

4. Material und Methoden

4.1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Als Versuchstiere dienten insgesamt 102 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Fa. Wiga, Sulzfeld) mit einem initialen Gewicht von ca. 180 g, entsprechend einem Alter von ungefähr 6 Wochen. Die Tiere befanden sich bis zum Tag des Versuches unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22-24 °C, relative Luftfeuchtigkeit: ca. 60%) in der Versuchstierhaltung des Institutes für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes, Homburg Saar (Tierschutzbeauftragte Frau Dr. med. vet. M. Frings). Die Fütterung erfolgte mit Standardlaborfutter sowie Wasser ad libitum.

Nur Versuchstiere, die keine Anzeichen von Erkrankungen aufwiesen, wurden in die Versuchsserien aufgenommen.

4.2. Versuchsdesign

4.2.1. Versuchsgruppen

Alle in die Untersuchungen aufgenommenen Tiere wurden in 19 Versuchsgruppen unterteilt, welche wiederum in 3 Studienabschnitte aufgeteilt worden sind. Die Zuteilung der Tiere in die jeweiligen Gruppen erfolgte randomisiert. Die nachstehende tabellarische Darstellung (Tabelle 1) veranschaulicht das Gruppendesign:

4. Material und Methoden

Vorbereitung		Studienabschnitt				
Präparat	Dosis	1	2		3	
			1 S / 5 R	2 S / 4 R	1 S / 5 R	2 S / 4 R
Ringerlaktat (Vehikel)	30 ml/kg	X	X	X		
	30 ml/kg+ SnMP-IX				X	X
DCLHb	1 g/kg	X	X	X		
	2 g/kg	X				
	3 g/kg	X	X	X		
HAR	5 mg/kg	X	X	X		
	25 mg/kg	X				
	75 mg/kg	X				
	5 mg/kg+ SnMP-IX				X	X
Anzahl Tiere pro Gruppe		2	8	8	6	6

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Tierzuordnung zu den einzelnen Studienabschnitten und Gruppen. S: Schock, R: Reperfusion (in Stunden)

4.2.2. Versuchsprotokolle

4.2.2.1. Studienabschnitt 1

Im ersten Studienabschnitt wurden die dosisabhängigen Effekte von DCLHb und HAR auf die HO-1 und HSP 70 Proteinexpression in Leber, Niere, Herz, Lunge und Aorta untersucht.

Hierzu wurde je zwei Tieren unter milder Äthernarkose DCLHb (1, 2 oder 3g/kg KG) oder HAR (5, 25 oder 75 mg/kg KG) über einen Venenverweilkatheter (Venflon 0,8 Viggo-Spectramed, Helsingborg, Schweden) in die Schwanzvene injiziert. Zwei mit Ringerlaktat (30 ml/kg KG) behandelte Tiere dienten als Kontrollgruppe. Die Venenverweilkanüle wurde hiernach entfernt und die

Äthernarkose beendet. Ab diesem Zeitpunkt wurde bei freiem Zugang zu Wasser eine Nahrungskarenz eingehalten. Nach 24 Stunden wurden den erneut mit Äther narkotisierten Versuchstieren die Organe (Leber, Niere, Herz, Lunge, Aorta) entnommen. Die organspezifische HO-1 und HSP 70 Proteinexpression wurde nachfolgend durch Western-Blot Analyse quantifiziert. Das am Versuchsende entnommene Blut wurde zur Gesamtbilirubinbestimmung im Serum verwendet.

4.2.2.2. Studienabschnitt 2

Aufgrund der im Studienabschnitt 1 gewonnenen Erkenntnisse wurde im 2. Studienabschnitt untersucht, ob eine durch die Vorbehandlung mit DCLHb bzw. HAR induzierte HO-1 Proteinexpression eine Modulation des durch hämorrhagischen Schock verursachten Organschadens bewirkt.

Hierzu wurden die entsprechenden Tiere (n=8/Gruppe) mit DCLHb (1 oder 3 g/kg KG) bzw. HAR (5 mg/kg KG) analog zu Studienabschnitt 1 vorbehandelt. Mit Ringerlaktat vorbehandelte Tiere (30 ml/kg KG) dienten als Kontrolle (Vehikel). 24 Stunden später erfolgte nun die Induktion eines hämorrhagischen Schocks für 1 bzw. 2 Stunden mit nachfolgender Reperfusion für 5 bzw. 4 Stunden. Zur Quantifizierung des Organschadens wurden jeweils vor Induktion (t_{0h}) und am Ende der Schockperiode (t_{1h} bzw. t_{2h}) sowie am Versuchsende (t_{6h}) Blutproben entnommen. Zusätzlich erfolgte am Versuchsende (t_{6h}) eine Entnahme der Leber zur nachfolgenden Bestimmung des ATP-Gehaltes im Gewebe (Abb.: 5).

- DCLHb 1, 3 g/kg KG i.v.
- Häminarginat 5 mg/kg KG i.v.
- Ringerlaktat 30ml/kg KG (Vehikel)

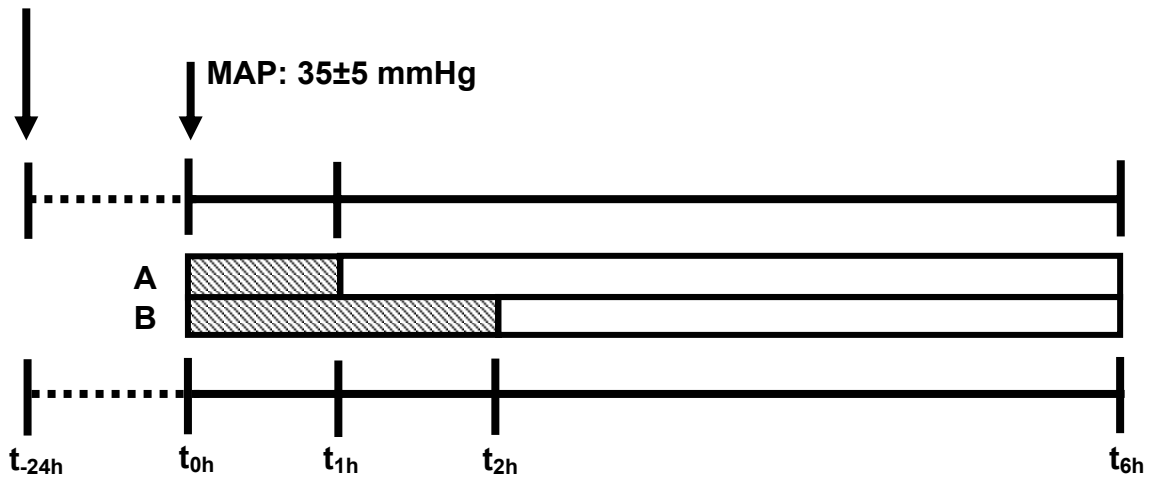




Abb. 5: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs im Studienabschnitt 2. t_{-24h} : Vorbehandlung; t_{0h} : Induktion des hämorrhagischen Schocks für 1 Stunde mit 5 Stunden Reperfusion (A), bzw. für 2 Stunden mit 4 Stunden Reperfusion (B). t_{6h} : Versuchsende.  = Schockperiode;  = Reperusionsphase

4.2.2.3. Studienabschnitt 3

Aufgrund der im Studienabschnitt 2 gewonnenen Erkenntnisse wurde im 3. Studienabschnitt untersucht, ob die durch HAR-Vorbehandlung vermittelte Protektion tatsächlich auf die Aktivität der HO-1 zurück zu führen ist.

Hierzu wurden analog zu Studienabschnitt 2 je 6 Tiere mit HAR (5 mg/kg KG) bzw. Ringerlaktat (30 ml/kg, Vehikel) vorbehandelt. 24 Stunden später erfolgte auch hier die Induktion eines hämorrhagischen Schocks für 1 bzw. 2 Stunden mit nachfolgender Reperfusion für 5 bzw. 4 Stunden. In diesem Abschnitt wurde jedoch unmittelbar vor Schockinduktion die Hämoxxygenase-Aktivität durch den kompetitiven Inhibitor Zinn-Mesoporphyrin-IX (SnMP-IX) blockiert. Die Quantifizierung des Organschadens erfolgt analog Studienabschnitt 2 (Abb.: 6).

- Häminarginat 5 mg/kg KG i.v.
- Ringerlaktat 30ml/kg KG (Vehikel)

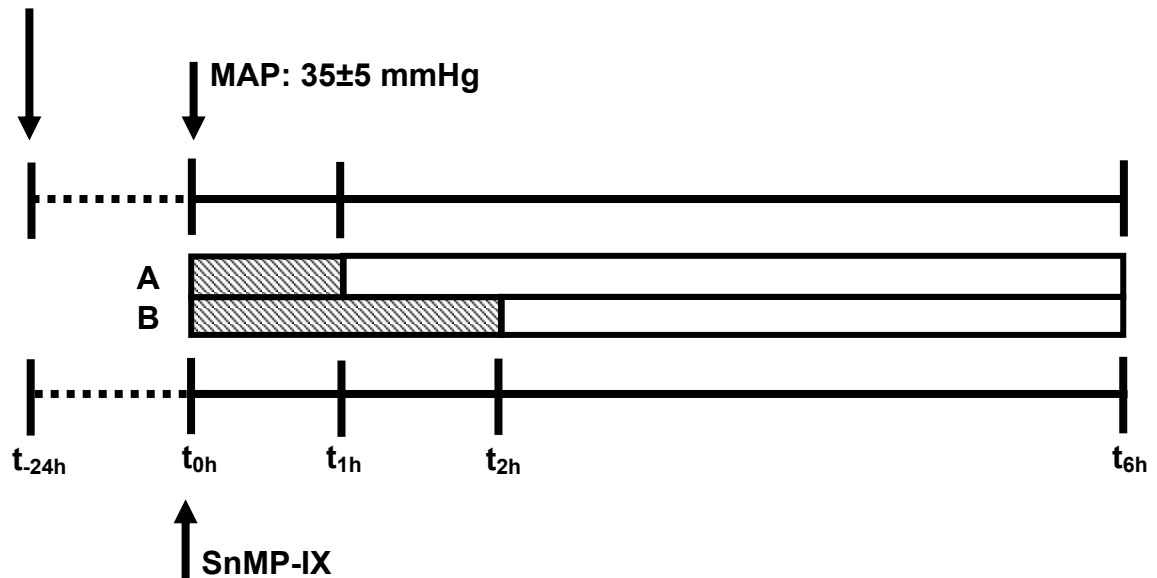


Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs im Studienabschnitt 3. t_{-24h} : Vorbehandlung; t_{0h} : Induktion des hämorrhagischen Schocks für 1 Stunde mit 5 Stunden Reperfusion (A), bzw. für 2 Stunden mit 4 Stunden Reperfusion (B). t_{6h} : Versuchsende. Unmittelbar vor Schockinduktion erfolge die Gabe des kompetitiven Inhibitors der HO-Aktivität (SnMP-IX). ▨ =Schockperiode; □ = Reperusionsphase

4.3. Versuchsdurchführung

4.3.1. Anästhesie der Versuchstiere

Zur Durchführung der einzelnen Untersuchungen und invasiven Eingriffe wurden die Versuchstiere narkotisiert. Hierzu verwendeten wir zur Verabreichung von DCLHb, HAR bzw. Ringerlaktat Diethylether. Die Ethernarkose wurde wegen der kurzen Anästhesiedauer bei guter Analgesie und Spontanatmung für diesen Zweck ausgewählt.

Die Schockversuche (Studienabschnitte 2 und 3) wurden unter Pentobarbitalnarkose (50 mg/kg KG), welches intraperitoneal appliziert wurde, durchgeführt. Diese Methode wurde gewählt, um eine lang dauernde wirksame Anästhesie und Analgesie bei vorhandener Spontanatmung erreichen zu können.

4.3.2. Injektionen und Injektionslösungen

4.3.2.1. Diaspirin-quervernetztes Hämoglobin

Die bei -24° gelagerte fertige 10%ige DCLHb-Lösung (Baxter Hemoglobin Therapeutics, Neuchatel, Schweiz) wurde vor der Applikation schonend aufgetaut. Die Applikation von DCLHb erfolgte in den entsprechenden Gruppen durch intravenöse Injektion in der angegebenen Dosierung (siehe Kap. 3.2. Versuchsdesign).

4.3.2.2. Häminarginat

Die im Kühlschrank lichtgeschützt gelagerte Häminarginatlösung (Normosang[®], Orphane Europe, Dietzenbach) wurde unmittelbar vor der Applikation mit 0,9 %iger Ringerlaktatlösung verdünnt. Die Applikation von HAR erfolgte in den entsprechenden Gruppen durch intravenöse Injektion in der angegebenen Dosierung (siehe 4.2. Versuchsdesign).

4.3.2.3. Zinn-Mesoporphyrin (SnMP)-IX

Im dritten Studienabschnitt erfolgte eine spezifischen Blockade der Hämoxygenase-Aktivität durch den kompetitiven Inhibitor Zinn-Mesoporphyrin-IX (SnMP-IX). Die Lösung wurde im eigenen Labor aus Zinn-Mesoporphyrin-IX Dichlorid (Porphyrin Products INC, Logan, USA), Natrium - Hydrogencarbonat (8,4%, Delta Pharma GmbH, Pfullingen) und PBS - Puffer (Phosphate Buffered Saline, Life Technologies) in einem lichtgeschütztem Gefäß hergestellt. Die Applikation von SnMP-IX erfolgte direkt nach Herstellung in den entsprechenden Gruppen durch langsame intravenöse Injektion zur Vermeidung von hämodynamischen Reaktionen unmittelbar vor Schockinduktion in einer Dosierung von 5,7 mg/kg KG.

4.3.3. Eingriffe

4.3.3.1. Präparation

Im Rahmen der Schockversuche (Studienabschnitt 2 und 3) wurden die Versuchstiere 24 Stunden nach Vorbehandlung mit DCLHb, HAR bzw. Ringerlaktat mit Pentobarbital narkotisiert.

Zur Durchführung der Präparation wurden die Tiere auf dem Rücken bei rekliniertem Kopf gelagert und die Extremitäten seitlich mit Pflaster fixiert.

Nach Anlage eines medianen Hautschnittes zwischen Mandibula und Manubrium sterni erfolgte eine Tracheotomie mit Einbringen eines ca. 3 cm langen Plastiktubus in die Trachea zur Sicherung der Spontanatmung. Anschließend wurde die rechte Vena jugularis externa präpariert und ein Polyethylen (PE) 50 Zentralvenenkatheter (ZVK) eingebracht. Über diesen Katheter konnte die Infusion von Ringerlaktatlösung als auch die Transfusion des entsprechenden Blutvolumens zu Beginn der Reperfusionphase durchgeführt werden. Anschließend erfolgte die Präparation der linken Arteria carotis communis, in welche ebenfalls ein PE 50 Katheter eingeführt wurde. Über diesen Katheter erfolgte eine kontinuierliche Überwachung der Hämodynamik (Hellige Servomed SMK 154-9, Freiburg) sowie die Entnahme von Blutproben.

An die operative Vorbereitungsphase von 35-45 min schloss sich eine 15-minütige Erholungsphase an.

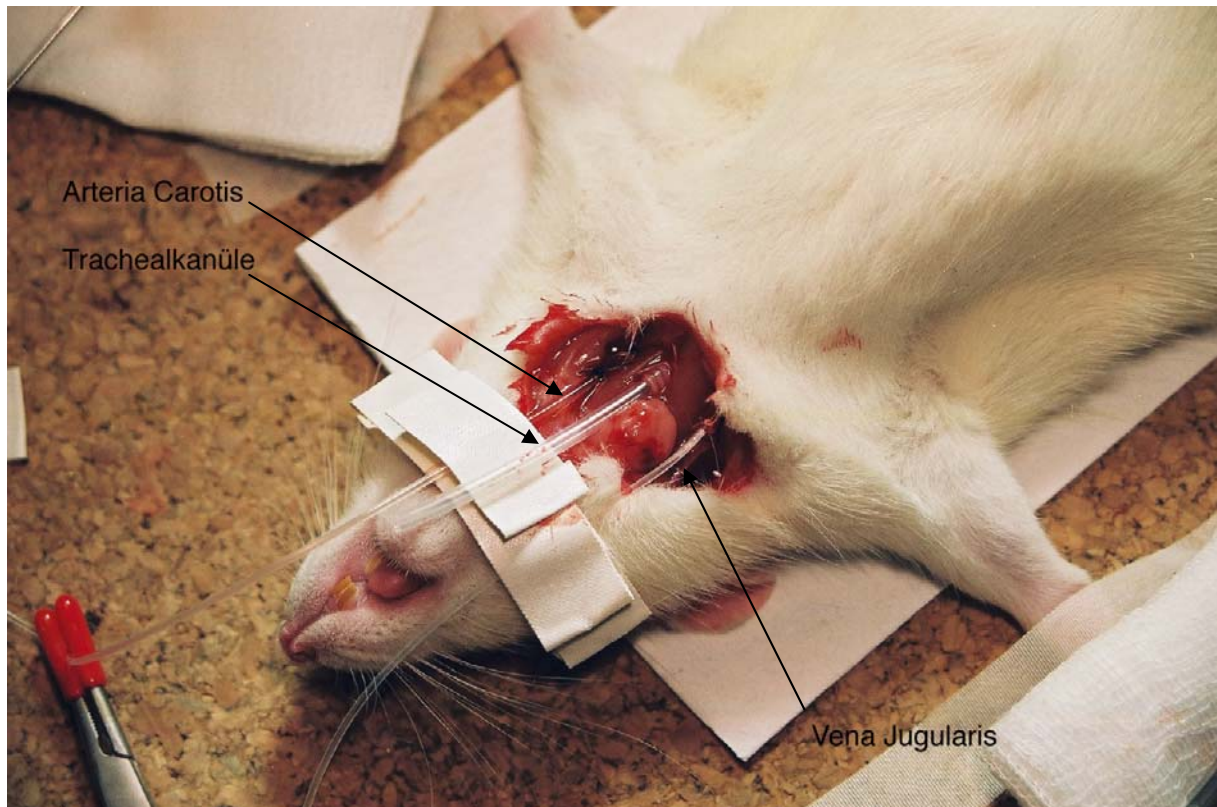


Abb. 7: *Situs am Ende der Präparation*

4.3.3.2. Modell des hämorrhagischen Schocks

Die Induktion und Aufrechterhaltung des hämorrhagischen Schocks erfolgte in Anlehnung an das isobare, heparinfreie Schockmodell nach WIGGERS und INGRAHAM (1946): der mittlere arterielle Blutdruck wurde durch raschen arteriellen Blutentzug auf 35 ± 5 mmHg gesenkt und durch weitere Blutentnahmen oder Infusion von Ringerlaktatlösung für 60 min bzw. 120 min in diesem Bereich konstant gehalten. Das entzogene Blut wurde mit Zitrat-Phosphat-Dextrose (0,14 ml/ml Blut) antikoaguliert und zur Retransfusion aufbewahrt.

Nach Ende der 60- bzw. 120-minütigen Schockphase schloss sich die Reperfusionphase für weitere 5 bzw. 4 Stunden an. Begonnen wurde diese mit der Retransfusion von 60% des entnommenen, antikoagulierten Blutes innerhalb der ersten 10 Minuten. Zusätzlich dazu wurde in der ersten Stunde der Reperfusionphase Ringerlaktatlösung entsprechend 200% und in der zweiten Stunde entsprechend 100% des entzogenen Blutvolumens infundiert.

Anschließend erfolgte bis zum Versuchsende die Deckung des Basisbedarfs (10 ml/kg KG/h) durch Infusion von Ringerlaktatlösung.

4.4. Bestimmung und Dokumentation der Zielparameter

Vor Versuchsbeginn wurde jedes Versuchstier gewogen, um eine gewichtsadaptierte Applikation der entsprechenden Substanzen sowie eine Umrechnung des Schock-Blutvolumens (siehe Kap. 4.4.2) pro kg Körpergewicht gewährleisten zu können.

4.4.1. Western Blot

Nach der Entnahme wurde das Gewebe sofort im flüssigen Stickstoff (-196°C) Schock gefroren und anschließend in einer Tiefkühltruhe (-80°C) bis zur Analyse gelagert.

Etwa 50 mg Gewebe wurde im zehnfachen Volumen Zellysepuffer homogenisiert (10 mM Tris pH 7,5, 10 mM Natriumchlorid, 0,1mM EDTA, 0,5% Triton X100, 0,02% Natriumazid, 2mM Phenylmethansulfonylfluorid). Nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile (10 min bei 18.000 X g) wurde die Konzentration an löslichem Gesamtprotein im Überstand bestimmt. Dazu wurde eine spektralphotometrische Messung durchgeführt, die auf dem Prinzip beruht, dass das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Comassie Brilliant Blau G-250 bei der Bindung an Proteine von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Als Referenz diente Bradford Protein Assay (BioRad Protein Assay Kit II, BioRad, Hercules, NY, USA). Anschließend wurden die Proben in Probenpuffer (62,5 mM Tris, pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% 2- Mercaptoethanol, 0,0025% Bromphenolblau) 5min gekocht. Gleiche Mengen Protein (100µg) pro Probe wurden durch SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) in 12% Tris-Glycin Gelen aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer fand ein denaturierender Puffer nach Lämmli Verwendung (25 mM Tris, pH 8,3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS). Als positive Kontrollen für HO-1 diente aufgereinigtes rekombinantes HO-1 Protein aus der Ratte (StressGen Biotechnologies Corp., Sidney, BC, Canada) und Protein aus Milzhomogenat. Die Gele wurden mittels

4. Material und Methoden

Elektrophorese (12 mM Tris Base, 96 mM Glycin, pH 8,3) auf Polyvinylidendifluorid-Membranen geblottet (Westran, Schleicher + Schüll, Dassel) und anschließend bei 4°C bis zur Antigendetektion für maximal 24 Stunden aufbewahrt. Eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur in 5% fettfreier Trockenmilch in Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung (20 mM Tris, pH 7,5, 0,5 M Natriumchlorid, 0,1% Tween20) diente zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Im Anschluss wurde die Membran mit einem polyklonalen Kaninchen anti-Ratte HO-1 Primärantikörper (Verdünnung 1:1000) (StressGen) 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wurde durch Waschen der Membran mit Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung entfernt. Im nächsten Schritt wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Esel anti-Kaninchen Sekundärantikörper (Verdünnung 1:10000) 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit Tween-haltiger Tris-gepufferter Kochsalzlösung fand nun die Detektion des Antigen-Antikörper Konjugates mittels verstärkter Chemielumineszenz (ECL Western Blot Analysis System, Amersham Buchler, Braunschweig) nach Anleitung des Herstellers statt. Das Signal wurde nach kurzem Kontakt (1-5 min) der Membran mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Buchler, Braunschweig) in einer mit Verstärkerfolien ausgekleideten Röntgenkassette sichtbar.

4.4.2. Hämodynamik

Im Rahmen der Schockversuche (Studienabschnitt 2 und 3) erfolgte eine kontinuierliche Überwachung des mittleren arteriellen Druckes (MAP) und der Herzfrequenz (HR), wobei die Werte alle 15 Minuten dokumentiert wurden. Gewährleistet wurde diese durch den Anschluss des Karotiskatheters an einen Druckwandler (Statham Gloud, P23Db, Oxford, Ca, USA), über den die Pulscurve und der numerische Werte des Blutdruckes auf einem Monitor (Servomed, Hellige, Heiligenwald) dargestellt wurde. Die Bestimmung der Herzfrequenz (HF) erfolgte durch Auszählung der Pulscurve auf dem Monitor, wodurch eine Berechnung der Herzschläge pro Minute möglich wurde.

4.4.3. Schock-Blutvolumen (SBV)

Als ein Vergleichsparameter der Kreislaufstabilität während der Schockperiode diene das Schock-Blutvolumen (SBV). Hierzu wurde das Blutvolumen das zur Schockinduktion und Aufrechterhaltung des definierten MAP entnommen und antikoaguliert wurde dokumentiert.

4.4.4. Dekompensationszeitpunkt

Als weiterer Vergleichsparameter diene der Dekompensationszeitpunkt. Definiert wurde dieser als das Auftreten einer Kreislaufinstabilität während der Schockperiode mit der Notwendigkeit der Volumengabe um den MAP bei 35 ± 5 mmHg zu stabilisieren.

4.4.5. Blutgasanalyse

In den Studienabschnitten 2 und 3 (siehe Kap. 3.2.2.) wurde vor Induktion des hämorrhagischen Schocks (T_{0h}), unmittelbar vor der Reperfusionphase (t_{1h} bzw. t_{2h}) sowie am Versuchsende (t_{6h}) eine Blutgasanalyse an einem Standardgerät (STAT profile 5, Nova Biochemicals, Rödermark, Deutschland) durchgeführt.

Aus den Blutproben wurde der arterielle Sauerstoffpartialdruck (pO_2) [mmHg], Kohlendioxid-Partialdruck (pCO_2) [mmHg], Laktat [mmol/l], Hämatokrit [%] sowie Basenüberschuss (Base Excess, BE) [mmol/l] bestimmt.

4.4.6. Serum-Gesamtbilirubin

Zur indirekten Quantifizierung der Hämoxxygenaseaktivität wurde die Konzentration von Gesamtbilirubin im Serum vor Versuchsbeginn und 24 Stunden nach Vorbehandlung unter Verwendung des Sigma Diagnostics Bilirubin Reagenz-Sets Nr. 550-A (SIGMA DIAGNOSTICS, Deisenhofen) bestimmt. Dieses enthält sowohl Gesamt-Bilirubin-Reagenz zur Bestimmung des Leerwerts (Lösung A: 0,1% Sulfanilsäure und 50% Dimethylsulfoxid (DMSO) in 0,2 mol/l Salzsäure) als auch Natriumnitritlösung (0,07 mol/l) zur Herstellung des Gesamt-Bilirubin-

4. Material und Methoden

Testreagenz (Lösung B: 30 ml Lösung A+1ml Natriumnitritlösung). Die quantitative Bestimmung von Gesamtbilirubin beruht auf der Reaktion des Bilirubins mit diazotierter Sulfanilsäure in Gegenwart von DMSO (Testreagenz) unter Bildung von Azobilirubin. Die Extinktion (E) des proportional zum Gesamtbilirubin gebildeten Azobilirubins kann bei 560 nm photometrisch bestimmt werden.

Die Blutproben wurden zentrifugiert und das Serum bis zur Bestimmung der Gesamtbilirubinkonzentration bei -24°C aufbewahrt. Von jeder Probe wurden je 40 µl mit 1 ml Lösung A (LEERWERT) oder 1 ml Lösung B (TEST) versetzt. Als Standard diente Bilirubin bekannter Konzentration, welches analog zu den Proben mit Lösung A oder B versetzt wurde.

Die Proben wurden gemischt (Vortex), 5 Minuten im Wasserbad bei 30°C inkubiert und anschließend die Extinktion bei 560 nm photometrisch bestimmt. Die Bestimmung des Nullwerts erfolgte mittels Aqua destilata.

Zur Berechnung des Gesamtbilirubins wurde folgende Gleichung zugrunde gelegt:

$$\text{Gesamtbilirubin (mg/dl)} = \frac{\Delta E \text{ Probe}}{\Delta E \text{ Standard}} \times \text{Konzentration Bilirubin Standard (mg/dl)}$$

wobei $\Delta E = E \text{ Test} - E \text{ Leerwert}$

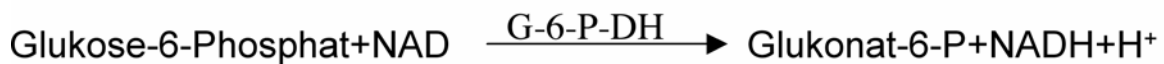
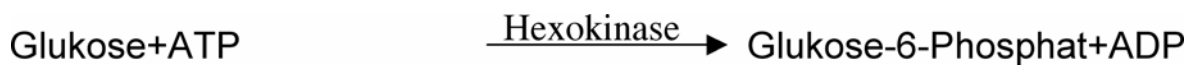
4.4.7. Serum-Leberenzyme

Die im chemischen Zentrallabor des Universitätsklinikums durchgeführte quantitative Bestimmung der leberspezifischen Enzyme Aspartat-Aminotransferase (ASAT), Alanin-Aminotransferase (ALAT) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) erfolgte aus den vor Schockinduktion und am Versuchsende entnommenen Blutproben.

4.4.8. ATP-Gehalt im Lebergewebe

Die quantitative Bestimmung des ATP-Gehalts im Lebergewebe wurde unter Verwendung eines enzymatischen UV-Tests (ATP Hexokinase-Set, Rolf Greiner BioChemica) durchgeführt. Das Set besteht aus Reagenz 1 (100 mmol/l TRIS Puffer pH 7,8 + 4 mmol/l Mg^{2+} + 20 mmol/l Glukose + 2,1 mmol/l NAD) und Reagenz 2 (4 mmol/l Mg^{2+} + 1,5 kU/l Hexokinase + 1,5 kU/l Glukose-6-phosphatdehydrogenase).

Testgrundlage:



Glukose wird durch ATP zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Dieser Schritt wird durch das Enzym Hexokinase katalysiert. Im zweiten Schritt erfolgt die NAD^+ abhängige Oxidation von Glukose-6-Phosphat durch das Enzym Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase, wobei $NADH + H^+$ proportional zum ATP-Gehalt entsteht. Die $NADH + H^+$ -Konzentration kann photometrisch bestimmt werden.

Das zur ATP-Bestimmung gewonnene Lebergewebe wurde am Versuchsende mit einer Gefrierstopzange entnommen und bis zur Untersuchung bei -80°C gelagert. Die tiefgefrorenen Leberproben wurden zügig in kalter 10% Trichloressigsäure homogenisiert (Powergen 125 tissue homogenizer, Fisher Scientific, Pittsburg, PA) und anschließend bei 3000 g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

250 μl Probe wurde mit 2400 μl Reagenz 1 versetzt, 5 Minuten bei 37°C inkubiert und die Extinktion E1 von Probe und Leerwert (250 μl Aqua dest. + 2400 μl Reagenz 1) photometrisch bestimmt. Anschließend wurde Probe und Leerwert mit jeweils 600 μl Reagenz 2 versetzt, bei 37°C 5 Minuten inkubiert und nachfolgend die Extinktion E2 photometrisch bestimmt.

4. Material und Methoden

Zur Berechnung des ATP-Gehaltes wurde folgende Gleichung zugrunde gelegt:

$$C_{\text{ATP}} = F \times \Delta E \text{ [\mu mol/dl]}$$

Wobei

$$\Delta E = (E_2 - E_1)_{\text{Probe}} - (E_2 - E_1)_{\text{Leerwert}}$$

Der zur Berechnung des ATP-Gehaltes verwendete Faktor F errechnete sich wie folgt:

$$F = (V \times f \times 100) / (\varepsilon \times v \times d) \text{ [\mu mol/dl]}$$

V= Gesamtvolumen in der Küvette [ml] = 3,250

f= Verdünnungsfaktor durch Probevorbereitung = 2,0

d= Schichtdicke der Küvette [cm] = 1,00

v= Probenvolumen [ml] = 0,250

ε = Extinktionskoeffizient NADH [$\text{l} \times \text{cm}^{-1} \times \text{mmol}^{-1}$] = 6,3 bei 340 nm

Somit wurde zur Berechnung der ATP-Konzentration der Faktor F mit 412,70 $\mu\text{mol/dl}$ zu Grunde gelegt.

4.4.9. Letalität

Versuchstiere, die durch die Induktion des hämorrhagischen Schocks verstorben sind oder die Reperfusionphase nicht überlebt haben wurden in die Letalitätsstatistik aufgenommen. Tiere, die durch iatrogene Fehler verstorben sind wurden hierbei nicht berücksichtigt.

4.5. Statistik

4.5.1. Nullhypothesen und Berechnung der Versuchstierzahl

Die Berechnung der Gesamtstierzahl erfolgte unter Berücksichtigung von Erfahrungswerten früherer Studien, nach der von KASTENBAUM et al. (1970) beschriebenen Methode. Hierbei wurde ein α -Fehler von 0,05 und ein β -Fehler von 0,1 zugrunde gelegt.

Folgende Nullhypothesen wurden festgelegt:

4. Material und Methoden

- Die Vorbehandlung führt nicht zu einer Expression von HO-1
- Die Vorbehandlung bewirkt keine Protektion nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion
- Die Protektion ist nicht von der HO-1 abhängig.

4.5.2. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Daten wurde unter Zuhilfenahme des Softwarepaketes SigmaStat[®] (Version 2.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) vorgenommen. Bei normal verteilten Daten kam die One way Analysis of Variance (ANOVA) zur Anwendung. Bei Durchführung multipler statistischer Tests wurde zusätzlich der Student-Newman-Keuls post-hoc Test eingesetzt. Die statistische Auswertung bezüglich der Letalität erfolgte mittels Fisher Exact Test. Als Signifikanzniveau wurde ein p - Wert von $< 0,05$ festgelegt.

4.5.3. Darstellung der Ergebnisse

Die graphische Aufarbeitung erfolgte unter Zuhilfenahme des Softwarepaketes SigmaPlot[®] (Version 5.02, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standard Error of the Mean (SEM) angegeben.