

Aus der urologischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Direktor: Univ.-Prof. Dott./ Dr. habil. P. Fornara)

***Untersuchungen zur dualen Wirkung von Ascorbat und CP-H als
Detektor- bzw. Detoxifikationsmolekül im Verlauf der in vitro Reperfusion
der Rattenniere***

H a b i l i t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. habil.

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg

von Hagen Loertzer
geboren am 30. Mai 1972 in Dessau

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

Referat und bibliographische Beschreibung

Fragestellung

Suche nach geeigneten Parametern zur Charakterisierung des oxidativen Stresses während der Reperfusionsphase nach Ischämie der Rattenniere bzw. der antioxidativen Kapazität im Perfusionspuffer.

Einleitung:

Die meisten ROS sind kurzlebig und können zudem mit einer Vielzahl von Verbindungen in der Nähe ihres Entstehungsorts interagieren. Diese Eigenschaft macht eine Messung zumeist schwierig. Die ESR-Spektroskopie ist eine Methode, die Radikale direkt nachweisen kann. Deshalb haben wir einen ROS-sensitiven Marker eingesetzt, um die Bildung von Radikalen bei der Organreoxygenierung zu analysieren.

Material und Methoden:

Es wurde eine Methode der rezirkulierenden Perfusion der Rattenniere etabliert, die sequentielle Phasen von Ischämie/Anoxie mit nachfolgender normoxischer Reperfusion des Organs ermöglicht. Die Bildung des Ascorbatradicals wie auch die Dauer der Lag-Phase bei der thermischen Genese von AAPH-abgeleiteten Peroxylradikalen diente als Marker für oxidativen Stress. Weiterhin wurden am Nierenhomogenat *in vitro* die Wechselwirkung der Spin-Trap 1-Hydroxy-3-Carboxy-Pyrrolidin (CP-H) mit solchen reaktiven Verbindungen wie Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) und Alkylperoxylradikalen ($\text{ROO}\bullet$) untersucht. Dabei wurde der Zeitverlauf der Erhöhung der Peak-Intensität des ESR-Signals des entstehenden CP-Radikals als Maß für die Oxidation von CP-H verwendet. Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass CP-H konzentrationsabhängig sowohl durch $\bullet\text{OH}$ wie auch durch $\text{ROO}\bullet$ oxidiert werden kann. Voruntersuchungen mit ischämischem Nierenhomogenat zeigten, dass CP-H während der Reperfusion durch die Umwandlung zu paramagnetischem CP die Bildung von ROS aufdeckt werden kann.

Ergebnisse:

AAPH (2-Amidinopropan Dihydrochlorid) zersetzt sich in Gegenwart von Sauerstoff bei 37°C mit konstanter Geschwindigkeit zu Peroxylradikalen, deren Akkumulation *in vitro* mittels ESR-Spektroskopie dargestellt werden kann. Die Anwesenheit von Antioxidantien (z.B. Ascorbat) verzögert solange die Bildung von AAPH-abgeleiteten ESR-Signalen, bis das zugesetzte Ascorbat als Schutzmolekül aufgebraucht ist. Wird Ascorbat dem Perfusionsmedium zugesetzt, lässt sich oxidativer Stress während der Reperfusion durch eine Erhöhung der Konzentration von Ascorbatradikal abschätzen. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass GSH kaum in der Lage ist, $\bullet\text{CP}$ zu reduzieren. Ascorbat hingegen kann bei Konzentrationen ab $300\ \mu\text{M}$ $\bullet\text{CP}$ langsam zu CP-H reduzieren. Dies kann zu einer Unterschätzung des

Einflusses der einzelnen Oxidantien, die bei der Gewebsreperfusion entstehen, führen.

Fazit:

Beide Methoden erlauben eine semiquantitative Abschätzung der Bildung von oxidierenden Radikalen zum Zeitpunkt ihrer Entstehung. Ascorbat ist ein physiologisches Antioxidanz, das in Gegenwart von fast allen Radikalen zum Ascorbatradikal oxidiert werden kann. In dieser Form ist das Ascorbatradikal ein Marker für oxidativen Stress, der mittels ESR-Spektroskopie darstellbar ist. Mit diesen besonderen Eigenschaften ist Ascorbat zum einen in der Lage entstehende •OH wie auch andere organische Radikale zu entgiften und dient dabei gleichzeitig als sich transient bildendes Ascorbatradikal dazu oxidativen Stress darstellbar zu machen. Bei der AAPH-Methode korreliert die lag-Phase mit der pro Zeiteinheit aufgebrauchten Ascorbatkonzentration. Auch hier zeigt das intermediär gebildete Ascorbatradikal die transiente Entgiftung der Alkyl- bzw. Alkylperoxyradikale an. An der Übertragbarkeit der gewonnenen Erfahrungen im Perfusionsmedium auf Blut bzw. Serum wird gearbeitet. Die Eignung von CP-H als Marker für die Erfassung und Quantifizierung von oxidativem Stress während der Reoxygenierung von Nierenhomogenat wie auch in der perfundierten Niere muss weiterhin diskutiert werden.

Loertzer, Hagen: Untersuchungen zur dualen Wirkung von Ascorbat und CP-H als Detektor- bzw. Detoxifikationsmolekül im Verlauf der in vitro Reperfusion der Rattenniere. Universität Halle/Saale, Medizinische Fakultät. Habilitation, 82 Seiten, 2008

Abkürzungsverzeichnis

•CP	=	3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-1-hydroxid
¹ O ₂	=	Singulett Sauerstoff
AAPH	=	2,2'-diazobis(2-amidinopropane)dihydrochlorid
AFR	=	Ascorbatradikal
CAT	=	Katalase
CP-H	=	3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-1-oxyl
DEPMPO	=	5-Diethoxyphosphoryl-5'-Methyl-1-Pyrrolin-N-Oxid
DHA	=	Dehydroasorbat
DMPO	=	5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid
DSO	=	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EC	=	Euro-Collins-Lösung
ESR	=	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie
GPx	=	Glutathionperoxidase
GSH	=	Glutathion
HPLC	=	High Pressure Liquid Chromatography
HTK – Lösung	=	Histidin-Tryptophan-Ketoglurat-Lösung
LPO	=	Lipidperoxidation
MGD	=	N-Methyl-D-Glucamin DithiocarbamatMPX (Myeloperoxidase)
NAD ⁺	=	Nicotinamidadenosindinukleotid (ox)
NBT	=	Nitrobluetetrazolium
OCl ⁻	=	unterchlorige Säure
PROXYL	=	3-Carboxy-2,2,5,5,-Tetramethylpyrrolidin-N-Oxyl
PUFA	=	polyunsaturated fatty acids (mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
ROS	=	Reactive Oxygen Spezies
SOD	=	Superoxiddismutase
TEMPO	=	4-Hydroxy-2,2,6,6,-Tetramethyl-Piperidin-N-Oxyl
UW – Lösung	=	University of Wisconsin – Lösung
XDH	=	Xanthindehydrogenase
XO	=	Xanthinoxidase

Inhaltsverzeichnis

	Seite
	Abkürzungsverzeichnis
1.	Einleitung
2.	Freie Radikale und reaktive Sauerstoffintermediate (ROI)
2.1.	Quantifizierung von Sauerstoffintermediaten (ROI)
2.2.	AAPH - 2,2'-diazobis(2-amidinopropane)dihydrochlorid
2.3.	Vitamin C
2.4.	CP-H bzw. •CP und DMPO
3.	Material und Methoden
3.1.	Material
3.1.1.	Biochemikalien
3.1.2.	Versuchstiere
3.2.	Methoden
3.2.1.	Zusammensetzung der verwendeten Stammlösung
3.2.2.	Messgeräte und Messmethoden
3.2.3.	Experimenteller Aufbau der Rattennierenperfusion
3.2.4.	Gewinnung des Nierenhomogenates
4.	Ergebnisse
4.1.	Wechselwirkung von Ascorbat mit AAPH-Zerfallsprodukten
4.2.	In-vitro Perfusion der Rattenniere
4.2.1.	Erfassung der Flussrate und des pO ₂ sowie des Perfusionsdruckes
4.2.2.	Ermittlung der AFR-Intensität während der in-vitro Perfusion der Rattenniere
4.2.3.	CP-H als Detektormolekül für oxidierend wirkende Radikale
4.2.4.	Interaktion von •CP mit zellulären Reduktionsmitteln
4.2.5.	Einfluss von Rattennierenhomogenat auf CP-H und •CP
5.	Diskussion

6.	Tabellen und Abbildungen	62
7.	Literaturverzeichnis	67
8.	Anhang	78
8.1.	Eidesstattliche Erklärung	78
8.2.	Danksagung	79
9.	Thesen	80

1. Einleitung

Der Ischämie-Reperfusionsschaden tritt nicht nur als alleinige Konsequenz in der Nierentransplantationsmedizin auf, sondern wir finden ihn auch in vielen anderen klinischen Situationen, zum Beispiel in der organerhaltenden Tumorchirurgie von Nierentumoren, Aneurysmachirurgie beim Abklemmen der Aorta oder im Rahmen einer erfolgreichen Reanimation oder nach hypotonen Phasen, zum Beispiel beim hypovolämischen Schock. Die Schädigung der Niere ist abhängig von dem ischämiebedingten Schaden, welcher durch die anschließende Reperfusion verstärkt wird. In der Transplantationsmedizin fiel auf, dass die Organüberlebensraten nicht verwandter Lebendspender deutlich höher waren als die einer Leichenniere mit Mismatch und sich von Haplotyp-identer verwandten Lebendspender nicht wesentlich unterscheiden. Die bessere Organüberlebensrate von nicht verwandten Lebendspendern zu Leichennieren kann mit genetischen Ursachen nicht erklärt werden, so dass sich die wissenschaftliche Aufmerksamkeit auch auf initiale, nicht immunologisch bedingte Schäden konzentrieren sollte. Alle toxischen Ereignisse für eine Zelle während einer Ischämie und einer anschließenden Reoxygenierung werden unter dem Begriff „Ischämie-Reperfusionsschaden“ subsumiert (Abb.: 1). Der Ischämie-Reperfusionsschaden hat einen deutlichen Einfluss auf die Wertigkeit der zu transplantierenden Organe. Um auf diesen Schaden ebenfalls einen Einfluss, zum Beispiel im Sinne einer medikamentösen Zytoprotektion, nehmen zu können, ist es wichtig, die Abläufe in dem Gewebe in jeder Phase genau zu erforschen.

Reaktive Sauerstoffintermediate (ROS) besitzen ein erhebliches pathogenes Potential. Ihre Beteiligung an der Entstehung von Erkrankungen, wie beispielsweise Arteriosklerose, Arthrosen, Parkinson-Syndrom, Morbus Alzheimer, Krebs, Diabetes mellitus bis hin zu Ischämie-Reperfusionsschäden, Zellapoptosen und Altern wurde in den letzten Jahren in der Literatur diskutiert [51, 85, 89, 95, 120].

Das Sauerstoff-Molekül ist unter anderem gekennzeichnet durch seine zwei ungepaarten Elektronen mit parallelem Spin. Diese verhindern in der Regel Reaktionen, bei denen Elektronenpaare (im Allgemeinen mit entgegengesetztem Spin) übertragen werden. Durch diese Eigenschaft ist das Sauerstoffmolekül relativ reaktionsträge. So genannte Übergangsmetallionen, die leicht von einer Oxidationsstufe zur an-

deren wechseln können, sind jedoch in der Lage, mit Sauerstoff zu reagieren. Bei dieser chemischen Reaktion werden einzelne Elektronen zwischen den beiden Reaktionspartnern übertragen. Auf diese Weise entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Ihr Merkmal ist ein ungepaartes Elektron, welches sie zu einem sehr reaktionsfreudigen Molekül macht. Nimmt nun das Sauerstoff-Molekül ein Elektron auf, entsteht das Superoxid-Radikal, $\bullet\text{O}_2^-$. Dieses ist eine chemisch sehr instabile Verbindung und besitzt ein sehr hohes Reaktionspotential. Es kann im Nanosekundenbereich leicht mit anderen Molekülen eine chemische Reaktion bzw. einen Elektronenaustausch eingehen.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird ebenfalls zu den ROS gezählt, obwohl ihm ein ungepaartes Elektron fehlt. Durch die Aufnahme eines Elektrons entsteht das Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$). Die höchste Reduktionsstufe erreicht das Sauerstoff-Molekül unter anderem in Form von Wasser (H_2O). In dieser chemischen Verbindung ist der Sauerstoff stabil und reaktionsträge [54].

Die ROS sind nur ein kleiner Teil der biologisch bedeutsamen Radikale. So gibt es beispielhaft erwähnt die reaktiven Stickstoffspezies, RNS, wie Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$), und die organischen Radikale, wie Alkylperoxyl-Radikale [53].

2. Freie Radikale und reaktive Sauerstoffintermediate (ROS)

In der Chemie gilt das Vorhandensein von mindestens einem ungepaarten Elektron auf der äußeren Hülle als Wesensmerkmal für Radikale [109, 125]. Der ungünstige energetische Aufbau der Radikale ist der Grund, weshalb sie bestrebt sind, mit anderen Molekülen oder einer anderen Verbindungen zu reagieren. Die Aufnahme oder Abgabe eines Elektrons kann in vielen Fällen zu einer irreversiblen Zerstörung der chemischen Struktur des Reaktionspartners führen. Freie Radikale und reaktive Sauerstoffradikale kommen ubiquitär in der Natur vor [11, 70]. Durch das hohe Reaktionspotential und die daraus folgende Zerstörung des Reaktionspartners werden die freien Radikale für die Entstehung von verschiedenen Krankheiten, zum Beispiel bei der Entstehung von Karzinomen, rheumatoide Arthritis, Autoimmunerkrankungen diskutiert [11]. Die Radikale sind in unserem Organismus wichtiger Bestandteil in vielen Signal-Transduktionsvorgängen [109]. So erfüllen sie eine wichtige Rolle in der Abwehr von Fremdkörpern durch das Immunsystem sowie in dem Zell-Zyklus-Regulation und Apoptose. In der Diskussion ist, ob die freien Radikale eine Rolle in der Zell- und Gewebsdifferenzierung spielen [111, 112, 114]. Ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und antioxidativer Abwehrfähigkeiten ist für einen harmonisch funktionierenden Organismus wichtig und unabdingbar.

Die Familie der ROS wird unter anderem gebildet von den Superoxidradikale (O_2^{\bullet}), Singulett-Sauerstoff (1O_2), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($\bullet OH$), Peroxynitrit ($ONOOH$) sowie eine Reihe organische Radikale (R-Oxyl-Radikal $RO\bullet$, R-Dioxyl-Radikal $ROO\bullet$ und etc.). Diese entstehen hauptsächlich durch Kontakt mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit dem Hydroxylradikal ($\bullet OH$) (vgl. Tab.1, Gl. 1-9) [11].

Die Bildung von ROS ist eine normale Begleiterscheinung jeder aeroben Stoffwechsellätigkeit der Zelle [34, 110]. Die Produktion von Superoxid-Radikalen erfolgt in der Regel im Rahmen des „respiratory burst“ in den neutrophilen und eosinophilen Granulocyten, Monocyten und Makrophagen mit Hilfe der NADPH-Oxidase [54].

Die sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff durch "Ein-Elektronen-Transfer-Reaktionen" führt dabei zur Bildung der ROS (Tab. 1, Gl. 1-3). Wird molekularer Sauerstoff durch insgesamt 4 Elektronen reduziert, entsteht Wasser.

Die Zelle bzw. der Organismus besitzt einige biologisch relevante Quellen, die zur Generierung sowie der Entgiftung von ROS dienen (Abb. 1) [11]. Unter physiologischen Bedingungen sind insbesondere die Mitochondrien eine Hauptquelle von ROS [7, 126].

Die generierten ROS können durch eine Reihe von enzym- sowie nichtenzymvermittelten Reaktionen mehr oder weniger effektiv entgiftet werden. Diverse Superoxid-dismutasen (SOD), Glutathionperoxidase (GPx) sowie Katalase (CAT) bilden die wichtigsten körpereigenen Enzyme, die an der Entgiftung bzw. Generierung der ROS direkt beteiligt sind [51, 87, 11] (Tab. 1, Gl. 13-15).

2.1. Quantifizierung von Sauerstoffintermediaten (ROS)

Die Identifizierung und Quantifizierung von ROS ist wegen ihrer extremen Kurzlebigkeit (im Fall des $\bullet\text{OH}$) liegt die Halbwertszeit unterhalb einer Nanosekunde [10], aufgrund ihrer sehr starken Reaktivität, zumeist nur *in vitro* möglich [11, 70]. Zur Quantifizierung von ROS können verschiedene Techniken/Methoden eingesetzt werden (Tab.2).

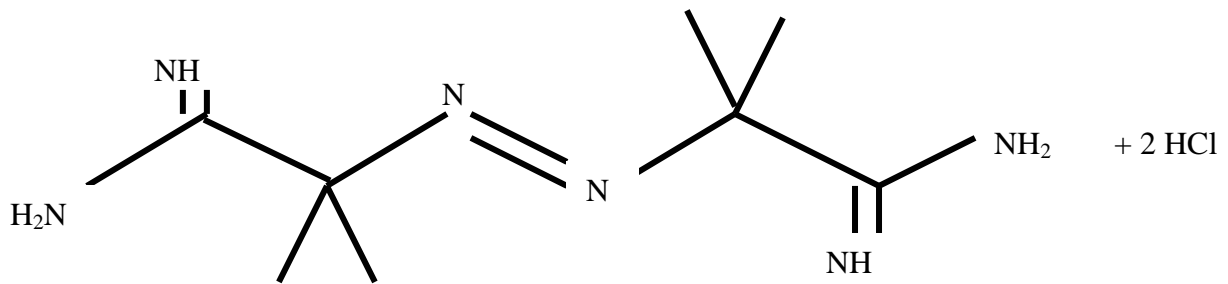
Der Einsatz von Spintraps zur nachfolgenden ESR-Identifizierung der gebildeten Radikaladdukte kann *in vivo* aufgrund der dazu notwendigen hohen Konzentrationen der Radikalfänger und der sich daraus ableitenden Toxizität nicht verwendet werden. Alternativ bietet sich die Bestimmung von so genannten „footprints“ des oxidativen Stresses an [11]. Die Nachweise von Peroxidationsprodukten von Lipiden wie Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxy-2(E)-Nonenal (4-HNE), die Detektion von Hydroxylierungsprodukten endogener Metabolite oder applizierter Pharmaka (vgl. Tab. 2) sowie die Erfassung von Konzentrationsveränderungen zellulärer Antioxidantien (z.B. Glutathion_{red} (GSH), Glutathion_{ox} (GSSG) u.a.) sind Beispiele für die Bestimmung so

genannter Folge- bzw. Endprodukte des oxidativen Stresses [22, 51, 52, 54, 107, 131].

Die Detektion und Quantifizierung dieser mehr oder weniger stabilen Folgeprodukte der Interaktion von ROS mit biologischen Strukturen kann somit als ein indirektes Maß für eine vorangegangene oxidative Schädigung angesehen werden. Hierin liegt auch ein experimentell zugänglicher Ansatzpunkt für die Beurteilung des Erfolges von therapeutischen Maßnahmen, die dem Ziel der Verringerung des oxidativen Stresses dienen. In letzter Zeit finden zunehmend auch so genannte *spin-label* (stabile organische Radikale, wie z.B. Hydroxy-TEMPO bzw. 3-Carboxy-Proxyl) Anwendung, deren paramagnetischen Eigenschaften durch Interaktion mit OH[•]-Radikalen dosisabhängig gelöscht werden und damit indirekt Auskunft über die Belastung eines Gewebes mit ROS geben können [29, 160,121].

2.2 AAPH - 2,2'-diazobis(2-amidinopropane)dihydrochlorid

In dieser Arbeit wurde AAPH (s. Formel 1) als Radikalgenerator genutzt. Durch seine relativ ungefährliche Handhabung sowie ihrer effizienten und gut zu kontrollierenden Radikalbildung nimmt diese Azo-Verbindung eine besondere Stellung ein. Der nahezu konstante thermische Zerfall des AAPH in den ersten Stunden wird mit 3.0 µM/min angegeben [50, 54, 70, 84, 87]. Bei 37° C beträgt die Halbwertszeit von AAPH 175 Stunden. Somit wird in den ersten Stunden eine konstante Menge an Radikalen produziert: $1,36 \cdot 10^{-6}$ M pro M AAPH pro Sekunde [84]. Bei 25° C geht man nach der Reaktions-Geschwindigkeits-Temperatur-Regel bei ca. 10° C geringerer Temperatur von einer halbierten Geschwindigkeit aus [64, 70]. So ergibt sich eine Bildungsrate von ca. $0,68 \cdot 10^{-6}$ M/M_(AAPH)*s. Dies entspricht bei 50 mM AAPH 2,04 µM/min.



Formel 1: AAPH (2,2'-diazobis(2-amidinopropane)dihydrochlorid)

AAPH zerfällt spontan in zwei kohlenstoffzentrierte Alkylradikale, die bei der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff zu zwei sauerstoffzentrierten Alkylperoxyradikalen reagieren (Gl. 1 und 2) [83].



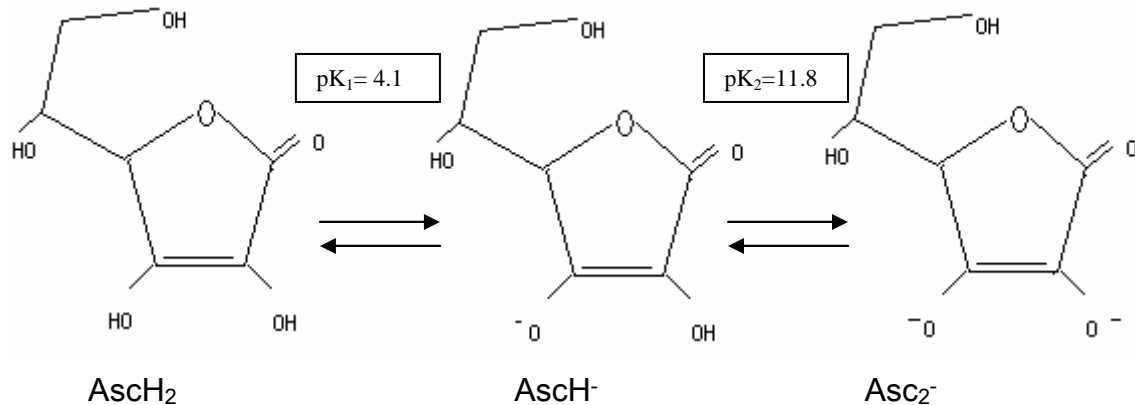
Im Grundsatz sind die bei dem Zerfall des AAPH generierten Radikale, die den der ROS-induzierten Lipidperoxidation entstandenen Radikaltypen ähnlich [70]. Dadurch ist dieser Zerfall Grundlage der Modellreaktion in unserer Arbeit. Das entstandene Radikal ist kurzlebig und lässt sich nur unter Zuhilfenahme so genannter Spintraps, wie z.B. DMPO, als paramagnetisches Addukte, der durch Radikalanlagerung modifizierten Spintraps mittels ESR-Spektroskopie darstellen [20].

2.3. Vitamin C

Eines unseres wichtigsten Vitamins, welches unser Immunsystem unterstützt, aber auch an vielen Vorgängen im menschlichen Körper beteiligt ist, ist das Vitamin C. Ein Mangel kann weitreichende Folgen haben [96]. Im biologischen Milieu ist Ascorbinsäure das stärkste nicht-enzymatische Reduktionsmittel und liegt im Plasma in einer

Konzentration von 0,03 bis 0,14 mM und in den Nierezellen von 0,4 bis 1,21 mM vor [58, 82].

In dieser Arbeit wird Vitamin C als Marker für oxidativen Stress genutzt.



Formel 2: Vitamin C bei unterschiedlichen pH-Werten

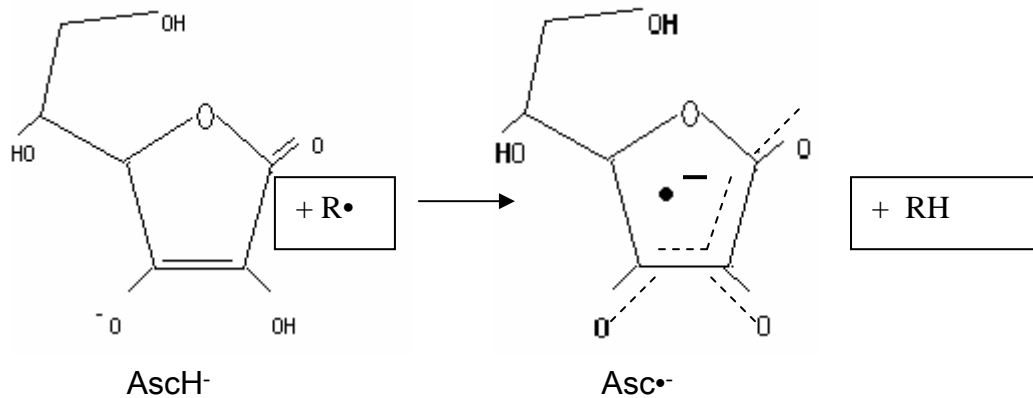
Bei einem pH-Wert von 7,4 liegt 99,95 % des Vitamins C als AsCH⁻ vor (s. Formel 2), so dass der Schwerpunkt unserer Betrachtungen auf AsCH⁻ lag. Aufgrund der Eigenschaft schnell an andere Reaktionspartner ein Proton (H⁺+e⁻ oder H[•]) abzugeben, stellt es ein gutes Antioxidanzmolekül (Gl. 3) dar [12, 13].



Das Standardreduktionspotential (E°) ist in der Radikalchemie ein häufig verwendeter thermodynamischer Parameter, der das Reaktionsverhalten eines Moleküls gut widerspiegelt. E° zeigt die Fähigkeit, eine Verbindung X in eine Verbindung Y zu reduzieren. Das Ascorbat kann aufgrund seines Reduktionspotentials mit $E^{\circ} = 282 \text{ mV}$ (s. Tab. 3) Verbindungen mit einem größeren Potential regenerieren. Unter diesen Verbindungen befinden sich unter anderem Radikale wie HO[•], RO[•], LOO[•] oder GS[•] (s. Tab. 3). Diese reaktiven und damit für Organismen gefährlichen Radikale können durch Ascorbat regeneriert werden [12, 13].

Aufgrund seines Reduktionspotentials ist das Ascorbat bei der Reaktion mit anderen Radikalen ein Protonendonator (s. Tab. 3). Das bei dieser Reaktion entstandene

freie Tricarbonyl-Ascorbat-Radikal (s. Formel 3) ist stabiler als die meisten Radikale und kann somit mit Hilfe der ESR-Spektroskopie gemessen werden [13].



Formel 3: Reaktion von Ascorbat mit einem Radikal zu einem Ascorbat-Radikal

Die Oxidation von Vitamin C erfolgt in wässriger Lösung auf verschiedene Weise. Sie findet in 2 Schritten statt und ist abhängig vom pH-Wert. So kann sie spontan, durch Metallionen, enzymatisch oder durch den Einfluss von anderen Radikalen erfolgen [70]. Der prinzipielle Weg des Zerfalls des $\text{Asc}\cdot^-$ *in vitro* ist die Form der Dismutation [6, 13, 59, 128]. Die Oxidation des Ascorbat mit der Bildung des AFR und der 2. Schritt mit der Bildung des DHA sind reversibel.

Die Regeneration wird durch die irreversible Hydrolyse von DHA blockiert. So entsteht aus dem DHA im ersten Schritt 2,3-Diketogluonsäure und im weiteren Zerfall eine potentiell toxische Substanz - die Oxalsäure. Der Zerfall des DHA ist sehr schnell und hat eine ungefähre Halbwertszeit von ca. 8 min bei einer Temperatur von 37° C [127, 128]. Durch hohe pH-Werte wird der irreversible Zerfall des DHA begünstigt [6].

Durch die Anwesenheit von Sauerstoff kann es zur Autoxidation von Ascorbat kommen. Ascorbat autoxidiert unter Verbrauch von Sauerstoff über das Ascorbatradikal zum Dehydroascorbat (s. Gl 4-6). Das gebildete $\cdot\text{O}_2^-$ kann wiederum durch Ascorbat zu H_2O_2 reduziert werden (s. Gl. 7-8).





Das Ascorbatradikal kann mit der ESR-Spektroskopie gemessen werden, da jedes Radikal anhand seiner Hyperfeinstruktur, ESR-Spektrums und des g-Wertes erfasst wird. Die Hyperfeinstruktur ist die Zahl der Linien im ESR-Spektrum. Das Ascorbatradikal besitzt eine schmale Doppelstruktur (Abb. 3-4 im Kap. Ergebnisse). Die in der Literatur angegebenen Paarkonstante a^H schwankt zwischen $a^H = 1,8 \text{ G}$ [12, 13] und $a^H = 1,65 \text{ G}$ [31].

2.4. CP-H bzw. $\bullet\text{CP}$ und DMPO

Radikale, die zu den ROS zählen, sind sehr kurzlebig und können nicht direkt mit der ESR gemessen werden. Um dies zu tun, nutzt man verschiedene Marker, z.B. „spin traps“. Die Spintraps (z.B. 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid {DMPO}, oder auch 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-pyrrolin-1-oxyl {CP-H}) sind diamagnetisch und besitzen nur vollständig gepaarte Elektronen. Sie werden daher mit der ESR nicht erfasst. Durch die Reaktion mit einem Radikal erhalten sie ein Elektron und werden, da sie selbst zum stabileren Radikal reagieren, paramagnetisch und somit für die ESR messbar [53].

Die Eisen-III-Ionen sind wichtige Oxidationsmittel in der Zelle und im Blutplasma. Um die Brauchbarkeit von CP-H als Marker für Radikale *in vitro* zu prüfen, wurde die Oxidation (Fenton-Reaktion) von CP-H durch Eisen(III)Chlorid mit einer Konzentration, etwa der im Cytosol vorhandenen Menge, gemessen [71, 52].

Die Stabilität von •CP ist von entscheidender Bedeutung, da bei einer Löschung von •CP durch Reduktionsmittel der Umsatz von CP-H und damit die zu messende Radikalproduktion unterschätzt würde.

In den Experimenten mit •CP wurden 0,1 mM, 0,3 mM, 0,6 mM oder 1 mM Ascorbinsäure durchgeführt. Der Nachweis der Reduktion als Grund für die Abnahme des ESR-Signals wurde nach der Reaktion mit Ascorbinsäure •CP mit der Zugabe des Oxidationsmittels Kaliumhexacyanoferrat ($K_3(Fe(CN)_6)$) erbracht.

Ein weiteres wichtiges Reduktionsmittel in unseren Zellen ist das GSH. Die Plasmakonzentration beträgt 1 bis 3 μM [102], die in den Nierenzellen rund 2,7 μM [50, 82]. Die Eisen-II-Ionen sind ein Reduktionsmittel und besitzen die Potenz, das •CP-Signal zu löschen. Im Plasma liegen sie in einer Konzentration von 1 μM vor [52]. Das Perfusionsmedium wurde in Vorbereitung auf die *in vivo* Experimente auf die reduktive Kapazität gegenüber •CP überprüft. Die •CP können auch noch oxidiert werden, wenn sich ein stärkeres Oxidationsmittel (z.B. andere Radikale) in dem Versuchsansatz befindet. Hierzu wurde der Einfluss mit Hilfe von Fenton-generierte Hydroxylradikale überprüft. Die Konzentrationen der Eisen-II-Ionen lagen bei 0,1 mM, 0,5 mM und 0,5 mM, welche deutlich höher waren als die Zellkonzentration. So konnte die Stabilität von •CP unter extremen Bedingungen, wie dem oxidativen Stress, getestet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Biochemikalien

Für die Erstellung der Lösungen und der Ansätze wurden eine Reihe verschiedener Chemikalien verwendet.

Chemikalienliste

- 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid [DMPO] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- •CP [C₉H₁₇NO₃] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Ascorbinsäure [C₆H₈O₆] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Diethyldithiocarbaminsäure [DETC, C₅H₁₀NS₂Na] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Eisen(II)Sulfat [FeSO₄·7H₂O] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Eisen(III)Chlorid [FeCl₃·6H₂O] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Glutathion [C₁₀H₁₇N₃O₆S] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Kaliumhexocyanoferrat [K₃Fe(CN)₆] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Wasserstoffperoxid [H₂O₂, 30gew.-%ige Lösung in H₂O] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- 2,2'-Azo-bis-2-Amidinopropan Hydrochlorid [C₈H₁₈N₆·2HCl; AAPH] (Polysciences, Warrington, USA)
- CP-H [C₉H₁₈NO₃] (Prof. Kirilyuk, Institut für Organische Chemie, Novosibirsk, Russland)
- Phosphate buffered saline [PBS] (FLUKA Chemika/Biochemika Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)
- Desferroxaminmesilat [DFA, C₂₉H₄₈N₆O₈·CH₃SO₃H] (Novartis, Nürnberg, Deutschland)

- Ebrantil® i.v. 25 mg Ampullen (Altana Pharma Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland)
- Trinitrosan® 50mg Ampullen (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- Rompun 2% Ampullen, (Fa. Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)
- Ketavet 100 mg/ml (Fa. Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland)
- Urethan (Ethylurethan) (Chemisches Laboratorium Dr. Vorbrodt , Orgentis Chemicals GmbH, Gatersleben, Deutschland)
- Heparin Ampullen (Liquemin®) (Roche AG, Grenzach, Deutschland)
- Custodiol [HTK-Lösung nach Bretschneider: NaCl (15 mmol/l), KCl (9 mmol/l), MgCl₂ ·6H₂O (4 mmol/l), Histidinhydrochlorid-Monohydrat (18 mmol/l), Histidin (180 mmol/l), Tryptophan (2 mmol/l)), Mannitol (30 mmol/l), CaCl₂ ·2H₂O (0,015 mmol/l), Kalium-hydrogen-2-oxopentandioat (1 mmol/l)] (Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland)
- Human-Albumin [20gew.% humane Plasmaproteine, mindestens 96% Albumin + Wasser für Injektionszwecke, weitere Bestandteile: Racemisches Acetyltryptophan (16mmol/l), Natriumcaprylat (16 mmol/l), Natrium-Ionen (145 mmol/l), Kalium-Ionen (max. 10mmol/l)] (Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)
- Glucose 40% Pfrimmer Infusionslösung [40 gew. % wasserfreie Glucose + Wasser für Injektionszwecke] (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland)
- Gelatinepolysuccinat Infusionslösung [4 gew. % Gelatinepolysuccinat + Wasser für Injektionszwecke] (Braun Ag, Melsungen, Deutschland)
- Isotone Kochsalzlösung [0,9 gew. % NaCl + Wasser für Injektionszwecke] (Braun, Melsungen, Deutschland)
- Vierfachpuffer [0,25M Saccharose (C₁₂H₂₂O₁₁), 25 mM KCl und 50 mM TRIS (C₄H₁₁NO₃) pH 7,4] (Merck, Darmstadt, Deutschland) und [0,5 mM EDTA ((HOOCCH₂)₂NCH₂)₂)] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)

3.1.2. Versuchstiere

Für die Versuche sind männliche Wistar-Ratten in einem Alter von ca. 12 Wochen und einem Körpergewicht von 200-250 Gramm verwendet worden. Die Aufzucht, Unterbringung und Fütterung erfolgte im Tierstall des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entsprechend den Richtlinien der Versuchstierhaltung (Amtsblatt der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 4.Jg., Nr.1 vom 10.Mai 1994). Durch die Mitarbeiter des Tierstalls der Martin-Luther-Universität wurden die einzelnen Tiere randomisiert ausgewählt. Jeweils einen Tag vor dem Versuch sind die Tiere im Labor untergebracht gewesen. Dies gab den Tieren Zeit für eine Akklimatisation. So konnten Störfaktoren ausgeschlossen werden, die durch den Stress während des Transports entstanden. 12 Stunden vor der Operation erhielten die Tiere keine Nahrung mehr, hatten aber freien Zugang zu Wasser. Damit keine Gefahr der Azidose bestand, wurde von einer längeren Fastenzeit abgesehen. Die Entnahme der linken Niere erfolgte standardisiert und entsprechend der Rechtsgrundlage des Tierschutzgesetzes § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4.

3.2. Methoden

3.2.1. Zusammensetzung der verwendeten Stammlösungen

Für die Erstellung der Perfusionslösung wurden

- 50ml Custodiol® , HTK – Lösung nach Bretschneider
- 50ml Gelafundin 4 %
- 10ml Human Albumin 20 %
- 10ml Glucose 40 %
- 5ml Ebrantil® (25 mg)
- 3ml Trinitrosan (15 mg)

verwendet. Nach dem Vermischen der Lösung erfolgte die Erwärmung der Perfusionslösung im Thermostat auf 37° C und die Anreicherung mit Sauerstoff. Für die ex-

perimentellen Untersuchungen mit Ascorbat erfolgte unmittelbar vor der Perfusion die Zugabe von 128 µl Vitamin C Lösung mit 100 mM Stammkonzentration. Durch das Vermischen der Lösung kann eine homogene Konzentration des Vitamin C garantiert werden.

Phosphat gepuffte Kochsalzlösung (PBS)

Eine 10× Stammlösung PBS besteht aus 80,0 g NaCl, 2,0 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄, 2,4 g KH₂PO₄, und ad 1000 ml mit Aq. dest., pH 7.4 mit HCl [45]. Eine Tablette des PBS wird auf 200 ml Wasser aufgelöst, um eine 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 10 mM Phosphatpufferlösung bei einem pH 7.4 und bei 25°C zu erreichen.

CP-H Stammlösung

Zum Lösen der aufgeführten Salze und zum Herstellen der Verdünnungen wurde jeweils pyrogenfreies, bidestilliertes Wasser benutzt. Zur Einwaage verwendeten wir die Analysewaage Typ „870/13“ von Kern, Albstadt-Ebingen, Deutschland. Die Herstellung der Stammlösungen erfolgte täglich frisch. Das •CP wurde in einer 1 mM Stammlösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert und konnte über mehrere Tage genutzt werden.

Soweit nicht explizit anders beschrieben, wurde CP-H in dem Perfusionsmedium mit folgendem Ansatz hergestellt: 5 Volumenteile Custodiol, 5 Volumenteile Gelatinepolysuccinat Infusionslösung und 1 Volumenteil Glucose 40 % Pfrimmer Infusionslösung. Diese Lösung wurde bei einer Raumtemperatur von ca. 20°C über Nacht mit 5 µMf DETC und 20 µMf DFA als Kupfer bzw. Eisen-Chelator inkubiert und anschließend kühl gelagert. Vor der Lösung von CP-H wurde das so gewonnene Medium 20 Minuten mit Stickstoff durchblasen um den Sauerstoff zu verdrängen. Um den Sauerstoffgehalt und damit die Autoxidation von CP-H zu •CP gering zu halten, wurde für die *in vitro* Versuche stets unter Luftabschluss oder, wenn dies nicht möglich war, unter N₂-Begasung gemessen. Bei den *in vivo* Experimenten erfolgte die Lösung analog, die Messungen jedoch mit Sauerstoff. Die CP-H Lösung wurde täglich frisch hergestellt.

3.2.2. Messgeräte und Messmethoden

ESR-Spektroskopie

Die ESR-Messungen erfolgten mit einem Minoscope MS 100 der Firma Magnettech GmbH, Berlin. Als Messröhrchen wurden Mikropipetten (50 µl) Blaubrand intra Mark, der Firma Brand GmbH & CoKG, Wertheim verwendet. Die Röhrchen wurden nach der Befüllung mit einer Knetmasse verschlossen. Das ESR-Spektrometer wurde durch das Programm ESR-Commander (Version 3.0) der Firma Magnettech gesteuert. Diese Methode erkennt nur das ungepaarte Elektron der Radikale und kann somit als spezifische und direkte Nachweismethode für Radikale verwendet werden. Voraussetzung ist allerdings das Vorliegen entsprechend langlebiger Radikale in ausreichender Konzentration (s. Kap.2). Kurzlebige Radikale können durch Adduktbildung mit einem so genannten Spintrap abgefangen werden. Das resultierende Radikal ist für die ESR- Spektroskopie ausreichend langlebig. Es wurden die Ansätze zur Erfassung von AFR, Alkyl-DMPO-Addukt, Alkylperoxyl-DMPO-Addukt sowie •CP untersucht.

Alle Proben (Totalvolumen 100 µl) wurden unmittelbar vor der Messung angesetzt. Die Proberöhrchen wurden mit 50 µl Proben befüllt und vermessen. Geräteeinstellungen für die oben beschriebenen Radikale (siehe nachfolgende Tabelle)

	Ascorbat- radikal	•CP- Radikal	Trapversuche mit DMPO
Feldmitte (G)	3368	3368	3368
Scanbereich (G)	10	100	100
Zeit pro Scan (s)	60	60	60
Anzahl der Scans	8	1	1
Modulationsamplitude (mG)	650	1000	1000
Leistungsdämpfung (dB)	6	6	6
Verstärkerstufe	50	50	50
Signalphase	180	180	180
Temperatur (°C)	25	25	25

UV-Spektroskopie

Die Erfassung der Ascorbat- bzw. der DMPO-Spektren erfolgte zwischen 200 nm und 400 nm mittels eines DU 640 Spektrophotometers der Firma Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA. Es wurden Quarzglas-Küvetten mit einem Totalvolumen von 1,0 ml der Firma Hellma GmbH, Müllheim eingesetzt. Die Temperierung auf 25° C bzw. 37°C ± 0,1°C erfolgte mit Hilfe einer Temperatur Kontrolleinheit der Firma Beckman Coulter.

Ansätze zur Erfassung der Ascorbat- bzw. DMPO-Spektren:

990 µl Reinstwasser + 10 µl Ascorbat (10 mM)

990 µl Reinstwasser + 10 µl DMPO (10 mM)

Die Erfassung der Autoxidation von Ascorbat ± AAPH ist bei einer Messwellenlänge von 266 nm über 30 min wie folgt durchgeführt worden:

990 µl PBS (10 mM; pH 7,4) + 10 µl Ascorbat (10 mM) bzw.

450 µl PBS (10 mM; pH 7,4) + 500 µl AAPH (50 mM) + 10 µl Ascorbat (10 mM).

Die Umrechnung der ermittelten Extinktionsdifferenzen in die entsprechenden Ascorbatkonzentrationen erfolgte unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten für Ascorbat $14,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Oxygraph

Der Verbrauch von Sauerstoff während der Autoxidation von Alkylradikalen ± Ascorbat wurde mit Hilfe eines so genannten Advanced High-Resolution Respirometers der Firma Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Österreich bei 37 °C ermittelt. Die Erfassung der Daten erfolgte mit dem Programm DatLab 2.1 der Firma Oroboros. Die polarographische Messkammer enthielt entweder 1783 µl PBS (10 mM; pH 7,4) + 17 µl Ascorbat (10 mM) oder 883 µl PBS (10 mM; pH 7,4) + 900 µl AAPH (100 mM) + 17 µl Ascorbat (10 mM). Ein weiterer Messansatz enthielt 900 µl PBS (10 mM; pH 7,4) + 900 µl AAPH (100 – 600 mM).

3.2.3. Experimenteller Aufbau der Rattennierenperfusion

Operationstechnik

Die Anästhesie der Ratten erfolgte durch intraperitoneale Gabe von 0,15 g / 100 g Körpergewicht Urethan (Ethylurethan, Chemisches Laboratorium Dr. Vorbrodt). Weiterhin erhielten die Ratten 60 min vor Operationsbeginn 1000 U Heparin (Liquemin[®], Roche) sub cutan. In Narkose wird die Ratte auf dem Operationstisch in Rückenlage gelagert (Bild 1A). Es erfolgte die mediane Laparatomie, der Darm wird abpräpariert und die linke Niere dargestellt (Bild 1B).

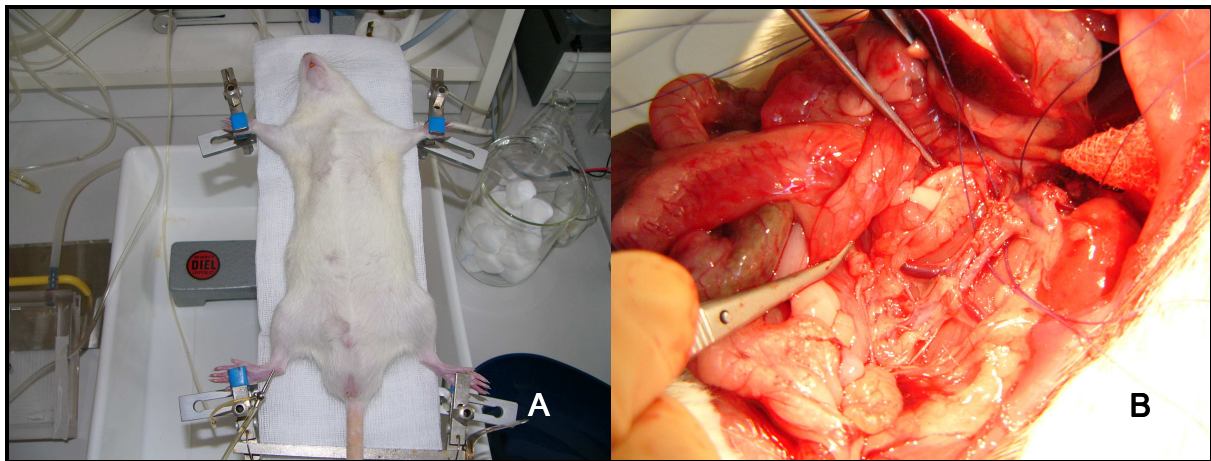


Bild 1: A Ratte auf dem Operationstisch in Rückenlage fixiert.

B Darstellung der freipräparierten Gefäße, mit bereits gelegten Ligaturen.

Die Gefäße zur Nebenniere wurden mit 5-0 Fäden (5-0 VICRYL[®], Firma ETHICON) ligiert. Freipräparation der abdominalen Aorta und die A. superior des Abganges der A. renalis wird mit 4-0 Fäden (4-0 VICRYL[®], Firma ETHICON) angeschlungen. Die weiteren Gefäße (A. + V. testicularis, A. + V. iliolumbalis) wurden mit 4-0 Fäden unterbunden. Nach der distalen Freipräparation der A. renalis wurde die Aorta und die Vena cava von einander getrennt. Mit einem 4-0 Faden erfolgte die Anschlingung der Aorta, um später die Einbindung der Kanüle zu erleichtern. Die Aorta wird durch den oberen Faden unterbunden und distal des A. renalis kanuliert.

Mit der Ligatur der Aorta beginnt die Ischämiezeit. Nach Mobilisierung der Aorta zwischen der proximalen Ligatur und der distalen Kanüle, der A. renalis, V. renalis sowie der Vena cava, erfolgte die Durchtrennung der Aorta oberhalb der Ligatur und unter-

halb der Kanüle und auf entsprechender Höhe auch der V. cava, so dass die Niere mit den entsprechenden Gefäßen einschließlich der Kanüle aus dem Situs entnommen werden konnte. Eine speziell für die Perfusion der Rattenniere gefertigte Schale (Bild 2) dient zur Halterung und Lagerung der Rattenniere. Durch die Eröffnung der Aorta und der V. cava wurden die Ratten getötet.

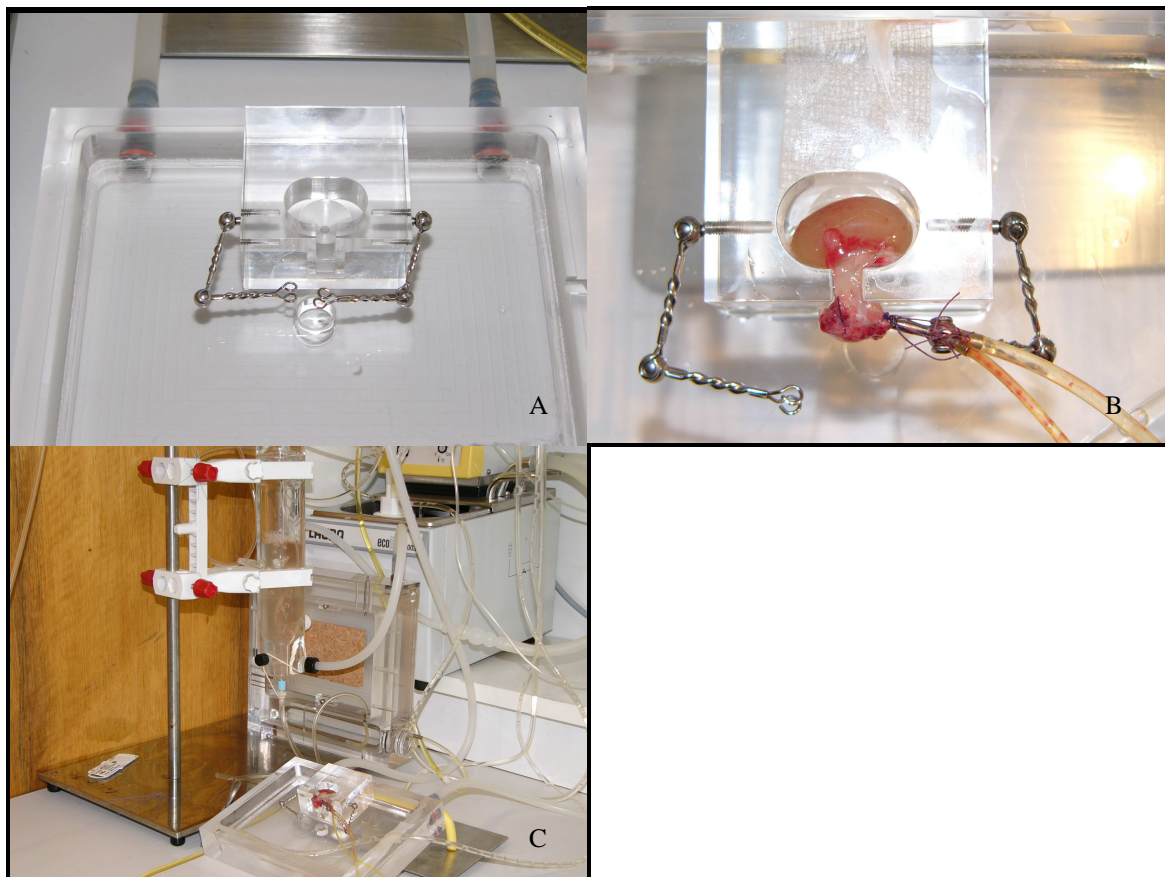


Bild 2: **A** Spezialhalterung für die Rattenniere; Halterungen für die Kanüle besitzen ein doppeltes Kugelgelenk, um eine möglichst ideale Lager der Kanüle zu erhalten.
B Entnommene Rattenniere in der Halterung mit Kanüle; Zustand vor Perfusion.
C Darstellung der entnommenen Niere mit Teilen des Perfusionsystems.

Nach einer 20minütigen Ischämiephase begann die Reperfusion mit einem konstanten Druck von 100 mmHg. Die Entnahme der Perfusatproben erfolgte nach einem genauen Zeitschema und an einer speziell gekennzeichneten Entnahmestelle. So konnten Variationen und Unregelmäßigkeiten in dieser Phase limitiert werden. Die entnommene Probenaliquote (100 µl) wurde in Eppendorf-Röhrchen bis zur Messung in Eis gekühlt aufbewahrt.

Das Perfusionssystem

Das Perfusionssystem (Bild 3) besteht aus folgenden elektronischen Teilgeräten (Firma Hugo Sachs Elektronik, Havard Appartus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland):

- ISOTEC Druckaufnehmer
- Feuchtkammer
- Ecoline Einhängethermostat E 100 (Bad- / und Umwälzthermostat)
- Durchfluß-Chemosensor pO₂ ZABA – DSK – Nr.1
- REGLO – Analogue (4 Kanal, 8 Rollenpumpe, PC gesteuert)

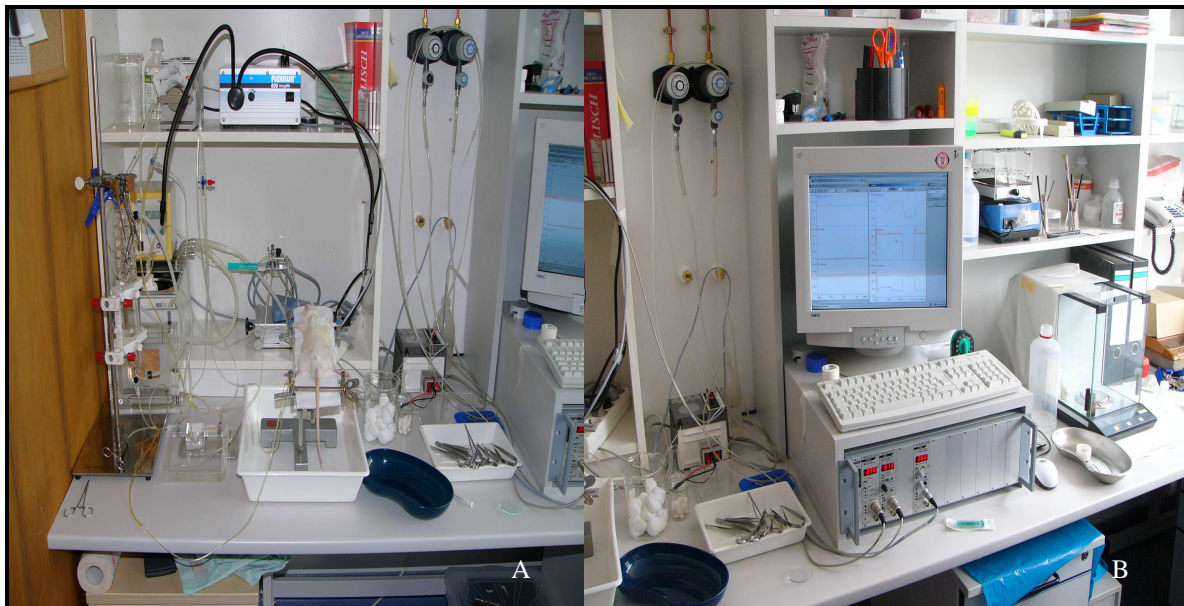


Bild 3: Perfusionssystem (A und B) im Überblick; weiterhin in A die Kaltlichtquelle (FLEXILUX 600 longlife)

Das System besteht aus zwei von einander unabhängigen Kreisläufen: das rezirkulierende Perfusionssystem und das Wärmeregulierungssystem. Die Regulation der Temperatureinstellung und Konstanterhaltung des Perfusionsmediums während der Perfusion ist die Aufgabe des Wärmeregulierungssystems. Beide Systeme laufen über getrennte Schlauch- und Pumpenkreisläufe.

Perfusionsparameter

Für die Experimente kam ein druckkonstantes Perfusionsmodell (100 mmHg) zur Anwendung. Der Druck wurde indirekt über die Flussgeschwindigkeit des Perfusionsmediums reguliert. Das Perfusionsvolumen beträgt zu Beginn des Versuches 128 ml und wird auf 37° C temperiert. Während der Perfusion erfolgt die permanente Begasung des Mediums mit Sauerstoff. Vitamin C (1 mM) wird unmittelbar vor Beginn der Perfusion dem Perfusionsmedium zugegeben. So kann eine homogene Verteilung des Vitamins C im gesamten Perfusionsmedium gewährleistet werden. Eine optimale Sauerstoffsättigung des Perfusionsvolumens wird durch Oberflächenvergrößerung im Oxygenator (Bild 4) erreicht. Die Verwendung von Tygon-Schlauchmaterial verhindert einen Gasaustausch mit der umgebenden Raumluft. Der Transport des Perfusionsmediums erfolgt über eine Rollenpumpe. Eine zweite Rollenpumpe wird für die Messung des Sauerstoffgehaltes des Perfusionsmediums verwendet, die mit einem konstanten Fluss (1 ml/min) das oxygenierte Perfusionsmedium zum Sensor transportiert. Nach der Messung wird das Medium wieder in das Sammelgefäß im Wasserbad geleitet und dem Kreislauf zugeführt. Der Hauptteil des Mediums perfundiert die Niere. Das Perfusionssystem ist direkt mit einem Drucksensor (Bild 4) gekoppelt, der in Abhängigkeit des Druckes in der Niere die Flussgeschwindigkeit reguliert.

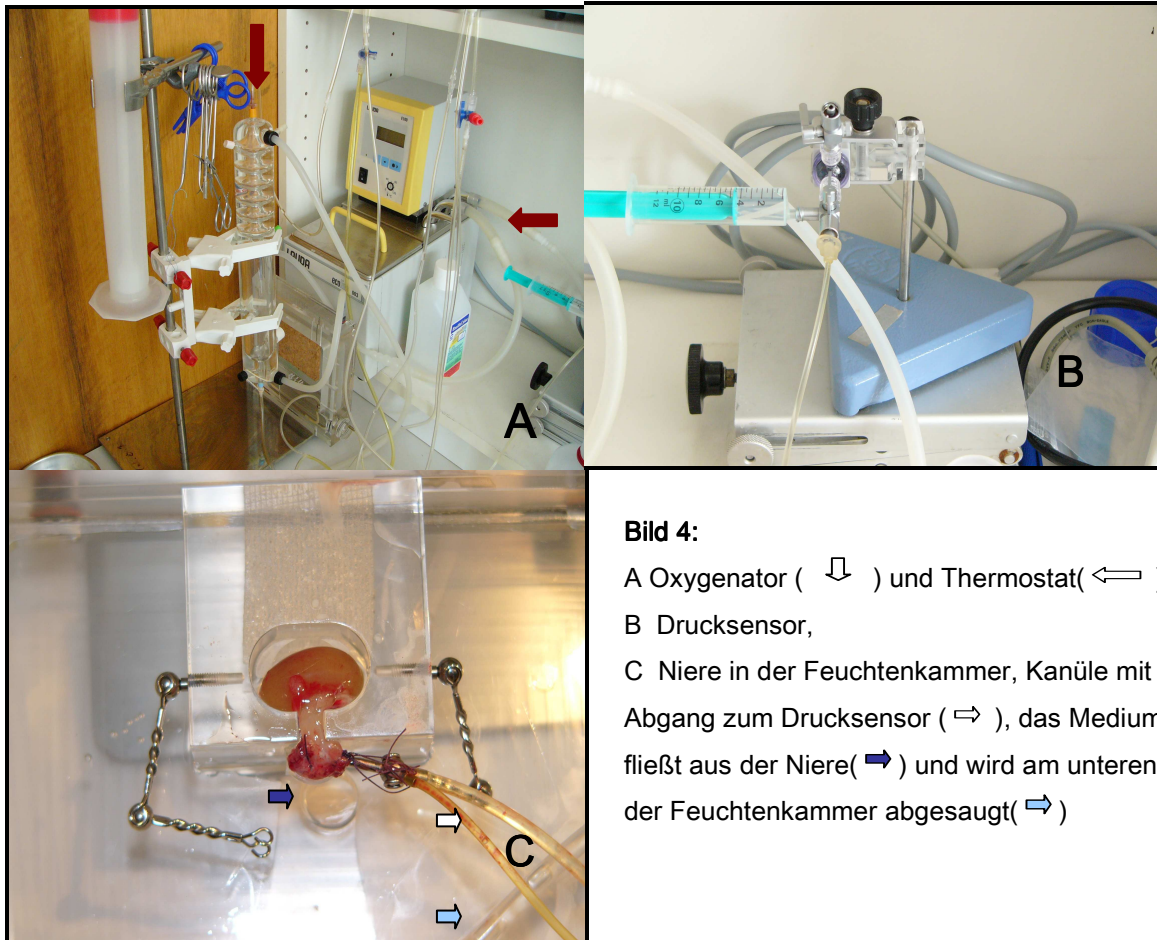


Bild 4:

A Oxygenator (\downarrow) und Thermostat(\leftarrow)

B Drucksensor,

C Niere in der Feuchtenkammer, Kanüle mit Abgang zum Drucksensor (\Rightarrow), das Medium fließt aus der Niere(\rightarrow) und wird am unteren Pol der Feuchtenkammer abgesaugt(\Rightarrow)

Nach der Perfusion der Niere wird das Medium aus der Feuchtkammer (Bild 4), in der sich die Niere während der Perfusion befindet, abgesaugt und dem Perfusions-system wieder zugeführt.

Wärmeregelungssystem

Der Einhängethermostat mit Umwälzpumpe erwärmt das Wasser im Gefäßbecken, in welchem sich auch das Sammelgefäß des Perfusionssystems befindet. Der Oxygenator und die Feuchtkammer werden mit konstant 37° C warmem Wasser kontinuierlich umspült.

Das Perfusionsmedium

Das Perfusionsmedium wurde speziell für die Rattenniere in Anlehnung der handelsüblichen Perfusionslösung, die bei der Nierenentnahme von der DSO verwendet wird, zugeschnitten. Eine Ödemarisierung des Organs oder eine starke Vasokonstriktion durfte das Medium nicht hervorrufen. Weiterhin sollte es keinen bzw. vernach-

lässigbaren Einfluss auf die zu detektierenden Signale (z.B. Ascorbatradikal) haben. Eine Stabilität des physiologischen pH-Wertes musste unter Begasung gesichert werden. Die Lösung sollte nur einen geringen Eisenanteil besitzen.

Die Histidin-Tryptophan-Ketoglurat-Lösung (HTK) wurde durch die Zugabe von Gelafundin, Glucoselösung (G40) und Albumin (HSA) modifiziert. Die Zugabe von HSA und Gelafundin verhinderte die Ödematisierung des Organs während der Perfusion. Durch Trinitrosan und Ebrantil konnte einer Vasokonstriktion vorgebeugt und so bei einem konstanten Perfusionsdruck von 100 mmHg bei einem Perfusionsfluss von ca. 20 ml/min über die Zeit der Perfusion erreicht werden.

3.2.4. Gewinnung des Nierenhomogenates

Für die Experimente mit •CP erfolgte die Entnahme der Rattenniere (ohne Naht) nach Darstellung der A. und V. renalis. Ab diesem Zeitpunkt begann die Ischämiezeit. Die Niere lag bei 37°C in einer verschlossenen Tube für 20 Minuten in isotoner Natriumchloridlösung. Zur Erstellung des Homogenates wurde die Niere nach Ablauf der Ischämiezeit grob mit der Schere zerkleinert und unter Zugabe von 8 ml Vierfachpuffer pro g Feuchtgewebe von Hand (10 kreisenden Schüben) homogenisiert. Da der Vierfachpuffer sauerstoffgesättigt war, begann die Reperfusion. Mit Hilfe einer Microfuge R Centrifuge von Beckmann Instruments (Palo Alto, USA) wurde bei 4°C und 600 G das Homogenat für 10 min anschließend zentrifugiert. Die Deceleration erfolgte auf Stufe 4 (entspricht 10 min und 16s Bremszeit) und die Acceleration maximal schnell (Stufe 9 entspricht 19 Sekunden Beschleunigungszeit), um ein Aufwirbeln zu verhindern. So konnte der Kern von dem übrigen Homogenat getrennt werden [72]. Dieses Verfahren stellt sicher, dass die Mitochondrien und andere Zellorganellen intakt blieben. Der Überstand wurde für die Messungen verwendet.

Dieses Vorgehen ermöglichte erste Messungen mit der ESR nach 15 Minuten nach der Reperfusion.

Messungen mit CP-H

In standardisierten zeitlichen Abständen wurde dem Homogenat 1 mM CP-H oder 90 μ M \bullet CP zugegeben. Danach erfolgte die Messung und Beobachtung des \bullet CP-Signals für 60 Minuten.

Um die Eignung von CP-H als Marker für oxidativen Stress *in vivo* nachzuweisen, wurde CP-H vor der Homogenisierung der Niere dem Versuchsansatz hinzugegeben. Danach erfolgt wie oben beschrieben nach der Aufbereitung des Homogenats die Messung des \bullet CP-Signals.

Als Negativ-Probe diente die Begasung des Vierfachpuffers für das Homogenat mit Stickstoff, um zu überprüfen, ob die Oxidation von \bullet CP nur auf die Entstehung von Radikalen zurückzuführen ist.

Messungen mit \bullet CP

Im Homogenat ist eine Reihe von biologischen Reduktionsmitteln (z.B. Proteine, Enzymkomplexe, Ascorbinsäure) enthalten. Um die gesamte reduktive Kapazität des nativen Homogenats für das \bullet CP zu bestimmen, wurde die Ischämiezeit auf wenige Sekunden beschränkt und so die Entstehung von Radikalen aufgrund des oxidativen Stresses reduziert bzw. vermieden. Nach der Aufbereitung des Homogenats wurde \bullet CP unmittelbar vor der Messung hinzugegeben.

Für das Abschätzen der Zusammensetzung der reduktiven Verbindungen des Homogenates erfolgte die Denaturierung für 60 Minuten bei 80° C. Zusätzlich wurden Ascorbinsäure und Ferritin zerstört, so dass Eisen-Ionen frei werden. Durch die anschließende Zentrifugation mit einer Qualitron Mini-Centrifuge DW-41 (Qualitron Incorporation, Hooland, USA) bei 7000 rpm für 2 Minuten waren nur noch freie Ionen von denaturierten Verbindungen im freien Überstand.

Um alle Membranen, wie auch der Mitochondrien und auch zusätzlich höhermolekularen Verbindungen zu zerstören, ist das Homogenat für 24 Stunden bei -21° C inkubiert worden. Erst nach dem Wiederauftauen wurde \bullet CP zugesetzt und gemessen. Weiterhin wurde der mit der ersten Zentrifugation gewonnene Überstand eines nativen Homogenats noch einmal mit der Microfuge R Centrifuge (Beckmann Instruments, Palo Alto, USA) bei 4°C und 10 000 G für 10 min zentrifugiert. So kann man

die neben den schon vorher entfernten Zellkernen, die Plasmamembran, die Kernmembran, Mitochondrien, Lysosomen und Peroxisomen entfernen [78]. Der Überstand entspricht nun im Wesentlichen dem Cytosol. Diesem wurde •CP zugegeben und gemessen.

4. Ergebnisse

4.1. Wechselwirkung von Ascorbat mit AAPH-Zerfallsprodukten

Beim thermischen Zerfall der wasserlöslichen Azo-Verbindung AAPH entstehen zunächst zwei kohlenstoffzentrierte Alkylradikale, die in Gegenwart von Sauerstoff in zwei sauerstoffzentrierte Alkylperoxyradikale umgewandelt werden [12, 13, 83]. Alkyl- und Alkylperoxyradikale entstehen u. a. bei der Lipidperoxidation (LPO). Der AAPH-Zerfall, der ein der LPO vergleichbares Radikalspektrum liefert, wird hier als Modellreaktion verwendet, mit deren Hilfe die Wechselwirkungen von Ascorbat mit $\bullet R$ bzw. $ROO\bullet$ untersucht werden soll.

Das primär beim Zerfall entstehende Alkylradikal (darstellbar nur in Abwesenheit von Sauerstoff) besitzt als DMPO-Addukt ein spezifisches Sechslinienspektrum (Abb. 3). Unter aeroben Bedingungen wandelt sich das Alkylradikal ($\bullet R$) in das Alkylperoxyradikal ($ROO\bullet$) um, das in Gegenwart der Spintrap DMPO ein paramagnetisches Addukt mit dieser bildet. Das entsprechende ESR-Signal dieses Addukts ist in Abbildung 4 dargestellt.

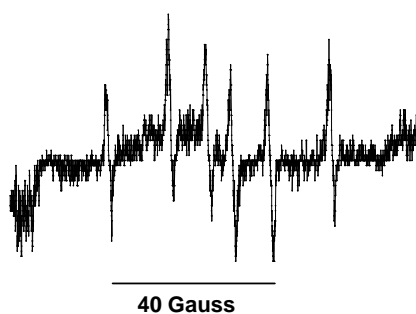


Abb 3: Alkyl-DMPO-Addukt

Anaerober Ansatz: 250 μ l HTK + 225 μ l AAPH (100 mM) +25 μ l DMPO (1 M).

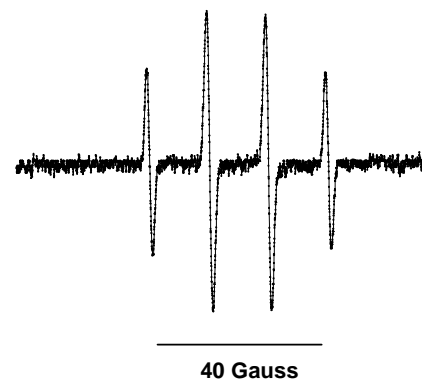


Abb.4: Alkylperoxy-DMPO-Addukt

Aerober Ansatz: 250 μ l HTK + 225 μ l AAPH (100 mM) +25 μ l DMPO (1 M).

Unter aeroben Bedingungen akkumuliert das durch den AAPH-Zerfall mit konstanter Geschwindigkeit das bildende ROO• mit der Spintrap DMPO zu einem mittels ESR-Spektroskopie nachweisbaren Addukt. Entsprechend der temperatur-abhängigen linearen Zerfallsrate des AAPH kommt es zu einem linearen Anstieg des ESR-Signals (Abb. 5).

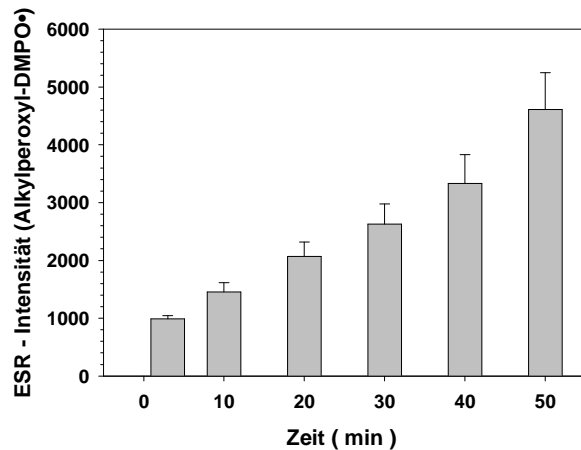


Abb 5: **Akkumulation des Alkylperoxy-DMPO-Addukts**

Aerober Ansatz: 450 µl H₂O + 500 µl AAPH (100 mM) + 50 µl DMPO (1 M). Ansatz wurde bei 37°C und kontinuierlicher O₂-Zufuhr inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 50 µl entnommen und die Intensität des ESR-Signals gemessen.

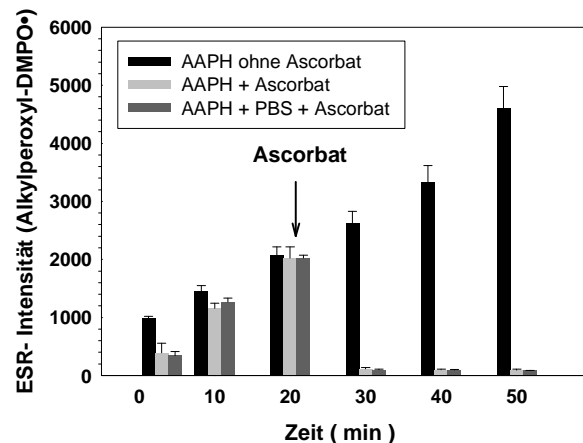


Abb. 6: **Löschung des Alkylperoxy-DMPO-Addukts durch Ascorbat**

Aerober Ansatz: 235 µl H₂O bzw. Phosphatpuffer (10 mM; pH 7,3) + 235 µl AAPH (100 mM). Ansatz wurde bei 37°C kontinuierlicher in Gegenwart von O₂ inkubiert. Nach 20 Minuten Zugabe von Ascorbat (10 mM) (n = 10).

Wie aus Abbildung 6 ersichtlich ist, kann die Zugabe eines Überschusses von Ascorbat, das bereits gebildete Addukt (bestehend aus Alkylperoxyradikal und DMPO) augenblicklich löschen. Es unterdrückt zudem die Neubildung des Adduktes solange, bis das zugefügte Ascorbat aufgebraucht ist.

Ist hingegen Ascorbat von Anfang an im Ansatz anwesend, unterdrückt es das Zustandekommen des Adduktsignals solange, bis Ascorbat komplett aufgebraucht ist. Ab diesem Moment nimmt die Adduktkonzentration im Messansatz wieder nahezu linear über die Messzeit zu, erreicht nach einer bestimmten Dauer ein Maximum, um anschließend wieder rasch an Intensität zu verlieren. Da dieser Ansatz nicht kontinu-

ierlich mit Sauerstoff äquilibriert wurde, sollte es wegen der kontinuierlichen Abnahme der Sauerstoffkonzentration bei gleichbleibender AAPH-Zerfallsgeschwindigkeit zu einer Verschiebung im Produktspektrum kommen. Solange ausreichend Sauerstoff im Ansatz zur Verfügung steht, werden sich die primär gebildeten Alkylradikale sofort mit dem Sauerstoff zu Alkylperoxyradikalen umsetzen. Verringert sich hingegen der Sauerstoffgehalt im Ansatz, werden immer weniger $R\cdot$ zu $ROO\cdot$ umgesetzt, bis letztlich aller Sauerstoff aufgebraucht ist und die $R\cdot$ überwiegen. Jetzt werden die bis dahin akkumulierten Alkylperoxyradikaladdukte des DMPO zunehmend durch die $\cdot R$ oxidiert, so dass deren paramagnetische Eigenschaft wieder gelöscht wird. Nunmehr reagieren die weiterhin unter anaeroben Bedingungen gebildeten $R\cdot$ mit dem im Überschuss vorhandenen DMPO zu $\cdot DMPO-R$. Solange Ascorbat im Ansatz vorhanden ist, lässt sich das Ascorbatradikal (C1) nachweisen. Nach seinem Verbrauch lässt sich das $\cdot DMPO-OOR$ (C2) und nach dem Verbrauch von Sauerstoff letztlich das $\cdot DMPO-R$ (C3) messen. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 7 A und B dargestellt.

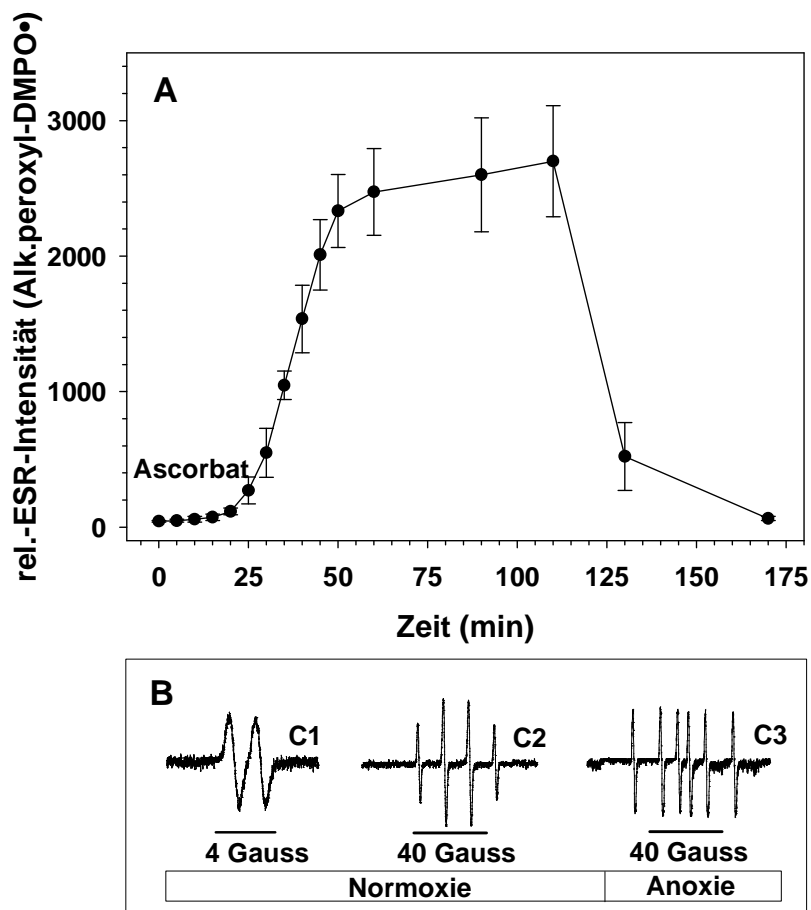


Abb. 7: **Initiale Unterdrückung der Bildung von Alkylperoxyradikal-Addukt durch Ascorbat.**

Bis Ascorbat aufgebraucht ist, ist das Ascorbatradikal (C1) darstellbar. Nach Verbrauch von Ascorbat wird das Alkylperoxy-DMPO-Addukt (C2) sichtbar. Nach O_2 -Verbrauch verschwindet das Alkylperoxy-DMPO-Addukt. Es bildet sich ein Alkylradikal-DMPO-Addukt (C3).

Das Transient aus dem Ascorbat entstehende AFR kann aufgrund seiner Stabilität ohne weiteres mit der ESR-Spektroskopie dargestellt werden. Seine Signalintensität nimmt mit der Menge der durch den AAPH-Zerfall gebildeten Radikale pro Zeiteinheit zu. Dieser Zusammenhang wird aus den Daten der Abbildung 8 deutlich. Messgröße ist hier nicht das akkumulierende DMPO-Addukt des AAPH-Zerfallsproduktes sondern das Ascorbatradikal (AFR).

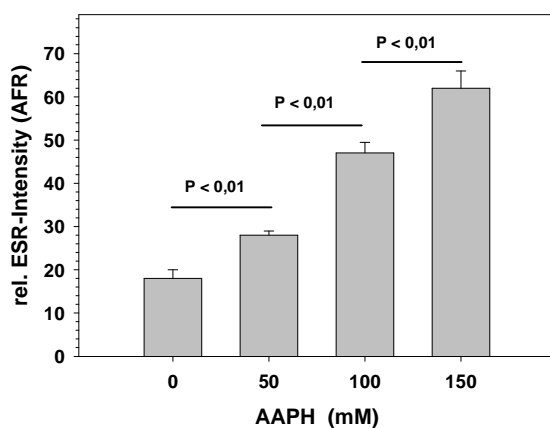


Abb. 8: **Einfluss von AAPH auf die Intensität des Ascorbatradikals**

495µl Perfusionsmedium + 5 µl Ascorbat (10 mM) + 500 µl AAPH (100-300 mM)

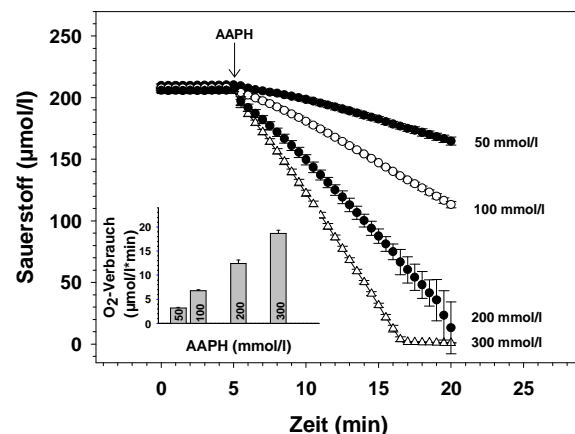


Abb. 9: **AAPH und Sauerstoffverbrauch**

Ansatz : 900 µl PBS (10 mM; pH 7,4) + 900 µl AAPH (100 -600 mM). 37°C.

Die Umwandlung von $\cdot R$ zu $ROO\cdot$ verbraucht Sauerstoff. Die durch diese Reaktion bedingte Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Messansatz wurde polarographisch mittels eines Hochleistungsrespirometers Oroborus der Fa. A. Paar (Innsbruck, Österreich) ermittelt. Abbildung 9 zeigt den Zusammenhang zwischen AAPH-Konzentration und Sauerstoffverbrauch. Man erkennt, dass die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs signifikant und nahezu linear mit steigender AAPH-Konzentration zunimmt (Einfügung in Abb. 9).

Wird dem polarographischen Messansatz nach Zugabe von AAPH nachfolgend Ascorbat hinzugefügt, beobachtet man eine zusätzliche Steigerung des Sauerstoff-

verbrauchs (Abb. 10). Dieser erhöhte Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von Ascorbat hat möglicherweise seine Ursache darin, dass die alleinige Anwesenheit von Ascorbat bereits zu einer messbaren Abnahme der Sauerstoffkonzentration im PBS-haltigen Messansatz führt (Abb. 11).

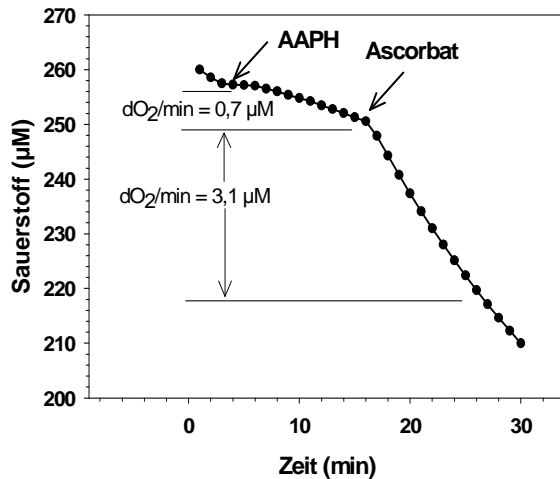


Abb. 10: **AAPH-induzierter Sauerstoffverbrauch ± Zugabe von Ascorbat**

Ansatz: 883 µl PBS (10 mM; pH 7,4) + 900 µl AAPH (100 mM) + 17 µl Ascorbat (10 mM). 37° C.

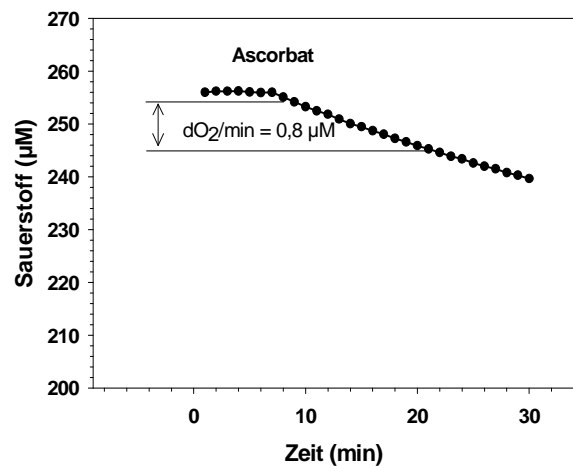


Abb. 11: **Ascorbat-induzierter Sauerstoffverbrauch**

Ansatz: 1783 µl PBS (10 mM; pH 7,4) + 17 µl Ascorbat (10 mM). 37° C.

Die durch Autoxidation von Ascorbat beobachtete Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Messpuffer sollte zu einer gleichzeitigen Abnahme der Ascorbatkonzentration im Ansatz führen. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 12 dargestellt. Enthält der Ansatz zudem AAPH, nimmt die Ascorbatkonzentration deutlich schneller ab (Abb. 13). Man erkennt aus diesen beiden Abbildungen, dass die ermittelten Geschwindigkeiten der Abnahme der Ascorbatkonzentrationen mit den in den Abbildungen 10 und 11 gemessenen Geschwindigkeiten der Abnahme der Sauerstoffkonzentration im Ansatz gut übereinstimmen.

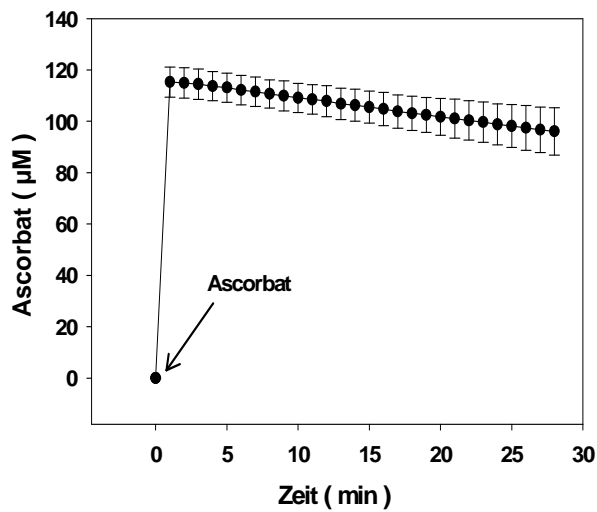


Abb. 12: **Autoxidative Abnahme der Ascorbatkonzentration**

Ansatz: 990 µl PBS (10 mM; pH 7,4) + 10 µl Ascorbat (10 mM). Asc.-Umsatz: 0,8 µM Asc./min

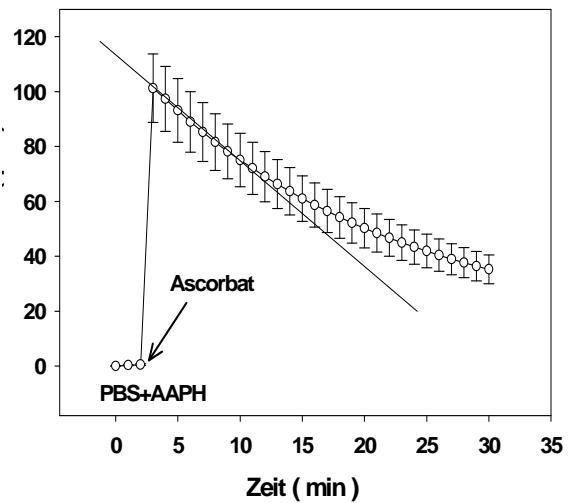


Abb. 13: **Autoxidative Abnahme der Ascorbatkonzentration in Gegenwart von AAPH**

Ansatz: 490 µl PBS (10 mM) + 500 µl AAPH (50 mM) + 10 µl Ascorbat (10 mM). Asc.-Umsatz: 3,7 µM Asc./min

Die dargestellten Veränderungen des AAPH- sowie des ascorbatabhängigen Sauerstoff- und Ascorbatverbrauchs werden immer auch von Änderungen der Ascorbatradikalkonzentration [AFR] begleitet. Bei alleiniger Autoxidation von Ascorbat in PBS (10 mM; pH 7,2) akkumuliert das mittels ESR-Spektroskopie erfassbare AFR-Signal kontinuierlich, wohingegen es bei Anwesenheit von AAPH deutlich stärker gebildet wird. Mit zunehmendem Verbrauch von Ascorbat wird das AFR-Signal zunächst kleiner. Nach Verbrauch erlischt das AFR-Signal vollständig. (Abb. 14).

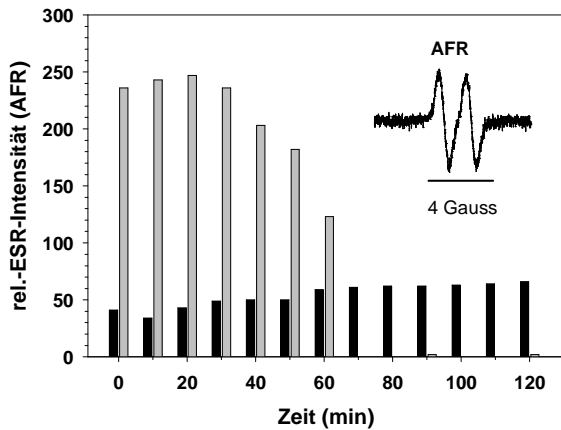


Abb. 14: **Autoxidative und AAPH-vermittelte Bildung von AFR**

Ansatz ohne AAPH (schwarze Balken): 990 µl PBS (10 mM) + 10 µl Ascorbat (100 mM)
 Ansatz mit AAPH (graue Balken): 490 µl PBS (10 mM) + 500 µl AAPH (100 mM) + 10 µl Ascorbat (100 mM). Beide Ansätze wurden bei 37°C inkubiert. pH 7,3.

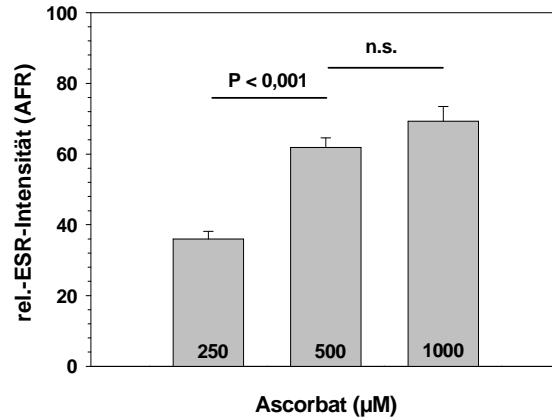


Abb. 15: **Abhängigkeit der AFR-Intensität von der Ascorbatkonzentration**

Ansatz: 50 µl HTK-Puffer + 50 µl Phosphat-Citrat-Puffer (pH 8,0) + Ascorbat (250-1000 µM_f).

Die Intensität des AFR-Signals hängt bei gegebenem pH-Wert auch von der Ascorbatkonzentration im Ansatz ab. Allerdings gibt es, wie aus den Daten von Abbildung 15 ersichtlich ist, zwischen diesen beiden Parametern keinen linearen Zusammenhang.

Unterschiedliche Puffer bzw. Perfusionslösungen für die Niere ergeben in Gegenwart von Ascorbat unterschiedliche AFR-Intensitäten. Werden die drei untersuchten Lösungen zuvor für 12 Stunden in Gegenwart von Desferoxamin (DF) inkubiert, vermindert sich das AFR-Signal jeweils signifikant (Abb. 16).

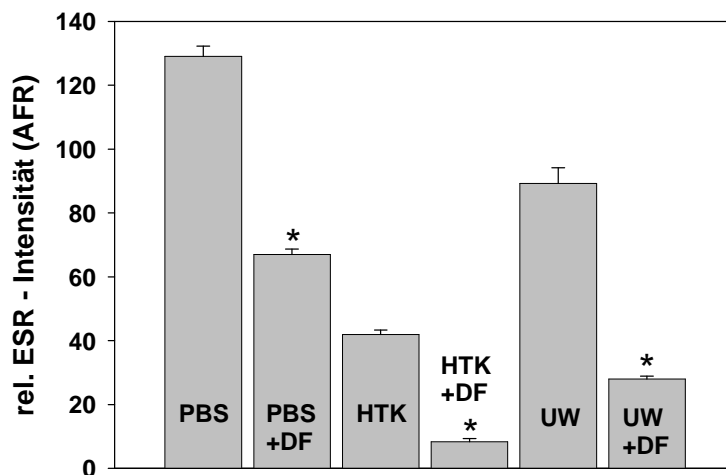


Abb. 16: Einfluss unterschiedlicher Lösungen und Desferrioxamin auf die AFR-Intensität

Ansatz: 990 μ l Puffer + 10 μ l Ascorbat (100 mM) \pm DF (50 mM) n = 20, * P < 0,01

4.2. In-vitro Perfusion der Rattenniere

4.2.1. Erfassung der Flussrate, des pO₂ sowie des Perfusionsdruckes

Die Effizienz des Gasaustausches im Perfusionsmedium durch den Wechsel der Gaszufuhr (Sauerstoff und Stickstoff) wird u. a. durch den verwendeten Oxygenator beeinflusst. Bei Abwesenheit von Proteinen im erythrozythenfreien Perfusionspuffer erfolgt der Wechsel zwischen aeroben (O₂-Begasung) und anaeroben (N₂-Begasung) Versuchsbedingungen innerhalb weniger Minuten (Abb. 17).

In Gegenwart der Niere erhöht sich der pO₂ im Perfusionsmedium allerdings nur auf ca. 450 mmHg, da die Niere ab dem Moment ihrer Durchströmung einen bestimmten Anteil an Sauerstoff für ihren Bedarf aus dem Perfusat entnimmt (Abb. 18). Da die Organperfusion unter einem konstanten Druck von 100 mmHg konzipiert wurde, ist die vom Drucksensor gesteuerte Perfusionspumpe bestrebt, durch Variation des Perfusionsflusses den Druck auf diesen vorgegebenen Wert zu halten. Dies hatte zur Folge, dass sich der Fluss häufig im Verlauf der Nierenperfusion verminderte. Der jeweils aktuelle Fluss wurde elektronisch registriert. Bei einem angestrebten Wechselspiel zwischen Druck und Fluss gab es somit zur erzwungenen Verminderung des Flusses keine Alternative (Abb. 19 und 20).

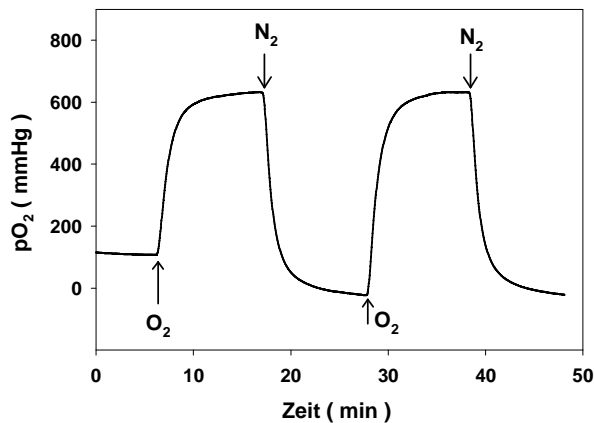


Abb. 17: **Änderung des pO₂ im Perfusionspuffer durch Variation der Begasung**

Ansatz: 50 ml Perfusionspuffer wurde mit einer Flussrate von 20 ml/min bei 37° C ohne Niere durch alternierenden Wechsel zwischen O₂- und N₂-Zufuhr begast. Der pO₂ wurde mit einem O₂-Sensor gemessen.

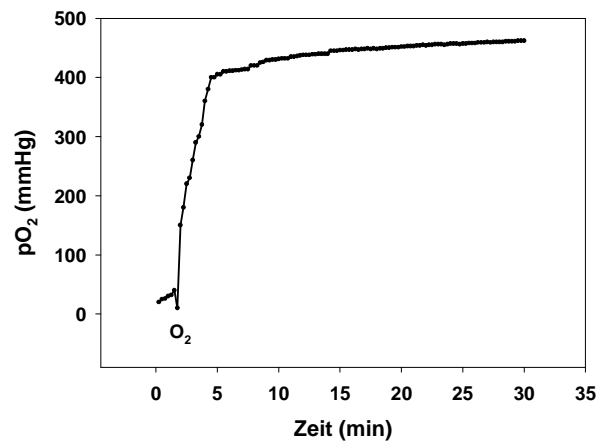


Abb. 18: **Änderung des pO₂ im Perfusionspuffer nach Beginn der O₂-Begasung in Gegenwart der Niere**

Ansatz: 50 ml modifizierte HTK-Lösung wurde rezirkulierend mit Sauerstoff begast. Die Nierenperfusion wurde unter einem konstanten Druck von 100 mmHg bei 37° C durchgeführt. Der pO₂ wurde mit einem O₂-Sensor gemessen.

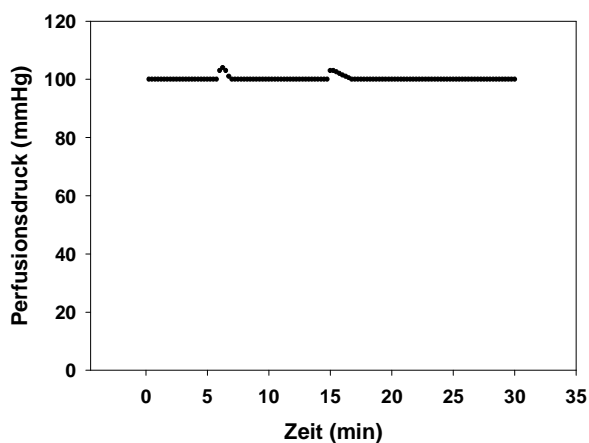


Abb. 19: **Änderung des Perfusionsdrucks in Gegenwart einer Rattenniere**

Ansatz: 50 ml modifizierte HTK-Lösung wurde rezirkulierend mit Sauerstoff begast. Die Nierenperfusion wurde unter einem konstanten Druck von 100 mmHg bei 37° C durchgeführt.

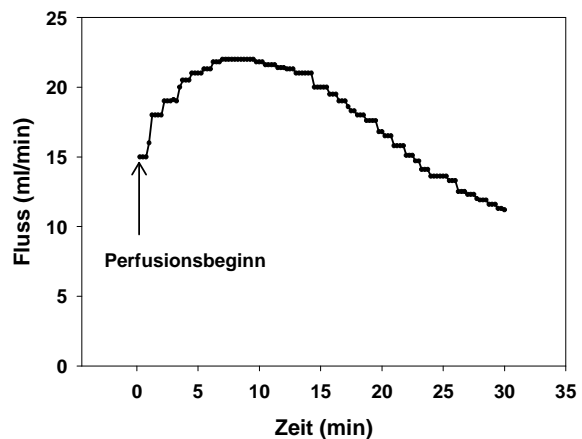


Abb.20: **Änderung des Perfusionsflusses bei druckkonstanter Perfusion der Niere**

Ansatz: 50 ml modifizierte HTK-Lösung wurde rezirkulierend mit Sauerstoff begast. Die Nierenperfusion wurde unter einem konstanten Druck von 100 mmHg bei 37° C durchgeführt. Der aus der Regulation der Pumpgeschwindigkeit resultierende Fluss wurde elektronisch erfasst.

4.2.2. Ermittlung der AFR-Intensität während der *in vitro* Perfusion der Rattenniere

Etwa 5 min vor Anschluss der Niere an das Perfusionssystem wurde dem voräquiliibrierten modifizierten HTK-Puffer (37° C, O₂-Begasung) 128 µl Ascorbat (100 mM) zugefügt. Bis zum Beginn der Organdurchströmung verteilte sich das Ascorbat gleichmäßig im Puffer. Ab Beginn der Einbindung der Niere in den Perfusionskreislauf wurde nach einem festgelegten Zeitplan jeweils 100 µl Perfusat aus dem Niereneffluat entnommen, auf ESR-Messkapillaren aufgezogen und diese verschlossen bis zur ESR-Messung aufbewahrt.

Jede einzelne Messung dauerte 1 Minute. Wegen der geringen Intensität des AFR-Signals wurde selbiges insgesamt 8 Mal vermessen und die erfassten AFR-Einzelspektren elektronisch gemittelt. Dieses gewählte Verfahren erhöhte das Signal-Rasch-Verhältnis zugunsten des Messsignals. Durch die akkumulierende Signalerfassung war ein direktes Vermessen der Perfusionsproben, die in Intervallen von 2 bzw. 5 Minuten abgenommen wurden, nicht möglich. Eine notwendige Lagerung der Messkapillaren veränderte die Signalausbeute nur unwesentlich.

Die zeitlichen Veränderungen der AFR-Signalintensität im Perfusat sind in Abbildung 21 dargestellt. Man erkennt einen signifikanten Anstieg der AFR-Intensität innerhalb der ersten 3 bis 7 min der Nierenperfusion. Nachfolgend vermindert sich diese Messgröße wieder signifikant.

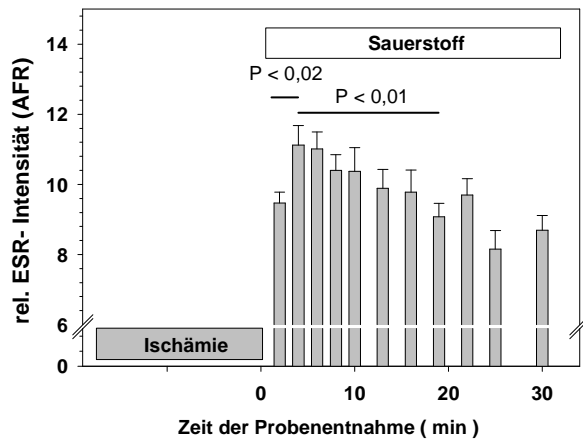


Abb. 21: zeitlicher Verlauf des AFR-Signales im Perfusionsmedium nach 20 min Ischämie

Ansatz: Modifizierte HTK-Lösung wurde rezirkulierend und kontinuierlich mit Sauerstoff begast. Die Nierenperfusion wurde unter einem konstanten Druck von 100 mmHg bei 37°C mit einem mittleren Perfusionsdruck >12ml/min durchgeführt.

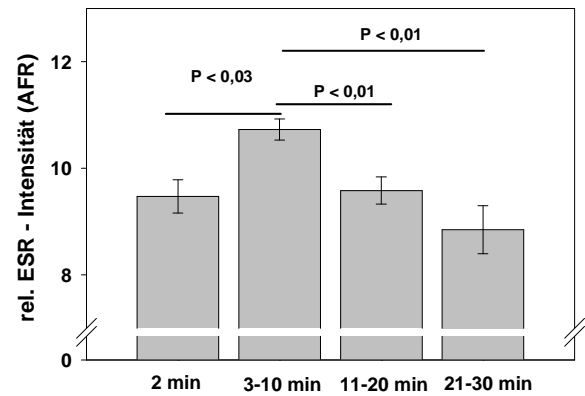


Abb. 22: Zeitgruppen (je Gruppe 10 Einzelwerte) des AFR-Signales im Perfusionsmedium nach 20 min Ischämie

Ansatz: Modifizierte HTK-Lösung wurde rezirkulierend und kontinuierlich mit Sauerstoff begast. Die Nierenperfusion wurde unter einem konstanten Druck von 100 mmHg bei 37°C mit einem mittleren Perfusionsdruck > 12ml/min durchgeführt.

Aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit wurden die zu jeder Messzeit erfassten Einzelwerte (n = 10) in vier Zeitgruppen zusammengefasst und diese Werte untereinander auf die Signifikanz der Mittelwertsabweichungen verglichen (Abb. 22). Es wird deutlich, dass sowohl der initiale Anstieg der AFR-Intensität (2 min vs. 3-10 min) wie auch der nachfolgende Abfall (3-10 min vs. 11-20 min) signifikant ist.

Bei den bisherigen Betrachtungen wurde davon ausgegangen, dass eine Reoxygenierung der zuvor für 20 min bei 37°C ischämisch gelagerten Rattenniere zu einem transienten Anstieg der ROS-Generierung während der ersten Minuten der Organperfusion führte. Dieser lässt sich durch einen Anstieg der AFR-Intensität dokumentieren. Dieser gedankliche Ansatz verlangt, dass bei einer Nierenperfusion, bei der die Perfusionsflüssigkeit mit Stickstoff begast wurde, dieser initiale Schub der Bildung von Radikalen ausbleibt. Abbildung 23 belegt die Richtigkeit dieser Annahme.

Man erkennt, dass die AFR-Intensität unter hypoxischen Bedingungen zu jedem Messpunkt signifikant unter der Intensität liegt, die bei aeroben Bedingungen gefunden wurde.

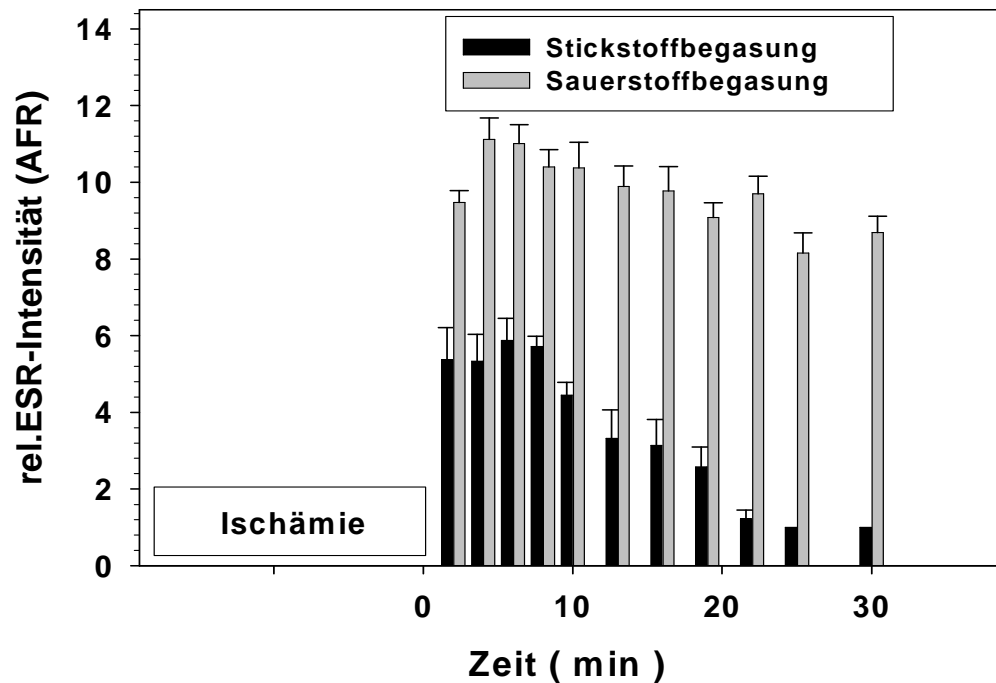
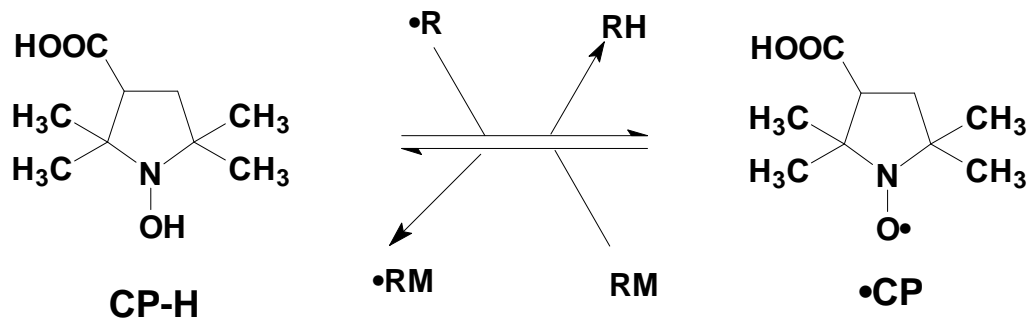


Abb. 23: Zeitlicher Verlauf des AFR-Signales im Perfusionsmedium nach 20min Ischämie und der unterschiedliche Begasung der Perfusionslösung mit Sauerstoff und Stickstoff

Ansatz: Modifizierte HTK-Lösung wurde rezirkulierend und kontinuierlich mit Sauerstoff (■) oder kontinuierlich mit Stickstoff (■) begast. Die Nierenperfusion wurde unter einem konstanten Druck von 100 mmHg bei 37° C mit einem mittleren Perfusionsdruck > 12ml/min durchgeführt.

4.2.3. CP-H als Detektormolekül für oxidierend wirkende Radikale

CP-H ist ein diamagnetisches organisches Pyrrolinderivat, das mittels ESR-Spektroskopie nicht detektierbar ist. In dieser Form besitzt es die Eigenschaft einer Spintrap, da es durch Wasserstoffentzug, vermittelt durch oxidierend wirkende Radikale ($\bullet R$) oder andere starke Oxidationsmittel, in seine paramagnetische Form ($\bullet CP$) überführt werden kann. Dabei wird das oxidierende Radikal ($\bullet R$) durch Aufnahme von Wasserstoff entgiftet und in seine reduzierte Form (RH) überführt (Schema 1).



Schema 1: Redoxreaktionen von CP-H und $\bullet CP$

Das bei der Oxidation von CP-H entstehende Radikal ($\bullet CP$) ergibt in der ESR-Spektroskopie ein Dreilinienspektrum (Abb. 24). Die Intensitätsänderung der ersten Linie (I_0) dient als Maß für seine Bildung. Die Intensität ist der Konzentration direkt proportional. In Wasser ist CP-H stabil. Wird CP-H hingegen in Perfusionspuffer gelöst, neigt es geringfügig zur Autoxidation (Abb. 25).

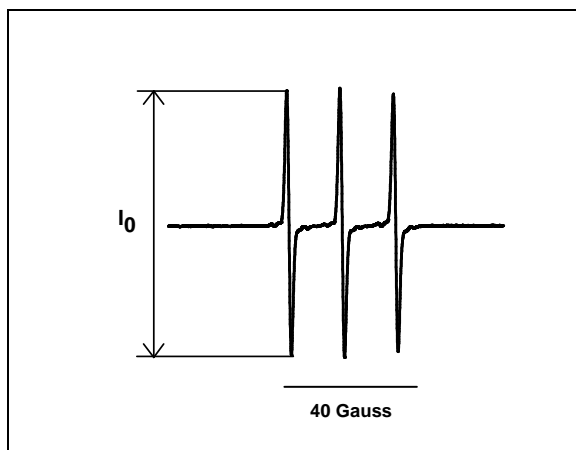


Abb. 24: ESR-Spektrum von $\bullet CP$

Ansatz: $\bullet CP$ 90 μM dementsprechend: 90 CP
(100 μMSt) + 10 H_2O

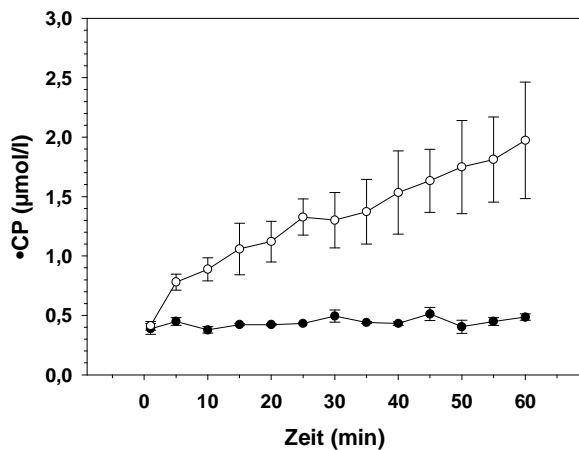


Abb. 25: **Autoxidation von CP-H in Wasser bzw. Puffer**

Ansatz: CP-H 1 mM , dementsprechend: 9 µl CP-H 10 mMst + 81 µl Medium -●- CP-H in Wasser, -o- CP-H in Puffer

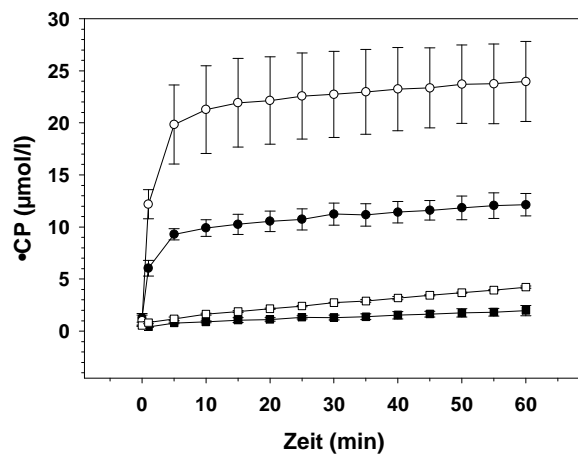


Abb. 26: **Oxidation von CPH durch FENTON-generierte Hydroxylradikale**

-■- Kontrolle ohne H₂O₂ und Fe(II); -□- H₂O₂ ohne Fe(II); -●- H₂O₂ (10 mM) + Fe(II) (1 µM) -o- H₂O₂ (20 mM) + Fe(II) (2 µM). Die Ansätze enthielten stets 1 mM CP-H

Da während der Organreperfusion u.a. auch oxidierende Radikale transient gebildet werden, sollen in einer Reihe von *in vitro* Voruntersuchungen zunächst die möglichen Wechselwirkungen einiger dieser Radikale mit CP-H analysiert werden.

Hydroxylradikale, gefolgt von Alkylperoxyradikalen, sind sauerstoffzentrierte Radikale, die über ein besonders hohes Redoxpotential verfügen (vgl. Tabelle 3). Deren Einfluss auf CP-H ist nachfolgend dargestellt. Hydroxylradikale (•OH) wurden mittels einer Fe(II)-Ionen katalysierten Reaktion aus H₂O₂ generiert (FENTON-Reaktion). Die so gebildeten •OH können CP-H *in vitro* konzentrationsabhängig zu •CP oxidieren (Abb. 26). Wie aus diesen Daten ersichtlich ist, vermag H₂O₂ bei Abwesenheit von Übergangsmetallen CP-H nicht bzw. nur marginal in •CP umzuwandeln.

In einem weiteren Messansatz wurde der Einfluss, der beim thermischen Zerfall von AAPH gebildeten organischen Radikale hinsichtlich ihrer Fähigkeit CP-H zu oxidieren, untersucht. Die beim AAPH-Zerfall entstehenden Radikale sind grundsätzlich mit denen, die bei einer Lipidperoxidation entstehen, vergleichbar. Die unter aeroben

Bedingungen bei gegebener Temperatur mit konstanter Rate entstehenden Alkylperoxyradikale (ROO•) reagieren ebenfalls mit CP-H. Bei dieser Reaktion wird wiederum •CP gebildet. Dabei wird das oxidierend wirkende ROO• durch das CP-H zum diamagnetischen Hydroperoxid umgesetzt. Entsprechend des linearen AAPH-Zerfalls war auch die Bildung von •CP über den 60minütigen Messintervall nahezu linear ansteigend (Abb. 27). Ohne externes Oxidationmittel (AAPH) blieb die Konzentration von CP-H im Ansatz nahezu unverändert.

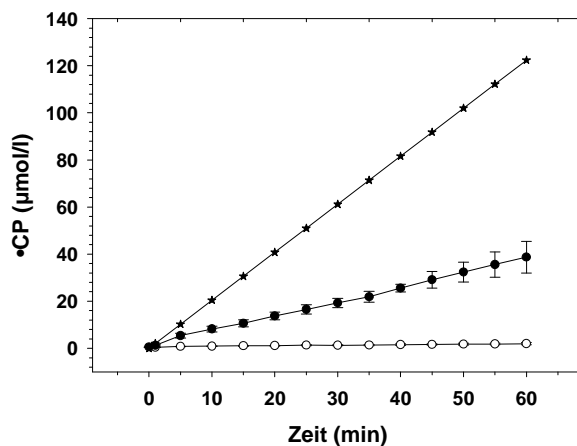


Abb. 25: **Einfluss von AAPH auf die Oxidation von CP-H**

Ansatz: -o- CP-H (1 mM) ohne AAPH; -●- CP-H (1 mM) + AAPH (50 mM), -★- Theoretisch mögliche Oxidation von CP-H

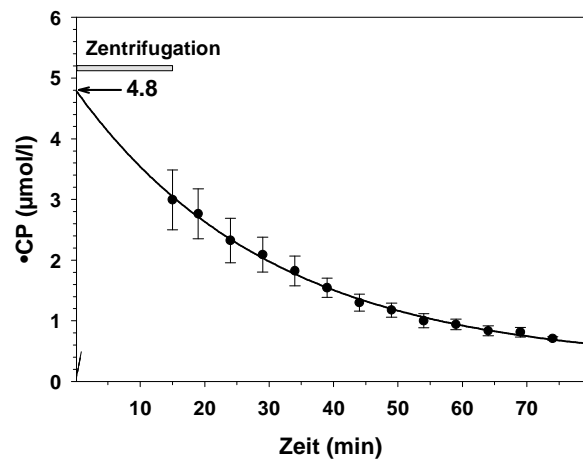


Abb. 26: **Oxidation von CP-H durch die während der „Reperfusion“ gebildeten Radikale und deren erneute Reduktion durch homogeneigene Reduktionsmittel**

Ansatz: -●- 5 µl CP-H 10 mM und 45 µl Homogenat

Ginge man davon aus, dass alle beim AAPH-Zerfall gebildete Alkylperoxyradikale (ROO•) ausschließlich mit den im Ansatz vorhandenen CP-H Molekülen reagieren würden, müssten theoretisch pro Zeiteinheit mehr •CP gebildet werden (-★-) wie praktisch ermittelt wurden (-●-).

In Abbildung 28 wurde der Einfluss von oxidierenden ROS, die bei der Reoxygenierung von Nierengewebe während der Homogenisierung entstehen, anhand der Oxidation von CP-H (Bildung von •CP) bestimmt. Dieses komplexe Experiment wird im

Detail mit den reduktiven Komponenten des Homogenats beschrieben. Man erkennt, dass bei einer Rückrechnung auf den Startpunkt des Experiments maximal etwa $4,8 \mu\text{M}$ $\bullet\text{CP}$ gebildet wurden.

4.2.4. Interaktion von $\bullet\text{CP}$ mit zellulären Reduktionsmitteln

Da grundsätzlich die meisten ROS, wie auch die vielen organischen Radikale durch die Anwesenheit von Reduktionsmitteln (Antioxidantien) wieder zu diamagnetischen Derivaten umgesetzt werden können, vermindert sich dadurch das darstellbare ESR-Signal. Der chemische Hintergrund dieser möglichen reduktiven Löschung von $\bullet\text{CP}$ durch diverse Reduktionsmittel (RM) ist schematisch in der Rückreaktion von Schema 1 dargestellt. In einer weiteren Untersuchungsreihe sollte deshalb geprüft werden, ob dies auch für $\bullet\text{CP}$ zutrifft. Wenn dies der Fall ist, sollte ermittelt werden, welche relevanten Reduktionsmittel für die reduktive Umwandlung von $\bullet\text{CP}$ zu CP-H in Betracht kommen könnten.

Nachfolgend wird der Einfluss von Glutathion (GSH), Ascorbat (AA) und Fe(II)-Ionen auf $\bullet\text{CP}$ dargestellt. Dabei kamen Konzentrationen dieser Reduktionsmittel zum Einsatz, die denen der Zelle in etwa entsprachen.

Die Initiale $\bullet\text{CP}$ -Konzentration wurde mit $90 \mu\text{M}$ so gewählt, dass sie der in späteren Versuchen mit Nierenhomogenaten eingesetzten $\bullet\text{CP}$ -Konzentration entsprach. Wie aus Abbildung 29 ersichtlich ist, führt die Anwesenheit von 5 mM GSH zu keiner signifikanten Abnahme der $\bullet\text{CP}$ -Konzentration. Konzentrationen von GSH unter 5 mM waren gänzlich ohne Einfluss auf die $\bullet\text{CP}$ -Reduktion (nicht dargestellt).

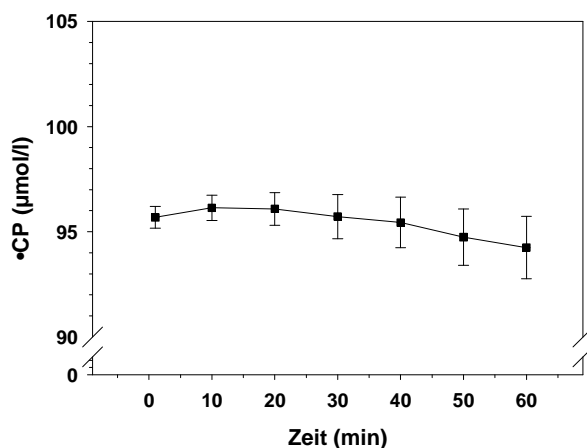


Abb. 29: Einfluss von GSH auf •CP

Ansatz: -■- •CP + GSH (5 mM)

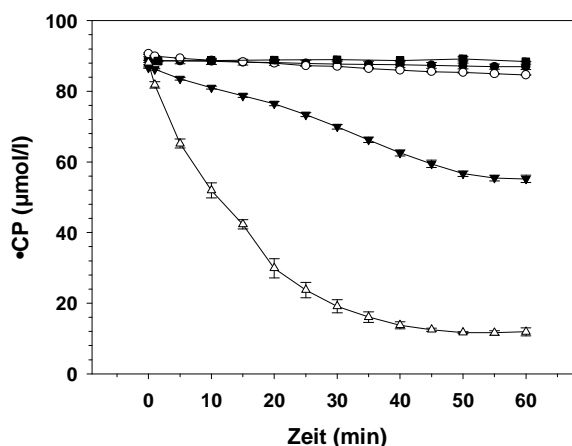


Abb. 30: Reduktion von •CP durch Ascorbat

Ansatz: -■- •CP ohne Ascorbat; -●- Ascorbat (0,1 mM); -○- Ascorbat (0,3 mM); -▼- Ascorbat (0,6 mM); -△- Ascorbat (1,0 mM).

Wird hingegen •CP in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Ascorbat (0,1 bis 1,0 mM) inkubiert, kommt es bereits bei 0,6 mM Ascorbat zu einer Abnahme der •CP-Konzentration von 90 µM auf ca. 55 µM. Bei einer anfänglichen Konzentration von 1,0 mM Ascorbat vermindert sich die •CP-Konzentration innerhalb von ca. 40 min von 90 auf ca. 10 µM (Abb.30).

Um zu prüfen, ob es sich bei der Löschung des •CP-Signals tatsächlich um eine reduktive Umwandlung von •CP zu CP-H handelt, wurde untersucht, ob sich das partiell reduzierte •CP durch Zugabe des Oxidationsmittels Kaliumhexacyanoferrat ($K_3Fe(CN)_6$) wieder re-oxidieren lässt. Da davon auszugehen war, dass ein Teil des Ascorbats nach der Reduktion von 90 µM •CP noch unverbraucht im Ansatz vorliegt, wurde $K_3Fe(CN)_6$ im Überschuss zugesetzt (Abb. 31). Aufgrund der beobachteten Zunahme der Intensität des ESR-Signals nach Zugabe des Oxidationsmittels ($K_3Fe(CN)_6$) kann davon ausgegangen werden, dass das •CP-Signal zuvor tatsächlich durch Ascorbat reduktiv gelöscht wurde.

Die Anwesenheit von Eisen (II)-Ionen ist für die Generierung von •OH essentiell. Dabei wirken die Fe(II)-Ionen als Reduktionsmittel für H_2O_2 . Wie gezeigt wurde, sind

bestimmte Reduktionsmittel in der Lage, •CP zu reduzieren. Daher sollte untersucht werden, ob auch Fe(II)-Ionen in der Lage sind, das ESR-Signal von •CP reaktiv zu löschen.

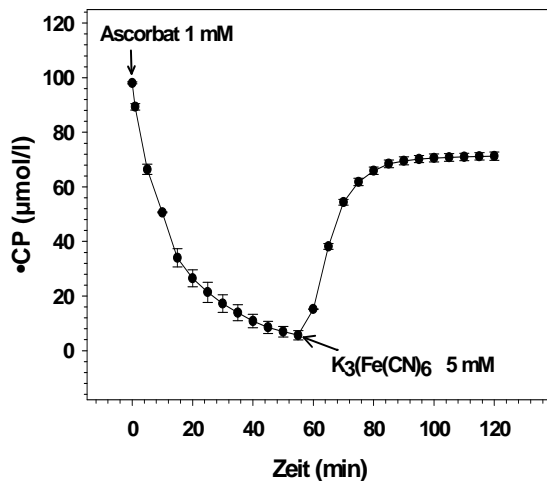


Abb. 31: Reduktion von •CP durch Ascorbat und Reoxidation von CP-H durch $K_3Fe(CN)_6$

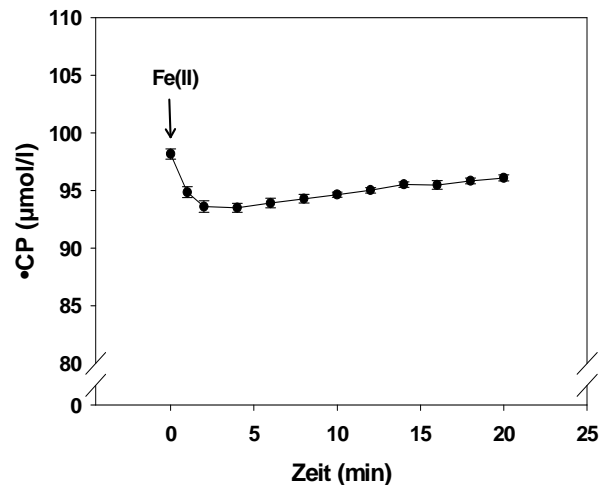


Abb. 32: Reduktion von •CP durch Fe(II)-Ionen

Die intrazellulär nachweisbare freie Konzentration von Fe(II) beträgt ca. 1 µM. Erst bei einer vielfach höheren Fe(II)-Konzentration konnte eine Absenkung des •CP-abhängigen ESR-Signals um 5 % nachgewiesen werden (Abb. 32). Daher ist anzunehmen, dass physiologische Eisenkonzentrationen keinen Einfluss auf die Stabilität des •CP-Signals besitzen.

Nunmehr soll der Einfluss des komplex zusammengesetzten Perfusionsmediums auf das •CP-Signal untersucht werden. Das Perfusionsmedium enthält keine erkennbare reduktive Kapazität, die •CP in das diamagnetische CP-H umwandeln kann (Abb. 33). Es kann also davon ausgegangen werden, dass alle nachfolgend beschriebenen Änderungen der Signalintensität von •CP und CP-H ihre Ursache im Kontakt mit dem Gewebe haben sollten.

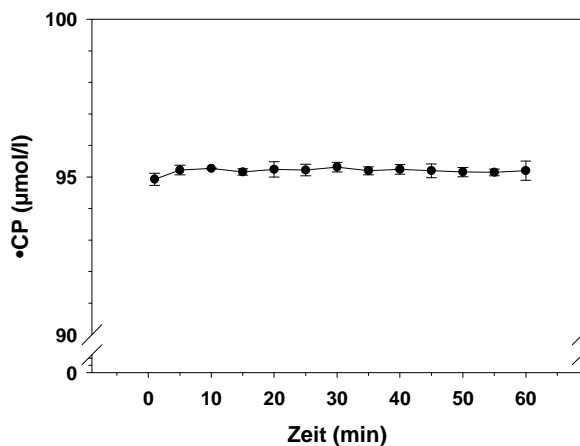


Abb. 33: **Reduktion von •CP durch Perfusionsmedium.**

Ansatz: 5 µl •CP 1 mM und 45 µl Perfusionsmedium (5 Volumenteile Custodiol, 5 Volumenteile Gelatinepolysuccinat Infusionslösung und 1 Volumenteil Glucose 40 % Pfrimmer Infusionslösung)

4.2.5. Einfluss von Rattennierenhomogenat auf CP-H und •CP

Da eine rezirkulierende Perfusion der Niere bei einem Perfusionsvolumen von mindestens 50 ml den Einsatz einer erheblichen Menge von CP-H benötigen würde, die aber im Rahmen der Arbeit nicht beschaffbar war, konnten Perfusionsversuche mit dieser Spintrap nicht durchgeführt werden. Alternativ musste auf Nierenhomogenat zurückgegriffen werden.

Der Wechsel von Ischämie und nachfolgender Reoxygenierung, wie er bei den AFR-Versuchen mit der isoliert perfundierten Rattenniere zur Anwendung kam, wurde dabei lediglich imitiert. Eine frisch entnommene Rattenniere wurde für 15 Minuten in einem verschließbaren Reagenzglas bei 37° C inkubiert. Diese Vorgehensweise entspricht der Warmischämiephase. Anschließend wurde die Niere zerkleinert und mit einem Potter-Homogenisator in Gegenwart von Vierfach-Puffer unter standardisierten Bedingungen homogenisiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch die Gewebshomogenisierung in Gegenwart des luftgesättigten Puffers das ischämische Nierengewebe wieder mit Sauerstoff angereichert wird. Dies entspricht der Reperfusionphase bei der Nierenperfusion. Das Homogenat wurde anschließend für 10 min bei 600 g zentrifugiert und der Überstand zur Bestimmung der •CP-Konzentration mittels ESR-Spektroskopie verwandt. Dabei ist anzunehmen, dass ab dem Moment des Kontaktes von ischämischen Nierengewebe mit sauerstoffhaltigem Puffer ROS gebildet werden. Dieser Vorgang wird sich möglicherweise auch während der Zentrifugation noch fortsetzen. Gleichzeitig mit der oxidativen Umwandlung von CP-H zu •CP beginnt aber auch seine reduktive Rückführung in das diamagnetische CP-H.

Damit ist die zum jeweiligen Messzeitpunkt darstellbare •CP-Konzentration im Ansatz stets nur die Resultante aus oxidativ gebildeten •CP und gleichzeitig einsetzender Rückreduktion zum CP-H. Dies hat zur Folge, dass das erfassbare ESR-Signal die für die •CP-Bildung tatsächlich verantwortliche ROS-Menge generell unterschätzt. Dieser Sachverhalt wurde bereits in Abbildung 28 dargestellt. Da während der Homogenisierung der Niere und der anschließenden Zentrifugation die •CP-Konzentration verständlicherweise nicht gemessen werden kann, erfolgte die Messwerterfassung erst ab der 20. Minute. Aus dem nachfolgend erfassbaren Abklingen der •CP-Konzentration wurde auf die zu Beginn der Zentrifugation vorhandene •CP-Konzentration extrapoliert. Aus diesen Untersuchungen resultierte ein Umsatz von knapp 5 μM CP-H, erkennbar an der ermittelten initialen •CP-Konzentration. Somit muss mindestens auch die gleiche Menge ROS gebildet worden sein (vgl. Abb. 28).

Die *in vitro* Versuche haben gezeigt, dass CP-H bei Abwesenheit oxidierend wirkender Radikale (s. Abb. 27; -o-) nicht zu •CP umgesetzt werden kann. Somit müssen die nachgewiesenen Veränderungen ausschließlich durch die Anwesenheit von Nierenhomogenat bedingt sein.

Wie in Abbildung 28 gezeigt, wurde initial mit CP-H gearbeitet, das durch die unter oxidativem Stress (Reoxygenierung während der Nierenhomogenisierung) generierten Radikale oxidativ zu •CP umsetzte.

Unter den in den Abbildungen 34 und 35 dargestellten Bedingungen wurde nunmehr ausschließlich mit •CP gearbeitet. Hier sollten mögliche Ursachen für die Signallöschung (Umwandlung von •CP zu CP-H) durch das Nierenhomogenat bzw. durch eine mitochondrienfreie Fraktion („Cytosol“) herausgearbeitet werden.

•CP wurde dem Puffer bereits vor der Homogenisierung zugesetzt und war auch während der Zentrifugation im Ansatz präsent. Man erkennt, dass natives Homogenat am raschesten •CP reduktiv zu CP-H umsetzt. Dies ist erkennbar an der Abnahme der ESR-Intensität um ca. 50 % innerhalb von 60 min Messzeit. Einfrieren und anschließendes Auftauen des Homogenates verlangsamt die Umwandlung zum diamagnetischen CP-H signifikant gegenüber der nativen Kontrolle. Am deutlichsten verzögert sich die Reduktion von •CP nach 60minütigem Erhitzen des Homogenats auf 80 °C. Die Ergebnisse wurden so gedeutet, dass durch das Einfrieren und Wiederauftauen die Intaktheit der Mitochondrien zerstört wurde und damit der Teil der

reduktiven Fähigkeiten des Homogenats, der mit der Unversehrtheit der Mitochondrien verbunden war, verloren gegangen ist. Sollte diese Hypothese richtig sein, dann müsste die Entfernung der Mitochondrien durch eine fraktionierte Zentrifugation des Homogenates die reduktive Kapazität des mitochondrienfreien Überstandes („Cytosol“) um eben diesen Betrag vermindern.

Diese Hypothese konnte experimentell gestützt werden (Abb. 35). Das Erhitzen des Homogenates denaturierte weitgehend alle Proteine/Enzyme, die neben den vorhandenen nichtenzymatischen Reduktionsmitteln des Nierengewebes für die Transformation von •CP zu CP-H verantwortlich zeichneten. Damit bleibt nach dem Erhitzen des Homogenates nur jene reduktive Kapazität der Niere erhalten, die in der Lage ist, •CP auch ohne Beteiligung von Zellorganellen wie Mitochondrien bzw. von reduktiv wirkenden Enzymen umzusetzen.

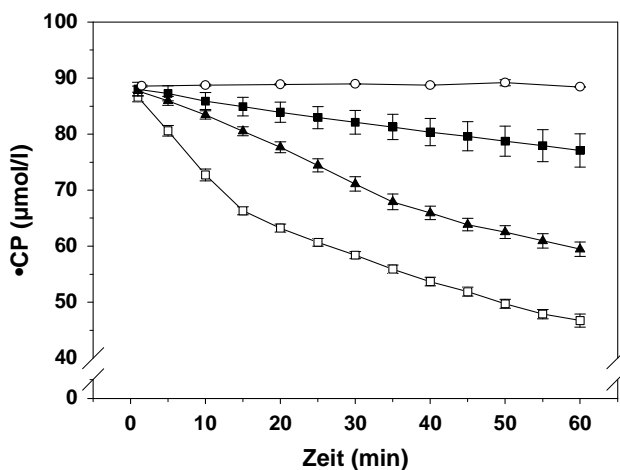


Abb. 34: Löschung des •CP-Signals durch a) natives, erhitztes oder gefrorenes Homogenat

Ansatz: •CP 90 µM. -○- Kontrollansatz ohne Homogenat. -□- natives Homogenat, -▲- erhitztes Homogenat (1 Stunde bei 80° C) und -■- für 24 Stunden bei -21 °C inkubiertes Homogenat.

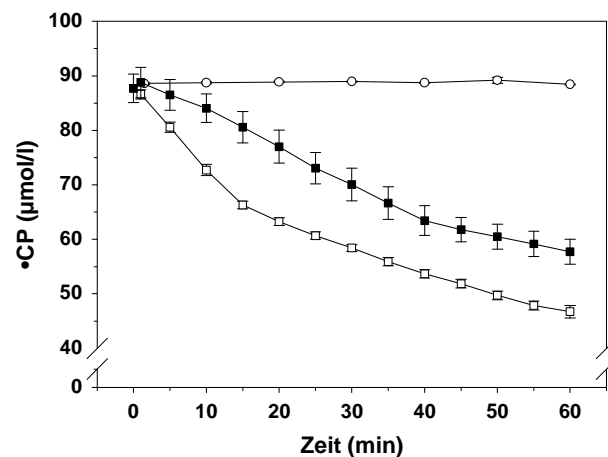


Abb. 35: Löschung des •CP-Signals durch durch Cytosol

Ansatz: •CP 90 µM. -○- Kontrollansatz ohne Homogenat, -■- natives Cytosol und -□- natives Homogenat.

5. *Diskussion*

Reaktive Sauerstoffintermediate ist ein Sammelbegriff für Radikale, Radikalverbindungen, die sich aus dem molekularen Sauerstoff ableiten [125]. Einige Autoren zählen aber auch nichtradikalische Verbindungen dazu, wie z.B. hypochlorige Säure, Peroxynitrit oder Ozon, die Derivate des Sauerstoffs darstellen. Sauerstoff ist aufgrund seines atomaren Aufbaues respektive seiner unterschiedlichen Elektronenkonfigurationen ein sehr wichtiges Molekül in der Radikalchemie.

Molekularer Sauerstoff ist per Definition ein Biradikal. Er besitzt zwei ungepaarte Elektronen in seiner äußeren Hülle, genauer formuliert, auf zwei verschiedenen π -Orbitalen (Abb. 2). Von entscheidender Bedeutung für die Reaktionsfähigkeit und Eigenschaften des Sauerstoffmoleküls ist die Besetzung dieser 2 π -Orbitale. Entscheidend ist, wie die Elektronen auf diese Orbitale verteilt sind und welchen Spin die Elektronen zueinander haben. Das heißt, besitzen sie einen parallelen oder antiparallelen Spin. Als Grundzustand wird die Verteilung der zwei Elektronen auf jeweils ein Orbital mit parallelen, gleichgerichteten Spin angesehen. Er ist aufgrund dieser energetisch günstigen Konstellation relativ stabil. Auch in diesem Zustand kann Sauerstoff als Oxidationsmittel wirken. Es kann von seinem Reaktionspartner Elektronen aufnehmen. Diese Elektronen müssten einen antiparallelen Spin haben, um die freien Plätze besetzen zu können. Aufgrund des Pauli-Prinzips besitzen die Elektronenpaare von Atomen oder Molekülen gegenläufige Spins, so dass eine Reaktion mit molekularem Sauerstoff nicht möglich ist. Diese Einschränkung der Reaktionsfähigkeit wird als Spin-Restriktion bezeichnet. Die Spin-Restriktion ist für die Reaktionsträgeit des molekularen Sauerstoffs verantwortlich und bildet somit einen Schutzmechanismus, der verhindert, dass komplexe organische Verbindungen des menschlichen Körpers mit dem Sauerstoff der uns umgebenden Luft reagieren [11].

Weitere reaktivere Formen des Sauerstoffs sind als Singulett- Sauerstoff bekannt. Es existieren zwei Formen, die beide durch die Zufuhr von Energie entstehen. Bei diesen Sauerstoffmolekülen sitzen die beiden Elektronen im äußeren Orbital und weisen einen antiparallelen Spins auf, so dass die Spin-Restriktion aufgehoben ist. Der Singulett- Sauerstoff ist ein wesentlich besseres Oxidationsmittel als molekularer Sauer-

stoff. Im biologischen System ist die Bildung von ROS eine normale Begleiterscheinung bei aeroben Stoffwechselvorgängen der Zelle. Die sukzessive Reduktion von molekularem Sauerstoff durch „Ein-Elektronen-Transfer-Reaktionen“ führt so zur Bildung von ROS.

Die direkte Erfassung von Radikalen gelingt grundsätzlich nur mittels der ESR-Spektroskopie; bei besonders reaktionsfreudigen (kurzlebigen) Radikalen bedarf es allerdings zusätzlich der Anwesenheit von so genannten Spintraps in hoher Konzentration am potentiellen Ort ihrer Entstehung. Zudem gibt es keine einzelnen Spintraps, die das Vorhandensein von allen möglichen Arten von Radikalen detektieren kann. Die ESR-Methode ist kein optisches Messverfahren. Sie hat gegenüber allen optischen Verfahren den deutlichen Vorteil, dass sie keiner Aufreinigung des Probenmaterials bedarf und auch in trüben bzw. unter bestimmten Bedingungen sogar in einer unbehandelten Gewebeprobe selbst durchführbar ist.

Die indirekte Erfassung von Radikalfolgeprodukten (Footprints) ist immer ein zeitlich versetzter Vorgang, der je nach Bestimmungsmethode Stunden nach einer stattgefundenen Radikalbelastung nur retrospektiv das Geschehen eines bereits wieder beendeten (weil transienten) Geschehens abbildet. Diese vielfach angewandte indirekte Methode erlaubt somit kaum eine Analyse und folglich kaum eine Prognose über den Schweregrad der oxidativen Beschädigung eines Organs im Moment der Schadensentstehung.

Wir suchten also nach einer Möglichkeit, wie man die den Vorteil der sofortigen Erfassung der Radikalbelastung, wie sie nur die ESR-Spektroskopie bietet, mit dem Einsatz eines möglichst körperverschträglichen Detektormoleküls kombinieren könnte.

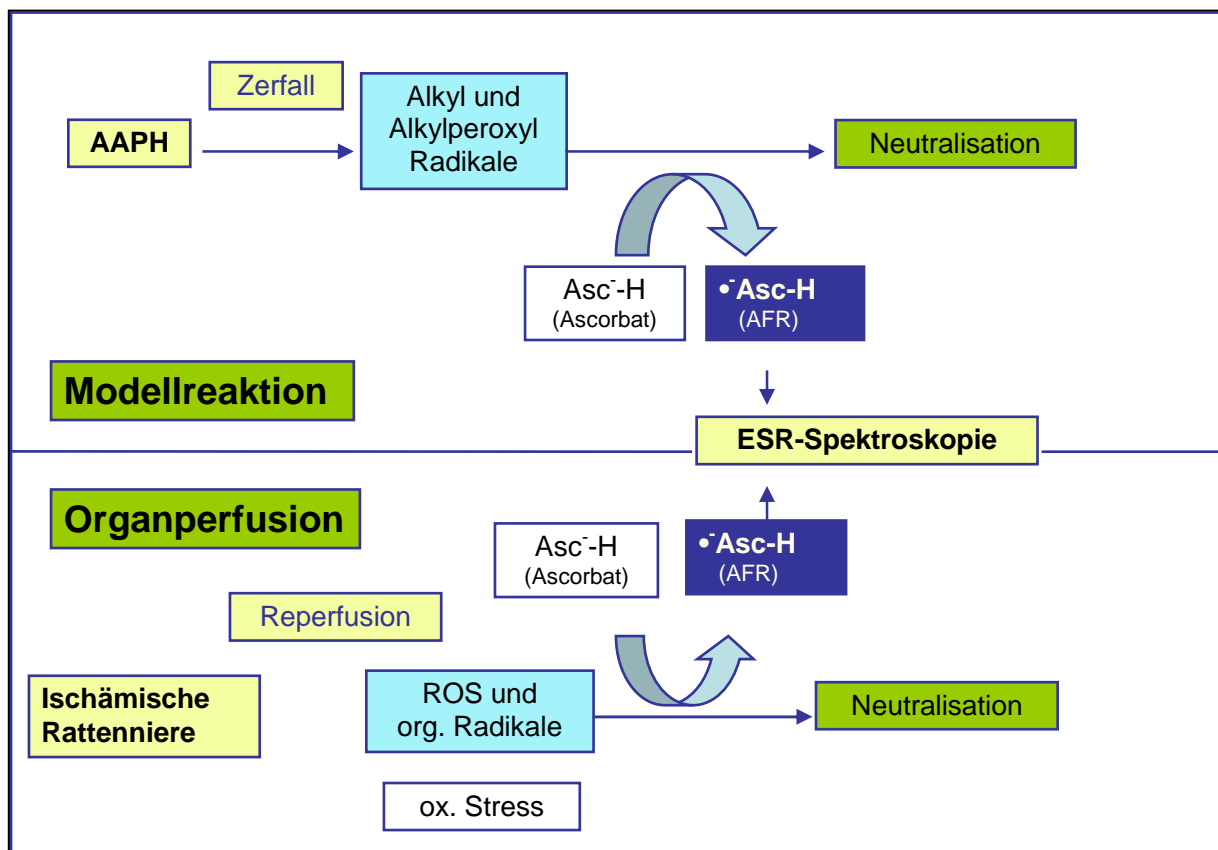
Im Ascorbat wurde eine solche Substanz gefunden. Hinweise ihres Einsatzes am isoliert perfundierten Herz ermutigten uns, Ascorbat als Detektionsmolekül für ROS und organische Radikale auch bei der Nierenperfusion einzusetzen.

Ausgangspunkt waren dabei folgende Überlegungen: Ascorbat kommt, als Nahrungsbestandteil aufgenommen, intrazellulär in hohen Konzentrationen (1 mM bis 2 mM) vor. Ascorbat gehört zum Repertoire der nichtenzymatisch wirkenden Anti-

oxidantien der Zelle. Aufgrund seines Redoxpotentials (vgl. Tabelle 3) kann es die meisten im Körper entstehenden Radikale erfolgreich neutralisieren. Dabei entsteht intermediär das mittels ESR-Spektroskopie direkt erfassbare Ascorbatradikal (AFR). Seine molekularen Besonderheiten bedingen eine ausreichend große Halbwertszeit, so dass eine Vermessung auch in Abwesenheit einer extern zugefügten Spintrap möglich ist [28, 26, 43]. In den durchgeführten Voruntersuchungen konnte eine diskrete Abnahme des AFR- Signals im später verwendeten Perfusionsmedium in einer Zeitspanne von einer Stunde nachgewiesen werden, was in verschiedenen Arbeiten ebenfalls dokumentiert wurde [39 – 42].

AFR entstehen sowohl als Folge einer reduktiven Neutralisation von Hydroxylradikalen, wie auch durch die Entgiftung einer Reihe von organischen Radikalen, wie sie bei der LPO entstehen (AAPH-Experimente).

Dieses Verhaltensmuster von Ascorbat in Gegenwart von diversen Radikalen und seine Umwandlung in das mittels ESR-Technik erfassbare AFR ist modellhaft im Reaktionsschema dargestellt.



Reaktionsschema 1: Akkumulation von diversen Radikalen im Ascorbatradikal (AFR)

Im oberen Teil des Schemas ist das durch den thermischen Zerfall von AAPH gebildete Radikalmuster abgebildet. Bei Anwesenheit von Ascorbat werden die vom AAPH-Zerfall abgeleiteten Radikale allesamt durch dieses Ascorbat reduktiv neutralisiert. Dabei oxidiert das Ascorbat zum Ascorbatradikal (AFR), welches mittels ESR-Spektroskopie direkt detektiert werden kann. Somit fungiert das sekundär gebildete AFR als Detektor für eine zuvor stattgefundenene Bildung organischer Radikale.

Der untere Teil zeigt schematisch das analoge Geschehen während einer Reperfusion eines zuvor ischämisch gelagerten Organs. Die bei der Reoxygenierung des ischämischen Gewebes entstehenden ROS und die nachfolgend gebildeten organischen Radikale sind allesamt so kurzlebig, dass ihre direkte Detektion nur mittels einer Spintrap, die in sehr hoher Konzentration im Gewebe vorhanden sein müsste, gelingen würde. In Gegenwart von Ascorbat reagiert dieses jedoch aufgrund seines Redoxpotentials wiederum mit dem ganzen Spektrum der entstehenden Radikale und oxidiert analog dem oberen Teil des Reaktionsschemas (s. Reaktionsschema 1) wieder zum Ascorbatradikal (AFR). Auch für den Fall, dass die extrem kurzlebigen Hydroxyl- oder Alkylperoxyradikale zuvor mit potentiell anderen Targets in der Zelle reagiert hätten, würde Ascorbat grundsätzlich auch diese Radikale wieder neutralisieren, so dass letztlich alle intermediär gebildeten bzw. transformierten Radikale sich im AFR wiederfinden.

Damit ergab sich die prinzipielle Möglichkeit der semiquantitativen Abschätzung der Radikalbildung unmittelbar nach Beginn der Reperfusion der Rattenniere. Offenbar setzt die Radikalbildung innerhalb von wenigen Minuten nach der Reoxygenierung des ischämischen Gewebes ein und kommt bereits nach 10-15 min wieder zum Erliegen. Dieser transiente Anstieg der ROS-Bildung nach Einleitung der Reperfusion bestätigt frühere Untersuchungen [1].

Wie die Voruntersuchungen in Gegenwart von Ascorbat und AAPH gezeigt haben, kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass das AFR-Signal direkt linear mit der Menge gebildeter Radikale anwächst. Da der AAPH-Zerfall mit der Bildung von Alkylradikalen ($R\cdot$) einhergeht, die in Gegenwart von Sauerstoff zu Alkylperoxyradikalen ($ROO\cdot$) weiterreagieren, verbraucht diese Reaktion Sauerstoff. Sowohl aus dem von uns gemessenen konzentrationsabhängigen Sauerstoffverbrauch, wie auch

aus der Abnahme der Ascorbatkonzentration in Gegenwart von AAPH konnte gezeigt werden, dass die AFR-Intensität proportional zum Sauerstoff- wie auch zum Ascorbatverbrauch ist. Damit erfüllt Ascorbat eine wesentliche Voraussetzung, als Detektor für Radikale eingesetzt werden zu können.

Ein solcher direkter Zusammenhang zwischen AFR-Signalintensität und Radikalbildung ist allerdings nur in einem eng begrenzten Konzentrationsbereich für Ascorbat gegeben [12, 13]. Bei höheren Konzentrationen von Ascorbat geht, wie wir gezeigt haben (Abb. 8), dieser lineare Zusammenhang wieder verloren.

Zudem erwies sich, dass die AFR-Intensität auch von dem Vorhandensein von Übergangsmetallionen wie Fe(III) oder Cu(II) sowie vom pH-Wert des eingesetzten Puffers beeinflussbar ist. Durch eine Vorinkubation der Pufferlösungen in Gegenwart von Desferoxamin (DF) konnten die mittels der Pufferbestandteile ungewollt eingeschleppten Übergangsmetalle komplexiert und damit ihrer katalytischen Eigenschaften beraubt werden (vgl. Abb. 16).

Ein weiteres Problem ergibt sich aus der spontanen Dismutation von AFR zu Ascorbat und DHA (vgl. Gl. 4-8). Die Neigung zur Dismutation von AFR steigt mit seiner Konzentration und wird zudem auch wieder vom pH-Wert beeinflusst [6, 127, 128]. Damit kann die einsetzende Dismutation von AFR dazu beitragen, dass die tatsächliche Bildung von ROS bzw. organischen Folgeradikalen unterschätzt wird.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Messung der AFR-Intensität dann ein Äquivalent für die zuvor gebildeten Radikale während der Reperfusion eines Organs sein kann, wenn es gelingt, alle übrigen Einflussgrößen, die die Intensität des AFR-Signals stören können, konstant zu halten. Dies ist unter den hier beschriebenen Bedingungen der *in vitro* durchgeführten zellfreien Experimente sowie während der Perfusion der Rattenniere grundsätzlich möglich.

Weitaus schwieriger wäre es, diesen Parameter während der Nierentransplantation als Maß für den aufgetretenen oxidativen Stress und der sich von ihm ableitenden möglichen Verschlechterung der Organfunktion zu benutzen.

CP-H und •CP-Experimente

In einer anderen Herangehensweise sollte untersucht werden, ob der Einsatz einer neuen Spintrap (CP-H) grundlegende Vorteile gegenüber dem Einsatz bisher bekannter Nachweisreaktionen für oxidativen Stress aufweist.

CP-H wurde im Jahre 1956 von Rogers in einer Lösung als freies Radikal nachgewiesen [73]. Die Arbeitsgruppe um Dikalov et al. beschrieb 1997 erstmals CP-H als eine geeignete Spintrap für den Nachweis von oxidierenden Radikalen [29].

Grundsätzlich gilt es dabei folgendes zu überprüfen:

1. Durch welche Verbindungen kann CP-H in ein radikalisches Derivat umgesetzt werden, das sich mittels ESR-Spektroskopie zeitnah zum verursachenden Geschehen nachweisen ließe?
2. Ist CP-H durch Oxidationsmittel bzw. durch oxidierend wirkende Radikale in das paramagnetische •CP überführbar?
3. Ist die Bildung von •CP aus CP-H der Konzentration des oxidierend wirkenden Stoffes direkt proportional?
4. Handelt es sich bei dem gebildeten Radikal (•CP) um einen stabilen Vertreter, der ohne Zuhilfenahme weiterer Verbindungen selbst mittels ESR-Technik direkt detektierbar ist?
5. Unter welchen Bedingungen verliert das gebildete paramagnetische Produkt (•CP) seine Stabilität?
6. Welche Verbindungen sind in der Lage, die Signalintensität von •CP wieder zu vermindern bzw. zu löschen?
7. Haben diese Verbindungen etwas mit dem Geschehen gemeinsam, das während der Reperfusion der Niere stattfindet?

Diese Fragen lassen sich zum Teil aus bereits vorhandenen Daten in der Literatur, bzw. durch die von uns zusätzlich durchgeführten Experimente beantworten.

Es konnte gezeigt werden, dass CP-H hauptsächlich durch solche Radikale zu •CP umgesetzt werden kann, die über ein hohes Redoxpotential verfügen. Dazu zählen in erster Linie solche Radikale, wie z.B. die Hydroxyl- und die Alkyl- bzw. Alkylperoxyradikale, die allesamt auch während der frühen Phase der Reperfusion nachweisbar sind.

Grundsätzlich ist es schwierig, $\bullet\text{OH}$ in einer chemischen Modellreaktion kontinuierlich zu generieren. Eine Methode der Wahl stellt u.a. die so genannte FENTON-Reaktion dar, bei der durch Zugabe einer definierten Menge Fe(II) -Ionen zu H_2O_2 $\bullet\text{OH}$ -Radikale unmittelbar nach Herstellung des Kontaktes beider Reaktanten in einem sehr kurzen Zeitfenster gebildet werden. Eine alternative Methode der Bildung von $\bullet\text{OH}$ durch die photochemische Homolyse von H_2O_2 bei 254 nm könnte nicht angewendet werden, da bei 254 nm auch das Targetmolekül CP-H photochemisch instabil ist (nicht dargestellt). Dennoch zeigten die Untersuchungen mit Fenton-generierten $\bullet\text{OH}$ (s. Abb. 31), dass sich durch die Zugabe eines starken Oxidationsmittels CP-H zu $\bullet\text{CP}$ umsetzen lässt.

Viele Marker zur Beurteilung und Bestimmung der ROS während einer Reperfusion sind bereits analysiert worden. Aber nicht alle von ihnen erfüllen die Kriterien eines optimalen Markers zur Bestimmung von ROS [53]. ROS werden meistens innerhalb der Zellen gebildet. Die gebildeten ROS verlassen selten aufgrund der extremen Kurzlebigkeit den Ort der Entstehung. So ist es sehr wichtig, dass ein Detektormittel den Ort der ROS Erzeugung erreicht. Die Experimente von Fink zum CP-H zeigten, dass CP-H die Zellmembran durchdringt und so direkt mit den ROS reagieren kann [36]. Dies konnte in verschiedenen *in vitro* – Experimenten bestätigt werden, so dass CP-H ein geeigneter Detektor für oxidierende Radikale (*in vitro*) ist [29, 30]. Hydroxylradikale sowie Alkyl- oder Peroxylradikale werden in zunehmendem Maße nach der Reperfusion gebildet und sind fähig, CP-H zu oxidieren. Nach der Oxidation von CP-H wird dies selbst zum Radikal ($\bullet\text{CP}$) und kann aufgrund der längeren Stabilität durch ESR-Spektroskopie leicht gemessen werden. Es bedarf keiner speziellen Vorbereitungen der Probe, so dass keine Trübung oder Verfärbung der Probe die Messung stört. Ohne eine mögliche fortwährende Verkleinerung der Signalintensität von $\bullet\text{CP}$ durch bestimmte zelluläre Reduktionsmittel oder Enzyme würde das gebildete $\bullet\text{CP}$ (s. Abb. 24, 25, 27) der Zahl der oxidierenden Radikalen entsprechen, die während der Reperfusion erzeugt werden. Das $\bullet\text{CP}$ ist von relativ hoher Stabilität gegenüber anderen zellulären Reduktanzien. Obgleich Ascorbat in der Regel in Lage ist, $\bullet\text{CP}$ zu reduzieren (s. Tab. 3), reicht eine geringe Plasmakonzentration des Ascorbats (0,14 mM) nicht aus, um das $\bullet\text{CP}$ zu reduzieren. (s. Abb. 30) [24, 108]. Erreicht das Ascorbat eine intrazelluläre Konzentration von 0,4 – 1,2 mM [97, 115] wird $\bullet\text{CP}$ reduziert und die gemessene Konzentration des ESR-Signals nimmt ab (s. Abb. 30).

In den Homogenat-Untersuchungen fiel eine relativ niedrige Konzentration des gebildeten \bullet CP (5 μ M, s. Abb. 28) auf. Dies ist vermutlich eine Konsequenz der außerordentlich starken oxidierenden Eigenschaften jener Radikale, die sich im Homogenat nach der Reperfusion gebildet haben und für die Oxidation von CP-H zu \bullet CP verantwortlich sind. Solche konkurrenzfähigen Radikale wie \bullet OH oder Alkylradikale sind in der Lage, nicht nur mit dem addierten Marker (CP-H), sondern auch mit allen Verbindungen in ihrer nächsten Umgebung zu reagieren.

Dieses Phänomen ist meistens das Problem von vielen Markern, die für Bestimmung des oxydierenden Stresses/Reperfusionsschaden (Messung der gebildeten ROS) genutzt werden, die entweder mit anderen zellularem Material oder den starken zellulären Reduktantien konkurrieren müssen und dadurch Schwankungen unterliegen [53]. Das Homogenat der Niere ist in der Lage, die Bildung von \bullet CP zu behindern und kann die Bestimmung der gebildeten Menge von ROS nach der Reperfusion unterschätzen.

Für eine Bestimmung der ROS in einem *in vivo* – Experiment muss man die stetige Verkleinerung der Menge von \bullet CP in Erwägung ziehen. So stellt der gemessene Wert der Menge von \bullet CP nach der Reperfusion des Nierenhomogenates möglicherweise nur ein Gleichgewicht zwischen Oxidation und nachfolgender Reduktion von CP-H und \bullet CP dar.



Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass ein optimaler Zeitpunkt zur Messung der entstandenen ROS zwischen der 5. Minute und 10. Minute nach Reperfusion liegt. In diesem Zeitsegment ist die Bildung von \bullet CP sehr groß, ohne dass die Antioxidantien \bullet CP wieder zu CP-H regenerieren.

Im klinischen Alltag der Nierentransplantation stehen zwei verschiedene Lösungen zur Auswahl. Zum einen die seit vielen Jahren verwendete UW-Lösung und zum anderen die von uns verwendete HTK-Lösung. Einen entscheidenden Unterschied beider Lösungen ist die Elektrolytzusammensetzung (s. Tab. 4). Die UW-Lösung be-

ruht auf dem Prinzip der intrazellulären Lösung. Demgegenüber passt sich die HTK-Lösung dem extrazellulären Milieu an. In der HTK-Lösung wird als Anion das Chlorid und in der UW-Lösung, das Laktobinat (Belzer-Lösung) verwendet. Die UW-Lösung unterliegt einem Prinzip, welches durch einen hohen Kaliumgehalt und durch das Laktobinat die transmembranöse Ionen- und Wasserverschiebungen bei gehemmter Na-K-ATPase verhindern soll. Dieser Vorgang wird von Collins mit der Energieeinsparung durch die Reduktion des transmembranösen Konzentrationsgradienten und die Proteinsynthese begründet [4, 21]. Demgegenüber steht das Prinzip der HTK-Lösung. Der Energiehaushalt der Zelle wird durch die Senkung der Natriumkonzentration und eine gegenüber dem Plasma mäßige Hyperkaliämie sowie durch den Entzug von Kalzium gedrosselt [5]. Während der Perfusion mit UW-Lösung fanden wir einen sehr starken vasokonstriktorisches Effekt, der auf den sehr hohen Kaliumgehalt der Lösung zurückgeführt ist und eine längere Perfusion unter normoxischen Bedingungen erschwert hat. In HTK- und UW-Lösung werden verschiedene Puffer mit verschiedener Pufferkapazität verwendet. Die UW-Lösung enthält 25 mmol/l Kaliumphosphatpuffer (pKs-Wert 7,2), während die HTK-Lösung Histidin mit HCl in einem Verhältnis von 180 : 18 mmol/l (pKs-Wert) verwendet. Die Pufferkapazität in der HTK-Lösung ist mit 200 mmol/l höher als bei der UW-Lösung. Das Antioxidationspotential der UW-Lösung wird in einer tierexperimentellen Arbeit bei der Perfusion von Rattennieren höher beschrieben als die der HTK-Lösung [103]. Da pH-Wert-Schwankungen einen großen Einfluss auf die Stabilität des Ascorbatradikals haben, ist ein konstanter pH-Wert während der Perfusion in dieser Untersuchung wichtig, so dass in dieser Arbeit eine modifizierte HTK-Lösung verwendet wurde.

Aus klinischen Studien ist bekannt, dass die durch den Perfusionsschaden ausgelöste verzögerte Transplantatfunktion eindeutig mit einer Verkürzung des Transplantatüberlebens korreliert [15, 49, 65, 119].

Die kürzere Ischämiezeit der Lebendnierenspende im Vergleich zur postmortalen Nierenspende ist ein wesentlicher Grund für die deutliche Inzidenz der verzögerten Transplantatfunktion. Im Gegensatz dazu steht aber, dass die verzögerte Transplantatfunktion nach Lebendnierenspende trotz niedriger Inzidenz das Risiko für eine akute Abstoßung erhöht, was auch durch die schlechtere immunologische Übereinstimmung begründet ist [9]. Bei einer frühen Abstoßungsreaktion des Transplantates innerhalb eines Jahres kommt es gehäuft zu einer signifikanten Verkürzung des

Transplantatüberlebens [45]. Die Ursachen dafür können eine verstärkte Expression von MHC Klasse 1 und 2-Molekülen in der Niere im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens sein, was die Immunogenität des ischämiegeschädigten Transplantates steigert [106]. Die durch den frühen Ischämie-Reperfusionsschaden erhöhte Expression der MHC-Molekülen könnte den Zusammenhang zwischen der verzögerten Transplantatfunktion und der erhöhten Inzidenz einer akuten Abstoßung erklären. Um möglichst viele Transplantate zu schützen, wurde die Entwicklung der Erkenntnisse der Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens vorangetrieben. Diese intensive Forschung hat die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung des Ischämie-Reperfusionsschadens bzw. der daraus resultierenden verzögerten Transplantatfunktion beeinflusst.

Es wurden in jüngerer Zeit mehrere Therapieansätze zur Behandlung des Organspenders und des Transplantatempfängers geprüft. Zu diesen Therapiestrategien zählen der Einsatz inflammatorischer oder antioxidativer Pharmaka sowie der Einsatz von Vasodilatoren und Wachstumsfaktoren.

Takada et al. konnten im tierexperimentellen Modell durch den Einsatz des löslichen P-Selekin-Glykoprotein-Liganden (sPSGL) eine signifikante Reduktion des renalen Ischämie-Reperfusionsschadens erzielen, welcher das Rollen von Entzündungszellen entlang der aktivierten Endothelwand vermindert [123]. Ebenfalls wies die Arbeitsgruppe von Fuller et al. [46] nach, dass der Einsatz von sPSGL die postischämische Zirkulation nach Rattennierentransplantation signifikant verbessert und das Ausmaß der Tubuluszellnekrosen vermindert. Bislang gibt es dazu keine Angaben über den Einsatz von sPSGL in der humanen Nierentransplantation. Das Ausmaß bzw. die Menge der entstandenen Radikalen, welche zur Schädigung der Niere führten, konnte in den Arbeiten bis dato nicht quantitativ erfasst sondern nur qualitativ durch die histologische Beurteilung der Tubuluszellen beurteilt werden.

Zunehmend gewinnt die Vorbehandlung des Spenders bei Organentnahme an Bedeutung. Der initiale Vorteil bei der Spendervorbehandlung ist die so genannte Präkonditionierung, das heißt, die Induktion von Schutzmechanismen im Spenderorgan bereits vor Beginn der ischämischen Schädigung. Zum Einsatz kommen antioxidative Substanzen, die sowohl zur Behandlung des Spenders als auch des Empfängers verwendet werden können. Hierzu kamen verschiedene Substanzen zum Einsatz, die eine antioxidative Protektion besitzen.

An einem Nierentransplantationsmodell konnte nachgewiesen werden, dass eine Spendervorbehandlung mit N-Acetylcystein (NAC oder ACC) renoprotektiv wirkt [47]. Acetylcystein besitzt eine gute therapeutische Breite und eine gute antioxidative Wirkung, was wahrscheinlich über die Induktion der zelleigenen Glutathionsynthese zu erklären ist [27, 47].

In der Regel wird Acetylcystein als Mukolytikum bei Patienten eingesetzt, doch in jüngerer Zeit wurde es als Antioxidans als Schutz vor kontrastmittelinduzierter Nephrotoxizität verwendet [32]. In einem Tierversuch mit Kaninchen zeigte die Arbeitsgruppe von Lin et. al, dass eine Kombination aus 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribonucleoside (A1CAR) und N-acetylcystein (NAC) die Nierentransplantatfunktion nach 48stündiger kalter Ischämiezeit in UW-Lösung deutlich verbessert [69]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wäre anzunehmen, dass ein Acetylcystein als ein wichtiges Additivum für die zukünftige Organkonservierung zur Verfügung stehen sollte. Eine ebenfalls qualitative Messung des Reperfusionsschadens bzw. Bestimmung der Menge der gebildeten Radikale und damit die Beurteilung der Reduzierung des frühen Reperfusionsschadens durch die Verwendung von N-Acetylcystein fehlt bis dato in der Literatur. Mit den in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungsmöglichkeiten gibt es eine Chance, die Reduzierung des frühen Reperfusionsschadens durch N-Acetylcystein nachzuweisen. Somit könnte die Aussage, dass N-Acetylcystein ein Schutz für den Ischämie-Reperfusionsschaden ist, eventuell bestätigt werden.

Die Nierentransplantationsüberlebensrate hängt von verschiedenen Faktoren ab. Eine der wesentlichen Ursachen des langfristigen Transplantatverlustes ist die chronische Transplantatnephropathie, was klinisch durch eine zunehmende Eiweißausscheidung, einen langsamen Serum-Kreatinin-Anstieg sowie die Ausbildung eines arteriellen Hypertonus nachgewiesen werden kann [79]. Das histologische Bild einer chronischen Transplantatnephropathie ist gekennzeichnet von einer Vaskulopathie, interstitiellen Fibrosen, Tubulusatrophie sowie Glomerulopathie [93, 119].

Die Ausbildung einer chronischen Transplantatnephropathie hängt von verschiedenen Faktoren, zum Beispiel von alloantigenabhängigen (Histoinkompatibilität, Häufigkeit von akuten Abstoßungen) als auch von alloantigenunabhängigen Einflüssen (Patientencompliance, Nephrotoxizität von Medikamenten, Wiederauftreten der Grunderkrankung, Alter Lipidstatus, arterielle Hypertonie), ab [75, 93, 101, 124].

Zu den alloantigenunabhängigen Faktoren zählt auch die Schädigung der Transplantatnieren durch den aufgetretenen Ischämie-Reperfusionsschaden [91, 96, 122]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die verzögerte Aufnahme der Transplantatfunktion (delayed graft function, DGF) als sicherer Indikator für das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens gewertet werden kann. In Kombination mit dem höheren Alter des Spenders hatte die Nierentransplantationsrate mit einer verzögerten Transplantatfunktionsaufnahme die kürzeste Transplantatüberlebenszeit [80, 90]. Durch eine Reduzierung des Ischämie-Reperfusionsschadens könnte somit das Nierentransplantatüberleben verlängert werden. Dies lässt sich so erklären, dass im Zuge des Ischämie-Reperfusionsschadens reaktive Sauerstoff-Radikale (ROS) gebildet werden. Diese können zu einer Zerstörung der Zellen führen, welche eine Entzündungsreaktion hervorruft und somit die Mikrozirkulation behindert [101].

Der ischämische Reperfusionsschaden kann aber auch zu einer direkten Zell- und Gewebeschädigung führen und damit zu einer direkten Beeinflussung der Transplantatfunktion. Der Zellverlust und die gestörte Transplantatfunktion spielen eine wichtige Rolle bei der Auslösung von akuten Abstoßungsreaktionen [56, 66, 90]. Die Abstoßungsreaktion wird ursächlich beeinflusst durch eine vermehrte Produktion von Entzündungsmediatoren, was zu einer erhöhten Expression von MHC-II-Molekülen im Transplantat führt. Diese wiederum führt zu einer Steigerung der Allogenität [61]. In der Regel werden die gebildeten reaktiven Sauerstoff-Radikale (ROS) durch mehrere enzymatische (Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase sowie Katalase) und nicht enzymatische Reaktionen (Glutathion, Harnsäure, Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Karotinoide) inaktiviert [108]. Diese Stoffe werden auch als Antioxidantien (Stoffe, die in geringer Konzentration die Oxidation anderer Substanzen verhindern) bezeichnet [53]. Liegt ein Ungleichgewicht zwischen Oxidationsmitteln und Antioxidantien zugunsten ersterer vor, wird dies als oxidativer Stress bezeichnet. Das Vitamin C (Ascorbinsäure) nimmt eine zwiespältige Rolle ein, da es zum einen antioxidativ wirkt (Reduktion von Hydroxylradikalen und diversen organischen Radikalen) und zum anderen Eisen(III)-Ionen zu Eisen(II)-Ionen reduziert. Die wiederum übernehmen die Funktion der Superoxid-Radikale für die Produktion von ROS via Fenton-Reaktion [53]. Außerdem wird durch das Ascorbat reversibel die Katalase inhibiert, einem wichtigen Enzym zum Abbau von Wasserstoffperoxid [25]. Die antioxidative Wirkung vom Vitamin C scheint zu überwiegen [53].

Im Rahmen des Abbaus der Purinnukleotide (Adenosin, Guanosin) entsteht bei der Oxidation von Hypoxanthin und Xanthin Harnsäure. Harnsäure stellt den größten Anteil des antioxidativen Potentials des Plasmas dar [77]. Hydroxylradikale, Superoxid und Singulett Sauerstoff werden regeneriert, indem sie die Harnsäure zu Allantoin oxidieren [118, 76]. In seltenen Fällen entsteht bei der Reaktion der Harnsäure mit Radikalen auch ein Harnsäureradikal ($\text{HS}\cdot$). Ascorbinsäure reduziert das $\text{HS}\cdot$ und Harnsäure wird regeneriert [55]. Die antioxidative Wirkung von Harnsäure und Ascorbinsäure ist etwa gleich groß, nur dass die Konzentration von Harnsäure im Plasma wesentlich höher ist [77].

Den Primaten (z.B. Menschen) ist die Fähigkeit zum Abbau von Harnsäure verloren gegangen. Sie scheiden es mit dem Urin aus und erreichen im Plasma eine Konzentration von 0,2 bis 0,4 mM. *In vivo*-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass Harnsäure mit einer Vielzahl von Radikalen (z. B. Hydroxylradikalen, Lipidhydroperoxyden und reaktiven Stickstoffspezies) reagiert. Bei diesen Experimenten fällt auf, dass bei dieser Reduktion der Harnsäure keine weiteren reaktiven Produkte (z.B. stabilere Radikale) entstehen, sondern sich in stabile Produkte (Allantoin oder Oxalat, die keine freien Elektronen besitzen) umwandeln [33]. Durch die relativ feste Bindung von Eisen(III)-Ionen kann Harnsäure eine zusätzliche Hydroxyl-Radikal-Produktion via Haber-Weiss-Reaktion verhindern. Das hat zur Folge, dass Hypoxanthin (HX) akkumuliert wird und es zu einer Aktivierung der lytischen Enzyme kommt [11]. Die Pyrimidindinukleotide sind unter ischämischen Bedingungen in weitgehend reduzierter Form ($\text{NADH}_2/\text{NADPH}_2$) in der Zelle zu finden.

Im Nierengewebe kann ein Sauerstoffmangel während der Ischämie innerhalb von wenigen Minuten zu einem nahezu vollständigen Abbau von ATP führen. Bei einer weiteren andauernden Ischämie kommt es zu keiner weiteren ATP-Verarmung in der Zelle [1 – 3]. Ein Denkansatz für diesen Mechanismus ist der Verlust der Vitalität von sauerstoffabhängigen Zellen als Folge des Energieabfalls [26]. Im Mittelpunkt dieser Hypothese steht eine Störung der Ionenhomöostase, insbesondere eine Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (z. B. Hepatozyten) [8]. Diese für den Zelluntergang ist eine Aktivierung von Hydrolasen (Phospholipasen, Proteinasen und Endonukleasen) durch die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration. Durch den ATP-Mangel kommt es zusätzlich zur Abnahme der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase mit einem nachfolgenden Zellödem [4]. Mit zunehmender Ischämiedauer summieren sich die irreversiblen

Schäden der subzellulären Strukturen und damit die Zunahme der Ödembildung. Diese kann als Folge eine Verlegung der Gefäßlumina haben und dadurch die Entstehung des so genannten „non-reflow“ Phänomens der Ischämie bewirken. Die Pathogenese des „non-reflow“ Phänomens wird kontrovers diskutiert [98].

Weiterhin ist die Bedeutung des Abfalls der energiereichen Phosphatverbindungen (ATP, ADP, AMP) im Gewebe während der kalten Ischämie bezüglich der Vitalität des Organes noch unklar [37]. Eine Diskrepanz zwischen Energiestatus und Ischämietoleranz sowie eine inverse Beziehung zwischen anaerober Energieumsatzrate und Strukturhaltung kann man an dem Nierengewebe beobachten. Eine Konservierung der Niere während der kalten Ischämie mit einer energiereichen Lösung, z.B. EC-Lösung, hat in der Summe negativere Auswirkungen auf die Strukturhaltung als energieärmere Lösungen [10]. Einen erheblichen ATP-Mangel ohne negative Zellstörung können die Nierentubulusepithelzellen tolerieren [132]. Am empfindlichsten reagieren die proximalen Nierentubulusanteile auf eine ischämische Unterversorgung [68]. Das Glomerula und das Nierengefäßsystem weisen morphologisch nach einer Ischämie und nachfolgender Reperfusion nur geringe Schädigungen auf [16, 68].

Einen Zusammenhang zwischen Gehalt an energiereichen Adeninnukleotiden (ATP, ADP, AMP, Phosphorylierungspotential) am Ende der kalten Ischämie und dem ischämischen Schaden nach der Reperfusion auf die Organvitalität konnte in verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen bei der Leber [16, 94, 116], bei der Niere [17, 103, 113] und dem Pankreas [43, 44, 67] nachgewiesen werden. Eine kontroverse Diskussion gibt es über die Bedeutung der Abbauprodukte der Adeninnukleotide (Adenosin, Inosin, Hypoxanthin, Xanthin) am Ende der kalten Ischämie [5, 35, 130]. Sie bilden einerseits als Ausgangsprodukte für die ATP-Resynthese [130] und sind auch Ausgangspunkt für die Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale während der Reoxygenierung des Gewebes [35]. Andererseits wird auch ein Auswascheffekt aus dem Gewebe durch die Reperfusion diskutiert [5, 129]. Für die Organvitalität ist es von größerer Bedeutung, wie schnell die Organe nach der Reperfusion zur Resynthese von ATP in der Lage sind, als der Abfall des Energiepotentials am Ende der Ischämie [37, 131]. In der tierexperimentellen Arbeit von Semmelmann et al. hatte die Rattennieren, die eine höhere Menge an ATP aufwiesen, nach der Reperfusion eine geringere Menge an ROS gebildet [103].

Das Hypoxanthin-Xanthinoxidase-System ist hauptsächlich nach der Reperfusion für die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen verantwortlich [11]. Die ROS bewirken

über die Lipidperoxidation eine Desintegration der Zellmembran und aktivieren gleichzeitig polymorphkernige Leukozyten, welche den Gewebsschaden unter anderem durch weitere Produktion von Sauerstoffradikalen verstärken können [57, 81, 100]. Ein wichtiger Radikalgenerator während der Reperfusionphase ist die Xanthinoxidase [11]. In verschiedenen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung von Xanthinoxidaseinhibitoren (z.B. Allopurinol oder Oxypurinol) der Reperfusionsschaden signifikant geringer ausfiel [18, 19, 48, 62, 63, 74, 78, 117]. Der primäre Radikalanstieg zeigte sich auch in diesen Studien adäquat zu unseren Ergebnissen in den ersten 10 Minuten der Reperfusion.

Die Bedeutung reaktiver Sauerstoffradikale beim Ischämie- / Reperfusionsschaden beruhen größtenteils auf den Erkenntnissen von tierexperimentellen Forschungsergebnissen. Unter physiologischen Bedingungen werden kleinen Mengen von ROS gebildet und durch physiologische Antioxidantien neutralisiert. Bei einer Sauerstoffminderversorgung der Zelle nimmt die Menge der ROS zu und die Kapazität der Antioxidantien ab [12, 20]. Zu einer exzessiven Freisetzung von Radikalen kommt es während der Reperfusion durch den oxidativen Abbau von Stoffwechselprodukten. Die dabei entstehenden ROS werden aufgrund der nicht mehr ausreichenden Pufferkapazität der Antioxidationen unzureichend neutralisiert.

Eine Qualifizierung als auch eine Quantifizierung der Radikalproduktion in der Phase der Reperfusion konnten wir durch die Verwendung des Ischämie-Reperfusionss-Modell mit einer *in vitro* perfundierten Rattenniere oder im Nierenhomogenat nachweisen [70, 71]. Ascorbat ist in der Lage, während der Reperfusion die entstehenden Radikale zu reduzieren und somit den ischämischen Reperfusionsschaden zu verringern [38, 70, 104].

Bei der Nierentransplantation oder auch bei nierenerhaltenen onkologischen Eingriffen in warmer oder kalter Ischämie kommt es zu einer überschießenden Bildung der Sauerstoff-Radikale, weil die genannten Inaktivierungssysteme durch Energie-Substratmangel durch die bestehende Hypoxie zunächst nicht vollständig funktionsfähig sind und die Entgiftungskapazität nach Reoxygenation durch die vermehrte Freisetzung der Sauerstoff-Radikale überschritten werden [93]. So kommt es zu einem Zellschaden im Rahmen des ischämischen Reperfusionsschadens. Eine mögliche Reduzierung des ischämischen Reperfusionsschadens wird primär durch Dauer der warmen bzw. kalten Ischämiezeit beeinflusst [96].

Viele neue Therapie-Optionen im Tiermodell (Modellierung von Entzündungsreaktionen, Antithrombin 3-Substitution, ischämische Präkonditionierung, Blockierung von Komplement-Aktivierungen) bieten eine Möglichkeit, die vermehrte Entstehung von Radikalen nach einem hypoxischem Schaden (z.B. Organentnahme, Unterbrechung der arteriellen Blutzufuhr, cardiogener Schock) zu reduzieren und damit den ischämischen Reperfusionsschaden zu senken. Neuere Therapie-Optimierungen im tierexperimentellen Modell müssen aber noch in der klinischen Anwendung bestehen [23, 88]. In der vorliegenden Arbeit können wir mit Hilfe unserer Ergebnisse des experimentellen Aufbaues die quantitative Messung der Radikale ermöglichen und den direkten Einfluss der möglichen Präkonditionierungen (z.B. Antioxidantien, Antithrombin I-Substitution) im direkten Versuch messen und somit auch ableiten, ob der Versuchansatz das Potential für eine Reduktion des ischämischen Reperfusionsschadens hat.

6. Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1: Bildungs- und Entgiftungsreaktionen IR-relevanter ROS

- (1) $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ (Superoxidradikal-Anion)
- (2) $O_2 + 2e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$ (Wasserstoffperoxid)
- (3) $O_2 + 3e^- \rightarrow \bullet OH$ (Hydroxylradikal)
- (4) $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \bullet OH + OH^- + Fe^{3+}$ (FENTON)
- (5) $H_2O_2 + O_2^- \rightarrow OH^- + OH + O_2$ (HABER-WEISS)
- (6) $Fe^{3+} + O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ (HABER-WEISS)
- (7) $O_2^- + NO + H^+ \rightarrow ONOOH$ (Peroxynitrit)
- (8) $ONOOH \rightarrow OH + \bullet NO_2$
- (9) PUFA + $\bullet OH$ (H₂O + R \bullet) (Initiierung der Lipid Peroxidation)
- (10) $X + NAD^+ + H_2O \rightarrow HS + NADH_2$ (XDH-Reaktion)
- (11) $HX + H_2O + O_2 \rightarrow X + O_2^- / H_2O_2$ (XO-Reaktion)
- (12) $X + H_2O + O_2 \rightarrow HS + O_2^- / H_2O_2$ (XO-Reaktion)
- (13) $2 O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (SOD)
- (14) $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$ (GPx)
- (15) $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ (CAT)
- (16) $H_2O_2 + Cl^- \rightarrow H^+ + OCl^- + OH^-$ (MPX)
- (17) $OCl^- + H_2O_2 \rightarrow Cl^- + H_2O + 1O_2$

(leicht modifiziert nach Brömme HJ, Loertzer H, Akçetin Z [11])

Tabelle 2: Nachweis- und Quantifizierungsmöglichkeiten von ROS:

ROS	Nachweis und Quantifizierung
Superoxidradikal	<ul style="list-style-type: none"> • ESR-Technik in Kombination mit <i>spin-traps</i> (z.B. DMPO, DEPMPO) • Chemilumineszenz-Technik unter Verwendung von Lucigenin bzw. Coelenterazin • Cytochrom c-Reduktion (UV-VIS-Spektroskopie, 550 nm) • Formazanbildung aus NBT (UV-VIS-Spektroskopie, 570nm)
Wasserstoffperoxid	<ul style="list-style-type: none"> • UV-VIS-Spektroskopie (bei 240 nm) • Fluoreszenzspektroskopie (z.B. Homovanillinsäure+Peroxidase) • Elektrochemisch (High Resolution Respirometry)
Hydroxylradikal	<ul style="list-style-type: none"> • ESR-Technik unter Verwendung von <i>spin-traps</i> (z.B. DMPO, DEPMPO) oder <i>spin-label</i> (z.B. Hydroxy-TEMPO, 3-Carboxy- PROXYL) • Bestimmung geeigneter stabiler Folgeprodukte einer vorangegangenen OH•-Attacke <ul style="list-style-type: none"> LPO: z.B. Malondialdehyd (UV-VIS-Spektroskopie) DNS: z.B. 8-OH-Guanosin (HPLC) Zytoplasma: z.B. Hydroxylierung von Salicylsäure, Alanin, Tyrosin etc. (UV-VIS, HPLC etc.)
Stickstoffmonoxid	<ul style="list-style-type: none"> • ESR-Technik unter Verwendung einer <i>spin-trap</i> (z.B. MGD) • Fluoreszenzspektroskopie (z.B. 2,3 Diaminonaphthalen) • Elektrochemisch (Clark Elektrode) • UV-VIS-Spektroskopie (Griess-Reagenz, 548 nm)
Peroxinitrit	<ul style="list-style-type: none"> • Tyrosinnitrosylierung in Proteinen etc.
Singulett Sauerstoff	<ul style="list-style-type: none"> • IR-Spektroskopie, Lichtemission bei 1268 bzw. 1642 nm

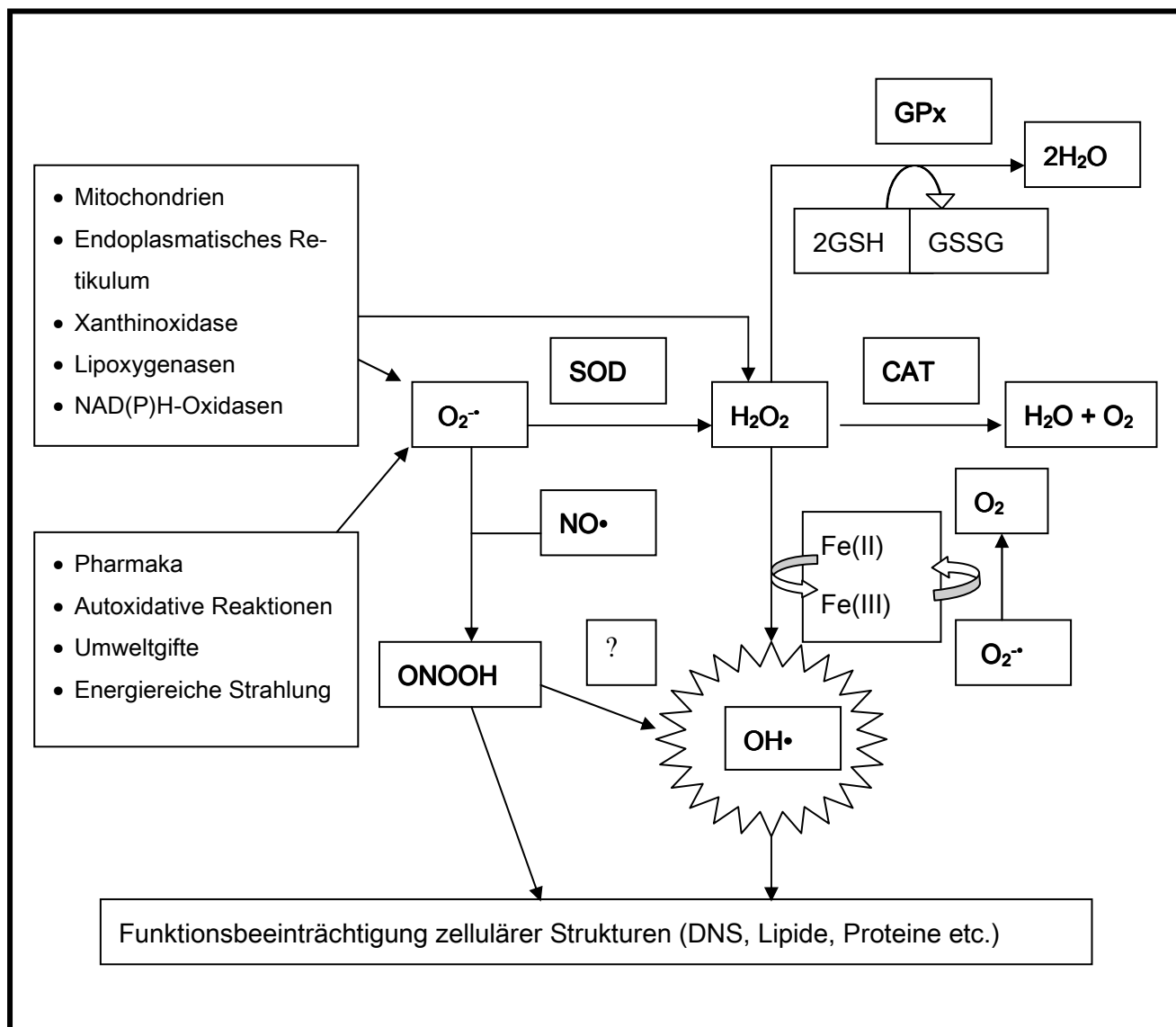
(leicht modifiziert nach Brömme HJ, Loertzer H, Akçetin Z [11])

Tabelle 3: Standard-Redoxpotentiale (E^0) mV bei pH 7.0 für ausgewählte Redoxpaare

Redoxpaar	Name	Standard-Redoxpotential mV
•OH, H(+)/H ₂ O	Hydroxylradikal	2310
RO•, H(+)/ROH	Alkoxyradikal	1600
ROO•, H(+)/ROOH	Alkylperoxyradikal	100
GS•, H(+)/GSH	Glutathylradikal	920
PUFA•, H(+)/PUFA-H	Lipidradikal	600
TO•, H(+)/TOH	Tocopherylradikal	480
Asc•(-), H(+)/AscH(-)	Ascorbatradikal	282
Fe(III)-EDTA/Fe(II)-EDTA		120
•O ₂ (-)/O ₂		-330
Fe(III)-DF/Fe(II)-DF		-450
•RSSR/RSSR		-1500
H ₂ O/e(-) (aq)		-2870

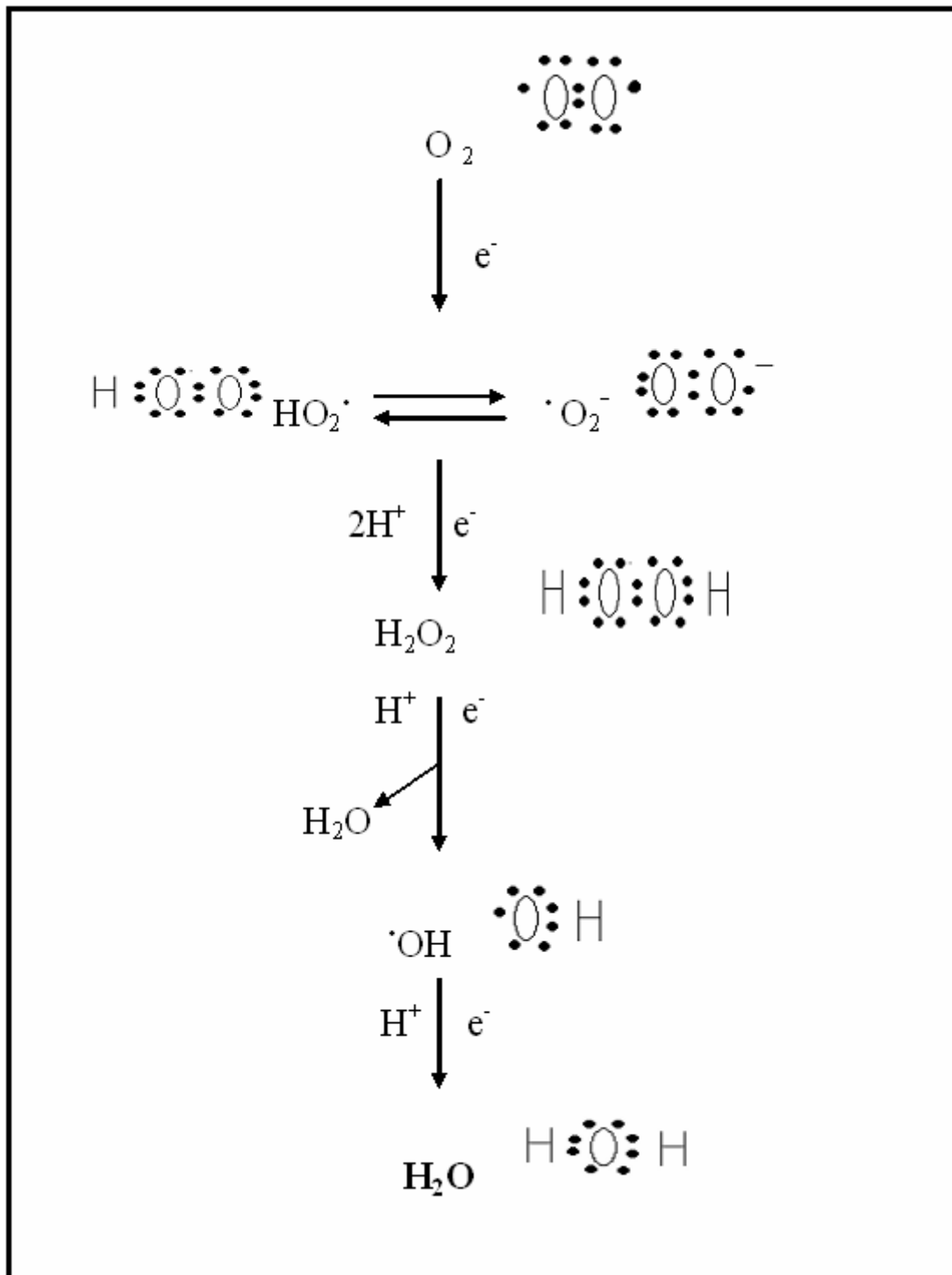
(nach Buettner GR and Jurkiewicz BA [12])

Abbildung 1: Biologisch relevante Quellen der Bildung und Möglichkeiten der Entgiftung von ROS



(leicht modifiziert nach Brömme HJ, Loertzer H, Akçetin Z [11])

Abbildung 2: Sauerstoffautoxidation



(leicht modifiziert nach Brömme HJ, Loertzer H, Akçetin Z [11])

7. Literaturverzeichnis

- 1 Akcetin Z, Busch A, Kessler G, Heynemann H, Holtz J, Brömme H. Evidence for only a moderate lipid peroxidation during ischemia- reperfusion of rat kidney due to its high antioxidative capacity. *Urol Res* 1999; 27: 280-284.
- 2 Akcetin Z, Erdemli G, Brömme HJ. Experimental study showing a diminished cytosolic antioxidative capacity in kidneys of aged rats. *Urol Int* 2000; 64: 70-73.
- 3 Akçetin Z, Pregla R, Busch A, Kessler G, Heynemann H, Holtz J, Brömme H. Lipid peroxidation and the expressional regulation of the heat-shock response during ischemia-reperfusion of rat kidney. *Urol Int.* 2000; 65(1): 32-9.
- 4 Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673-676.
- 5 Booster MH, Van der Vusse GJ, Wijnen RMH, Yin M, Stubenitsky BM, Koostra G. University of Wisconsin solution is superior to histidin tryptophane ketoglurate for preservation of ischemically damaged kidneys. *Transplantation* 1994; 58: 979-984.
- 6 Bors W, Buettner GR. The vitamin C radical and its reactions. *Vitamin C in Health and Disease* , Marcel Dekker Inc. , New York 1997, Chapter 4 pp 75-94
- 7 Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1973; 134: 707-716.
- 8 Brecht M, Brecht C, de Groot H. Late steady increase in cytosolic Ca²⁺ preceding hypoxic injury in hepatocytes. *Biochem J* 1992; 283: 399-402 .
- 9 Brennan TV, Freise CE, Fuller TF, Vincenti F, Chan S, Chang CK, Bostom A, Zlatunich JK, Tomlanovich SJ, Feng S. Early graft function after living donor kidney transplantation predicts rejection but not outcomes. *Am J Transplant* 2004; 4: 971-979.
- 10 Bretschneider HJ, Helmchen U, Kehrer G. Nierenprotektion. *Klin. Wochenschrift* 1988; 66: 817-827.
- 11 Brömme HJ, Loertzer H, Akçetin Z. Postischemic reperfusion injury. *Biochemical and methodological principles.* *Urologe A* 2002; 41: 159-63.
- 12 Buettner GR and Jurkiewicz BA. Catalytic metals, ascorbate, and free radicals: combinations to avoid. *Rad Research* 1996; 145: 532-541.

- 13 Buettner GR, Jurkiewicz BA. Ascorbat radikal: A valuable marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic Biol Med.* 1993; 14: 49-55.
- 14 Burkitt, M. ESR spin trapping studies into the nature of the oxidizing species formed in the Fenton reaction: Pitfalls associated with the use of 5,5-DMPO in the detection of the hydroxyl radical. *Free Radic. Res.* 1993; 18: 43 – 57.
- 15 Burne-Taney MJ, Rabb H. The role of adhesion molecules and T cells in ischemic renal injury. *Kidney Int* 2004; 66: 542-557.
- 16 Büsing M, Hopt UT , Schareck W , Ernst M , Morgenroth K. Ultrastructural changes of different preserved human kidney allografts before and after reperfusion. *Transplant Proc* 1990; 22: 448-449.
- 17 Calman KC. The prediction of organ viability: 2. Testing an hypothesis. *Cryobiology* 1974; 11: 7-12.
- 18 Chambers DJ, Takahashi A, Humphrey SM, Harvey DM, Hearse DJ. Allopurinol-enhanced myocardial protection does not involve xanthine oxidase inhibition or purine salvage. *Basic Res Cardiol.* 1992; 87: 227-38.
- 19 Coghlan JG, Flitter WD, Clutton SM, Panda R, Daly R, Wright G, Ilesley CD, Slater TF. Allopurinol pretreatment improves postoperative recovery and reduces lipid peroxidation in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994; 107: 248-56.
- 20 Cohen MV. Free Radicals in Ischemic and Reperfusion Myocardial Injury : Is this the Time for Clinical Trials? *Anal of Internal Medicine* 1989; 111: 918-931.
- 21 Collins GM, Bry WI, Warren R, Mollenkopf F, Feduska NJ. Clinical comparison of UW with Collins' solution for cadaveric kidney preservation. *Transplant Proc.* 1991; 23: 1305-6.
- 22 Crow JP, Beckman JS. Reactions between nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: Footprints of peroxynitrite in vivo. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 17-43.
- 23 Daemen MA, de Vries B, Burman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury. *Transplantation* 2002; 73: 1693- 1700.
- 24 Davies K, Sevanian A, Muakkassah-Kelly S, Hochstein P. Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J* 1986; 235 (3): 747.
- 25 Davison A, Kettle A, Fatur DJ. Mechanism of the inhibition of catalase by ascorbate. Roles of active oxygen species, copper and semidehydroascorbate. *J Biol Chem.* 198; 261(3): 1193-200.

- 26 De Groot H, Hopt UT, Büsing M, Becker DH. Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens. Kager Verlag, Freiburg, 1994, S. 1-8.
- 27 De Vries N, De Flora S. N-acetyl-l-cysteine. J Cell Biochem Suppl 1993, 17F: 270-277.
- 28 Dean RT, Hunt JV, Grant AJ, Yamamoto Y, Niki E. Free radical damage to proteins : the influence of the relative localization of radical generation, anti-oxidants and the target proteins. Free radical biology and medicine 1991; 11: 1260-1264.
- 29 Dikalov S, Skatchkov M, Bassenge E. Spin trapping of superoxide radicals and peroxynitrite by 1-hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine and 1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants. Biochem Biophys Res Commun 1997; 231: 701-704.
- 30 Dikalov S, Skatchkov M, Fink B, Bassenge E. Quantification of superoxide Radicals and Peroxynitrite in Vascular Cells using Oxidation of Sterically hindered Hydroxylamines and electron spin resonance. Nitric Oxide: Biology and Chemistry 1997; 1 (5): 423.
- 31 Dikalova AE, Kadiiska MB, Mason RP. An in vivo ESR Spin-trapping study: Free radical generation in rats from formate intoxication- role of the Fenton reaction. PNAS 2001; 98 (24): 13549-13553.
- 32 Dulkanchainun TS, Goss JA, Imagawa DK, Shaw GD, Anselmo DM, Kaldas F, Wang T, Zhao D, Busuttil AA, Kato H, Murray NG, Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Reduction of hepatic ischemia/reperfusion injury by a soluble P-selectin glycoprotein ligand-1. Ann Surg 1998; 227: 832-840.
- 33 Elstner E (ed). *Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin*. Mannheim; Wien; Zürich, BI-Wissenschaftsverlag 1990.
- 34 Esterbauer H. Estimation of peroxidative damage. A critical review. Pathol Biol 1996; 44: 25-28.
- 35 Fernando AR, Armstrong DM, Griffiths JR, Hendry WF, O'Donoghue EP, Perrett D, Ward JP, Wickham JE. Enhanced preservation of the ischaemic kidney with inosine. Lancet. 1976; 1: 555-7.
- 36 Fink B, Dikalov S, Bassenge E. A new approach for extracellular spin trapping of nitroglycerin induced superoxide radicals both *in vitro* and in vivo. Free Radical Biology & Medicine 2000; 28: 121 -128.

- 37 Finn WF. Prevention of ischemic injury in renal transplantation. *Kidney International* 1990; 37: 171-182.
- 38 Fischer JH, Kulus D, Hansen-Schmidt I, Isselhard W. Adenin nucleotide levels of canine kidneys during hypothermic aerobic or anaerobic storage in collins solution. *Eur Surg Res* 1981; 113: 178-188.
- 39 Frei B, England L, Ames BN. Ascorbat is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 6377-6381.
- 40 Frei B, Forte TM, Ames BN, Cross CE. Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. *Biochem J* 1991; 277: 133-138.
- 41 Frei B, Kim MC, Ames BN. Ubiquinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87: 4879-83.
- 42 Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Medical Sciences* 1988; 85: 9748-9752.
- 43 Fujino Y, Kuroda Y, Morita A, Tanioka Y, Ku Y, Saitho Y. The effect of fasting and exogenous adenosine on ATP tissue concentration and viability of canine pancreas grafts during preservation by the two-layer method. *Transplantation* 1993; 56: 1083-1086.
- 44 Fujino Y, Kuroda Y, Saitho Y. Adenine nucleotides metabolism of the canine pancreas during preservation by the two – layer cold storage method. *Kobe J Med Sci* 1991; 37: 255-263.
- 45 Fuller TF, Feng S, Brennan TV, Tomlanovich S, Bostrom A, Freise CE. Increased rejection in living unrelated versus living related kidney transplants does not affect short-term function and survival. *Transplantation* 2004; 78: 1030-1035.
- 46 Fuller TF, Sattler B, Binder L, Vetterlein F, Ring B, Lofr T. Reduction of severe ischemia/reperfusion injury in rat kidney grafts by a soluble P-selectin glycoprotein ligand. *Transplantation* 2001; 72: 216-222.
- 47 Fuller TF, Sekova N, Niemann CU, Freise CE. Influence of donor pretreatment with n-acetylcysteine on ischemia/reperfusion injury in rat kidney grafts *J Urol* 2004; 171: 1296-1300.
- 48 Godin DV, Ko K. Allopurinol and ischemia/reperfusion injury: new use for an old drug? *Can J Cardiol.* 1991; 7(4): 163-9.

- 49 Gonzalez N, Alvarez V, Pons H et al. Mycophenolate mofetil aggravates postischemic acute renal failure in rats. *Transplant Proc* 2002; 34: 43-44.
- 50 Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899: 136-47.
- 51 Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: an overview. *Methods Enzymol* 1990; 186: 1-85.
- 52 Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 1992; 307: 108-112.
- 53 Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine.* Oxford: Oxford University Press, 2000.
- 54 Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984; 219: 1-14.
- 55 Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of Human Extracellular Fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.
- 56 Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-612.
- 57 Hoffmann T, Kübler J, Meßmer K. Bradykinin-Antagonisierung bei Ischämie und Reperfusion des Pankreas. *Zentralbl Chir* 1996; 121: 412-423.
- 58 Hornig D. Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann N Y Acad Sci.* 1975; 258: 103-18.
- 59 Hossain MA, Asada K. Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenin dinucleotide enzyme *J Biol Chem* 1985; 260: 12920-12926.
- 60 Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Suematsu N, Hayashidani S, Ichikawa K, Utsumi H, Machida Y, Egashira K, Takashita A. Direct evidence for increased hydroxyl radicals originating from superoxide in failing myocardium. *Circ Res* 2000; 86: 152-157.
- 61 Joosten SA, Van Kooten C, Paul LC. Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transpl Int* 2003; 16: 137-145.
- 62 Kang SM, Lim S, Song H, Chang W, Lee S, Bae SM, Chung JH, Lee H, Kim HG, Yoon DH, Kim TW, Jang Y, Sung JM, Chung NS, Hwang KC. Allopurinol modulates reactive oxygen species generation and Ca²⁺ overload in ischemia-reperfused heart and hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol.* 2006; 535(1-3): 212-9.

- 63 Kinugasa Y, Ogino K, Furuse Y, Shiomi T, Tsutsui H, Yamamoto T, Igawa O, Hisatome I, Shigemasa C. Allopurinol improves cardiac dysfunction after ischemia-reperfusion via reduction of oxidative stress in isolated perfused rat hearts. *Circ J* 2003; 67(9): 781-7.
- 64 Klinker R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2003
- 65 Kluth DC, Erwig LP, Rees AJ. Multiple facets of macrophages in renal injury. *Kidney Int* 2004; 66: 542-557.
- 66 Kouwenhoven EA, de Bruin RW, Bajema IM, Marquet RL, Ijzermans JN. Gold ischemia augments allogeneic-mediated injury in rat kidney allografts. *Kidney Int* 2001; 59: 1142-1148.
- 67 Kuroda Y, Fujino Y, Morita A, Ku Y, Saitoh Y. Correlation between high adenosine triphosphate tissue concentration and good posttransplant outcome for the canine pancreas graft after preservation by the two – layer cold storage method. *Transplantation* 1991; 52: 989-991.
- 68 Lam FT, Aparicio SR, Giles GR. Changes in proximal tubular morphology following hypothermic storage in two preservation solutions. A comparative study using canine and porcine kidneys. *Transplantation* 1990; 50: 902-906.
- 69 Lin A, Sekhon C, Sekhon B, Smith A, Chavin K, Orak J, Singh I, Singh A. Attenuation of ischemia-reperfusion injury in a canine model of autologous renal transplantation. *Transplantation* 2004; 78(5): 654-659.
- 70 Loertzer H, Bauer S, Mörke W, Fornara P, Brömme HJ. Formation of ascorbate radicals as a measure of oxidative stress: an *in vitro* electron spin resonance-study using 2,2-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride as a radical generator. *Transplant Proc.* 2006; 38(3): 674-8.
- 71 Loertzer H, Laubner S, Chipkonvenski K, Fornara P, Brömme: The Carboxyl-Derived spin trap (CP-H) can act under definite conditions as appropriate detector-compound for oxidative stress. *Transpl int* 2007; 2(Suppl 2): 208.
- 72 Lottspeich F, Zorbas H. *Bioanalytik*. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
- 73 M. Rogers, *J Chem Soc* 1956, 2784.
- 74 Manning AS, Coltart DJ, Hearse DJ. Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ Res.* 1984; 55(4): 545-8.

- 75 Matas AJ, Gillingham KJ, Humar A, Dunn DL, Sutherland DE, Najarian JS. Immunologic and nonimmunologic factors: different risks for cadaver and living donor transplantation. *Transplantation* 2000; 69: 54-58.
- 76 Meyers RA (ed). *Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine*. Wiley, John & Sons, Incorporated; Vols 15 edition; 1996
- 77 Mikami T, Kita K, Tomita S, Qu GJ, Tasaki Y, Ito A. Is allantoin in serum and urine a useful indicator of exercise- induced oxidative stress in humans? *Free Radic* 2000; 32(3): 235-44.
- 78 Miwa-Nishimura N, Kanaide H, Abe S, Nakamura M. Does allopurinol prevent myocardial injury as a result of hypoxia-re-oxygenation in rats? *Int J Exp Pathol*. 1990; 71(5): 727-39.
- 79 Mizutani A, Okajima K, Uchiba M, Isobe H, Harada N, Mizutani S, Noguchi T. Antithrombin reduces ischemia/reperfusioninduced renal injury in rats by inhibiting leucocyte activation through promotion of prostacyclin production. *Blood* 2003; 101: 3029-3036.
- 80 Moreso F, Seron D, Gil-Vernet S, Riera L, Fulladosa X, Ramos R, Alsina J, Grinyo JM. Donor age and delayed graft function as predictors of renal allograft survival in rejection-free patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 930-935.
- 81 Nagel E, Niechzial M, Meyer zu Wilsendorf A, Pichlmayr R. Sauerstoffradikale und Antioxidantien in der Organtransplantation-eine Übersicht. *Transplant* 1995; 7: 159-165.
- 82 Naidu KA. Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition J* 2003; 2: 1-10.
- 83 Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y. Inhibition of Oxidation of Methyl Linoleate in Solution by Vitamin E and Vitamin C. *The Journal of Biological Chemistry* 1984; 259(7): 4177-4181.
- 84 Niki E. Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol* 1990; 186: 100-108.
- 85 Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1988; 5: 113-124.

- 86 Ohkohchi N, Sakurada M, Endoh T, Koyamada M, Katho H, Koizumi M, Orii T, Satomi S, Tagucchi Y, Mori S. Role of free radicals and energy synthesis on primary graft nonfunction in liver transplantation. *Transplant Proc* 1991; 23: 2416-2419.
- 87 Ohlenschläger G. Freie Radikale, Oxidativer Stress und Antioxidantien. R Reglin Verlag Köln 1990.
- 88 Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: 608-627.
- 89 Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 1997; 174: 305-319.
- 90 Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; 346: 580-590.
- 91 Paul LC. New insights in chronic allograft rejection. *Curr Opin Urol* 2002; 12: 89-93.
- 92 Qi Chen ; Espey MG , Krishan MC, Mitchell JB, Croke CP, Buettner GR, Shacter E, Levine M : Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(38): 13604-9.
- 93 Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, Furness P, Gaber LW, Gibson IW, Glotz D, Goldberg JC, Grande J, Halloran PF, Hansen HE, Hartley B, Hayry PJ, Hill CM, Hoffman EO, Hunsicker LG, Lindblad AS, Yamaguchi Y. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999; 55: 713- 723.
- 94 Reckendorfer H, Burgmann H, Spieckermann PG. Hepatic energy metabolism during hypothermic storage and reperfusion using different protection solution. *Eur Surg Res* 1992; 24: 339-348.
- 95 Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 359-384.
- 96 Roodnat JI, Mulder PG, Van Riemsdijk IC, IJzermans JN, van Gelder T, Weimar W. Ischemia times and donor serum creatinine in relation to renal graft failure. *Transplantation* 2003; 75: 799-804.

- 97 Rose RC, Bode AM. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J.* 1993; 7 (12): 1135-42.
- 98 Sakorafas GH, Tsiotos GG, Sarr MG. Ischemia/Reperfusion-Induced pancreatitis. *Dig Surg.* 2000; 17(1): 3-14.
- 99 Sambrook J, et al. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. 1989; Vol. 3, B.12.
- 100 Schoenberg MH, Beger HG. Sauerstoffradikale und postischämische Organschäden-Pathophysiologie, klinische Relevanz und Therapie. *Zentralbl Chir* 1985; 120: 174 -185.
- 101 Schwarz C, Oberbauer R. The influence of organ donor factors on early allograft function. *Curr Opin Urol* 2003; 13: 99-104.
- 102 Scott G (ed). *Antioxidants in Science, Technology, Medicine and Nutrition.* Chichester, Albion Publishing Limited, 1997.
- 103 Semmelmann A, Neeff H, Sommer O, Thomusch O, Hopt UT, von Dobschuetz E. Evaluation of preservation solutions by ESR-spectroscopy: superior effects of University of Wisconsin over Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate in reducing renal reactive oxygen species. *Kidney Int.* 2007; 71(9): 875-81.
- 104 Sharma MK , Buettner GR, Spencer KT, Kerber RE. Ascorbyl Free Radical as a Real-time Marker of Free Radical Generation in Briefly Ischemic and Reper-fused Hearts. An Elektron Paramagnetic Resonance Study. *Circulation Research* 1994; 74(4): 650-658.
- 105 Shimamura T, Fujimura Y, Ukeda H. Electron spin resonance analysis of superoxide anion radical scavenging activity with spin trapping agent, diphenyl-PMPO. *Anal Sci.* 2007; 23(10): 1233-35.
- 106 Shoskes DA, Halloran PR. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol* 1996; 155: 1831-1840.
- 107 Sies H. Biochemie des oxidativen Stress. *Angew Chem* 1986; 98: 1061-1075.
- 108 Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291-295.
- 109 Simm A, Brömme H-J. Reactive oxygen species (ROS) and aging : Do we need them- can we measure them – should we block them? *Signal Transduction* 2005; 3: 115-125.
- 110 Skulachev VP. Membrane-linked systems preventing superoxide formation. *Biosci Rep* 1997; 17: 347-366.

- 111 Sohal RS, Allen RG, Nations C. Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation : an hypothesis. *J Free Radic. Biol. Med.* 1986; 2: 75 – 81.
- 112 Sohal RS, Allen RG. Relationship between metabolic rate , free radicals, differentiation and aging : a unified theory. *Basic Life Sci.* 1985; 35: 75-104.
- 113 Southard JH, Rice MJ, Belzer FO. Preservation of renal function by adenosine stimulated ATP synthesis in hypothermically perfused dog kidneys. *Cryobiology* 1985; 22: 237-242.
- 114 Southern PA, Powis G. Free Radicals in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin. Proc.* 1988; 63: 390-408.
- 115 Steffan J. Bestimmung von L-Ascorbinsäure und Dehydro-L-ascorbinsäure in Humanplasma und Leukozyten mit HPLC/UV und HPLC/EC. Fachbereich Chemie und Chemietechnik Paderborn: Universität-Gesamthochschule Paderborn, 1999: 178.
- 116 Steininger R, Roth E, Holzmüller H, Grünberger T, Sperlich M, Burgmann H, Moser E, Feigl W, Mühlbacher F. Comparison of HTK – and UW- solution for preservation tested in an orthotopic liver transplantation model in the pig. *Transplant Int* 1992; 5(Suppl 1): 403-407.
- 117 Stewart JR, Crute SL, Loughlin V, Hess ML, Greenfield LJ. Prevention of free radical-induced myocardial reperfusion injury with allopurinol. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985; 90(1): 68-72.
- 118 Stryer L (ed). *Biochemistry*, Third Edition, Freeman and Company, New York, 1996
- 119 Sun DF, Fujigaki Y, Fujimoto T et al. Myophenolate mofetil inhibits regenerative repair in uranyl acetate-induced acute renal failure by reduced interstitial cellular response. *Am. J Pathol* 2002; 161: 217-227.
- 120 Sussman MS, Bulkley GB (1990) Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. *Methods Enzymol* 1990; 186: 711-723.
- 121 Swartz HM, Sentjurc M, Morse PD. Cellular metabolism of water-soluble nitroxides: effect on rate of reduction of cell/nitroxide ratio, oxygen consumption and permeability of nitroxides. *Biochem Biophys Acta* 1986; 888: 82-90.
- 122 Szabo A, Heemann U. Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. *Transplant Proc* 1998; 30: 4281-4284.

- 123 Takada M, Nadeau KC, Shaw GD, Marquette KA, Tilney NL. The cytokine-adhesion molecule cascade in ischemia/reperfusion injury of the rat kidney. Inhibition by a soluble P-selectin ligand. *J Clin Invest* 1997; 99: 2682-2690.
- 124 Trushkov S, Bicans J, Shevelev V, Jushinskis J, Suhorukov V, Rozental R. Use of HTK solution in kidney preservation. *Transplant Proc* 2003; 35: 766.
- 125 Turrens JF. Mitochondria formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335 – 344 .
- 126 Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 1980; 191: 421-427.
- 127 VanDuijn MM, Tijssen K, VanSteveninck J, Van der Broek PJA, Van der Zee J. Erythrocytes Reduce Extracellular Ascorbate Free Radicals Using Intracellular Ascorbate as an Electron Donor. *J Biol Chem.* 2000; 275(36): 27720-27725.
- 128 VanDuijn MM, Van der Zee J, Van der Broek PJA. The ascorbate-driven reduction of extracellular ascorbate free radical by the erythrocyte is an electronic process. *FEBS Letters* 2001, 491: 67-70.
- 129 Vigués F, Ambrosio S, Bartrons R, Campillo M, Riera L, Lopez MA, Grino JM, Serrallach N, Franco E. Effect of different preservation solution on adenine nucleotide content and metabolism in human kidney transplantation. *Transpl Int* 1994; 7: 96-100.
- 130 Wahlberg J, Eklund T, Hillerd L. Comparison of energy metabolism in rat liver grafts during preservation in University of Wisconsin or Euro-collins solution. *Transplant Proc* 1995; 27: 721-723.
- 131 Weight SC, Bell PRF, Nicholson ML. Renal ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1996; 83: 162 – 170.
- 132 Zager RA, Jurkowitz MS, Merola AJ. Response of the normal rat kidney to sequential ischemic events. *Am J Physiol* 1985; 249: 148-159.

8. Anhang

8.1. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Habilitationsleistung selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Zugleich erkläre ich, dass an keiner anderen Fakultät oder Universität ein Habilitationsverfahren derzeit anhängig ist bzw. jemals anhängig war.

Halle, den 25. März 2008

Dr. med. Hagen Loertzer

8.2. Danksagung

Herrn Universitätsprofessor Dott./Dr. habil. P. Fornara, dem Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Urologie mit Nierentransplantationszentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, diese Habilitationsschrift unter seinem Direktorat anfertigen zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich mich für seine beständige Unterstützung und die Schaffung von Freiräumen für die Forschungstätigkeit bezüglich dieser Arbeit bedanken.

Weitere, wesentliche Danksagung gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. H.-J. Brömme, der mich in einem großen Teil meiner wissenschaftlichen Laufbahn gefördert und unterstützt hat. In zahlreichen, freundschaftlichen Diskussionen und Gesprächen konnte ich viel über das Wesentliche über die Pathogenese von Radikalen und über ihrer Detektion und Quantifizierung sowie über ihre Bedeutung lernen.

Nicht zu vergessen sind alle die Doktoranden, insbesondere Frau Sabine Bauer und Frau Sandra Laubner, die mich durch ihre Mitarbeit bei diesem Forschungsprojekt unterstützt haben.

Auch danke ich allen Kollegen, die mich in meiner klinischen und wissenschaftlichen Laufbahn begleitet haben.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Ehefrau und bei meiner Tochter bedanken, die mich auf meinem beruflichen Weg immer unterstützt haben.

9. Thesen

- Mit der ESR-Spektroskopie kann man Radikale direkt nachweisen.
- Bei besonders reaktionsfreudigen (kurzlebigen) Radikalen bedarf es zusätzlich der Anwesenheit von Spintraps.
- Das Ascorbatradikal zählt zu den relativ langlebigen, weil stabileren Radikalen. Es kann auch ohne Anwesenheit von Spintraps mit der ESR-Spektroskopie gemessen werden.
- Das primär beim Zerfall von AAPH entstehende Alkylradikal (darstellbar nur in Abwesenheit von Sauerstoff) besitzt als DMPO-Addukt ein spezifisches Sechslinienspektrum. In Gegenwart von Sauerstoff bildet sich aus dem Alkylradikal ein Peroxylradikal. Es bildet mit der Spintrap DMPO ein Addukt, das in der ESR ein Vierlinienspektrum aufweist.
- Ascorbat ist in der Lage, die beim thermischen Zerfall von AAPH gebildeten Alkyl- und Peroxylradikale zu neutralisieren. Das dabei zwischenzeitlich gebildete Ascorbatradikal kann als Marker für oxidativen Stress dienen.
- Die Anwesenheit von Antioxidantien (z.B. Ascorbat) verzögert die Bildung von AAPH-abgeleiteten ESR-Signalen.
- Die Intensität des AFR-Signals hängt bei gegebenen pH-Wert von der Ascorbatkonzentration im Ansatz ab. CP-H kann konzentrationsabhängig sowohl durch $\cdot\text{OH}$ wie auch durch $\text{ROO}\cdot$ oxidiert werden.
- Unterschiedliche Perfusionslösungen für die Niere ergeben in Gegenwart von Ascorbat unterschiedliche AFR-Intensitäten.

- Das diamagnetische CP-H kann konzentrationsabhängig sowohl durch $\bullet\text{OH}$ wie auch durch $\text{ROO}\bullet$ zum paramagnetischen $\bullet\text{CP}$ oxidiert werden.
- Das bei der Oxidation von CP-H entstehende Radikal ($\bullet\text{CP}$) ergibt in der ESR-Spektroskopie ein Dreilinienspektrum.
- Diverse physiologische Reduktionsmittel können das $\bullet\text{CP}$ -Radikal mit unterschiedlicher Geschwindigkeit konzentrationsabhängig wieder zum diamagnetischen CP-H reduzieren.
- Glutathion kann bei einer Konzentration von 1 mM $\bullet\text{CP}$ nicht zu CP-H umsetzen.
- Das Ascorbat kann hingegen bei Konzentrationen ab 300 μM $\bullet\text{CP}$ langsam zu CP-H reduzieren.
- Das CP-H hat sich als Marker für die Erfassung und Quantifizierung von oxidativem Stress während der Reoxygenierung von Nierenhomogenat bewährt.
- Die durchgeführten Experimente befinden sich im experimentellen Stadium und können noch nicht auf den klinischen Anforderungen übertragen werden.

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Loertzer
Vorname: Hagen
Akademischer Titel: Dr. med.
Geburtsdatum / -ort: 30. Mai 1972, Dessau
Wohnort: Karl-Liebknecht-Str 8, 06114 Halle
Familienstand: verheiratet, 1 Tochter

Schulbildung:

1978 – 1988: 24. Polytechnische Oberschule „Bertolt Brecht“ Dessau
1988 – 1990: Erweiterte Oberschule „Philanthropinum“ Dessau

Wehrdienst:

9/1990 – 8/ 1991: Sanitätsgefreiter im Schwimmbrückenregiment 805 in Dessau

Soziales Jahr:

1/ 1991 – 9/1992: Tätigkeit in einer allgemein-medizinischen Praxis in Wolfen

Medizinstudium:

10/1992 – 10/1998: Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Berufliche Tätigkeiten:

1994 – 1997: Notfallambulanz der Klinik für Allgemein Chirurgie der MLU Halle- Wittenberg
1995 – 1996: Poliklinik für Augenheilkunde der MLU Halle-Wittenberg
1996 – 1997: Chirurgische Wachstation/AWR Berufsgenossenschaftliche Klinik „Bergmannstrost“ Halle
1/1999 – 6/ 2000: Arzt im Praktikum in der Klinik für Urologie im Klinikum Offenburg
3/2001 – 2/2002: Chirurgisches Jahr an der Kinderchirurgischen Universitätsklinik und Poliklinik der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität
7/2000 – 3/2004: Assistenzarzt der Urologischen Universitätsklinik und Poliklinik der Medizinischen Fakultät der MLU Halle-Wittenberg
seit 07/2000: Arzt im Rettungsdienst
4/2004 – 3/2007: Facharzt für Urologie der Urologischen Universitätsklinik und Poliklinik der Medizinischen Fakultät der MLU Halle-Wittenberg
seit 4/2007 Funktionsoberarzt der Urologischen Universitätsklinik und Poliklinik der Medizinischen Fakultät der MLU Halle-Wittenberg