

Aus dem Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(komm. Leiter: Prof. Dr. A. Simm)

**Carboxyproxyl (CP-H) -
ein Marker für oxidativen Stress**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Sandra Adam (geb. Laubner)

geboren am 02.10.1983 in Halle/Saale

Betreuer: PD Dr. H. J. Brömme

Gutachter:

PD Dr. H. J. Brömme

Prof. Dr. M. Steiner

Prof. Dr. R. Horstkorte

Referat

Bei Transplantationen, aber auch bei organerhaltender Tumorchirurgie mit zeitweisem Unterbrechen der Blutzufuhr, entsteht eine Ischämie. Wenn mit der Reperfusion wieder Sauerstoff zur Verfügung steht, erfolgt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die dabei u.a. entstehenden Hydroxylradikale greifen nahezu jede Substanz in ihrer Umgebung an und die zellulären Schutzmechanismen, Antioxidantien wie Vitamin C und Glutathion (GSH), können sie nicht vollständig neutralisieren. Es kommt zum oxidativen Stress.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung eines Markers zur Erfassung der Radikalproduktion *in vitro* und *in vivo* bei oxidativem Stress: die in der ESR-Spektroskopie stumme *spin trap* CP-H. Reagiert CP-H mit Radikalen entsteht CP•, das mit der ESR-Spektroskopie erfassbar ist. Zunächst wurde die Stabilität von CP-H und CP• *in vitro* überprüft. Während ersteres sehr stabil ist, wird CP• durch Ascorbat ab einer Konzentration von 0,6 mM reduziert. Gegenüber GSH ist es jedoch stabil. Die Eignung des Messsystems *in vitro* wurde mit Hilfe zweier radikalbildenden Reaktionen überprüft: der Fenton-Reaktion und dem thermischen Zerfall von AAPH. Dabei konnten bis zu 85 % der Radikale durch Bildung von CP• erfasst werden. Damit sind CP-H und das korrespondierende CP• im Vergleich zu anderen *spin traps in vitro* sehr stabil und zeichnen sich durch eine hohe Radikalfängerquote aus.

Das in diesem Labor für andere Marker benutzte Perfusionsmedium für Experimente mit ganzen Organen konnte weder CP-H noch CP• angreifen. Jedoch zeigte sich bei *in vitro* Experimenten, dass das Medium die Fenton-Reaktion und damit Radikalproduktion unterhält. Dies erscheint widersprüchlich, da im Medium einige Radikalfänger enthalten sind. Daher wurde auf den Einsatz des Mediums für die *in vivo* Experimente verzichtet und statt ganzer Rattennieren ein Zellaufschluss benutzt. Zugewetztes CP-H war in diesem Zellaufschluss sehr stabil. Das CP•-Signal wurde jedoch durch das biologische Milieu zu einem Drittel gelöscht. Trotzdem gelang die Messung der Radikal-Produktion bei 20 Minuten Warmischämie im Nierenzellaufschluss. Damit ist CP-H auch für *in vivo* Messungen geeignet.

Insgesamt ist dieser Marker wie andere *spin traps* in der Lage, Radikale im Moment ihrer Bildung zu erfassen und zeichnet sich dadurch gegenüber anderen Messverfahren aus. Die besonderen Eigenschaften von CP-H, wie die hohe Stabilität, ermöglichen sowohl *in vitro* und *in vivo* Messungen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1. Einleitung	1
1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	1
1.1.1 Das Superoxidanion-Radikal ($\bullet\text{O}_2^-$)	1
1.1.2 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	5
1.1.3 Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$)	7
1.2 Antioxidantien	8
1.2.1 Ascorbat	9
1.2.2 Glutathion	10
1.3 Ischämie-Reperfusions-Schaden	11
1.3.1 Physiologie	11
1.3.2 Konkrete Schäden	12
1.4 Marker für oxidativen Stress	14
1.4.1 Überblick	14
1.4.2 Der ideale Marker	16
1.4.3 Die ESR-Spektroskopie	16
1.4.4 CP-H	17
2. Zielstellung	19
3. Material und Methoden	21
3.1 Chemikalien	21
3.2 Herstellen der Stammlösungen	21
3.3 Spektroskopie	22
3.4 <i>In vitro</i> Experimente	22
3.4.1 CP-H	22
3.4.2 CP•	23
3.4.3 Perfusionsmedium	24
3.5 <i>In vivo</i> Experimente	24
3.5.1 Ratten	24
3.5.2 Nieren-Präparation	25
3.5.3 Messungen mit CP•	25
3.5.4 Messungen mit CP-H	26
3.6. Statistische Auswertung	26

4.	Ergebnisse	27
4.1	Oxidation von CP-H <i>in vitro</i>	27
4.1.1	Autoxidation und Oxidation durch Eisen-III-Ionen	27
4.1.2	Oxidation durch Radikale	28
4.2	Reduktion von CP• <i>in vitro</i>	30
4.2.1	Reduktion durch Ascorbat	30
4.2.2	Reduktion durch GSH	32
4.2.3	Reduktion durch Eisen-II-Ionen	32
4.3	Reaktion von CP• mit Radikalen <i>in vitro</i>	33
4.4	Verhalten im Perfusionsmedium	34
4.4.1	Verhalten von CP-H oder CP• im Perfusionsmedium	34
4.4.2	Fenton-Reaktion	35
4.5	Stabilität von CP• <i>in vivo</i>	36
4.6	Messung der Radikalproduktion <i>in vivo</i>	39
5.	Diskussion	41
5.1	Eignung von CP-H als Marker <i>in vitro</i>	41
5.1.1	Stabilität des CP•-Signals <i>in vitro</i>	42
5.1.2	CP-H als Marker <i>in vitro</i>	46
5.2	Perfusionsmedium	47
5.3	Eignung von CP-H als Marker <i>in vivo</i>	49
5.3.1	Stabilität des CP•-Signals <i>in vivo</i>	50
5.3.2	CP-H als Marker <i>in vivo</i>	52
5.4	Zusammenfassende Beurteilung	53
6.	Literaturverzeichnis	59
7.	Thesen	68
8.	Anhang	70

Abkürzungen

A	nicht dargestellter Rest eines Wasserstoffdonors
AAPH	2.2-Azo-bis-Amidinopropan
Abb.	Abbildung
AFMK	N ¹ -acetyl-N ² -formyl-5-methoxykynuramin
Asc	Ascorbinsäure
•Asc	Ascorbat-Radikal
AscH ⁻	Ascorbat
ATP	Adenosintriphosphat
α-Toc•	α-Tocopherol-Radikal
α-TocH	α-Tocopherol
bzw.	beziehungsweise
-•CH-	Carbon-zentriertes Radikal
CP-H	3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-hydroxid
CP•	3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl
DETC	Diethyldithiocarbaminsäure
DHA	Dehydroascorbat
DMPO	5,5-Dimethyl-1-Pyrolin-1-oxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz
f	finale Konzentration im Messansatz
Fe ²⁺	Eisen(II)-Ion
Fe ³⁺	Eisen(III)-Ion
FRAP	ferric reducing ability of plasma
Gl.	Gleichung
H ⁺	Wasserstoff-Ion (Proton)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	high pressure liquid chromatography (Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)
HS	Harnsäure
hν	Lichtenergie

HX	Hypoxanthin
IFN γ	Interferon γ
I_0	Intensität des ersten Peaks im ESR-Spektrum
l	Liter
Kap.	Kapitel
LDL	low density Lipoprotein
M	molar (mol/l)
n	Anzahl der Experimente bei einem Versuch
NAD ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (oxidiert)
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduziert)
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATP-abhängige Protonenpumpe
•NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
•O ₂ ⁻	Superoxidanion-Radikal
PDGF	Thrombocyten-aktivierter Wachstumsfaktor
POD	Peroxidase
QH ₂	Ubihydrochinon
•Q ⁻	Ubisemichinon
R	nicht dargestellter Rest eines Moleküls
R•	Alkylradikal
ROO•	Peroxyradikal
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute, deutsch: Umdrehungen pro Minute
SOD	Superoxiddismutase
St	Konzentration in der Stammlösung
TAR	totale antioxidative Reaktivität
Tempon	4-Oxo-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer
u.a.	unter anderem
Vgl.	Vergleiche
X	Xanthin
•	Symbol für ein ungepaartes Elektron

1. Einleitung

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

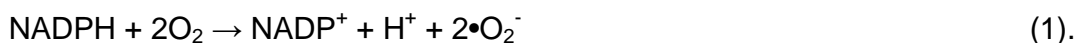
Sauerstoff (O₂) zeichnet sich durch seine zwei ungepaarten Elektronen mit parallelem Spin aus - diese verhindern Reaktionen, bei denen Elektronenpaare (im Allgemeinen mit entgegengesetztem Spin) übertragen werden. Dadurch ist Sauerstoff, obwohl *per se* ein Biradikal, sehr reaktionsträge. Übergangsmetallionen, die leicht von einer Oxidationsstufe zur anderen wechseln können, sind jedoch in der Lage, mit Sauerstoff zu reagieren indem sie nur einzelne Elektronen übertragen. Auf diese Weise können reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen.

Wird ein zusätzliches Elektron von Sauerstoff aufgenommen, entsteht das Superoxidanion-Radikal ($\bullet\text{O}_2^-$). Durch die Aufnahme eines zweiten Elektrons und Protonen entsteht Wasserstoffperoxid (H₂O₂), das ebenfalls zu den ROS gezählt wird, obwohl es kein ungepaartes Elektron besitzt. Daraus wiederum kann durch Übertragung eines weiteren Elektrons das Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$), gebildet werden. Die höchste Reduktionsstufe des Sauerstoffs ist Wasser (H₂O) [33, 45, 97].

Neben den oben genannten ROS gibt es auch andere biologisch bedeutsame z.T. von Sauerstoff abgeleitete Radikale. Beispielhaft erwähnt seien die reaktiven Stickstoffspezies, RNS, wie Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$), und diverse organischen Radikale, wie z.B. Alkyl- oder Peroxyl-Radikale [43].

1.1.1 Das Superoxidanion-Radikal ($\bullet\text{O}_2^-$)

Die Produktion von Superoxidanion-Radikalen findet im Rahmen des „respiratory burst“ von neutrophilen und eosinophilen Granulocyten, Monocyten und Makrophagen mit Hilfe der NADPH-Oxidase statt [8, 45]:

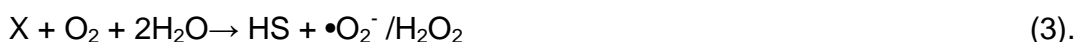


Dieses Enzym findet sich nicht nur in den Immunabwehrzellen, sondern auch in vielen anderen Geweben, beispielsweise in der Niere. Es besteht aus den membran-assoziierten Flavocytochrom-Untereinheiten Nox-2 (auch als gp91^{phox} bezeichnet) und p22^{phox}. Außerdem umfasst es die cytosolischen Regulator-Proteine p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} und die GTPase Rac1. Einzelne der genannten Untereinheiten sowie deren homologe Formen können ebenfalls Superoxidanion-Radikale produzieren. Sie sind in Fibroblasten, Erythrocyten, Thrombocyten und vielen anderen Zellen zu finden. So auch überall in der Rattenniere: in den Podocyten und

Mesangialzellen der Glomeruli, im proximalen und distalen Schenkel der Henle-Schleife und im Sammelrohr [8, 27, 39].

Angiotensin II, low-density Lipoproteine (LDL), Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und Thrombocyten-aktivierter Wachstumsfaktor (PDGF) aktivieren die NADPH-Oxidase. Letztere und Angiotensin II hemmen jedoch die Expression von Nox 4, ein der Nox-2-Untereinheit der NADPH-Oxidase homologes Protein, in Blutgefäßen. In Podocyten erhöht ATP die Produktion der Superoxidanion-Radikale [32, 33, 39, 60].

Superoxidanion-Radikale werden außerdem mit Hilfe der Xanthin-Oxidase gebildet. Diese entsteht durch reversible Sulfhydryl-Oxidation oder durch irreversible Proteolyse aus der Xanthin-Dehydrogenase. Beide sind für den Abbau von Hypoxanthin (HX) zu Xanthin (X) und weiter zu Harnsäure (HS) im Rahmen des Purinstoffwechsels verantwortlich. Die Dehydrogenase-Form nutzt NAD^+ als Elektronen-Akzeptor, die Oxidase-Form Sauerstoff [66]:



Diese Reaktion findet besonders bei hohem pH und geringer Xanthinkonzentration statt. Werden diese Bedingungen verändert, wird anstatt des Superoxidanion-Radikals Wasserstoffperoxid gebildet [37, 48].

Xanthinoxidase findet sich im Menschen vor allem in der Muttermilch, in der Leber und dem gastrointestinalen Trakt. In der Niere liegen geringe Konzentrationen im äußeren Mark vor. Interferon γ (IFN γ) aktiviert die Xanthinoxidase [39, 71, 77]. Allopurinol und Oxypurinol hemmen sie kompetitiv [23].

Weitere Quellen für Superoxidanion-Radikale sind der Komplex I (NADH-Dehydrogenase oder NADH: Ubichinon Oxidoreduktase) und in höherem Maße Ubichinon in der Atmungskette in den Mitochondrien. Im Komplex I wird zunächst $NADH_2$ verbraucht:



Die Elektronen werden über FMN an die Eisen-Schwefel-Zentren übertragen und von denen in der Regel auf Ubichinon (Q). Von diesem werden sie an Komplex III weitergeleitet. Bei der Bildung von Superoxidanion-Radikalen durch Komplex I

werden die Elektronen von den Eisen-Schwefel-Zentren an Sauerstoff statt an Ubichinon übertragen:



Dies ist möglich, da in der Membran immer Sauerstoff vorhanden ist. Werden die Elektronen bei regelrechtem Ablauf der Atmungskette auf Ubichinon übertragen, entsteht Ubisemichinon ($\bullet Q^-$):



Dieses gibt das aufgenommene Elektron an Komplex III weiter. Auch hier können Superoxidanion-Radikale gebildet werden, indem die Elektronen an Sauerstoff statt an Komplex III übergeben werden (Gl. 5).

Die gebildeten Radikale entstehen im Intermembranraum und können mit einem weiteren Elektron und zwei Wasserstoffionen in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden:



Mit zunehmender Sauerstoff-Konzentration erhöht sich die Menge der produzierten Superoxidanion-Radikale. Eine Hemmung des Elektronenflusses innerhalb der Atmungskette, beispielsweise durch Cyanid oder einen Mangel an Ubichinon, erhöht die Konzentration an gebildeten Radikalen durch Komplex I und senkt sie bei Komplex III. Der für Komplex I spezifische Hemmstoff Rotenon stimuliert ebenfalls die Superoxidanion-Radikal Produktion [18, 96, 97].

Auch einige andere Enzyme, wie die Aldehyd-Oxidase, und die spontane Oxidation von Hydrochinonen, Katecholaminen, reduzierten Hämproteinen und anderen Verbindungen setzen Superoxidanion-Radikale frei [38].

Würde lediglich die spontane Dismutation zum Abbau dieses Radikals beitragen, wäre die steady state Konzentration der Superoxidanion-Radikale sehr hoch. Allerdings überwiegt in aeroben Zellen der Abbau durch die Superoxiddismutase (SOD), mit der die folgende Reaktion 10^4 - bis 10^6 -fach schneller abläuft [33, 46]:



Diese Reaktion ist keine echte Entgiftung, da aus Wasserstoffperoxid beispielsweise im Rahmen der Fenton-Reaktion Hydroxyl-Radikale produziert werden können (vgl. Gl. 12).

Die SOD existiert in zwei Formen im menschlichen Organismus, als Kupfer-Zink-SOD und als mitochondriale SOD mit Mangan anstelle des Kupfers und Zinks im aktiven Zentrum. Die Erste findet sich in nahezu allen Zellen des Organismus, vor allem im Cytosol, aber auch in Lysosomen, dem Nukleolus und zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. Cyanid und Diethyldithiocarbamate hemmen das Enzym im Gegensatz zur Mangan-SOD. Diese ist in den Mitochondrien lokalisiert [38, 43].

Das Superoxidanion-Radikal kann Membranen nicht durchdringen. In unpolaren Lösungen wirkt es als starke Base, ist nukleophil und ein Reduktionsmittel. In Gegenwart eines Protonen-Donators, wie Ascorbat (Vitamin C) oder α -Tocopherol (Vitamin E), kann es jedoch auch als Oxidationsmittel wirken. Zunächst entsteht dabei das Hydro-Peroxyl-Radikal ($\bullet\text{HO}_2$) und mit einem weiteren Superoxidanion-Radikal daraus Wasserstoffperoxid [43]:



In wässrigen Lösungen wirkt das Superoxidanion-Radikal im Wesentlichen als Reduktionsmittel. So reduziert es beispielsweise Eisen(III)-Ionen im Cytochrom c. In den hydrophoben Membranen greift es vor allem Phospholipide nukleophil an [33, 45].

Alle genannten Reaktionen sind jedoch als Konkurrenzreaktion zur spontanen und enzymatischen Dismutation zu betrachten (vgl. Gl. 12). Insgesamt ist damit die direkte Toxizität des Superoxidanion-Radikals eher gering zu bewerten. Als direkt durch das Superoxidanion-Radikal entstandene Schäden sind die chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, die durch Interaktion mit extrazellulären Stoffen bewirkt wird, und die folgende Entzündungsreaktion zu werten [42, 45]. Außerdem ist das Radikal für eine gestörte Vasodilation und Vasculitis verantwortlich. Damit ist es an der Entstehung von Artherosklerose beteiligt [67, 69]. Zusätzlich

kann das Superoxidanion-Radikal mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit reagieren, welches zu den reaktiven Stickstoffspezies gehört [5].

Die Hauptwirkung wird offenbar indirekt über das Hydroxyl-Radikal vermittelt. Dies entsteht nach der Haber-Weiss-Reaktion wie folgt:



Die Bedeutung des Superoxidanion-Radikals besteht damit in der Reduktion der Eisen(III)-Ionen (Gl. 11). Mit der Fenton-Reaktion (Gl. 12) ergibt sich eine Reaktion (Gl. 13), die nur durch die katalytische Wirkung der Eisen(II)-Ionen einen relevanten Umsatz aufweist. Diese liegen im Körper zu zwei Dritteln an Hämoglobin und zu 10 % an Myoglobin gebunden vor. Eisen(II)-Ionen, die nicht in Enzymen oder anderen zellulären Proteinen als Elektronenüberträger dienen, sind im Blut an das Transportprotein Transferrin und im Zellinneren an die Speicherproteine Ferritin und Hämosiderin gebunden. Katalytisch wirksam für die oben genannte Reaktion ist zum einen die geringe Konzentration an freien Eisen(II)-Ionen, im Cytosol sind es ca. 1 μM [42]. In Entzündungsexudat hingegen liegen höhere Konzentrationen vor. Zum anderen können auch an ATP gebundene Eisen-Ionen sowie solche in voll beladenem Transferrin und Ferritin die Haber-Weiss-Reaktion fördern. Allerdings ist Transferrin im Körper in so hohen Konzentrationen vorhanden, dass es nur sehr selten mehr als ein Eisen-Ion trägt [26, 42, 45, 91]. Zusätzlich sind auch die in freiem Hämoglobin enthaltenen Eisen-Ionen in der Lage, die Fenton-Reaktion einzugehen. Eine Bindung von Hämoglobin an Haptoglobin verhindert dies [76, 91].

1.1.2 Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Wasserstoffperoxid wird, obwohl es über kein freies Elektron verfügt und damit kein Radikal ist, zu den ROS gezählt. Sowohl cytosolische Enzyme, wie die Aldehyd-Oxidase, Enzyme am endoplasmatischen Retikulum, zum Beispiel die Diamin-Oxidase, und andere Enzyme, wie die Harnstoff-Oxidase, sind in der Lage Wasserstoffperoxid zu bilden [33, 37, 43, 48]. Auch die bereits erwähnte Xanthin-Oxidase bildet Wasserstoffperoxid. Hauptquelle ist jedoch die Dismutation des Superoxidanion-Radikals (vgl. Gl. 8 in Kap. 1.1.1).

Die Wasserstoffperoxid-Entgiftung ist für aerobe Zellen die einzige Möglichkeit, ROS direkt abzubauen. Hierfür stehen mehrere Enzyme zur Verfügung. Besonders in der Leber, aber auch in allen anderen Organen, sowie in Erythrocyten sind Peroxidasen (POD) für den Wasserstoffperoxidabbau verantwortlich. Diese sind im Cytosol und der Mitochondrienmatrix lokalisiert. Es gibt eine Reihe verschiedener Peroxidasen, erwähnt seien die NAD-, die Fettsäuren-, die Cytochrom- und die Glutathion-POD. Abgesehen von wenigen Ausnahmen sind sie alle Hämproteine. Die jeweils namensgebende Verbindungen (AH₂) dienen als Wasserstoffdonator:



In weiteren Reaktionen können die Wasserstoffdonatoren regeneriert werden; am Beispiel des Glutathions mit Hilfe der Glutathion-Reduktase unter NADPH-Verbrauch. Ungesättigte Fettsäuren, Mercaptosuccinat, Penicillamin und viele andere Substanzen können sie inhibieren [43, 53, 72, 85, 94].

Auch Katalase baut Wasserstoffperoxid ab:



Die Aktivität dieses Enzyms variiert sehr stark und ist in der Leber und Niere, meist in Peroxisomen, am höchsten. Außerdem enthalten Erythrocyten Katalase. Sie ist aus vier Hämproteinen aufgebaut und kann neben der oben beschriebenen Reaktion auch eine der Peroxidase ähnliche Reaktion fördern. Wasserstoffdonatoren, wie Methanol, Ethanol oder Phenole, sind die Edukte:



Hier kann R unter anderem für Wasserstoff stehen, so dass auch auf diesem Weg ein Abbau möglich ist, wobei aus dem Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid Wasser wird, jedoch ein noch stärkeres Oxidationsmittel A entsteht. Dieses kann ebenfalls schädlich wirken [3, 19, 33].

Eine Hemmung der Katalase-Aktivität ist mit Ascorbat, Nitriten und Cyanid möglich. Zusätzlich kann der Abbau von Wasserstoffperoxid durch Konkurrenzreaktionen analog der Gleichung (14) verlangsamt werden [2, 33].

Wasserstoffperoxid kann leicht durch Membranen diffundieren bzw. mit Hilfe der Aquaporine passieren. Es ist jedoch nur ein schwaches Oxidationsmittel und insgesamt wenig reaktiv. In hohen Konzentrationen über 200 μM ist es jedoch zytotoxisch [43, 45]. Die zellschädigende Bedeutung erhält Wasserstoffperoxid durch die bereits besprochene Haber-Weiss-Reaktion (vgl. Gl. 13 in Kap. 1.1.1), in der Hydroxyl-Radikale gebildet werden. Zusätzlich reagiert es mit Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom c, so dass diese die enthaltenen Eisen-Ionen freigeben, welche die genannte Reaktion katalysieren [43, 73].

Wasserstoffperoxid besitzt außerdem eine Bedeutung zur Regulation von Enzymen, es kann die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase inaktivieren [12] und es steigert die Lipid-, DNA- und Protein-Oxidation [43].

In vitro kann Wasserstoffperoxid photolytisch in Hydroxyl-Radikale gespalten werden, dies erfolgt meist bei 254 nm [43].



1.1.3 Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$)

Wichtigste Quelle der Hydroxyl-Radikale *in vivo* sind die Fenton-Reaktion und die Haber-Weiss-Reaktion (vgl. Gl. 12 und 13 in Kap. 1.1.1). Des Weiteren wird Wasser durch ionisierende Strahlen gespalten und damit eine geringe Menge Hydroxyl-Radikale durch kosmische Strahlung oder radioaktive Strahlung gebildet. *In vitro* ist neben anderen Reaktionen die photolytische Spaltung von Wasserstoffperoxid von Bedeutung (vgl. Gl. 17 oben) [42, 43, 45, 91].

Hydroxyl-Radikale reagieren sehr schnell mit nahezu allen in einer Zelle befindlichen Verbindungen: Kohlenhydraten, Aminosäuren, RNA- und DNA-Basen, Phospholipiden und organischen Säuren. Dabei können drei Reaktionstypen unterschieden werden: Wasserstoff-Abstraktion (Gl. 18), Addition (Gl. 19) und Elektronen-Transfer (Gl. 20).



Bei allen wird ein weniger reaktives Radikal zurückgelassen. Ein Sonderfall der Addition ist die Reaktion von zwei Hydroxyl-Radikalen miteinander. Dabei entsteht Wasserstoffperoxid:



Diese Reaktion ist jedoch nur *in vitro* von Bedeutung, da die Wahrscheinlichkeit, einen anderen Reaktionspartner als ein zweites Hydroxyl-Radikal zu treffen, *in vivo* sehr viel höher ist [22, 43, 84].

1.2 Antioxidantien

Wie bereits beschrieben, können Radikale und im Besonderen ROS den menschlichen Organismus auf vielfältige Weise schädigen. Um dem zu begegnen, verfügt der Körper über eine Reihe von Abwehrmechanismen, die die Oxidation anderer Verbindungen verhindern und zusammenfassend als Antioxidantien bezeichnet werden. Dabei treten diese immer in Konkurrenz zu anderen Stoffen, mit denen die Radikale reagieren können, und müssen dem entsprechend regenerierbar sein [43, 84]. Liegt ein Missverhältnis zwischen Oxidationsmitteln und Antioxidantien zu Gunsten der Ersteren vor, wird dies als oxidativer Stress bezeichnet [84].

Auch die Reparatur oder das Ersetzen bereits geschädigter Substanzen ist eine wichtige Überlebensstrategie der Zellen. Im weiteren Sinne zählen solche Reparaturmechanismen auch zur antioxidativen Abwehr, da sie eine Schädigung zwar nicht verhindern, diese jedoch wieder reparieren können. Ein wichtiges Beispiel ist der Ersatz von DNA-Basen wie Guanin, die durch Hydroxyl-Radikale hydroxyliert wurden. Das ausgeschnittene 8-Hydroxy-desoxy-Guanosin/8-Hydroxy-Guanin lässt sich im Blut oder Harn nachweisen [43, 80].

Insgesamt lassen sich zur Verhinderung einer Schädigung vier Strategien unterscheiden: zunächst Verbindungen, die, wie die in Kap. 1.1.2 und 1.2.2 erwähnten, Superoxiddismutasen, Katalasen und Peroxidasen, Radikale oder andere reaktive

Spezies abbauen. Die zweite Gruppe sind Proteine, die die Verfügbarkeit von Prooxidantien, wie freie Eisen-Ionen, verringern. Beispiele sind Transferrin, Haptoglobine und auch das Eisen-II-Ionen oxidierende Caeruloplasmin. Eine weitere Strategie ist der Schutz von Biomolekülen durch andere Proteine, wie die Hitzeschock-Proteine. Die letzte Gruppe umfasst die vielen verschiedenen niedermolekularen Verbindungen, die nicht-enzymatisch mit ROS reagieren und diese so neutralisieren. Beispiele sind Ascorbat, GSH, α -Tocopherol, Harnsäure, Melatonin und viele andere [33, 80, 84].

Im Folgenden sind exemplarisch zwei der genannten Substanzen beschrieben, da sie für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind.

1.2.1 Ascorbat

Ascorbat bzw. Vitamin C (AscH^-) ist das Anion der Ascorbinsäure. Diese dissoziiert bei pH 7 zum Anion. Es ist eines der stärksten Reduktionsmittel im Körper und kann von diesem nicht synthetisiert werden. Daher muss es mit der Nahrung aufgenommen werden. Seine Bedeutung als Antioxidant wurde in vielen Arbeiten hervorgehoben [64, 68]. Im Plasma liegt es in einer Konzentration von 0,03 bis 0,14 mM und in den Nierenzellen von 0,4 bis 1,21 mM vor [49, 68]. Es wird als Coenzym für eine Vielzahl von Reaktionen benötigt, beispielsweise zur Kollagensynthese. Die ionisierbare Hydroxylgruppe ermöglicht die Bildung von Ascorbat-Radikalen ($\bullet\text{Asc}^-$). Diese können weiter zu Dehydroascorbat (DHA) oxidiert werden.

Ascorbat (AscH^-) ist in den meisten Reaktionen Reduktionsmittel und kann eine zwiespältige Rolle einnehmen: zum einen wirkt es antioxidativ, indem es sowohl Hydroxyl-Radikale als auch Superoxidanion-Radikale reduziert:



Auf der anderen Seite kann es auf dieselbe Weise auch Eisen(III)-Ionen zu Eisen(II)-Ionen reduzieren und so die Funktion der Superoxidanion-Radikale für die Produktion von ROS *via* Fenton-Reaktion übernehmen (*vgl. Gl. 11 und 12 in Kap. 1.1.1*). Diese Reaktion erfolgt jedoch nur bei einem Eisen-*overload*, bei dem durch Ferritin- und Transferrinmangel die Konzentration an freien Eisen-Ionen erhöht ist [17, 43]. Außerdem inhibiert Ascorbat reversibel die Katalase, einem wich-

tigen Enzym zum Abbau von Wasserstoffperoxid (*vgl. Kap. 1.1.2*) [25]. Insgesamt überwiegt jedoch seine antioxidative Wirkung [43, 80].

1.2.2 Glutathion

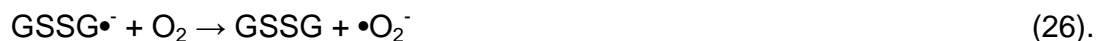
Neben seiner Bedeutung als Cosubstrat für die Glutathion-Peroxidase (*vgl. Kap. 1.1.2*) ist auch Glutathion (GSH) allein ein wichtiges Antioxidant. Zusätzlich dient es als Cosubstrat für Enzyme der Leukotrien-Synthese und wird für die Faltung und den Abbau von Proteinen mit Disulfidbrücken, wie Insulin, benötigt. Im Plasma liegt GSH in einer Konzentration von 1 bis 3 μM [80] vor. In der Niere sind es ca. 2 $\mu\text{mol/g}$ [43]. Dies entspricht unter der Annahme, dass 1 g Niere 0,75 ml Lösungsraum entsprechen, rund 2,7 mM. Die antioxidative Wirkung ergibt sich zunächst aus der Fähigkeit, Kupfer-Ionen zu chelatieren und so deren Potential zur Bildung freier Radikale zu senken. Außerdem kann GSH Radikale wie folgt reduzieren:



Das gebildete Thiyl-Radikal ($\text{GS}\bullet$) kann mit einem weiteren dimerisieren. Da die intermediäre Konzentrationen von $\text{GS}\bullet$ sehr klein ist, ist die reine Dimerisierungsreaktion eher unwahrscheinlich. Die Konzentration von GSH ist aber relativ hoch, ein geringer Teil wird dissoziieren und das gebildete Ion (GS^-) kann mit dem Thiyl-Radikal reagieren:



Auch hier ergibt sich eine zwiespältige Rolle des GSH, da das entstandene Addukt, wenn es mit Sauerstoff reagiert, Superoxidanion-Radikale bilden kann. Auch GSH kann damit pro-oxidativ wirken:



Analog zu Ascorbat überwiegt die antioxidative Wirkung auch bei GSH [43, 80].

1.3 Ischämie-Reperfusionsschaden

Ischämie ist eine Form der Hypoxie, ein Zustand, in dem die Nachfrage nach Sauerstoff nicht gedeckt werden kann. Fehlt der Sauerstoff in einem Gewebe gänzlich, spricht man von Anoxie. In der Physiologie werden vier Formen der Hypoxie unterschieden: die hypoxämische Hypoxie ist durch eine verringerte arterielle Sauerstoffsättigung gekennzeichnet. Diese entsteht bei Lungenfunktionsstörungen oder verringertem Sauerstoffangebot der Luft, z.B. in Höhenlagen. Die anämische Hypoxie wird durch eine geringe Sauerstoffbeladung des Blutes, z.B. bei Hämoglobindefekten oder auch durch Beladung der Erythrocyten mit Kohlenmonoxid, ausgelöst. Eine gestörte Sauerstoff-Diffusion ist die Ursache der dritten Form der Hypoxie. Zellgifte wie Cyanide verhindern dabei eine Verwertung des Sauerstoffs in der Zelle. Die letzte Form der Hypoxie ist die Ischämie, bei der die Durchblutung gestört ist. Neben dem Sauerstoffdefizit führt dies auch zu einem Mangel an Ausgangsstoffen für verschiedene Stoffwechselprozesse und zu einer Akkumulation von Abbauprodukten. Häufige Ursachen sind Thromben und Arteriosklerose [55].

Die temporäre Unterbrechung der Blutzufuhr zu einem Organ beispielsweise bei einer Organtransplantation entspricht einer Ischämie mit anschließender Reperfusion. Nieren sind die am häufigsten transplantierten Organe [1]. Andere Beispiele für Ischämien mit folgender Reperfusion sind Aortenaneurysma-Operationen, bei denen die Blutzufuhr zu allen distal liegenden Organen unterbrochen wird, organerhaltende Tumorchirurgie und Kreislaufstillstände mit anschließender Reanimationen [5, 13].

1.3.1 Physiologie

Während der Ischämie eines Gewebes können durch den Sauerstoffmangel viele Stoffwechselreaktionen nicht mehr bis zum Ende ablaufen und der ATP-Gehalt der Zellen nimmt deutlich ab. So kann auch der NAD^+ -verbrauchende Abbau von Hypoxanthin nicht mehr erfolgen, da dieses nicht mehr regeneriert werden kann [5]. Durch Kalzium-abhängige Proteasen wird die Xanthin-Dehydrogenase in die Oxidase-Form umgewandelt, die die Bindungsstelle für NAD^+ verloren hat. Die oxidierte Form stellt eine bedeutsame Quelle der ROS-Produktion bei dem Ischämie-Reperfusionsschaden dar [5, 13, 23, 66, 87]. Mit der Reperfusion wird dabei Hypoxanthin mit Sauerstoff statt NAD^+ als Elektronenakzeptor umgesetzt und es entstehen als artifizielle Produkte Superoxidanion-Radikale oder Wasserstoffpero-

xid (vgl. Gl. 2 und 3 in Kap.1.1.1). Diese Reaktion erfolgt auch in Grenzgebieten zwischen hypoxischen Gewebe und nahezu normoxischen Arealen [61]. Zusätzlich werden Eisen-Ionen freigesetzt, die die Aktivität der Xanthin-Oxidase steigern und die Umwandlung der Xanthin-Dehydrogenase-Form in die Oxidase-Form fördern [66].

Neben der Xanthin-Oxidase existieren weitere Quellen für eine gesteigerte ROS-Produktion: die Autoxidation von Epinephrin [9] sowie eine gesteigerte Aktivität der NADPH-Oxidase (vgl. Gl. 1 in Kap. 1.1.1) sind in der Niere von Bedeutung. Auch immigrierte Leukocyten, die bereits 5 Minuten nach der Reperfusion an Endothelzellen unter anderem der Vasa recta in der Niere binden, schütten ROS aus. Dieser Effekt hält bis zu 24 Stunden an [23, 31].

In der Ischämiephase können die Komplexe der Atmungskette in den Mitochondrien (vgl. Kap. 1.1.1) auf Grund des Sauerstoffmangels keine ROS produzieren. Erfolgt die Reperfusion, werden ROS verstärkt produziert bis die Elektronen-Transport-Komplexe wieder reoxygeniert sind. Da dies nur eine kurze Zeit der Fall ist, ist dieser Effekt nur von Bedeutung, wenn die Reperfusion unterbrochen wird und eine erneute Ischämie folgt. Solche Zyklen erfolgen bei mehrmaligem Durchspülen eines zu transplantierenden Organs [61].

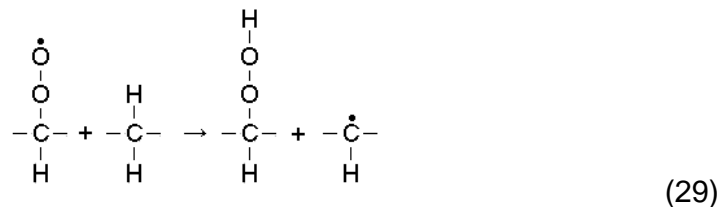
Kontrovers wird eine Verminderung der Effektivität der antioxidativen Kapazitäten diskutiert. Einige Autoren zeigten eine Verringerung der Aktivität der GSH-Peroxidase [23] und der Superoxiddismutase nach der Reperfusion von Nieren [9, 24]. Andere Autoren konnten solche Effekte nicht eindeutig nachweisen [5, 81]. Die Unterschiede können dabei mit den verschiedenen Ausgangskapazitäten an Antioxidantien in den einzelnen Geweben zusammenhängen [5]. Insgesamt sind die antioxidativen Strategien (vgl. Kap. 1.2) der Zelle nicht in der Lage, der verstärkten Produktion von ROS ausreichend zu begegnen, und die Zellen leiden unter oxidativem Stress [9, 23].

1.3.2 Konkrete Schäden

Bei einigen radikalbildenden Reaktionen entsteht das Hydroxyl-Radikal. Da es mit nahezu allen Substanzen in seiner unmittelbaren Umgebung reagieren kann, sind die Ischämie-Reperfusions-Schäden vielfältig [44].

Bei ungesättigten Fettsäuren ist eine Addition an die durch Doppelbindung gekoppelten Kohlenstoffatome möglich (vgl. Gl. 19 in Kap. 1.1.3) und damit eine Veränderung ihrer chemischen Eigenschaften. Von großer Bedeutung ist jedoch die Li-

lipid-Peroxidation: initiiert wird sie durch die Reaktion von Hydroxylradikalen mit Methylengruppen von Lipiden (Gl. 27). Das gebildete Kohlenstoff-zentrierte Radikal kann in der ersten Schleife der Kettenreaktion mit Sauerstoff zu einem Peroxyl-Radikal reagieren (Gl. 28) und dieses wiederum mit einer anderen Methylengruppe zu einem Hydroperoxid und einem weiteren Kohlenstoff-zentrierten Radikal (Gl. 29).



Bemerkenswert daran ist, dass lediglich für die Startreaktion ein Hydroxyl-Radikal nötig ist, die darauffolgende Kettenreaktion und damit Veränderung von vielen weiteren Lipiden jedoch nur von der Anwesenheit von Sauerstoff abhängig ist. Die Folge ist eine Schädigung der Membran und damit eine erhöhte Permeabilität, die in der Niere die Filtration verändert [9, 43].

In den Mitochondrien kann es zu einer empfindlichen Störung der Atmungskette kommen: starke Oxidationsmittel, wie $\bullet\text{OH}$ und andere Radikale, erhöhen die unspezifische Permeabilität der inneren Mitochondrienmembran für Ionen und niedermolekulare Stoffe bis 1500 Dalton. Dadurch können die nötigen Konzentrationsgradienten nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zu einer Depolarisation. Zusätzlich werden die Atmungsketten-Komplexe voneinander getrennt. Die Elektronen können nicht mehr regelgerecht weitergeleitet werden und es folgt ein massiver Anstieg der Radikalproduktion (*vgl. Kap. 1.1.1*). Auf diese Weise entsteht ein Teufelskreis: ATP-Mangel, bedingt durch die Ischämie, bewirkt eine Radikalproduktion, welche wiederum die Mitochondrien schädigt, die dadurch weniger ATP produzieren können und weitere Radikale freisetzen [61].

Auch die Zell-Kommunikation mit Nachbarzellen und dem gesamten Organismus ist beeinträchtigt: der Ionen-Transport zum Beispiel *via* Na-K-ATPase ist verringert und Rezeptormoleküle werden inaktiviert. Außerdem verursachen Radikale eine Störung des Stoffwechsels durch Veränderung von Enzymaktivitäten. In den Nieren wird zum Beispiel eine Stimulation der Renin- und Prostaglandin-Synthese beobachtet. Dies bewirkt insgesamt eine Vasokonstriktion in den Nieren, verbunden mit einer verschlechterten Filtration [9, 43, 46].

DNA und die verschiedenen RNA-Gruppen, wie Transport-, Messenger-RNA oder andere, können beschädigt werden, da Hydroxyl-Radikale mit den Purin- und Pyrimidin-Basen reagieren können. Auch die Desoxyribose kann beschädigt werden. Insgesamt führt dies zu Mutationen oder Strangbrüchen [43, 45].

1.4 Marker für oxidativen Stress

1.4.1 Überblick

Der oxidative Stress ist seit vielen Jahren Thema intensiver Forschung und es gibt daher verschiedene Ansätze zu dessen Messung. In diesem Kapitel soll zunächst ein Überblick der bekannten Verfahren gegeben werden.

Eine Möglichkeit zur Erfassung von stattgehabten oxidativen Stress ist die Messung von nicht-enzymatischen Antioxidantien und deren Abnahme im Gewebe oder Blut. Dies erfolgt mit photometrischer Bestimmung oder Chemiluminiszenz. Beispiele dafür sind α -Tocopherol, GSH oder auch Ascorbat [6, 93]. In anderen Arbeiten wurde die Summe der Antioxidantien, totale antioxidative Reaktivität (TAR), bestimmt und über deren Abnahme die Konzentration der produzierten Radikale geschätzt. Die TAR wurde mit der Zugabe eines Radikal-produzierenden Systems, ähnlich dem in dieser Arbeit benutztem AAPH (*vgl. Kap. 3.4.1*), und dessen Koppung an eine Farbreaktion bestimmt. Die Antioxidantien fangen die gebildeten Radikale und verhindern so deren Reaktion mit einem Farbindikator. Für den oxidativen Stress kann jedoch häufig nur ein Trend angegeben werden, eine exakte Quantifizierung gestaltet sich schwierig. Dies liegt nicht zuletzt an den individuell verschiedenen Ausgangskonzentrationen an Antioxidantien. Außerdem lässt diese Methode keine Rückschlüsse auf die Art der gebildeten Radikale zu. So werden diese Verfahren im Wesentlichen zur Abschätzung der Abwehrfähigkeiten gegenüber Radikalen und nicht zur Quantifizierung von oxidativem Stress genutzt [34, 51, 62].

Ein ähnlicher Grundgedanke liegt der Messung der Eisen-reduzierenden Kapazität des Blutplasmas, englisch FRAP, zu Grunde: Antioxidantien sind gegenüber Radikalen Reduktionsmittel und der Gehalt an Antioxidantien wird hier anhand der Reduktion von Eisen-III-Ionen ermittelt [11].

Ein anderer Ansatz misst die Anreicherung von Folgeprodukten, die nach der Wechselwirkung mit Radikalen entstehen. Dies können hydroxylierte Derivate körpereigener Verbindungen oder dem Körper zugesetzten Verbindungen sein. Zur ersten Gruppe zählen von der RNA oder DNA abgeleitete Verbindungen wie 8-Hydroxy-Guanin [20] bzw. -Desoxyguanin [74, 83] oder Abbauprodukte der Desoxyribose [47, 73]. Des Weiteren finden die Endprodukte der Lipidperoxidation (vgl. Kap. 1.3.2) Malondialdehyd [30] und 4-Hydroxy-Nonenal [98] und auch Endprodukte der verbrauchten Antioxidantien Anwendung. Ein Beispiel für Letztgenannte ist AFMK, eine Verbindung, die bei der Reaktion von Melatonin mit ROS entsteht [65, 92].

Zu den dem Körper erst zugesetzten Verbindungen zählen Salicylsäure [50] oder andere Aspirinderivate. Nach Wechselwirkung mit Hydroxyl-Radikalen entsteht 2,3-Dihydroxybenzoesäure [21, 41].

Allen oben genannten Verfahren ist gemein, dass sie erst deutlich nach dem oxidativen Stress eine Messung erlauben. Außerdem sind die Nachweisverfahren der Verbindungen wie die HPLC zeitaufwendig und mit Ausnahme von 2,3-Dihydroxy-benzoesäure und hydroxylierten Guaninderivaten unspezifisch für die Radikale.

Die letzte Gruppe besteht aus Markern, die direkt die gebildeten Radikale erfassen. Es existiert eine Vielzahl von *spin traps*, die mit verschiedenen kurzlebigen Radikalen reagieren und selbst zu Radikalen werden, die stabiler sind. Damit agieren *spin traps* zugleich auch wie Antioxidantien, da sie aggressive Radikale neutralisieren indem sie weniger reaktive Radikale bilden. Die letzteren werden mit der Elektronen-Spin-Resonanz(ESR)-Spektroskopie erfasst. Dieses Verfahren (vgl. Kap. 1.4.3) ist schnell und auch für geringe Konzentrationen von ca. 1 μM Addukt geeignet. Meist werden Hydroxylamine und deren korrespondierenden Nitroxide benutzt. Diese unterscheiden sich deutlich hinsichtlich ihrer Fähigkeit Zellmembranen zu penetrieren, ihrer Anfälligkeit gegenüber zellulären Reduktionsmitteln und der Geschwindigkeit und Spezifität, mit der sie mit Radikalen reagieren [56-58].

Auch wenn es keine *spin trap* ist, gehört das Ascorbatradikal in diese Gruppe. Ascorbat wirkt antioxidativ, indem es mit Radikalen intermediär zu dem genannten relativ stabilen Addukt reagiert (vgl. Gl. 22 und 23 in Kap. 1.2.1). Die Messung der Konzentration des Ascorbatradikals erlaubt keine Rückschlüsse auf die Art der ursprünglichen Radikale, zeigt aber den Moment ihrer Bildung an [15, 16].

1.4.2 Der ideale Marker

Für Verbindungen zur Messung von Radikalkonzentration und -wirkung gibt es eine Reihe von idealen Eigenschaften, die sich jedoch nur selten auf eine Substanz vereinigen. Der ideale Marker sollte schnell und spezifisch mit dem zu untersuchenden Radikal reagieren. Die Schnelligkeit ist von Bedeutung, da viele Radikale nur sehr kurzlebig sind. Die Spezifität ist dann entscheidend, wenn ermittelt werden soll, welche Art von Radikalen gebildet wurden und in welchem Umfang. Des Weiteren sollte das gebildete Markermolekül chemisch stabil sein und insbesondere nicht durch das biologische Milieu in Zellen oder im Blut metabolisiert werden. Für Messungen in lebenden Organismen sollte die Substanz nicht toxisch sein. Bei Messungen mit der ESR-Spektroskopie ist zur Unterscheidung von anderen Radikalen ein unverwechselbares ESR-Spektrum wünschenswert (vgl. Kap. 1.4.3) [43, 86, 95].

Für Studien mit *in vivo* Experimenten ist zudem der Verteilungsraum von Bedeutung: hydrophobe Substanzen können die Zellmembran leicht durchdringen und so auch Radikalentstehungen in der Zelle erfassen. Dabei ist auch zu beachten, ob das gebildete Marker-Radikal noch hydrophob ist [43, 86, 95].

1.4.3 Die ESR-Spektroskopie

Wie bereits beschrieben sind Radikale durch ungepaarte Elektronen gekennzeichnet. Die Elektronen-Spin-Resonanz-(ESR)-Spektroskopie macht sich dies zunutze: der Spin (Eigendrehimpuls), parallel oder antiparallel zu einem Magnetfeld, und die Tatsache, dass diese Elektronen ein magnetisches Moment besitzen, sind hierbei von Bedeutung. Wird dem Elektron Energie in Form von Mikrowellen zugeführt, kehrt es bei Resonanz seinen Spin um. Mit einer konstanten Mikrowellenfrequenz wird die für jedes Radikal spezifische Feldstärke, bei der Resonanz entsteht und die Mikrowellenenergie absorbiert wird, ermittelt. Wird das entstehende Absorptionsspektrum gegen die Feldstärke aufgetragen, ergibt sich die erste Ableitung des

Signals in Form eines Peaks im ESR-Spektrum. Aus diesem Peak lässt sich durch Flächenintegration die Konzentration berechnen [59, 86, 99].

Da Radikale oft sehr kurzlebig sind, lassen sie sich nicht direkt mit der ESR-Spektroskopie messen: die dazu erforderlichen Radikalkonzentrationen können nicht erreicht werden, da diese sofort nach der Bildung weiter reagieren und ihren Radikalcharakter verlieren. Dieses Problem kann experimentell durch den Einsatz von *spin traps* weitgehend umgangen werden. *Spin traps* sind diamagnetische organische Moleküle. Sie sind daher mit der ESR-Spektroskopie nicht erfassbar. Reagieren sie mit einem Radikal, entzieht oder gibt es ihnen ein Elektron. Dadurch werden sie paramagnetisch und können mit der ESR-Spektroskopie erfasst werden. Beispiele für *spin traps* sind 5,5-Dimethyl-1-Pyrrolin-N-Oxid (DMPO) oder auch das in dieser Arbeit untersuchte 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-hydroxid (CP-H) [43, 82]. Hydroxylradikale entziehen der *spin trap* CP-H ein Elektron, wodurch dieses zum paramagnetischen CP• oxidiert wird. CP• ist langlebiger als ROS und eignet sich damit für ESR-Messungen.

1.4.4 CP-H

3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-hydroxid (CP-H) ist eine von Carboxyproxyl abgeleitete *spin trap* und gehört zu den Hydroxylaminen, vereinfacht R-N-OH (*Abb. 1a*). Es ist diamagnetisch und gibt kein ESR-Signal. Wird CP-H durch ein oxidierendes Radikal, z.B. •OH, oxidiert, entsteht 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl (CP•), ein Pyrrolidin-Nitroxid, vereinfacht R-N-O• (*Abb. 1b*). Neben der Oxidation durch Radikale kann CP-H auch autooxidiert werden: eine sehr geringe Menge reagiert an der Luft oder in sauerstoffhaltigen Medien kontinuierlich zu CP•. Dieses ist paramagnetisch mit einem Triplet ESR-Signal. Die Amplitude (I_0) des ersten der drei Gipfel steht zu den übrigen im Verhältnis 1:1:1 (*Abb. 2*). Dieses Spektrum ist unabhängig von dem ursprünglich mit CP-H reagierendem Radikal nahezu gleich [43, 57, 95].

CP• kann durch genügend starke Reduktionsmittel zum CP-H reduziert werden. Diese Redoxreaktion wird damit stets vom Reaktionspartner beeinflusst.

Zusätzlich kann CP• durch oxidierende Radikale weiter zu 3-Carboxy-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-N-oxid oxidiert werden (*Abb. 1c*). Diese Reaktion ist jedoch kinetisch ungünstig und muss durch starken Radikalüberschuss erzwungen werden [90]. Das oxidierte CP• ist wie CP-H diamagnetisch und daher mit der ESR nicht erfassbar.

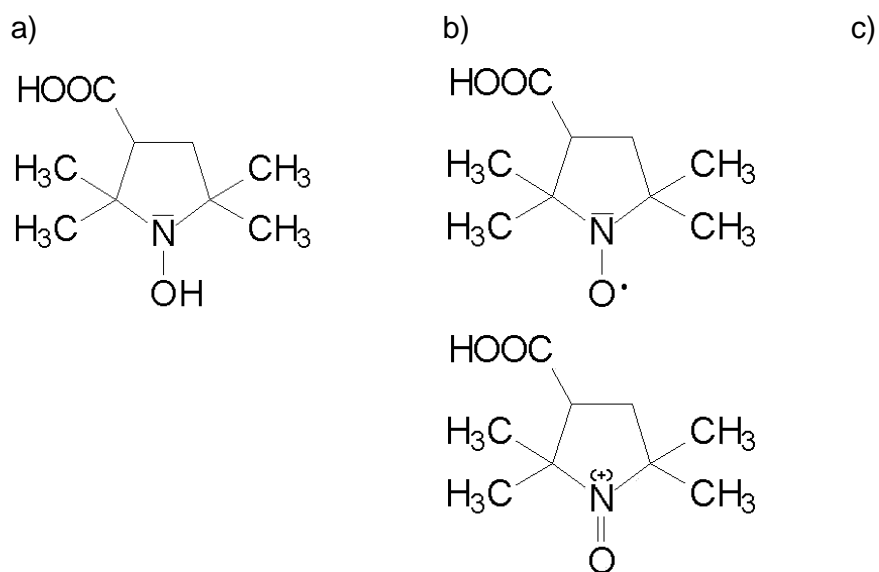


Abb. 1: Oxidationsstufen von (a) CP-H über (b) CP• zu (c) oxidiertes CP•

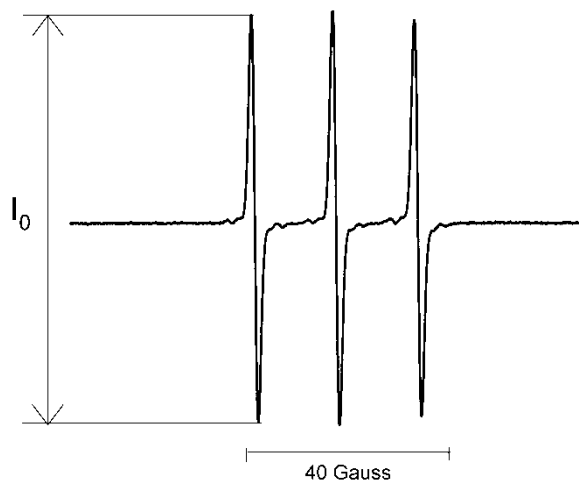


Abb. 2: ESR-Spektrum von CP•.

Ansatz: CP• 90 μ M in Wasser gelöst.

2. Zielstellung

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen durch eine Vielzahl von Reaktionen. Wichtige Enzyme, die im menschlichen Organismus ROS produzieren, sind die NADPH-Oxidase und die Xanthin-Oxidase. In Mitochondrien setzen zusätzlich die Komplexe I und III der Atmungskette ROS frei (vgl. Kap. 1.1). Zum Schutz gegen eine schädigende Wirkung der Radikale verfügt der Körper über zahlreiche antioxidative Mechanismen (vgl. Kap. 1.2). Durch eine Ischämie mit anschließender Reperfusion wird das relative Gleichgewicht zwischen ROS-Entstehung und -Abwehr empfindlich gestört, es entsteht oxidativer Stress. Dieser Vorgang spielt insbesondere für Organtransplantationen, aber auch in der organerhaltenden Tumorchirurgie und anderen Fachgebieten eine wichtige Rolle (vgl. Kap. 1.3). Ziel der Forschung ist es daher, den oxidativen Stress möglichst gering zu halten oder auch durch geeignete Radikalfänger Organschäden zu vermeiden. Zu diesem Zweck werden die verschiedensten Marker zur Messung des Erfolges oder Misserfolges der Maßnahmen benötigt. CP-H ist eine von Carboxyproxyl abgeleitete *spin trap*, die potentiell als Marker dienen kann. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Eignung für *in vitro* und *in vivo* Messungen geprüft werden.

CP-H wird durch Radikale in das mit der ESR-Spektroskopie erfassbare CP• umgewandelt. Stets sollen daher beide Substanzen untersucht werden. Zunächst wird die *in vitro* Stabilität in reinem Wasser ermittelt. Anschließend soll untersucht werden, in wieweit zelluläre Reduktionsmittel auf CP• bzw. oxidierende Eisen-III-Ionen auf CP-H *in vitro* wirken. Die Eignung zur Messung der Radikalproduktion *in vitro* soll mit Hilfe zweier radikalbildender Systeme geprüft werden: der Fenton-Reaktion mit Bildung von Hydroxyl-Radikale (vgl. Gl. 12 in Kap. 1.1.1) und dem AAPH-Zerfall mit Bildung von Peroxylradikalen (vgl. Gl. 35 und 36 in Kap. 5.1.1). Da diese Radikale jedoch sehr gut mit nahezu jeder Verbindung in ihrer unmittelbaren Umgebung reagieren können, soll auch gemessen werden, in wie weit diese das aus CP-H entstandene CP• wieder löschen.

Im zweiten Teil der Arbeit werden *in vivo* Messungen durchgeführt. Zu deren Vorbereitung sollen die Eigenschaften des in diesem Labor für andere Arbeiten mit Rattenorganen genutzten Perfusionsmedium geprüft werden [10]. Analog der *in vitro* Versuche soll zunächst die Stabilität von CP• und CP-H ohne andere Substanzen erfasst werden. Anschließend erfolgt mittels der Fenton-Reaktion eine Radikalmessung mit CP-H im Perfusionsmedium. Danach wird der Einfluss des Nierenzellaufschlusses geprüft. Für CP• soll dabei eine differenzierte Betrachtung mit

verschieden behandelten Zellaufschlüssen erfolgen, um Aufschluss über die Art der reduzierenden Substanzen zu gewinnen. Auch *in vivo* wird dann gemessen, wie stark CP• durch Radikale gelöscht wird. Am Ende soll am Beispiel von 20 Minuten Warmischämie die Radikalbildung mit Hilfe von CP-H erfasst werden.

Insgesamt wird so ein Überblick der für Messungen des oxidativen Stresses wichtigen Stabilität des Messsystems CP-H - CP• geschaffen und dieses sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Marker genutzt.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

CP-H ($C_9H_{18}NO_3$) wurde von Prof. Kirilyuk, Institut für Organische Chemie, Novosibirsk, Russland zur Verfügung gestellt. CP• ($C_9H_{17}NO_3$) wurde von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland bezogen.

Eisen(II)Sulfat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), Eisen(III)Chlorid ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$), Ascorbat ($C_6H_8O_6$), Glutathion ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 30gew.-%ige Lösung in H_2O), Kaliumhexacyanoferrat (II) ($K_4[Fe(CN)_6]$), Kaliumhexacyanoferrat (III) ($K_3[Fe(CN)_6]$) und Diethyldithiocarbaminsäure (DETC, $C_5H_{10}NS_2Na$) wurden ebenfalls von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland bezogen. Desferroxaminmesilat (DFA, $C_{29}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_3SO_3H$) lieferte Novartis, Nürnberg, Deutschland.

2,2'-Azo-bis-2-Amidinopropan Hydrochlorid ($C_8H_{18}N_6 \cdot 2HCl$) (AAPH) lieferte Polysciences, Warrington, USA.

Custodiol® (HTK-Lösung nach Bretschneider: NaCl (15mM), KCl (9 mM), $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (4 mM), Histidinhydrochlorid-Monohydrat (18 mM), Histidin (180 mM), Tryptophan (2 mM)), Mannitol (30 mM), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,015 mM), Kaliumhydrogen-2-oxopentandioat (1 mM)) stammte von der Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland.

Die Glucose 40% Pfrimmer Infusionslösung® (40 gew.% wasserfreie Glucose + Wasser für Injektionszwecke) wurde von Baxter, Unterschleißheim, Deutschland bezogen.

Gelatinepolysuccinat Infusionslösung® (4gew.% Gelatinepolysuccinat + Wasser für Injektionszwecke) und die isotone Kochsalzlösung (0,9 Gew.% NaCl + Wasser für Injektionszwecke) lieferte Braun, Melsungen, Deutschland.

Rompun® (Wirkstoff: Xylacinhydrochlorid 20 mg/ml) wurde von Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland, bezogen, Ketavet® (Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml) von der Pharmacia GmbH, Erlangen, Deutschland und Liquemin® (Wirkstoff: Heparin-Natrium) von SERO-Med GmbH, Wien, Österreich.

3.2 Herstellen der Stammlösungen

Zum Lösen der aufgeführten Salze und zum Herstellen der Verdünnungen wurde jeweils pyrogenfreies, bidestilliertes Wasser benutzt. Zur Einwaage wurde die Analysewaage Typ „870/13“ von Kern, Albstadt-Ebingen, Deutschland, verwandt. Die Stammlösungen wurden täglich frisch hergestellt.

Einzig CP• wurde in einer 1mM Stammlösung bei 4°C im Kühlschrank gelagert und konnte über mehrere Tage genutzt werden. Die CP-H Lösung wurde in einer 10 mM Stammlösung täglich frisch hergestellt.

3.3 Spektroskopie

Die ESR-Untersuchungen erfolgten mit dem MiniScope MS100 von Magnettech, Berlin, Deutschland. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µl in einer Einmal-Mikropipette von Brand, Wertheim, Deutschland und wurde mit folgenden ESR-Spektrometer-Einstellungen vermessen: Center Field: 3368 G, Sweep Width: 100 G, Sweep Time: 60 s, Number: 1, Modulation Amplitude: 1000 mG, Receiver Gain: 50, Signal Phase 180. Die Power Attenuation war 6db. Das ESR-Spektrometer wurde stets 24 Stunden vor den Messungen eingeschaltet. Dadurch wurden Schwankungen der Messwerte zwischen den einzelnen Meßtagen weitgehend vermieden. Die Umrechnung des ESR-Signals in CP•-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe von 100 Standardmessungen mit einer vorgegebenen CP• Konzentration von 90 µM. Daraus wurde ein Umrechnungsfaktor ermittelt.

Die photometrischen Untersuchungen erfolgten mit dem Beckman DU 640 Spektrometer von Beckman Instruments, Palo Alto, USA. Die UV-Lampe wurde jeweils 30 Minuten vor jeder Messung eingebrannt. Die Messungen erfolgten mit einer 1 ml Küvette von der Hellma GmbH & Co.KG, Müllheim, Deutschland, aus Quarz. Die Strahlendicke betrug 1 cm.

3.4 *In vitro* Experimente

3.4.1 CP-H

Der Umsatz von CP-H zu CP• wurde mit der ESR-Spektroskopie erfasst. Würde CP-H bereits durch Sauerstoff, Ionen oder andere Oxidationsmittel zu CP• reagieren, wäre die CP•-Produktion nicht allein auf die Menge an entstanden ROS zurückzuführen und damit eine Überschätzung der Letzteren möglich. CP-H wurde mit einer Konzentration von 1mM eingesetzt und der Ansatz über 60 Minuten gemessen.

Zur Quantifizierung der Autoxidation von CP-H wurde die CP•-Bildung bei Lösung in Wasser erfasst. Zusätzlich wurde die Oxidation von CP-H in Gegenwart von 10 µM Eisen(III)-Ionen gemessen.

Um die Eignung von CP-H als Marker für Radikale *in vitro* zu prüfen, wurde zunächst die Fenton-Reaktion (vgl. Gl. 12 in Kap. 1.1.1) genutzt. 1 µM Eisen-(II)-

Ionen und 1 μM Wasserstoffperoxid wurden zugesetzt. In einem zweiten Experiment wurden jeweils 10 μM beider Reaktanten hinzugegeben. Es wurden Messungen nach 10 Minuten durchgeführt.

Anschließend wurde AAPH in einer Konzentration von 50 mM eingesetzt und das CP•-Signal über 60 Minuten erfasst.

3.4.2 CP•

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. CP• wurde in einer Konzentration von 90 μM eingesetzt.

Zu CP• wurden in der ersten Gruppe von Experimenten 0,1 mM, 0,3 mM, 0,6 mM oder 1 mM Ascorbat hinzugegeben und für 60 Minuten die dadurch bedingte Abnahme von CP• gemessen. 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) wurde in einem zweiten Experiment 60 Minuten nach Zugabe von 1 mM Ascorbat hinzugefügt und das CP•-Signal weitere 60 Minuten gemessen.

Des Weiteren wurde das photometrische Spektrum von 200 bis 500 nm von 1 mM des zwei- und dreiwertigen Kaliumhexacyanoferrat erfasst. Anschließend wurden zu 18 μM CP• 0,2 mM Ascorbat hinzugegeben und nach 60 Minuten 1 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) ergänzt. Über 70 Minuten erfolgte eine Messung der photometrischen Absorption bei 420 nm alle 15 Sekunden.

In der dritten Versuchsreihe wurde GSH in Konzentrationen von 5 oder 10 mM zu CP• gegeben und dessen Signal über 60 Minuten gemessen.

In der vierten Gruppe von Experimenten wurden Eisen-II-Ionen in Konzentrationen von 100 und 500 μM benutzt und das CP•-Signal für 20 Minuten gemessen.

Da CP• auch oxidiert werden kann (*vgl. Kap. 1.4.4 und Gl. 30 in Kap. 5*) und diverse Radikale sehr starke Oxidationsmittel sind, wurde deren Einfluss untersucht. Dabei wurden zunächst Fenton-generierte Hydroxyl-Radikale (*vgl. Gl. 12 in Kap. 1.1.1*) benutzt. Eisen-II-Ionen wurden in Konzentrationen von 0,1 mM, 0,25 mM und 0,5 mM eingesetzt. Wasserstoffperoxid wurde jeweils im Überschuss von 1 mM zugegeben und anschließend das CP•-Signal über 20 Minuten erfasst. Zusätzlich erfolgte eine Messung nur mit 1 mM Wasserstoffperoxid ohne Eisen-II-Ionen.

Im Weiteren wurde die oxidative Potenz der AAPH-generierten Peroxyl-Radikale (vgl. Kap. 3.4.1) getestet. Dabei wurde AAPH mit 50 mM zugesetzt und für 60 Minuten gemessen.

3.4.3 Perfusionsmedium

Bauer et al. führten in diesem Labor Experimente mit perfundierten Ratten-Nieren durch [10]. Da dies zunächst auch im Rahmen dieser Arbeit angestrebt wurde, wurden zur Vorbereitung Untersuchungen mit dem Perfusionsmedium durchgeführt. Dessen Zusammensetzung wurde empirisch optimiert: fünf Volumenteile Custodiol, fünf Gelatinepolysuccinat Infusionslösung und einer Glucose 40 % Pfrimmer Infusionslösung. Diese Lösung wurde nach der Empfehlung von Prof. Dikalov über Nacht mit 20 μM DFA und 5 μM DETC inkubiert [28]. Für die Experimente mit CP-H und CP• wurden beide Verbindungen jeweils im Perfusionsmedium gelöst und im ersten Schritt über 60 Minuten die Änderung der ESR-Intensität gemessen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden jeweils 1 μM Eisen-II-Ionen und Wasserstoffperoxid in eine CP-H-Lösung gegeben und das entstehende CP•-Signal nach 10 Minuten erfasst.

3.5 *In vivo* Experimente

3.5.1 Ratten

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten im Alter von fünf bis acht Wochen und einem Gewicht von 200 bis 250g verwendet. Die Tiere wurden in der zentralen Tierzucht der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, ausgehend von Tieren von der Harlan Bioservice for Science GmbH, Walsrode, Deutschland, nachgezüchtet. Sie wurden unter konstanten Bedingungen gehalten, dazu zählen jeweils 12-stündige Hell- und Dunkelperioden und freier Futter- und Wasserzugang. Die Narkose erfolgte mit 0,6 ml Rompun 20 mg/ml und 0,8 ml Ketavet 100 mg/ml. Außerdem erhielten die Ratten 1000 U Heparin zur Gerinnungshemmung.

3.5.2 Nieren-Präparation

Nach erfolgreicher Narkoseeinleitung wurde das Abdomen der Ratten mit einem Schnitt eröffnet, anschließend das Peritoneum eröffnet und die linke Niere dargestellt. An der A. und V. renalis wurde ohne Naht der Schnitt geführt und die Niere mitsamt der Kapsel entnommen. Ab diesem Zeitpunkt war die Niere ischämisch. Anschließend wurde sie mit isotoner Kochsalzlösung abgespült, um anhaftendes Blut zu entfernen. Für die erste Gruppe der Experimente wurde die Niere sofort weiterverarbeitet. Bei der zweiten Gruppe wurde diese bei 37°C in einem verschlossenen Gefäß für 20 Minuten in isotoner Natriumchloridlösung inkubiert.

Anschließend wurde die Niere zunächst grob mit der Schere zerkleinert und unter Zugabe von 8 ml Wasser pro g Feuchtgewebe homogenisiert. Dies erfolgte von Hand in zehn kreisenden Schüben und entspricht prinzipiell einer Reperfusion, da das Wasser sauerstoffgesättigt war. Anschließend wurde der Zellaufschluss mit einer Microfuge R Centrifuge von Beckman Instruments, Palo Alto, USA, bei 4°C und 600 g für 10 Minuten zentrifugiert. Um ein Aufwirbeln zu verhindern wurde die Deceleration auf Stufe 4 (entspricht 10 min und 16 s Bremszeit) beschränkt, die Acceleration wurde möglichst hoch (Stufe 9, entspricht 19 Sekunden Beschleunigungszeit). Im Ergebnis wurde der Kern von dem übrigen Zellaufschluss getrennt [63]. Der Überstand, abgesehen von den Resten der Fettkapsel, die ganz oben im Zentrifugen-gefäß waren, wurde für die Messungen genutzt.

Insgesamt ergab sich ein Zeitintervall von 15 Minuten, in dem nicht mit der ESR-Spektroskopie gemessen werden konnte. 1 mM CP-H oder 90 µM CP• wurden zu verschiedenen Zeiten der Aufbereitung zugegeben, die jeweils erläutert werden. Anschließend erfolgte die Messung des CP•-Signals.

3.5.3 Messungen mit CP•

Die reduktive Kapazität des nativen Zellaufschlusses für CP• wurde über 60 Minuten gemessen. Dafür wurde die Ischämiezeit so kurz wie möglich gehalten; insgesamt nur wenige Sekunden. CP• wurde erst nach der Aufbereitung des Zellaufschlusses und damit unmittelbar vor der Messung hinzugegeben.

Es wurden insgesamt drei weitere Experimente mit möglichst kurzer Ischämiedauer und CP•-Zugabe 15 Minuten nach der Reperfusion durchgeführt. Im ersten wurde der Zellaufschluss für 60 Minuten bei 80°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit einer Qualitron Mini-Centrifuge DW-41 der Firma Qualitron

Incorporation, Hooland, USA bei 7.000 rpm für 2 Minuten zentrifugiert. Dem Überstand wurde CP• zugegeben und das ESR-Signal gemessen.

In einem dritten Experiment wurde der Zellaufschluss für 24 Stunden bei -21°C inkubiert. Nach dem Wiederauftauen wurde CP• zugesetzt und das ESR-Signal gemessen.

Im vierten Experiment wurde der mit der ersten Zentrifugation gewonnene Überstand eines nativen Zellaufschlusses noch einmal mit der Microfuge R Centrifuge von Beckman Instruments, Palo Alto, USA, bei 4°C und 10.000 G für 10 Minuten zentrifugiert. Dem Überstand, der näherungsweise dem Cytosol entspricht, wurde CP• zugegeben und anschließend das ESR-Signal gemessen.

In einem anderen Versuchsablauf wurden die Ratten-Nieren bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Nach dieser Ischämie wurde CP• zugegeben und die Nieren homogenisiert. Anschließend wurde das CP•-Signal gemessen.

3.5.4 Messungen mit CP-H

Zunächst wurde die Ischämiezeit auf wenige Sekunden begrenzt und CP-H erst deutlich nach der Reperfusion hinzugegeben. Das CP•-Signal wurde anschließend für 75 Minuten erfasst.

CP-H wurde in einem weiteren Experiment als Marker für oxidativen Stress *in vivo* genutzt. Nach 20 Minuten Ischämie bei 37°C wurde es vor der Homogenisierung zugegeben. Nach der Aufbereitung des Zellaufschlusses wurde das CP•-Signal für 60 Minuten gemessen.

3.6. Statistische Auswertung

Alle angegebenen Intensitäten und daraus errechneten Konzentration verstehen sich als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes aus mindestens drei voneinander unabhängigen Messungen. Die statistische Analyse erfolgte mit dem gepaarten

Student's *t*-Test; dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5% ($p < 0,05$) als Grenze der Signifikanz angenommen.

4. Ergebnisse

4.1 Oxidation von CP-H *in vitro*

Mit Hilfe der Oxidation von CP-H zu CP• und der anschließenden Erfassung des CP•-Signals soll die Produktion oxidierender Radikale gemessen werden. Dabei ist es von Bedeutung, ob CP-H auch ohne Radikale oxidiert wird, da dadurch die Radikalproduktion überschätzt würde.

Um die Eignung von CP-H als Marker für Radikalproduktion zu prüfen, wurde im Anschluss das Maß der CP•-Produktion durch verschiedene radikalproduzierende Systeme ermittelt. Diese *in vitro* Anordnung ermöglicht eine genaue Berechnung der Radikalkonzentrationen und damit eine Aussage über den Anteil der Radikale, die von CP-H gefangen wurden.

4.1.1 Autoxidation und Oxidation durch Eisen-III-Ionen

CP-H gehört zu den Nitroxiden, die in Lösung einer Autoxidation unterliegen können. Es entstünde CP•. Diese Reaktion ist wahrscheinlich auf die Anwesenheit geringer Mengen Eisen-Ionen zurückzuführen [43]. Eine spontane Oxidation könnte zu einer Überschätzung der zu messenden Radikalproduktion führen. Daher wurde sie, wie in Abb. 3a zu sehen, erfasst: In Wasser gelöstes CP-H zeigte im Verlauf von 60 Minuten keine signifikante Autoxidation. Es fällt jedoch auf, dass schon zu Beginn der Messung etwa $0,44 \mu\text{M} \pm 0,04$ CP• enthalten waren. Entweder entsteht diese Menge sofort nach dem Lösen, oder es ist herstellungsbedingt bereits im Präparat (CP-H) anwesend. Diese ermittelte Basiskonzentration muss bei Messungen mit CP-H abgezogen werden.

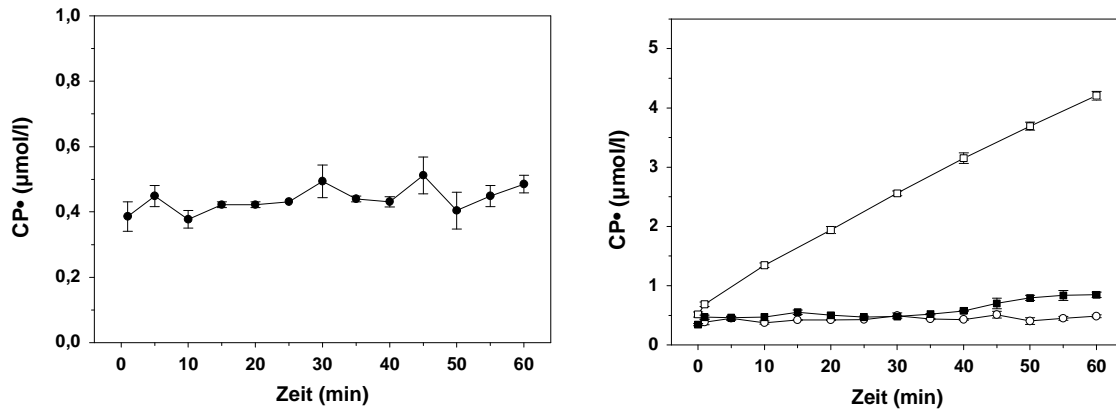


Abb. 3: Oxidation von CP-H in verschiedenen Lösungen

a) Autoxidation

Ansatz: CP-H 1 mM Lösung in Wasser. Diese Kurve dient im Weiteren als Kontrollkurve. n=3.

b) Oxidation durch Eisen-III-Ionen

Ansatz: CP-H 1 mM. -O- Kontrollansatz ohne Fe(III) und -■- Fe(III) 1 μM und -□- Fe(III) 10 μM. n=3.

In der Abb. 3b wurde überprüft, in wie weit Eisen-III-Ionen CP-H oxidieren können. Bei einer Konzentration von 1 μM konnte ein sehr geringe, aber signifikante Oxidation von CP-H in CP• beobachtet werden ($p < 0,005$): nach 60 Minuten entstanden 0,8 μM CP•. Mit einer zehnfach höheren Konzentration von Eisen-III-Ionen konnte ein signifikanter Anstieg der CP•-Konzentration nach 60 Minuten auf $4,2 \pm 0,07$ μM festgestellt werden ($p < 0,001$). Pro Zeiteinheit wurden dabei nahezu konstante Mengen CP• gebildet.

4.1.2 Oxidation durch Radikale

Der Ischämie-Reperfusionsschaden wird zu großen Teilen durch Radikale ausgelöst. Dabei spielen sowohl ROS als auch die durch diese gebildeten Kohlenstoff-zentrierten Radikale im Rahmen der Lipidperoxidation (vgl. Kap. 1.3.2) eine zentrale Rolle [9, 43].

Die Eignung von CP-H als Marker für oxidativen Stress *in vitro* wurde mit Hilfe von zwei Radikal-generierenden Systemen überprüft. Die in Kap. 4.1.1 gemessene Basiskonzentration von $0,44 \pm 0,04$ μM CP• wurde im Folgenden stets abgezogen. Es darf angenommen werden, dass bei der Zugabe einer definierten Menge Fe(II) zu einer H₂O₂-haltigen wässrigen Lösung theoretisch eine der Eisenkonzentration äquivalente Konzentration an •OH gebildet wird (vgl. Gl. 12 in Kap. 1.1.1). Dieser Zusammenhang ist in Abb. 4a dargestellt.

Bei dem in Abb. 4b gezeigten thermischen Zerfall von AAPH bei Raumtemperatur (vgl. Gl. 35 und 36 in Kap.5.1.1) wurden kontinuierlich Peroxyl-Radikale gebildet.

Da die Fenton-Reaktion bereits unmittelbar nach Interaktion von Fe(II) mit H₂O₂ abgeschlossen sein sollte, wurde die Menge der gebildeten CP• nicht über ein Zeitintervall hinweg, sondern nach 10 Minuten einmalig erfasst. Anhand unveröffentlichter Daten konnte gezeigt werden, dass bis zu diesem Moment die CP•-Konzentration ansteigt und dann auf einem stabilen Niveau bleibt. Bei einer Eisen-II-Ionen und Wasserstoffperoxid-Konzentration von 1 µM entstanden nach 10 Minuten $0,65 \pm 0,05$ µM CP• ($p < 0,001$). Bei Einsatz von 10 µM waren es $8,8 \pm 0,58$ µM CP• ($p < 0,001$). Je nachdem, wie viel Hydroxyl-Radikale gebildet wurden, konnten also 65 ± 5 bzw. $88 \pm 5,8$ % durch CP-H abgefangen werden.

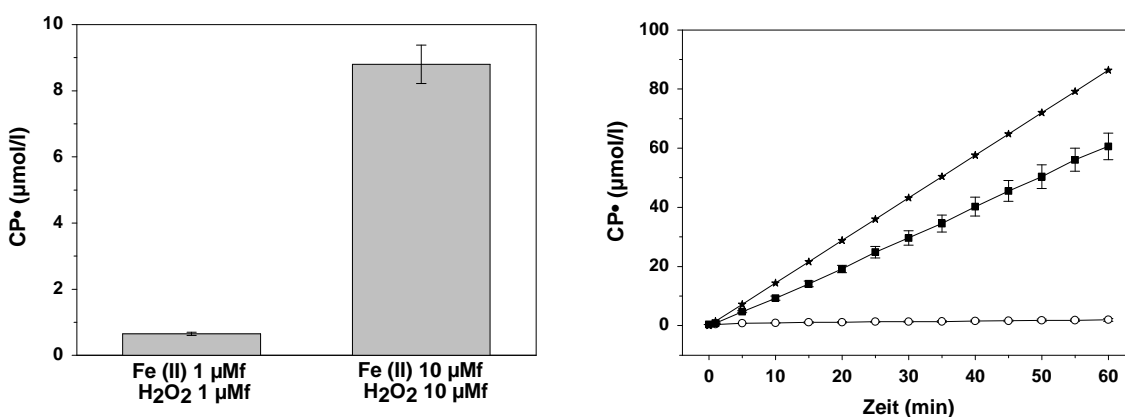


Abb. 4: Oxidation von CP-H durch

a) Fenton-generierte Hydroxyl-Radikale

Ansatz: CP-H 1 mM. Fe(II)- und H₂O₂-Konzentrationen im Bild. 10 Minuten nach Herstellung des Ansatzes gemessen. n=5.

b) AAPH-generierte Peroxyl-Radikale Ansatz:

CP-H 1 mM. -O- Kontrollansatz ohne AAPH, -■- AAPH 50 mM. n=3.

-★- theoretisch produzierte CP•-Menge, wenn alle Peroxyl-Radikale mit CP-H reagieren würden. Bei 25 °C liegt eine Bildungsrate von ca. 1,44 µM/min vor (vgl. Kap. 3.4.1).

Die in Abb. 4b dargestellte Oxidation von CP-H zu CP• durch Peroxyl-Radikale verlief mit einem signifikanten Anstieg. Die CP•-Konzentration steigt dabei nahezu linear an ($p < 0,005$). Im Vergleich zur theoretisch produzierten Radikal-Menge (vgl. Kap. 3.4.1) fällt auf, dass zunächst 58 ± 6 % der Radikale von CP-H gefangen wurden. Dieser Anteil fällt dann auf ein stabiles Niveau von $68 \pm 0,6$ % nach 5 Minuten ab.

4.2 Reduktion von CP• *in vitro*

Da der CP•-Gehalt als Maß für die Radikalproduktion genutzt werden soll, muss zunächst untersucht werden, in welchem Ausmaß das entstandene CP• wieder durch in der Zelle enthaltene Reduktionsmittel gelöscht werden kann. In Versuchsanordnungen, in denen diese enthalten sind, und bei *in vivo* Messungen würde sonst die Radikalproduktion unterschätzt.

4.2.1 Reduktion durch Ascorbat

Ascorbat ist ein wichtiges nicht-enzymatisches Reduktionsmittel der Zelle [68]. Aus diesem Grund wurde es, wie in Abb. 5a zu sehen, in verschiedenen Konzentrationen mit CP• kombiniert. Bei allen eingesetzten Konzentrationen konnte eine signifikante Löschung des CP• nachgewiesen werden, wenn auch in stark unterschiedlichem Ausmaß: bei einer Ascorbat-Konzentration von 0,1 mM wurden 2 ± 1 % des CP• gelöscht ($p < 0,05$). Bei 0,3 mM Ascorbat verringerte sich die gemessene CP•-Konzentration um $6 \pm 0,02$ % ($p = 0,001$) und bei 0,6 mM Ascorbat um 36 ± 1 % ($p < 0,001$). 1 mM Ascorbat bewirkte eine Verminderung des CP•-Signals um 86 ± 1 % ($p < 0,001$).

Wenn das CP•-Signal nicht mehr erfasst werden kann, erlaubt dies keine Aussage über die Art der Veränderung durch Ascorbat. Mit Hilfe des in Abb. 5b dargestellten Experimentes konnte die Reversibilität dieser Reaktion gezeigt werden. Das Oxidationsmittel Kaliumhexacyanoferrat (III) konnte das CP•-Signal regenerieren. Dabei wurde jedoch nicht wieder die Ausgangskonzentration von 90 μ M CP• erreicht: bei $70 \pm 1,5$ μ M stellte sich ein Gleichgewicht ein, welches in den folgenden 30 Minuten stabil blieb.

Zur weiteren Untersuchung dieser Reaktion wurden zusätzlich einige photospektrometrische Messungen durchgeführt. Oxidiert Kaliumhexacyanoferrat (III) einen Reaktionspartner, entsteht Kaliumhexacyanoferrat (II). Die Spektren dieser beiden Verbindungen wurden erfasst. Entsprechend Abb. 5c ist zu erkennen, dass lediglich das dreiwertige Kaliumhexacyanoferrat Licht bei 420 nm absorbiert. In Abb. 5d ist die Wiederholung des ESR-spektrometrischen Experimentes aus Abb. 5b mit jeweils einem Fünftel der Konzentration im Photometer dargestellt. Erfasst wurde die Absorption bei 420 nm. Nach der Zugabe von 1 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) wurde eine Absorption von ca. 0,9 gemessen. Diese sank binnen 2 Minuten auf einen konstanten Wert von $0,68 \pm 0,002$.

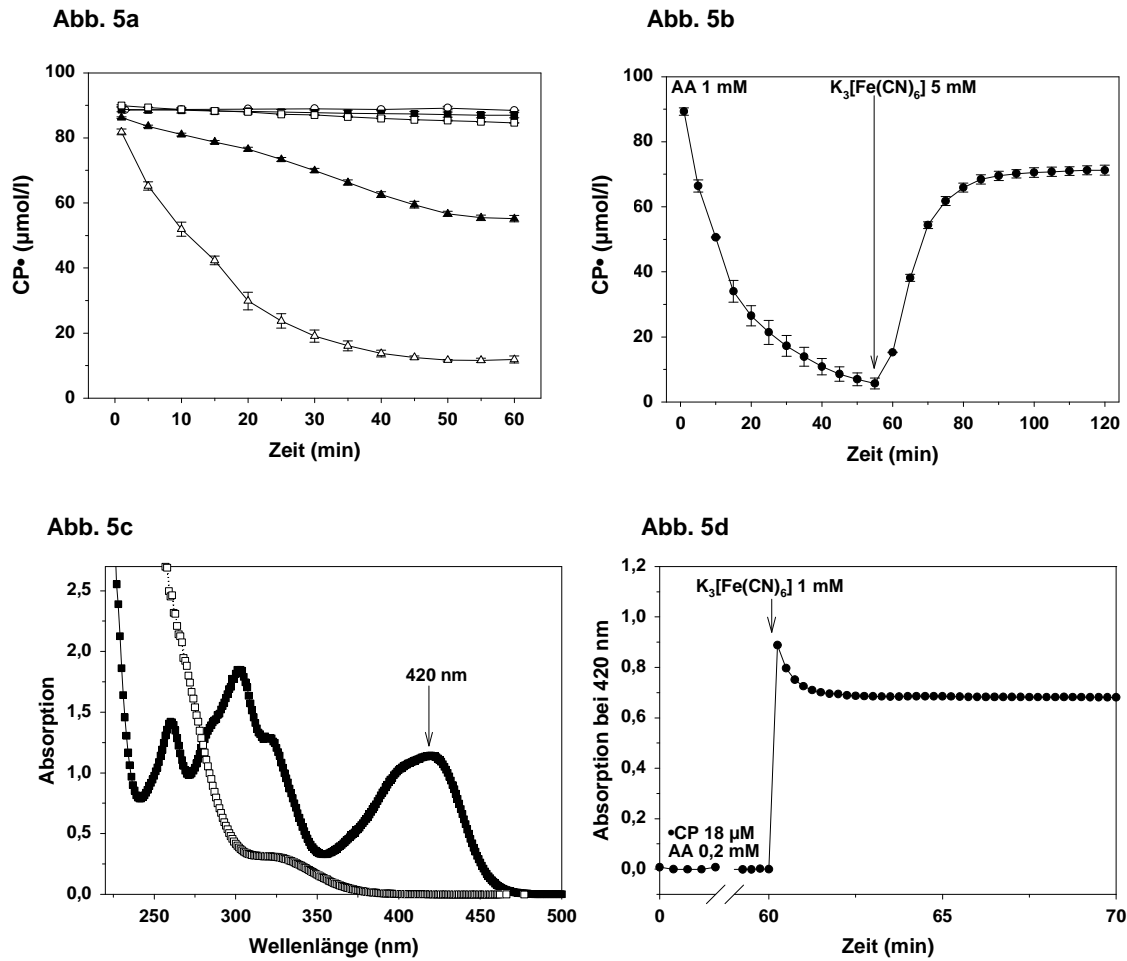


Abb. 5: Reduktion von CP• durch Ascorbat (Asch⁻).

a) Mit verschiedenen Konzentrationen von Ascorbat

Ansatz: CP• 90 μM. -○- Kontrollansatz ohne AA n=3, -■- AA 0,1 mM n=6, -□- AA 0,3 mM n=6, -▲- AA 0,6 mM n=6 und -△- AA 1 mM n=6.

b) Mit anschließender Reoxidation durch Kaliumhexacyanoferrat (III)

Ansatz: CP• 90 μM. AA 1 mM nach 60 Minuten K₃[Fe(CN)₆] 5 mM hinzugegeben. n=3.

c) photometrisches Spektrum von Kaliumhexacyanoferrat (II) und (III)

Ansatz: -□- Kaliumhexacyanoferrat (II) 1 mM und -■- Kaliumhexacyanoferrat (III) 1 mM. n=1.

d) Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat (III) in Gegenwart von Ascorbat und CP•

Ansatz: CP• 18 μM. AA 0,2 mM nach 60 Minuten K₃[Fe(CN)₆] 1 mM hinzugegeben. n=1.

4.2.2 Reduktion durch GSH

Auch GSH ist ein biologisch bedeutsames Reduktionsmittel [80]. Entsprechend der Abb. 6a war es aber kaum in der Lage, mit CP• zu reagieren. Bei einer Konzentration von 5 mM wurde kein signifikanter Abfall des CP•-Signals beobachtet. Bei einer GSH-Konzentration von 10 mM konnte eine signifikante CP•-Reduktion um $4 \pm 2 \%$ nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

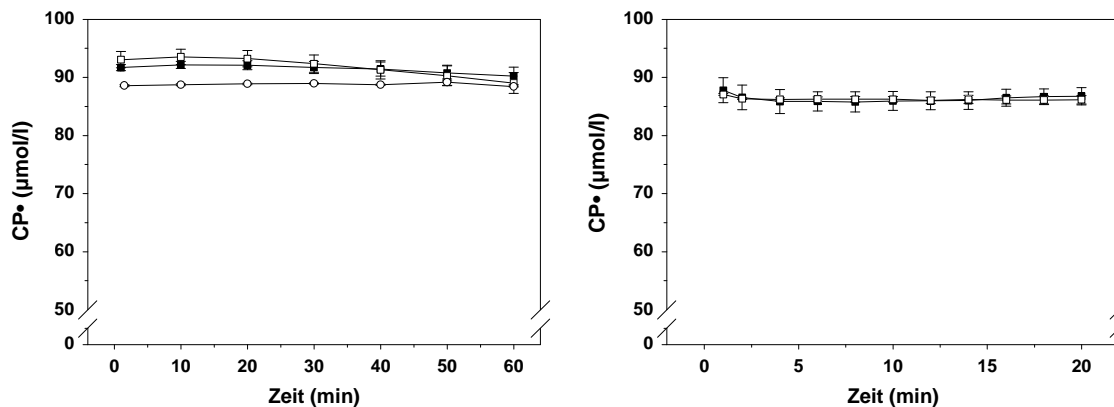


Abb.6: Reduktion von CP•

a) durch GSH

Ansatz: a) CP• 90 µM. -○- Kontrollansatz ohne GSH n=3, -■- GSH 5 mM und -□- GSH 10 mM. n=5.

b) durch Eisen-II-Ionen

Ansatz: CP• 90 µM. -■- Fe(II) 0,1 mM und -□- Fe(II) 0,5 mM. n=3.

4.2.3 Reduktion durch Eisen-II-Ionen

In Abb. 6b ist die Abhängigkeit der CP•-Reduktion zu CP-H von der Eisen(II)-Ionen Konzentration dargestellt. Bei einer Konzentration von 0,1 mM erfolgte in den ersten 4 Minuten eine geringfügige aber signifikante Löschung des CP•-Signals um $2,2 \pm 0,2 \%$ ($p < 0,002$). Anschließend stieg die gemessene CP•-Konzentration allmählich an, bis sie nach 20 Minuten wieder den Ausgangswert erreicht hatte. Diese Konzentration von Eisen-II-Ionen entspricht etwa dem hundertfachen der physiologischen Konzentration [42].

Mit einer Eisen(II)-Ionen Konzentration von 0,5 mM konnte keine signifikante Reduktion der CP•-Konzentration gemessen werden.

4.3 Reaktion von CP• mit Radikalen *in vitro*

Viele Radikale, insbesondere das Hydroxyl-Radikal, sind sehr reaktiv und können nicht nur CP-H zu CP• oxidieren, sondern evtl. auch CP• selbst weiter oxidieren und damit wieder das ESR-Signal des CP• vermindern (vgl. Gl. 30 in Kap. 5). Dies hätte eine Veränderung der Struktur und eine Löschung des Signals zur Folge. Zunächst wurde als Radikal generierendes System die Fenton-Reaktion genutzt (vgl. Gl. 12 in Kap. 1.1.1). Wie schon bei den Versuchen mit CP-H (vgl. Kap. 4.1.2) wurden verschiedene Eisen(II)-Ionen- und Wasserstoffperoxid-Konzentrationen eingesetzt. In der Abb. 7a ist zu erkennen, dass bei den Eisen(II)-Ionen-Konzentrationen 0,1 mM und 0,25 mM und in Gegenwart von 1 mM Wasserstoffperoxid keine signifikante Löschung des CP•-Signals erfolgte. Die alleinige Anwesenheit von Wasserstoffperoxid hat keinen messbaren Einfluss auf die zugesetzte CP•-Konzentration. Erst durch eine Zugabe von 0,5 mM Eisen(II)-Ionen wurde eine deutliche Reduktion der CP•-Konzentration um $28 \pm 2 \%$ in der ersten Minute erreicht. Anschließend blieb bei allen drei Konzentrationen die CP•-Menge konstant.

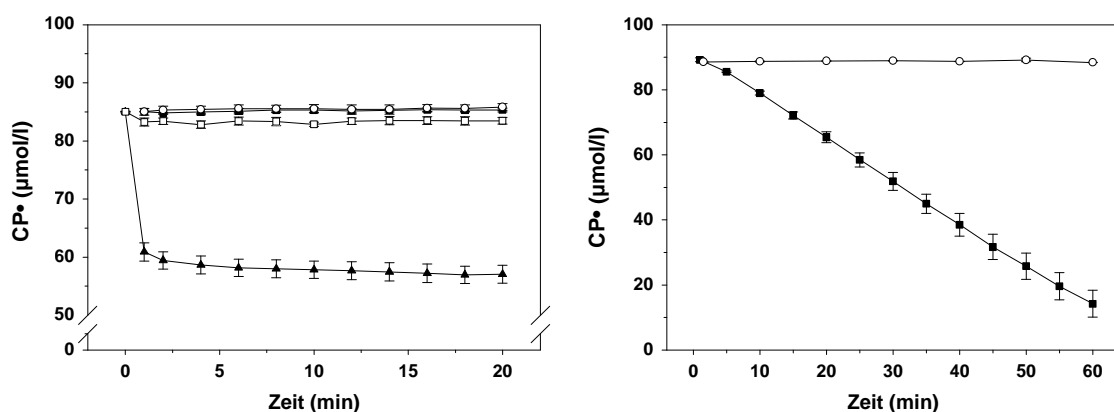


Abb. 7: Löschung von CP• durch Radikale

a) Fenton-generierte Hydroxyl-Radikale

Ansatz: CP• 90 µM. -O- Kontrollansatz mit H₂O₂ 1 mM, -■- Fe(II) 0,1 mM und H₂O₂ 1 mM, -□- Fe(II) 0,25 mM und H₂O₂ 1 mM und -▲- Fe(II) 0,5 mM und H₂O₂ 1 mM. n=3.

b) durch AAPH-generierte Peroxyl-Radikale

Ansatz: CP• 90 µM. -O- Kontrollansatz ohne AAPH und -■- AAPH 50 mM. n=3.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der thermische Zerfall von AAPH bei Raumtemperatur (vgl. Gl. 35 und 36 in Kap. 5.1.1) als Quelle von Peroxyl-Radikalen genutzt. Es wurde dieselbe Konzentration von AAPH (50 mM) wie in den Versuchen mit CP-H eingesetzt (vgl. Kap. 4.1.2). Die Ergebnisse sind in Abb. 7b dargestellt.

Die gebildeten Radikale waren in hohem Ausmaß in der Lage, CP• zu löschen: bereits ab der fünften Minute wurden relativ konstant $1,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$ CP• pro Minute umgesetzt. Nach 60 Minuten waren nur noch $16 \pm 4\%$ der ursprünglichen CP•-Menge erhalten.

4.4 Verhalten im Perfusionsmedium

In Anlehnung an in diesem Labor durchgeführte Experimente wurde eine Perfusion der Rattennieren zunächst angestrebt. Bauer et al. verwendeten dabei ein empirisch erprobtes Perfusionsmedium, dessen genaue Zusammensetzung in Kap. 3.4.3 beschrieben wurde [10].

4.4.1 Verhalten von CP-H oder CP• im Perfusionsmedium

Im Perfusionsmedium könnte durch die Vielzahl an Verbindungen eine Autoxidation von CP-H gefördert werden. Außerdem sind eine Reihe potentiell reduktiv wirksamer Substanzen enthalten, wie Histidin und Glucose, die CP• angreifen könnten. Bei der Lösung von CP-H in dem Perfusionsmedium, dargestellt in Abb. 8a, konnte kein signifikanter Anstieg der CP•-Konzentration gemessen werden. Die Schwankungen waren zu groß für den Nachweis einer signifikanten Oxidation. Aus der Abb. 8b geht hervor, dass CP• nicht durch das Perfusionsmedium verändert wurde. Damit scheint dieses Medium keinen Einfluss auf die Stabilität weder von CP-H noch CP• zu haben.

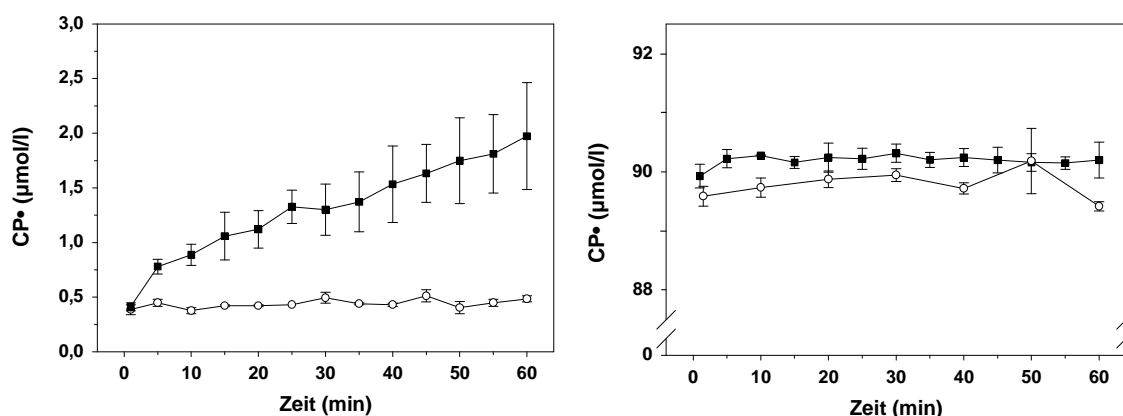


Abb. 8 Beeinflussung durch das Perfusionsmedium

a) Verhalten von CP-H

Ansatz: CP-H 1 mM. -O- Kontrollansatz in Wasser und -■- Lösung in Perfusionsmedium. n=3.

b) Verhalten von CP•

Ansatz: CP• 90 µM. -O- Kontrollansatz in Wasser und -■- Lösung in Perfusionsmedium. n=3.

4.4.2 Fenton-Reaktion

Die bei der Fenton-Reaktion (*vgl. Gl. 12 in Kap. 1.1.1*) gebildeten Hydroxyl-Radikale reagieren mit nahezu jeder Verbindung in ihrer unmittelbaren Umgebung [43]. Unterschiede ergeben sich dabei durch geringfügige Affinitätsunterschiede. Im Perfusionsmedium ist das als Radikalfänger bekannte Tryptophan enthalten. Es könnte mit den Hydroxyl-Radikalen reagieren, bevor diese CP-H in CP• umwandeln. Histidin, das in hoher Konzentration enthalten ist, reagiert sehr schnell mit Hydroxyl-Radikalen [44]. Andererseits besteht auch die Möglichkeit des Eintrags von Eisen-II-Ionen oder der Regeneration der Eisen-III-Ionen, so dass weitere Hydroxyl-Radikale gebildet würden. Dafür wäre jedoch auch weiteres Wasserstoffperoxid nötig.

In Abb. 9 ist die Reaktion von Fenton-generierten Hydroxyl-Radikalen mit CP-H in verschiedenen Medien dargestellt. Zumindest in Wasser werden aus je 1 μM Eisen-II-Ionen und Wasserstoffperoxid 1 μM Hydroxyl-Radikale gebildet (*vgl. Gl. 12 in Kap. 1.1.1*). Je nach eingesetztem Medium wird der Anteil der Radikale, die mit CP-H reagieren, verschieden sein.

In Wasser werden entsprechend Abb. 4a in Kap. 4.1.2 $0,65 \pm 0,05 \mu\text{M}$ CP• gebildet (Balken 1). Im Perfusionsmedium wird jedoch eine signifikant höhere Produktion von $2,5 \pm 0,12 \mu\text{M}$ CP• erfasst (Balken 2). Bei reinem Custodiol als einer der beiden Hauptbestandteile des Perfusionsmediums (*vgl. Kap. 3.4.3*) werden $3,3 \pm 0,03 \mu\text{M}$ CP• gebildet (Balken 3). Werden diesem die Chelatoren DFA und DETC zugesetzt, reduziert sich die gemessene CP•-Menge nicht signifikant auf $3,2 \pm 0,34 \mu\text{M}$ (Balken 4). Auch die Differenz zur Produktion im Perfusionsmedium (Balken 2) ist nicht signifikant. Der zweite Hauptbestandteil des Perfusionsmediums, Gelafundin, bewirkt die stärkste CP•-Bildung: insgesamt $6,2 \pm 0,24 \mu\text{M}$ wurden erfasst (Balken 5). Im Gegensatz dazu findet nach Zugabe der Metallionen-Chelatoren zu Gelafundin die geringste CP•-Produktion mit einer Endkonzentration von $1,5 \pm 0,34 \mu\text{M}$ statt (Balken 6). Diese Konzentration liegt nicht signifikant über der in Wasser gemessenen (Balken 1).

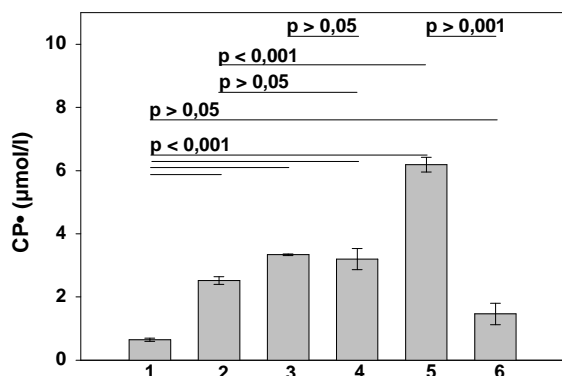


Abb. 9: Einfluss von Hydroxyl-Radikalen auf CP-H in verschiedenen Medien

Ansatz: CP-H 1 mM, Fe(II) und H₂O₂ jeweils 1 µM. In 70 µl

1 Wasser

2 Perfusionsmedium (5 Volumenteile Custodiol + 5 Volumenteile Gelafundin + 1 Volumenteil Glucose 40 +

20 µM DFA + 5 µM DETC)

3 Custodiol

4 Custodiol + 20 µM DFA + 5 µM DETC

5 Gelafundin

6 Gelafundin + 20 µM DFA + 5 µM DETC

10 Minuten nach Herstellung des Ansatzes wurde die CP•-Konzentration gemessen. n= 5.

4.5 Stabilität von CP• *in vivo*

Nachdem die Stabilität von CP• *in vitro* geprüft wurde, sollte mit den folgenden Experimenten die Eignung für *in vivo* Messreihen geprüft werden. Die für die Messung der Radikalproduktion relevante Umwandlung von CP-H in CP• würde durch eine Löschung des CP•-Signals unterschätzt. In zwei Messreihen wurde zunächst das System ohne den Einfluss von Radikalen untersucht und anschließend wurde geprüft, inwieweit Radikale selbst CP• löschen.

In der Zelle sind neben Ascorbat, welches CP• *in vitro* reduzieren konnte, viele weitere potentielle Reduktionsmittel enthalten. Insbesondere verfügt die Zelle über eine Reihe zum Teil unspezifisch reduktiv wirksamer Enzyme.

Um den Einfluss von Radikalen auszuschließen, wurde zum einen die Ischämiezeit auf wenige Sekunden beschränkt und damit oxidativer Stress weitgehend vermieden und zum anderen CP• erst deutlich nach der Reperfusion hinzugegeben, so dass die initial gebildeten Radikale bereits mit anderen Substraten reagiert haben.

In Abb. 10a ist zu erkennen, dass der native Zellaufschluss CP• relativ stark löscht: in den ersten 15 Minuten insgesamt $20,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$ und danach relativ konstant $0,44 \pm 0,036 \mu\text{M}$ pro Minute CP•. Nach 60 Minuten waren nur noch $54 \pm 1,0 \%$ der Ausgangskonzentration von CP• erhalten ($p = 0,001$).

Der für 24 Stunden bei -21°C inkubierte und dann bei Raumtemperatur wieder aufgetaute Zellaufschluss zeigte eine weniger starke Kapazität, CP^{\bullet} anzugreifen. Dabei sind zwei Phasen zu erkennen: in der ersten, bis 35 Minuten, erfolgte eine Löschung um etwa $0,58 \pm 0,03 \mu\text{M}$ pro Minute und in der zweiten um $0,34 \pm 0,03 \mu\text{M}$ pro Minute. Insgesamt waren nach 60 Minuten $68 \pm 1,1 \%$ des CP^{\bullet} nicht gelöscht ($p < 0,05$).

Im dritten Versuch wurde der Zellaufschluss bei 80°C für eine Stunde erhitzt. Das so behandelte Medium hatte das geringste Potential, CP^{\bullet} zu löschen: es konnte keine signifikante Senkung der CP^{\bullet} -Konzentration ermittelt werden, da zu große Schwankungen vorlagen.

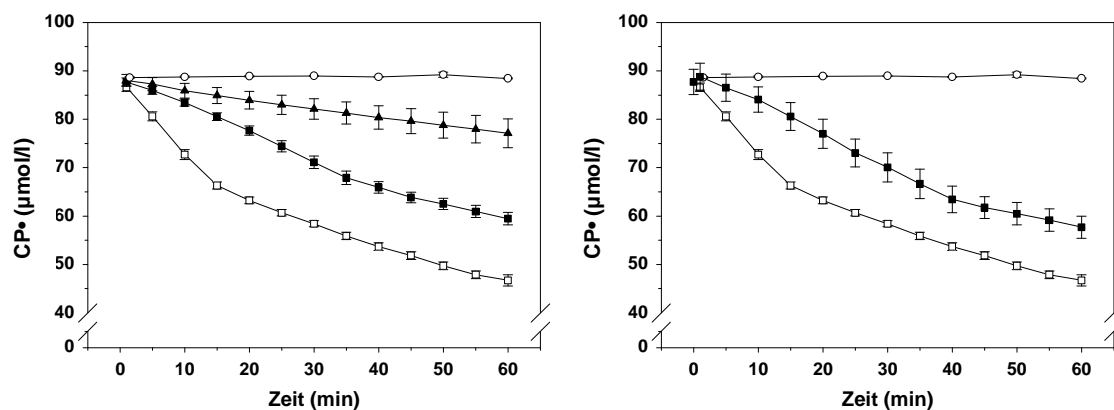


Abb. 10: Löschung des CP^{\bullet} -Signals *in vivo*

a) nativer, erhitzter oder gefrorener Zellaufschluss

Ansatz: CP^{\bullet} $90 \mu\text{M}$. -O- Kontrollansatz ohne Zellaufschluss, $n=3$. -□- nativer Zellaufschluss $n=3$, -■- für 24 Stunden bei -21°C inkubierter Zellaufschluss, $n=3$ und -▲- erhitzter Zellaufschluss (1 Stunde bei 80°C). Wenige Sekunden Ischämie, CP^{\bullet} -Zugabe ca. 15 min nach Reoxygenierung, $n=3$.

b) nativer Zellaufschluss oder Cytosol

Ansatz: CP^{\bullet} $90 \mu\text{M}$. -O- Kontrollansatz ohne Zellaufschluss $n=3$, -■- natives Cytosol und -□- nativer Zellaufschluss. Wenige Sekunden Ischämie, CP^{\bullet} -Zugabe ca. 15 min nach Reoxygenierung, $n=3$.

In der Abb. 10b wurde überprüft, inwieweit natives Cytosol im Vergleich zu nativem Zellaufschluss CP^{\bullet} löscht. Es sind auch hier zwei Phasen zu erkennen: in der ersten, bis 40 Minuten, wird das CP^{\bullet} -Signal um $0,65 \pm 0,03 \mu\text{M}$ pro Minute gelöscht. In der zweiten Phase sind es nur noch $0,29 \pm 0,02 \mu\text{M}$ pro Minute. Nach 60 Minuten sind noch $65 \pm 2,5 \%$ des CP^{\bullet} nicht gelöscht ($p < 0,001$). Dies sind $11 \pm 3,5 \%$ mehr als beim nativen Zellaufschluss und entspricht damit beinahe dem bei -21°C inkubiertem Zellaufschluss.

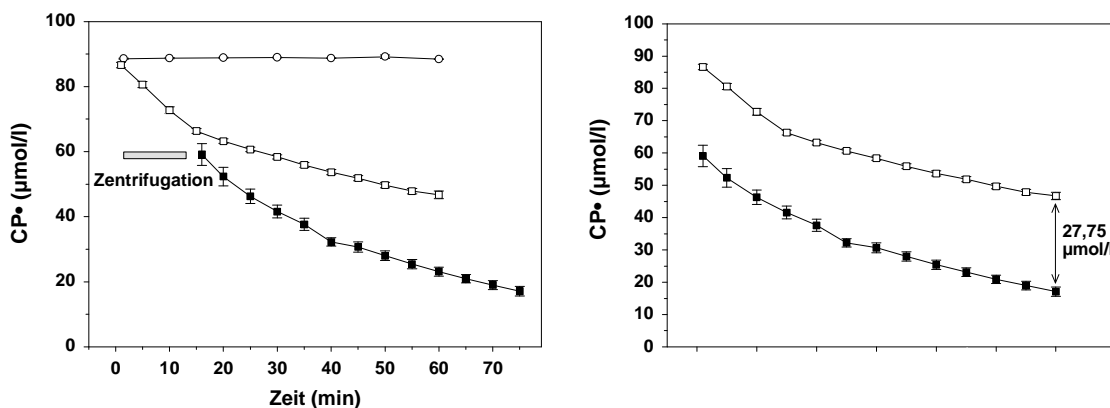


Abb. 11: Löschung des CP•-Signals durch *in vivo* gebildete Radikale

a) nativer oder ischämischer Zellaufschluss

Ansatz: CP• 90 µM. -○- Kontrollansatz ohne Zellaufschluss. -□- nativer Zellaufschluss entsprechend Abb. 10a, -■- für 20 Minuten ischämischer Zellaufschluss. CP•-Zugabe mit Reoxygenierung. n=4.

b) nativer oder ischämischer Zellaufschluss ohne Zeitdarstellung

Ansatz: CP• 90 µM. -□- nativer Zellaufschluss entsprechend Abb. 10a, -■- für 20 Minuten ischämischer Zellaufschluss. CP•-Zugabe mit Reoxygenierung. n=4.

Bereits *in vitro* zeigte sich, dass Radikale CP• angreifen können (vgl. Abb. 7 in Kap. 4.3). Dadurch wird die Menge der gebildeten Radikale anhand der Umwandlung von CP-H in CP• unterschätzt. Auch *in vivo* wurde dieser Einfluss nachgewiesen. In dem ischämischen Nierenzellaufschluss vor der Reperfusion CP• zugegeben wurde, kann dieses durch die gebildeten Radikale angegriffen werden.

In Abb. 11a ist zum Vergleich noch einmal die Löschung von CP• durch den nativen Zellaufschluss dargestellt. Dabei wurde CP• in beiden Experimenten für 60 Minuten gemessen, bei dem Versuch mit dem ischämischen Zellaufschluss konnte jedoch während der Zentrifugation kein Signal erfasst werden (vgl. Kap. 3.5.2). Es ist zu erkennen, dass auch hier zwei Phasen in der CP•-Abnahme bestehen. In der ersten bis ca. 40 Minuten (Abb. 11a) werden etwa $1,1 \pm 0,15 \mu\text{M}$ pro Minute gelöscht und in der zweiten $0,43 \pm 0,03 \mu\text{M}$ pro Minute. Nach 60 Minuten sind nur noch $19 \pm 1,4 \%$ der Ausgangskonzentration von CP• erhalten ($p < 0,001$). Bei dem nativen Zellaufschluss waren es nach demselben Messintervall $54 \pm 1 \%$.

In Abb. 11b sind die beiden Zellaufschluss-Kurven noch einmal ohne den Zeitunterschied von 15 Minuten dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die beiden Kurven nahezu parallel verlaufen. Die Messungen mit der Radikalproduktion sind relativ konstant um $27,75 \pm 1,8 \mu\text{M}$ geringer als die im nativen Zellaufschluss.

4.6 Messung der Radikalproduktion *in vivo*

Im vorliegenden Experiment sollte die Radikalproduktion *in vivo* mit Hilfe von CP-H erfasst werden. Dadurch lässt sich das Ausmaß des Ischämie-Reperfusionsschadens nach 20 Minuten Warmischämie abschätzen. Die Länge der Ischämiephase wurde an in diesem Labor durch Bauer et al. durchgeführte Experimente mit einem anderen Marker angepasst [10].

Da CP-H jedoch auch durch im Nierenzellaufschluss enthaltene Oxidationsmittel in CP• umgewandelt werden könnte, wurde dies zunächst überprüft. Dafür wurde analog der Experimente mit CP• (*vgl. Kap. 4.5*) die Ischämiedauer auf wenige Sekunden begrenzt und CP-H erst nach der Aufbereitung des Zellaufschlusses hinzugegeben. Auf diese Weise kann die durch Reperfusion (Reoxygenierung) bedingte Entstehung von Radikalen oder eine Reaktion dieser mit CP-H minimiert werden. Damit ist dies als Kontrollwert für die Messung der Radikalproduktion zu werten.

In der Abb. 12a ist zu erkennen, dass nach einer Minute $0,8 \pm 0,08 \mu\text{M}$ CP-H in CP• umgewandelt wurden (-o-). Nach 5 Minuten wurde die maximale CP•-Konzentration von $1,3 \pm 0,09 \mu\text{M}$ erreicht. Anschließend fällt diese auf $0,5 \pm 0,01 \mu\text{M}$ nach 75 Minuten ab.

Im zweiten Schritt wurde die in Abb. 12a -■- dargestellte Warmischämie über 20 Minuten bei CP-H-Zugabe vor der Reoxygenierung zur Messung der Radikalproduktion durchgeführt. Die erste Messung war dabei wegen der nötigen Zentrifugation erst 15 Minuten nach der Homogenisierung und damit Reoxygenierung möglich (*vgl. Kap. 3.5.2*). Im Kurvenverlauf fällt auf, dass das gemessene CP•-Signal signifikant abnimmt ($p = 0,002$). Mit Hilfe einer approximierten Funktion lässt sich die CP•-Konzentration während der Zentrifugation berechnen. Eine Minute nach der Homogenisierung waren demnach $4,8 \mu\text{M}$ CP-H in CP• umgewandelt. Berücksichtigt man die Kontroll-Messungen, müssen $0,8 \pm 0,08 \mu\text{M}$ abgezogen werden. Des Weiteren ist die 1:8 Verdünnung des Zellaufschlusses zur Aufbereitung einzurechnen (*vgl. Kap.3.5.2*). Insgesamt ergeben sich damit $32 \pm 0,64 \mu\text{M}$.

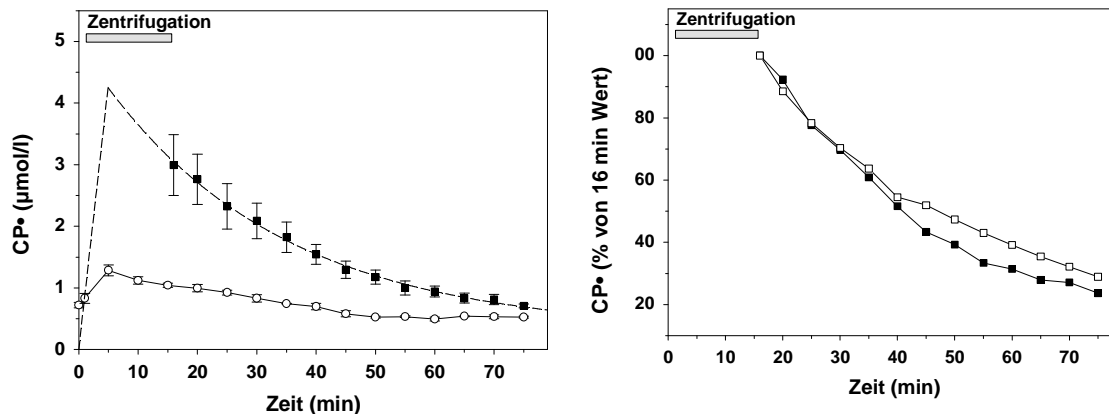


Abb. 12: Reaktion von CP-H mit Nierenzellaufschluss

a) Oxidation von CP-H durch im oxidativen Stress gebildete Radikale.

Ansatz: -○- 5 μl CP-H 10 mM und 45 μl Zellaufschluss (n=4). Ischämiezeit wenige Sekunden, CP-H-Zugabe ca. 15 min nach Reoxygenierung.

-■- 5 μl CP-H 10 mM und 45 μl Zellaufschluss (n=8) und ab 5 min mit folgender Funktion approximiert

(- - -): $y = 0,29 + 4,66 \cdot \exp(-0,034 \cdot x)$. Ischämiezeit

20 min, CP-H-Zugabe mit Reoxygenierung.

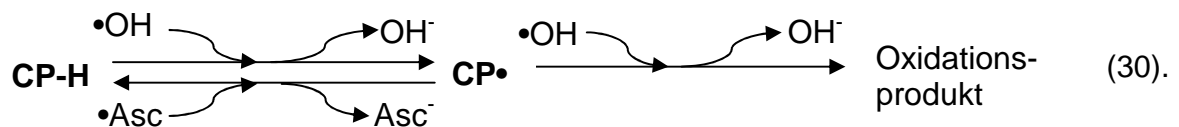
b) Abnahme der CP•-Konzentration in % vom Ausgangswert

Ansatz: a) -□- 5 μl CP• 900 μM und 45 μl nativer Zellaufschluss entsprechend Abb. 10a. -■- 5 μl CP-H 10 mM und 45 μl Zellaufschluss Ischämiezeit 20 min, CP-H-Zugabe mit Reoxygenierung. entsprechend Abb. a.

Der deutliche Abfall des CP•-Signals in Abb. 12a wurde anschließend mit dem bei den *in vivo* Messungen mit CP• (vgl. Abb. 11a) verglichen. Da die gemessenen Signale deutlich verschiedene Intensitäten besitzen, wurden in der Abb. 12b die Konzentrationen als Prozente vom Ausgangswert dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die beiden Kurven nahezu parallel verlaufen. Das CP•-Signal wird demnach in beiden Experimenten gleichstark wieder gelöscht.

5. Diskussion

Basis des in dieser Arbeit verwendeten Nachweises von Radikalen ist die Umwandlung des diamagnetischen CP-H zu dem paramagnetischen und damit mit der ESR-Spektroskopie erfassbaren CP• (vgl. Kap. 1.4.4). Neben Radikalen können grundsätzlich auch andere nichtradikalische Oxidationsmittel CP-H umwandeln. Durch sein freies Elektron ist CP• durch Reduktionsmittel, wie das Ascorbat, angreifbar. In diesem Beispiel entstünde aus dem Ascorbat das Ascorbat-Radikal. Dies entspricht dem ersten Teil der Reaktionsgleichung:



Zusätzlich könnte CP• aber entsprechend dem zweiten Teil der Gleichung durch stark oxidativ wirkende Substanzen, wie Hydroxyl-Radikale, angegriffen werden. Diese Reaktion ist jedoch nur möglich, wenn sie durch starken Radikal-Überschuss erzwungen wird. Dabei entstünde wahrscheinlich das der Abb. 1c (vgl. Kap.1.4.4) entsprechende oxidierte CP•. In der ESR-Spektroskopie konnte immer nur CP• erfasst werden. So ist der gemessene Umsatz von CP-H zu CP• stets die Resultante der oxidierenden Substanzen, insbesondere jener Radikale, die CP• bilden, abzüglich der reduzierenden und stark oxidierenden Substanzen, die es wieder löschen. Die Eignung eines Markers für bestimmte Messungen ergibt sich aus einer Reihe von Faktoren, auf die im Kap. 1.4.2 und auch im Folgenden noch eingegangen wird. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Stabilität von CP-H bzw. CP• untersucht, bevor dieses Messsystem *in vitro* und *in vivo* genutzt wurde.

5.1 Eignung von CP-H als Marker *in vitro*

In vitro Experimente bieten den Vorzug der Überschaubarkeit der wirkenden Einflüsse. Es können auch für medizinische Fragestellungen wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Daher wurden in dieser Arbeit eine Reihe von *in vitro* Untersuchungen durchgeführt.

5.1.1 Stabilität des CP•-Signals *in vitro*

Zunächst wurde die Stabilität von CP• gegenüber zwei der wichtigsten zellulären Reduktionsmittel *in vitro* untersucht: Ascorbat und GSH.

Gegenüber Ascorbat erwies sich CP• als relativ stabil bis zu einer Konzentration von 0,3 mM. Ab 0,6 mM war Ascorbat allerdings in der Lage, CP• deutlich zu löschen (*vgl. Abb. 5a in Kap.4.2.1*). Beim Menschen liegt Ascorbat im Plasma mit einer Konzentration von 0,03 bis 0,14 mM und in den Nierenzellen von 0,4 bis 1,21 mM vor [49, 68]. Das bedeutet, dass CP• im Plasma nicht durch Ascorbat verändert werden würde, in den Nierenzellen jedoch schon, je nach der konkreten Konzentration in der individuellen Niere.

Auffällig an der Signallöschung durch Ascorbat ist auch der nicht lineare Kurvenverlauf: mit zunehmender Messdauer sinkt die Umsatzrate und bleibt schließlich fast bei null stehen. Dies ist bemerkenswert, da auf 1 μM CP• 6,6 bzw. 10 μM Ascorbat kommen. Letztere konnte also bei einem Umsatz 1:1 nicht verbraucht werden. Als Erklärung bietet sich die zunehmend geringere Trefferwahrscheinlichkeit bei abnehmender Konzentration von CP• an.

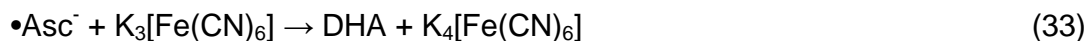
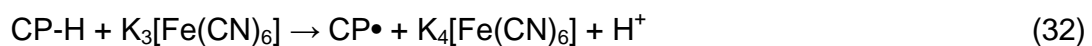
Des Weiteren fällt auf, dass Ascorbat CP• nicht vollständig löscht. Der Kurvenverlauf deutet darauf hin, dass die Reaktion zum Erliegen kommt. Es könnte sich aber auch um ein dynamisches Gleichgewicht zwischen CP•-Löschung zu CP-H und CP•-Neubildung handeln. Hierfür würde das bei der CP•-Löschung gebildete Ascorbat-Radikal mit CP-H reagieren und es entstünde erneut CP• (*vgl. Gl. 31*).

Dass es sich wahrscheinlich um eine reduktive Umwandlung von CP• in CP-H durch Ascorbat handelt, konnte mit Hilfe des Experimentes mit Kaliumhexacyanoferrat (III) nachgewiesen werden (*vgl. Abb. 5b in Kap.4.2.1*): sollte dieses Oxidationsmittel die Intensität des CP•-Signals wieder erhöhen, so muss CP• zuvor reduziert worden sein. Nach dessen Zugabe stieg die gemessene Konzentration von CP• wieder an. Allerdings nur bis auf fast $70 \pm 1,5\%$ des Ausgangswertes. Daher wurden photometrische Untersuchungen dieser Reaktion angeschlossen. Kaliumhexacyanoferrat (III) hat im Gegensatz zur seiner reduzierten Form (Kaliumhexacyanoferrat (II)) bei 420 nm ein Absorptionsmaximum (*vgl. Abb. 5c in Kap.4.2.1*). Da Konzentrationen über 2 mM photometrisch nicht zuverlässig erfassbar waren, wurden statt 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) nur ein Fünftel, also 1 mM verwandt. Entsprechend wurden auch die übrigen Konzentrationen verringert: die von CP• auf 18 μM und die von Ascorbat auf 0,2 mM. Nachdem Ascorbat CP• reduziert hatte, wurde Kaliumhexacyanoferrat (III) zugegeben. Wie aus den ESR-

spekrometrischen Messungen hervorging, wurde CP• dadurch regeneriert (vgl. Abb. 5b in Kap.4.2.1 und Gl. 32). Die Abnahme der Extinktion bei 420 nm deutet darauf hin, dass Kaliumhexacyanoferrat (III) partiell zu Kaliumhexacyanoferrat (II) reduziert wird und es konnte gezeigt werden, in welchem Umfang dies geschah (vgl. Abb. 5d in Kap.4.2.1). Eine Konzentration von 1mM Kaliumhexacyanoferrat (III) entspricht einer Absorption von 1. Schon 15 Sekunden nach dessen Zugabe konnte nur noch eine Konzentration von ca. 0,9 mM erfasst werden. Nach weiteren 2 Minuten waren $0,32 \pm 0,002$ mM Kaliumhexacyanoferrat (III) verbraucht. Da nur 18 μ M CP• durch Ascorbat reduziert wurden, kann deren Regeneration allein nicht die Ursache des Verbrauchs sein. Es ergibt sich in dem System eine Vielzahl von möglichen Reaktionen. Zunächst die Reduktion von CP• durch Ascorbat (AscH⁻):



Sowohl CP-H als auch das entstehende Ascorbat-Radikal ($\bullet\text{Asc}^-$) können mit $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ reagieren:



Die Reaktionsgleichung 32 entspricht dabei der in der ESR-Spektroskopie erfassten Regeneration des CP•-Signals (vgl. Abb. 5b in Kap.4.2.1). Die in Gleichung (33) dargestellte Reaktion mit Bildung von Dehydroascorbat (DHA) kann den erfassten Verbrauch von Kaliumhexacyanoferrat (III) über die Regeneration von CP• hinaus erklären. Überdies kann auch Ascorbat Kaliumhexacyanoferrat (III) reduzieren:



Zwischen all diesen aufgeführten Reaktion wird sich ein dynamisches Gleichgewicht einstellen, das die ursprünglich aufgefallene nicht vollständige Regeneration des CP•-Signals erklärt.

GSH ist wie Ascorbat ein zelluläres Antioxidanz und Reduktionsmittel. Es ist allerdings im Gegensatz zum Ascorbat selbst bei einer Konzentration von 5 mM nicht in

der Lage, die Intensität des CP•-Signals abzusenken. Erst bei einer Konzentration von 10 mM, also 100 µM GSH auf 1 µM CP•, konnte eine geringe Senkung um $2,2 \pm 0,2$ % gemessen werden (vgl. Abb. 6a in Kap.4.2.2). Da GSH im Plasma mit 1 bis 3 µM [80] und in der Niere mit ca. 3 mM vorliegt [43], würde eine Messung *in vivo* nicht durch GSH beeinflusst werden. Vergleicht man die Wirkung der maximal eingesetzten GSH Konzentration von 10 mM mit der von den verschiedenen Ascorbat-Konzentrationen bis 1 mM, wird deutlich, dass eine zehnfach geringere Konzentration von Ascorbat eine weitaus höhere reduktive Potenz gegenüber CP• hatte, als GSH.

Wie bereits mit Gleichung 30 (vgl. Kap. 5) beschrieben, können auch starke Oxidationsmittel im Überschuss CP• angreifen. Hierbei sind insbesondere oxidierende Radikale zu nennen. Deren Einfluss wurde mit Hilfe der Fenton-Reaktion (vgl. Gl. 12 in Kap.1.1.1) und den dabei gebildeten Hydroxyl-Radikalen sowie dem AAPH-Zerfall (vgl. Gl. 35 und 36 in Kap. 5.1.1) mit Bildung von Peroxyl-Radikalen untersucht.

Fenton-generierte Hydroxyl-Radikale sind ab einer Eisen-II-Ionen-Konzentration von 500 µM in der Lage, CP• zu löschen. Dies entspricht einem Verhältnis von 5,5 µM Hydroxyl-Radikalen auf 1 µM CP•. Entsprechend der Charakteristik der Fenton-Reaktion bei der kurzfristig Hydroxyl-Radikale gebildet werden, wurde, wie in nicht dargestellten Experimenten ermittelt, nach einem sprunghaften Abfall der CP•-Konzentration ein stabiles Niveau erreicht. Daher wurde das CP•-Signal nur punktuell nach 10 Minuten erfasst. Bei Eisen-II-Ionen-Konzentrationen unter 500 µM und Wasserstoffperoxid im Überschuss blieb CP• stabil (vgl. Abb. 7a in Kap.4.3). In menschlichen Zellen liegen fentonfähige Eisen-Ionen mit einer Konzentration von 1 µM vor [42]. Zusätzlich werden Eisenionen durch das Superoxidanionradikal, das bei der Reperfusion ischämischer Gewebe entsteht, aus Ferritin und anderen eisenhaltigen Proteinen freigesetzt. Ein ähnlicher Mechanismus liegt bei der Freisetzung aus Hämproteinen durch Peroxide vor. Im oxidativen Stress ist damit von einer etwa zehnfach höheren Konzentration, die für die Fenton-Reaktion zur Verfügung steht, auszugehen [44]. Aber selbst diese Eisen-Ionen-Konzentration erzeugt mit Wasserstoffperoxid nicht genügend Hydroxylradikale, um das CP•-Signal zu löschen. Dazu ist eine hundertfach höhere Konzentration nötig (vgl. Abb. 7a in Kap.4.3).

Zusätzlich wurde der Einfluss von Eisen-II-Ionen in Abwesenheit von Wasserstoffperoxid untersucht: 100 µM waren dabei in der Lage CP• geringfügig zu löschen,

500 μM jedoch nicht in signifikantem Ausmaß (vgl. Abb. 6b in Kap.4.2.3). Damit kann das hundertfache der physiologisch vorkommenden Konzentration von Eisen-II-Ionen kaum $\text{CP}\bullet$ löschen [42]. Der Abfall des $\text{CP}\bullet$ -Signals erfolgte sprunghaft in den ersten 4 Minuten, danach stieg es im Verlauf von 60 Minuten wieder auf den Ausgangswert an. Diese anfängliche Löschung könnte auf eine geringe Verunreinigung mit Wasserstoffperoxid und damit die Fenton-Reaktion zurückzuführen sein. Die Regeneration von $\text{CP}\bullet$ könnte durch die gebildeten Eisen-III-Ionen und damit einer Oxidation von CP-H erklärt werden.

Anschließend wurde der thermische Zerfall von AAPH zur Untersuchung der Interaktion von $\text{CP}\bullet$ mit einer anderen Spezies von Radikalen genutzt. Zunächst entstehen aus AAPH (R-N=N-R) Alkylradikale ($\text{R}\bullet$) (Gl. 35), eine Form von Kohlenstoffzentrierten Radikalen, die unmittelbar mit Sauerstoff zu Peroxyl-Radikalen ($\text{ROO}\bullet$) weiterreagieren (Gl. 36):



Bei 37°C beträgt die Halbwertszeit von AAPH 175 Stunden. In den ersten Stunden wird also eine nahezu konstante Menge an Radikalen produziert: $1,1 \cdot 10^{-6}$ M pro M AAPH und Sekunde [70]. AAPH wurde in einer Konzentration von 50 mM eingesetzt. Bei 25°C ist nach der Reaktions-Geschwindigkeits-Temperatur-Regel bei 10° geringerer Temperatur von einer ca. halbierten Geschwindigkeit auszugehen [55]. Damit ergibt sich bei einer Temperaturerniedrigung um 12° eine Verringerung auf 43% und damit eine Bildungsrate von ca. $0,48 \cdot 10^{-6}$ M / $M_{(\text{AAPH})} \cdot \text{s}$. Dies entspricht bei 50 mM AAPH $1,44 \mu\text{M}$ Peroxyl-Radikalen pro Minute.

Diese Bildungsrate ist wie beschrieben durch die Anwesenheit von Sauerstoff im Ansatz limitiert. Bauer et al. konnte zeigen, dass die im Wasser physikalisch gelöste Sauerstoffkonzentration in der Messkapillare des ESR-Spektroskops bei einer AAPH Konzentration von 50 mM ausreichend für einen konstanten thermischen Zerfall innerhalb der ersten Stunden ist [10].

Diese Peroxyl-Radikale können ähnlich wie die Hydroxylradikale $\text{CP}\bullet$ angreifen (vgl. Gl. 30 in Kap. 5). Nach 60 Minuten wurden zwei Drittel der Ausgangskonzentration von $\text{CP}\bullet$ gelöscht (vgl. Abb. 7b in Kap. 4.3). Pro Minute werden dabei im Mittel $1,4 \mu\text{M}$ Radikale gebildet und $1,3 \pm 0,6 \mu\text{M}$ $\text{CP}\bullet$ umgesetzt. Die Umsatzquote ist damit weitaus größer als die bei den Fenton-generierten Hydroxyl-Radikalen. Dies

lässt sich mit einer erhöhten Trefferwahrscheinlichkeit bei einer kontinuierlichen Produktion begründen: werden wie in der Fenton-Reaktion ca. 500 μM Radikale in weniger als einer Sekunde gebildet, können diese auch miteinander, mit verbliebenen Eisen-Ionen oder mit Wasserstoffperoxid reagieren. Werden jedoch ca. 120 μM Alkylperoxyl-Radikale über eine Zeitperiode von 60 Minuten kontinuierlich produziert, kann, bedingt durch die Brown'sche Molekularbewegung, immer neues $\text{CP}\bullet$ reagieren. Außerdem sind die entstehenden Peroxyl-Radikale wesentlich stabiler als Hydroxyl-Radikale, was die Wahrscheinlichkeit, dass Erstere mit CP-H reagieren, weiter erhöht.

5.1.2 CP-H als Marker *in vitro*

Nachdem die Stabilität des mit der ESR-Spektroskopie erfassbaren $\text{CP}\bullet$ untersucht wurde, konnte im zweiten Schritt die Umwandlung von CP-H in $\text{CP}\bullet$ betrachtet werden (*vgl. Gl. 30 in Kap. 5*). Diese Reaktion soll zum Nachweis der Radikale genutzt werden. CP-H unterliegt im Zeitraum von 60 Minuten keiner wesentlichen Autoxidation zu $\text{CP}\bullet$ in Wasser (*vgl. Abb. 3a in Kap. 4.1.1*). Viele andere Nitroxide sind weniger stabil [43]. Die stets erfasste Basiskonzentration von $0,44 \pm 0,04 \mu\text{M}$ $\text{CP}\bullet$ in einer CP-H Lösung muss jedoch bei allen anderen Messungen abgezogen werden. Diese geringe Konzentration $\text{CP}\bullet$ könnte nach dem Lösen durch die Anwesenheit geringer Mengen Eisen-II-Ionen im Präparat und das Einbringen von Wasserstoffperoxid *via* Fenton-Reaktion entstehen. Es könnten aber auch herstellungsbedingt bereits im Präparat geringe Mengen CP-H enthalten sein.

Eisen-III-Ionen sind neben Radikalen potentielle Oxidationsmittel für CP-H. In der Zelle werden freie Eisen-II-Ionen in die dreiwertige Form überführt, um an verschiedene Proteine gebunden zu werden. Daten über die tatsächliche Konzentration von freien Fe(III)-Ionen sind uns nicht bekannt. Im Plasma sollten sie allerdings kaum Werte von ca. 1 μM überschreiten. Bei dieser Konzentration war eine vernachlässigbar geringe Oxidation von CP-H in $\text{CP}\bullet$ zu messen. Erst ab einer Konzentration von 10 μM waren Eisen-III-Ionen in der Lage, CP-H in relevantem Umfang in $\text{CP}\bullet$ umzuwandeln (*vgl. Abb. 3b in Kap. 4.1.1*).

Zur Überprüfung der Eignung von CP-H als Marker *in vitro* wurden zwei Radikalgenerierende Systeme genutzt: die Fenton-Reaktion (*vgl. Gl. 12 in Kap. 1.1.1*) und der thermische AAPH-Zerfall (*vgl. Gl. 35 und 36 in Kap. 5.1.1*). Dabei ist von zentraler Bedeutung, ob die Konzentration der gebildeten Radikale direkt proportional zum gemessenen Umsatz von CP-H zu $\text{CP}\bullet$ ist.

Für die Fenton-generierten Hydroxyl-Radikale konnte eine Proportionalität zwischen deren Bildung und dem Anstieg des CP•-Signals gezeigt werden: eine Erhöhung der Konzentration der Ausgangsstoffe Eisen-II-Ionen und Wasserstoffperoxid bewirkte eine gleich starke Erhöhung der CP•-Konzentration (vgl. Abb. 4a in Kap. 4.1.2). Bei je 1 μM der Edukte wurden $0,65 \pm 0,05 \mu\text{M}$ CP• und bei den zehnfachen Ausgangskonzentrationen $8,8 \pm 0,58 \mu\text{M}$ CP• gebildet. Das CP•-Signal ist bei diesen Konzentrationen stabil. Erst ab fünfzigfach höheren Konzentrationen (je 50 μM Fe(II)/H₂O₂) konnte eine signifikante Löschung von CP• beobachtet werden (vgl. Abb. 8a in Kap. 4.3).

Auch beim AAPH-Zerfall wurde direkt proportional zur Bildung der Peroxyl-Radikale ein Anstieg der CP•-Konzentration gemessen: nach 20 Minuten wurde ein gleichbleibender Anteil von $68 \pm 0,6 \%$ der produzierten Radikale als CP•-Signal umgesetzt (vgl. Abb. 4b in Kap. 4.1.2). Dabei ist der Vergleich mit dem Experiment von CP• mit AAPH (vgl. Abb. 7b in Kap. 4.3) von Bedeutung: hier wurden zwei Drittel des CP• innerhalb des Messzeitraums gelöscht. Es ist damit zu vermuten, dass zunächst ein noch größerer Teil der Radikale mit CP-H zu CP• reagierte und anschließend durch die überschüssigen Alkylperoxyradikale CP• wieder gelöscht wird.

Im Vergleich dieser beiden Experimente zeigt sich, dass das Verhältnis von theoretisch produzierten Radikalen zur gemessenen Konzentration von CP• abweicht. Bei den Fenton-generierten Hydroxyl-Radikalen wurden je nach Konzentration $65 \pm 5 \%$ bzw. $88 \pm 5,8 \%$ als CP•-Signal erfasst, bei den AAPH-generierten Peroxyl-Radikalen waren es $68 \pm 0,6 \%$. Damit sind die Fängerquoten bei diesen beiden Versuchen sehr ähnlich. Das spricht für eine gute Radikaldetektion des Messsystems unabhängig von der Art der eingesetzten Radikale.

5.2 Perfusionsmedium

Die Überprüfung der Eignung von CP-H als Marker für oxidativen Stress sollte ursprünglich mit Hilfe der Perfusion ganzer Rattennieren erfolgen. Solche Experimente wurden bereits erfolgreich in diesem Labor mit einem anderen Radikaldetektorsystem durchgeführt [10]. Aufbauend auf diesen Erfahrungen wurde zunächst versucht, das verwendete Perfusionsmedium (vgl. Kap. 3.4.3) auch in einigen Experimenten dieser Arbeit einzusetzen. Zunächst wurden die Interaktionen des Mediums mit CP-H unter *in vitro* Bedingungen analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Medium weder auf CP-H noch auf CP• einen Einfluss hatte (vgl. Abb. 8 in Kap. 4.4.1). Anschließend wur-

de geprüft, inwieweit dieses Medium die Messung von Radikalen beeinflusst. Dafür wurden Fenton-generierte Hydroxyl-Radikale eingesetzt. Es fiel auf, dass im Vergleich zu Wasser im Perfusionsmedium mehr als doppelt so viel CP-H in CP• umgewandelt wurde (vgl. Balken 2 in Abb. 9 in Kap. 4.4.2). Zur genaueren Untersuchung dieses Phänomens wurden die Hauptbestandteile Custodiol und Gelafundin jeweils mit und ohne Zugabe der Metallionen-Chelatoren DFA und DETC einzeln untersucht. Dabei ergab sich, dass bei alleiniger Anwesenheit von Gelafundin die stärkste Abweichung von den Messungen in Wasser mit einer CP•-Bildung von $6,2 \pm 0,24 \mu\text{M}$ (vgl. Balken 5 in Abb. 9 in Kap. 4.4.2) auftrat. Wurden DFA und DETC zugegeben, war die gemessene CP•-Konzentration geringer als ohne die Chelatoren. Dieser Effekt war am stärksten bei Gelafundin ausgeprägt: nur noch $1,5 \pm 0,34 \mu\text{M}$ CP• wurden gemessen (vgl. Balken 6 in Abb. 9 in Kap. 4.4.2).

Zunächst erscheinen diese Ergebnisse überraschend, da Custodiol in der Transplantationsmedizin regelmäßige Anwendung zur Vermeidung von Schäden durch Radikale findet [4, 54]. Ausgerechnet damit wurde aber eine signifikant stärkere CP•-Produktion als in Wasser gemessen, was darauf hindeutet, dass im Custodiol eine Verbindung bzw. eine Kombination von Verbindungen enthalten sein sollte, die entweder die Produktion von Radikalen verstärkt, oder die eine nachfolgende Löschung des gebildeten CP• verzögert. Dieser Einfluss des Custadiols wird zudem noch durch den Zusatz von Gelafundin potenziert. Zur Interpretation dieser Ergebnisse können nur hypothetische Erläuterungsansätze geäußert werden, da weiterführende Experimente den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten.

Die Beobachtung, dass unter Zugabe von Metallionen-Chelatoren vor allem bei Gelafundin deutlich weniger CP• produziert wurde, lässt den Schluss zu, dass freie Metallionen, darunter vornehmlich Eisen-II-Ionen, an dem beobachteten Befund beteiligt sind. Gelafundin wird als Plasmaersatz eingesetzt und enthält neben anderen Inhaltsstoffen 3-4% Gelatine. Da sich Gelatine vom Kollagen herleitet und dieses als wichtigstes Bindegewebsprotein u.a. auch mit einer Reihe von Metallionen vergesellschaftet ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass somit im Gelafundin solche Metallionen als Artefakt in unser Messsystem eingebracht wurden. Das würde wiederum den beobachteten Effekt der Metallchelatoren erklären. Bei Custodiol ist der Effekt der Chelatoren demzufolge deutlich geringer.

Die beobachtete Steigerung der CP•-Ausbeute in Gegenwart von Custodiol bzw. Gelafundin im Vergleich mit Wasser wirft einige Fragen auf. Die begrenzte Verfügbarkeit von Eisen-II-Ionen und Wasserstoffperoxid, initial je $1 \mu\text{M}$, limitiert die Bildung von •OH ebenfalls auf maximal $1 \mu\text{M}$. Daraus ergibt sich theoretisch nur die Möglichkeit des Umsatzes von wiederum $1 \mu\text{M}$ CP-H zu CP•. Jede über diesen Wert hinausgehende

Radikalproduktion setzt u.a. voraus, dass die in der Fenton-Reaktion zu Eisen-III-Ionen Eisen-II-Ionen reaktiv wieder regeneriert werden [14]. Um allerdings die beobachtete Erhöhung der CP•-Konzentration damit erklären zu können, muss zudem angenommen werden, dass auch das Wasserstoffperoxid als zweiter Ausgangsstoff der Fenton-Reaktion nachgebildet wird, da es auch nur in einer Konzentration von 1 μM vorlag. Die Autoxidation eines Bestandteils dieses komplexen Mediums eröffnet dazu eine Möglichkeit [44].

Eine prinzipiell andere Möglichkeit der Deutung der Mehrproduktion von CP• im Perfusionsmedium im Vergleich zu Wasser ergibt sich, da letzteres eine Vielzahl anderer Verbindungen enthält, mit denen die gebildeten Radikale reagieren könnten. Die Interaktion des elektrophilen Hydroxylradikals mit einer anderen Verbindung als CP-H führt in der Regel immer zu einer Bildung von Folgeradikalen, die ihrerseits Kettenreaktionen initiieren könnten. Diese Sekundär- und Tertiärradikale würden ihrerseits die Möglichkeit haben, das CP-H zu CP• umzusetzen. Als Inhaltsstoffe, bei denen solch eine Reaktion möglich scheint, kommen im Custadiol u.a. Histidin, Mannitol und Tryptophan in Frage. Diese sind zunächst alle Radikalfänger. Aber nach einer Interaktion mit dem Hydroxylradikal werden sie selbst zu radikalischen Folgeverbindungen umgesetzt. Vom Histidin ist z.B. bekannt, dass es *in vitro* in Gegenwart von Eisen-Ionen die Lipidperoxidation fördert und *in vivo* die Toxizität von Wasserstoffperoxid erhöht [44].

Welche der aufgeführten Verbindungen kausal mit der erhöhten Bildung von CP• in Verbindung gebracht werden könnten, kann momentan nicht bestimmt werden. Ferner ist fraglich, ob eine Übertragung dieser Befunde und Folgerungen auf die Nutzung von Custadiol bzw. Gelafundin beim Menschen möglich sind. Eine Überprüfung dieser Ergebnisse unter den Bedingungen einer Organtransplantation wäre allerdings von einigem Interesse.

Aufgrund dieser inkonsistenten Datenlage wurde von weiterführenden Experimenten mit dem Perfusionsmedium und damit auf eine Perfusion der Rattennieren verzichtet. Als Ersatz wurde Nierenzellaufschluss für die *in vivo* Messungen mit CP-H verwandt.

5.3 Eignung von CP-H als Marker *in vivo*

Neben den *in vitro* Versuchsreihen sind die *in vivo* Experimente ein wichtiger Bestandteil der Charakterisierung von CP-H und CP•. Entsprechend der Erkenntnisse zum Perfusionsmedium (vgl. Kap. 4.4 und 5.2) wurde im Weiteren lediglich Nierenzellaufschluss statt ganzer Rattennieren genutzt. Das Homogenisieren erfolgte dabei mit Wasser anstelle isotoner Kochsalzlösung. Dadurch quollen die Zel-

len und ein Aufschluss wurde erleichtert. Zusätzlich wurden aber auch die Zellorganellen, insbesondere die Mitochondrien, aufgeschlossen. Die Membranen mit den Enzymen und den Komplexen der Atmungskette blieben durch diese Behandlung erhalten, da die osmotische Aufnahme von Wasser lediglich ein Platzen der Organellen bewirkt und keine vollständige Zerstörung der Membran.

5.3.1 Stabilität des CP•-Signals *in vivo*

Für die Messungen *in vivo* wurde zunächst die Stabilität des bei Kontakt mit Radikalen entstehenden CP• geprüft (vgl. Gl. 30 in Kap. 5). Dafür wurden zwei prinzipiell verschiedene Ansätze gewählt: im ersten wurde die Ischämiezeit auf wenige Sekunden beschränkt und CP• erst 15 min nach der Reperfusion zugesetzt. Da mit der Reperfusion Sauerstoff wieder verfügbar ist, beginnt zu diesem Zeitpunkt die Produktion von Radikalen, die den Ischämie-Reperfusionsschaden bewirken (vgl. Kap. 1.3). Die Mehrzahl der Radikale sind zunächst ROS, die sehr schnell mit allen Verbindungen in ihrer unmittelbaren Umgebung reagieren. Wird CP• nun erst deutlich nach der Reperfusion zugegeben, sollte der Einfluss von derartigen Radikalen auf CP• weitgehend ausgeschlossen sein. Mit der kurzen Ischämiedauer sollte zusätzlich das Akkumulieren von Stoffwechselprodukten, die die Radikalentstehung begünstigen, gering gehalten werden. Damit sollte allein das biologische Milieu löschend auf CP• wirken. Binnen 60 Minuten wurde dabei die gemessene CP•-Konzentration fast halbiert (vgl. Abb. 10a in Kap. 4.5.2).

Zur genaueren Analyse, wodurch CP• gelöscht wurde, wurde der Zellaufschluss in weiteren Versuchen behandelt: durch Einfrieren wurde durch die Bildung von Eiskristallen ein Großteil der Organellen, insbesondere der Mitochondrien, und diverse höhermolekulare Verbindungen modifiziert. Nach dieser Behandlung ist die Reduktion von CP• deutlich geringer ausgeprägt: $68 \pm 1,1$ % des CP• wurden nicht gelöscht. Einzelne Membranabschnitte blieben jedoch sicher unversehrt und so kann nur von einer partiellen Zerstörung der membranständigen Enzyme ausgegangen werden. Das Einfrieren ist damit kein probates Mittel zur Trennung von membran-gebundenen und freien reaktiv wirkenden Verbindungen wie Ascorbat. Durch Erhitzen auf 80°C konnte eine Zerstörung fast aller reaktiven Bestandteile erreicht werden: Eiweiße denaturieren und so wurden die Enzyme inaktiviert. Auch im Cytosol vorkommende Reduktionsmittel wie Ascorbat werden durch die Inkubation bei so hohen Temperaturen beeinflusst: die Autoxidation zu DHA wird durch

einen verstärkten Zerfall von letzterem in verschiedene andere Produkte gefördert [44, 75]. Damit nimmt die Konzentration von Ascorbat bei hohen Temperaturen stetig ab. Im so behandelten Medium wurde CP• nicht mehr signifikant gelöscht (vgl. Abb. 10a in Kap. 4.5.2).

Zur genauen Trennung von cytosolischen und membrangebunden reduktiv wirksamen Bestandteilen des Zellaufschlusses wurde dieser noch einmal zentrifugiert. Dadurch wurden neben den schon vorher entfernten Zellkernen, die Mitochondrien, Lysosomen und Peroxisomen entfernt [63]. Der Überstand entspricht etwa dem Cytosol. Insgesamt wurden darin $35 \pm 2,5$ % des CP• gelöscht (vgl. Abb. 10b in Kap. 4.5.2).

Von den 46 ± 1 % CP•, die im Zellaufschluss gelöscht wurden, entfallen damit nur $11 \pm 3,5$ % auf membrangebundene Enzyme und die übrigen $35 \pm 3,5$ % auf im Cytosol enthaltene Reduktionsmittel. Ascorbat ist mit den bis zu 1,2 mM in menschlichen Nierenzellen zwar in einer relativ hohen Konzentration vorhanden [49, 68], jedoch muss die 1:8 Verdünnung des Zellaufschlusses berücksichtigt werden (vgl. Kap. 3.5.2). Es blieben nur maximal 0,1 bis 0,2 mM Ascorbat, die zumindest *in vitro* nicht in der Lage sind, CP• zu löschen (vgl. Abb. 5a in Kap. 4.2.1). Es müssen also noch weitere reduktive Verbindungen enthalten sein.

Außer bei dem erhitzten Zellaufschluss fallen in den drei übrigen Messreihen jeweils zwei Phasen auf: zunächst erfolgt eine starke Löschung von CP•, die dann schwächer wird (vgl. Abb. 10 in Kap. 4.5.2). Der Zeitpunkt dieser Anstiegsänderung ist jeweils verschieden und so sind Rückschlüsse auf deren Ursache schwierig. Da bei dem erhitzten Zellaufschluss keine Phasen erkennbar waren, liegt die Vermutung nahe, dass es ein oder mehrere durch Hitze zerstörte Komponenten waren, die die spätere langsamere Löschung von CP• verursachten. Es müssen Bestandteile des Cytosols sein, da auch hier diese zwei Phasen auftraten. Ob es jedoch das hitze-labile Ascorbat, Proteine oder andere Bestandteile waren, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht ermitteln.

Im zweiten Teil der Experimente wurde CP• nach 20 Minuten Ischämie vor dem Homogenisieren und damit vor der Reperfusion mit folgender Radikalproduktion zugegeben (vgl. -■- in Abb. 11a in Kap. 4.5). CP• wurde um $81 \pm 1,4$ % gelöscht. Im Vergleich zu den Experimenten, bei denen der Einfluss von Radikalen beinahe vollständig ausgeschlossen wurde und nur die reduktiven Bestandteile des Nierengewebes CP• angreifen konnten (vgl. -□- in Abb. 11a in Kap. 4.5), zeigt sich eine

stärkere Löschung des CP•-Signals. Aus der Abb. 11b (vgl. Kap. 4.5) geht hervor, dass beide Kurven beinahe parallel verlaufen. Der relativ konstante Unterschied von $27,75 \pm 1,8$ mmol/l wird demnach durch die während der Reoxygenierung gebildeten Radikale verursacht: Hydroxyl-Radikale oxidieren CP• und Superoxidation-Radikale reduzieren es. Da diese Radikale bei der Reoxygenierung gebildet werden und anschließend keine weiteren radikalbildenden Reaktionen vorliegen, entspricht der weitere Verlauf der Kurve der ohne Radikalbildung. Daher traten auch hier die zwei Phasen mit verschieden starker CP•-Löschung auf.

Für Nutzung der Reaktion von CP-H zu CP• als Marker für die Radikalbildung muss die hier gezeigte Wirkung der Radikale auf das gebildete CP• berücksichtigt werden: von den ursprünglich eingesetzten $90 \mu\text{M}$ CP• wurden $27,75 \pm 1,8 \mu\text{M}$ gelöscht, dies entspricht $30,8 \pm 2 \%$. Bei den folgenden Experimenten mit CP-H würde die radikalbedingte Bildung von CP• um diesen Prozentsatz unterschätzt.

5.3.2 CP-H als Marker *in vivo*

Zur Beurteilung der Stabilität von CP-H *in vivo* wurde, analog der Experimente mit CP•, die Ischämiezeit auf wenige Sekunden begrenzt und CP-H dem Zellaufschluss 15 min nach der Reoxygenierung zugegeben. Durch diese Vorgehensweise sollte zum einen die Radikalbildung deutlich reduziert sein. Zum anderen reagieren die dennoch gebildeten Radikale sehr schnell mit Verbindungen in ihrer unmittelbaren Entstehungsumgebung, so dass bei der späten Zugabe von CP-H diese bereits größtenteils verbraucht sein sollten. Die so erzeugte Kontrolle zeigt, dass nach einer Minute trotzdem $0,8 \pm 0,08 \mu\text{M}$ CP-H in CP• umgewandelt wurden. Das entspricht weniger als einem Promille der ursprünglich eingesetzten Konzentration von CP-H. Dieser Wert muss bei Messungen der Radikalproduktion abgezogen werden. Der Anstieg unmittelbar danach ist durch im Zellaufschluss vorkommende oxidativ wirksame Substanzen zu erklären. *In vitro* waren $10 \mu\text{M}$ Eisen-III-Ionen in der Lage, CP-H in CP• umzuwandeln (vgl. Abb. 3b in Kap. 4.1.1). Diese liegen im Plasma in einer erheblich niedrigeren Konzentration vor. Der anschließende Abfall des CP•-Signals ist durch die Löschung im biologischen Milieu, wie sie bereits beobachtet wurde (vgl. Kap. 4.5), zu erklären.

Zum Abschluss der Charakterisierung von CP-H als Marker für oxidativen Stress *in vivo* wurde ein Experiment zur Messung der Radikalproduktion nach 20 Minuten Warmischämie durchgeführt. Da CP-H vor dem Homogenisieren und damit vor der Reperfusion zugegeben wurde, war es zum Zeitpunkt der Radikalproduktion anwesend. Durch die für die ESR-Messungen nötige Zentrifugation ergab sich jedoch ein Zeitfenster von 15 Minuten, in dem keine Messung erfolgen konnte (vgl. Abb. 12a in

Kap. 4.6). Mit Hilfe einer approximierten Funktion ließ sich jedoch die wahrscheinliche CP-H Konzentration auch vor der ersten Messung ermitteln. Eine Minute nach dem Homogenisieren waren demnach $4,8 \mu\text{M}$ CP-H in CP• umgewandelt. Berücksichtigt man die 1:8 Verdünnung und die Kontrollkurve (vgl. Kap. 3.5.2 und 4.6), ergeben sich $32 \pm 0,64 \mu\text{M}$ CP•.

Das gemessene CP•-Konzentration fällt innerhalb von 60 Minuten kontinuierlich ab. Vergleicht man diesen Abfall mit den Experimenten zur Stabilität von CP• *in vivo* (vgl. Kap. 4.5.2 und Abb. 12b in Kap. 4.6) so fällt auf, dass diese Kurven übereinstimmen. Die Löschung des Signals entspricht also der Reduktion von CP• im biologischen Milieu.

Um die Menge der beim Ischämie-Reperfusionsschaden produzierten Radikale abzuschätzen, wurde die Umwandlung von CP-H in CP• erfasst (vgl. Abb. 12a in Kap. 4.6). Jedoch müssen die Ergebnisse aus den Versuchen mit CP• berücksichtigt werden (vgl. -■- in Abb. 11a in Kap. 4.5). Hier wurde CP• zu genau dem gleichen Zeitpunkt zugegeben, zu dem auch CP-H für die oben genannte Messung hinzugefügt wurde. Es wurden $30,8 \pm 2 \%$ des CP• durch die bei der Reoxygenierung gebildeten Radikale gelöscht. Wenn also bei der Messung des Ischämie-Reperfusionsschadens CP-H durch die Radikale zu CP• umgewandelt wird und fast sofort weitere Radikale fast ein Drittel des CP• wieder löschen, muss dieser Anteil berücksichtigt werden (vgl. Gl. 30 in Kap. 5). Demnach entsprechen die oben genannten $32 \pm 0,64 \mu\text{M}$ nur $69,2 \%$ der ursprünglich gebildeten CP•. Insgesamt wurden somit $46,2 \pm 0,92 \mu\text{M}$ CP-H in CP• umgewandelt.

Diese Konzentration entspricht jedoch nicht der der produzierten Radikale. Auch wenn CP-H im *stadium nascendi* anwesend war, so werden doch nicht alle Radikale auf CP-H treffen. Im biologischen Milieu existiert eine Vielzahl von Verbindungen, die durch Radikale oxidiert oder reduziert werden können.

Bei Experimenten in komplexen biologischen Systemen kann es aber nie erreicht werden, dass eine *spin trap* alle Radikale fängt. Vielmehr soll ein immer gleicher, wenn auch möglichst hoher Prozentsatz der Radikale gefangen werden, um Vergleiche möglich zu machen. Mit diesem Experiment wurde die grundsätzliche Eignung der Markerreaktion von CP-H zu CP• zur Messung der Radikalproduktion *in vivo* gezeigt. Damit ist es möglich, den Einfluss der Ischämiedauer, verschiedener pro- oder antioxidativ wirkender Substanzen sowie vieler anderer Faktoren zu messen.

5.4 Zusammenfassende Beurteilung

Die ESR-Spektroskopie ist ein etabliertes Verfahren zur Quantifizierung paramagnetischer Substanzen. Sie erlaubt dabei eine Unterscheidung bestimmter

paramagne-tischer Stoffgruppen, so dass eine unbemerkte Summation vermieden wird [43]. Allerdings ist die Empfindlichkeit der ESR-Spektroskopie nicht sehr hoch. In der Regel können bei Raumtemperatur lediglich Radikaladdukte oberhalb einer Konzentration von 0,5 μM von dieser Methode erfasst werden, da sonst das Verhältnis vom Signal-Peak zum Hintergrundrauschen zu gering ist.

CP-H wurde bereits in einigen Studien erfolgreich als *spin trap* eingesetzt: insbesondere Dikalov legte Arbeiten vor, in denen CP-H genutzt wurde, um die durch Glycerolnitrat bewirkte Radikal-Produktion *via* NADH-Oxidase in isolierten Endothelzellen zu erfassen. Messungen mit ganzen Organen bzw. deren Zellaufschlüssen liegen jedoch noch nicht vor [27-29].

Die in dieser Arbeit mit CP-H erfassten Werte liegen nur wenig oberhalb der Nachweisgrenze der ESR-Spektroskopie. Dadurch ergeben sich einige Messunsicherheiten, die sich bei abnehmenden Konzentrationen in höheren Schwankungen der einzelnen Messwerte ausdrücken. Eine höhere Ausgangskonzentration von CP-H hätte dieses Problem beheben können, war jedoch auf Grund der hohen Anschaffungskosten für CP-H im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Insgesamt ist die für Messungen nötige CP-H-Konzentration von 1 mM bei Fängerquoten von über 70% (vgl. Abb. 4 in Kap. 4.1.2) vergleichsweise gering. Zum Vergleich soll hier DMPO (5,5-Dimethylpyrolin-1-oxid) als ein häufig verwendeter Marker angeführt werden: zwar werden, wie im Rahmen unveröffentlichter Experimente aus diesem Labor ermittelt wurde, ca. 90% der Radikale gefangen, dafür sind jedoch Konzentrationen von 50 bis 100 mM nötig.

Bei den *in vitro* Versuchen konnten die Radikale in dem Moment ihrer Bildung erfasst werden. Besonders eindrücklich gelang dies bei den AAPH-Versuchen, wobei dies ebenso auf die Fenton-Versuche zutrifft (vgl. Kap. 4.3). Diese Fähigkeit zum Nachweis der Radikale im Moment ihrer Bildung zeichnet alle *spin traps* im Vergleich zu anderen Nachweisverfahren, bei denen erst die Entwicklung einer Farb-reaktion oder die Trennung der Produkte durch die HPLC erfolgen muss, aus.

Bei den *in vivo* Experimenten war eine Zentrifugation erforderlich, da Zellbruchstücke und Fettreste das Aufziehen des Messgutes in die Kapillare des ESR-Spektrometers erschwert hätten. Dadurch war jedoch eine Messung direkt nach der Reaktion der Radikale mit CP-H nicht möglich und ein mathematisches Modell musste herangezogen werden, um die CP•-Konzentrationen während der ersten Minuten zu ermitteln. Auf diese Weise wurde ein wesentlicher Vorteil der Methode zum Teil eingebüßt: eine Beobachtung im *stadium nascendi* war nicht möglich

(vgl. Kap. 4.5). Dieser Mangel ist dabei nicht charakteristisch für CP-H, vielmehr für die nötige Probenaufbereitung vor der ESR-Spektroskopie. Trotzdem ist eine zeitliche Verzögerung von ca. 15 Minuten im Vergleich zu Messungen von 8-OH-Guanin/8-OH-Desoxyguanosin oder Malondialdehyd minimal, da diese in der Regel erst Stunden nach den durch Radikale erzeugten Veränderungen nachweisbar sind [20, 30]. Außerdem ist durch die Erfassung der Löschung des CP•-Signals im biologischen Milieu (vgl. Abb. 11a in Kap. 4.5) in dieser Arbeit die Erstellung einer Funktion zur Berechnung der fehlenden Messwerte bei den CP-H Experimenten zur Messung des Ischämie-Reperfusionsschadens (vgl. Abb. 12 in Kap. 4.6) erst möglich gemacht worden.

Insgesamt lässt sich damit feststellen, dass CP-H *in vitro* und *in vivo* ein schnelles Nachweisverfahren darstellt. Dies ist eines der Kriterien für einen idealen Marker (vgl. Kap. 1.4.2) [43, 86, 95]. Weitere sollen im Folgenden betrachtet werden.

Die Spezifität des Markers für bestimmte Radikale wird auch zu den gewünschten Eigenschaften gezählt [43]. Allerdings ist dies nur erforderlich, wenn eine Unterscheidung der einzelnen Spezies vorgenommen werden soll. Diese Trennung ist für die Beurteilung des Ischämie-Reperfusionsschadens jedoch nicht in jedem Fall relevant, da sowohl die verschiedenen ROS, als auch alle anderen von diesen abgeleitete Radikale das Gewebe schädigen können.

Die Stabilität der Messsubstanz ist von großer Bedeutung [43, 95]. Auf der einen Seite soll ein Marker auch mit weniger aggressiven Radikalen als Hydroxylradikale reagieren, auf der anderen Seite soll er nicht mit anderen Stoffen interagieren. Bisher ist mit keiner Substanz diese Anforderung umfassend erreicht worden [44]. In Abwesenheit von Reduktionsmitteln ist CP• stabil. Die als Kontrollkurve in Abb. 5a (vgl. Kap. 4.2.1) eingefügte Kurve, zeigt, dass in 60 Minuten keine signifikante Löschung erfolgt. Zum Vergleich soll erneut DMPO angeführt werden: reagiert dieses mit Hydroxylradikalen, entsteht das DMPO-OH-Addukt, welches wie CP• mit der ESR-Spektroskopie erfassbar ist. Für das DMPO-OH-Addukt liegen Daten aus diesem Labor ohne Zugabe eines Reduktionsmittels vor: innerhalb von 60 Minuten wurden 44% gelöscht. Allerdings scheinen diese bislang nicht veröffentlichten Ergebnisse zu belegen, dass die Halbwertszeit des Adduktzerfalls ganz maßgeblich von dessen initialer Konzentration beeinflusst wird. Insgesamt erweist sich CP• als deutlich stabiler als das DMPO-OH-Addukt. Auch CP-H ist sehr stabil und unterliegt keiner Autoxidation, jedoch sind geringe Mengen CP• bereits vor jeder Messung im Präparat enthalten (vgl. Abb. 3a in Kap. 4.1.1).

Gegenüber zellulären Reduktionsmitteln wie Ascorbat ist CP• *in vitro* relativ stabil. Ein Vergleich mit DMPO verdeutlicht dies: das in der ESR-Spektroskopie erfassbare DMPO-OH-Addukt ist wesentlich stärker durch Ascorbat angreifbar. Unveröffentlichte Daten, die in unserer Einrichtung erhoben wurden, zeigen, dass bei Einsatz von

100 µM Fenton-generierten Hydroxyl-Radikalen ca. 90 µM DMPO-OH-Addukt gebildet werden. Unter Zusatz von 0,1 mM Ascorbat wird das DMPO-OH-Addukt auf 25 % des Ausgangswertes innerhalb weniger Sekunden reduziert. Damit ist das Verhältnis von *spin trap*-Hydroxyl-Radikal-Addukt zu Ascorbat in diesen Experimenten fast 1:1. Im Vergleich wurden 90 µM CP• erst durch 1 mM Ascorbat auf ca. 14 % des Ausgangswertes reduziert (vgl. Abb. 5a in Kap. 4.2.1). Dies entspricht einem 1:10 Verhältnis von Addukt zu Ascorbat für eine etwa gleich starke Löschung wie beim DMPO. Die Löschbarkeit des DMPO-OH-Addukt-Signals wurde auch durch Halliwell beschrieben [43]. Gegenüber GSH ist CP• stabil (vgl. Kap. 4.2.2).

CP-H lässt sich *in vitro* durch Eisen-III-Ionen oxidieren, allerdings reicht die im Plasma anzutreffende Konzentration um 1 mM kaum aus, um einen nennenswerten Effekt auf CP-H zu haben. Erst bei der zehnfachen Konzentration konnte eine Oxidation in relevantem Ausmaß erfasst werden (vgl. Abb. 3b in Kap. 4.1.1).

Tempon (4-Oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl), ist neben CP-H ein wichtiger Vertreter der *Nitroxid-spin-traps*. Für Tempon hat Swartz *in vivo* Reduktionkonstanten von 0,04/min und für CP• von 0,3/min im menschlichen Blut ermittelt [89]. Dies spiegelt sich auch in den Halbwertszeiten bei Gabe von 0,1-0,15 mmol/kg in Mausblut wieder: bei CP• sind es 5 Minuten, bei Tempon nur 0,5 [88]. *In vivo* wurde CP• durch den Zellaufschluss auf 54 ± 1 % seiner Ausgangskonzentration gelöscht (vgl. Abb. 10a in Kap. 4.4.2). Bei der zusätzlichen Löschung durch Radikale wurden insgesamt $79 \pm 1,5$ % des CP• *in vivo* gelöscht (vgl. Abb. 11a in Kap. 4.4.2). CP-H war weitgehend stabil: weniger als ein Promille wurden *in vivo* in CP• umgewandelt (vgl. Abb. 12a in Kap. 4.6).

Als weitere wünschenswerte Eigenschaft für *in vivo* Messungen wird eine geringe Toxizität genannt [43, 95]. Die LD₅₀ von CP-H beträgt nach Dikalov 2800 mg/kg [29] und nach Gordon sind CP-H und CP• im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-2} M nicht zytotoxisch oder mutagen [40]. Die LD₅₀ von Tempon ist im Vergleich 800 mg/kg [29]. DMPO hingegen ist bei einer Dosis von 2320 mg/kg nicht tödlich [78]. Damit ist CP-H als ein Marker mit mittlerer Toxizität zu bewerten.

Ein idealer Marker soll nach Halliwell ein einzigartiges ESR-Spektrum besitzen [43]. Das Triplet ESR-Spektrum von CP• (vgl. Abb. 2 in Kap. 1.4.4) ist charakteristisch für viele Nitroxide und damit nicht einzigartig für CP-H [43, 58] oder auch Tempon [29]. Aber auch das viergipfelige Signal von DMPO ist nicht einmalig [36, 52]. Im Rahmen dieser Arbeit ist eine solche Unterscheidung auch nicht nötig: viele Radikale zeigen ein deutlich anderes Spektrum und die wenigen, die ein gleiches Triplet haben, können nur von Radikalen stammen, die nicht von CP-H gefangen wurden. Da aber für die Abschätzung des Ischämie-Reperfusionsschadens die Summe der Radikale von Bedeutung ist, würde eine Addition beider Gruppen das Ergebnis nicht verfälschen.

Als letzte wünschenswerte Eigenschaft wird ein zur Messung passender Verteilungsraum *in vivo* genannt [43, 95]. CP-H ist eher hydrophob und penetriert nach Fink zu $8,3 \pm 0,4\%$ in das Cytosol von Zellen, $91,1 \pm 0,6\%$ verbleiben im Plasma und der Rest wird in der Membran gehalten [35]. Reagiert CP-H im Zellinneren mit dort gebildeten oxidierenden Radikalen entsteht CP•, welches die Zellmembran nicht durchdringen kann [100].

Tempon im Vergleich penetriert deutlich besser als CP-H in die Zellen [58]. Auch DMPO gelangt schneller in Zellen, nach Anzai wird innerhalb von zehn Sekunden ein Konzentrationsausgleich von DMPO und auch DMPO-OH-Addukten zwischen Intra- und Extrazellulärraum erreicht [7]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellmembranen durch das Homogenisieren zerstört (vgl. Kap. 3.5.2), CP-H konnte damit alle Verteilungsräume erreichen. Für weiterführende Experimente mit ganzen Organen muss die eingeschränkte Penetration von Membranen jedoch kritisch berücksichtigt werden.

Gegenüber der Messung mit Hilfe der Anreicherung von Folgeprodukten, die nach der Wechselwirkung mit Radikalen entstehen, wie 8-Hydroxy-Guanin oder Malondialdehyd (vgl. Kap. 1.4.1), haben *spin traps* den Vorteil, schneller und direkter die Radikale zu messen. Bei Erstgenannten werden die ROS nicht direkt erfasst.

Malondialdehyd wird z.B. mit Hilfe von chromogenen Reagenzien, meist 2-Thiobarbitursäure, nachgewiesen. Dabei können Wechselwirkungen mit Substanzen mit primären Aminogruppen auftreten, die die Messergebnisse verfälschen können [79]. Damit liegt eine deutlich geringere Spezifität vor. Außerdem ist meist eine aufwändige Bearbeitung der Proben nötig, die einen Zeitverlust bedeuten [20, 30].

Insgesamt ist CP-H als Marker für oxidativen Stress *in vitro* und *in vivo* geeignet. Wie andere *spin traps* ist es in der Lage, die Radikale sofort und mit geringem Aufwand *via* ESR-Spektroskopie zu erfassen. *In vitro* konnte ein relativ hoher Anteil der Radikale durch CP-H gefangen werden (vgl. Kap. 4.1.2). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Radikale das messbare CP• auch selbst angreifen. Am Beispiel der Fenton-Reaktion ist dies zu vernachlässigen, bei dem thermischen Zerfall von AAPH werden jedoch zwei Drittel des gebildeten CP• wieder gelöscht (vgl. Kap.4.3 und 5.1.1).

Das in anderen Versuchsanordnungen häufig verwandte Perfusionsmedium wurde gesondert betrachtet. Dessen besondere Effekte als z.T. prooxidatives Medium sind bei Messungen mit CP-H *in vivo* zu berücksichtigen (vgl. Kap. 4.4). Damit ist dessen Verwendung für diese *spin trap* nicht zu empfehlen. Mit Wasser treten solche störenden Effekte nicht auf.

Allgemein reagiert *in vivo* nur ein geringer Anteil des eingesetzten CP-H mit Radikalen. Dies ist durch die Vielzahl an Verbindungen, mit denen die Radikale anstelle der

spin trap reagieren können, zu erklären. Nur die CP-H-Moleküle, die sich in unmittelbarer Nähe des Ortes befinden an dem die Radikale gebildet werden, können mit diesen interagieren. Das dabei entstehende CP• wird durch im biologischen Milieu enthaltene Reduktionsmittel umgewandelt und auch die Radikale selbst greifen es theoretisch an. Letzteres ist jedoch auf Grund der erwähnten Konkurrenz um Reaktionspartner der Radikale relativ unwahrscheinlich. *In vivo* werden etwa insgesamt 30 % des gebildeten CP• wieder gelöscht. Am Beispiel von einer 20 minütigen Warmischämie konnte jedoch gezeigt werden, dass der verbleibende Anteil ausreichend für Messungen der Radikalproduktion ist (vgl. Kap. 4.6 und 5.3.2).

6. Literaturverzeichnis

1. www.eurotransplant.nl/files/annual_report/AR2007_def.pdf am 21.03.2009
2. Aebi H: Catalase. *Bergmeyer* 3 (1996) 273-286
3. Aebi H: Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105 (1984) 121-126
4. Agarwal A, Goggins W, Pescovitz M, Milgrom M, Murdock P, Fridell J: Comparison of Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate and University of Wisconsin solutions as primary preservation in renal allografts undergoing pulsatile perfusion. *Transplant Proc* 37 (2005) 2016-2019
5. 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* 27 (1999) 280-284
6. Akcetin Z, Erdemli G, Brömme H: Experimental study showing a diminished cytosolic antioxidative capacity in kidneys of aged rats. *Urol Int* 64 (2000) 70-73
7. Anzai K, Aikawa T, Furukawa Y, Matsushima Y, Urano S, Ozawa T: ESR measurement of rapid penetration of DMPO and DEPMPO spin traps through lipid bilayer membranes. *Arch Biochem Biophys* 415 (2003) 251-256
8. Babior B: NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 16 (2003) 42-47
9. Baud L, Ardaillou R: Involvement of reactive oxygen species in kidney damage. *Br Med Bull* 49 (1993) 621-629
10. Bauer S, Loertzer H, Fornara P, Mörke W, Brömme H: Bewertung des AAPH-Zerfalls in Peroxylradikale bzw. der Generierung von Ascorbat-Radikalen als Parameter zur Abschätzung von oxidativen Stress bzw. der Erfassung der antioxidativen Kapazität im Perfusionspuffer der Rattenniere. *Transplantationsmedizin Suppl* 2 (2005) 124
11. Benzie I, Strain J: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239 (1996) 70-76
12. Brodie A, Reed D: Reversible oxidation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase thiols in human lung carcinoma cells by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 148 (1987) 120-125

13. Brömme H, Loertzer H, Akcetin Z: Der postischämische Reperfusionschaden biochemische und methodische Grundlagen. *Urologe A* 41 (2002) 159-163
14. Brömme H, Weinandy R, Peschke D, Peschke E: Simultaneous quantitative determination of alloxan, GSH and GSSG by HPLC. Estimation of the frequency of redox cycling between alloxan and dialuric acid. *Horm Metab Res* 33 (2001) 106-109
15. Büttner GR, Jurkiewicz B: Ascorbate free radical as a marker of oxidative stress: an EPR study. *Free Radic Biol Med* 14 (1993) 49-55
16. Büttner GR, Jurkiewicz BA: Ascorbate radical: a valuable marker of oxidative stress. In: al. Fe (Hrsg.): *Analysis of free radicals in biological systems*. Birkhäuser Verlag, Basel 1995, S. 145-164
17. Burkitt M, Gilbert B: Model studies of iron-catalysed Haber-Weiss cycle and the ascorbate-driven Fenton reaction. *Free Radic Res Commun* 10 (1990) 265-280
18. Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58 (1989) 79-110
19. Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59 (1979) 527-605
20. Chen L, Gao Y, Li X, Shen D, Sun F: Melatonin protects against MPTP/MPP⁺-induced mitochondrial DNA oxidative damage *in vivo* and *in vitro*. *J Pineal Res* 39 (2005) 34-42
21. Coudray C, Talla M, Martin S, Fatôme M, Favier A: High-performance liquid chromatography-electrochemical determination of salicylate hydroxylation products as an *in vivo* marker of oxidative stress. *Anal Biochem* 227 (1995) 101-111
22. Czapski G: Reaction of •OH. *Methods Enzymol* 105 (1984) 209-215
23. Das D, Maulik N: Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. *Methods Enzymol* 233 (1994) 601-610
24. Davies S, Reichardt-Pascal S, Vaughan D, Russell G: Differential effect of ischaemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 3 (1995) 348-354
25. Davison A, Kettle A, Fatur D: Mechanism of the inhibition of catalase by ascorbate. Roles of active oxygen species, copper and semidehydroascorbate. *J Biol Chem* 261 (1986) 1193-1200

26. Dikalov S, Alov P, Rangelova D: Role of iron ion chelation by quinones in their reduction, OH-radical generation, and lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 195 (1993) 113-119
27. Dikalov S, Fink B, Skatchkov D, Bassenge E: Formation of reactive oxygen species by Pentaerithrotyltetranitrate and Glyceryl Trinitrate *in vitro* and development of nitrate tolerance. In: (Hrsg.): *Pharmacol Exp Ther* 286 1998, S. 938-944
28. 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-4-oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants. *Biochem Biophys Res Comm* 231 (1997) 701-704
29. 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* 1 (1997) 423-431
30. Draper H, Polensek L, Hadley M, McGirr L: Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues. *Lipids* 19 (1984) 836-843
31. Duncan C: The role of oxygen radicals in ischemia-reperfusion injury in the heart. *Med Sci Res* 22 (1994) 609-611
32. Ellmark S, Dusting G, Fui M, Guzzo-Pernell N, Drummond G: The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* 65 (2005) 495-504
33. Elstner E: *Der Sauerstoff. Biochemie, Biologie, Medizin.* BI-Wissenschaftsverlag Mannheim; Wien; Zürich, 1990
34. Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi E: Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys* 388 (2001) 261-266
35. 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 Radic Biol Med* 28 (2000) 121-128
36. Finkelstein E, Rosen G, Rauckman E: Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: practical aspects. *Arch Biochem Biophys* 200 (1980) 1-16

37. Fridovich I: Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 272 (1997) 18515-18517
38. Fridovich I: Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 41 (1974) 35-97
39. Gill P, Wilcox C: NADPH oxidases in the kidney. *Antioxid Redox Signal* 8 (2006) 1597-1607
40. Gordon D, Brasch R, Ogan M, Deen D: Pyrroxamide, a nonionic nitroxyl spin label contrast agent for magnetic resonance imaging. *Mutagenesis and cell survival. Invest Radiol* 23 (1988) 616-620
41. Grootveld M, Halliwell B: Aromatic hydroxylation as a potential measure of hydroxyl-radical formation *in vivo*. Identification of hydroxylated derivatives of salicylate in human body fluids. *Biochem J* 237 (1986) 499-504
42. Halliwell B, Gutteridge J: Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 307 (1992) 108-112
43. Halliwell B, Gutteridge J: *Free radicals in biology and medicine*. 3 Oxford University Press, Oxford, 1999
44. Halliwell B, Gutteridge J: *Free radicals in biology and medicine*. 4 Oxford University Press, oxford, 2007
45. Halliwell B, Gutteridge J: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219 (1984) 1-14
46. Halliwell B, Gutteridge J: Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186 (1990) 1-85
47. Halliwell B, Gutteridge J, Aruoma O: The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal Biochem* 165 (1987) 215-219
48. Harrison R, Bray R: Xanthine oxidase: introductory remarks. *Biochem Soc Trans* 25 (1997) 749-750
49. Hornig D: Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann N Y Acad Sci* 258 (1975) 103-118
50. Huang N, Wan F, Tseng C, Tung C: Amphetamine induces hydroxyl radical formation in the striatum of rats. *Life Sci* 61 (1997) 2219-2229
51. Janaszewska A, Bartosz G: Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 62 (2002) 231-236

52. Janzen E: Spin trapping. In: Ohya-Nishiguchi H, Packer L (Hrsg.): *Bioradicals Detected by ESR Spectroscopy* Birkhäuser, Berlin 1995, S. 113-142
53. Kanofsky J: Peroxidase-catalyzes Generation of Singlet Oxygen and of free Radicals. In: Everse J, Everse K, Grisham M (Hrsg.): *Peroxidases in Chemistry and Biology 2* CRC Press Inc., New York 1991, S. 219-238
54. Klaus F, Castro D, Bittar C, Bittar A, Keitel E, Seelig D, Goldani J, Meine M, Garcia V: Kidney Transplantation with Belzer or Custodiol Solution: A randomized prospective study. *Transplant Proc* 39 (2003) 353-354
55. Klinke R, Silbernagl S: *Lehrbuch der Physiologie*. 4 Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003
56. Kocherginsky N, Swartz H: Chemical Reactivity of Nitroxides. In: Kocherginsky N, Swartz H (Hrsg.): *Nitroxide Spin Labels Reactions in Biology and Chemistry* CRC Press, Inc., Boca Raton 1995, S. 25-148
57. Kocherginsky N, Swartz H: Introduction. In: Kocherginsky N, Swartz H (Hrsg.): *Nitroxide Spin Labels Reactions in Biology and Chemistry* CRC Press, Inc., Boca Raton 1995, S. 1-14
58. Kocherginsky N, Swartz H: Terminology, Classification, and Distribution of the Nitroxides in Cells. In: Kocherginsky N, Swartz H (Hrsg.): *Nitroxide Spin Labels Reactions in Biology and Chemistry* CRC Press, Inc., Boca Raton 1995, S. 15-25
59. Kuppusamy P, Chzhan M, Zweier J: Principles of Imaging. Theory and Instrumentation. In: Berliner L (Hrsg.): *In Vivo EPR (ESR). Theory and Applications*. In: *Biological Magnetic Resonance* 18 Kluwer Academic/Plenum Publishers [New York], New York 2003, S. 99-152
60. Lassègue B, Sorescu D, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant S, Lambeth J, Griendling K: Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88 (2001) 888-894
61. Lemasters J, Nieminen A: Mitochondrial oxygen radical formation during reductive and oxidative stress to intact hepatocytes. *Biosci Rep* 17 (1997) 281-291
62. Lissi E, Salim-Hanna M, Pascual C, del Castillo M: Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-

- enhanced chemiluminescence measurements. *Free Radic Biol Med* 18 (1995) 153-158
63. Lottspeich F, Zorbas H: *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1998
 64. Machlin L, Bendich A: Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J* 1 (1987) 441-445
 65. Manda K, Ueno M, Anzai K: AFMK, a melatonin metabolite, attenuates X-ray-induced oxidative damage to DNA, proteins and lipids in mice. *J Pineal Res* 42 (2007) 386-393
 66. Martelin E, Lapatto R, Raivo K: Regulation of xanthine oxidoreductase by intracellular iron. *Am J Physiol Cell Physiol* 283 (2002) 1722-1728
 67. Maytin M, Leopold J, Loscalzo J: Oxidant stress in the vasculature. *Curr Artheroscler Rep* 1 (1999) 156-164
 68. Naidu K: Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition J* 2 (2003) 1-10
 69. Napoli C, Lerman L: Involvement of oxidation-sensitive mechanisms in the cardiovascular effects of hypercholesterolemia. *Mayo Clin Proc* 76 (2001) 619-631
 70. Niki E: Free radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods Enzymol* 186 (1990) 100-108
 71. Parks D, Granger D: Xanthine Oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 548 (1986) 87-99
 72. Pütter J, Becker R: Peroxidases. *Bergmeyer Bd I* 3 (1996) 286-300
 73. Puppo A, Halliwell B: Formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Is haemoglobin a biological Fenton reagent? *Biochem J* 249 (1988) 185-190
 74. Richter C, Park J, Ames B: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) 6465-6467
 75. Rose R, Bode A: Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *FASEB J* 7 (1993) 1135-1142
 76. Sadrzadeh S, Graf E, Panter S: Hemoglobin. A biologic Fenton reagent. *J Biol Chem* 259 (1984) 14354-14356
 77. Sarnesto A, Linder N, Raivio K: Organ distribution and molecular forms of human xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase protein. *Lab Invest* 74 (1996) 48-56

78. Schaefer C, Janzen E, West M, Poyer J, Kosanke S: Blood chemistry changes in the rat induced by high doses of nitronyl free radical spin traps. *Free Radic Biol Med* 21 (1996) 427-436
79. Schönfelder U: Der Einfluß von Cholesterol auf die UV-induzierte Peroxidation der Lipide des menschlichen Stratum corneum. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (1999) S. 37
80. Scott G: Antioxidants in Science, Technology, Medicine and Nutrition. Albion Publishing Limited, Chichester, 1997
81. Sela S, Shasha S, Mashiach E, Haj M, Kristal B, Shkolnik T: Effect of oxygen tension on activity of antioxidant enzymes and on renal function of the postischemic reperfused rat kidney. *Nephron* 63 (1993) 199-206
82. Sentjurc M, HM S, Kocherginsky N: Metabolism, Toxicity, and Distribution of Spin Traps. In: Kocherginsky N, Swartz H (Hrsg.): Nitroxide Spin Labels Reactions in Biology and Chemistry CRC Press, Inc., Boca Raton 1995, S. 199-209
83. Shigenaga M, Gimeno C, Ames B: Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989) 9697-9701
84. Sies H: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82 (1997) 291-295
85. Spallholz J, Boylan M: Glutathione Peroxidase: the two Selenium Enzymes. In: Everse J, Everse K, Grisham M (Hrsg.): Peroxidases in Chemistry and Biology 1 CRC Press Inc., New York 1991, S. 259-292
86. Subramanian S, Mitchel J, Krishna M: Principles of *in vivo* EPR. In: Berliner L (Hrsg.): *In Vivo* EPR (ESR). Theory and Applications. In: Biological Magnetic Resonance 18 Kluwer Academic/Plenum Publishers [New York], New York 2003, S. 23-40
87. Sun K, Kiss E, Bedke J, Stojanovic T, Li Y, Gwinner W, Grone H: Role of xanthine oxidoreductase in experimental acute renal-allograft rejection. *Transplantation* 77 (2004) 1683-1682
88. Swartz H, Sentjurc M, Kocherginsky N: Metabolism and Distribution of Nitroxides *In Vivo*. In: Kocherginsky N, Swartz H (Hrsg.): Nitroxide Spin Labels Reactions in Biology and Chemistry CRC Press, Inc., Boca Raton 1995, S. 153-174

89. Swartz H, Sentjurc M, Kocherginsky N: Metabolism of Nitroxides and Their Products in Cells. In: Kocherginsky N, Swartz H (Hrsg.): Nitroxide Spin Labels Reactions in Biology and Chemistry CRC Press, Inc., Boca Raton 1995, S. 113-148
90. Swartz H, Sentjurc M, Morse P, 2nd: Cellular metabolism of water-soluble nitroxides: effect on rate of reduction of cell/nitroxide ratio, oxygen concentrations and permeability of nitroxides. *Biochim Biophys Acta* 888 (1986) 82-90
91. Symons M, Gutteridge J: Free Radicals and Iron: Chemistry, Biology, and Medicine. Oxford University Press Inc., New York, 1998
92. Tan D, Manchester L, Burkhardt S, Sainz R, Mayo J, Kohen R, Shohami E, Huo Y, Hardeland R, Reiter R: N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J* 15 (2001) 2294-2296
93. Thom S, Kang M, Fisher D, Ischiropoulos H: Release of glutathione from erythrocytes and other markers of oxidative stress in carbon monoxide poisoning. *J Appl Physiol* 82 (1997) 1424-1432
94. Thomas E, Learn D: Myeloperoxidase-Catalyzed Oxidation of Chloride and Other Halides: The Role of Chloramines. In: Everse J, Everse K, Grisham M (Hrsg.): *Peroxidases in Chemistry and Biology 1* CRC Press Inc., New York 1991, S. 83-104
95. Timmins G, Liu K: Spin trapping *in vivo*: facts and artefacts. In: Berliner L (Hrsg.): *In Vivo EPR (ESR). Theory and Applications*. In: *Biological Magnetic Resonance* 18 Kluwer Academic/Plenum Publishers [New York], New York 2003, S. 285-308
96. Turrens J, Boveris A: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191 (1980) 421-427
97. Valentine J, Foote C, Greenberg A, Liebman J: *Active Oxygen in Biochemistry*. Chapman & Hall, London, 1995
98. Van den Branden C, Verelst R, Vamecq J, Vanden Houte K, Verbeelen D: Effect of vitamin E on antioxidant enzymes, lipid peroxidation products and glomerulosclerosis in the rat remnant kidney. *Nephron* 76 (1997) 77-81

99. Weil J, Bolton J, Wertz J: Electron paramagnetic Resonance. Elementary Theory and Practical Applications. John Wiley and Sons, Inc., New York, 1994
100. Chen K, Swartz M: Oxidation of hydroxylaminesto nitroxide spin labels in living cells. Biochem Biophys 970 (1988) 270-277

7. Thesen

1. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen durch eine Vielzahl von Reaktionen im menschlichen Organismus. Zu ihnen gehört auch das mit nahezu jeder Substanz in seiner Umgebung reagierende Hydroxyl-Radikal.
2. Der Körper verfügt über verschiedene Abwehrmechanismen gegen Radikale zu denen die Antioxidantien Ascorbat und GSH gehören.
3. Der Ischämie-Reperfusionsschaden entsteht durch ein Ungleichgewicht von Radikalbildung und -abwehr zu Gunsten der Ersteren. Es entsteht oxidativer Stress.
4. Das Ausmaß dieses Stresses kann mit einer Reihe unterschiedlicher Messsysteme erfasst werden. Ein verbreitetes Verfahren stellen *spin traps* dar.
5. CP-H ist eine *spin trap*. Diese Verbindung ist diamagnetisch und wird durch Oxidation mit Hilfe von Hydroxyl-Radikalen oder anderen Oxidationsmitteln zum paramagnetischen CP•. Außerdem kann es weiter oxidiert werden oder mit Hilfe von Reduktionsmitteln wie Ascorbat zurück zu CP-H reagieren. Die Konzentration von CP• kann mit Hilfe der ESR-Spektroskopie erfasst werden.
6. Die Stabilität der beiden Substanzen CP-H und CP• wurde untersucht. *In vitro* ist CP-H sehr stabil. CP• wird durch Ascorbat ab einer Konzentration von 0,6 mM reduziert. GSH ist dazu bis zu Konzentrationen von 10 mM nicht in der Lage.
7. Mit Hilfe der Marker-Reaktion von CP-H zu CP• können bis zu 85 % der mit Fenton-Reaktion gebildeten Hydroxyl-Radikale und 70 % der durch den AAPH-Zerfall entstandenen Peroxyl-Radikale *in vitro* erfasst werden. Jedoch kann das gebildete CP• durch dieselben Radikale z.T. wieder gelöscht werden.
8. In diesem Labor wurde ein klinisch verwendetes Perfusionsmedium, u.a. bestehend aus Custodiol und Gelafundin, genutzt. CP-H und auch CP• sind darin stabil. Jedoch scheint dieses Medium die Hydroxyl-Radikal-bildende Fenton-Reaktion zu fördern.

9. *In vivo* ist CP-H im Nierenzellaufschluss stabil. CP• wird jedoch deutlich durch das biologische Milieu reduziert.
10. Mit CP-H kann das Ausmaß der Radikalproduktion *in vivo* abgeschätzt werden.
11. Insgesamt ist CP-H als Marker für oxidativen Stress sowohl *in vitro* als auch *in vivo* geeignet und wie andere *spin traps* in der Lage, Radikale im Moment ihrer Bildung zu erfassen.
12. Im Vergleich zu anderen Markern ist das durch Reaktion mit Radikalen gebildete CP• stabiler gegenüber Reduktionsmitteln. Die Toxizität von CP-H ist deutlich geringer als die anderer *spin traps* wie z.B. Tempon, jedoch höher als die von DMPO. Das CP-H penetriert zu ca. 10% ins Cytosol. Oxidierende Radikale entstehen im Zellinneren und können CP-H zu CP• oxidieren. Dieses kann keine Zellmembranen durchdringen und verbleibt nach seiner Bildung in der Zelle.

8. Anhang

Lebenslauf

Name	Sandra Adam, geb. Laubner
Adresse	Pfännerhöhe 25, 06110 Halle/S.
Geburtsdaten	02.10.1983 in Halle/S.
1990 – 1994	Grundschule Rosa Luxemburg, Halle/S.
1994 – 2003	Mathematisch-naturwissenschaftliches Gymnasium Georg Cantor, Halle/S., allgemeine Hochschulreife, Notendurchschnitt: 1,0
Ab 2003	Studium der Humanmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
20.02.- 19.03.2006	Famulatur in der Abdominal-, Gefäß- und Allgemein Chirurgie, Universitätsklinik Hannover
14.08.- 28.08.2006	Famulatur in privater Praxis für HNO, Halle/S.
01.09.-15.09.2006	Famulatur in privater Praxis für Kinderheilkunde, Halle/S.
12.02.-13.03.2007	Famulatur in der Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitäts- spital Basel
27.08.-25.09.2007	Famulatur in der HNO, Klinikum St. Georg Leipzig
04. 2005 – 06. 2008	studentische Hilfskraft in den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannstrost, Halle/S., Stationen: Früh-Rehabilitation 2 & ITS
08.2008 - 12.2008	PJ:Nephrologie, St. Elisabeth und St. Barbara Kranken- haus Halle/S.
12.2008 – 05.2008	Elternzeit
06.2009 - 09.2009	PJ: Kinderchirurgie, Universitätsklinik Halle/S.
09.2009 - 01.2010	PJ: Allgemein Chirurgie, Universitätsklinik Halle/S.

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle im Literaturverzeichnis gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Außerdem erkläre ich, dass ich keine früheren Promotionsversuche hatte.

Ort, Datum

S.Adam

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. H.J. Brömme für die Überlassung des Themas und die gute Zusammenarbeit bedanken. Neben vielen fachlichen Hinweisen bin ich v.a. für die stets zum Denken anregenden Diskussionen und das immer offene Ohr für Fragen aller Art dankbar. Die Forschungsjahre in diesem Labor haben mir dank ihm immer Freude bereitet.

Außerdem möchte ich dem Direktor des Institutes für Pathophysiologie Prof. em. Dr. J. Holtz und dem kommissarischen Leiter des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung Prof. Dr. A. Simm für die freundliche Bereitstellung der Räumlichkeiten danken.

Thekla Wangemann, MTA des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung, danke ich für die hilfreichen Ratschläge bei den Tierexperimenten und ihre Unterstützung.

Weiterhin möchte ich meinen Eltern für das Vertrauen und die Motivation, die sie mir gaben, danken. Meinem Bruder gilt der Dank für seine (trotz nicht vorhandener fachlicher Grundlagen) stets durchdachten Hinweise. Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Mann Danilo bedanken. Er hatte nicht nur immer Verständnis für die viele investierte Zeit, sondern motivierte mich immer wieder neu und löste so manches Computer-Problem. Abschließend danke ich meiner Tochter Miriam, die wenigstens manchmal auch schlief, wenn ich arbeiten musste.