

Diplomarbeit
Oxidativer Stress – Messmethoden, Parameter und HBO
Interpretation anhand eines Case Reports

eingereicht von

Karin Rappold

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorⁱⁿ der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Physiologische Chemie

und

Klinische Abteilung für Thoraxchirurgie und Hyperbare Chirurgie

unter der Anleitung von

Ao.Univ. Mag. Dr. Joachim Greilberger

Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Dr. Jörg Lindenmann

Graz, am 29.10.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 29.10.2017

Karin Rappold eh

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Ao.Univ. Mag. Dr. Joachim Greilberger für die Bereitstellung des Themas meiner Diplomarbeit sowie die außerordentlich kompetente und zuverlässige Betreuung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer Assoz.-Prof. Priv.-Doz. Dr. Jörg Lindenmann für die Unterstützung und Zuverlässigkeit, vor allem für den klinischen Teil meiner Arbeit, bedanken.

Der wohl größte Dank den ich hier festhalten möchte, gilt meinen Eltern Heidemarie und Friedrich Rappold. Danke liebe Mama und lieber Papa, dass ihr mir meine Ausbildung ermöglich habt, immer für mich da seid und mich immer wieder so großzügig unterstützt! Es ist nicht selbstverständlich solche Eltern zu haben wie ihr es seid.

Als nächstes möchte ich mich bei Schwester Petra Moussa sowie Schwager Dr. med. univ. Alexander Moussa bedanken. Sie haben mich immer wieder motiviert und mir Halt gegeben. Ich konnte und kann mich immer auf sie verlassen. Danke für eure großzügige Unterstützung!

Des Weiteren möchte ich meinen Neffen Maximilian sowie meine Nichte Johanna erwähnen, welche mir ohne es zu wissen immer wieder einen abwechslungsreichen Alltag geschenkt haben. Schön, dass es euch gibt!

Ein weiterer besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. med. univ. Veronika Matzi.

Danke liebe Veronika, für Deine nicht selbstverständliche Hilfe die Du meiner ganzen Familie bereits geleistet hast. Ohne dich wäre wohl so manches in meinem Leben anders verlaufen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinem Freund Andreas Forster bedanken. Er hat mich nicht nur bei der Erstellung meiner Diplomarbeit, sondern das gesamte Studium mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mich immer wieder aufs Neue aufgebaut. Danke, dass ich dich an meiner Seite habe!

Zusammenfassung

Hintergrund: Oxidativer Stress ist ein sehr aktueller und weit verbreiteter Begriff. Er beschreibt eine Dysbalance zwischen Oxidantien und Antioxidantien, wobei das Gleichgewicht zugunsten der Oxidantien verschoben ist. Der Zusammenhang dieser Stoffwechsellage und die Entstehung von Krankheiten sind seit einiger Zeit bekannt. Dies ist auch der Grund, weshalb die Entwicklung und Interpretation von Messparametern einen enormen Stellenwert einnimmt.

Anhand eines Case-Reports, in dem eine exogene Zufuhr von Wasserstoffperoxid stattfand und dessen Folgen mittels Hyperbarer Oxygenierung (in weiterer Folge kurz HBO genannt) behandelt wurden, sollen die Auswirkungen auf das oxidative Stresslevel erhoben werden.

Methodik: Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde mittels Literaturrecherche via Pubmed in der Datenbank Medline nach themenbezogener Literatur gesucht und zusätzlich anhand von Lehrbüchern versucht, eine theoretische Basis zu vermitteln.

Im vorliegenden Case-Report wurden jeweils vor und nach zweimaliger HBO-Therapie die oxidativen Stressparameter erhoben, um den Verlauf des oxidativen Stresslevels zu ermitteln. Abschließend wurden die zuvor beschriebenen theoretischen Grundlagen mit Hilfe des Case-Reports und dessen Messergebnissen interpretieren und mit aktuellen Daten verglichen.

Ergebnisse: Die Konzentrationen von CP (von 184 auf 220 pmol/mg), oxLDL (von 261.4 auf 455.1 ng/ml), TOS (von 30.0 auf 126.5 μ M), GPx (von 14.0 auf 20.0 U/mgHb) und 8-OHdG (von 6.7 auf 12.7 ng/mL) erhöhten sich nach den beiden durchgeführten HBO-Sitzungen. Hingegen kam es zu einer Erniedrigung von MDA (von 1.42 auf 1.40 μ M) und NTP (von 426.0 auf 406.8 nM).

Schlussfolgerung: Die exogene Zufuhr von Wasserstoffperoxid sowie die Durchführung einer HBO-Therapie kann eine Erhöhung der oxidativen Stressparameter nach sich ziehen. Zusätzlich konnte anhand der Ausgangswerte unseres Probanden im Vergleich zu den Messergebnissen von Matzi et al. gezeigt werden, dass die Intoxikation mittels Wasserstoffperoxid eine enorme oxidative Belastung des Körpers darstellt.

Inwieweit dem menschlichen Organismus eine Kompensation dieser oxidativen Belastung möglich ist, kann aufgrund dieses Einzelfalles jedoch nicht geklärt werden.

Abstract

Background: Oxidative Stress nowadays is a common term which stands for a dysbalance between oxidants and antioxidants, which is shifted in favour of oxidants.

It is known, that this metabolic situation is causing multiple diseases especially cancer.

This is the reason, for an encouraged attempt in getting new parameters.

The aim of this study is to demonstrate the causes of hydrogen peroxide ingestion and HBO on the level of oxidative stress.

Methods: Therefore an extensive literature research in medline and study of relevant books was conducted. In the following Case Report the oxidative stress parameters were measured before and after two-time HBO-therapy, to detect the process of these parameters. Finally, the results were discussed, based on the theoretical foundations and compared with present data.

Results: After both HBO-therapies the concentration of CP (from 184 to 220 pmol/mg), oxLDL (from 261.4 to 455.1 ng/ml), TOS (from 30.0 to 126.5 μ M), GPx (from 14.0 to 20.0 U/mgHb) and 8-OHdG (from 6.7 to 12.7 ng/mL) are increased, whereas the concentration of MDA (from 1.42 to 1.40 μ M) and NTP (from 426.0 to 406.8 nM) is decreased.

Conclusions: The ingestion of hydrogen peroxide on the one hand, and the HBO-therapy on the other hand can increase the oxidative stress parameters. Furthermore can be shown, that the ingestion of hydrogen peroxide causes an oxidative burden, caused by the higher starting values compared to the values from the study of Matzi et al. How far the human body is able to offset such oxidative stress levels generally can't be told by an individual case.

Inhaltsverzeichnis

Diplomarbeit.....	i
Eidesstattliche Erklärung.....	ii
Danksagung.....	iii
Zusammenfassung.....	iv
Abstract.....	v
Inhaltsverzeichnis.....	vi
Glossar und Abkürzungen.....	viii
Abbildungsverzeichnis.....	xi
Tabellenverzeichnis.....	xiii
1 Einleitung.....	14
1.1 Oxidativer Stress.....	14
1.1.1 Definition Stress.....	16
1.1.2 Definition oxidativer Stress.....	17
1.2 Freie Radikale und Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff Spezies.....	18
1.2.1 Reaktionsmechanismen freier Radikale.....	20
1.2.2 Physiologische Entstehung von RONS im Körper - Mitochondrien.....	21
1.3 Hyperbare Oxygenierung - HBO.....	27
1.3.1 Geschichte.....	27
1.3.2 Physikalische Grundlagen.....	27
2 Allgemeine Ansatzpunkte für Messmethoden des oxidativen Stress.....	39
2.1 Direkte Messmethoden für den oxidativen Stress Status.....	39
2.2 Indirekte Ansätze für Messmethoden des oxidativen Stress Status.....	39
2.2.1 Glutathionperoxidase GPx.....	40
2.2.2 Superoxid-Dismutase (SOD).....	42
2.2.3 Katalase.....	42
2.2.4 Vitamin C - die L-Ascorbinsäure.....	43
2.2.5 Vitamin E - Tocopherol.....	43
2.2.6 Messparameter, die sich durch Lipidperoxidation ergeben.....	44
2.2.7 Messparameter, die sich durch die Modifikation von Proteinen ergeben.....	44
2.2.8 Messparameter, die sich durch oxidative DNA- bzw. RNA-Schädigung ergeben.....	45
2.3 Oxidative Stressparameter.....	46

3	Case Report.....	47
3.1	Erhobene oxidative Stressparameter.....	52
3.1.1	Carbonylproteine (CP)	52
3.1.2	Atherogenes LDL (oxLDL)	54
3.1.3	8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG).....	55
3.1.4	Glutathionperoxidase Aktivität (GPx)	56
3.1.5	Malondialdehyd (MDA).....	57
3.1.6	Total oxidativer Status (TOS)	58
3.1.7	Nitro-Tyrosin-Proteine (NTP).....	59
4	Resultate	61
5	Diskussion.....	68
6	Conclusio	71
7	Literaturverzeichnis	72

Glossar und Abkürzungen

8-OHdG	8-Hydroxydesoxoguanosin
ADP	Adenosindiphosphat
ATA	absolute (technische) Atmosphäre
atm	physikalische Atmosphäre
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Bar
BCA	Bichinolinsäure Test
C	Konzentration des gelösten Gases
CAT	Katalase (aus dem engl. Catalase)
CD	Compact Disc
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungen Erkrankung
CP	Carbonylproteine
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESR	Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie
FADH ₂	hydrierte Form des Flavinadeninucleotids.
Fe ²⁺	Eisen(II)
GCS	engl. Glasgow Coma Scale; Glasgow-Koma-Skala
GPx	Gluthationperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wasserstoff
H ⁺	Wasserstoffproton
H ₂	molekularer Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

Hb	Hämoglobin
Hb-Fe ²⁺	reduziertes Hämoglobin
Hb-Fe ³⁺	oxydiertes Hämoglobin
HBO	Hyperbare Oxygenierung
HNE	4-Hydroxy-nonenal
HO ₂ *	Hydroxyperoxyl Radikal
HOBr	Hypobromige Säure
HOCl	Hypochlorit
kg/cm ²	Kilogramm pro Quadratzentimeter
kPa	Kilopascal
LDL	Low-density-Lipoprotein
m	Meter
MDA	Malondialdehyd
mmHg	Millimeter Quecksilber-Säule
MPa	Megapascal
N ₂	Stickstoff
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NAD ⁺	oxidierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NTP	Nitro-Tyrosin-Proteine
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ^{*-}	Superoxidanionradikal
OH*	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
oxLDL	oxidiertes Low-density-Lipoprotein
P	Druck
p	Partialer Druck
Pa	Pascal
PBS	engl. phosphate buffered saline; phosphatgepufferte Salzlösung
P _{ges}	Gesamtdruck
PW Doppler	Pulsed Wave Doppler
RNA	Ribonukleinsäure
RONS	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff Spezies

ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl. revolutions per minute – Umdrehungen pro Minute
SOD	Superoxid-Dismutase
T	Temperatur
THC	Tetrahydrocannabinol
TNB	Tetramethylbenzidin
TOS	totaler oxidativer Status
UV-Licht	Ultraviolettes-Licht
V	Volumen
α	Löslichkeitskoeffizient für Gase und Flüssigkeiten

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Oxidativer Stress	18
Abbildung 2 Homolytische Spaltung am Beispiel H_2	18
Abbildung 3 Unterteilung der ROS	19
Abbildung 4 Freie Radikale und RONS	19
Abbildung 5 Kovalente Bindung zweier Radikale	20
Abbildung 6 Reaktionsmöglichkeiten freier Radikale	21
Abbildung 7 Reduktion von Sauerstoff durch Cytochrom Oxidase	22
Abbildung 8 Überblick der Atmungskette	23
Abbildung 9 Steady State: Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien	25
Abbildung 10 Circulus Vitiosus des oxidativen Stress	26
Abbildung 11 Gesetz nach Boyle	27
Abbildung 12 Gesetz nach Dalton	28
Abbildung 13 Gesetz nach Henry	28
Abbildung 14 O_2 -Aufnahmekurve unter HBO Therapie	31
Abbildung 15 Veränderungen an Biomolekülen durch RONS	40
Abbildung 16 Reduktionsmöglichkeiten von Glutathion	41
Abbildung 17 Oxidation von $Hb-Fe^{2+}$ zu Eisen(III)-Hämoglobin (Methämoglobin) und Superoxidanionradikal	41
Abbildung 18 Superoxid-Dismutase	42
Abbildung 19 Wie H_2O_2 durch die Katalase verändert wird	42
Abbildung 20 Direkte Effekte durch Peroxynitrit, Hypochlorit und Hydroxylradikal auf die Erbsubstanz	46
Abbildung 21 Substanzen welchen einen indirekten Effekt auf die Erbsubstanz ausüben können	46
Abbildung 22 TOS – vor und nach zweimaliger HBO Therapie	61
Abbildung 23 MDA – vor und nach zweimaliger HBO Therapie	62
Abbildung 24 oxLDL – vor und nach zweimaliger HBO Therapie	63
Abbildung 25 CP – vor und nach zweimaliger HBO Therapie	63
Abbildung 26 GPx – vor und nach zweimaliger HBO Therapie	64
Abbildung 27 NTP – vor und nach zweimaliger HBO Therapie	65
Abbildung 28 8-OHdG – vor und nach zweimaliger HBO-Therapie	65

Abbildung 29 Verlauf der einzelnen Stressparameter in % jeweils vor und nach
zweimaliger HBO Therapie 67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zusammenfassung der wichtigsten Antioxidantien und Oxidantien	16
Tabelle 2 Überblick über endogene sowie exogene Abwehrmechanismen	24
Tabelle 3 Gebräuchliche Einheiten in der Anwendung von HBO	29
Tabelle 4 Umrechnungstabelle der gebräuchlichsten Druckeinheiten in der Therapie mit HBO	29
Tabelle 5 Die wichtigsten Indikationen einer HBO Therapie	33
Tabelle 6 Absolute und relative Kontraindikationen für eine HBO Therapie	35
Tabelle 7 Relevante Laborergebnisse bei Aufnahme in Graz.	49
Tabelle 8 Oxidative Stressparameter im Überblick. 1. Abnahme vor HBO-Therapie und 2. Abnahme nach zweimaliger HBO-Therapie.	66
Tabelle 9 Oxidative Stressparameter vor, während und nach einer HBO Therapie, gemessen bei gesunden Probanden	68

1 Einleitung

Oxidativer Stress ist heute ein weit verbreiteter Begriff. Vor allem in den letzten Jahren nahmen die Publikationen zu diesem Thema rasant zu (1). Seit einiger Zeit ist bekannt, dass es einen engen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Entstehung von Krankheiten wie Artherosklerose, Diabetes mellitus, neurodegenerativen Erkrankungen und auch malignen Erkrankungen gibt (1,2,48). Beispielsweise liegt dieser bei neoplastischen Erkrankungen darin, dass freie Radikale Mutationen in unserem Körper verursachen und somit zu einer Entartung von Zellen führen können (3,4). In der Literatur existieren sogar Zahlen, die besagen, dass ein Großteil aller bösartigen Erkrankungen primär oder sekundär durch oxidativen Stress ausgelöst werden (5). Mit der zunehmenden Kenntnis und des Verständnisses über den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und einer daraus resultierenden Krankheitsentstehung, nahm auch das Interesse in Richtung einer Entwicklung von qualitativen und quantitativen Messmethoden von oxidativem Stress in den letzten Jahren enorm zu. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene indirekte als auch direkte Messmethoden erforscht und versucht, Parameter mit Referenzwerten für eine bessere Vergleichbarkeit zu etablieren (5).

Zu Beginn dieser Arbeit müssen zum leichteren Verständnis einige Begriffe etwas näher definiert und beschrieben werden. Danach folgt ein ausführlicher Überblick über die Entstehung von freien Radikalen sowie einer oxidativen Stoffwechsellage und die mitunter weitreichenden Konsequenzen, die diese nach sich ziehen kann. Ein Exkurs zur *Hyperbaren Oxygenierung* (HBO) liefert einen Überblick über Indikationen sowie Kontraindikationen und mögliche Nebenwirkungen. Anschließend werden auch die möglichen Auswirkungen zwischen HBO und oxidativen Stress beschrieben, welche in der Literatur immer wieder diskutiert werden. Des Weiteren werden die derzeit etablierten Messmethoden der oxidativen Stressparameter näher erläutert. Abschließend wird der theoretische Zusammenhang von oxidativem Stress, dessen Parametern und Auswirkungen im Zuge eines Case Reports erarbeitet und mittels aktueller Literatur diskutiert und verglichen.

1.1 *Oxidativer Stress*

Eine Person, die in der Forschung im Bereich des oxidativen Stresses eine sehr wichtige Rolle spielte und auch heute noch immer spielt, ist Prof. Dr. Helmut Sies. Ihn kann man als den Gründer des Konzepts des *oxidativen Stress* bezeichnen (5,6). Er erforschte die

molekulare Basis von Oxidantien sowie Antioxidantien, war im Laufe seines Lebens an vielen verschiedenen renommierten Universitäten als Gastprofessor tätig, arbeitete an zahlreichen Forschungsprojekten mit und legte mit seiner Arbeit den Grundstein für dieses Forschungsgebiet (6).

Im menschlichen Körper laufen ständig Prozesse ab, bei denen Oxidantien und Antioxidantien entstehen. Er besitzt hierfür sehr fein regulierte Systeme, welche versuchen eine Balance zwischen diesen beiden Systemen aufrecht zu erhalten. Dies bezeichnet man als sogenanntes „Steady-State“. Unter bestimmten Umständen kann es jedoch zu einer Störung dieser Prozesse kommen und das Gleichgewicht wird verschoben (2,6,7,46). Gründe für eine Dysbalance können beispielsweise ein erhöhter Level von endogen oder exogen zugeführten Oxidantien und eine daraus folgende Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, kurz ROS, sein. Des Weiteren kommen auch eine verminderte Produktion in antioxidativ wirksamer Enzyme bzw. antioxidativer Substanzen oder das vermehrte Vorliegen inaktivierter antioxidativ wirksamer Enzyme als Ursache in Frage. Auch chronisch entzündliche Erkrankungen können die Produktion von Radikalen fördern und tragen somit an der Entstehung eines Ungleichgewichts bei (5). In der Regel liegen jedoch meist mehrere Faktoren gleichzeitig vor, die dann in Summe eine veränderte Stoffwechselsituation bedingen (2,8,9). Kommt es nun zu einem verschobenen Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten eines vermehrten Vorliegens von Oxidantien, so spricht man lt. Löffler von oxidativem Stress (47). Inwiefern und vor allem in wieweit sich dieser negativ auswirkt, hängt natürlich im Wesentlichen von der Höhe der gebildeten Oxidantien, den jeweiligen körperlichen Ressourcen und der Menge an effektiv vorhandenen Antioxidantien ab (2,8,9).

Oxidantien:

Als Oxidantien werden Stoffe bezeichnet, die als Elektronenakzeptor Elektronen aufnehmen und dabei selbst reduziert werden. (10,11). Grundsätzlich ist die Verwendung des Begriffes Oxidans trotz der gängigen Benutzung, zu hinterfragen, da sowohl das O_2^* , H_2O_2 , als auch einige weitere ROS gleichzeitig andere Stoffe oxidieren als auch reduzieren können (5).

Antioxidantien:

Als Antioxidantien werden Stoffe bezeichnet, die als Elektronendonator Elektronen abgeben und dabei selbst oxidiert werden. Sie versuchen der Entstehung von freien Radikalen, welche für den Organismus schädlich sind, entgegen zu wirken (4,10,12).

Eine Dysbalance zwischen Antioxidantien und Oxidantien liegt vor, wenn eine geringe Konzentration an Antioxidantien bzw. erhöhte Konzentration an Oxidantien vorliegt. Weiters sind Oxidantien, wie Radikale, sehr reaktiv und können unmittelbar mit der umliegenden organischen Materie reagieren, bevor Antioxidantien dies verhindern können. Dies kann aber durchaus gewollt sein, wenn eine Reparatur oder ein Ersatz eines durch Oxidantien geschädigten Biomoleküls energetisch günstiger ist, als im Vorhinein das Oxidans zu beseitigen. Zudem kann auch vermutet werden, dass modifizierte Materie, wie oxidiertes LDL, eine immunreaktive Antwort bewirken kann, indem Autoantikörper gegen oxidiertes LDL gebildet werden. Des Weiteren hat man in den vergangenen Jahren festgestellt, dass ein gewisses Maß an Oxidation und Reduktion, sprich die sogenannte Redox-Regulation, eine wichtige Rolle bei intrazellulären Prozessen spielt. Sei es in der Kommunikation zwischen den Zellorganellen, der Organregulation oder auch betreffend der Reaktion des Körpers auf Stress (5).

Tabelle 1 zeigt die wichtigsten Antioxidantien und Oxidantien im Organismus:

Antioxidantien	Oxidantien
Vitamin E - Tocopherol	Strahlung
Vitamin C - Ascorbinsäure	Gifte (Pestizide, Metalle, ...)
Glutathion	Radikale
Spurenelemente	Ozon
Enzyme (SOD, CAT, GPx)	

Tabelle 1 Zusammenfassung der wichtigsten Antioxidantien und Oxidantien. (2,5).

1.1.1 Definition Stress

Zunächst bedarf es einer Definition des Begriffes „Stress“ und der möglichen Konsequenzen, die dieser Zustand in unserem Körper bewirkt. Stress wird im Pschyrembel grundsätzlich als physiologische Reaktion auf physische oder psychische Herausforderungen des menschlichen Körpers gesehen. Im Bereich der Humanphysiologie

führt Stress zur Aktivitätssteigerung des Sympathikus, welche folglich eine vermehrte Ausschüttung von Katecholaminen nach sich zieht. Das klinische Bild ist klassischerweise gekennzeichnet durch einen erhöhten Blutdruck, Blutzucker, einer gesteigerten emotionalen Erregung und auch einer vermehrten Schweißproduktion. Dies wird unter der einfachen Beschreibung „fight-or-flight“-Reaktion subsummiert.

Im Allgemeinen kann man sagen, dass Stress die Folge einer Dysbalance zwischen Anforderungen und Reaktionsmöglichkeiten ist. Grundsätzlich kann man Stress daher in zwei Formen unterteilen, einerseits den Eustress und andererseits den Distress. Unter Eustress versteht man in erster Linie einen gesunden, durchaus positiv wirksamen Stress. Er ist wichtig für eine adäquate physiologische Anpassung unseres Körpers an die alltäglichen Anforderungen. Eustress wirkt leistungssteigernd, liefert uns die Energie durch Glukoneogenese und mobilisiert so unsere eigenen körperlichen Ressourcen.

Im Gegensatz dazu versteht man unter Distress einen negativen Stress, welcher unseren Körper in eine gegenteilige Situation bringt. Er setzt uns langfristig gesehen in eine Kampf- oder Fluchtbereitschaft und es erfolgt eine inadäquate Reaktion unseres Körpers auf alltägliche Anforderungen. Distress kann daher im Falle eines länger andauernden Bestehens zur Entstehung von Krankheiten führen. Vor allem psychiatrische Erkrankungen können auf Basis eines langandauernden Distresses resultieren. Die beiden hier genannten könnte man als die wichtigsten und bekanntesten qualitativen Formen von Stress bezeichnen, wobei jedoch anzumerken ist, dass noch einige weitere Stressformen existieren. Dies verdeutlicht, wie vielfältig der Begriff Stress ist (12).

1.1.2 Definition oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird laut Pschyrembel als übermäßige, das heißt über das natürliche Maß hinaus umfassende, Produktion von Sauerstoff-Superoxidationen (O_2^{*-}) und anderen reaktionsfreudigen Sauerstoffderivaten definiert (12). Die Ursache für die Entstehung von oxidativem Stress ist eine Dysbalance zwischen Oxidantien und Antioxidantien, wobei das Gleichgewicht zugunsten der Oxidantien verschoben ist. Dies tritt auf, wenn der Körper, aus welchem Grund auch immer, nicht mehr in der Lage ist eine ausgeglichene Stoffwechsellage aufrecht zu erhalten (5).

Oxidativer Stress

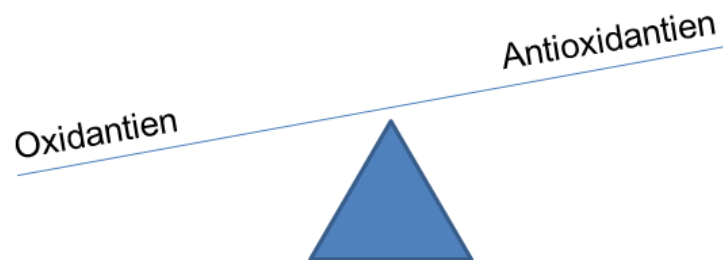


Abbildung 1 Oxidativer Stress.

1.2 Freie Radikale und Reaktive Sauerstoff- und Stickstoff Spezies

Freie Radikale sind meist sehr reaktionsfreudige, kurzlebige Atome oder Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen, welche vielfältige und oft irreversible Reaktionen auslösen können. Sie bilden sich durch Zufuhr von Energie wie beispielsweise durch ionisierende Strahlung oder Elektronenübertragung (5,12). Radikale können auf verschiedenste Weise auch aus „Nicht-Radikalen“ entstehen, indem sie zum Beispiel ein einzelnes Elektron abgeben oder auch ein einzelnes Elektron aufnehmen. Sozusagen ein Radikal-Kation bzw. Radikal-Anion.

Des Weiteren entstehen Radikale auch durch homolytische Spaltung einer chemischen Bindung. Hier kommt es durch einen exogenen Einfluss wie beispielsweise UV Licht, ionisierende Strahlung oder hohen Temperaturen zu einer Spaltung der kovalenten Bindung zweier Atome, wobei jedes Atom ein Elektron des zuvor bindenden Elektronenpaares behält. In Halliwell et al. wird das Rauchen als gutes und alltägliches Beispiel angeführt, das eine homolytische Spaltung und somit die Entstehung von Radikalen zur Folge hat (5).



Abbildung 2 Homolytische Spaltung am Beispiel H_2 . Modifiziert nach (10).

Freie Radikale sind nur sehr schwer direkt nachweisbar, da sie eine hohe Reaktionsfreudigkeit besitzen (10,13). Reagieren freie Radikale in vivo, so entstehen auf

Basis von reaktivem Sauerstoff und Stickstoff schädliche Substanzen, sogenannte reaktive Sauerstoffspezies und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, kurz auch ROS und RONS genannt.

ROS ist eine allgemeine Bezeichnung für Atome oder Moleküle, welche sich vom Sauerstoff ableiten, jedoch um ein vielfaches reaktionsfreudiger sind. Man unterscheidet Radikale mit freien Elektronen und Radikale ohne freien Elektronen, welche jedoch ein hohes Oxidationspotential besitzen. Zusammenfassend kann man sagen, dass zwar alle Sauerstoffradikale ROS sind, aber nicht alle ROS zu den freien Radikalen zählen (5). Einen kurzen Überblick zum besseren Verständnis liefert Abbildung 3.

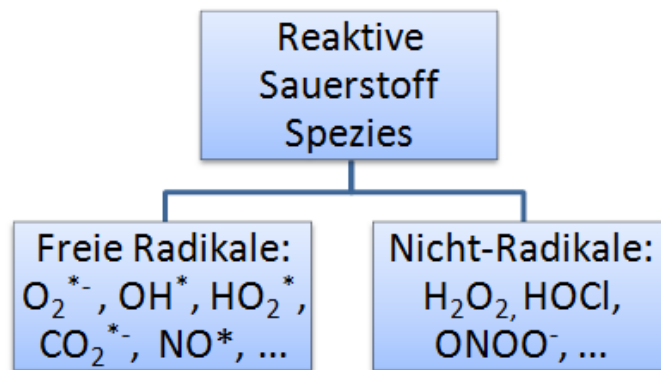


Abbildung 3 Unterteilung der ROS. Modifiziert nach (5).

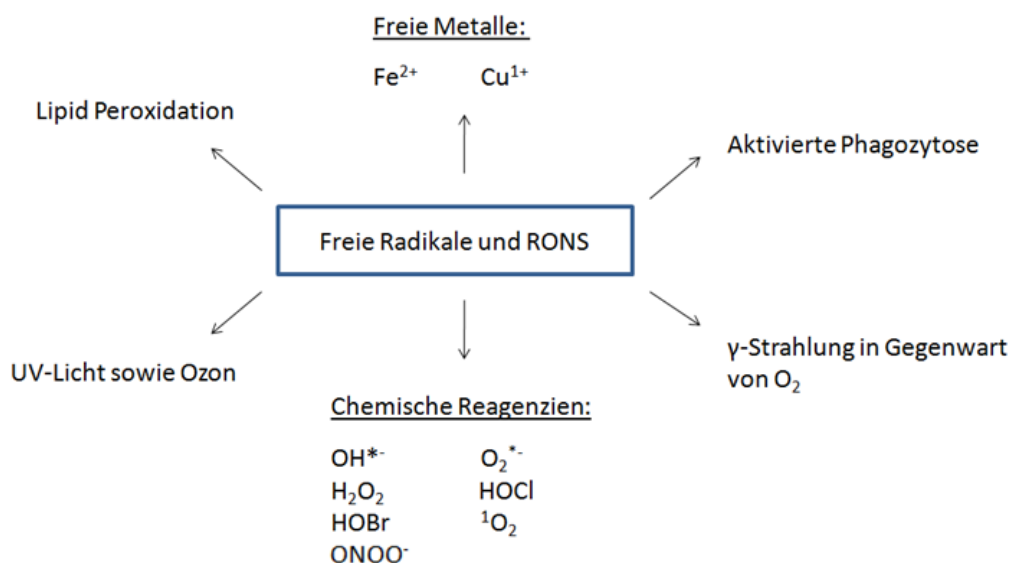


Abbildung 4 Freie Radikale und RONS. Modifiziert nach (2,7,8).

1.2.1 Reaktionsmechanismen freier Radikale

Es gibt verschiedene Varianten, wie freie Radikale reagieren können. Zum einen gibt es ein Reaktionsmuster, bei dem zwei Radikale auf einander treffen und zum anderen eines, wobei ein Radikal auf ein Nicht-Radikal trifft. Treffen zwei Radikale auf einander, gehen sie eine kovalente Bindung ein, indem sie ihre ungepaarten Elektronen teilen. Nimmt man nun wiederum dasselbe Beispiel anhand von Wasserstoff, so wäre dies die umgekehrte Reaktion zur, im Vorhinein beschriebenen, homolytischen Spaltung (5).

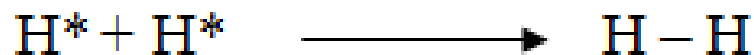


Abbildung 5 Kovalente Bindung zweier Radikale. Modifiziert nach (5).

Ein weiteres, auch biologisch sehr relevantes Beispiel einer kovalenten Bindung zweier Radikale wäre die Bindung von NO^* und O_2^{*-} , die als Ergebnis Peroxynitrit ONOO^- , ein Nicht-Radikal ergibt.

Die Mehrzahl der Reaktionen, die ein Radikal eingeht, sind jedoch jene mit einem Nicht-Radikal. Folglich entsteht ein weiteres freies Radikal, welches eine Kettenreaktion nach sich ziehen kann. Hier kann das freie Radikal auf der einen Seite als ein Oxidationsmittel sowie auf der anderen Seite als Reduktionsmittel agieren (5).

Oxidationsmittel oxidieren andere Atome oder Moleküle, indem sie Elektronen oder Wasserstoff aufnehmen oder Sauerstoff hinzufügen und somit selbst reduziert werden. Eine andere Bezeichnung für Oxidationsmittel wäre somit auch Elektronenakzeptor (5,10,11). Das Reduktionsmittel ist nun das Gegenteil vom Oxidationsmittel. Es reduziert ein anderes Atom oder Molekül, indem es ihm Elektronen oder Wasserstoff zuführt oder Sauerstoff entzieht. Somit bezeichnet man das Reduktionsmittel auch häufig als Elektronendonator (5,10,11). Ein kurzer Überblick zum besseren Verständnis der wichtigsten Reaktionsmöglichkeiten liefert Abbildung 6.

Bindung des freien Radikals A* mit einem Nicht-Radikal, welches ein ungepaartes Elektron besitzt:



Freies Radikal als Reduktionsmittel:



Freies Radikal als Oxidationsmittel:



Abbildung 6 Reaktionsmöglichkeiten freier Radikale. Modifiziert nach (5).

1.2.2 Physiologische Entstehung von RONS im Körper - Mitochondrien

Der menschliche Körper ist ständig damit beschäftigt durch bestimmte Prozesse Energie zu gewinnen. Jener Ort in unserem Körper an dem Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird und ROS physiologisch als Nebenprodukt entstehen, sind die Mitochondrien (5). Laut einigen Autoren entstehen 90 % der RONS im Körper in den Mitochondrien (2,8). Die Mitochondrien sind jene speziellen Zellorganellen im Körper, in denen die oxidative Phosphorylierung stattfindet und die durch ihre spezielle innere Membran an der Bildung von ATP maßgeblich beteiligt sind (12).

Jener Zyklus, welcher in den Mitochondrien aller Zellen im menschlichen Körper, mit Ausnahme der Erythrozyten, abläuft und für die Energiegewinnung sorgt, ist der Citratzyklus. Er verbindet die Abbauprodukte der drei Hauptnährstoffe Kohlenhydrate, Lipide und Proteine, die in einem komplexen Kreisprozess vollständig von Acetyl-CoA zu CO₂, NADH/H⁺, FADH₂ und GTP verstoffwechselt werden. Die aus dem Kreisprozess entstehenden Reduktionsäquivalente NADH/H⁺ und FADH₂ liefern dann in der gemeinsamen Endstrecke, der Atmungskette, die Energie in Form von ATP, welche die menschlichen Zellen antreibt (10,14). NADH/H⁺ und FADH₂ entstehen vor allem im Rahmen der β-Oxidation und während des Citratzyklus in den Mitochondrien. NADH/H⁺ kann jedoch zusätzlich auch noch im Rahmen der Glykolyse im Zytosol entstehen. Die notwendige Regeneration, also Reduktion beider Moleküle, findet hauptsächlich im Rahmen der Atmungskette statt (10).

Die Atmungskette

Am Ende des oxidativen Stoffwechsels steht die Atmungskette, die in der inneren Mitochondrienmembran abläuft. Hier werden alle im Stoffwechsel entstandenen Reduktionsäquivalente (NADH/H^+ und FADH^+) aufgenommen. In der Atmungskette werden die entstandenen Elektronen nach und nach abgegeben und treiben somit einen Protonengradienten an, der dann schließlich genutzt wird um aus ADP ATP zu bilden.

Insgesamt besitzt die Atmungskette vier Komplexe (I–IV), an denen die Elektronen abgegeben und weitertransportiert werden. Der Komplex I nimmt alle Elektronen von den angefallenen NADH/H^+ auf und dient als Protonenpumpe. Der Komplex II entspricht der Succinat-Dehydrogenase des Citratzyklus, die für die Umwandlung von Succinat in Fumarat verantwortlich ist. Das dabei entstandene FADH_2 wird somit im Komplex II der Atmungskette aufgenommen. Ubichinon steht nun an nächster Stelle der Atmungskette. Es hat die Aufgabe die von Komplex I und II aufgenommen Elektronen und zusätzlich anfallende Elektronen von FADH_2 zum Komplex III weiter zu geben. Ubichinon selbst wird dadurch zum Ubichinol reduziert. Der Komplex III fungiert wiederum als Protonenpumpe und gibt die Elektronen zum Cytochrom c weiter, welches die Elektronen zum Komplex IV weiterleitet. Im Komplex IV kommt es dann durch die Cytochrom-Oxidase zur Übertragung der Elektronen auf den Sauerstoff, welcher somit zu Wasser reduziert wird (10). Der letzte Abschnitt der Atmungskette ist nun die ATP-Synthase, in der es zum Abbau des Protonengradienten kommt und somit ATP gebildet wird (8,10).

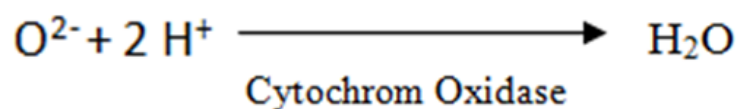


Abbildung 7 Reduktion von Sauerstoff durch Cytochrom Oxidase. Modifiziert nach (10).

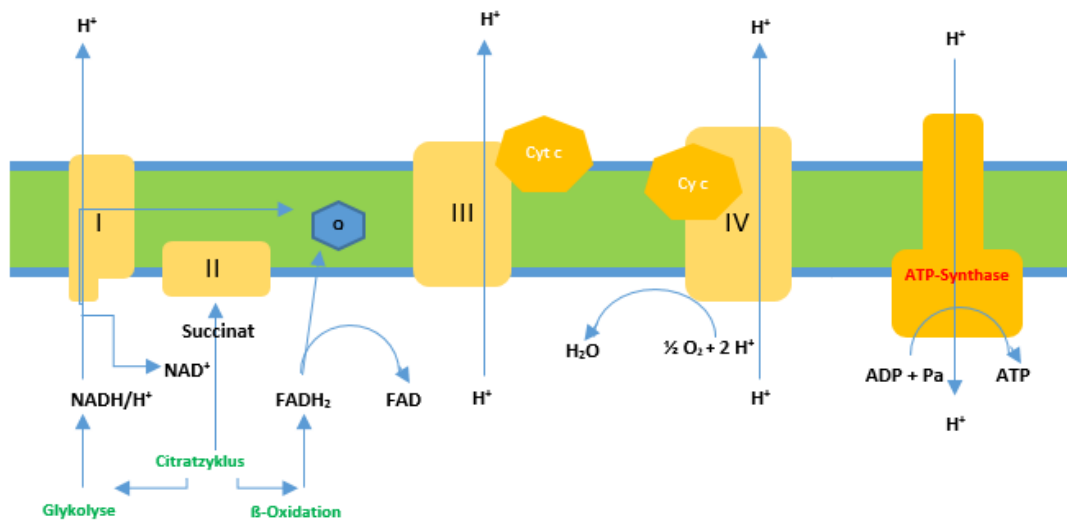


Abbildung 8 Überblick der Atmungskette. Modifiziert nach (10).

Stoffwechsellage bei Hypoxie

Bei Vorliegen einer hypoxischen Stoffwechsellage kommt es zu funktionellen und morphologischen Veränderungen in den Mitochondrien, die meist rasch zu erkennen sind. Es kommt zu einem Mangel an ATP, der beispielsweise das Entstehen von Myopathien als Konsequenz nach sich zieht (3). Des Weiteren führt das daraus resultierende Überangebot von NADH zu dessen Oxidation und es kommt zu einer steigenden Anzahl von 2H^+ und 2e^- . Dies führt wiederum zu einer Erhöhung des Elektronentransfers im Ubichinol-Komplex. Durch diese zusätzlich vorhandenen Elektronen kommt es in weiterer Folge zur Bildung von freien Radikalen und in letzter Konsequenz zur Bildung von RONS (5).

Stoffwechsellage bei Hyperoxie

Bei einem Überschuss an Sauerstoff liegen optimale Bedingungen vor, um in den Mitochondrien eine vollständige Verbrennung zu erreichen. Das Überangebot an Sauerstoff kann jedoch dazu führen, dass freie Radikale oder RONS weitere Radikale bilden (5).

Im menschlichen Organismus nehmen freie Radikale bzw. RONS mitunter auch eine wichtige Rolle ein, denn sie sind ein wesentlicher Bestandteil der Immunabwehr. Sie können beispielsweise nicht mehr funktionierende oder fehlentwickelte Zellen im Körper abbauen und haben eine antivirale, antifungale sowie antibakterielle Eigenschaft (1,5). Daher sind freie Radikale und RONS nicht von vornherein als schädlich zu bezeichnen. Entscheidend ist vielmehr die Konzentration, das Kompartiment und der Zeitraum, die der menschliche

Körper ihrer Wirkung ausgesetzt ist. Die Folgen einer intensiven und exzessiven Exposition sind, wie bereits früher erwähnt, oxidative Schäden, die sich etwa in Form von entzündlichen Prozessen manifestieren können. Längerfristig gesehen können dadurch direkte Schäden an Nukleinsäuren, Proteinen und Lipiden entstehen, die in weiterer Folge zu schwerwiegenden Erkrankungen des zentralen Nervensystems wie beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen führen können. Mitunter wird auch die Entstehung von chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen, Arteriosklerose oder Malignomen mit einer kumulativen Belastung von oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht (1,12,15,48). Dieses Problem scheint hier jedoch noch nicht zu Ende zu sein. Es dürfte vielmehr erst beginnen, da Krankheiten wie die oben genannten, wiederum zu einer veränderten Stoffwechsellage führen können und somit ihrerseits wieder zu einer gesteigerten Produktion von freien Radikalen beitragen, die ebenfalls eine vermehrte Bildung von RONS bedingen. Der Körper wird somit einer massiven oxidativen Stresssituation ausgesetzt (1,5,15).

Ein weiteres, nicht zu unterschätzendes Problem, das sich aus dieser Situation ergibt, ist der Umstand, dass sich nach einer gewissen Zeitspanne vom erhöhten oxidativen Stress Level eine bestimmte Stabilisierung dieses Zustandes einstellt. Dies kann zu einer Chronifizierung führen und wird als sogenannter chronischer oxidativer Stress bezeichnet (8).

Glücklicherweise besitzen menschliche Zellen unter normalen physiologischen Voraussetzungen Mechanismen, um überschüssige freie Radikale oder RONS zu neutralisieren oder zu eliminieren. Sie können so im Idealfall den Steady-State aufrechterhalten (2,8). Diese Vorgänge werden als antioxidative Abwehrmechanismen bezeichnet. Man unterscheidet diesbezüglich zwischen endogen und exogen wirksamen Abwehrmechanismen. In der unten angeführten Tabelle werden die verantwortlichen Systeme kurz aufgelistet (14).

Endogene Mechanismen	Exogene Mechanismen
Superoxid-Dismutase (SOD)	Ascorbinsäure
Gluthationperoxidase (GPx)	Tocopherol
Katalase (CAT aus dem engl. Catalase)	Ubichinol
Gluthation	Carotinoide

Tabelle 2 Überblick über endogene sowie exogene Abwehrmechanismen. Modifiziert nach (2,8,14).

Steady State



Abbildung 9 Steady State: Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien (2,8).

Folgen des oxidativen Stress:

Die Reaktion der Zellen auf oxidativen Stress kann sehr vielfältig sein. Die Folgen sind einerseits vom betroffenen Gewebe, andererseits auch von Ausmaß und Wirkungsdauer des oxidativen Stress abhängig (5).

Vermehrte Proliferation:

Untersuchungen haben gezeigt, dass in Zellkulturen Zellen zur Proliferation angeregt werden, wenn man ihnen ständig ein geringes Maß an H_2O_2 zuführt und sie so einem geringen Level an oxidativen Stress aussetzt. Erstaunlicherweise gibt es ab einem bestimmten Zeitpunkt einen Wachstumsstopp. Dieser wird durch die Zellen selbst hervorgerufen und als „Contact inhibition“ bezeichnet. Ab einer bestimmten Größe bzw. Anzahl von Zellen kommt es zu einem Verlust des Proliferations-Stimulus. Die Wundheilung ist ein anschauliches Beispiel für den pro-proliferativen Effekt, welcher optimal abläuft. Hingegen kann es durch einen Überschuss und nicht kontrollierten Proliferationsstopp auch zu pathogenen Prozessen wie beispielsweise Artherosklerose, Malignomen, rheumatoider Arthritis oder Fibrose kommen (5).

Adaptation:

Es zeigte sich, dass Zellen einen milden oxidativen Stress dadurch tolerieren, indem sie die Synthese von Antioxidantien anregen und so das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien aufrecht erhalten. Ein gewisses Maß an oxidativem Stress scheint durchaus eine positive Auswirkung zu haben. Beispielsweise kann die Ischämie bedingte ROS Bildung bis zu einem gewissen Grad zu einer rascheren Erholung der Kontraktilität von

ischämisch geschädigten Schweineherzmuskelzellen führen und somit die Zellen vor neuerlichen Ischämien schützen (5).

Migration und Adhäsion:

ROS wird eine Beeinflussung von Adhäsionsmolekülen nachgesagt. In Zellstudien können ROS die Regulation und den Aufbau des Zytoskeletts beeinflussen und somit wesentlichen Einfluss auf Wachstum, Formveränderungen und Migration der Zellen haben. Insbesondere wird eine Begünstigung der Metastasierung von malignen Zellen vermutet. Neueren Erkenntnissen zufolge könnten jedoch auch positive Wirkungen vorliegen. H_2O_2 scheint beispielsweise die Wundheilung bei Zebrafischen zu beeinflussen, indem es die Phagozytose anregt (5).

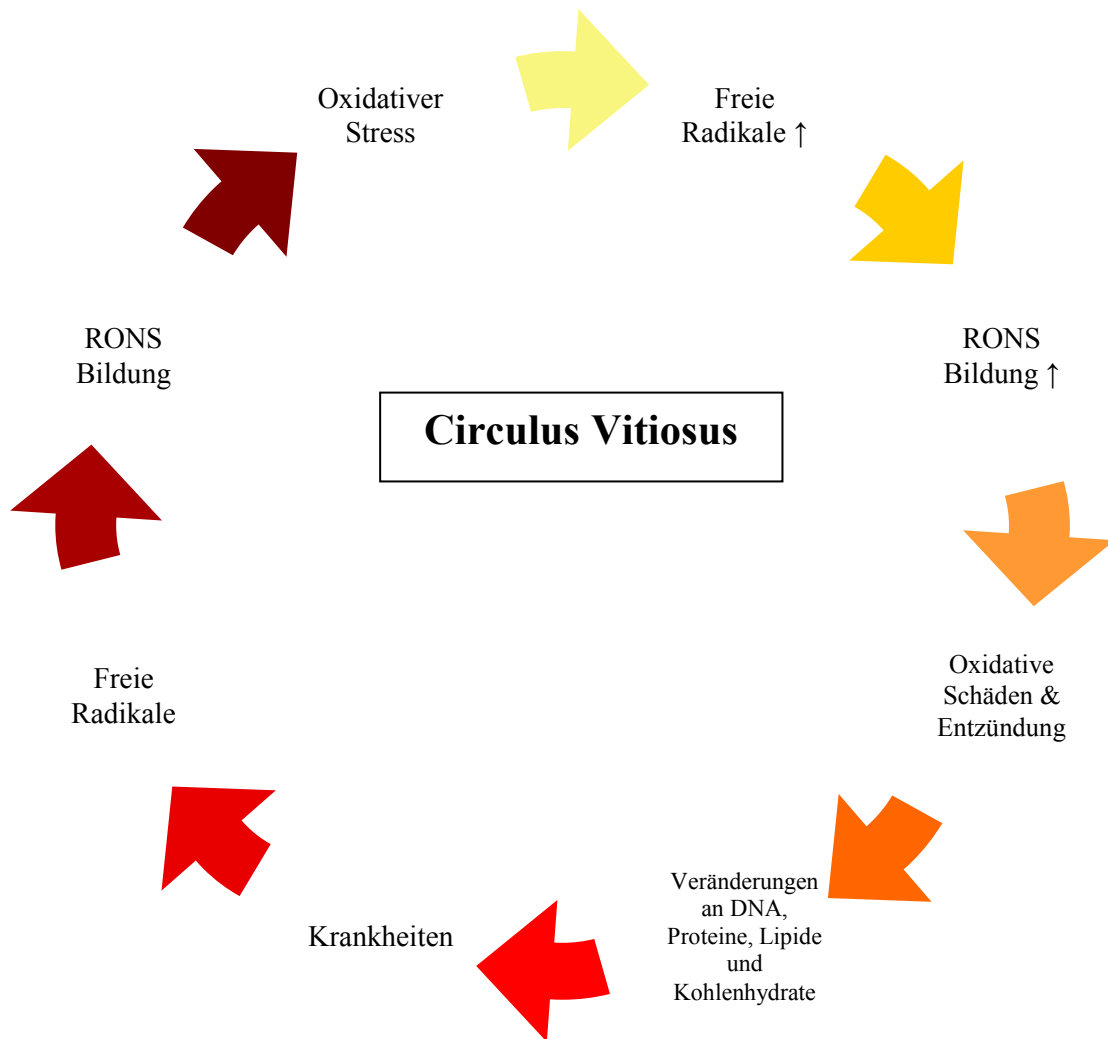


Abbildung 10 Circulus Vitiosus des oxidativen Stress (1,5,12,15).

1.3 Hyperbare Oxygenierung - HBO

1.3.1 Geschichte

Der Grundstein der therapeutischen Anwendung der *Hyperbaren Oxygenierung* (HBO) wurde von einem britischen Arzt und Pfarrer namens Henshaw im Jahr 1662 gelegt. Nach dem Motto „seemed like a good idea“ wurde anfangs, ohne wesentliche Anhaltspunkte für eine tatsächliche Wirkung, die erste Druckkammer gebaut. Im Laufe der Jahre setzten sich mehrere Wissenschaftler intensiv mit der Anwendung von HBO auseinander, wobei sich die wirklich nachweisbare Wirkung der Therapie zunächst als äußerst bescheiden erwies. Nach den anfänglichen, teils sehr abenteuerlichen Versuchen, fand die HBO 1955 den endgültigen Eintritt in den klinischen Alltag durch Churchill-Davidson I., welcher die HBO-Therapie in Kombination mit Strahlentherapie bei Krebspatienten anwendete (16).

1.3.2 Physikalische Grundlagen

Zum besseren Verständnis der Therapie mittels HBO ist ein gewisses physikalisches Grundverständnis erforderlich. Daher sollen die wichtigen physikalisch-chemischen Gesetze, welche in der HBO eine bedeutsame Rolle spielen, hier einleitend etwas näher erläutert werden (16).

Gesetz nach Boyle

Das Gesetz nach Boyle besagt, dass sich das Volumen eines idealen Gases bei konstanter Temperatur, umgekehrt proportional zum vorhandenen Druck verhält (14,16,17).

$$p \times V = \textit{konstant} \rightarrow \textit{wenn } T = \textit{konstant}$$

T ... Temperatur

V ... Volumen

P ... Druck

Abbildung 11 Gesetz nach Boyle. Modifiziert nach (14,16,17).

Das bedeutet, wenn man den Druck verdoppelt, halbiert sich das Volumen und umgekehrt. In der klinischen Anwendung zeigt sich jedoch, dass die Änderung des Volumens mit jeder zunehmenden Atmosphäre in der klinischen Praxis geringer ausfallen (16). Prinzipiell unterliegt jedes Gas, sei es nun im menschlichen Körper oder auch in medizinischem

Equipment, welches sich in der Tauchkammer befindet, diesem Gesetz (14). Praktisch relevant ist dies aus dem Grund, da vor allem zum Beginn der Therapie ein langsamer Anstieg des Druckes erreicht werden soll, um das Entstehen eines Barotraumas im Mittelohr möglichst zu verhindern (16).

Gesetz nach Dalton

Dalton's Gesetz besagt, dass sich ein Gas aus mehreren Bestandteilen zusammensetzt. Demnach ergibt die Summe aller einzelnen Drücke eines Gases den sogenannten Partialdrücken, den Gesamtdruck des vorliegenden Gases (16).

$$P_{\text{ges.}} = p_1 + p_2 + p_3 + \dots + p_n$$

P ... Druck

P_{ges} ... Gesamtdruck

Abbildung 12 Gesetz nach Dalton. Modifiziert nach (14).

Gesetz nach Henry

Dem Gesetz von Henry zufolge ist die Menge des in einer Flüssigkeit gelösten Gases proportional zum vorherrschenden Druck (16). Dieser Umstand gewinnt vor allem im Zusammenhang mit dem Einsatz von HBO bei Tauchern, die an einer Dekompressionskrankheit erkranken, an bedeutsamer klinischer Relevanz.

$$\alpha \times \frac{p}{C} = \textit{konstant} \quad \rightarrow \textit{wenn } T = \textit{konstant}$$

α ... Löslichkeitskoeffizient für Gase und Flüssigkeiten

p ... Partialer Druck

C ... Konzentration des gelösten Gases

Abbildung 13 Gesetz nach Henry. Modifiziert nach (14).

Wie unschwer aus der Bezeichnung ableitbar ist, bedient sich HBO einer Anwendung von Sauerstoff unter erhöhten Druckverhältnissen. Die wichtigsten physikalischen Einheiten, die daher ständig verwendet werden, sind in nachstehender Tabelle zusammengefasst:

mmHg	Millimeter Quecksilber-Säule
kg/cm ²	Kilogramm pro Quadratcentimeter
bar	Bar
atm	Physikalische Atmosphäre
ATA	Absolute (technische) Atmosphäre

Tabelle 3 Gebräuchliche Einheiten in der Anwendung von HBO. Modifiziert nach (18).

Wie die für die HBO gebräuchlichen Einheiten miteinander in Beziehung stehen, zeigt Tabelle 4. HBO ist, wie eingangs bereits kurz erwähnt, eine Therapie, die schon seit langer Zeit erprobt ist und zu verschiedenen therapeutischen Zwecken angewendet wird. Da man in der Literatur immer wieder teils unterschiedliche Einheiten für die verwendeten Drücke findet, kommt es nicht selten vor, dass eine Umrechnung der Einheiten erforderlich wird (14). Die unten angeführte Tabelle soll dies vereinfachen.

Umrechnungstabelle der Druckeinheiten:

1 Pa	Pascal	entspricht	1 N/m ²
1 kPa	Kilopascal	entspricht	1.000 N/m ²
1 MPa	Megapascal	entspricht	1.000.000 N/m ²
1 bar	Bar	entspricht	100.000 Pa 100 kPa 0,1 MPa 0,99 ata 750,06 mmHg
1 atm	Physikalische Atmosphäre	entspricht	1,013 bar
1 ATA	Absolute (technische) Atmosphäre		760 mmHg
1 mmHg	Millimeter Quecksilbersäule	entspricht	133,32 Pa

Tabelle 4 Umrechnungstabelle der gebräuchlichsten Druckeinheiten in der Therapie mit HBO. Modifiziert nach (14,16).

Oxygenierung:

Die Luft, welche alle lebenden Organismen, mit Ausnahme der Anaerobier, atmen, ist ein Gemisch aus verschiedenen Gasen. Der Hauptbestandteil unserer Atemluft ist Stickstoff N₂, welches einen Anteil von rund 78 Vol.-% entspricht. Sauerstoff O₂ ist mit knappen 21 Vol.-% der zweitgrößte und wichtigste Bestandteil, gefolgt von zahlreichen anderen Gasen wie

beispielsweise Kohlenstoffdioxid, Argon, Neon, Helium oder Wasserstoff. Letztere sind nur mehr in sehr geringen Anteilen nachweisbar (14,18).

Die physiologische Anreicherung des Blutes mit O₂ ist ein Prozess, der ständig ablaufen muss, um ein aerobes Leben zu ermöglichen. Sauerstoff wird über die Atemluft eingeatmet und zu den Alveolen der Lunge transportiert. In den Alveolen tritt der Sauerstoff mittels Diffusion ins venöse Blut über. Dies ist physikalisch gesehen nur möglich, da ein Druckunterschied zwischen dem in den Alveolen und dem im venösen Blut vorhandenen Sauerstoff vorliegt. In den Alveolen liegt Sauerstoff mit einem Druck von rund 100 mmHg und im venösen Blut mit rund 40 mmHg vor. Der Hauptteil des Sauerstoffes wird nun chemisch am Hämoglobin (Hb) gebunden und gelangt somit über das Herz in den großen Körperkreislauf, wo dann der Körper mit sauerstoffreichem Blut versorgt wird (18). Verstoffwechselt wird der Sauerstoff in den einzelnen Zellorganellen wie den Mitochondrien, den Peroxisomen und dem endoplasmatischen Retikulum (14). Gleichzeitig wird CO₂, das ständig als Stoffwechselprodukt der Zellen anfällt, zu den Kapillaren transportiert, wo es wiederum durch Diffusion, dieses Mal jedoch in die andere Richtung, ins Blut gelangt. Schlussendlich verlässt CO₂ über die Lunge als Bestandteil der Luft, die wir abatmen, den menschlichen Organismus (18).

Die Sauerstoffsättigung ist direkt abhängig vom Sauerstoffpartialdruck, der im arteriellen Gefäßsystem vorherrscht. Prinzipiell herrscht bei einem gesunden Menschen in den Alveolen ein Sauerstoffpartialdruck zwischen 90 und 100 mmHg. Die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins beträgt rund 95 %. Ein weiterer minimaler Bruchteil von Sauerstoff liegt gelöst im Blutplasma vor.

Bemerkenswerterweise ist Hämoglobin sogar bei einem Abfall des Sauerstoffpartialdrucks innerhalb der Alveolen auf rund 60 mmHg immer noch zu 90 % mit Sauerstoff gesättigt. Selbst unter diesen Bedingungen ist somit eine ausreichend hohe Sauerstoffversorgung gewährleistet. Dieses Phänomen lässt sich anhand der Sauerstoffbindungskurve erklären (19).

Wirkung von HBO

Gemäß der Definition der Undersea and Hyperbaric Medical Society handelt es sich bei HBO um eine Behandlung, bei der Patienten reinen Sauerstoff, also 100%-igen Sauerstoff, in einer Umgebung einatmen, die mehr als eine absolute Atmosphäre (ATA) Umgebungsdruck aufweist (20).

Die medizinische Anwendung von HBO basiert im Grunde auf zweierlei Ansätzen. Einerseits stellen eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks und andererseits mechanische Effekte, wie beispielsweise die Verringerung von Gasblasen, wesentliche Bestandteile für die Wirkung dieser Therapie dar.

Drücke, die höher sind als normale Partialdrücke, ermöglichen Sauerstoff Eigenschaften, die einem Medikament nahe kommen und somit spezifische Anwendungsgebiete und Nebenwirkungen umfassen, welche später etwas näher erläutert werden (16).

Wie bereits vorher erwähnt, liegt Sauerstoff zu 95 % an Hämoglobin gebunden und nur zu einem geringen Prozentsatz frei im Plasma vor. Unter hyperbaren Bedingungen wird zusätzlich eine erhöhte physikalische Lösung von Sauerstoff im Plasma erzielt. Dies ist deshalb der Fall, da die physikalische Lösung von O₂ schneller abläuft, als die chemische Bindung an Hämoglobin (18).

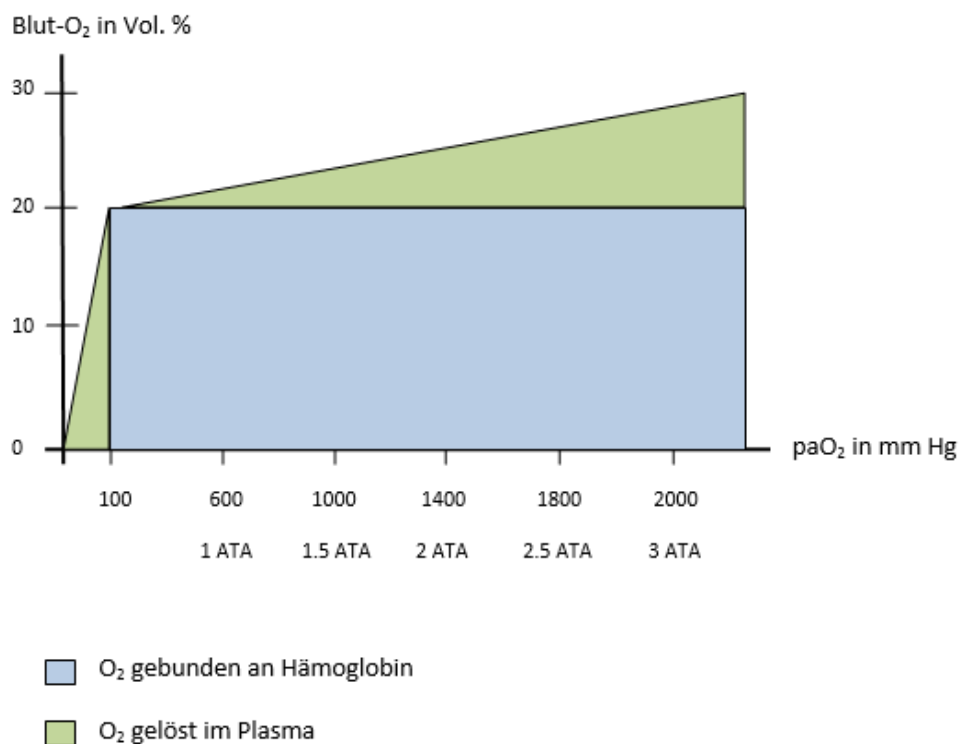


Abbildung 14 O₂-Aufnahmekurve unter HBO Therapie. Modifiziert nach (18).

In Abbildung 16 ist der direkte Zusammenhang zwischen physikalisch gelöstem O₂ und dem vorliegenden Umgebungsdruck ersichtlich. Die Bindung an Hämoglobin bleibt unabhängig vom Druck gleich (18).

Auf Meereshöhe beträgt die Sauerstoffkonzentration im Blutplasma circa 3 mL/L (21). Atmet man hier nun 100 %-igen Sauerstoff ein, so erreicht man eine physikalische

Sauerstoffbeladung im Plasma von rund 15 mL/L (22). Macht man sich nun das physikalische Gesetz von Henry zu Nutze und bindet eine weitere physikalische Größe, nämlich den Druck, mit ein, so hat man die Wirkung der HBO (23). Mit zunehmendem Druck und Atmung von 100 %-igem Sauerstoff erzielt man eine überdurchschnittliche Anreicherung des Plasmas und erreicht bei 3 ATA nahezu 60 mL/L Blutplasma (21). Folglich kann der Sauerstoff unabhängig von Hämoglobin die Zellen passieren und ermöglicht eine bessere Oxygenierung des Gewebes. Dies ist auch der Grund warum HBO eine Indikation für Kohlenmonoxid Vergiftungen oder schwere Anämien darstellt (23). Des Weiteren bewirkt HBO eine verbesserte Wundheilung von ischämischen oder Ischämie gefährdeten Wunden. Dies ist deshalb der Fall, da Sauerstoff, wie früher bereits beschrieben, unabhängig von Hämoglobin diffundieren kann und somit gleichzeitig auch ein Überangebot an Sauerstoff vorliegt. Zusätzlich bewirkt Sauerstoff eine Anregung der Angiogenese und fördert die Bildung von Kollagenen, die sauerstoffabhängig ist (23,24).

Eine Konsequenz, die HBO durch die 100 %-ige Sättigung von Hämoglobin mit O₂ im venösen Schenkel nach sich zieht, ist, dass Hämoglobin folglich keine Bindungsmöglichkeit für CO₂ zum Abtransport hat. Da CO₂ im Gegensatz zu O₂ jedoch eine höhere Löslichkeit besitzt, verursacht dies nur selten Probleme. Weil CO₂ unter anderem mittels Bikarbonat abgepuffert wird, kommt es lediglich zu einer leichten Veränderung des pH Wertes in Richtung Azidose (16).

Generell existieren, wie bei jeder medizinischen Maßnahme, Indikationen sowie Kontraindikationen und mögliche Nebenwirkungen bzw. Komplikationen (14). In der Literatur findet man zahlreiche, beinahe unüberschaubare Indikationen für die Anwendung einer HBO. In nachstehender Tabelle wurden die wichtigsten Indikationen nach der Undersea and Hyperbaric Medical Society, die seit 2014 gültig sind, herangezogen und zusammengefasst (25).

Im Zuge dieser Arbeit wird aufgrund des vorliegenden Case Reports nur auf die Behandlung von Luft- bzw. Gasembolien näher eingegangen.

Indikationen:

Luft- oder Gasembolien
Kohlenmonoxid Vergiftungen
Gasbrand
Kompartmentsyndrom, Rissquetschwunden oder andere akute traumatisch Ischämien
Dekompressionskrankheit
Arterielle Unzulänglichkeiten
Schwere Anämien
Intrakranielle Abszesse
Nekrotisierende Weichteilinfektionen
Osteomyelitis
Verzögerte Schäden durch Bestrahlung
Problemwunden zur verbesserten Wundheilung
Gefährdete Hauttransplantate
Thermische Verbrennungen
Idiopathischer Hörsturz

Tabelle 5 Die wichtigsten Indikationen einer HBO Therapie. Modifiziert nach (25).

Wasserstoffperoxid:

Wie in Tabelle 5 ersichtlich, ist das Vorliegen einer Luft- oder Gasembolie als eine Indikation für HBO zu werten. Im später folgenden Case Report wurde jener junge Mann, der in suizidaler Absicht circa 100 ml 30 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung getrunken hat und in weiterer Folge Lufteinschlüsse in der Leber sowie in der Pfortader entwickelte, mittels HBO therapiert.

Wasserstoffperoxid ist ein farb- und geruchloses Oxidationsmittel, das in einer sehr variablen Konzentration zwischen 3–30 % zur Anwendung kommt. Abhängig von der vorliegenden Konzentration entfaltet es auch eine unterschiedliche Wirkung. In geringen Konzentrationen (3–6 %) dient Wasserstoffperoxid als Allzweck-Desinfektionsmittel sowie zur Sterilisation von medizinischen Instrumenten. Es ist somit in vielen Haushalten zu finden. In höheren Konzentrationen (33–35 %) dient es vor allem als Bleichmittel. Daher ist es ein wesentlicher Bestandteil von Haarfärbemittel und kommt auch im Rahmen einer

Bleichung der Zähne zur Anwendung. Die Toxizität von Wasserstoffperoxid hat drei Hauptmechanismen. H_2O_2 bedingt Korrosionsschäden, Sauerstoffgasbildung und Lipidperoxidation (26-28).

Verschluckt man hochprozentiges Wasserstoffperoxid, so kann es zu Erosionen und Ulzerationen bis hin zu Perforationen führen. Das sogenannte „snow white sign“ beschreibt weißliche Schleimhautveränderungen, die durch Wasserstoffperoxid-Ingestion entstehen können. In der Literatur existieren zahlreiche Beschreibungen, bei denen das „snow white sign“ im Rahmen von Colonoskopien oder Gastroskopien beobachtet werden konnte. Der Grund dafür ist, dass früher zur Sterilisation von Endoskopiegeräten häufig Wasserstoffperoxid (meist 3 %-iges H_2O_2) verwendet wurde (28).

Durch eine Ingestion kann es mitunter auch zu Übelkeit, Erbrechen, bei ausgeprägten Verletzungen sogar zu Hämatemesis und gastrointestinaler Schaumbildung kommen. Des Weiteren besteht die große Gefahr einer Aspiration oder Inhalation des Oxidationsmittels, wodurch es zu einer schweren Reizung und Entzündung der Atemwege kommen kann. Je nach Ausmaß können die Symptome vom einfachen Husten angefangen bis hin zu einer akuten Atemnot oder zur Ausbildung eines Laryngospasmus reichen. Letzterer würde folglich ein lebensbedrohliches Zustandsbild beschreiben und weitere Maßnahmen wie eine Sicherung der Atemwege erforderlich machen.

Eine weitere Gefahr liefert die Reaktion, welche durch die Katalase verursacht wird. Die Katalase spaltet Wasserstoffperoxid sehr rasch in Wasser und Sauerstoff auf, wodurch es zu einer massiven Ansammlung von Sauerstoff in Organen oder Gefäßen kommt. Folglich wird in der Literatur immer wieder über venöse oder auch arterielle Gasembolien wie etwa Hirninfarkte, Embolien im Pfortadersystem, akut aufgetretene Myokardinfarkte und auch Pneumomediastini berichtet (26–28).

Obwohl eine Intoxikation mit dieser potentiell hoch toxischen Substanz nicht selten ist, sind Todesfälle aufgrund einer Ingestion von Wasserstoffperoxid trotzdem eher rar (29).

In der Literatur existieren mehrere Fälle von H_2O_2 Ingestionen sowie zahlreiche Übersichtsarbeiten, die alle die Entwicklung einer portalen sowie cerebralen Embolie beschreiben. In allen angeführten Studien wird bei Patienten mit einer vorliegenden Embolie, sei dies mit oder auch ohne entsprechender Klinik, eine Therapie mit HBO dringend empfohlen, da dadurch laut Literatur eine frühzeitige Verbesserung sowie Genesung erzielt werden kann (30–36).

Kontraindikationen:

Wie in Tabelle 6 zusammengefasst, gibt es lediglich eine absolute Kontraindikation für die Durchführung einer HBO – der Pneumothorax. Alle anderen angeführten Punkte werden als relative Kontraindikationen gelistet, da man für besagte Situationen eine sorgfältige Abwägung nach dem Kosten-Nutzen-Prinzip durchführen sollte (18).

Absolute Kontraindikationen	Relative Kontraindikationen
Unbehandelter Pneumothorax	Respiratorische Infektionen der oberen Atemwege Emphysem mit CO ₂ Retention Status post thorakale Operationen Status post Operationen am Ohr Hohes Fieber Schwangerschaft Klaustrophobie Asymptomatische pulmonale Läsionen Anfallsleiden

Tabelle 6 Absolute und relative Kontraindikationen für eine HBO Therapie. Modifiziert nach (18).

Komplikationen:

Zu den häufigen Nebenwirkungen oder Komplikationen zählt das Barotrauma im Ohr. Dieses tritt vor allem gehäuft im Rahmen des Abtauchens, also in der Phase in der der Umgebungsdruck erhöht wird, auf. Vereinfacht dargestellt besitzt das menschliche Ohr eine Röhre, die sogenannte eustachische Röhre. Diese verbindet den Nasenrachenraum mit dem Mittelohr durch schlitzförmige Öffnungen und ist für den Druckausgleich im Ohr zuständig. Je tiefer der Patient taucht, desto näher werden die schlitzförmigen Öffnungen aneinander gedrückt. Ein Druckausgleich ist unter Umständen durch aktives Schlucken, Gähnen oder ein Valsalva-Manöver meist noch möglich. Gelingt dies jedoch nicht mehr, sollte man den Druck in der Druckkammer wieder langsam dem Umgebungsdruck anpassen und den Tauchgang beenden. Wenn dies nicht erfolgt, kann es zu traumatischen Veränderungen im Bereich des Trommelfells kommen.

Je nach vorliegendem Druck sowie Dauer lassen sich unterschiedliche Auswirkungen am Trommelfell erkennen (16,18).

Nach Kindwall E.P. und Whelan H.T. werden 4 Stadien des Barotrauma des Ohres unterschieden:

- Stadium 1: Am Trommelfell ist ein Erythem rund um den Malleus sichtbar
- Stadium 2: Das Erythem hat sich auf das gesamte Trommelfell ausgebreitet
- Stadium 3: Hellrote Einblutungen ins Trommelfell sind sichtbar
- Stadium 4: Dunkelblaue bis schwarze Stellen welche auf ein blutgefülltes Mittelohr hinweisen. Das Trommelfell kann, muss aber nicht rupturiert sein (16).

Bei jenen Patienten, die, aus welchem Grund auch immer, keinen selbstständigen Druckausgleich durchführen können, sollte somit, um die vorhin erwähnte Komplikation zu vermeiden, die Anlage einer Paukendrainage überdacht werden (37).

Die Sinusoide sind im Zusammenhang mit einer HBO oft ein limitierender Faktor. Insbesondere Krankheiten, die eine physiologische Belüftung der Sinusoide verhindern, können zu Komplikationen führen. Durch den erhöhten Umgebungsdruck kann es, ähnlich wie beim Ohr, zu einer Kompression, gefolgt von Schmerzen unterschiedlichen Ausmaßes kommen (16,18).

Eine reversible Folge, die im Zusammenhang mit oft wiederholten HBO Sitzungen auftreten kann, ist eine temporäre Verschlechterung des Visus in Form einer Myopie. Andererseits wird paradoxerweise auch über eine Verbesserung der Presbyopie berichtet. Die Myopie scheint jedoch auch nur temporär vorzuliegen und sich nach circa sechs Wochen wieder zu legen (16).

Die wohl schwerwiegendste Komplikation der HBO ist das Barotrauma der Lunge. Dies kann sich als Embolie, Mediastinalemphysem oder Spannungspneumothorax präsentieren und weitreichende Konsequenzen nach sich ziehen (18). Neben den oft fehlenden typischen klinischen Zeichen eines Pneumothorax, ist in der Druckkammer durch die Umgebungsgeräusche oftmals die Auskultation der Lungen erschwert und die Zeichen einer Zyanose nicht sichtbar. Sollte ein Pneumothorax vorliegen, muss umgehend eine Dekompression mittels Thorakozentese durchgeführt werden, um eine obere Einflusstauung und deren weitreichenden Folgen zu verhindern. Diese Komplikation ist der Grund, weshalb in jeder Tauchkabine ein Thorakozentese-Set vorhanden sein sollte (16).

Da die HBO mitunter in Kammern von geringer Größe durchgeführt wird, ist es naheliegend, dass Klaustrophobie ein weiterer Grund für eine erschwerte oder nicht mögliche Durchführung der Therapie darstellt (16,18).

HBO und oxidativer Stress

HBO kommt bei verschiedensten Krankheitsbildern zum Einsatz. Narkowics et al. berichteten jedoch, dass es durch die Einatmung von 100 %-igem Sauerstoff unter erhöhtem Umgebungsdruck zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen und folglich zu einer Bildung von ROS kommt (38). In der Studie von Speit et al. sowie Dennog et al. wurde vor allem über die Folgen in Form von Mutationen der menschlichen DNA berichtet. Untersuchungen an gesunden Probanden, die sich täglich einer HBO unterzogen haben, haben gezeigt, dass die Schäden an der DNA nur nach dem ersten Tauchgang beobachtet werden konnten. In den folgenden Anwendungen konnten keine zusätzlichen DNA-Schäden detektiert werden. Die Autoren kamen daher zum Entschluss, dass vor allem die erste Sitzung gefährlich für die DNA sein dürfte (39,40).

Parameterveränderung nach ausgedehnter HBO:

Benedetti et al. untersuchten ebenfalls, wie sich eine ausgedehnte HBO Therapie auf das oxidative Stress Level auswirkt. Hierzu wurden zwölf Patienten 15 Zyklen einer HBO unterzogen, wobei täglich eine Sitzung durchgeführt wurde. Den Probanden wurde jeweils nach der 1. sowie nach der 15. HBO-Einheit Blut abgenommen und dabei die Bestimmung der oxidativen Stressparameter durchgeführt. Gemessen wurden oxidativ reaktive Metaboliten/ROS, Malondialdehyd, Glutathion, α -Tocopherol, Retinol sowie Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathionperoxidase (41). Bereits nach der ersten HBO war ein leichter Anstieg des oxidativen Stresslevels messbar. Die Messwerte nach der letzten Einheit boten deutlich erhöhte Werte. Erklärt wurde dies dadurch, dass eine ausgeprägte HBO Therapie zu einer Akkumulation der oxidativ reaktiven Metaboliten führt, der die antioxidativ wirkenden Substanzen nicht genug entgegen wirken können. Dieser Erkenntnis nach würde man sich im Laufe der Therapie einen signifikanten Abfall der α -Tocopherol- und Retinolplasmaspiegel erwarten. Interessanterweise waren diese jedoch nahezu gleichbleibend. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, dass der Körper durch die Anforderungen an Antioxidantien mittels Mobilisierung aller Antioxidantien-Speicher reagiert (41).

Parameter, welche bereits nach der ersten HBO Therapie durch die vermehrte Ansammlung von Radikalen reagierten, waren die Katalase und die GPx. Auch in dieser Studie wurde das bereits von Escobar et al. demonstrierte Phänomen der Inaktivierung von Superoxid-Dismutase und Katalase durch Singlett Sauerstoff und Lipid Peroxid Radikale ab einer bestimmten Konzentration beobachtet. Genauer gesagt wurde im Vergleich zur ersten Messung nach der 15. Einheit eine bis zu 20 %-ige Reduktion von Superoxid-Dismutase und Katalase nachgewiesen (9).

Auch Dennog et al. beschäftigten sich mit dieser Thematik und untersuchten die antioxidative Reaktion des Körpers auf eine HBO. Sie analysierten den antioxidativen Status vor und 24 Stunden nach einer HBO. Die Untersuchungen kamen zum Ergebnis, dass der menschliche Körper über gute Adaptationsmechanismen, gegen die bei einer einzelnen HBO Therapie entstehenden Oxidantien, verfügt. Dies konnte auch in der Blutanalyse bestätigt werden. Den Autoren zufolge dürfte der Körper zumindest bei einer einmaligen HBO Sitzung auch gut gegen Wasserstoffperoxid verursachte DNA Schädigung geschützt sein. Des Weiteren untersuchten sie die Wirkung von substituierten Antioxidantien und beobachteten, dass es keine suffiziente Schutzwirkung gegenüber einer HBO-induzierten DNA Schädigung gibt (42).

2 Allgemeine Ansatzpunkte für Messmethoden des oxidativen Stress

Oxidativer Stress ist, wie bereits früher in der Arbeit beschrieben wurde, eine Dysbalance zwischen Oxidantien und Antioxidantien, wobei das Gleichgewicht zugunsten der Oxidantien verschoben ist. Da freie Radikale in der Entstehung von Krankheiten, insbesondere im Bereich der Karzinogenese, sowie auch im Alterungsprozess beteiligt sind, wäre es umso wichtiger, ein geeignetes Verfahren für das Ausmaß des vorhandenen Stresslevels oder der bereits im Körper stattgefundenen Veränderungen zu finden.

Freie Radikale sind nur sehr schwer direkt nachweisbar, da sie eine hohe Reaktionsfreudigkeit besitzen (10,13,47). Die hierfür notwendigen Messverfahren sind daher sehr teuer und hochkomplex. Misst man jedoch die Auswirkungen, welche ROS nach sich ziehen, hat man eine Methode, die einen indirekten Rückschluss auf die vorliegende Belastung zulässt (5).

2.1 Direkte Messmethoden für den oxidativen Stress Status

Die direkten Messmethoden finden im Alltag nur sehr selten ihre Anwendung. Gründe dafür sind, dass diese Messmethoden sehr zeitaufwendig und teuer sind. Daher werden die möglichen Messungen der Vollständigkeit halber zwar aufgelistet, aber nicht im Detail darauf eingegangen.

- Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR)
- Radiolyse
- Laser-Flash-Photolyse
- Chemolumineszenz Methoden
- Radioimmunoassay
- Biopsien (5).

2.2 Indirekte Ansätze für Messmethoden des oxidativen Stress Status

Bei den indirekten Messmethoden gibt es drei verschiedene Ansätze. Einerseits kommt es durch das Vorliegen von ROS in einer erhöhten Konzentration und Dauer zu Veränderungen verschiedener Biomoleküle. Es folgt eine Oxidation von Proteinen, Lipiden und/oder DNA-

Basen sowie Kohlenhydraten (2,5,46). Somit lässt ein Nachweis dieser veränderten Moleküle einen direkten Rückschluss auf den oxidativen Stress Status zu.

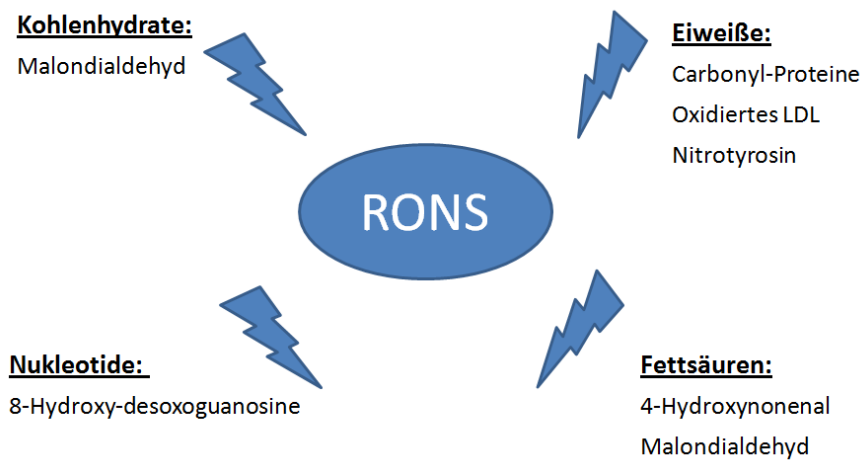


Abbildung 15 Veränderungen an Biomolekülen durch RONS.

Den zweiten Ansatz der indirekten Messmethode liefert die Konzentrationsbestimmung von antioxidativ wirksamen Substanzen, wie zum Beispiel Vitamin C, Vitamin E und Gluthation. Die dritte Möglichkeit einer indirekten Messvariante ist die Analyse der antioxidativ wirksamen Enzyme. Hierzu zählen die Superoxiddismutase (SOD), Gluthationperoxidase (GPx), Catalase (CAT) und die Gluthation-Reduktase (2,5).

2.2.1 Glutathionperoxidase GPx

Das Glutathion ist ein atypisches Tripeptid, das aus den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin besteht. An der Cysteingruppe befindet sich die bekannte Thiol-Gruppe. Es ist ein Reduktionsmittel und zählt somit zu den Antioxidantien (5,10). Die Hauptlokalisierung von Glutathion im Blut ist innerhalb der Erythrozyten. Grundsätzlich kann es in jeder Zelle, also intrazellulär, aber auch extrazellulär, wie z.B. im Serum seiner Funktion als Antioxidans nachgehen. Vollzieht Glutathion seine Aufgabe als Reduktionsmittel, so sind immer zwei Glutathion Moleküle nötig. Bei der Reduktion geben die beiden Moleküle jeweils ihren Wasserstoff ab, werden somit selbst oxidiert und gehen gemeinsam eine Verbindung ein. Hierbei entsteht ein Glutathion-Disulfid, das durch das Enzym Glutathionperoxidase katalysiert wird (5,10). Des Weiteren kann die GPx durch Reduktion auch noch H_2O_2 zu H_2O überführen und so das gefährliche Zelltoxin unschädlich machen (10).

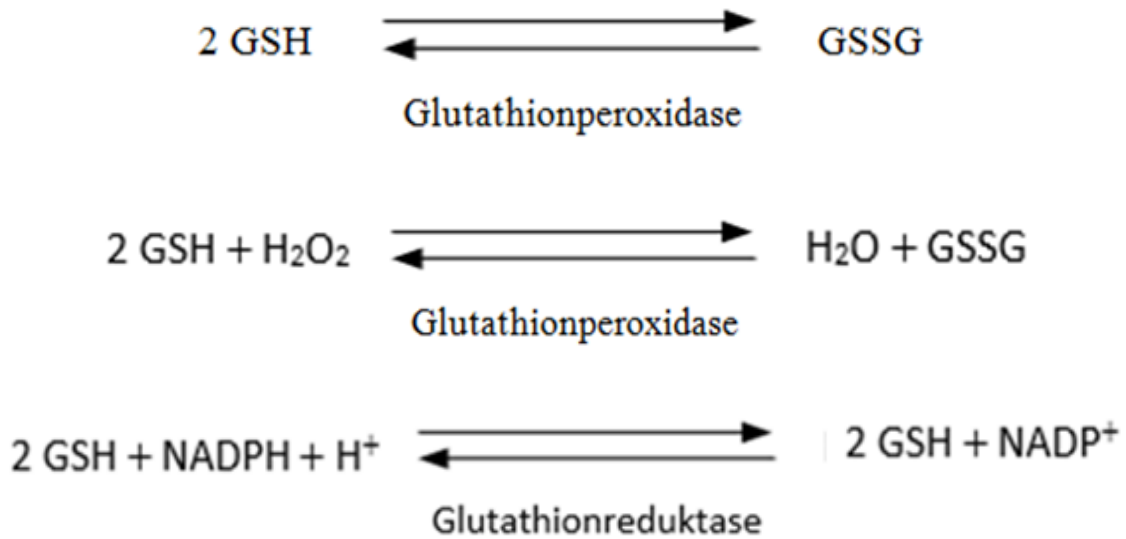


Abbildung 16 Reduktionsmöglichkeiten von Glutathion. Modifiziert nach (10).

Regeneriert wird Glutathion-Disulfid durch die Glutathion-Reduktase, wobei das NADPH + H⁺ als Coenzym und somit auch als Elektronenspender fungiert (Abbildung 20).

Die Hauptaufgabe von Glutathion ist es, Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für den Körper unschädlich zu machen. Da nun überall dort wo Sauerstoff vorhanden ist, freie Radikale entstehen können, sind vor allem die Erythrozyten, welche für den Sauerstofftransport im Körper verantwortlich sind, davon sehr gefährdet (5,10). In Abbildung 21 soll dies an einem Beispiel verständlich gemacht werden.

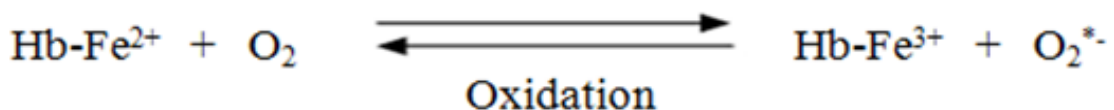


Abbildung 17 Oxidation von Hb-Fe²⁺ zu Eisen(III)-Hämoglobin (Methämoglobin) und Superoxidanionradikal. Modifiziert nach (10).

Valko et al. propagieren, dass das Verhältnis zwischen GSH/GSSG ein gutes Maß zur Erhebung des oxidativen Stress im menschlichen Körper darstellt (2). Glutathion spielt eine zentrale und sehr vielseitige Rolle im Zusammenhang mit der Genese von oxidativem Stress. Zum einen dient Glutathion als Co-Faktor für viele Enzyme, die für Reparaturvorgänge oder Abbauarbeiten von freien Radikalen zuständig sind, andererseits ist GSH auch am Transport von Aminosäuren durch die Plasmamembran beteiligt. Des Weiteren ist GSH bei der Beseitigung und Entgiftung von Hydroxyl-Radikalen und H₂O₂ beteiligt, indem sie diese in unschädliche Einzelbestandteile umwandelt. Eine weitere protektive Funktion ergibt sich

aus der Überführung der wichtigen Antioxidantien Vitamin C und Vitamin E in ihre aktive Form (2,5).

2.2.2 Superoxid-Dismutase (SOD)

Das Superoxidanionradikal ist ein sehr reaktives und daher schädliches Molekül. Es entsteht durch die Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff (siehe Abbildung 21).

Wie in Abbildung 18 gezeigt, wird das hierbei entstandene Radikal, das sogenannte Superoxidanionradikal, mit Hilfe der Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid umgewandelt (11). Die SOD ist eines der effektivsten, intrazellulär gelegenen, antioxidativ wirksamen Enzyme (1).

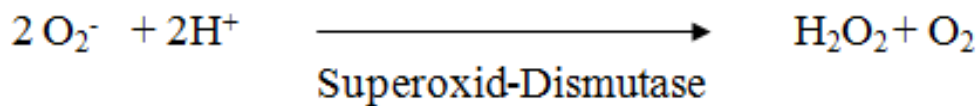


Abbildung 18 Superoxid-Dismutase. Modifiziert nach (11).

H₂O₂ ist eine sehr schwache Säure, die bei vielen verschiedenen Reaktionen innerhalb von Zellen entsteht. Entsorgt wird das nun angefallene Wasserstoffperoxid durch die Glutathionperoxidase, die bereits weiter oben beschrieben wurde, oder durch die Katalase (5,10).

2.2.3 Katalase

Die Katalase ist vor allem intrazellulär, wie beispielsweise innerhalb der Erythrozyten und insbesondere in den Peroxisomen lokalisiert, kommt jedoch auch in allen anderen Zellen des Körpers vor, und vollzieht hier die wichtige Aufgabe des Abbaus des Zelltoxins Wasserstoffperoxid. Es wird durch die Katalase in Wasser und Sauerstoff übergeführt (7,10).

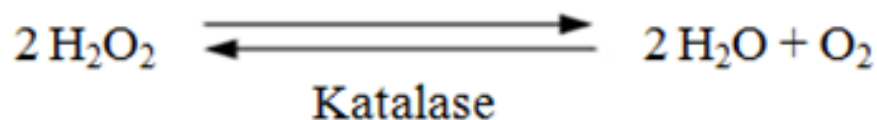


Abbildung 19 Wie H₂O₂ durch die Katalase verändert wird. Modifiziert nach (10).

Die Katalase weist eine extrem hohe Aktivitätsrate auf. Valko et al. geben in ihrer Arbeit an, dass allein ein Molekül Katalase innerhalb einer Minute rund sechs Millionen Moleküle Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umwandeln kann. Dieser Zusammenhang ist

insofern medizinisch interessant, da bei malignen Erkrankungen die Katalase quantitativ als auch qualitativ abnimmt und somit auch ein wichtiger regulativer Mechanismus zur Entsorgung von Wasserstoffperoxid entfällt (1).

2.2.4 Vitamin C - die L-Ascorbinsäure

Vitamin C, auch als Ascorbinsäure bekannt, zählt zu den wasserlöslichen Vitaminen und ist ein starkes Reduktionsmittel. Seine Aufgabe als Antioxidans erfüllt es, indem es zusammen mit Dehydro-Ascorbinsäure ein Redoxpaar bildet und so die Zellmembran vor freien Radikalen schützt. Des Weiteren bewirkt die Ascorbinsäure die Reduktion von Tocochinon zu Tocopherol und regeneriert somit verbrauchtes Vitamin E (10).

Eigentlich wäre es anzunehmen, dass eine tägliche Zufuhr von Vitamin C einen positiven Effekt auf den antioxidativen Status nach sich zieht. In zahlreichen Untersuchungen konnten jedoch keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen werden. Interessanterweise wird jedoch erwähnt, dass bei Hochrisikopatienten ein niedriger Serum Vitamin C Spiegel im Zusammenhang mit der Entstehung von Magenmetaplasien und chronischer Gastritis steht (1).

2.2.5 Vitamin E - Tocopherol

Vitamin E zählt neben Vitamin A, D und K zu den fettlöslichen Vitaminen. Es ist in den Membranen sowie in den Lipoproteinen lokalisiert und dient als Oxidationsschutz für mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Wird eine Fettsäure von einem freien Radikal oxidiert, verliert diese ein H-Atom und es entsteht ein Lipidradikal. Durch eine weitere Bindung mit einem O₂ Molekül kann sich dieses Lipidradikal zu einem hochreaktiven Lipidperoxyl-Radikal entwickeln. Lipidperoxyl-Radikale greifen Zellmembranen an und können diese auch zerstören. Indem es sein H-Atom auf das Lipidperoxyl-Radikal überträgt, fungiert Tocopherol als ein wichtiges Antioxidans (10). Vitamin E zählt somit zu jenen Substanzen, die die Atherosklerose, eine krankhafte Ablagerung von oxidierten Fettsäuren, die in Folge zu Herzinfarkten oder Schlaganfällen führen kann, wirksam verhindern können (11).

Durch diesen antioxidativ wirkenden Vorgang wird Tocopherol selbst oxidiert und zu einem Vitamin-E-Radikal. Wie bereits früher erwähnt, hat nun Vitamin C die Aufgabe, das Vitamin E zu regenerieren (10).

2.2.6 Messparameter, die sich durch Lipidperoxidation ergeben

Lipide bieten eine Vielzahl an Angriffspunkten für Oxidation. Die Oxidation von Fetten beginnt zum einen bereits beim Kochen, findet jedoch auch nach dem Verzehr im Gastrointestinaltrakt statt. Zum anderen können bereits oxidierte Fette ihren Prozess der Oxidation im Körper weiter fortführen. Die aufgenommenen Fettsäuren, die im Blutkreislauf zirkulieren, sind ebenfalls weitere potentielle Ziele für eine Oxidation (5).

Die Membran der menschlichen Zellen besteht, abhängig von der Funktion der jeweiligen Zelle, in unterschiedlicher Zusammensetzung aus Proteinen und Lipiden. Ein Effekt, der durch die Lipidperoxidation hervorgerufen wird, ist die Herabsetzung der Membranfluidität. Durch diese Veränderung der Membranbeschaffenheit werden die Membranlücken größer und durchgängiger für jene Substanzen, welche normalerweise nicht durch die Membran hindurchkommen sollten. Hierzu zählt beispielsweise H_2O_2 . Durch diese Veränderung an der Membran werden nun mitunter Membranproteine zerstört, Rezeptoren inaktiviert, Enzyme sowie Transportproteine verändert oder im schlimmsten Fall sogar völlig funktionsunfähig gemacht (5).

Die Endprodukte der Lipidperoxidation sind bei vielen Krankheiten des Menschen erhöht. Jene Parameter, die durch die Oxidation von Lipiden entstehen und als Messparameter herangezogen werden, sind beispielsweise oxidiertes LDL (oxLDL) und Malondialdehyd (MDA) (43). Eine mögliche Messmethode, die auch im vorliegenden Case Report zur Erhebung dieser Parameter durchgeführt wurde, wird im nächsten Kapitel näher beschrieben.

2.2.7 Messparameter, die sich durch die Modifikation von Proteinen ergeben

Eine Oxidative Schädigung von Proteinen kann sich in Form von funktionsunfähigen Rezeptoren, fehlgebildeten Antikörpern, Enzymen, Transportproteinen und/oder auch Strukturproteinen äußern. Leider bleibt dieser Prozess nur sehr selten bei einem einzigen Protein stehen. Es entsteht häufig eine folgenschwere Kettenreaktion. Weitere Proteine können dadurch beeinflusst werden oder gar Enzyme, die für die Reparaturmechanismen oxidativ geschädigter DNA benötigt werden, können in ihrer Funktion gestört werden. Proteinschädigung kann zum einen direkt durch freie Radikale passieren, wobei hier vor allem OH^* als reaktivstes Radikal interagiert, und zum anderen auch indirekt erfolgen. Zu den indirekten Verursachern der Oxidation zählen beispielsweise die Endprodukte der Lipidperoxidation. Hier sind als wichtige Vertreter die MDA und HNE zu nennen (5).

Freie Radikale führen somit zu einer Veränderung von Proteinen, die dadurch ihre Form und Funktion verlieren und daher ihre ursprüngliche Stoffwechselregulation nicht mehr ausführen können. Durch die Einwirkung von RONS entstehen Carbonylproteine (CP) sowie Nitro-Tyrosin-Proteine (NTP) und oxidiertes LDL (oxLDL). Krankheiten, welche mit erhöhtem Level von oxidativ geschädigten Proteinen in Verbindung gebracht werden, sind beispielsweise Multiple Sklerose, Autoimmunerkrankungen, Malignome oder auch eine Herzinsuffizienz (5,43).

2.2.8 Messparameter, die sich durch oxidative DNA- bzw. RNA-Schädigung ergeben

Schätzungen zufolge durchläuft die menschliche Erbsubstanz rund 10^4 spontane chemische Veränderungen pro Tag. Freie Radikale und RONS können die Erbsubstanz durch direkte als auch durch indirekte Effekte beeinflussen und zu Veränderungen beitragen, die weitreichende Konsequenzen nach sich ziehen können (5). Eine Vielzahl von DNA- oder RNA-Schäden sowie Modifikationen beeinflussen den physiologischen Ablauf der Zellreplikation, die Signaltransduktion sowie die Transkription und haben Zellalterung, Mutationen und in weiterer Folge eine Karzinomentstehung als Konsequenz. Beckman et al. gaben sogar an, dass allein eine menschliche Zelle in etwa $1,5 * 10^5$ ungeschützte Kontakte zu freien Radikalen oder RONS pro Tag hat, was demnach eine große Anzahl an Möglichkeiten für Modifikationen bietet (44).

ROS können zahlreiche Schädigungen an der DNA hervorrufen. Sie verursachen Einzel- oder Doppelstrangbrüche, die Modifikation oder Verlust von Purin- und/oder Pyrimidinbasen sowie der Desoxyribose. Auch die Endprodukte der Lipidperoxidation können eine Modifizierung der Erbsubstanz hervorrufen. Die daraus resultierenden Folgen können weitreichende Konsequenzen nach sich ziehen. Liegt eine Schädigung der DNA vor, so kommt es solange zu einem Stopp der Replikation bzw. Zellteilung, bis der Fehler aufgehoben wurde. Bei zu großer Schädigung wird ein programmierter Zelltod eingeleitet, der durch das Protein p53 ausgelöst wird. Nicht immer gelingt es der Zelle schnell genug die fehlerhaften Basen oder Zuckerreste zu reparieren. Dadurch kommt es zu einer noch größeren Anzahl an modifizierte-DNA Basen, welche sich fehlerhaft verbinden. Folglich entstehen Transitions-Mutationen, fehlerhafte Genexpression und fehlerhafte Proteine (5).

Der menschliche Körper besitzt Reparaturmechanismen, um diese Fehler der DNA auszubessern. Valko et al. beobachteten, dass sich auch die Effizienz dieser

Reparaturmechanismen in Gegenwart von oxidativem Stress vermindert, weil die regulativ wirkenden Reparatur-Enzyme modifiziert werden (1,2,8).

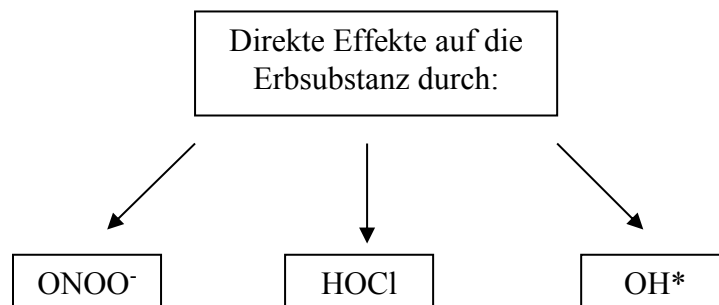


Abbildung 20 Direkte Effekte durch Peroxynitrit, Hypochlorit und Hydroxylradikal auf die Erbsubstanz. Modifiziert nach (5).

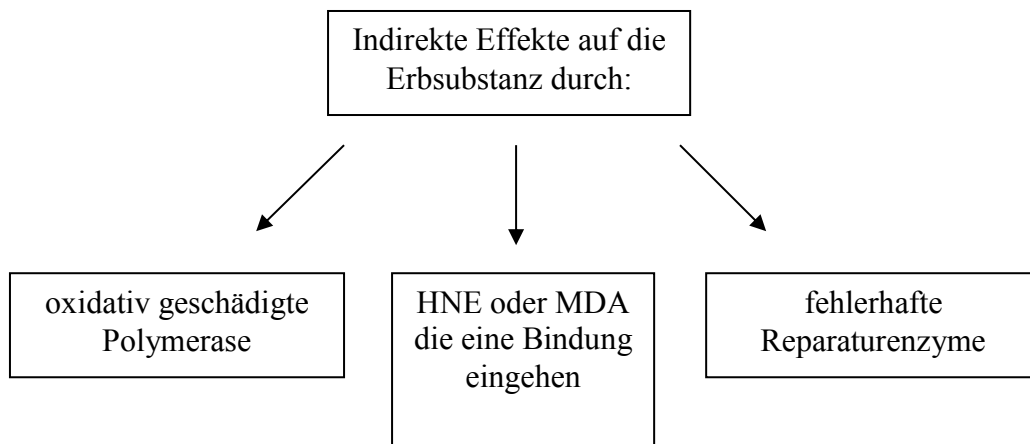


Abbildung 21 Substanzen welchen einen indirekten Effekt auf die Erbsubstanz ausüben können (5).

Ein Parameter, welcher sich aus der geschädigten DNA ergibt, ist 8-Hydroxydesoxoguanosin, kurz auch als 8-OHdG bezeichnet. Auch dieser Parameter wird im nächsten Kapitel näher beschreiben (1,2,8).

2.3 Oxidative Stressparameter

Da man die Auswirkungen der Oxidantien auf die kleinsten Bausteine unseres Körpers kennt, ist es auch wichtig, das Ausmaß der Belastung festzustellen. Hierzu wurden in den letzten Jahren Parameter propagiert, die eine Aussage über das Ausmaß der Belastung unseres Körpers erlauben sollen. Im folgenden Case Report wurden stellvertretend der Carbonylprotein-Wert, das atherogene LDL, das 8-Hydroxydesoxyguanosin, die Glutathionperoxidase Aktivität, der Malondialdehyd, der Totale oxidative Status und die Nitro-Tyrosin-Proteine zur Bestimmung der oxidativen Stresslage herangezogen.

3 Case Report

Der folgende Fall handelt von einem 17 Jahre alten männlichen Patienten, der nach eigenen Angaben um ca. 06:00 Uhr morgens in suizidaler Absicht etwa 100 ml 30 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung getrunken hat. Davor habe er reichlich Alkohol und acht Tabletten Amoxicillin eingenommen. Daraufhin klagte der Patient über abdominelle Schmerzen, Atemnot und berichtete zusätzlich über eine Schaumbildung im Mund. Aufgrund besagter Beschwerden verständigte er schließlich selbst die Rettung.

Erstversorgt wurde der Patient in einem peripher gelegenen Krankenhaus um ca. 10 Uhr. Zum Zeitpunkt der Akutbehandlung war der Patient nicht erweckbar und reagierte nicht auf Schmerzreize. Hämodynamisch war er jedoch stabil. Laut Aufzeichnungen habe keine Hämatemesis stattgefunden. Laborchemisch war ein Äthanolspiegel im Blut von 0.8 Promille zu erheben.

Die unmittelbar eingeleiteten Sofortmaßnahmen setzten sich aus einer Therapie mit einem Pantoloc Perfusor 40 mg/ 50 ml mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 5 ml/h, dem eine Bolusapplikation von Pantoloc 80 mg i.v. vorausgegangen war und einem erweiterten Monitoring der Vitalfunktionen zusammen.

Zur weiteren Abklärung erfolgte eine CT Untersuchung des Neurocraniums und des Thorax. Diese wurden später an der Universitätsklinik für Radiologie in Graz von den zuständigen Fachärzten befundet. In der durchgeführten Abdomensonographie wurden Luftblasen im Pfortadersystem diagnostiziert. Zeitgleich wurde Kontakt mit der Vergiftungszentrale in Wien aufgenommen. Deren Empfehlung zufolge war bei vorliegendem Erkrankungsbild, aufgrund der Gefahr einer Luftembolie, dringendst eine Therapie mittels HBO indiziert. Daher erfolgte eine unmittelbare Kontaktaufnahme mit der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendheilkunde sowie der Thoraxchirurgie des LKH Graz, um die beabsichtigte Überstellung zur HBO Therapie zu organisieren. Die Transferierung stellte sich in Anbetracht der zu dem Zeitpunkt vorherrschenden Schlechtwetterlage sehr aufwendig dar. Der eigentlich zuständige Rettungshubschrauber konnte nicht fliegen und auch ein bodengebundener Transport mittels Notarztwagen war nicht möglich bzw. hätte zu lange gedauert. Aufgrund der Notwendigkeit der Überstellung ins Landeskrankenhaus Graz und der nur dort vorhandenen HBO Therapiemöglichkeit, wurde ein Militärhubschrauber organisiert, der eigens für einen Patiententransport umgebaut werden musste. In der Zwischenzeit zeigte sich die Vigilanz des Patienten soweit gebessert, insofern dass dieser

wieder erweckbar war. Schließlich konnte der Patient um 15:35 Uhr wie geplant auf der Kinderintensivstation übernommen werden. Laut Notarzt verlief der Transport komplikationslos und der Patient habe die meiste Zeit geschlafen.

Nach Übernahme in die Ambulanz wurde ein ausführlicher Status durchgeführt. Der Patient präsentierte sich etwas verlangsamt, war aber ansprechbar und gab verzögerte, aber klare Antworten mit teilweise etwas verwaschener Sprache. Er war orientiert, hatte einen GCS von 15 und wies folgende stabile Vitalparameter auf: Sinusrhythmus, Herzfrequenz 80 Schläge/Minute, Blutdruck 128/69 mmHg. Atemnot wurde verneint. Es lag eine Sauerstoffsättigung von 99 % bei Raumluft vor und beide Lungen wiesen ein vesikuläres Atemgeräusch auf. Es zeigte sich eine periorale abgeblaste Haut, die Mundschleimhaut war geringgradig gerötet und hatte teilweise weißliche Verfärbungen („snow white sign“). Der restliche einsehbare Rachen war nur gering gerötet und es waren keine wesentlichen Schwellungen oder Blutungen sichtbar. Neurologisch waren keine Auffälligkeiten sowie keine fokalen neurologischen Defizite erfassbar. Die Pupillen waren beidseits isokor und reagierten auf Licht direkt und indirekt prompt.

Des Weiteren wurde auch ein Drogenschnelltest durchgeführt, welcher ein positives Ergebnis auf Tetrahydrocannabinol (THC) lieferte. Weitere relevante Laborwerte sind in der nachfolgenden Tabelle angeführt.

Aufnahmelabor am Universitätsklinikum Graz:

Leistung	Ergebnis	Einheit	Referenzwert
Äthanolspiegel	0.02 Promille		
Drogenschnelltest	THC positiv		
Blutgasanalyse arteriell	pH 7.42	-	7.370-7.450
	pO ₂ 86.8	mmHg	71.0-104.0
	pCO ₂ 36.4	mmHg	35.0-46.0
	Laktat 0.9	mmol/l	0.5-2.2
Hb-Derivate arteriell	ctHb 16.5	g/dl	13.0-17.5
	COHb 1.2	%	0.4-1.6
	MetHb 1.2	%	0.4-1.0
	Hkt 50.6	%	40.0-50.0
Leuko	11.13	G/l	4.4-11.3
Ery	5.41	T/l	4.50-5.90
Hb	16.6	g/dl	13.0-17.5
Hkt	45.4	%	40.0-50.0
Thrombo	243	G/l	140-440
Bili ges.	0.85	mg/dl	0.10-1.20
AP 37°C	85	U/l	40-130
GGT 37°C	73	U/l	-55
CHE 37°C	10210	U/l	4600-13000
AST 37°C	26	U/l	-35
ALT 37°C	33	U/l	-45
CRP	0.8	mg/l	-5.0

Tabelle 7 Relevante Laborergebnisse bei Aufnahme in Graz.

Das restliche Labor am Aufnahmetag sowie die restlichen Laborbefunde während des gesamten stationären Aufenthaltes zeigten ein stabiles unauffälliges Bild. Es wurde kein Anstieg der Entzündungsparameter, der Leber- oder Nierenfunktionsparameter sowie kein Abfall des roten Blutbildes verzeichnet. Die Blutgasanalysen waren im gesamten Verlauf unauffällig, die Elektrolyte waren durchwegs stabil und auch die Vitalparameter des Patienten waren stets ohne Auffälligkeiten.

Weiteres Prozedere:

Aufgrund der Luftansammlung im Leberparenchym und im Gefäßsystem wurde eine hyperbare Therapie an der Thoraxchirurgie durchgeführt. Präoperativ erfolgten zum Ausschluss einer Perforation eine diagnostische Ösophagogastrroduodenoskopie sowie eine Laryngotracheobronchoskopie. Des Weiteren wurde ein Röntgen des Thorax und des Abdomens angefertigt.

Bisherige Befunde:

Röntgen Thorax: Kein Infiltrat und kein Pleuraerguss nachweisbar

Röntgen Abdomen: Keine freie Luft sowie kein Ileuszeichen

Radiologischer Befund: CT Neurocranium und Thorax

Hierbei handelt es sich um eine Nachbefundung der auswertig durchgeführten Computertomographie. Da die Aufnahmen auf einer Compact Disc (CD) mitgegeben wurden und diese eine schlechte Bildqualität aufwiesen, wird der Befund seitens der Radiologie als diagnostisch nicht zuverlässig angesehen.

Das CT des Neurocraniums zeigt altersentsprechende Verhältnisse. Es liegt kein eindeutiger Hinweis auf größere intracranielle Luftansammlungen vor. Ferner sind keine Raumforderungen, Blutungen oder delinierte Infarktbezirke sichtbar und es besteht auch kein Hinweis auf Liquorzirkulationsstörungen. Die miterfassten Abschnitte des Nebenhöhlensystems sowie die ossären Strukturen sind ebenso unauffällig.

Im durchgeführten CT-Thorax sind die miterfassten cervikalen Abschnitte frei von peritrachealer sowie periösophagealer Luft. Im Thoraxabschnitt kann jedoch knapp oberhalb des Ösophagusdurchtritts durch das Zwerchfell abschnittsweise eine paraösophageale Luft mit letzter Sicherheit nicht ausgeschlossen werden. Ansonsten bestehen keine Auffälligkeiten des Mediastinums, es liegt kein Pneumothorax und auch kein Pneumomediastinum vor.

In den miterfassten Oberbauchabschnitten ist eine pathologische Luftansammlung sichtbar. Es handelt sich um eine rechts lateral, subdiaphragmal gelegene, streifige intrahepatische Gasansammlung. Anhand dieser Bildgebung kann jedoch nur sehr schlecht zwischen einer intraportalen Luft oder Luft in den peripheren Gallenwegen differenziert werden.

Diagnostische Ösophagoduodenoskopie und diagnostische Laryngotracheobronchoskopie:

Im Mund-Rachen-Raum sowie an der Wangenschleimhaut befinden sich oberflächliche Schleimhautbeläge. Der Larynx ist gerötet, die Stimmritze ist offen und die Stimmlippen selbst erscheinen unverändert. Die Schleimhaut der Epiglottis ist etwas gerötet, es ist jedoch keine stärkere Ödembildung sichtbar.

Die Trachea sowie die Bronchialabgänge sind frei durchgängig und geben keinen Hinweis für eine stattgefundene Aspiration.

In der Gastroskopie präsentieren sich entlang des gesamten Verlaufs des Ösophagus Schleimstraßen, jedoch sind keine wesentlichen Entzündungszeichen der Schleimhaut sichtbar. Im gesamten Magen (Fundus, Corpus und Antrum) sind fleckförmige Erosionsblutungen der Schleimhaut sichtbar, es zeigt sich jedoch kein Hinweis auf sichtbare Schleimhautablösungen sowie persistierende Blutungen. Die proximalen Duodenalabschnitte weisen ebenfalls Schleimhautschwellungen auf, welche bis zur Papille erkennbar sind. Distal der Papille ist die Schleimhaut wieder unauffällig und regelrecht.

Insgesamt gibt es keinen Hinweis für tiefe Ulzerationen.

HBO Therapie-Schema:

Nach Ausschluss einer Perforation bekam der Patient seine erste von insgesamt zwei HBO-Therapien. Der erste Tauchgang von 15 Metern (m) mit circa 1.5 bar erfolgte für eine Dauer von 65 Minuten und wurde noch am Tag des Ereignisses, circa 12 Stunden nach dem Vorfall, durchgeführt. Der zweite Tauchgang mit 15 m und ungefähr 1.5 bar erfolgte einen Tag später, wiederum für 65 Minuten. Beide Tauchgänge wurden vom Patienten gut toleriert und verliefen komplikationslos.

Wo im Rahmen der ersten sonographischen Kontrolle im PW-Doppler noch deutliche Lufteinschlüsse in beiden Leberlappen sowie in der Pfortader darstellbar waren, konnte bereits einen Tag später, also zwei Tage nach zweimaliger HBO, eine deutliche Verbesserung beobachtet werden. Im Leberparenchym waren nur mehr vereinzelte, peripher gelegene, Lufteinschlüsse sichtbar und auch im Gefäßsystem war nur mehr eine geringe Luftauslenkung erkennbar.

Nachdem sich der Patient im guten Allgemeinzustand mit stabilen Vitalparametern und ohne wesentliche Schmerzen präsentierte, wurde er, in Anbetracht des stattgefundenen Suizidversuchs, zur stationären Weiterbetreuung auf eine Kinder- und Jugendneuropsychiatrie transferiert.

Zur weiteren Nachsorge wurde eine Therapie mit Durotiv 2 x 40 mg per os für insgesamt vier Wochen sowie eine Kontrollendoskopie zur Reevaluierung der Schleimhautverhältnisse bzw. zum Ausschluss etwaiger narbiger Residuen im oberen Gastrointestinaltrakt und die sonographische Verlaufskontrolle der Leber und deren Portalgefäße empfohlen.

Da dieser Fall einerseits nicht alltäglich und das zugeführte Wasserstoffperoxid an sich eine relevante Substanz bei der Entstehung von oxidativem Stress ist, wurden im Rahmen der Betreuung des Patienten die relevanten Stressparameter für Studienzwecke mitbestimmt.

3.1 Erhobene oxidative Stressparameter

Analysiert wurden die oxidativen Stressparameter mit Hilfe von Testmethoden, welche von Firmen wie beispielsweise der Immundiagnostik AG angeboten werden. Diese bieten verschiedenste Testkits an, in denen alle benötigten Substanzen und Reagenzien beiliegend sind. Für die Bestimmungen der Parameter ist jeweils eine genaue Anleitung für die Durchführung des Tests, inklusive genauem Ablauf und Testbedingungen, beiliegend. Das Einhalten der einzelnen Arbeitsschritte, Inkubationszeiten sowie Pipettiervolumina und Temperaturen sind essentiell, da jede Abweichung zu falschen Testergebnissen führen kann. Zudem liegen allen Testkits positive und negative Kontrollen bei.

Im folgenden Case Report wurden die Testkits der Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland) für die Bestimmung der oxidativen Stressparameter verwendet (43).

3.1.1 Carbonylproteine (CP)

Der Carbonylprotein-Wert, nachstehend kurz CP-Wert genannt, ist ein Messparameter, der angibt, wie viele Carbonylgruppen kovalent, also irreversibel am Protein gebunden sind. Der CP-Wert lässt somit eine Aussage über die Höhe von geschädigten Proteinen zu. Die Messung des CP-Wertes findet vor allem im Verlauf einer Therapie ihre Wichtigkeit. Er kann zur Therapiekontrolle herangezogen werden. Zu den häufigsten Indikationen zählen vor allem chronische Erkrankungen wie beispielsweise Diabetes mellitus, Arteriosklerose, maligne Erkrankungen oder Morbus Alzheimer.

Die Immundiagnostik AG bietet ein Sandwich-ELISA Testkit (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) für die Bestimmung des CP-Wertes an. Zur Bestimmung benötigt man humanes Serum oder Plasma (43).

Testprinzip:

Die durch Oxidation entstandenen proteingebundenen Carbonyle können mittels Derivatisierung durch Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und anschließender Bestimmung mit anti-DNPH-Antikörper erhoben werden. Mittels ELISA erfolgt eine quantitative Bestimmung der Carbonylproteine.

Zuerst wird die Probe mit DNPH für 45 Minuten bei Raumtemperatur derivatisiert. Die überschüssigen DNPH Bestandteile sowie die Nicht-Protein-Bestandteile werden mittels Ultrafiltration entfernt (5 min. bei 11.000 rpm). Die gereinigten Proteine werden in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) 1:80.000-fach verdünnt und dann auf eine ELISA-Platte aufgetragen (200 µL/well). Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur und ohne schütteln wird die gesamte Mikrotitrationsplatte gewaschen (5 Zyklen mit Waschpuffer; 10 mM Phosphatpuffer mit 0.1% Tween; Waschapparat: ELx50; Biotek, USA). Danach wird ein anti-DNPH-Antikörper (1:100 in 10 mM Phosphatpuffer) in jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte pipettiert (200 µL/well). Die anschließende Inkubationszeit beträgt 45 Minuten bei Raumtemperatur. Nicht gebundene Antikörper werden durch weiteres Waschen (6 Zyklen mit Waschpuffer; Waschapparat: ELx50; Biotek, USA) entfernt. Danach werden 200 µL/well Peroxidase-konjugierter Antikörper aufgetragen und für weitere 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift (5 Zyklen mit Waschpuffer; Waschapparat: ELx50; Biotek, USA) wird das Färbereagenz TNB (Tetramethylbenzidin) in jede Vertiefung der Mikrotitrationsplatte pipettiert. Die Reaktion wird nach der Färbung mit einer verdünnten Schwefelsäurelösung gestoppt.

Die Carbonyl-Konzentration wird anhand einer photometrischen Messung bei einer Absorption von 450 nm mittels einer Standardkurve bestimmt (Beckmann Coulter; DTX 880 Multimode Detector). Da der CP-Wert im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt errechnet wird, muss die Proteinkonzentration nach dem kolorimetrischen Bichinolinsäure Test (BCA-Testkit, Pierce, USA) auch mitbestimmt werden. Hierfür werden die Proben 1:50 in 0.9% NaCl verdünnt. Die Arbeitslösung wird aus einem Teil Reagenz 2 (4 %-ige Kupfersulfatlösung) mit acht Teilen Reagenz A (Bicincholinsäure) hergestellt. In einer Mikrotitrationsplatte werden 50 µL BSA-Standards, Blank und verdünnte Proben vorgelegt. Danach werden 150 µL Arbeitslösung in die Vertiefungen hinzu pipettiert und für 30

Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wird die Mikrotitrationsplatte abgekühlt und bei 562 nm vermessen (Beckmann Coulter; DTX 880 Multimode Detector). Aus der berechneten Standardgerade werden die Konzentrationen der Proben bestimmt und mit 50 multipliziert. Als Referenzwert für die Carbonylproteine wurde von Immundiagnostik AG ein Wertbereich von 80–200 pmol (Carbonyl)/mg (Protein) festgelegt (43).

3.1.2 Atherogenes LDL (oxLDL)

Durch die Oxidation von LDL entsteht oxidiertes, sogenanntes oxLDL, das von den Makrophagen im Körper aufgenommen wird. Eine Überladung der Makrophagen mit oxLDL führt zur Bildung von Schaumzellen, die sich in den Gefäßen ablagern und zur Entstehung von Arteriosklerose oder kardiovaskulären Krankheiten beitragen (5).

Für die Bestimmung von oxLDL wird venöses Nüchternblut herangezogen. Bis zur Messung müssen die Proben bei -20 °C gelagert werden. Die Probe sollte weder hämolytisch, noch lipämisch sein, da sonst das Testergebnis verfälscht sein könnte (43).

Testprinzip:

Das Testprinzip ist ein ELISA von der Firma Immundiagnostik AG. Die Mikrotitrationsplatte ist mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen MDA-modifiziertes oxLDL gerichtet ist, vorbeschichtet. Nach einem dreimaligen Waschzyklus (10 mM PBS pH 7.4 mit 0.1 % Tween; Waschapparat: ELx50; Biotek, USA) werden je 100 µL Standards, positive und negative Kontrolle sowie die Proben (1:10 verdünnt in Assaypuffer) in die Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten pipettiert. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei 37 °C unter ständigem Schütteln. Danach wird die Platte fünfmal gewaschen (Waschapparat: ELx50; Biotek, USA) und der Detektionsantikörper (polyklonaler anti-MDA-oxLDL-HRP; 1:100 verdünnt in Antikörper-Lösung) mit je 100 µL/well aufgetragen. Die darauffolgende Inkubationszeit beträgt 35 Minuten bei 37 °C unter ständigem Schütteln. Danach wird die Mikrotitrationsplatte ein weiteres Mal gewaschen (Waschapparat: ELx50; Biotek, USA) und das Färbereagenz TNB aufgetragen. Nach der Färbung wird die Reaktion gestoppt. Als Stopplösung dient verdünnte Schwefelsäure. Die Färbung wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Beckmann Coulter; DTX 880 Multimode Detector). Aus der Eichgerade wird die Konzentration der Proben bestimmt und mit dem Faktor 10 multipliziert.

Der Referenzwert liegt laut Angabe der Firma Immundiagnostik AG bei 0–400.0 ng/mL (43).

3.1.3 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG)

8-OHdG entsteht bei DNA Veränderungen durch Radikale und ist ein oxidiertes DNA Produkt. Es stellt somit einen geeigneten intrazellulären Marker für das Ausmaß an oxidativem Stress dar. Valko et al. bezeichnen 8-OHdG auch als einen potentiell relevanten Biomarker für die Karzinogenese (1).

8-OHdG wird, nachdem es intrazellulär entstanden ist, über die Nieren ausgeschieden. Leider lässt der vorliegende Level an 8-OHdG keinen quantitativen Rückschluss für die durch freie Radikale bedingt entstandene Schädigung der DNA zu. In Studien zeigt sich, dass die gleiche Anzahl von oxidativen Veränderungen der DNA bei unterschiedlichem Level an 8-OHdG vorliegen kann (5).

Testprinzip:

Zur Bestimmung dient ein kompetitiver ELISA. Als Material kann einerseits Urin, aber auch eine Serum- bzw. Plasmaprobe herangezogen werden. In diesem Fall wurde EDTA-Plasma verwendet.

Die Mikrotitrationsplatte ist mit 8-OHdG beschichtet. 50 µL Standards, Blank und Plasma werden direkt auf die Platte pipettiert. Danach wird 100 µL einer Antikörperlösung (monoklonaler Antikörper gegen human-8-OHdG; 1:100 verdünnt in Assaypuffer) hinzugefügt. Die Platte wird nicht geschüttelt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die Mikrotitrationsplatte dreimal gewaschen (Waschpuffer in destilliertem Wasser verdünnt: 10mM PBS + 0.01 % Tween; Waschapparat: ELx50; Biotek, USA). Danach wird 150 µL des zweiten Antikörpers (polyklonaler Antikörper von der Ziege, gerichtet gegen den monoklonalen Anti-human-8-OHdG; 1:100 in Assaypuffer) in jede Vertiefung pipettiert und für weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen (Waschapparat: ELx50; Biotek, USA) wird das Substrat TNB aufgetragen und die Färbung initiiert. Nach 10 Minuten wird die Reaktion durch die Zugabe von je 50 µL einer verdünnten Schwefelsäure gestoppt. Danach wird die Extinktion der Standards und Proben vermessen (Beckmann Coulter; DTX 880 Multimode Detector) und die Konzentration aus der Standardkurve berechnet.

Der Referenzwert wird zwischen 0–12.0 ng/mL angegeben (43).

3.1.4 Glutathionperoxidase Aktivität (GPx)

Glutathionperoxidase ist, wie im vorhergehenden Kapitel eingehend beschrieben, ein sehr wichtiges, wenn nicht sogar eines der wichtigsten antioxidativ wirksamen Enzyme. Es ist für die Entsorgung von reaktiven Sauerstoffspezies verantwortlich. Vor allem die Zellmembran von Zellen kann leicht durch freie Radikale oxidiert werden. Mit Hilfe von Glutathion reduziert die GPx die entstandenen Lipidperoxide zu Alkoholen und verhindert somit die Bildung von weiteren freien Radikalen. Die aktivierte GPx verhindert daher oxidative Veränderungen der Zellmembran und leistet so einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Integrität der Zelle.

Testprinzip:

GPx wird indirekt aus Erythrozytenlysat bestimmt. Das Erythrozytenlysat wird dreimal in isotonischer Kochsalzlösung 0.9 % (9 g NaCl/L) gewaschen. Aus der Probe werden 2.3 mL EDTA Vollblut zentrifugiert und anschließend das Plasma abgehoben. Danach werden langsam 2 mL kalte isotope Kochsalzlösung zum zurückgebliebenen Zentrifugat, bestehend aus Buffy Coat (Leukozyten und Thrombozyten) und Erythrozyten, pipettiert. Durch eine erneute Zentrifugation (2.400 rpm, 5 Minuten bei 4 °C) kommt es zu einer nochmaligen Trennung und der Überstand kann wiederum abgehoben und verworfen werden. Dieses Prozedere wird noch zweimal durchgeführt, damit das restliche EDTA-Plasma von den Erythrozyten vollständig getrennt werden kann. Danach wird der zurückgebliebene zelluläre Erythrozyten-Bestand mit kaltem, destilliertem Wasser versetzt. Zu 1 mL Erythrozytenlysat werden 3 mL aqua dest. pipettiert, womit die Erythrozyten zum Platzen gebracht werden. Durch eine weitere Zentrifugation (11.000 rpm; 10 Minuten; bei 4 °C) wird eine erneute Trennung erreicht und das benötigte Material für die Messung gewonnen. Die aufgebrochene Zellmembran der Erythrozyten befindet sich nun am Boden des Eppendorf Röhrchens. Aus dem Lysat wird die Enzymaktivität der GPx in einer Mikrotitrationsplatte bestimmt (Cayman Chemical, Michigan, USA). Dies erfolgt, basierend anhand der oxidativen Veränderung von GSH zu GSSG, durch die aktivierte GPx. In weiterer Folge wird GSSG und NADPH durch die Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert. Dann werden 100 µL Assaypuffer, 16 µL Samplepuffer, 25 µL Co-Substrat und 4 µL Lysatprobe in die Mikrotitrationsplatte vorgelegt.

Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µL Cumene. Die Extinktion der NADPH-Absorption wird alle 60 Sekunden bei 25 °C gemessen (Beckmann Coulter; DTX 880

Multimode Detector). Die Abnahme der NADPH-Absorption wird bei 340 nm während der Oxidation von NADPH zu NADP⁺, welches die Aktivität der GPx widerspiegelt, abgelesen. Die Ergebnisse werden in U/mg Hb ausgewertet.

Der Referenzwert wird zwischen 30–42.0 U/mg Hb angegeben (43).

3.1.5 Malondialdehyd (MDA)

Malondialdehyd ist ein Abbauprodukt, das im Rahmen der Lipidperoxidation anfällt. Hauptsächlich entsteht MDA durch die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. MDA ist weniger reaktiv als HNE. Es reagiert auch mit DNA Basen, wobei hier bevorzugt Guanin angegriffen wird (5).

Oxidierete Lipide haben die Fähigkeit, leicht durch die Zellmembran hindurch zu diffundieren und mit dem Zellkern zu interagieren. Die Folge daraus ist, dass die Zelle komplett in ihrer Form, Funktion und Eigenschaft verändert werden kann und die Barrierefunktion mitunter gestört ist. Handelt es sich beispielsweise um einen Erythrozyten, so führt dies zu einer Hämolyse.

Testprinzip:

Für die Messung von MDA dient Plasma, Serum oder Urin (Lipidperoxidation Kit, Oxford Biomedical Research, USA) als Substrat. Auch hier kann eine hämolytische oder lipämische Probe zu falschen Ergebnissen führen und sollte somit nicht zur Testung herangezogen werden. Die zur Bestimmung vorgesehene Probe muss nach Abnahme sofort kühl gelagert werden. Die erforderliche Arbeitslösung wird mit dem Mischen von Reagenz 1 (6 mL; 1-Methyl-2-phenylindol) mit Diluent (Eisen(III)-chlorid Hexahydrat in Methanol) hergestellt. Schließlich werden 100 µL Standards, ein Blank und die Plasma-Proben jeweils in ein Eppendorf Gefäß pipettiert. Zu dieser Vorlage werden je 330 µL Arbeitsreagenz pipettiert und kurz gemischt. Die Reaktion wird mit der Zugabe von 75 µL konzentrierter Salzsäure (Sigma; 12 N) gestartet. Für 90 Minuten wird die Reaktion bei 45 °C durchgeführt (Eppendorf Thermostat Plus, Deutschland). Danach werden die Standards, der Blank und die Proben abgekühlt und bei 11.000 rpm über drei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird photometrisch bei 585 nm gemessen (Beckmann Coulter; DTX 880 Multimode Detector). Mit Hilfe der ermittelten Extinktionen der Standards wird eine Eichgerade erstellt, aus der die Probenkonzentration von MDA berechnet wird.

Der Referenzwert wird zwischen 0–1.20 µM angegeben (43).

3.1.6 Total oxidativer Status (TOS)

Wie bereits des Öfteren beschrieben wurde, handelt es sich bei oxidativen Stress um eine Stoffwechselsituation, bei der das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zu Gunsten der Oxidantien verschoben ist. Es existiert bereits eine Vielzahl von Parametern, die Rückschlüsse auf die oxidative Stresslage erlauben. Eine wahllose Bestimmung von Parametern beansprucht einen enormen Zeitaufwand. TOS hingegen ist ein Parameter, der einerseits schnell gemessen werden kann, aber andererseits einen eingeschränkten Rückschluss über den vorherrschenden oxidativen Status erlaubt. Der Grund dafür ist, dass nur Lipidperoxide gemessen werden und somit kein direktes Korrelat zu allen freien Radikalen besteht, da nicht alle miterfasst werden. Es hat sich aber gezeigt, dass der TOS einigermaßen dem oxidativen Stresslevel entspricht (43).

Testprinzip:

Die Bestimmung des TOS-Wertes erfolgt mittels photometrischer Messung (PerOx Kit, Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland). Lyophilisierte Standards, negative und positive Kontrollen werden in einer Rekonstitutionslösung aufgelöst. Die Reaktionspuffermischung wird unmittelbar vor dem Testansatz hergestellt. 5 mL Reaktionspuffer A werden mit 100 µL Reaktionspuffer B und 5 µL Enzymlösung (Peroxidase) gemischt. Das Testprinzip beruht auf der Reaktion von Peroxidase mit Peroxid. Durch die darauffolgende Zugabe eines Chromogens kann die Substratumsetzung bei einer Wellenlänge von 450 nm ermittelt werden. Je 10 µL eines Standards, der Proben und der Kontrollen werden in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrotitrationsplatten pipettiert. Danach werden 100 µL Reaktionspuffer hinzugegeben. Die erste Messung zur Bestimmung der Ausgangswerte wird bei 450 nm durchgeführt (Beckmann Coulter; DTX 880 Multimode Detector). Die Reaktion wird durch die Zugabe von 100 µL der Reaktionspuffermischung gestartet. Die Reaktionszeit liegt bei 15 Minuten und einer Temperatur von 37 °C. Danach werden 50 µL einer verdünnten Schwefelsäure als Stopplösung hinzugegeben. Nun wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Beckmann Coulter; DTX 880 Multimode Detector). Nach Abzug der Ausgangswerte kann die Konzentration an Peroxiden über den Standard errechnet werden.

Die Referenzwerte werden wie folgt festgelegt und interpretiert:

EDTA-Plasma:

< 200.0 $\mu\text{mol/L}$ gut

200.0–350.0 $\mu\text{mol/L}$ mäßige oxidative Belastung

> 350.0 $\mu\text{mol/L}$ starke oxidative Belastung

EDTA-Serum:

< 180.0 $\mu\text{mol/L}$ gut

180.0–310.0 $\mu\text{mol/L}$ mäßige oxidative Belastung

> 310.0 $\mu\text{mol/L}$ starke oxidative Belastung (43).

3.1.7 Nitro-Tyrosin-Proteine (NTP)

Nitrotyrosin entsteht durch Nitrierung von Tyrosin durch Peroxynitrit. Eine weitere Möglichkeit einer Nitrierung von Tyrosin erfolgt durch NO_2^* . Letzteres wird durch Metalle wie Eisen oder Kupfer katalysiert. Bei entzündlichen, kardiovaskulären Erkrankungen, wie dies beispielsweise bei einer koronaren Herzkrankheit, diabetischen Gefäßveränderungen oder Arteriosklerose der Fall ist, kann ein erhöhter Spiegel an NTP verzeichnet werden (43). Es wird vermutet, dass diese veränderten Proteine eine immunologische Reaktion auslösen und somit einen Beitrag zur Entstehung dieser Erkrankungen leisten. Gebildet wird Nitrotyrosin über NO^* . Dieser Metabolit wird neben O_2^{*-} bei vielen Krankheiten und anderen entzündlichen Prozessen im Körper produziert, was zur vermehrten Bildung von Peroxynitrit (ONOO^-) führt. Die Folge daraus ist, dass ONOO^- Aminosäuren wie Tyrosin in den vorhandenen Proteinen nitriert. Liegen diese Nitrotyrosine gebunden an einem Protein vor, so ist dieses relativ stabil.

Peroxynitrit selbst ist nur sehr schwer messbar. Dies ist auch der Grund, warum man proteingebundenes Nitrotyrosin zur Messung heranzieht und so einen indirekten Rückschluss auf eine mögliche Peroxynitrit Belastung erhält (5,43).

Testprinzip:

Das Testprinzip der Immundiagnostik AG beruht auf einer Sandwich-ELISA-Technik, die eine mit polyklonalen Ziege anti-Nitrotyrosin Antikörper beschichtete Mikrotitrationsplatte verwendet. Das EDTA-Plasma der Proben wird 1:60 in Assaypuffer verdünnt. Die Standards

und Kontrollen werden nach Vorschrift in destilliertem Wasser aufgelöst. Die Mikrotitrationsplatte wird vorgewaschen (drei Zyklen; Waschapparat: ELx50; Biotek, USA). Jeweils 100 µL der Standards, der Kontrollen und der verdünnten Proben werden aufgetragen. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei Raumtemperatur und unter regelmäßigem Schütteln (300 rpm; 25 °C; Thermostar; Servolab, Austria). Danach wird die Mikrotitrationsplatte dreimal gewaschen (Waschapparat: ELx50; Biotek, USA). Es werden 100 µL verdünnter 2. Antikörper (anti-IgG-HRP; 1:100 verdünnt in Assaypuffer) in die Vertiefungen pipettiert und eine weitere Stunde unter ständigem Schütteln (300 rpm; 25 °C) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wird die Platte erneut drei Mal gewaschen (Waschapparat: ELx50; Biotek, USA). Es werden jeweils 100 µL des Substrats TNB in die Vertiefungen pipettiert und die Reaktion mit verdünnter Schwefelsäure nach entsprechender Färbung gestoppt und photometrisch bei 450 nm gemessen (Beckmann Coulter; DTX 880 Multimode Detector). Die Berechnung der Konzentration der unbekanntenen Proben erfolgt aus der Standardgeraden und der Multiplikation mit dem Faktor 60. Dies entspricht der obigen Verdünnung.

Die Immundiagnostik AG gibt folgenden Referenzwert an: 48.0–1533.0 nM (43).

4 Resultate

Jener oxidative Stressparameter, welcher als erstes gemessen wurde und in Abbildung 26 ersichtlich ist, ist der Totale Oxidative Status (TOS). Er zeigt zumeist das Vorhandensein von Lipidperoxiden, ausgedrückt in Wasserstoffperoxid Äquivalenten (μM). In diesem Fall lag der Ausgangswert des TOS vor der ersten HBO-Therapie bei $30,0 \mu\text{M}$. Nach dem erfolgten HBO Therapie-Schema nahm der Wert enorm zu und lag danach bei $126,5 \mu\text{M}$. Dies ist ein Anstieg von mehr als 400 %. In Tabelle 8 sind alle gemessenen Stressparameter inklusive Normwerte zusammengefasst. Hier sieht man jedoch, dass sich beide Messwerte trotz der enormen Erhöhung immer noch innerhalb des Normbereichs befinden.

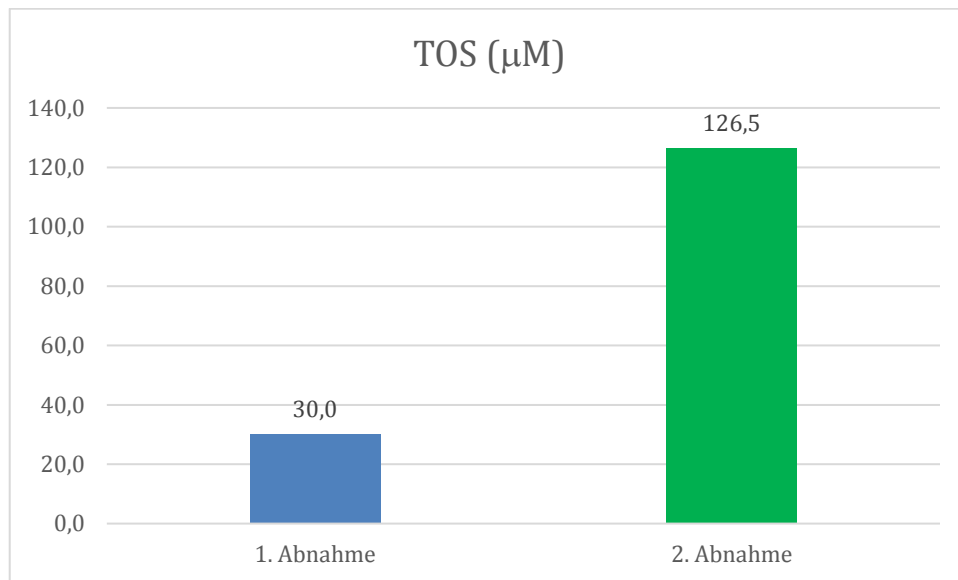


Abbildung 22 TOS – vor und nach zweimaliger HBO Therapie.

Aus Lipidperoxiden entsteht nach einem weiteren Schritt der Lipidperoxidation der Malondialdehyd (MDA), ein Vertreter der freien Carbonyle. Beide Abnahmen zeigen nahezu einen ähnlichen Wert (Abbildung 27: $1,42 \mu\text{M}$ vs. $1,40 \mu\text{M}$). Im Vergleich zu bekannten wissenschaftlichen Daten von gesunden Probanden, sind jedoch beide Werte erhöht (Tabelle 8).

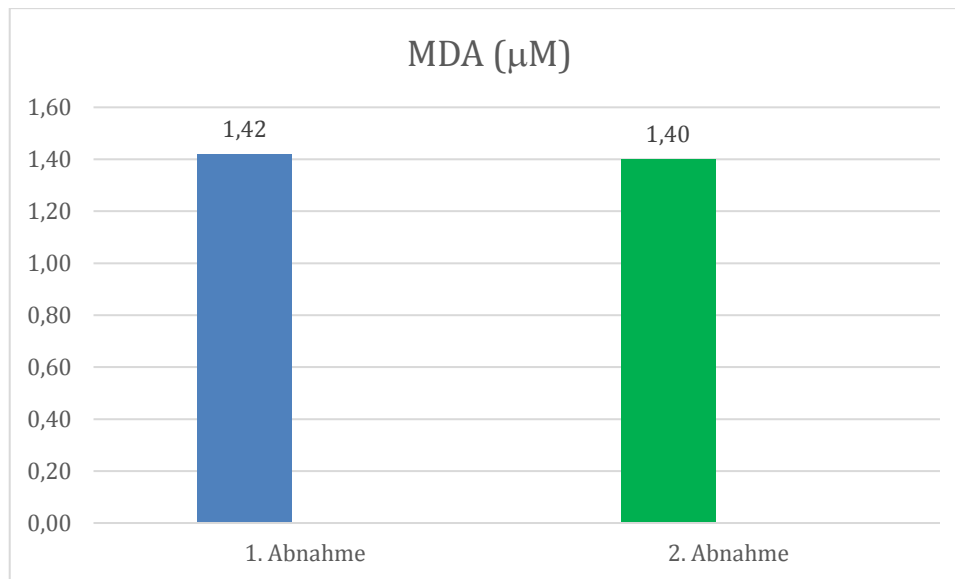


Abbildung 23 MDA – vor und nach zweimaliger HBO Therapie.

Lipide liegen entweder in den zellulären Membranen eingebaut oder in gebundener Form an transportierenden Proteinen, den Lipoproteinen, vor. Eine zelluläre Schädigung bzw. Oxidation von LDL hat zur Folge, dass vermehrt oxLDL nachweisbar ist. Dies ist auch der Grund dafür, warum man in diesem Case Report das oxLDL aus dem Plasma gemessen hat. Dieser beruht auf der Messung von MDA-Addukten am oxLDL.

In Abbildung 28 zeigt sich, dass vor der HBO Therapie die Konzentration von oxLDL bei 261.4 ng/mL lag, und diese nach dem Tauchgang auf 455.1 ng/mL anstieg. Dies entspricht einem 1.7-fachen Anstieg. Im vorliegenden Fall wurde ein Emphysem in der Leber diagnostiziert. Da Lipoproteine in der Leber produziert werden, kann ein möglicher Bezug zur Oxidation des Lipoproteins LDL vermutet werden. Vergleicht man nun die erhobenen oxLDL-Werte mit dem Referenzwert, so ist ersichtlich, dass der Wert erst nach der HBO Therapie über der Norm lag.

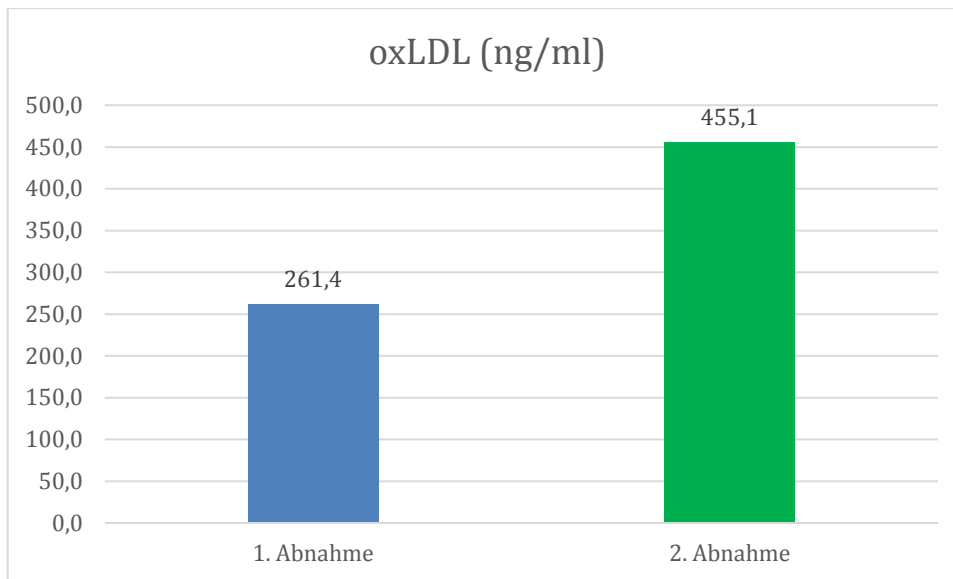


Abbildung 24 oxLDL – vor und nach zweimaliger HBO Therapie.

Ein weiterer oxidativer Stressparameter, der im Zuge des Case Reports gemessen wurde, ist der CP-Wert. Es ist jener Parameter, der angibt, wie viele Carbonylgruppen kovalent am Protein gebunden sind. In Abbildung 29 ist ersichtlich, dass bereits der erste gemessene Wert bei 184 pmol/mg lag. Nach den therapeutischen Interventionen wurde ein CP-Wert von 220 pmol/mg gemessen. Dies ist, ausgehend vom Ausgangswert, ein Anstieg von 20 %. Des Weiteren liegt der gemessene CP-Wert zum 2. Messzeitpunkt über dem angegebenen Referenzwert (Tabelle 8).

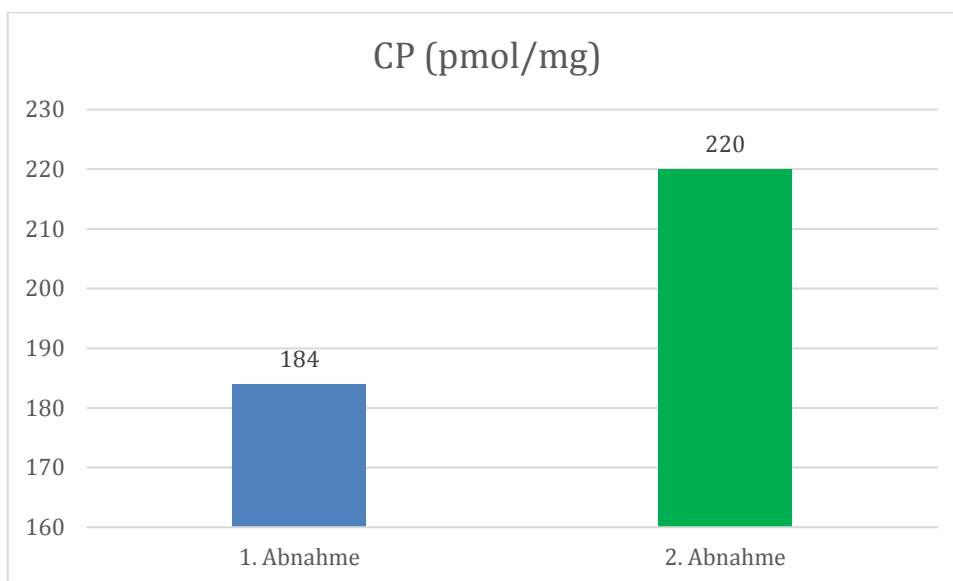


Abbildung 25 CP – vor und nach zweimaliger HBO Therapie.

Neben den oxidativen Stressparametern gibt es auch antioxidative Systeme, welche gemessen werden können. Ein Messparameter ist die Glutathionperoxidase. GPx ist ein selenhaltiges Enzym, das Peroxide, wie dies beispielsweise Lipidperoxide oder Wasserstoffperoxid sind, abbaut. In Abbildung 30 ist eine deutliche Änderung der Enzymaktivität sichtbar. Es ist ein Anstieg von 14,0 U/mgHb auf 20,0 U/mgHb zu verzeichnen gewesen. Hinzufügen muss man jedoch, dass beide gemessenen Werte, trotz deutlicher oxidativer Belastung, unterhalb des angegebenen Referenzwertes lagen (Tabelle 8).

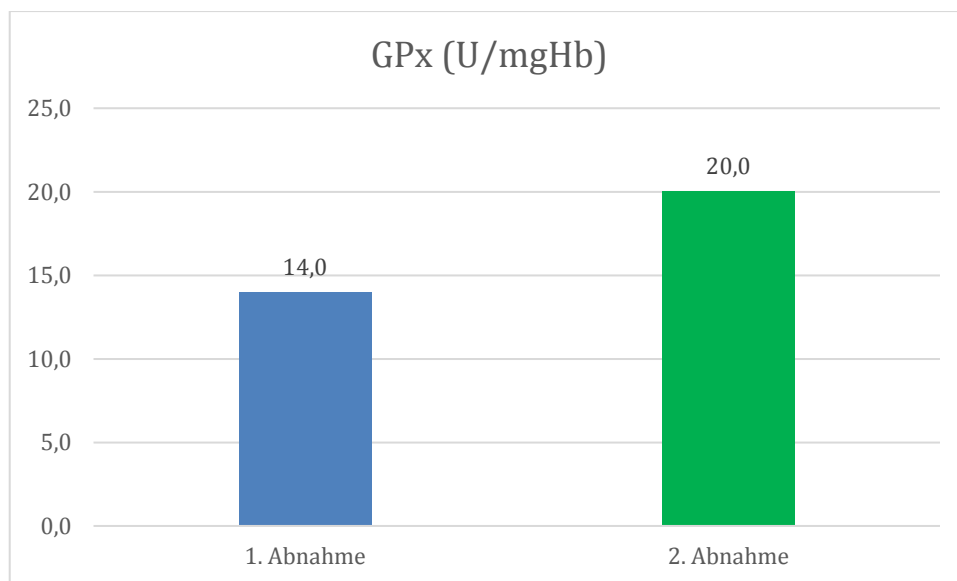


Abbildung 26 GPx – vor und nach zweimaliger HBO Therapie.

Die Nitro-Tyrosin-Proteine stellen den nächsten erhobenen Stressparameter dar. NTP gibt uns die Menge an Nitrotyrosin-Proteinen an, die durch eine oxidative Reaktion entsteht. Der gemessene Ausgangswert im Case Report lag bei 426,0 nM. Nach den beiden HBO Therapien sank dieser Wert auf 406,8 nM ab (Abbildung 31).

Bezogen auf die Referenzwerte von gesunden Probanden befinden sich beide gemessenen NTP Werte im Normbereich (Tabelle 8).

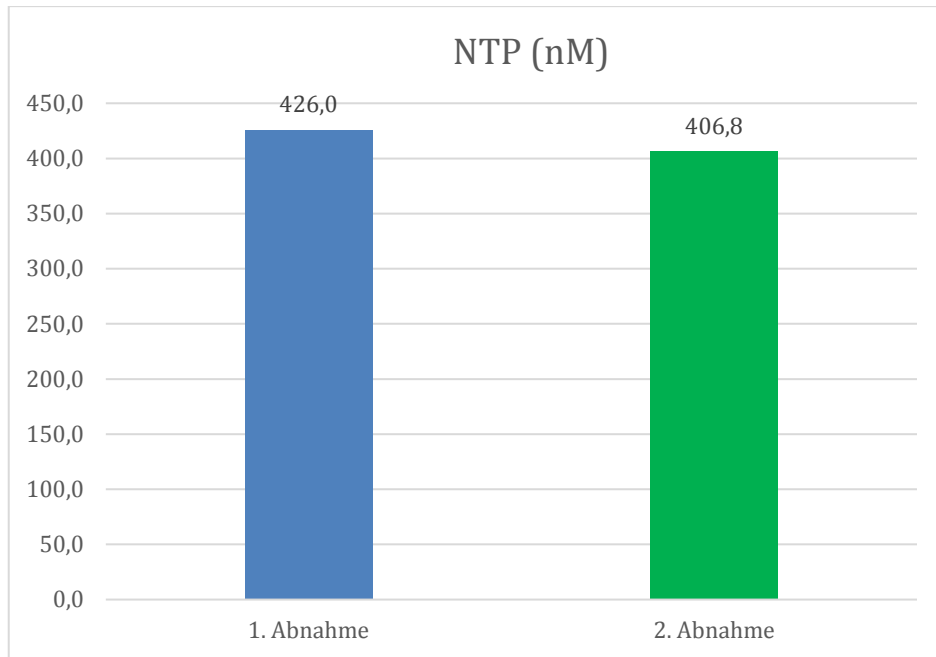


Abbildung 27 NTP – vor und nach zweimaliger HBO Therapie.

Als einziger intrazellulärer Oxidationsparameter wurde in diesem Fall das oxidierte DNA-Produkt, die 8-Hydroxydesoxyguanosin, bestimmt. 8-OHdG ist ein Derivat der DNA-Guanosine. In der nachstehenden Abbildung sieht man, dass dieser Stressparameter nahezu eine Verdoppelung aufwies (Abbildung 32). Durch die HBO-Therapie stieg der Wert von 6,7 auf 12,7 ng/mL an und lag somit über dem angegebenen Referenzwert (Tabelle 8).

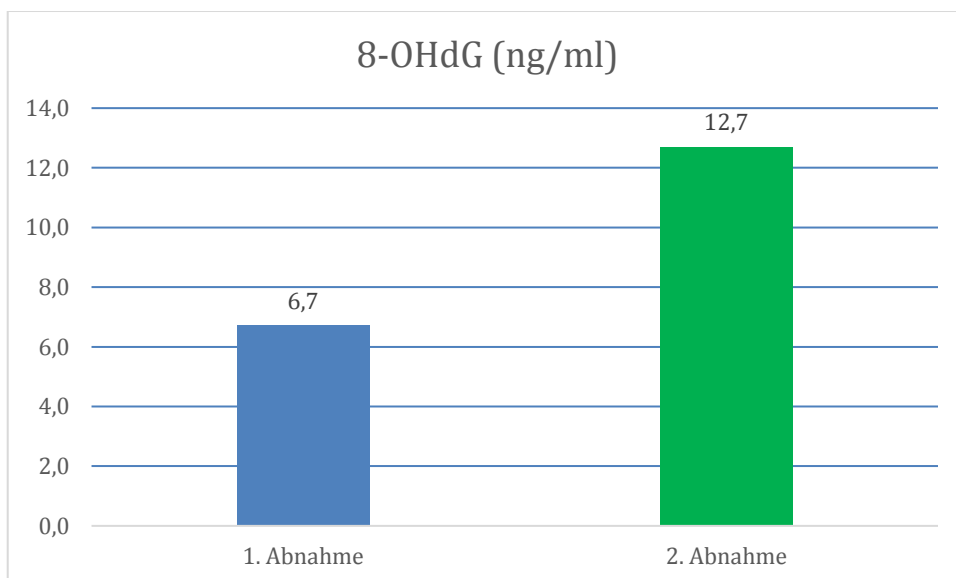


Abbildung 28 8-OHdG – vor und nach zweimaliger HBO-Therapie.

In der nachstehenden Tabelle sind die gesamten oxidativen Stressparameter zu den jeweiligen zwei Messzeitpunkten zusammengefasst. Die 1. Abnahme wurde vor der ersten HBO-Sitzung durchgeführt. Diese Werte bilden somit das Ausgangslevel an oxidativem Stress, welcher im Körper des Patienten vorlag.

Die 2. Abnahme wurde nach dem 2. HBO-Tauchgang durchgeführt. An diesen Parametern kann man somit den zeitlichen Verlauf des oxidativen Stresslevels ablesen.

	1. Abnahme	2. Abnahme	Normwerte
CP	184	220	80–200 pmol/mg
oxLDL	261.4	455.1	0–400.0 ng/mL
TOS	30.0	126.5	0–200.0 μ M
GPx	14.0	20.0	30–42.0 U/mg Hb
MDA	1.42	1.40	0–1.20 μ M
NTP	426.0	406.8	48.0–1533.0 nM
8-OHdG	6.7	12.7	0–12.0 ng/mL

Tabelle 8 Oxidative Stressparameter im Überblick. 1. Abnahme vor HBO-Therapie und 2. Abnahme nach zweimaliger HBO-Therapie.

Als grafische Darstellung wird in Abbildung 33 die prozentuelle Änderung der oxidativen Stressparameter aufgezeigt. Die gemessenen Ausgangswerte werden als 100 % angenommen, die zweiten Messwerte prozentuell aufgerechnet, um den prozentuellen Verlauf und Vergleich darstellen zu können.

Eine Zunahme von TOS, oxLDL CP, GPx und 8-OHdG nach zweimaliger HBO ist ersichtlich. Keinen relevanten Unterschied kann man bei MDA und NTP erkennen. Diese blieben fast auf demselben Niveau stehen (Abbildung 33).

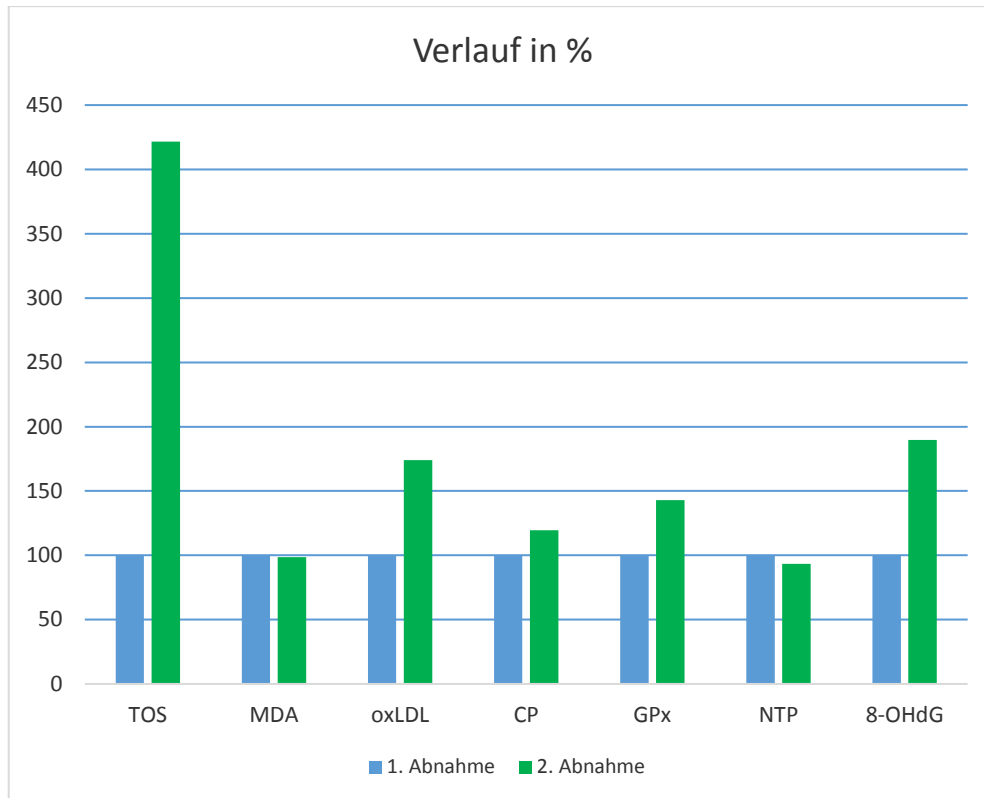


Abbildung 29 Verlauf der einzelnen Stressparameter in % jeweils vor und nach zweimaliger HBO Therapie.

5 Diskussion

Es existieren in Datenbanken einige Fälle einer unabsichtlichen Intoxikation mittels Wasserstoffperoxid. Im Zuge dieser Diplomarbeit wurde anhand des Case Reports, bei dem ein Patient in suizidaler Absicht circa 100 ml 30 %-iges Wasserstoffperoxid trank, die oxidativen Stressparameter TOS, CP, oxLDL, MDA, NTP, GPx und 8-OHdG erhoben.

Auf Anraten der Vergiftungszentrale Wien wurde eine bildgebende Abklärung durchgeführt, in der eine portale Emphysembildung erhoben werden konnte, die schließlich mittels HBO erfolgreich therapiert wurde. Aufgrund dieses nicht alltäglichen Falles, wurden die oxidativen Stressparameter vor und nach den beiden HBO-Tauchgängen mitbestimmt. In der Literatur existieren mehrere Arbeiten, welche die Auswirkungen einer HBO-Therapie auf die oxidative Stoffwechselsituation untersuchten (4,38-42). Jene Studie, welche jedoch am analogsten und somit gleichzeitig auch als Vergleichsstudie für die Diplomarbeit herangezogen wurde, ist jene von Matzi et al. aus dem Jahre 2015. In dieser Arbeit wurden 21 gesunde Probanden einer einmaligen HBO unterzogen, wobei vor, während und nach der HBO-Therapie eine Blutabnahme zur Bestimmung der oxidativen Stressparameter erfolgte. Gemessen wurden CP, MDA, oxLDL, 8-OHdG und GPx. Der TOS wurde jedoch nicht ermittelt. Die erhobenen Messergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst (45).

	Vor HBO	Während HBO	Nach HBO
CP (pmol/mg)	77.1	61.7	78.1
MDA (µM)	0.92	1.26	1.00
oxLDL (ng/mL)	52.2	49.1	46.7
8-OHdG (ng/mL)	9.4	8.1	8.1
GPx (IU/mg)	22.5	26.5	25.6

Tabelle 9 Oxidative Stressparameter vor, während und nach einer HBO Therapie, gemessen bei gesunden Probanden. Modifiziert nach (45).

Vergleicht man nun die gemessenen oxidativen Stressparameter zwischen der Studie von Matzi et al. mit den Messergebnissen des Case Reports, so kann man folgendes feststellen. Bereits beim ersten gemessenen Parameter ist ein deutliches Ergebnis erkennbar. Der CP-Wert ist im Vergleich zu gesunden Probanden bereits zu Beginn um 100 % höher (184 pmol vs. 77 pmol/mg). Während der CP-Wert der gesunden Personengruppe nach der Therapie gleich bleibt (78 pmol/mg), ist bei den Messergebnissen des Case Reports ein weiterer

Anstieg auf 220 pmol/mg (Anstieg um das 3-fache) zu verzeichnen und liegt somit oberhalb des Referenzwertes.

Das gleiche Szenario zeigt sich bei oxLDL, hier jedoch ausgeprägter. Der Ausgangswert im vorliegenden Kasus ist im Vergleich zu Matzi et al. um das 5-fache höher (261.4 ng/mL vs. 52.2 ng/mL) und steigt nach der HBO Therapie auf fast das 10-fache an (455.1 ng/mL vs. 46.7 ng/mL). Auch hier liegt der zweite erhobene oxLDL-Wert des Case Reports eindeutig über dem Referenzwert. Die Messung des oxLDL beruht auf einer ELISA Detektion mittels Antikörper gegen MDA-Addukte am oxLDL (Apolipoprotein B-100). Deshalb war es wichtig die gesamte MDA Menge zu bestimmen. Interessanterweise präsentierte sich der MDA Wert sowohl vor als auch nach der HBO-Therapie nur unwesentlich erhöht. Im Vergleich zur gesunden Probandengruppe von Matzi et al. waren beide Werte des Falles erhöht (1.42 μ M vs. 0.92 μ M und 1.40 μ M vs. 1.00 μ M). Da MDA als ein Zwischenprodukt der Lipidperoxidation vermittelten Reaktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren resultiert und auch durch Glukoseoxidation entsteht, haben wir in unserem Fall den Gehalt an Lipidperoxiden mittels TOS ermittelt. Diesbezüglich liegen jedoch keine Vergleichswerte aus Matzi et al. vor. Dennoch konnte nach der HBO-Therapie ein um 4-fach erhöhter TOS-Wert gemessen werden.

Zusätzlich wurde auch die Aktivität der Glutathionperoxidase aus Erythrozyten erhoben. GPx vermag Peroxide wie Wasserstoffperoxid abzubauen. Es zeigte sich, dass der Proband vor der HBO Therapie eine 60 % niedrigere Aktivität aufwies als jene, aus der gesunden Probandengruppe (14.0 IU/mg vs. 22.5 IU/mg). Die Aktivität der GPx nahm nach der HBO-Therapie beim Case Report, als auch bei Matzi et al. zu (20.0 IU/mg vs. 25.6 IU/mg). Wobei die Aktivität im Vergleich zu gesunden Probanden nach wie vor niedriger war.

In den Messergebnissen von 8-OHdG ist ein weiterer deutlicher Unterschied zu sehen. Der erhobene 8-OHdG Wert lag in unseren Messungen vor dem Tauchgang bei 6.7 ng/mL. Im Vergleich zu Matzi et al. lag dieser bei 9.4 ng/mL. Nach der Therapie konnte nahezu eine Verdoppelung des Wertes (12.7 ng/mL) verzeichnet werden, wobei dieser in der Vergleichsstudie bei 8.1 ng/mL lag.

Der letzte Parameter NTP wurde, wie bereits zu Beginn schon erwähnt, in der Studie von Matzi et al. nicht erhoben. Die beiden Messergebnisse des Probanden befanden sich jeweils im Normbereich. Eigentlich wäre ein Anstieg zu erwarten gewesen, da sich aus Wasserstoffperoxid und NO* Peroxynitrit bildet. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sich durch eine verzögerte H₂O₂ Aufnahme kein NTP gebildet hat oder dieses durch weitere

Prozesse bereits in andere Produkte umgewandelt wurde (z.B. Reduktion der Nitrogruppe und nachfolgender Desaminierung) und somit nicht mehr messbar war.

6 Conclusio

Es konnte gezeigt werden, dass bei einer exogenen Zufuhr von 100 mL 30%-iger Wasserstoffperoxid Lösung ähnliche klinische Reaktionen auftraten, wie sie in einigen anderen Quellen zu finden sind. Auch hier wurde immer wieder die HBO-Therapie als erfolgreiches Behandlungsschema erwähnt (26-36).

Obwohl, wie bereits schon erwähnt, die unabsichtliche Intoxikation mit Wasserstoffperoxid kein seltenes Ereignis zu sein scheint, ist die Erhebung der oxidativen Stressparameter im Zuge dieses Ereignisses nicht alltäglich. Der Vergleich mit der bereits durchgeführten Studie von Matzi et al. liefert eine gute wissenschaftliche Basis, um die erhobenen Messergebnisse unseres Probanden zu vergleichen. Vor allem standen bei beiden Untersuchungen dieselben Messprinzipien zur Verfügung, welche einen noch besseren Vergleich ermöglichten. Aufgrund der Ausgangswerte unseres Probanden im Vergleich zu den Messergebnissen von Matzi et al. konnte gezeigt werden, dass die Intoxikation mittels Wasserstoffperoxid eine enorme oxidative Belastung des Körpers darstellt.

Durch die Einleitung einer HBO Therapie konnte das entstandene Emphysem in der Leber vollständig zurückgebildet werden und die klinische Symptomatik des Patienten verbessert sich zusehends.

Im Zuge dieser Therapie konnte dargestellt werden, dass die exogene Zufuhr von Wasserstoffperoxid sowie molekularer Sauerstoff die Oxidation erhöhen, da sich sämtliche Parameter des oxidativen Stresses erhöhten. Interessanterweise kann aber nicht rückgeschlossen werden, ob die Erhöhung von CP, oxLDL und MDA aufgrund einer intra- oder extrazellulären Oxidation bedingt ist. Im Gegensatz dazu dürfte dies bei 8-OHdG, welches einem intrazellulären Marker entspricht, jedoch zutreffen.

Grundsätzlich wäre eine weitere Kontrolle der oxidativen Stressparameter, drei Monate nach der erfolgten Behandlung, geplant gewesen. Da der Patient jedoch aufgrund seiner Erkrankung nicht zum geplanten Termin erschienen ist, bleibt die eindeutige Klärung der möglichen Kompensationsmechanismen des menschlichen Organismus gegenüber übermäßigen oxidativen Belastungen durch Wasserstoffperoxid sowie HBO bis auf weiteres ungeklärt.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006 Mar; 160(1):1-40.
- (2) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84.
- (3) Zeeck A, Grond S, Papastavrou I, Zeeck SC. editor. *Chemie für Mediziner.* 6. Auflage. München: Urban & Fischer Verlag; 2005.
- (4) Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res.* 1999 Jul; 428(1–2):83-89.
- (5) Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology & Medicine.* 5. Auflage. New York: Oxford University Press; 2015.
- (6) Jones DP, Radi R. Redox pioneer: professor Helmut Sies. *Antioxid Redox Signal.* 2014 Dec; 21(18):2459-68.
- (7) Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative Stress and Cardiovascular Injury. *Circulation.* 2003 Oct; 108(16):1912-1916.
- (8) Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014 Dec; 224:164-175.
- (9) Escobar JA, Rubio MA, Lissi EA. SOD and catalase inactivation by singlet oxygen and peroxy radicals. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(3):285-290.
- (10) Horn F, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium.* 3. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2005.
- (11) Wachter H, Hausen A. *Chemie für Mediziner: Fortgeführt von Gilbert Reibenegger.* 8. Auflage. Berlin, New York: Walter de Gruyter; 2002.
- (12) Psyrembel-Online [Internet]. Deutschland: Berlin; [cited 09. May.2017]. Available from: <https://www-1psyrembel-1de-1psyrembel.han.medunigraz.at/>.

- (13) Berg A, König D. Oxidativer Stress und Sport. Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin 2000; 51(5):177-178.
- (14) Mathieu D. editor. Handbook on Hyperbaric Medicine. Dordrecht: Springer; 2006.
- (15) Toyokuni S. Oxidative stress as an iceberg in carcinogenesis and cancer biology. Arch Biochem Biophys. 2016 Apr; 595:46-49.
- (16) Kindwall EP, Whelan HT. Hyperbaric Medicine Practice. 3. Auflage. North Steves Blvd: Best Publishing Company; 2008.
- (17) Seibt W. Physik für Mediziner. 5. Auflage. Stuttgart, New York: 2003.
- (18) Jain KK. Textbook of Hyperbaric Medicine. 4. Auflage. Göttingen: Hogrefe & Huber Publisher; 2004.
- (19) Maurer D. Hyperbare Oxygenierung und Tauchmedizin. Einführung in Geschichte, Physik, Wirkungsweise und Anwendung. Wiesbaden: Springer Verlag; 2016.
- (20) Undersea & Hyperbaric Medical Society: Raising the quality of practice one member at a time [Internet]. Florida: North Palm Beach; [cited 05.May.2017]. Available from: <https://www.uhms.org/>.
- (21) Leach RM, Rees PJ, Wilmschurst P. Hyperbaric oxygen therapy. BMJ. 1998 Oct; 317(7166):1140-1143.
- (22) Tibbles PM, Edelsberg JS. Hyperbaric-Oxygen Therapy. N Engl J Med. 1996 Jun; 334(25):1642-1648.
- (23) Gill AL, Bell CNA. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. QJM. 2004 Jul; 97(7):385-95.
- (24) Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis-effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. Surgery. 1981 Aug; 90(2):262-270.
- (25) Lindell K, Weaver MD, Chair and Editor. Undersea and Hyperbaric Medical Society: Hyperbaric Oxygen Therapy Indications. 13. Auflage. Durham: Best Publishing Company; 2014.

- (26) Watt BE, Proudfoot AT, Vale JA. Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol Rev.* 2004; 23(1):51-57.
- (27) Pritchett S, Green D, Rossos P. Accidental ingestion of 35% hydrogen peroxide. *Can J Gastroenterol.* 2007 Oct; 21(10):665-667.
- (28) Lapeyre B. The "Frost Sign" and the "Snow White Sign": Intramucosal Air Injection or Peroxide Colitis? *Endoscopy.* 2005 Jul; 37(07):679.
- (29) Indorato F, Raffino C, Tropea FM, Barbera N, Grieco A, Bartoloni G. Fatal accidental ingestion of 35 % hydrogen peroxide by a 2-year-old female: case report and literature review. *Forensic Science, Medicine, and Pathology* 2014 Sep; 10(3):443-447.
- (30) Byrne B, Sherwin R, Courage C, Baylor A, Dolcourt B, Brudzewski JR, et al. Hyperbaric oxygen therapy for systemic gas embolism after hydrogen peroxide ingestion. *J Emerg Med.* 2014 Feb; 46(2):171-5.
- (31) French LK, Horowitz BZ, McKeown NJ. Hydrogen peroxide ingestion associated with portal venous gas and treatment with hyperbaric oxygen: a case series and review of the literature. 2010 Jul; 48(6):533-8.
- (32) Rider SP, Jackson SB, Rusyniak DE. Cerebral air gas embolism from concentrated hydrogen peroxide ingestion. *Clin Toxicol (Phila).* 2008 Nov; 46(9):815-8.
- (33) Papafragkou S, Gasparyan A, Batista R, Scott P. Treatment of portal venous gas embolism with hyperbaric oxygen after accidental ingestion of hydrogen peroxide: a case report and review of the literature. *J Emerg Med.* 2012 Jul; 43(1):21-3.
- (34) Mullins ME, Beltran JT. Acute cerebral gas embolism from hydrogen peroxide ingestion successfully treated with hyperbaric oxygen. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1998; 36(3):253-6.
- (35) Burns RA, Schmidt SM. Portal venous gas emboli after accidental ingestion of concentrated hydrogen peroxide. *J Emerg Med.* 2013 Sep; 45(3):345-7.
- (36) Zengin S, Al B, Genç S, Yarbil P, Yilmaz DA, Gulsen MT. A rare case of portal vein gas: accidental hydrogen peroxide ingestion. *BMJ Case Rep.* 2012 May; 10.1136/bcr.01.2012.5602, Published May 2012.

- (37) Vrabec JT, Clements KS, Mader JT. Short-term tympanostomy in conjunction with hyperbaric oxygen therapy. *Laryngoscope*. 1998 Aug; 108(8 Pt 1):1124-8.
- (38) Narkowicz CK, Vial JH, McCartney PW. Hyperbaric oxygen therapy increases free radical levels in the blood of humans. *Free Radic Res Commun*. 1993; 19(2):71-80.
- (39) Speit G, Dennog C, Radermacher P, Rothfuss A. Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat Res*. 2002 Dec; 512(2-3):111-9.
- (40) Dennog C, Hartmann A, Frey G, Speit G. Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis*. 1996 Nov; 11(6):605-9.
- (41) Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, Canestrari F. Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clin Biochem*. 2004 Apr; 37(4):312-7.
- (42) Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res*. 1999 Jul; 428(1-2):83-9.
- (43) Immundiagnostik-Closing the Gaps in Diagnostics [Internet]. Deutschland: Bensheim; [cited 05.July.2017]. Available from:<http://www.immundiagnostik.com/home/produkte/testkits-assays/oxidativer-stress-praeventivmedizin.html>.
- (44) Beckman KB, Ames BN. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*. 1997 Aug; 272(32):19633-6.
- (45) Matzi V, Greilberger JF, Lindenmann J, Neuboek N, Nuhsbaumer S, Zelzer S, et al. Application of Hyperbaric Oxygen Reduce Oxidative Damage of Plasmatic Carbonyl Proteins and 8-OHdG by Activating Glutathion Peroxidase. *Clin Lab*. 2015 Jun; 61(5-6):587-93.
- (46) Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem*. 2017 Jun; 86:715-748.
- (47) Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 5. Auflage. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 2003.
- (48) Jones DP, Sies H. The Redox Code. *Antioxidants & Redox Signal*. 2015 Sep; 23(9):734-46.