Wissenschaftsverlag.
23. **Elstner F:** *Sauerstoffabhängige Erkrankung und Therapie.* 1993, Mannheim: BI-Wissenschaftsverlag.
24. **Cross AR and Jones OTG:** Enzymatic mechanisms of superoxide production. *Biochem Biophys Acta.* 1057:281-298 (1991)
25. **Stryer L:** *Biochemie.* 4 ed. 1999, Heidelberg: Spektrumverlag.
26. **Minotti G and Aust SD:** Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids.* 27(3):219-226 (1992)
27. **Lazou A, et al.:** Oxidative status and anti-oxidant enzyme activity during calcium paradox in the rat isolated heart. *Clin Exp Pharm Phys.* 27:160-166 (2000)
28. **Pepe S:** Mitochondrial function in ischaemia and reperfusion of the ageing heart. *Clin Exp Pharm Phys.* 27:745-750 (2000)
29. **Floyd RA:** Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4:2587-2597 (1990)
30. **Kontos HA:** Oxygen radicals in CNS damage. *Chem Biol Interact.* 72:229-255 (1989)
31. **Rice-Evans CA and Burdon H:** Free radical lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res.* 32:71-110 (1993)

32. **Machlin LJ and Bendich A:** Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.* 1:441-445 (1987)
33. **Dhalla NS, et al.:** Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 47:446-456 (2000)
34. **Brigelius-Flohé R:** Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Rad Biol Med.* 27(9/10):951-956 (1999)
35. **Toufektsian MC, et al.:** Effects of selenium deficiency on the response of cardiac tissue to ischemia and reperfusion. *Toxicology.* 148(2-3):125-132 (2000)
36. **Carlberg I and Mannervik B:** Glutathione reductase. *Methods Enzymol.* 113:484-490 (1985)
37. **Warholm M, et al.:** Glutathione transferases from human liver. *Methods Enzymol.* 113:499-504 (1985)
38. **Keppeler D:** Export pumps for glutathione s-conjugates. *Free Rad Biol Med.* 27(9/10):985-991 (1999)
39. **Fukuzawa K and Fujii T:** Peroxide dependent and independent lipid peroxidation: site-specific mechanisms of initiation by chelated iron and inhibition by  $\alpha$ -tocopherol. *Lipids.* 27:227-333 (1992)
40. **Takasaki T, et al.:** Relationship between aging and vitamin E. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 39(5):494-500 (2002)
41. **Griffith OW:** Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med.* 27(9/10):922-935 (1999)
42. **Aruoma O and Halliwell B:** Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl radical generation? *Biochem J.* 241:273-278 (1987)
43. **Gutteridge JMC and Quinlan GS:** Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. *Biochem Biophys Acta.* 1159:247-254 (1992)
44. **Maxwell SRJ and Lip GYH:** Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol.* 58:95-117 (1997)

45. **Ferrari R, et al.:** Oxygen free radicals and myocardial damage: protective role of thiol-containing agents. *Am J Med.* 91(3c):95s-105s (1991)
46. **DeWall RA, et al.:** Responses of ischaemic myocardium to allopurinol. *Am Heart J.* 82:362-370 (1971)
47. **Lefer DJ and Granger DN:** Oxidative stress and cardiac disease. *Am J Med.* 109(315-323) (2000)
48. **Arroyo CM, et al.:** Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Lett.* 221(1):101-104 (1987)
49. **Grech, et al.:** Evidence for free radical generation after primary percutaneous transluminal coronary angioplasty recanalization in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 77:122-127 (1996)
50. **Antunes F, Han D and Cadenas E:** Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Rad Biol Med.* 33(9):1260-1267 (2002)
51. **Molyneux CA, Glyn MC and Ward BJ:** Oxidative stress and cardiac microvascular structure in ischemia and reperfusion: the protective effect of antioxidant vitamins. *Microvasc Res.* 64:265-277 (2002)
52. **Schimke I, et al.:** Oxidative stress in human heart is associated with changes in the antioxidative defense as shown after heart transplantation. *Mol Cell Biochem.* 204:89-96 (2000)
53. **Uchida K, et al.:** Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. *J Biol Chem.* 274(4):2234-2242 (1999)
54. **Langendorff:** Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Arch.* 61:291-332 (1895)
55. **Coudray C, et al.:** Relationship between severity of ischemia and oxidant scavenger enzyme activities in the isolated rat heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 27(1):61-69 (1995)
56. **Porreca E, et al.:** Myocardial antioxidant defense mechanisms: time related changes after reperfusion of the ischemic rat heart. *Free Radic Res.* 29(3):171-179 (1994)
57. **Kirshenbaum LA and Singal PK:** Increase in endogenous antioxidant enzymes protects hearts against reperfusion injury. *Am J Physiol.* 265:H484-H493 (1993)

58. **Arduini A, et al.:** Effect of ischemia and reperfusion on antioxidant enzymes and mitochondrial inner membrane proteins in perfused rat heart. *Biochem Biophys Acta.* 970(113-121) (1988)
59. **Esterbauer H, Schaur RJ and Zollner H:** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde und related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 11(1):81-128 (1991)
60. **Thollon C, et al.:** Nature of the cardiomyocyte injury induced by lipid hydroperoxides. *Cardiovasc Res.* 30:648 (1995)
61. **Tavazzi B, et al.:** Malondialdehyde production and ascorbate decrease are associated to the reperfusion of the isolated postischemic rat heart. *Free Rad Biol Med.* 13(1):75-78 (1992)
62. **Ono K and Lindsey ES:** Improved technique of heart transplantation in the rat. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 57:225-229 (1969)
63. **Yokoyama H, et al.:** Proposal of a working left heart model with a heterotopic transplantation technique in rats. *J Heart Lung Transplant.* 14(4):706-712 (1995)
64. **Bradford MM:** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254 (1976)
65. **Cohen G, Dembiec D and Marcus J:** Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem.* 34:30-38 (1970)
66. **McCord JM and Fridovich I:** The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem.* 244(22):6056-6063 (1969)
67. **Kirby TW and Fridovich I:** A picomolar spectrophotometric assay for superoxide dismutase. *Anal Biochem.* 127(2):435-440 (1982)
68. **Paglia DE and Valentine WN:** Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70(1):158-169 (1967)
69. **Krien PM, Margou V and Kermici M:** Electrochemical determination of femtomole amounts of free reduced and oxidized glutathione. Application to human hair follicles. *J Chromatogr.* 576(2):255-261 (1992)
70. **Kloner RA, Przyklenk K and Whittaker P:** Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circ.* 80(5):1115-1127 (1989)

71. **Ruuge EK, et al.:** Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol.* 261(4 Suppl):81-86 (1991)
72. **Takemura G, Onodera T and Ashraf M:** Quantification of hydroxyl radical and its lack of relevance to myocardial injury during early reperfusion after ischemia in rat hearts. *Circ Res.* 71(7):96-105 (1992)
73. **Thompson-Gorman SL and Zweier JL:** Evaluation of the role of xanthine oxidase in myocardial reperfusion injury. *J Biol Chem.* 265(12):6656-6663 (1990)
74. **Eaton P, Hearse DJ and Shattock MJ:** Lipid hydroperoxide modification of proteins during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res.* 51:294-303 (2001)
75. **Sies H:** Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 91(3c):31s-38s (1991)
76. **Liebert M, et al.:** CML characterization of a product of a second class I locus in the rat MHC. *Immunogenetics.* 16(2):143-155 (1982)
77. **Adams DH and Tilney NL:** The pathophysiology of chronic rejection, in *Transplantation reviews*, P.J. Morris and N.L. Tilney, Editors. 1989, Saunders: Philadelphia.
78. **Adams DH, et al.:** Experimental graft arteriosclerosis. *Transplantation.* 53(5):1115-1119 (1992)
79. **Pigeolet E, et al.:** Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and derived free radicals. *Mech Ageing Dev.* 51(3):283-297 (1990)
80. **Dickinson DA and Forman HJ:** Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology.* 64:1019-1026 (2002)
81. **Schafer FQ and Buettner GR:** Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Rad Biol Med.* 30:1191-1212 (2001)
82. **Gutteridge JMC:** Aspects to consider when detecting and measuring lipid peroxidation. *Free Radic Res Commun.* 1:173-184 (1986)
83. **Wade CR and van Rij AM:** Plasma malondialdehyde, lipid peroxides, and the thiobarbituric acid reaction. *Clin Chem.* 35:336 (1989)

84. **Dipolock AT:** Antioxidants and free radical scavengers, in *Free radical damage and its control*, C.A. Rice-Evans and R.H. Burdon, Editors. 1994, Elsevier Science: New York. p. 114-120.
85. **Subramanian R, Volovsek A and Ho YS:** Lack of change in MnSOD during ischemia/reperfusion of isolated rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 25(10):1179-1186 (1993)
86. **Kaul N, et al.:** Free radicals and heart. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 30:55-67 (1993)
87. **Curello S, et al.:** Oxidative stress during myocardial ischaemia and reperfusion experimental and clinical evidences. *J Appl Cardiol.* 1:311-327 (1986)
88. **Haramaki, et al.:** Networking antioxidants in the isolated rat heart are selectively depleted by ischemia-reperfusion. *Free Rad Biol Med.* 25(3):329-339 (1998)
89. **Zweier JL, et al.:** Measurement and characterization of postischemic free radical generation in the isolated perfused heart. *J Biol Chem.* 264(32):18890-18895 (1989)
90. **Halliwell B:** Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res.* 47:410-418 (2000)
91. **Galianes M and Hearse DJ:** The consequences of asanguineous versus sanguineous reperfusion after long-term preservation of the heart. *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 4(5):273-277 (1990)
92. **Blum J and Fridovich I:** Inactivation of glutathion peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.* 240:500-508 (1985)
93. **Ishikawa T and Sies H:** Cardiac transport of glutathione disulfid and S-conjugate. *J Biol Chem.* 259(6):3838-3843 (1984)
94. **Cargnoni A, et al.:** Changes in oxidative stress and cellular redox potential during myocardial storage for transplantation: experimental studies. *J Heart Lung Transplant.* 18(5):478-487 (1999)
95. **Kaneko M, et al.:** Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart. *Mol Cell Biochem.* 139:91-100 (1994)
96. **Leichtweis S and Ji LL:** Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. *Acta Physiol Scand.* 172:1-10 (2001)

97. **Paradies G, et al.**: Lipid peroxidation and alterations to oxidative metabolism in mitochondria isolated from rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Free Rad Biol Med.* 27(1/2):42-50 (1999)

Anhang A

## Reagenzien

Reagenz	Formel	Hersteller	Art.nr.
1-Chloro-2,4-Dinitrobenzene (CDNB)	$C_6H_3ClN_2O_4$	Sigma	C-6396
Ethanol	$C_2H_5OH$	Roth	9065
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	$C_{10}H_{16}N_2O_8$	Roth	8040
Glutathionreduktase		Sigma	G-3664
Gluthation, oxidiert (GSSG)	$C_{20}H_{32}N_6O_{12}S_2$	Sigma	G-4501
Gluthation, reduziert (GSH)	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	Sigma	G-4251
Hypoxanthin	$C_5H_4N_4O$	Sigma	H-9377
Kaliumdihydrogenphosphat	$KH_2PO_4$	Sigma	P-5379
Kaliumhydrogenphosphat	$K_2HPO_4$	Sigma	P-3786
Kaliumpermanganat	$KMnO_4$	Merck	1.05082
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	Merck	1.06346
Natriumhydrogenkarbonat	$NaHCO_3$	Roth	8551
Dinatriumhydrogenphosphat	$Na_2HPO_4$	Merck	1.06586
Natriumazid	$NaN_3$	Sigma	S-8032
Natronhydroxid	$NaOH$	Roth	K021
Nikotinamidadenindinukleotid- phosphat (NADPH)	$C_{21}H_{26}N_7O_{17}P_3Na_4$	Sigma	N-7505
Nitroblue-Tetrazolium (NBT)	$C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$	Sigma	N-6876
Salzsäure	$HCl$	Merck	1.09060
Schwefelsäure	$H_2SO_4$	Roth	4623
TRIS- (hydroxymethyl)aminomethan	$C_4H_{11}NO_3$	Roth	4855
Wasserstoffperoxid	$H_2O_2$	Merck	1.08597

Reagenz	Formel	Hersteller	Art.nr.
Xanthinoxidase		Sigma	X-4500
Bis-(2-Aminoethyl)-Amin- N,N,N',N'',N''-Pentaessigsäure	DTPA	Aldrich	35904-1
ortho-Phosphorsäure 85%	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck	1.00552

## Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller	Ort/Land
Photometer	Ultrospec 3000	Amersham Biosciences Europe	Freiburg
Feinwaage	SBC 33	Scaltec	Heiligenstadt
Grobwaage	Kern 572	Kern	Albstadt
Vortex	Genie 2	Scientific Industries	NY, USA
pH-Meter	MP 225	Mettler Toledo	Urdorf, CH
Magnetrührer		Marienfeld	Mergentheim
Rüttler	Titramax 100 T	SLT	Crailsheim
ELISA-Reader	Tecan Spectra II	Tecan Deutschland GmbH	Crailsheim
Röhren	55.466	Sarstedt	
Küvetten, groß	67.741	Sarstedt	
Küvetten, klein	67.742	Sarstedt	
Pumpe (HPLC)	Waters 515		
Detektor (HPLC)	ESA Coulochem 5100A	ESA	Bedford, MA, USA
Elektroden (HPLC)	Cond.-Cell Model 5021	ESA	Bedford, MA, USA
Elektroden (HPLC)	Analytical-Cell Model 5011	ESA	Bedford, MA, USA
Säule (HPLC)	NC-04-300, Nucleosil 120-5-C18, 5µm, Part.-Nr. 3004 1735	Bischoff	Leonberg
Vorsäule (HPLC)	Guardcartridge K1, Nucleosil 120-5-C18, Part-Nr. 6301 1735	Bischoff	Leonberg

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Ort/Land</b>
Ultrafilter	Ultrafree MC-cartridges	Millipore	Eschborn
Zentrifugal-analyser	Cobas Fara	Roche	Grenzach-Wyhlen

## Anhang B

### Danksagungen

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Olaf Elert für die Vergabe des Themas meiner Dissertationsarbeit recht herzlich danken.

Desweiteren ergeht herzlicher Dank an meinen Betreuer Herrn Dr. med. André Renner, der mir bei der Ausführung des tierexperimentellen Teils sowie der schriftlichen Ausarbeitung mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Frau Dipl. Biol. Martina Sagstetter möchte ich für die Betreuung während der gesamten biochemisch-experimentellen Laborarbeit danken.

In diesem Zusammenhang danke ich auch Frau Prof. Karin Ulrichs und ihren Mitarbeitern aus der Abteilung für experimentelle Transplantationsimmunologie der chirurgischen Klinik, die die Benutzung des Kleintier-Operationsraums ermöglichten sowie die Pflege der Tiere übernahmen.

Ebenso danken möchte ich den technischen Assistentinnen und Assistenten des Labors der herzchirurgischen Klinik und des pneumologischen Forschungslabor (Prof. Dr. med. Michael Schmidt) für die freundliche Aufnahme und die problemlose Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie und meiner Freundin Doris, die mir in „schweren Zeiten“ stets seelischen Beistand leisteten.

## Lebenslauf

Geboren am 23. November 1975 in Würzburg als erstes Kind meiner Eltern Norbert Bengel und Elisabeth Bengel (geb. Schröckseis) begann meine Schulausbildung im Herbst 1982 in der Volksschule Höchberg. Nach der vierten Klasse wechselte ich 1986 an das naturwissenschaftliche Friedrich-Koenig-Gymnasium in Würzburg, wo ich nach neun weiteren Schuljahren im Sommer 1995 das Abitur ablegte.

Von Oktober 1995 bis Juli 1996 folgte die Wehrdienstzeit bei der Marine (Tender „Elbe“, 7. Schnellbootgeschwader) als Sanitätssoldat.

Im Wintersemester 1996 begann ich das Humanmedizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg. Das Physikum legte ich nach dem vierten Semester Regelstudienzeit im Frühjahr 1998 ab. Es folgten Teil I und II der ärztlichen Prüfung am Ende der Wintersemester 1999 und 2001. Im Anschluss daran absolvierte ich das praktische Jahr mit Ausbildungsabschnitten in Tifers (Schweiz), Houston, TX (USA) und Würzburg. Am 30. November 2002 beendete ich das Medizinstudium mit Bestehen des dritten Abschnittes der ärztlichen Prüfung.

Nach Erlangen der vorläufigen Approbation zum 02. Dezember 2002 leistete ich vom 01. Februar 2003 bis 31. Juli 2004 die Zeit als Arzt im Praktikum in der herzchirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern der Ludwigs-Maximilians-Universität München unter Prof. Dr. med. B. Reichart ab und erhielt am 01. August 2004 die Approbation als Arzt. Seit dem 01. Oktober 2004 bin ich in der herzchirurgischen Klinik des Klinikums Großhadern der Ludwigs-Maximilians-Universität München als Assitenzarzt in der Weiterbildung zum Facharzt für Herzchirurgie tätig.