

**Einfluss unterschiedlicher Narkoseformen
auf die Entstehung von oxidativem Stress im heterotopen
Rattenherztransplantationsmodell**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sven Helms
geboren am 11.10.1980 in Berlin

Gutachter

1. PD Dr. Marcus Franz, Jena
2. Prof. Dr. Alexander Berndt, Jena
3. Prof. Dr. Khosro Hekmat, Köln

Tag der öffentlichen Verteidigung: 30. September 2014

Abkürzungsverzeichnis

$\cdot\text{HO}_2$	Hydroperoxyradikal
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidanion
$\cdot\text{OH}$	Hydroxylradikal
$^\circ\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm pro Milliliter
μM	Mikromolar (molare Masse)
$\mu\text{M/mg}$	Mikromolar pro Milligramm
$\mu\text{M/ml}$	Mikromolar pro ml
μmol	Mikromol
3 - MCDP	3 – Chlor - 1,2 - propandiol
4-HNE	4 - Hydroxy - 2 - nonenal
A.	Arteria, Arterie
Abb.	Abbildung
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	<i>American Heart Association</i>
AIP	Anästhetika-induzierte Präkonditionierung
AMP	Adenosinmonophosphat
AMR	<i>Antibody Mediated Rejection</i> , Antikörper-vermittelte Abstossung
AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ASD	Atriumseptumdefekt, Vorhofseptumdefekt
ATP	Adenosintriphosphat
ATP-Synthase	Adenosintriphosphat-Synthase
BCA	Bicinchoninsäure
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BSA-PBS	bovines Serumalbumin in phosphatgepufferter Lösung
C	Kohlenstoff
ca.	circa

CAV	<i>Cardiac Allograft Vasculopathy</i>
CI	<i>Cardiac Index</i> , Herzindex
cm	Zentimeter
Cu/Zn-SOD	Kuper/Zink-Superoxiddismutase
DAG	Diacylglycerol
DDT	Dichlordiphenyltrichloroethan
df	<i>dilution factor</i> , Verdünnungsfaktor
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS (DNA)	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis(2 - Nitrobenzoesäure)
e ⁻	Elektron
EC-SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EvG	Elastica-van-Gieson-Färbung
F344	Fisher - Ratte
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisenion
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisenion
Fe-SOD	Eisen-Superoxiddismutase
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G _i -Protein	inhibitorisches Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion, reduziertes
GSSG	Glutathion, oxidiertes
GTP	Guanosintriphosphat
H/E-Färbung	Hämatoxylin - Eosin - Färbung
H ⁺	Wasserstoffion
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase
IF	interstitielle Fibrose
iNOS	induzierbare Nitritmonoxid-Synthase
ISHLT	<i>International Society for Heart and Lung Transplantation</i>

ITP	Inositol 1,4,5 - Triphosphat
IVUS	intravaskulärer Ultraschall
K^+_{ATP}	ATP-abhängiger Kaliumkanal
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
l/min	Liter pro Minute
l/min/m ²	Liter pro Minute pro Quadratmeter
L·	Lipidradikal
Lew	Lewis-Ratte
L-OO·	Lipidperoxyradikal
L-OOH	Lipidhydroperoxid
LPO	Lipidperoxid
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MCDP	10 – (N – Methylcarbamoyl) – 3,7 – (Dimethylamino) - Phenothiazin
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mito K^+_{ATP}	mitochondrialer ATP-abhängiger Kaliumkanal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (molare Masse)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Mn/Ni-SOD	Mangan-Nickel-Superoxiddismutase
Mn-SOD	Mangan-Superoxiddismutase
MPA	Metaphosphorsäure
MPTP	mitochondriale Permeabilität – Transition – Pore
ms	Millisekunde
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycine</i>
MTP	Microtiterplatte
Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher	Natrium/Kalzium-Austauscher (Ionenkanal)
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium/Kalium-Pumpe
NAD ⁺ /NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinsäureamid – Adenin – Dinukleotid - Phosphat
NaN ₃	Natriumazid

nm	Nanometer
nm/min	Nanometer pro Minute
nmol/ml	Nanomol pro Milliliter
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid - Synthase
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
O ₂	Sauerstoff
OH ⁻	Hydroxidion
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCWP	pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PKC	Proteinkinase C
PKC-ε, PKC-δ	Isoformen der Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
RA-Druck	rechtsatrialer Druck
Reg.-Nr.	Registriernummer
R-O·	Alkoxyradikal
R-OH	Alkohol
R-OO·	Peroxyradikal
R-OOH	Hydroperoxid
R-O-O-R	Peroxidbindung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
$\text{sarcK}^+_{\text{ATP}}$	sarcolemmaler ATP-abhängiger Kaliumkanal
SH-Gruppe	Thiol-Gruppe
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SOD	Superoxiddismutase
TMB	Tetramethylbenzidin
TVP	Transplantatvaskulopathie
U	<i>Unit</i> = Einheit
U/mg	<i>Units</i> pro Milligramm (<i>Units</i> = Einheiten)
U/ml	<i>Units</i> pro Milliliter (<i>Units</i> = Einheiten)
V.	Vena, Vene
vs.	versus
Vv.	Venae, Venen

WHO

World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Inhaltsverzeichnis	7
1. Zusammenfassung.....	10
2. Einleitung.....	13
2.1 Die humane Herztransplantation.....	13
2.1.1 Indikation zur Herztransplantation.....	13
2.1.2 Spenderauswahl	14
2.1.3 Spenderoperation und Konservierung.....	15
2.1.4 Empfängeroperation.....	15
2.1.5 Transplantatabstossung.....	16
2.1.6 Immunsuppression nach Herztransplantation	20
2.1.7 Morbidität und Mortalität nach Herztransplantation	20
2.2 Grundlagen des oxidativen Stresses.....	21
2.2.1 Sauerstoffradikale	21
2.2.2 Lipidperoxidation	24
2.3 Antioxidanzien.....	26
2.3.1 Enzymatische Antioxidanzien	27
2.3.2 Nichtenzymatische Antioxidanzien.....	29
2.4 Der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden	30
2.5 Die myokardiale Präkonditionierung durch volatile Anästhetika	34
3. Ziele der Arbeit	36
4. Material und Methoden	37
4.1 Tierversuch	37
4.1.1 Versuchstiere	37
4.1.2 Versuchsaufbau und Versuchsgruppen	37

4.1.3	Heterotopes allogenenes Rattenherztransplantationmodell.....	39
4.1.4	Nachsorge.....	41
4.1.5	Probengewinnung	42
4.2	Probenanalyseverfahren	43
4.2.1	Proteinbestimmung	43
4.2.2	Superoxiddismutase-Assay.....	44
4.2.3	Katalase-Assay	46
4.2.4	Glutathionperoxidase-Assay	48
4.2.5	Reduziertes und oxidiertes Glutathion	50
4.2.6	Lipidhydroperoxide.....	52
4.2.7	Bestimmung der 4-HNE-Addukte.....	54
4.2.8	Histologie	55
4.3	Statistische Verfahren	58
5.	Ergebnisse	59
5.1	Auswertung der Operationsprotokolle der Transplantation	59
5.2	Einfluß von unterschiedlichen Narkoseformen auf die Aktivität der enzymatischen Antioxidanzien	60
5.2.1	Einfluß der Narkoseform auf die Aktivität der Superoxiddismutase.....	60
5.2.2	Einfluß der Narkoseform auf die Aktivität der Katalase.....	61
5.2.3	Einfluß der Narkoseform auf die Aktivität der Glutathionperoxidase	62
5.3	Einfluß von unterschiedlichen Narkoseformen auf die nichtenzymatischen Antioxidanzien.....	64
5.3.1	Einfluß der Narkoseform auf den Gesamtgehalt des Glutathions (GSht)	64
5.3.2	Einfluß der Narkoseform auf den Gehalt an reduziertem Glutathion (GSH)...	65
5.3.3	Einfluß der Narkoseform auf den Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSSG) ..	66
5.3.4	Einfluß der Narkoseform auf die Redox-Ratio von Glutathion.....	67
5.4	Einfluß von unterschiedlichen Narkoseformen auf die Lipidperoxidation	68
5.4.1	Einfluß der Narkoseform auf die Lipidperoxidation.....	68

5.4.2	Einfluß der Narkoseform auf die Bildung von 4-HNE	69
5.5	Einfluss von unterschiedlichen Narkoseformen auf die Entwicklung einer chronischen Transplantatabstossung.....	71
5.5.1	Einfluss von unterschiedlichen Narkoseformen auf die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie	74
5.5.2	Einfluss von unterschiedlichen Narkoseformen auf die Entwicklung einer interstitiellen Fibrose	76
6.	Diskussion	77
7.	Schlussfolgerung	93
8.	Literaturverzeichnis	95
Anhang	107
Reagenzien	107
Labormaterialien.....	108
Danksagung	110
Lebenslauf.....	111
Ehrenwörtliche Erklärung.....	112

1. Zusammenfassung

Im Rahmen einer Herztransplantation ist es unvermeidbar, dass das Spenderorgan einer Ischämie ausgesetzt ist. Sowohl durch die Ischämie als auch durch die anschließende Reperfusion des Spenderherzens mit sauerstoffreichem Blut, kommt es durch oxidativen Stress zu einer Reihe von Schäden am Myokard, die als Ischämie-Reperfusionsschaden zusammengefasst werden. Um dem oxidativen Stress entgegen zu wirken, besitzen Zellen verschiedene Abwehrmechanismen. Diese sind in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies abzufangen und in weniger schädliche Moleküle umzuwandeln. Eine Spätfolge des Ischämie-Reperfusionsschadens ist die chronische Transplantatabstossung mit Transplantatvaskulopathie (TVP) und interstitieller Fibrose (IF), welche massgeblich das Langzeitüberleben nach einer Herztransplantation beeinflussen. Eine Möglichkeit auf den Ischämie-Reperfusionsschaden einzuwirken ist die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung. Hierbei werden durch die Verabreichung eines volatilen Anästhetikums vor dem Ischämieereignis zelluläre Abwehrmechanismen gestärkt und der Ischämie-Reperfusionsschaden abgeschwächt.

In der vorliegenden Dissertation wurde anhand eines heterotopen Rattenherztransplantationsmodells untersucht, inwieweit volatile Anästhetika (Isofluran) im Vergleich zu nicht-volatilen Anästhetika (Nembutal[®]) in der Lage sind, das Myokard vor einem Ischämieereignis zu präkonditionieren. Ziel war es herauszufinden, inwiefern durch die Wahl des Anästhetikums antioxidative Schutzmechanismen der Zellen langfristig gestärkt werden können und sich die Entstehung einer chronischen Transplantatabstossung beeinflussen lässt. Ferner wurde untersucht, inwieweit die Aktivität bzw. der Gehalt bestimmter Antioxidanzien und von Lipidperoxiden einen Rückschluss auf den Schweregrad des initialen oxidativen Stressereignisses zulassen.

Für diesen Versuch wurden die Herzen von Lewis-Ratten heterotop an die Abdominalgefäße von Fisher-Ratten anastomosiert. Jedes Transplantationspaar erhielt hierbei die gleiche Narkoseform (volatil vs. intraperitoneal). Die Ischämiezeit des zu transplantierenden Herzens variierte zwischen 30 Minuten und 8 Stunden. Nach einer Nachbeobachtungszeit von 70 bzw. 140 Tagen, wurden die Transplantate entnommen und Biomarker des oxidativen Stresses bestimmt. Es erfolgten Aktivitätsmessungen der Superoxiddismutase, der Katalase und der Glutathionperoxidase anhand von Enzymtests. Des Weiteren wurden der

Glutathiongehalt, die Redox-Ratio des Glutathions sowie der Anteil von Lipidperoxiden im Gewebe ermittelt. Immunhistochemisch erfolgte die Quantifizierung von 4-Hydroxy-2-nonenal im Gewebe. Zur Graduierung des Ausmasses der chronischen Abstossungsreaktion, kam ein definiertes *Scoring-System* unter Einbeziehung wichtiger histopathologischer Parameter zur Anwendung. Am Ende des Tierversuches wiesen alle Transplantate eine vergleichbar gute Transplantatfunktion auf. Für die untersuchten Marker des oxidativen Stresses Katalase, Glutathionperoxidase, dem Gesamtgehalt an Glutathion sowie dem oxidierten und reduzierten Glutathion, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen bezogen auf die Wahl des Narkosemittels. Die Aktivität der Superoxiddismutase zeigte lediglich zwischen den Gruppen, die einer achtstündigen Ischämie ausgesetzt waren und 70 Tage nachbeobachtet wurden, einen Unterschied. Hier war die Aktivität der Superoxiddismutase in der Isoflurangruppe signifikant niedriger als in der Nembutal[®]-Gruppe. Zwischen den anderen Gruppen fand sich kein Unterschied in der Aktivität der Superoxiddismutase. Zwischen den selben beiden Gruppen konnte auch ein signifikanter Unterschied in der Redox-Ratio des Glutathions nachgewiesen werden. Diese war in der Isoflurangruppe deutlich niedriger als in der Nembutal[®]-Gruppe. Für die Konzentration der Lipidperoxide und des 4-HNE, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Auch hinsichtlich des Grades der chronischen Abstossung, insbesondere der Transplantatvaskulopathie und der Fibrose, konnte kein relevanter Unterschied beobachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergaben keinen Anhalt dafür, dass zum Zeitpunkt der Transplantatentnahme die Transplantate oxidativen Stress erfahren hatten. Es zeigte sich sogar, dass einige der untersuchten Parameter im Normbereich lagen. Da sich in allen Gruppen ein vergleichbarer Grad der chronischen Abstossung, insbesondere der Transplantatvaskulopathie und der Myokardfibrose zeigte, konnte ein Einfluss der Narkoseform hierauf nicht nachgewiesen werden.

Es läßt sich schlussfolgern, dass sich die antioxidativen Schutzmechanismen der Herzmuskelzelle durch die Wahl der Narkoseform nicht langfristig beeinflussen lassen. Auch kann man anhand der gemessenen Marker keinen Rückschluss auf das Ausmass des oxidativen Stresses zum Zeitpunkt der Transplantationsoperation ziehen. Lediglich die Aktivität der Katalase und der Glutathionperoxidase, sowie der

Nachweis von Lipidperoxiden weisen auf ein früheres oxidatives Stressereignis hin. Eine Einflussnahme auf die Entwicklung der chronischen Transplantatabstossung scheint durch die Wahl der Narkose nicht möglich zu sein.

2. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, zählen laut WHO zu den weltweit am häufigsten zum Tode führenden Krankheiten (www.WHO.int). Als Folge verschiedenster Erkrankungen des Herzens entwickelt sich das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz (Hunt et al. 2005), in deren Endstadium die Herztransplantation als ultima-ratio-Therapie zur Verfügung steht (Starling 1997, Hunt et al. 2005, Large 2007, Struber et al. 2007). Seit 1983 wurden weltweit ca. 104 000 Herztransplantationen durchgeführt. Die durchschnittliche 1-Jahresüberlebensrate nach erfolgreicher Transplantation wird mit ca. 80 % angegeben. Patienten, die das erste Jahr nach Transplantation überleben, haben eine 63-prozentige Wahrscheinlichkeit, die nächsten 10 Jahre zu überleben. Aktuell wird das Langzeitüberleben herztransplantierter Patienten durch die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie und das Auftreten maligner Erkrankungen determiniert (Stehlik et al. 2012).

2.1 Die humane Herztransplantation

2.1.1 Indikation zur Herztransplantation

Die Indikation zur Herztransplantation besteht im Endstadium der Herzinsuffizienz, wenn die voraussichtliche Lebenserwartung ohne Transplantation 6-12 Monate beträgt (Schmid et al. 2009). Als Hauptursachen für die Entwicklung einer terminalen Herzinsuffizienz sind die nicht-ischämische Kardiomyopathie (53,8 %) und die ischämische Kardiomyopathie (37,1 %) zu nennen (Stehlik et al. 2012). Derzeit existieren zwei Klassifikationssysteme zur Beschreibung des Schweregrades der Herzinsuffizienz (**Tabelle 1**). Die Klassifikation der *New York Heart Association* (NYHA) orientiert sich am Beschwerdebild des Patienten und gibt vier Schweregrade an. Die Klassifikation der *American Heart Association* (AHA) und des *American College of Cardiology* (ACC) (Bosco et al. 2011) berücksichtigt strukturelle Schäden des Myokards sowie das Beschwerdebild des Patienten (Hunt et al. 2005, Dickstein et al. 2008).

Tabelle 1: Klassifikationen der Herzinsuffizienz (Dickstein et al. 2008)

ACC/AHA* -Klassifikation		NYHA** -Klassifikation	
A	Hohes Risiko eine Herzinsuffizienz zu entwickeln; keine strukturellen oder funktionellen Myokardschäden	I	Keine Symptome
B	Vorhandensein einer strukturellen Herzerkrankung, die streng mit der Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert ist; keine Symptome	II	Symptome (Luftnot, Müdigkeit, Palpitation) bei normaler körperlicher Belastung
C	Vorhandensein einer strukturellen Herzerkrankung mit Zeichen der Herzinsuffizienz	III	Symptome (Luftnot, Müdigkeit, Palpitation) bei leichter körperlicher Belastung
D	Vorhandensein einer voranschreitenden strukturellen Herzerkrankung mit Zeichen der Herzinsuffizienz in Ruhe trotz maximaler medikamentöser Therapie	IV	Symptome (Luftnot, Müdigkeit, Palpitation) bereits in Ruhe, Zunahme der Beschwerden bei kleinster körperlicher Anstrengung
* = American College of Cardiology (ACC); American Heart Association (AHA)			
** = New York Heart Association (NYHA)			

Damit ein Patient für eine Herztransplantation gelistet werden kann, sind neben einer ausführlichen Anamneseerhebung weitere umfassende apparative Untersuchungen notwendig. Da die reduzierte Leistungskapazität des Betroffenen das Hauptsymptom der Herzinsuffizienz darstellt, bilden Belastungstests die Grundlage für die Indikationsstellung zur Transplantation (Schmid et al. 2009). Um den größten Nutzen in Bezug auf Lebensqualität und Überleben zu erhalten, müssen weitere Kriterien erfüllt sein, um für eine Herztransplantation gelistet werden zu können. Beispielsweise kommen Patienten mit einer früheren Krebserkrankung nur nach einer 5-jährigen Remission für eine Transplantation in Frage. Der Diabetes mellitus, das Rauchen sowie Nierenfunktionsstörungen gelten als relative Kontraindikationen. Ein aktiver Substanzmißbrauch stellt eine absolute Kontraindikation dar (Mehra et al. 2006).

2.1.2 Spenderauswahl

In Deutschland erfolgt die Vermittlung von Spenderorganen durch die Stiftung Eurotransplant in Leiden/Holland. Dabei ist die Blutgruppenkompatibilität Grundvoraussetzung für die Durchführung einer Organtransplantation, wobei Spender der Blutgruppe „0“ als Universalspender angesehen werden (Schmid et al. 2009). Des Weiteren sollte die Körperlänge zwischen Spender und Empfänger nicht mehr als 30% voneinander abweichen (Costanzo 2010), da ein zu kleines

Spenderherz möglicherweise nicht in der Lage ist, nach der Transplantation eine für den Empfängerorganismus ausreichende Pumpleistung zu erbringen (Grauhan 2003, Beyersdorf et al. 2005). Neben diesen Voraussetzungen muss eine gute Funktion des zu transplantierenden Herzens gegeben sein. Dazu gehört auch der Ausschluss einer koronaren Herzkrankheit, weswegen bei Spendern über 45 Jahren eine Koronarangiographie empfohlen wird. Nicht zuletzt erfolgt die visuelle und manuelle Inspektion des zu entnehmenden Herzens (Grauhan 2003, Beyersdorf et al. 2005, Schmid et al. 2009).

2.1.3 Spenderoperation und Konservierung

Nach Freilegung des zu entnehmenden Herzens, erfolgt zunächst die Mobilisierung aller großen Gefäße sowie die Umschlingung beider Hohlvene mit jeweils einer Ligatur. In die proximale Aorta ascendens wird eine Kardioplegiekanüle platziert. Nach systemischer Heparin-gabe, werden beide Vv. cavea ligiert, so dass in der Folge der linke Ventrikel kein Blut mehr auswerfen kann. Nun erfolgt das „*cross-clamping*“ der Aorta ascendens distal der Kardioplegiekanüle und die Konservierungslösung kann appliziert werden. Nach Eintritt des Herzstillstandes und ausreichender Perfusion des Spenderherzens, beginnt man die Entnahme mit der Durchtrennung der beiden Hohlvenen, gefolgt vom Absetzen der Lungenvenen und der Durchtrennung der Aorta ascendens sowie der beiden Pulmonalarterien kurz hinter der Bifurkation. Nach der Entnahme erfolgt eine Inspektion der Herzhöhlen sowie der Herzklappen, anschließend wird das Herz steril in kalter Konservierungslösung gelagert und transportiert. In deutschen Herzzentren wird zur Organkonservierung vorwiegend die sogenannte Bretschneiderlösung verwendet (Beyersdorf et al. 2005, Schmid et al. 2009).

2.1.4 Empfängeroperation

Die Operationstechnik nach Lower und Shumway gilt bis heute als Standardtechnik der orthotopen Herztransplantation. Nach medianer Sternotomie und Längsinzision des Perikards, erfolgt die Etablierung der extrakorporalen Zirkulation. Ist das Herz mittels kardiopleger Lösung stillgelegt, beginnt man mit der Exzision des kranken Herzens, wobei die Hinterwand der beiden Vorhöfe im Mündungsbereich der

Hohlvenen bzw. der Lungenvenen in situ belassen wird. Aorta ascendens und A. pulmonalis werden herznah durchtrennt. Nachdem am Spenderherzen die Hinterwand des linken Vorhofs im Bereich der Lungenvenenmündung entfernt worden ist, beginnt man mit der Anastomose des linken Vorhofs des Spenderherzens mit der Hinterwand des linken Vorhofs des Empfängers in fortlaufender Naht. Bevor mit der Anastomose des rechten Vorhofs begonnen werden kann, inzidiert man das Spenderherz beginnend an der unteren Hohlvene in Richtung des rechten Vorhofes. Der rechte Vorhof kann nun in fortlaufender Naht anastomosiert werden. Als letztes werden A. pulmonalis und Aorta ascendens in ebendieser Reihenfolge mit den entsprechenden Empfängergefäßen end-zu-end vernäht. Insgesamt sind bei dieser Technik vier Anastomosen notwendig (Kirklin et al. 2002, Beyersdorf et al. 2005, Schmid et al. 2009). Eine weitere Operationstechnik stellt die bikavale Technik dar, bei der die obere und die untere Hohlvene des Spenderherzens einzeln mit der oberen bzw. unteren Hohlvene des Empfängers verbunden werden. Für diese Technik wird der rechte Vorhof nicht inzidiert (Beyersdorf et al. 2005, Schmid et al. 2009). Der Vorteil der bikavalen Technik gegenüber der eben beschriebenen Technik nach Lower und Shumway, ist ein intakter rechter Vorhof mit weniger Insuffizienzen der Trikuspidalklappe, eine bessere rechtsventrikuläre Funktion und weniger Sinusknotendysfunktionen (Beyersdorf et al. 2005, Hunt und Haddad 2008, Schmid et al. 2009).

2.1.5 Transplantatabstossung

Bekommt das transplantierte Herz nach Freigabe der Zirkulation Kontakt mit dem Blut des Empfängers, werden eine Reihe von Mechanismen in Gang gesetzt, die, sollten sie unbehandelt bleiben, das transplantierte Organ schädigen können. Es ist sogar ein Verlust des Transplantats möglich (Kirklin et al. 2002). Abhängig vom zeitlichen Verlauf, unterscheidet man die akute und die chronische Abstossung.

2.1.5.1 Die akute Transplantatabstossung

Die akute Abstossung tritt häufig in den ersten 6 Monaten nach einer Herztransplantation auf. Man unterscheidet hierbei die zelluläre und die antikörpervermittelte (humorale) Abstossung, wobei die zelluläre Abstossung häufiger auftritt als die humorale Abstossung (Costanzo et al. 2010).

Die akute zelluläre Abstossung

Das Immunsystem des Empfängers erkennt das Transplantat durch direkte oder indirekte Alloerkennung als fremd. Den T-Zellen des Empfängers werden durch körpereigene Antigen-präsentierende Zellen (APC) oder durch APC des Spenders, MHC-Fragmente bzw. MHC-Moleküle präsentiert (MHC = *Major Histocompatibility Complex*). Durch eine Interaktion der APC mit dem T-Zellrezeptor, werden die T-Zellen aktiviert. Die Folge ist eine Infiltration des Myokards mit Abwehrzellen. Um den Schweregrad der Abstossung bestimmen zu können, hat die *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) 1990 ein *Grading-System* eingeführt, welches 2004 überarbeitet wurde (**Tabelle 2**) (Stewart et al. 2005, Baba et al. 2011).

Tabelle 2: ISHLT-Grading zur akuten zellulären Abstossung (Stewart et al. 2005, Baba et al. 2011)

Abstossungsgrad	Histopathologischer Befund
0 R	Keine Abstossung
1 R (mild)	Interstitielles und/oder perivaskuläres Infiltrat, höchstens ein Fokus mit Myozytenschaden
2 R (moderat)	Zwei oder mehr Infiltrate mit begleitendem Myozytenschaden
3 R (schwer)	Diffuses Infiltrat mit multifokalem Myozytenschaden, fakultativ mit Ödem, Einblutung und/oder Vaskulitis

„R“ bedeutet, dass das Grading von 2004 gemeint ist, um Verwechslungen mit dem Grading-System von 1990 zu vermeiden

Die akute humorale Abstossung

Die akute Antikörper-vermittelte (humorale) Abstossung, ist durch eine Endothelschwellung, ein interstitielles Ödem und vaskulären Ablagerungen von Immunglobulinen und Komplementfaktoren gekennzeichnet (Baba et al. 2011). Für die Bestimmung des Schweregrades einer humoralen Abstossung, hat die ISHLT ebenfalls ein Grading-System eingeführt (**Tabelle 3**) (Stewart et al. 2005). Patienten, die eine humorale Abstossung erfahren, haben eine erhöhte Gefahr des Transplantatversagens und damit verbunden auch eine erhöhte Mortalität. Da es keine eindeutigen klinischen Symptome gibt, sollte bei jedem transplantierten Patienten, der eine ungeklärte Transplantatdysfunktion aufweist, der Ausschluss einer humoralen Abstossung erfolgen (Stewart et al. 2005, Baba et al. 2011).

Tabelle 3: ISHLT-Grading zur akuten humoralen Abstossung (Stewart et al. 2005, Baba et al. 2011)

Abstossungsgrad	Befund
AMR 0	Kein Nachweis einer AMR
AMR 1	Nachweis einer AMR*

AMR = Antibody-Mediated Rejection (Antikörper-vermittelte Abstossung)
* = Nachweis von Immunglobulinen und Komplementfaktoren (C3d, C4d und/oder C1q) in Kapillaren; Nachweis von Makrophagen in der Immunoperoxidase-Färbung; histologische Befunde wie Endothelschwellung, interstitielles Ödem, Hämorrhagien, intravaskuläre Thromben, Myozytenschäden

Eine Sonderform der humoralen Abstossung, ist die hyperakute Abstossung, bei der es aufgrund präformierter Antikörper im Blut des Empfängers zu einer Aktivierung des Komplementsystems kommt, was innerhalb weniger Minuten bis Stunden zu einem Verlust des Transplantates führen kann (Kirklin et al. 2002, Costanzo et al. 2010).

2.1.5.2 Die Transplantatvaskulopathie und die interstitielle Fibrose

Die Transplantatvaskulopathie (TVP) und die interstitielle Fibrose sind die histomorphologischen Korrelate der chronischen Transplantatabstossung (Booth und Bishop 2010) und sind im Langzeitverlauf nach Herztransplantation Ursachen für Morbidität und Mortalität der Patienten (Stehlik et al. 2012). Bei der TVP handelt sich um eine das gesamte koronare Strombett betreffende Störung der regelnden Funktionen der Endothelzellen mit nachfolgender Proliferation vor allem glatter Gefäßmuskelzellen. Die dadurch entstehenden sogenannten Intimaproliferate führen zu einer mehr oder minder stark ausgeprägten Lumeneinengung der Gefäße. Charakteristisch für den Befall größerer Koronararterien (> 50 µm) ist eine konzentrische, stenosierende Hyperplasie der Intima und eine Verdünnung der Media. In der Endstrombahn des Koronarsystems finden sich luminale Stenosen von Arteriolen und Kapillaren, die auf eine Vermehrung der glatten Gefäßmuskelzellen zurückzuführen sind. Baba und Mitarbeiter sprechen sogar von einem Klassenwechsel von Kapillaren zu Blutgefäßen mit glattmuskulären Zellen (Baba et al. 2011). Die Entstehung der TVP wird auf ein Zusammenspiel immunologischer und nichtimmunologischer Reaktionen zurückgeführt (Suzuki et al. 2010). Ein auslösender Faktor der TVP ist der Ischämie-Reperfusionsschaden, welcher zu einer langstreckigen Schädigung des Endothels mit daraus resultierender Störung der Endothelfunktion führt. Aufgrund der Endothelschädigung bekommen im Blut zirkulierende Zytokine Kontakt zu den unter der Intima liegenden Gefäßschichten,

was zu einem deutlichen Wachstum der glatten Gefäßmuskulatur führt (Ramzy et al. 2005). Da das transplantierte Herz denerviert ist, verläuft die TVP häufig klinisch stumm und zeigt erst im Spätstadium Zeichen der Myokardischämie wie Transplantatversagen, Arrhythmien oder Herzinfarkte (Baba et al. 2011). Als primäres diagnostisches Werkzeug steht die Koronarangiographie zur Verfügung. Die ISHLT hat, basierend auf den Befunden der Koronarangiographie, eine einheitliche Nomenklatur zur Beurteilung der TVP vorgeschlagen (**Tabelle 4**) (Mehra et al. 2010).

Tabelle 4: Empfohlene ISHLT-Nomenklatur der TVP (Mehra et al. 2010)

Angiographiebefund
CAV₀ (nicht signifikant): keine Läsion zu detektieren
CAV₁ (mild): linker Hauptstamm < 50 % stenosierte, oder primäres Gefäß mit maximaler Läsion < 70 %, oder jegliches Gefäß mit einer Stenosierung < 70 % ohne Transplantatdysfunktion**
CAV₂ (moderat): linker Hauptstamm 50 - 69 % stenosierte, oder ein einzelnes primäres Gefäß ≥ 70 % stenosierte, oder isolierte Stenosen ≥ 70 % in kleineren Gefäßen zweier Koronararterien, ohne Transplantatdysfunktion**
CAV₃ (schwer): linker Hauptstamm > 70 % stenosierte, oder ≥ 2 primäre Gefäße mit Stenosen > 70 %, oder Stenosen > 70 % in kleineren Gefäßen aller drei Koronararterien, oder CAV ₁ oder CAV ₂ mit Transplantatdysfunktion** oder Hinweis auf restriktive Störung***
<p><i>Definitionen:</i></p> <p>* primäres Gefäß = proximales Drittel des Ramus interventricularis anterior, des Ramus circumflexus und die rechte Koronararterie</p> <p>** Transplantatdysfunktion = LVEF ≤ 45 % mit regionalen Wandbewegungsstörungen</p> <p>*** restriktive Störung = symptomatische Herzinsuffizienz mit echokardiographischem E/A > 2, verkürzter isovolumetrischen Relaxationszeit (< 60 ms), verkürzter Dezelerationszeit (< 150 ms) oder einem restriktiven Muster in der Rechtsherzkathetermessung (RA-Druck < 12 mmHg, PCWP > 25 mmHg, CI < 2 L/min/m²)</p> <p>(CAV = Cardiac Allograft Vasculopathy; LVEF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion; RA-Druck = rechtsatrialer Druck; PCWP = pulmonalkapillärer Verschlussdruck; CI = Herzindex)</p>

Die interstitielle Fibrose des Transplantats stellt ein weiteres Charakteristikum der chronischen Transplantatabstossung dar. Hierbei handelt es sich um eine Ansammlung von netzartigen Fasern, unter anderem aus extrazellulärer Matrix bestehend, welche die Kardiomyozyten umgeben. Als Ursachen für die Ausbildung einer interstitiellen Fibrose gelten der Ischämie-Reperfusionsschaden sowie Abstossungsreaktionen. In beiden Fällen kommt es zu einer Schädigung des Myokards, was Reparaturvorgänge in Gang setzt, bei denen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren freigesetzt werden (Booth und Bishop 2010). Zytokine und Wachstumsfaktoren führen unter anderem zu einer Proliferation von Fibroblasten,

den Produzenten extrazellulärer Matrix (Krenning et al. 2010). Die Folgen der Fibrosierung am Myokard sind die diastolische Dysfunktion aufgrund einer Versteifung des Herzgewebes sowie eine Störung der elektromechanischen Kopplung, was die Ausbildung gefährlicher Arrhythmien begünstigt (Booth und Bishop 2010, Krenning et al. 2010).

2.1.6 Immunsuppression nach Herztransplantation

Um eine Abstossung des neuen Organs zu verhindern, ist es notwendig das Immunsystem des Empfängers zu unterdrücken. Die Reaktivität des Immunsystems und das Auftreten von Abstossungsreaktionen sind in der Frühphase der Transplantation am größten und nehmen mit zunehmendem Abstand zur Transplantation ab. Da die Immunreaktion nie vollständig erlischt, ist eine lebenslange Einnahme von Immunsuppressiva unerlässlich (Schmid et al. 2009). Im Vordergrund der Immunsuppression steht die Hemmung der Aktivität, Proliferation und Differenzierung der T-Zellen (Kirklin et al. 2002, Costanzo et al. 2010). Zur Anwendung kommen Kortikosteroide, Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, Tacrolimus), Zytostatika (Mycophenolat-Mofetil, Azathioprin), mTOR-Inhibitoren (Sirolimus) und Antikörper (Schmid et al. 2009, Costanzo et al. 2010). Da viele Immunsuppressiva nicht selektiv auf Lymphozyten oder andere Immunzellen wirken, haben sie ein erhebliches Potenzial an Nebenwirkungen (Schmid et al. 2009).

2.1.7 Morbidität und Mortalität nach Herztransplantation

Die mediane Überlebensrate nach einer Herztransplantation beträgt 10 Jahre (Stehlik et al. 2012), wobei die ersten 12 Monate nach der Transplantation mit dem höchsten Mortalitätsrisiko behaftet sind (Stehlik et al. 2011). Zu den relevanten Risikofaktoren gehören die präoperative Dialysepflichtigkeit, die Abhängigkeit von einem Herzunterstützungssystem, die Notwendigkeit einer Beatmung vor der Operation, sowie präoperativ bestehende Infektionen, die eine intravenöse Antibiotikatherapie notwendig machen, sowie die Ischämiezeit des Spenderorgans (Stehlik et al. 2012). Die 5-Jahres Mortalität hingegen wird durch Abstoßungsepisoden im ersten Jahr nach Transplantation, durch das Schema der Immunsuppression sowie durch eine postoperativ bestehende Dialysepflichtigkeit bestimmt. Die 10-Jahres-Sterblichkeit

wird durch die gleichen Risikofaktoren der 1- bzw. 5-Jahres-Mortalität bestimmt, wobei ein zusätzlicher signifikanter Risikofaktor das Geschlecht ist. Herzen von weiblichen Spendern scheinen ein höheres Sterblichkeitsrisiko nach sich zu ziehen (Stehlik et al. 2010). Die Haupttodesursache in den ersten 30 Tagen nach der Transplantation ist das primäre Transplantatversagen, gefolgt vom Multiorganversagen und Infektionen, welche im ersten Jahr nach Transplantation die vorrangige Todesursache darstellen. Mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Transplantation, treten die Malignome an die erste Stelle der Todesursachen, gefolgt vom Transplantatversagen und der Transplantatvaskulopathie (Costanzo et al. 2010, Stehlik et al. 2011). Weitere Nebenerkrankungen, die im Zusammenhang mit einer Herztransplantation auftreten können, sind der Hypertonus, der Diabetes mellitus, Nierenfunktionsstörungen sowie Cortikosteroid-induzierte Knochenerkrankungen, wobei die meisten Erkrankungen zumindest teilweise auch als Nebeneffekte der Therapie mit Immunsuppressiva zu verstehen sind (Costanzo et al. 2010).

2.2 Grundlagen des oxidativen Stresses

Oxidativer Stress ist ein Zustand, in dem Oxidanzien, so genannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS), sowie reaktive Stickstoffverbindungen, intra- oder extrazellulär produziert werden und schädigend auf Zellen wirken. Dem Zugrunde liegt ein Ungleichgewicht zwischen Oxidanzien und Antioxidanzien, wobei das Verhältnis zugunsten der Oxidanzien verschoben ist. Oxidativer Stress findet dabei sowohl während der Ischämie als auch in der postischämischen Reperfusionphase statt (Sies 1997, Becker et al. 1999, Misra et al. 2009).

2.2.1 Sauerstoffradikale

Freie Radikale sind Atome, Moleküle oder Ionen, die in einem Orbital ihrer Elektronenhülle ein ungepaartes und somit freies Elektron besitzen. Zumeist handelt es sich dabei um Stoffe mit einer ungeraden Anzahl an Elektronen (Atkins et al. 2006). Molekularer Sauerstoff ist ein Biradikal, welches zwei ungepaarte Elektronen mit parallelem Spin aufweist. 95% des zellulär verfügbaren Sauerstoffs werden in der mitochondrialen Atmungskette zu Wasser reduziert, wobei unter physiologischen Bedingungen keine Radikale als Zwischenprodukte entstehen. Die verbleibenden 5%

werden in einzelnen Reaktionsschritten zu Wasser reduziert, wobei reaktive Sauerstoffspezies als Zwischenprodukte entstehen (Hess und Manson 1984). Die wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies, die bei diesem Prozess gebildet werden sind Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) (Fridovich 1978, Hess und Manson 1984, Sies 1997). Daneben entstehen bei der Reaktion dieser ROS mit biologischen Molekülen eine Reihe anderer Radikale, die ebenfalls als reaktive Sauerstoffspezies bezeichnet werden. Zu nennen sind Alkoxyradikale ($\text{R-O}\cdot$) und Peroxyradikale ($\text{R-OO}\cdot$), die bei der Reaktion mit Lipiden entstehen, der Singulett-Sauerstoff, Nitritoxidradikale und Peroxinitrite (Sies 1993, Sies 1997).

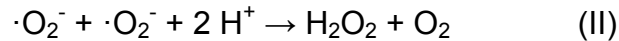
Unter pathologischen Bedingungen entstehen im Myokard vermehrt Sauerstoffradikale nicht nur in Mitochondrien sondern auch in Endothelzellen und Leukozyten. Zusätzlich tragen die Autooxidation von Katecholaminen sowie die membranständige Arachidonsäurekaskade zur Radikalentstehung bei (Ferrari et al. 1991, Ferrari et al. 1992).

Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2^-$) entstehen im Organismus physiologisch bei der Autooxidation von Hydroquinonen, Leukoflavinen, Katecholaminen, Thiolen und Tetrahydropterinen (Fridovich 1978). Daneben ist auch eine Reihe von Enzymen an der Bildung von Superoxidanionen beteiligt. Zu nennen sind die Xanthin-Oxidase, die Aldehyd-Oxidase und die NADH/NADPH-Oxidasen (Cross und Jones 1991, Elahi et al. 2009, Fridovich 1978). Ein Molekül Sauerstoff wird hierbei durch die Aufnahme eines Elektrons (e^-) zu einem Superoxidanion (I) reduziert (Fridovich 1978, Hess und Manson 1984, Sies 1993, Sies 1997).



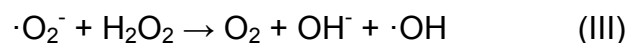
Das Superoxidanion ($\cdot\text{O}_2^-$) ist relativ reaktionsträge und liegt in wässrigem Milieu zusammen mit seiner protonierten Form, dem Hydroperoxyradikal ($\cdot\text{HO}_2$), vor. Das Hydroperoxyradikal ist in der Lage organische Moleküle wie ungesättigte Fettsäuren der Zellmembranen zu Alkoxyradikalen zu oxidieren. Unter physiologischen Bedingungen wird dies durch die Dismutation der Superoxidanionen zu Wasserstoffperoxid verhindert (Jung et al. 2010). Diese Reaktion kann spontan ablaufen, wenn Superoxidanionen und Hydroperoxyradikale in gleicher molarer

Konzentration vorliegen (Ferrari et al. 1991), anderenfalls wird die Dismutation durch die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert (Hess und Manson 1984, Ferrari et al. 1991).

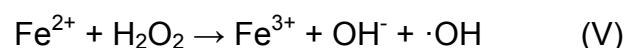


Wasserstoffperoxid kann zudem durch die zweifache Reduktion von molekularem Sauerstoff entstehen. Die Gefahr die für den Organismus durch Wasserstoffperoxid ausgeht, liegt in der Bildung von Hydroxylradikalen in der Haber-Weiss-Reaktion oder in der Fenton-Reaktion (Hess und Manson 1984, Ferrari et al. 1991).

In der Haber-Weiss-Reaktion entstehen Hydroxylradikale durch eine Ein-Elektronen-Übertragung von Superoxidanionen auf Wasserstoffperoxid (III):



Diese Reaktion findet jedoch nur statt, wenn sie durch Übergangsmetalle wie Eisen und/oder Kupfer katalysiert wird, wobei diese Metalle als Elektronenakzeptoren von Superoxidanionen (IV) und im Folgenden als Elektronendonatoren für Wasserstoffperoxid (V) dienen:

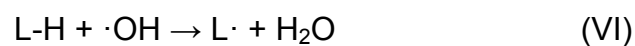


Reaktionsgleichung (V) entspricht der Fenton-Reaktion (Minotti und Aust 1989). Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$) sind sehr reaktive und instabile Radikale, die mit einer Vielzahl von organischen Verbindungen und Biomembranen reagieren. Dabei entstehen in einer Kettenreaktion neue Radikale, die bei unzureichendem zellulärem Schutz zur Inaktivierung von Enzymen, zu DNS-Schäden, Proteinvernetzungen und zu einem Verlust der Membranstabilität führen können (Hess und Manson 1984, Ferrari et al. 1991, Fridovich 1998). Aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer richten Hydroxylradikale den größten Schaden am Ort ihrer Entstehung an (Hippeli und Elstner 1997).

2.2.2 Lipidperoxidation

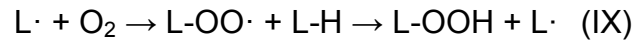
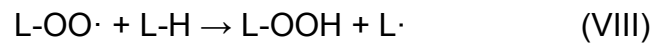
Lipide sind unterschiedlich aufgebaute Moleküle, die jedoch gleiche Eigenschaften in Bezug auf ihre Löslichkeit in organischen und wässrigen Lösungsmitteln aufweisen. Sie bestehen isoliert aus Fettsäuren oder setzen sich aus einem Grundgerüst aus Glycerin, Isopren oder Sphingosin und einer Fettsäure zusammen. Einige im menschlichen Körper vorkommende Fettsäuren sind die Palmitinsäure, Stearinsäure, die Ölsäure, sowie die Linolsäure, Linolensäure und die Arachidonsäure. Die letzten drei genannten gehören dabei zu der Gruppe der essenziellen Fettsäuren, da sie aufgrund ihrer mehrfachen Doppelbindungen nicht selbst vom Körper hergestellt werden können und über die Nahrung aufgenommen werden müssen. Lipide sind Bestandteile der Zellmembranen, dienen als Ausgangsstoffe für die Herstellung von biologisch aktiven Verbindungen (z.B. Hormone) und bilden den umfangreichsten Energiespeicher des Organismus (Horn et al. 2005, Löffler et al. 2007).

Bei der Lipidperoxidation wird Sauerstoff in ungesättigte Fettsäuren eingebracht, wobei Lipidhydroperoxide (L-OOH), Lipidperoxyradikale (L-OO·) und Lipidradikale (L·) entstehen. Der Mechanismus der Lipidperoxidation kann in drei Schritte unterteilt werden: Initiation, Ausbreitung / Kettenreaktion und Termination (Minotti und Aust 1992). Die Initiation erfolgt über eine Reaktion von ROS mit der C=C-Doppelbindung einer ungesättigten Fettsäure. Dabei wird ein Wasserstoffatom aus der Fettsäure herausgelöst und es entsteht ein Lipidradikal (L·) (VI), welches nun als konjugiertes Dien relativ schnell mit molekularem Sauerstoff zu einem Lipidperoxyradikal (L-OO·) (VII) weiterreagiert. Am Beispiel des Hydroxylradikals (·OH) kann man folgende Reaktionsgleichung formulieren (Hess und Manson 1984):



Das Lipidperoxyradikal (L-OO·) selbst kann nun mit der C=C-Doppelbindung einer benachbarten Fettsäure reagieren und dadurch ebenfalls ein Wasserstoffatom herauslösen, wodurch ein Lipidhydroperoxid (L-OOH) und ein Lipidradikal (L·) (VIII) entstehen. Daraus folgt eine Kettenreaktion (IX), in der das neu entstandene Lipidradikal mithilfe von molekularem Sauerstoff zu einem Lipidperoxyradikal

reagiert, welches die C=C-Doppelbindung einer Fettsäure angreift (Hess und Manson 1984, Minotti und Aust 1989, Minotti und Aust 1992):



Zum Abbruch dieser Kettenreaktion kommt es, wenn zwei Lipidradikale miteinander reagieren und ein nichtradikalisches Produkt bilden (Gutteridge 1995, Porter et al. 1995, Kelly et al. 1998). Des Weiteren können Lipidhydroperoxide mithilfe von Übergangsmetallen erneut zu Lipidperoxiden reagieren. Eine zentrale Rolle spielt dabei das Eisen, welches die Umwandlung von Lipidhydroperoxiden (L-OOH) in Alkoxyradikale (L-O \cdot) und Peroxyradikale (L-OO \cdot) katalysiert. Diese Radikale sind in der Lage eine Lipidperoxidation auszulösen (Minotti und Aust 1992, Gutteridge 1995, Kelly et al. 1998). Auf der anderen Seite werden Lipidhydroperoxide über verschiedene Wege zu sekundären Abbauprodukten der Lipidperoxidation umgewandelt. Dazu zählen Aldehyde wie Malondialdehyd oder 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE), Alkane (z.B. Ethan), Ketone, Alkohole und Furane (Gueraud et al. 2010, Niki 2008). Die Produkte der Lipidperoxidation haben verschiedene Auswirkungen im Organismus, da sie mit Proteinen, Membranbestandteilen, anderen Lipiden und sogar der DNS reagieren. Die meisten dieser Abbauprodukte sind in der Lage biologische Membranen durch passive Diffusion zu durchwandern oder sich durch Bindung an Membranlipide und Membranproteine in die Membran einzulagern, was eine Veränderung der Membraneigenschaften zur Folge hat. Zum Beispiel kommt es zu einer erhöhten Membranpermeabilität für Ionen, oder zu einer Beeinflussung der Signaltransduktion in die Zelle durch Interaktionen mit Phospholipasen. Die Membran selbst kann auch geschädigt werden, wobei es zu einem Zerreißen der Zellmembran oder zu deren Schrumpfung kommen kann. Aufgrund der Vielzahl von Interaktionsmöglichkeiten, kann es durch Produkte der Lipidperoxidation zu einer Reihe von Erkrankungen wie zum Beispiel der Atherosklerose, degenerativen Nervenerkrankungen und sogar zu Tumorerkrankungen kommen (Gueraud et al. 2010).

2.2.2.1 4-Hydroxy-2-nonenal

4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE) ist ein Aldehyd und entsteht während der Lipidperoxidation von ω -6-Fettsäuren wie der Linolsäure, der γ -Linolensäure oder der Arachidonsäure. Dabei kann die Lipidperoxidation durch ROS oder durch verschiedene Isoformen der Lipoxygenasen stattfinden (Riahi et al. 2010). 4-HNE hat sowohl physiologische als auch zytotoxische Eigenschaften, wobei die Konzentration des Aldehyds eine Rolle spielt. Konzentrationen unter 0,1 μ M gelten als physiologisch, wobei 4-HNE Einfluß auf verschiedene zellregulatorische Mechanismen, wie die Aktivierung der Phospholipase C, die Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten und die Modulation der Adenylatcyclase hat. Höhere Konzentrationen haben einen negativen Einfluß auf die DNS- und Proteinsynthese und ab einer Konzentration von 100 μ M, treten akute Zellschäden bis hin zum Zelltod auf. Akut zytotoxische Konzentrationen werden meist in der Nähe von Membranen erreicht, an denen durch ROS Lipidperoxidation hervorgerufen wird (Esterbauer et al. 1991). Des Weiteren hat 4-HNE eine Affinität zu Thiolgruppen (SH-Gruppen), wie sie in Glutathion (GSH) vorkommen, sodass GSH ein wesentlicher Regulator der 4-HNE-Konzentration in der Zelle darstellt (Yang et al. 2003). Daneben führt 4-HNE auch zu einer Inaktivierung der Glutathionperoxidase (GPx) (Romero et al. 1998).

2.3 Antioxidanzien

Nach der Definition von Halliwell und Gutteridge von 1989 sind Antioxidanzien Substanzen, die in der Lage sind, die Oxidation anderer Substanzen signifikant zu verzögern oder sogar zu verhindern. Die Antioxidanzien liegen dabei in geringeren Konzentrationen vor, als das oxidierbare Substrat (Halliwell und Gutteridge 1990, Sies 1997).

Es lassen sich verschiedene antioxidative Mechanismen beschreiben:

1. Abfangen von Radikalen oder deren Vorläufermolekülen ("*scavenging*" oder "*quenching*");
2. Bindung von Metallionen (Übergangsmetalle), welche zur Bildung von ROS beitragen;
3. Vermehrte endogene Bildung von Antioxidanzien;

4. Abbruch der Kettenreaktion der Lipidperoxidation (Halliwell und Gutteridge 1990, Dhalla et al. 2000).

Antioxidanzien lassen sich in endogene (körpereigene) und exogene Substanzen sowie in enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidanzien unterteilen (Sies 1993, Dhalla et al. 2000, Ndhala et al. 2010).

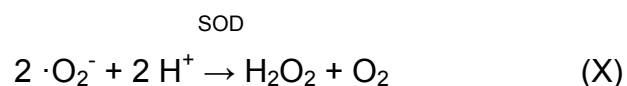
Zu den wichtigsten enzymatischen Antioxidanzien, deren Aktivität in dieser Arbeit untersucht worden ist, zählen die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase sowie die Glutathionperoxidase (GPx). Neben den eben erwähnten gibt es natürlich auch noch andere antioxidativ wirksame Enzyme. Der nichtenzymatische Teil der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress wird durch das Glutathion, durch Vitamine (Vitamine A, C und E) und andere körpereigene Moleküle wie Albumin, Bilirubin und Coeruloplasmin vermittelt (Halliwell und Gutteridge 1990, Sies 1993, Dhalla et al. 2000, Ndhala et al. 2010).

2.3.1 Enzymatische Antioxidanzien

Die drei wichtigsten enzymatischen Antioxidanzien sollen im Folgenden näher erläutert werden.

2.3.1.1 Superoxiddismutase

Die Superoxiddismutase (SOD) ist eines der wichtigsten antioxidativ wirksamen Enzyme des Organismus. Sie katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2^-$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2) (X), und ist in der Lage, die Lebensdauer eines Superoxidanions um den Faktor 10^9 zu verkürzen (Hess und Manson 1984, Fridovich 1998).

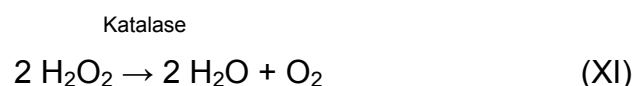


Bislang sind vier Formen der SOD bekannt. Je nachdem, welches Metall als prosthetische Gruppe an das Enzym gekoppelt ist, unterscheidet man die Kupfer/Zink-SOD (Cu/Zn-SOD), die Mangan-SOD (Mn-SOD), die Mangan/Nickel-SOD (Mn/Ni-SOD) und die Eisen-SOD (Fe-SOD) (Fridovich 1998, Valdivia et al.

2009). Im menschlichen Organismus kommen lediglich die Cu/Zn-SOD, die Mn-SOD und die extrazelluläre SOD (EC-SOD) vor. Die einzelnen SOD-Isoformen des menschlichen Organismus lassen sich bestimmten Zellkompartimenten zuordnen. Während die Mn-SOD vorwiegend in Mitochondrien vorkommt, findet man die Cu/Zn-SOD im Zytosol. Die EC-SOD ist ebenfalls eine Cu/Zn-SOD und befindet sich im Extrazellulärraum und auf Zelloberflächen (Fridovich 1998, Valdivia et al. 2009, Jung et al. 2010).

2.3.1.2 Katalase

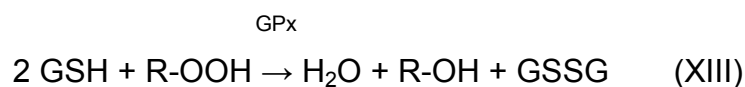
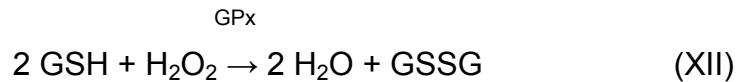
Katalasen sind in der Natur ubiquitär vorkommende Hydroperoxidasen, welche in der Lage sind, Peroxidbindungen (R-O-O-R) aufzubrechen (Zamocky et al. 2008). In der Literatur unterscheidet man drei Gruppen von Katalasen: die monofunktionalen bzw. typischen Katalasen, die Katalase-Peroxidasen (bifunktionale Katalasen) und die Mangan-Katalasen, welche die kleinste Gruppe darstellen. Die typischen und bifunktionalen Katalasen findet man beim Menschen in den Peroxisomen und der Mitochondrienmembran, während man die Mangan-Katalasen bisher nur in Bakterien hat nachweisen können. Allen Katalasen gemein ist die Eigenschaft, Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umzusetzen (XI) (Chelikani et al. 2004, Zamocky et al. 2008). Die Gefahr, die dabei vom Wasserstoffperoxid ausgeht, ist eine Bildung von Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) (Siehe Abschnitt 2.2.1).



2.3.1.3 Glutathionperoxidase

Die Glutathionperoxidase (GPx) ist ein Selenoprotein, welches in seinem katalytischen Zentrum L-Selenocystein enthält und eine wesentliche Komponente der antioxidativen Abwehr im menschlichen Organismus darstellt. Bislang sind fünf Isoformen der GPx bekannt: die ubiquitäre zytosolische GPx-1, die gastrointestinale GPx-2, die plasmatische GPx-3, die Phospholipid-Hydroperoxid-GPx (GPx-4) sowie die GPx des olfaktorischen Epithels und des embryonalen Gewebes (GPx-6). Ihre antioxidative Wirkung besteht in einer Reduktion von Wasserstoffperoxid, organischen Hydroperoxiden und Phospholipidperoxiden, wobei letzteres nur durch die GPx-4 realisiert wird (Lu und Holmgren 2009, Almondes et al. 2010). Alle

Isoformen der GPx benötigen als Ko-Substrat reduziertes Glutathion (GSH), welches in oxidiertes Glutathion (GSSG) umgewandelt wird. Bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid entsteht als Endprodukt Wasser (XII), während bei der Reduktion von organischen Hydroperoxiden oder Phospholipidperoxiden deren korrespondierender Alkohol und Wasser entsteht (XIII) (Fridovich 1998, Lu und Holmgren 2009):



2.3.2 Nichtenzymatische Antioxidanzien

2.3.2.1 Glutathion

Das Glutathion (γ -Glutamyl-Cysteinyl-Glycin; GSH) stellt das wichtigste intrazelluläre nichtenzymatische Antioxidanz dar (Forman et al. 2009). Die Synthese von GSH erfolgt vorwiegend in der Leber aus Glutamat, Cystein und Glycin. Die beiden ATP-abhängigen Enzyme welche die GSH-Synthese katalysieren, sind die Glutamat-Cystein-Ligase und die Glutathionsynthetase. GSH wirkt antioxidativ, da es aufgrund seines Cystein-Restes durch elektrophile Substanzen, wie ROS und andere freie Radikale, nichtenzymatisch zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird, wobei die Radikale reduziert werden. Das oxidierte Glutathion (GSSG) wird anschließend durch die Glutathionreduktase NADPH-abhängig wieder zu GSH reduziert. Des Weiteren ist GSH ein Substrat der Glutathionperoxidase, welche, wie bereits beschrieben, Wasserstoffperoxid reduziert (Wu et al. 2004, Forman et al. 2009). Neben der antioxidativen Wirkung hat Glutathion weitere Funktionen im Organismus. Es spielt eine wichtige Rolle beim Abbau von Formaldehyd und dem Prostaglandinstoffwechsel. Eine ausreichende GSH-Konzentration ist notwendig für die Spermatogenese, ein hoher intrazellulärer Anteil an oxidiertem Glutathion (GSSG) führt zu einer Aktivierung verschiedener Signalkaskaden innerhalb der Zelle (Wu et al. 2004).

2.4 Der myokardiale Ischämie-Reperfusionsschaden

Im Rahmen einer Herztransplantation lässt es sich nicht vermeiden, dass das Spenderherz einer Phase der Ischämie ausgesetzt ist. Selbst wenn Entnahme und Transplantation im selben Transplantationszentrum stattfinden, so ist doch das Spenderorgan bis zur Vollendung aller Anastomosen im Zustand der Ischämie. Die durchschnittliche Ischämiezeit eines Spenderherzens wird mit 3 Stunden ($\pm 1,5$ h) angegeben, wobei eine längere Ischämiezeit als Risikofaktor für ein vorzeitiges Versterben nach Transplantation gilt (Stehlik et al. 2011, Stehlik et al. 2012). Nicht nur die Ischämie des Spenderherzens sondern auch dessen Reperfusion mit sauerstoffreichem Blut führen zu schädlichen Veränderungen an den Kardiomyozyten. Die Veränderungen und Schädigungen die das Herz dabei erfährt, werden als Ischämie-Reperfusionsschaden zusammengefasst. Yellon und Hausenloy beschreiben dabei vier Formen der myokardialen Dysfunktion:

1. das „*myocardial stunning*“, eine mechanische Dysfunktion des Herzmuskels, die sich nach Tagen bis Wochen wieder zurückbildet
2. das „*no-reflow*“-Phänomen, bei dem ischämisches Myokard trotz wiederhergestellter Blutzufuhr nicht reperfundiert wird
3. gefährliche Arrhythmien
4. den tödlichen Reperfusionsschaden, bei dem es durch die Wiederherstellung der Zufuhr von sauerstoffreichem Blut zum Zelltod von Herzmuskelzellen kommt (Yellon und Hausenloy 2007).

Der tödliche Reperfusionsschaden ist histologisch durch die Ausbildung von Kontrakturbändern, einer Kalziumansammlung in den Mitochondrien sowie durch eine Zellschwellung und die Ruptur von Zell- und Mitochondrienmembranen gekennzeichnet (Zweier und Talukder 2006, Yellon und Hausenloy 2007). Auf die grundlegenden Mechanismen des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens soll im Folgenden näher eingegangen werden.

In der Phase der Ischämie kommt es aufgrund des Sauerstoffmangels zu einem Sistieren der mitochondrialen ATP-Produktion, der Hauptquelle für ATP in der Zelle. Kompensatorisch beginnt die ATP-Bereitstellung durch die anaerobe Glykolyse, wodurch es zu einer intrazellulären Akkumulation von Laktat kommt. Die Folge ist

eine Azidose mit Hemmung der Glykolyse sowie aller anderen Mechanismen der Energiegewinnung (Jennings und Reimer 1991, Buja 2005, de Groot und Rauen 2007). Aufgrund des ATP-Mangels kommt es zu einer Hemmung der energieabhängigen sarkolemmalen Transportmechanismen. Die sarkolemmale Na^+/K^+ -Pumpe (Na^+/K^+ -ATPase) stellt ihre Arbeit ein. Dies führt zu einem Anstieg der intrazellulären Natrium-Konzentration und einem daraus resultierendem Wassereinstrom in die Zelle. Die Folge ist eine Zellschwellung mit möglicher Ruptur der Zellmembran (Buja 2005, de Groot und Rauen 2007). Zudem versucht der sarkolemmale Na^+/H^+ -Austauscher die Laktazidose auszugleichen, indem Natriumionen in die Zelle und Wasserstoffionen aus der Zelle geschleust werden (Jennings und Reimer 1991, Baines 2009). Um die intrazelluläre Natriumüberladung auszugleichen, wird der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aktiviert, bei dem Na^+ aus der Zelle, dafür aber Ca^{2+} in die Zelle transportiert wird. Des Weiteren wird Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und den Mitochondrien in das Zellinnere freigesetzt. Die zytosolische Kalziumüberladung bewirkt eine Aktivierung verschiedenster kalziumabhängiger Zellvorgänge wie z.B. des kontraktile Apparates und der Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Hydrolasen, die zu einer Instabilität des Zytoskeletts führen (Jennings und Reimer 1991, Buja 2005, de Groot und Rauen 2007, Piper et al. 2008). Wird nach Fertigstellen aller Anastomosen das transplantierte Herz wieder mit sauerstoffreichem Blut perfundiert, kommt es durch die Reenergetisierung der Kardiomyozyten zu einer schnellen Kalziumaufnahme aus dem Zellinneren in das sarkoplasmatische Retikulum. Übersteigt dabei das sarkoplasmatische Retikulum seine Kalziumspeicherkapazität, so gibt es schlagartig große Mengen an Kalzium wieder in das Zytosol ab. Wiederholt sich dieser Vorgang mehrfach hintereinander, kommt es in Gegenwart ausreichend hoher ATP-Spiegel zu einer ungehemmten Aktivierung des kontraktile Apparates, der sogenannten Hyperkontraktur. Durch die proteolytische Schädigung von Strukturproteinen des Zytoskeletts, kommt es durch die Hyperkontraktur zur Ruptur des Sarkolemms mit der Ausbildung von Kontraktionsbandnekrosen (Piper et al. 2008). Ein weiterer schädigender Mechanismus während der Reperfusion ist die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Diese entstehen vorwiegend in der mitochondrialen Atmungskette sowie durch Aktivitäten der Xanthin-Oxidase und der NADPH-Oxidase (McCord 1988, Elahi et al. 2009). Die Xanthin-Oxidase, als Teil des Purinstoffwechsels, nutzt molekularen Sauerstoff als Co-Substrat, den sie in

Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen umsetzt. Am menschlichen Myokard findet man die Xanthin-Oxidase in den Endothelzellen der Kapillaren, wo sie zu großen Teilen in der Dehydrogenaseform (Xanthin-Dehydrogenase) vorliegt und NAD^+ als Co-Substrat nutzt (Berry und Hare 2004). Die Konversion der Xanthin-Dehydrogenase in deren Oxidaseform erfolgt entweder reversibel durch Oxidation von Thiolgruppen des Enzyms unter anaeroben Bedingungen oder irreversibel durch Proteolyse (McCord 1988, Berry und Hare 2004, Elahi et al. 2009). Während der myokardialen Ischämie entsteht vermehrt ADP, welches über AMP zu Hypoxanthin und Xanthin abgebaut wird und somit als Substrat für die Xanthin-Oxidase zur Verfügung steht (Nishino 1994). In welchem Maße die Xanthin-Oxidase am Reperfusionsschaden beteiligt ist, ist noch nicht vollständig geklärt (Berry und Hare 2004). Ebenfalls in Endothelzellen, aber auch in phagozytierenden Zellen des Immunsystems, findet man die NADH/NADPH-Oxidase. Dieses Enzym nutzt bei der Reduktion von Sauerstoff zu Superoxidanion oder Wasserstoffperoxid NADH oder NADPH als Elektronendonator (Kaminski et al. 2002, Sirker et al. 2011). Während der Ischämie und der Reperfusion kommt es an der luminalen Seite der Blutgefäße zu einem Anheften und einer Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Diese aktivierten neutrophilen Granulozyten haben eine hohe NADH/NADPH-Oxidase-Aktivität und schädigen zudem durch das Freisetzen der Inhalte ihrer Granula das Endothel und das umliegende Gewebe (Lucchesi 1990, Park und Lucchesi 1999, Kaminski et al. 2002). Die Hauptquelle für ROS in den Kardiomyozyten während der Reperfusion ist die mitochondriale Atmungskette (Solaini und Harris 2005, Andriantsitohaina et al. 2012). Unter normalen Bedingungen findet in der mitochondrialen Atmungskette durch die Reduktion von molekularem Sauerstoff ein Elektronentransport zwischen den Komplexen der Atmungskette statt, in dessen Folge ein Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran aufgebaut wird. Der entscheidende Schritt findet dabei in der F_0F_1 -ATP-Synthase (ATP-Synthase) statt, welche Wasserstoffionen aus dem Intermembranenspalt in das Innere der Mitochondrien schleust und dabei ADP in ATP umwandelt (Solaini und Harris 2005). Während der Ischämie versiegt die Sauerstoffzufuhr zur Atmungskette. Um den Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufrecht zu halten, arbeitet die ATP-Synthase nun in umgekehrte Richtung, und befördert unter Verbrauch von ATP Wasserstoffionen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum. Es kommt zu einem weiteren Mangel an ATP und einer

Akkumulation von NADH mit Bildung von ROS (Solaini und Harris 2005, Perrelli et al. 2011, Andriantsitohaina et al. 2012). Wird in der Reperfusion die Sauerstoffzufuhr wieder hergestellt, findet eine Übermäßige Produktion von Superoxidanionen durch die Komplexe I (NADH : Coenzym Q-Oxidoreduktase) und III (Ubichinol : Cytochrom c-Oxidoreduktase) der Atmungskette statt (Andriantsitohaina et al. 2012). Aufgrund der Kalziumüberladung der Kardiomyozyten kommt es zu einer Stimulation der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) mit vermehrter Stickstoffmonoxidbildung (NO). Das NO ist selbst ein Radikal und interagiert mit Teilen von Komplex I und III, was zu deren Hemmung führt (Brookes et al. 2004, Solaini und Harris 2005).

Neben der Bildung von ROS findet während der Reperfusion eine weitere Veränderung an den Mitochondrien statt. Wie bereits in diesem Abschnitt beschrieben, kommt es nach Wiederherstellen der Blutzufuhr zu einer Oszillation der zytosolischen Kalziumkonzentration mit hohen Kalziumspitzenkonzentrationen (Piper et al. 2008). Um diese Kalziumüberladung auszugleichen, wird unter anderem der mitochondriale Kalziumtransporter aktiviert, der Kalzium aufgrund des elektrochemischen Gradienten der inneren Mitochondrienmembran in die Mitochondrienmatrix fördert. Zusammen mit den ROS führt dies zur Formation und Öffnung sogenannter mitochondrialer Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPTP). Bei diesen Poren handelt es sich um unspezifische Kanäle, die die innere Mitochondrienmembran für Ionen und Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kDa permeabel machen (Baines 2009, Baines 2011). Die Öffnung der MPTP hat zur Folge, dass die innere Mitochondrienmembran durch eine ungehinderte Diffusion von Wasserstoffionen in die Mitochondrienmatrix depolarisiert wird und ihren Protonengradienten verliert, was zu einer Entkopplung der Atmungskette und somit zu einer Produktion von ROS führt. Um den Protonengradienten wieder herzustellen, wird aus der F_0F_1 -ATP-Synthase wieder eine Protonenpumpe, die ATP verbraucht (Baines 2011). Der dadurch verursachte Mangel an ATP führt wie schon in der Ischämie zu einer Störung der Ionen- und Stoffwechsellhomöostase der Kardiomyozyten und zur Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Nukleasen (Halestrap et al. 2004). Da die MPTP nicht für Proteine durchgängig ist, erzeugen die Proteine der Mitochondrienmatrix einen kolloidosmotischen Druck, mit Schwellung der Mitochondrien und Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran. Es werden dadurch pro-apoptotische Proteine, wie das Cytochrom c in das Zytosol freigesetzt (Brookes et al. 2004, Halestrap et al. 2004, Baines 2011). Insgesamt scheint es so,

dass der Öffnung der MPTP eine entscheidende Rolle beim Ischämie-Reperfusionsschaden zugesprochen werden kann (Halestrap et al. 2004, Baines 2011).

2.5 Die myokardiale Präkonditionierung durch volatile Anästhetika

Die myokardiale Präkonditionierung durch volatile Anästhetika beschreibt das Phänomen, bei dem der Einsatz von Narkosegasen vor einer Phase der Ischämie eine Abschwächung des myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens zur Folge hat. Der kardioprotektive Effekt volatiler Anästhetika ist schon seit längerer Zeit bekannt und wurde erstmals 1976 von der Arbeitsgruppe um Bland und Lowenstein am Halothan nachgewiesen (Tanaka et al. 2004, Bienengraeber et al. 2005). Unter Laborbedingungen wurde die Anästhetika-induzierte Präkonditionierung (AIP) erstmalig von Kersten und Mitarbeitern 1997 am Isofluran beschrieben (Kersten et al. 1997, Bienengraeber et al. 2005). Mittlerweile sind auch für andere Narkosegase Präkonditionierungseffekte nachgewiesen worden. Die Mechanismen die der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung (AIP) zugrundeliegen, ähneln denen, wie der von Murry und Mitarbeitern 1986 erstmals beschriebenen ischämischen Präkonditionierung (Buchinger et al. 2005, Lorsomradee et al. 2008).

Bei den heutzutage gebräuchlichen Inhalationsnarkotika handelt es sich vorwiegend um halogenierte Kohlenwassertoffe. Ihre Löslichkeit im Blut sowie die Verteilung im Gewebe werden von den lipophilen Eigenschaften des jeweiligen Inhalationsgases bestimmt (Loscar und Conzen 2004, Burgis 2005). Bei der Anästhetika-induzierten Präkonditionierung spielen verschiedene Mechanismen wie die Öffnung ATP-sensitiver Kaliumkanäle (K^+_{ATP}), die intrazelluläre Bildung kleiner Mengen an ROS sowie die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und inhibitorischer Guaninnukleotid-bindender Proteine (G_i -Proteine) eine bedeutende Rolle. Ein einzelner Endeffektor ließ sich jedoch noch nicht identifizieren (Tanaka et al. 2004, Hu und Liu 2009). Auf zwei der eben genannten Mechanismen soll im Folgenden etwas näher eingegangen werden.

Rolle der ATP-sensitiven Kaliumkanäle

Bei den Untersuchungen zur Anästhetika-induzierten Präkonditionierung stehen zwei K^+_{ATP} im Vordergrund. Zum einen der sarkolemmale Kaliumkanal ($sarck^+_{ATP}$) und

zum anderen der mitochondriale Kaliumkanal ($\text{mitoK}_{\text{ATP}}^+$). Insbesondere dem $\text{mitoK}_{\text{ATP}}^+$ wird eine zentrale Rolle bei der AIP zugesprochen. Ob volatile Anästhetika diese Kaliumkanäle direkt öffnen, oder nur deren Offenheitswahrscheinlichkeit erhöhen ist bislang nicht vollständig geklärt. Die kardioprotektiven Effekte durch Öffnung des $\text{mitoK}_{\text{ATP}}^+$ und der damit verbundenen Aufrechterhaltung der mitochondrialen bioenergetischen Funktion wird auf folgende Beobachtungen zurückgeführt: die Aktivierung dieser Kaliumkanäle führt zu einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran, was zum einen zu einer Verminderung der intrazellulären Kalziumüberladung und somit zu einer Aufrechterhaltung der mitochondrialen Kalziumhomöostase und zum anderen zu einer Zellschwellung der Mitochondrien führt. Die Depolarisation und Zellschwellung haben eine verminderte Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) durch die Atmungskette zur Folge, was wiederum zur Aktivierung von Kompensationsmechanismen führt, welche die oxidative Phosphorylierung optimieren. Die Öffnung der $\text{mitoK}_{\text{ATP}}^+$ bewahrt die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran für Vorläufermoleküle der ATP-Synthese sowie die Struktur des Intermembranraumes der Mitochondrien, was die mitochondriale Energieproduktion sicherstellt und bei Einsetzen der Ischämie einen effizienten Energietransfer zwischen Mitochondrien und Zellinneren gewährleistet (Tanaka et al. 2004, Bienengraeber et al. 2005).

Rolle der Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC) ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, welche durch Phosphorylierung des Serin/Threonin-Teils von Proteinen deren Aktivität beeinflusst und in verschiedenen Isoformen in der Zelle vorliegt (Bosco et al. 2011, Son et al. 2011). Sie wird durch die Aktivierung eines G-Proteins und der damit verbundenen Produktion von DAG (Newton 2003) oder aber auch direkt durch volatile Anästhetika stimuliert. Letzteres erfolgt vermutlich durch die Interaktion des volatilen Anästhetikums mit der regulatorischen Domäne der PKC (Tanaka et al. 2004, Hu und Liu 2009). Die bei der AIP aktivierten Isoformen PKC- δ und PKC- ϵ translozieren zu sarkolemmalen und mitochondrialen Membranen und führen dort zu einem Öffnen der K_{ATP}^+ -Kanäle. Wie bereits beschrieben wird vermutet, dass volatile Anästhetika die Offenheitswahrscheinlichkeit dieser Kaliumkanäle erhöhen (Tanaka et al. 2004, Hu und Liu 2009). Insgesamt wird der Aktivierung der PKC eine entscheidende Rolle in der AIP zugeschrieben (Lorsomradee et al. 2008).

3. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation soll anhand eines heterotopen Rattenherztransplantationsmodells zur Induktion chronischer Abstossungsprozesse untersucht werden, inwieweit volatile Anästhetika im Vergleich zu nicht-volatilen Anästhetika in der Lage sind, das Myokard vor einem Ischämieereignis zu präkonditionieren. Verschiedene Aspekte sollen dabei gezielt untersucht werden:

1. Hat die Präkonditionierung mit einem volatilen Anästhetikum einen langfristigen Einfluss auf die antioxidativen Schutzmechanismen des Myokards?
2. Kann anhand der im späten postoperativen Verlauf gemessenen Marker für den oxidativen Stress ein Rückschluss auf den Schweregrad des oxidativen Stresses kurz nach der Transplantation gezogen werden?
3. Lässt sich durch die Wahl des Anästhetikums die chronische Transplantatabstossung hinsichtlich ihrer Entwicklung bzw. ihres Schweregrades positiv beeinflussen?

Für diesen Versuch werden die Herzen von Lewis-Ratten (Lew) heterotop an die Abdominalgefäße von Fisher-Ratten (F344) anastomosiert. Jedes Transplantationspaar erhält hierbei die gleiche Narkoseform (volatil vs. intraperitoneal). Die Ischämiezeit des zu transplantierenden Herzens variiert zwischen 30 Minuten und 8 Stunden. Nach einer Nachbeobachtungszeit von 70 bzw. 140 Tagen werden die Transplantate entnommen und die Biomarker des oxidativen Stresses bestimmt. Ferner erfolgt eine histopathologische Bewertung der chronischen Abstossungsreaktion anhand eines definierten Scoring-Systems mit besonderer Fokussierung auf die TVP und die Myokardfibrose.

4. Material und Methoden

4.1 Tierversuch

4.1.1 Versuchstiere

Die Durchführung der heterotopen allogenen Rattenherztransplantation erfolgte an Ratteninzuchtstämmen der Firma Charles-River GmbH, Sulzfeld, wobei als Spender männliche Lewis-Ratten (Lew) und als Organempfänger männliche Fisher-Ratten (F344) verwendet wurden. Beide Inzuchtstämme sind besonders für die Transplantationsforschung geeignet, da sie bezüglich ihrer MHC-I- und MHC-II-Moleküle (MHC = *Major Histocompatibility Complex*) nahezu identisch sind und sich nur in mehreren non-MHC-Antigenen unterscheiden. Die Haltung der Tiere erfolgte im Institut für Versuchstierkunde und Tierschutz der Friedrich Schiller Universität Jena unter Einhaltung der Tierschutzbestimmungen. Die Versuchstiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser und unterlagen kontrollierten Tag-Nacht-Zyklen. Entsprechend der Vorgaben des Tierschutzgesetzes (Reg.-Nr. 02-043/07), erfolgte vor Versuchsbeginn eine 14-tägige Akklimation der Tiere an die genannten Bedingungen.

4.1.2 Versuchsaufbau und Versuchsgruppen

Der im Folgenden beschriebene Versuchsaufbau ist in Abbildung 1 dargestellt (**Abb. 1**). Um Unterschiede im Abstoßungsgrad des transplantierten Organes in Abhängigkeit von der gewählten Narkoseform zu untersuchen, wurden im Tierversuch zwei Hauptgruppen mit jeweils 24 Tieren gebildet. Eine Gruppe erhielt Isofluran als volatiles Narkotikum, während die zweite Gruppe Nembutal[®] als Injektionsnarkotikum intraperitoneal verabreicht bekam. Spender- und jeweilige Empfängerratte haben die gleiche Narkoseform erhalten. Innerhalb der beiden Gruppen wurde zwischen 30 und 480 Minuten kalter Ischämie des Spenderherzens unterschieden. Die Ischämiezeit von 30 Minuten diente hierbei als Kontrolle, da bei einer humanen Herztransplantation selbst unter optimalen zeitlichen Bedingungen mit einer Ischämiezeit von etwa 30 Minuten gerechnet werden muß. Um eine ausreichende Triggerung des oxidativen Stresses bzw. der Abstossungsreaktion im Versuch zu erzeugen, wurde eine kalte Ischämie von 480 Minuten gewählt (Renner

et al. 2004, Renner et al. 2005). Jede der Gruppen, wurde nochmals unterteilt und jeweils einem Nachbeobachtungszeitraum von 70 bzw. 140 Tagen zugewiesen. Diese Zeitpunkte wurden deshalb gewählt, da die Ausbildung einer TVP im transplantierten Organ ungefähr ab dem 70. Tag nach Transplantation beginnt und nach 140 Tagen reproduzierbar eine ausgeprägte TVP vorliegt. Im gesamten Versuchsaufbau sind acht unterschiedliche Gruppen mit je 6 Tieren gebildet worden, nicht zuletzt um eine aussagekräftige Statistik durchführen zu können.

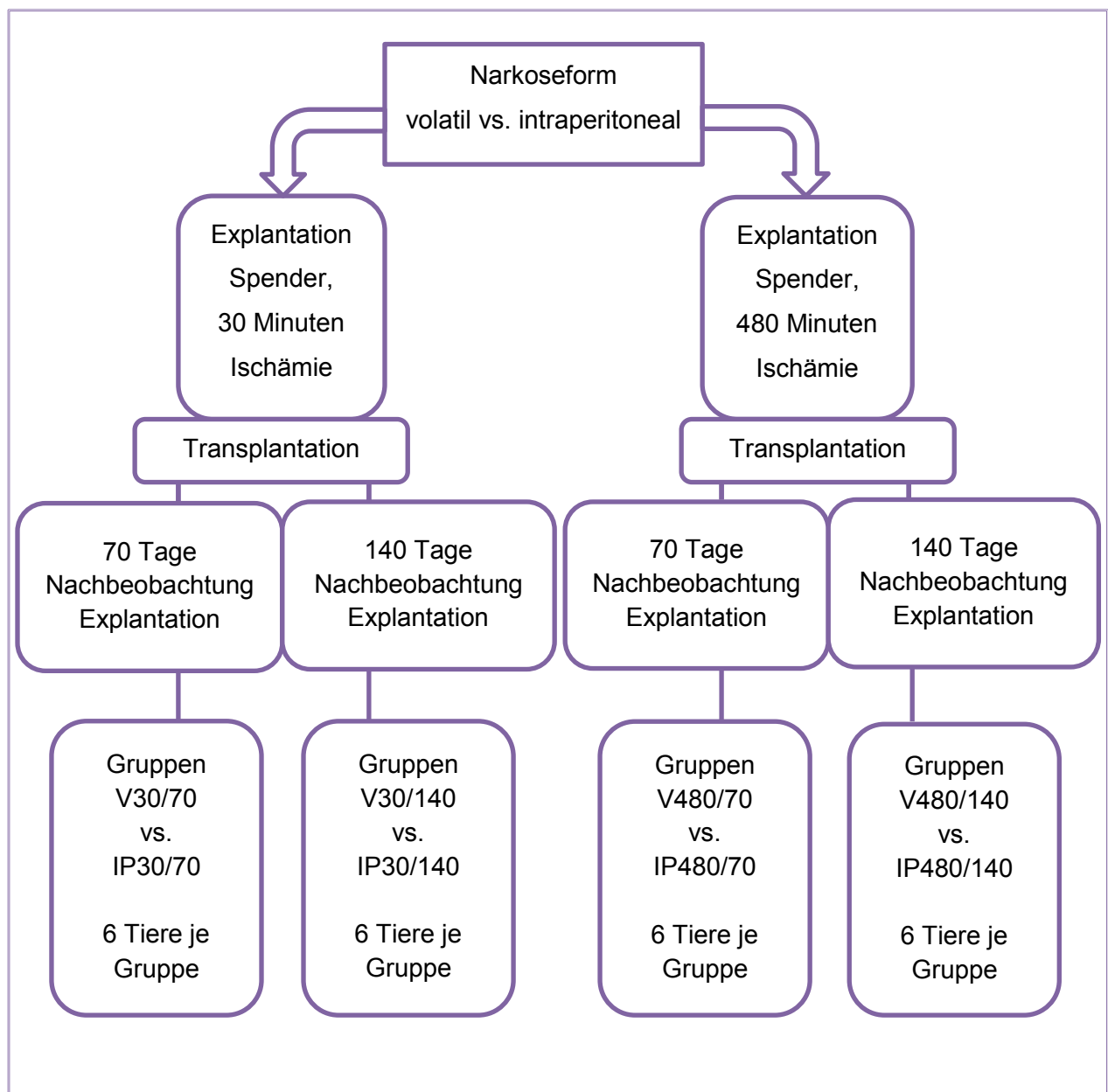


Abb. 1: Versuchsaufbau

4.1.3 Heterotopes allogenes Rattenherztransplantationsmodell

Die Herztransplantationen wurden nach dem Modell von Ono und Lindsey mit der Modifikation nach Yokoyama in mikrochirurgischer Operationstechnik durchgeführt. Das Modell nach Ono und Lindsey sieht eine heterotope Herztransplantation an der Ratte mit Anastomosierung des Spenderherzens an die Bauchgefäße des Empfängertieres vor. Dabei werden die Venae cavae sowie die Pulmonalvenen des Spendertieres ligiert und die Aorta ascendens des Spenderherzens mit der Aorta abdominalis des Empfängertieres und der Truncus pulmonalis des Spenderherzens mit der Vena cava inferior des Empfängers anastomosiert (Ono und Lindsey 1969). Die Modifikation des Spenderherzens nach Yokoyama beinhaltet die Resektion der Trikuspidalklappe, einen zu schaffenden Vorhofseptumdefekt (ASD), die Ligierung des Truncus pulmonalis, sowie die Seit-zu-Seit Anastomosierung des rechten Vorhofs mit der Vena cava inferior des Empfängers. Der Aortenstumpf des Spenderherzens wird End-zu-Seit mit der Aorta abdominalis des Empfängertieres anastomosiert. Am transplantierten Herzen ergibt sich somit ein Blutfluss von der V. cava inferior über das rechte Atrium und dem ASD in den linken Vorhof, von dort über die Mitralklappe in den linken Ventrikel und durch die Aortenklappe über die aorto-aortale Anastomose in die Aorta abdominalis des Empfängers. Zusätzlich gelangt Blut aus dem rechten Atrium in die rechte Herzkammer und durch die Trikuspidalklappeninsuffizienz retrograd in den rechten Vorhof, wo es zum einen über den ASD in das linke Atrium und über die atrio-cavale Anastomose in die V. cava inferior gelangt. Auf diese Weise wird eine Überdehnung des rechten Ventrikels, sowie eine Thrombenbildung verhindert (Yokoyama et al. 1995).

4.1.3.1 Operationsvorbereitung

Vor Beginn jeder Operation wurden die Ratten gewogen. Anschließend erfolgte, je nach Gruppenzugehörigkeit, die Narkoseeinleitung in einer Anästhesiebox mittels 3 % Isofluran (Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland) mit einer O₂-Zugabe von 2 l/min über ca. vier Minuten bzw. durch eine intraperitoneale Injektion einer gewichtsadaptierten Dosis von 50 mg/kg Nembutal[®] (Ovation Pharmaceuticals Inc., Deerfield, Illinois, USA). Nach Eintritt der Narkose, wurden die Ratten rasiert und für die Operation fixiert. Für die Isoflurangruppe war eine Aufrechterhaltung der Narkose mit 2 % Isofluran bei einer O₂-Zugabe von 2 l/min notwendig, die Nembutal[®]-Gruppe

hingegen erhielt lediglich Sauerstoff mit einem Fluß von 2 l/min. Jedes Versuchstier wurde vor der entsprechenden Operation in gleicher Weise vorbereitet und die Operationen in tiefer Narkose durchgeführt.

4.1.3.2 Spenderoperation

Die Eröffnung der Bauchdecke erfolgte durch eine Längsinzision, anschließend wurden die großen Bauchgefäße aufgesucht und durchtrennt. Mit Durchtrennung von V. cava inferior und Aorta abdominalis wurden Vor- und Nachlast des noch schlagenden Herzens gesenkt und einer Thrombenbildung vorgebeugt. Nach Durchtrennung des Zwerchfells, erfolgte die Eröffnung des Thorax mittels eines Schnitts entlang der linken und rechten Axillarlinie. Mit zwei Bulldogklemmen wurden die untere sowie die beiden oberen Hohlvenen abgeklemmt und das Herz mit 4 °C kalter Bretschneider-Kardioplegielösung (Custodiol[®], Dr. Franz Köhler Chemie, Bensheim, Deutschland) retrograd über die V. cava inferior und anschließend über die Aorta antegrad bis zum Stillstand perfundiert. Nach Eintritt des Herzstillstandes erfolgte zunächst die Ligierung von V. cava inferior, V. cava superior dexter sowie der V. pulmonalis dexter mit 4-0 ETHIBOND Excel (Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland). Im nächsten Schritt wurde der rechte Vorhof zwischen V. cava inferior und V. cava superior inzidiert und die Trikuspidalklappe reseziert sowie die Vorhofscheidewand im Sinne eines ASD teilreseziert. Das rechte Herz wurde von thrombotischem Material befreit und mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurden die V. cava superior sinister, V. pulmonalis sinister, V. lobi caudati sowie der Truncus pulmonalis ebenfalls mit 4-0 ETHIBOND Excel ligiert und die Aorta ascendens proximal des Truncus brachiocephalicus durchtrennt. Auch hier erfolgte die Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung zur Entfernung etwaiger Thromben. Die zuvor ligierten Gefäße wurden nacheinander abgesetzt und das entnommene Herz für die entsprechende Ischämiezeit in Konservierungslösung (Custodiol[®]) bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

4.1.3.3 Transplantationsoperation

Die Vorbereitung sowie die Narkose der Empfängertiere, erfolgten in gleicher Weise wie die der Spendertiere.

Für die Implantation wurde die Bauchdecke der F344-Ratten mit einer ca. 5 cm langen Längsinzision eröffnet und das Darmkonvolut in einer Mullkompressen feucht

ausgelagert. Nach Aufsuchen der beiden großen Bauchgefäße (Aorta abdominalis und V. cava inferior), wurde das darüberliegende Peritoneum unterhalb der Nierengefäße stumpf aufpräpariert. Infrarenale Gefäßabgänge aus beiden Gefäßen wurden auf einer Länge von ca. 1 cm mittels eines Gefäß-Clips zusammengefasst abgeklemmt. Anschließend erfolgte das gemeinsame Ausklemmen der abdominellen Aorta und der V. cava inferior mithilfe zweier Bulldogklemmen auf einer Länge von ca. 1 cm und die Längsinzision dieser Gefäße von ca. 3-4 mm. Etwaige Thromben wurden entfernt und die Gefäße mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Mit einer End-zu-Seit Anastomose der Aorta des Spenderherzens mit der Aorta des Empfängertieres in fortlaufender evertierender Naht (8-0 Prolene, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland), wurde mit der Implantation des Spenderherzens begonnen. Der rechte Vorhof des Spenderherzens wurde in gleicher Weise ebenfalls End-zu-Seit mit der V. cava inferior des Empfängers verbunden. Nach Abschluss der Anastomosen, wurden die Bulldogklemmen entfernt und der Blutfluss durch das Spenderherz wieder hergestellt. Bei ausreichender Kontraktion des Spenderherzens und relativer Bluttrockenheit, wurde das Darmkonvolut in die Bauchhöhle zurückverlagert und eine gewichtsadaptierte Dosis von 2 mg/Kg Körpergewicht (KG) Cyclosporin A (Sandimmun[®], Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland) direkt in den Bauchraum verabreicht. Der schichtweise Verschluss der Bauchdecke erfolgte mit 5-0 Prolene in fortlaufender evertierender Nahttechnik.

4.1.4 Nachsorge

Alle transplantierten Tiere bekamen von Tag 1 bis Tag 14 nach der Transplantation täglich 2 mg/kg KG Cyclosporin A intraperitoneal injiziert und wurden über diesen Zeitraum täglich gewogen. Die Beurteilung des Transplantats erfolgte ebenso täglich durch Palpation durch die Bauchdecke, wobei die Funktion des Grafts nach einem Punktesystem bewertet wurde (Lange et al. 2006), welches von 0 (keine Transplantatfunktion) bis 4 (sehr gute Transplantatfunktion) reicht (**Tabelle 5**). Im weiteren Verlauf erfolgte die Nachsorge zweimal wöchentlich durch Wiegen des Versuchstieres sowie palpatorische Beurteilung des Transplantats.

Tabelle 5: Beurteilung der Transplantatfunktion

Transplantatfunktion	Punkte
keine	0
schwach	1
ausreichend	2
gut	3
sehr gut	4

4.1.5 Probengewinnung

Transplantatentnahme

Nach Ablauf des jeweiligen Nachbeobachtungszeitraumes (70 bzw. 140 Tage), wurden die Ratten entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit, wie unter OP-Vorbereitung beschrieben, für die Explantation vorbereitet. Vor jeder Entnahme erfolgte nochmals die Beurteilung der Transplantatfunktion mittels Palpation durch die Bauchdecke. Für die Tiere der Isoflurangruppe wurde während der gesamten Entnahme die Narkose mit 2 % Isofluran bei einem Sauerstofffluss von 2 l/min aufrechterhalten, die Ratten der Nembutal[®]-Gruppe erhielten während der Narkose lediglich 2 l Sauerstoff pro Minute. Nach medianer Laparotomie, wurde das Transplantat visuell nach Kontraktionsfähigkeit, Farbaspekt und Fibrosierungserscheinungen am Myokard beurteilt. Das Transplantat wurde nun entlang der Anastomosen entnommen, in physiologischer Kochsalzlösung gespült und bis zur weiteren Verarbeitung kühl gelagert. Die entnommenen Herzen wurden vom Apex zur Herzbasis in vier Probenteile, ohne Mitnahme der Vorhöfe, geschnitten. Herzspitze und -basis wurden jeweils in ein steriles Probengefäß (Fa. Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) überführt, und für eine spätere biochemische und molekularbiologische Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff (Linde AG, Pullach, Deutschland) schockgefroren und bei - 80°C gelagert. Das Herzgewebe aus der Klappenebene wurde erneut geteilt. Ein Teil dieser Probe wurde für spätere immunhistochemische Untersuchungen zunächst in Tissue Tek Compound (Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland) eingebettet und anschließend in

flüssigem Stickstoff (Linde AG, Pullach, Deutschland) schockgefroren und bei - 80°C gelagert. Das zweite Probenstück wurde in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet.

4.2 Probenanalyseverfahren

Jene beiden Gewebeproben, die ohne Zusatz von Tissue Tek Compound schockgefroren wurden, wurden unter ständiger Kühlung auf Trockeneis sowie Zufuhr von flüssigem Stickstoff in einem Mörser homogenisiert, zu gleichen Teilen auf mehrere Probengefäße verteilt, und bis zur weiteren Bearbeitung bei - 80°C gelagert.

4.2.1 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit der Firma Thermo Scientific (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Der Test kombiniert die Biuret-Reaktion, bei der Kupfer-II-Sulfat in einem basischen Medium in Anwesenheit von Proteinen mit mindestens zwei Peptidbindungen, zu Kupfer-(I)-Sulfat reduziert wird, mit dem spezifischen Nachweis der Kupfer-(I)-Ionen durch Bindung an Bicinchoninsäure (BCA). Dabei reagieren zwei Moleküle BCA mit einem Kupfer-(I)-Ion zu einem wasserlöslichen violetten Farbkomplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch erfasst werden kann.

Probenvorbereitung:

Die homogenisierten Gewebeproben wurden nach Zugabe von 1 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert, der Überstand jeweils in ein neues Probengefäß abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Zusammensetzung der Testkomponenten:

Arbeitsreagenz: BCA-Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bichinchoninsäure, Natriumtartat) + BCA-Reagenz B (4 % Kupfer-II-Sulfat) im Verhältnis 50:1, beide Reagenzien werden vom Hersteller gebrauchsfertig geliefert

Rinderserumalbumin: 2 mg/ml Rinderserumalbumin in 0,9 % physiologischer

Kochsalzlösung und 0,05 % Natriumazid (NaN_3),
gebrauchsfertig

Durchführung:

Zu Beginn der Bestimmung erfolgte die Herstellung einer Standardverdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin nach Vorgabe des Herstellers.

Die Standardverdünnungsreihe, die Leerprobe (PBS) sowie die zu messenden Proben, wurden zu je 25 μl in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Durch Zugabe von je 200 μl Arbeitsreagenz, wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank und anschließender Abkühlung der Proben auf Raumtemperatur (RT), erfolgte die Messung der Absorption mithilfe des Sunrise Remote-Plattenreaders (TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz). Auf Grundlage der gemessenen Absorption der Standardverdünnungsreihe, ließ sich die Proteinkonzentration für jede der Proben in $\mu\text{g/ml}$ bestimmen.

4.2.2 Superoxiddismutase-Assay

Der Test der Firma Northwest Life Science Specialities, LCC (Northwest Life Science Specialities, LCC, Vancouver, WA, USA, erfasst den Anteil einer definierten Menge Hämatoxylin, der in Anwesenheit der Superoxiddismutase an der Autooxidation gehindert wird. Die Menge des nicht oxidierten Hämatoxylins, lässt sich bei einer Wellenlänge von 560 nm photometrisch bestimmen, und ist direkt proportional zur Konzentration der Superoxiddismutase.

Probenvorbereitung:

Die homogenisierten Gewebeproben wurden mit 1 ml PBS versetzt, 20 Sekunden mittels eines MS2 Minishakers (IKA-Werke GmbH & CO.KG, Staufen, Deutschland) gevortext und anschließend für 10 Minuten bei 3000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde zu je 100 μl in Probengefäße abpipettiert.

Zusammensetzung der Testkomponenten:

Hämatoxylin-Lösung: Hämatoxylin + 1,2 ml destilliertes Wasser

Testpuffer: gebrauchsfertig, ca. ½ Stunde vor Testbeginn, Öffnen des Fläschchens, um eine Anreicherung mit Sauerstoff zu erreichen

Probenverdünnungspuffer: gebrauchsfertig

Durchführung:

Die Testdurchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Alle Reagenzien und Proben wurden vor Testbeginn auf Raumtemperatur gebracht. Jede Probe wurde mit 100 µl Probenverdünnungspuffer versetzt. Auf eine Mikrotiterplatte wurde in jede Vertiefung 230 µl Testpuffer gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 µl des Testpuffers als Leerprobe bzw. von 10 µl der zu untersuchenden Probe. Der Test erfolgte als Doppelbestimmung. Nach zweiminütiger Inkubation unter ständigem Schütteln, wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 µl der Hämatoxylin-Lösung gestartet. Anschließend wurde die Reaktionskinetik im Messintervall von 10 Sekunden über eine Gesamtdauer von 5 Minuten bei einer Absorption von 560 nm mithilfe des Sunrise Remote-Plattenreaders erfasst. Zur Berechnung der Superoxiddismutasekonzentration wurde aus den Absorptionswerten der Doppelbestimmung je Probe der Mittelwert gebildet, graphisch dargestellt und eine Regression durchgeführt. Aufgrund der Linearität, konnten zwei Punkte auf der Regressionsgeraden bestimmt werden und die Koordinaten (X_1/Y_1 für Punkt eins und X_2/Y_2 für Punkt zwei) in folgende Gleichung eingesetzt werden:

$$\text{Rate}_{(\Delta \text{ Absorption } 560\text{nm}/\text{min})} = (Y_2 - Y_1) / (X_2 - X_1)$$

Im Anschluss, erfolgte die Bestimmung des Verhältnisses der Absorption der Probe (s) zur Leerprobe (b) mithilfe folgender Gleichung:

$$\text{Ratio}_{s/b} = \text{Rate } s / \text{Rate } b$$

Nun konnte der prozentuale Anteil des Hämatoxylins, welcher durch die SOD an der Oxidation gehindert wurde, mithilfe folgender Gleichung berechnet werden:

$$\%_{\text{Inhibition}} = (1 - \text{Ratio } s/b) \cdot 100 \%$$

Die Konzentration der SOD ließ sich abschließend anhand unten stehender Gleichung bestimmen:

$$1,25 \cdot (\% \text{ Inhibition}) \cdot \text{Verdünnungsfaktor} (0,5) = [\text{SOD}] \text{ U/ml}$$

Die Umrechnung der SOD-Konzentration in die Einheit Milligramm erfolgte mithilfe der zuvor bestimmten Proteinkonzentration.

4.2.3 Katalase-Assay

Der Katalase-Test der Firma Northwest Life Science Specialities, LCC (Northwest Life Science Specialities, LCC, Vancouver, WA, USA), beruht auf einer Umsetzung einer definierten Menge H_2O_2 durch eine unbekannte Menge an Katalase (Probe). Nach einer Reaktionszeit von zwei Minuten, wird die Reaktion gestoppt und die verbliebene Menge an H_2O_2 in einer zweiten Reaktion mithilfe der Meerrettichperoxidase (HRP) durch Umsetzung eines Chromogens nachgewiesen. Der so entstandene Farbkomplex lässt sich bei einer Wellenlänge von 650 nm photometrisch quantifizieren. Die Konzentration der Katalase lässt sich anhand einer Standardkurve errechnen, wobei eine umgekehrte Proportionalität zwischen Katalasekonzentration und nachgewiesener Menge an H_2O_2 besteht. Eine Katalaseeinheit entspricht der Menge Enzym, die pro Minute 1 μmol H_2O_2 umsetzt (bei pH 7,0 und 27 °C).

Probenvorbereitung:

Die im Mörser zerstoßenen Gewebeproben wurden mit 0,25 %iger Kochsalzlösung vermengt und für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 5 μl Portionen aufgeteilt und jede mit 15 μl Probenverdünnungspuffer 1:20 verdünnt.

Zusammensetzung der Testkomponenten:

Testgemisch: 5 ml 4X Testpuffer + 14,9 ml destilliertes Wasser +
100 μl H_2O_2 , das Gemisch 1 Stunde bei RT
inkubieren

Arbeitspuffer: 7,5 ml 4X Testpuffer + 22,5 ml destilliertes Wasser

Stopp-Lösung: 1 ml 20X Stopp-Lösung + 5 ml 4X Testpuffer + 14 ml destilliertes Wasser

HRP-Lösung: Meerrettichperoxidase-Pulver + 1,8 ml 4X Testpuffer

Katalasestandard (100 U/ml): Katalase-Pulver (150 U) verdünnt in 1,275 ml Probenverdünnungspuffer

Chromogen: gebrauchsfertig, enthält TMB in DMSO

Probenverdünnungspuffer: gebrauchsfertig

Durchführung:

Herstellung einer vom Hersteller definierten Katalase-Standardreihe nach Anleitung. Im nächsten Schritt erfolgte das Auftragen von jeweils 10 µl der Standardreihe bzw. der Proben in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte. Durch Zugabe von 190 µl des Testgemisches, wurde die Reaktion gestartet. Nach einer Inkubation von zwei Minuten bei Raumtemperatur erfolgte der Abbruch der Reaktion durch Zugabe von 200 µl des Stopp-Reagenz. Anschließend wurde eine zweite Mikrotiterplatte mit einem Gemisch, bestehend aus 264 µl Arbeitspuffer und 15 µl der Chromogen-Lösung, für jeden Probennapf vorbereitet. Nach Zugabe von je 6 µl eines Reaktionsgemisches der ersten Mikrotiterplatte in je einen Probennapf der zweiten Mikrotiterplatte wurde die Umsetzung des Chromogens durch Aufbringen von jeweils 15 µl der HRP-Lösung gestartet. Die Absorptionsmessung bei 650 nm wurde mit dem Sunrise Remote-Plattenreader durchgeführt und konnte nach siebenminütiger Inkubation begonnen werden. Mithilfe des Katalase-Standards ließ sich eine Standardkurve anfertigen anhand derer die Katalase-Konzentration der Probe nach Regression errechnet werden konnte. Zur Berechnung wurden unten stehende Gleichungen herangezogen:

$$(y = a \cdot x + b)$$

mit Stabilisator und 4mM NaN₃)

H₂O₂-Reagenz: 0,3 ml einer H₂O₂-Lösung (bestehend aus 0,2 ml 3 %igem H₂O₂ + 2 ml Puffer-Lösung) in 10 ml Pufferlösung verdünnt

Pufferlösung: enthält EDTA sowie 4 mM NaN₃, pH 7,0, gebrauchsfertig

Durchführung:

Der Test wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nachdem alle Reagenzien auf Raumtemperatur (RT) angewärmt wurden, erfolgte das Aufbringen von 50 µl Pufferlösung als Leerprobe sowie je 50 µl der Proben in Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte. Nach Zugabe von je 50 µl des Arbeitsreagenz, wurde die Reaktion durch Zufügen von 50 µl des H₂O₂-Reagenz zu jeder Probe gestartet. Die Messung der Absorption ($\Delta A_{340/\text{min}}$) erfolgte nach einer Inkubationszeit von einer Minute mithilfe des Sunrise Remote-Plattenreaders für 5 Minuten mit einem Messintervall von 30 Sekunden. Anhand unten stehender Formel konnte die Konzentration der Glutathionperoxidase berechnet werden:

$$2 \cdot (mRate_{\text{Probe}} - mRate_{\text{Leerprobe}}) \cdot V_{\text{rm}} \cdot df / 2,74 \cdot V_{\text{s}} = [\text{GPx}] \text{ mU/ml}$$

$$mRate_{\text{Probe}} = -1000 \cdot \Delta A_{340/\text{min}}$$

$$mRate_{\text{Leerprobe}} = -1000 \cdot \Delta A_{340/\text{min}}$$

V_{rm} = Volumen des Reaktionsgemisches (3 · 50 µl)

V_{s} = Volumen der Probe (50 µl)

Absorptionskoeffizient der MTP = 2,74

df = Verdünnungsfaktor der Probe = 10

Auf Grundlage der Proteinkonzentration wurde die GPx-Konzentration pro Milligramm berechnet: [GPx] mU/mg.

4.2.5 Reduziertes und oxidiertes Glutathion

Zum Einsatz kam der GSH/GSSG-Test der Firma Oxford Biomedical Research Inc. (Oxford Biomedical Research Inc., Oxford, MI, USA). Dieser Test erfasst in zwei getrennten Testabläufen sowohl das oxidierte Glutathion (GSSG) sowie das gesamte Glutathion (reduziertes und oxidiertes). Die Bestimmung der Konzentration des gesamten Glutathions (GSH_t) erfolgt in zwei aufeinander folgenden Reaktionsschritten. Im ersten Reaktionsschritt wird GSSG durch die Glutathionreduktase NADPH-abhängig zu GSH reduziert. Das so entstandene GSH sowie das bereits in der Zelle vorhandene GSH reagieren mit 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB), wobei ein Produkt entsteht, welches bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch quantifiziert werden kann und dessen Menge proportional zur Konzentration des GSH_t ist. Für die Bestimmung der Konzentration des GSSG wird zu der Testprobe ein *Scavenger* gegeben, der mit der Thiolgruppe des bereits in der Zelle vorhandenen GSH reagiert und es so an der Reaktion mit dem DTNB hindert. Das DTNB reagiert somit nur mit GSH, welches zuvor aus der Reduktion von GSSG durch die Glutathionreduktase entstanden ist. Die Konzentration des GSSG wird somit indirekt bestimmt.

Probenvorbereitung:

GSSG-Probe:

Die im Mörser homogenisierten Gewebeproben wurden mit 30 μ l des *Scavengers* (Thiol-*Scavenger*, gebrauchsfertig), sowie mit 270 μ l eiskalter 5 %iger Metaphosphorsäure (MPA) gemischt und bei 4 °C für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 50 μ l Portionen in Probengefäße abpipettiert und jeweils mit 700 μ l Testpuffer verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Probe auf Eis.

GSH_t -Probe:

Die für den Test vorgesehenen homogenisierten Proben der Rattenherzen wurden mit 350 μ l eiskalter 5 %iger MPA gemischt und bei 4 °C für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 25 μ l Proben auf Probengefäße aufgeteilt und jeweils mit 1,5 ml Testpuffer verdünnt.

Zusammensetzung der Testkomponenten:

NADPH-Reagenz: lyophilisiertes NADPH + 500 µl Testpuffer (gebrauchsfertig), Überführen des Gemisches in 5,5 ml Testpuffer und Lagerung auf Eis

Glutathionreduktase-Lösung: 30 µl Reduktaselösung (enthält rekombinante Glutathionreduktase) + 6 ml Testpuffer, Lagerung auf Eis

DTNB-Lösung: lyophilisiertes DTNB + 500 µl Testpuffer auflösen und die Lösung in 5,5 ml Testpuffer überführen, Lagerung bei RT

GSSG-Standard: 10 µM GSSG, gebrauchsfertig

Durchführung:

Zunächst erfolgte das Erstellen einer Standardverdünnungsreihe mithilfe des mitgelieferten GSSG-Standards in aufsteigenden Konzentrationen laut Herstellerprotokoll.

Für die Messung wurden je 50 µl der Standardproben, der Testproben (GSH_t-Proben und GSSG-Proben) sowie des Testpuffers (Leerprobe) zur Doppelbestimmung auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Nach Zugabe von je 50 µl DTNB-Lösung und Glutathionreduktase-Lösung zu jeder Probe, wurden die Testgemische kurz geschüttelt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Durch Beigabe von 50 µl NADPH-Reagenz zu jeder Probe, wurde die Reaktion gestartet und die 412 nm Absorptionsmessung mittels des Sunrise Remote-Plattenreaders durchgeführt. Die Messdauer betrug 10 Minuten mit einem Messintervall von 1 Minute. Nach graphischer Darstellung der gemessenen Absorptionswerte und linearer Regression, entsprach der Anstieg der Regressionskurve der Änderung der Absorption (Rate).

Nach Abzug der Rate der Leerprobe, erhielt man die Rate für die Standardproben bzw. der Testproben (Net-Rate):

$$\text{Net-Rate} = \text{Rate}_{\text{Probe}} - \text{Rate}_{\text{Leerprobe}}$$

Die Net-Rate-Werte wurden erneut graphisch dargestellt und eine lineare Regression durchgeführt. Anhand dieser Kurve ließ sich nach Bestimmung des Schnittpunktes

mit der y-Achse und des Anstieges die Konzentration des gesamten Glutathions (GSH_t) und des oxidierten Glutathions (GSSG) jeder gemessenen Probe nach folgenden Gleichungen berechnen:

$$GSH_t (\mu M/ml) = [(Net-Rate \text{ der } GSH_t\text{-Probe} - \text{Schnittpunkt}) / \text{Anstieg}] \cdot 488$$

$$GSSG (\mu M/ml) = [(Net-Rate \text{ der } GSSG\text{-Probe} + \text{Schnittpunkt}) / \text{Anstieg}] \cdot 30$$

Die Konzentration des gesamten Glutathions und des oxidierten Glutathions wurde auf Grundlage der Proteinkonzentration in $\mu M/mg$ angegeben. Unter Verwendung der Konzentration des gesamten Glutathions und des oxidierten Glutathions ließ sich die Konzentration des reduzierten Glutathions (GSH) wie folgt berechnen:

$$GSH_t = GSH + 2 \text{ GSSG}$$

$$GSH = GSH_t - 2 \text{ GSSG}$$

Die Redox-Ratio beschreibt das Verhältnis von reduziertem Glutathion zum Gesamtglutathion und wird anhand folgender Formel berechnet:

$$GSH / GSH_t$$

Da sich die Masseinheiten ausgleichen, ist die Redox-Ratio dimensionslos.

4.2.6 Lipidhydroperoxide

Zur Bestimmung der Konzentration der Lipidhydroperoxide (LPO-Konzentration) wurde der LPO-CC-Test der Firma Kamiya Biomedical Company (Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, USA) verwendet. Dieser kolorimetrische Test misst die Umwandlung von 10-(N-Methylcarbamoyl)-3,7-(Dimethylamino)-Phenothiazin (MCDP) zu Methylenblau während der Reduktion von Lipidhydroperoxiden zu Lipidalkoholen in Anwesenheit von Hämoglobin.

Probenvorbereitung:

1 g des Gewebehomogenates wurde mit 0,1 % peroxidfreiem Triton X-100, 0,05 % Desoxycholinsäure und 4 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und für 10 Minuten an einem kühlen dunklen Ort unter ständigem Schütteln ruhen gelassen. Anschließend wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 3000 x g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und 10 fach mit PBS verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der Probe auf Eis.

Zusammensetzung der Testkomponenten:

Reagenz 1: Reagenz 1A (enthält Ascorbinoxidase, Lipoproteinlipase und Stabilisator) + Reagenz 1B (enthält 1 mM Goods-Puffer und Surfactants)

Reagenz 2: Reagenz 2A (MCDP) + Reagenz 2B (100 mM Goods-Puffer, Hämoglobin und Surfactants)

Kalibrator: 50 nmol/ml Cumolhydroperoxid, gebrauchsfertig

Durchführung:

Zunächst erfolgte das Auftragen von 0,1 ml Kalibrator, PBS (Leerprobe) bzw. Probe in je einen Probennapf einer Mikrotiterplatte als Doppelbestimmung. Zu jeder Probe wurde 1 ml Reagenz 1 gegeben und die Testgemische nach kurzem Schütteln für fünf Minuten bei 30 °C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml Reagenz 2, gefolgt von einer zehnmütigen Inkubation in einem Wasserbad bei 30 °C. Die abschließende Messung der Absorption bei 675 nm Wellenlänge wurde mit dem Sunrise Remote-Plattenreader durchgeführt.

Mithilfe der Absorptionswerte für den Kalibrator und der Leerprobe, konnte eine Kalibrierungskurve erstellt werden. Zur Berechnung der LPO-Konzentration anhand der Absorptionswerte der Probe, diente folgende Gleichung:

$$[\text{LPO}] \text{ nmol/ml} = (\text{Es} - \text{Eb}) \cdot 50 / (\text{Ecal} - \text{Eb})$$

Es = Absorption der Probe

Eb = Absorption der Leerprobe

Ecal = Absorption des Kalibrators

Auf Grundlage der Proteinkonzentration, erfolgte die Angabe der LPO-Konzentration in nmol/mg.

4.2.7 Bestimmung der 4-HNE-Addukte

Die Bestimmung der 4-HNE-Addukte (Michael-Addukte) erfolgte immunhistochemisch an Gewebeschnitten in einem Drei-Schritt-Verfahren. Der polyklonale Primärantikörper (Kaninchen) anti-HNE-Michael-Addukte, reagiert mit den 4-HNE-Addukten im Gewebe. Ein zweiter Antikörper (Sekundärantikörper), vom Esel stammend und mit alkalischer Phosphatase (AP) konjugiert, reagiert mit den 4-HNE-Michael-Addukte-Antikörpern. Diese zweite Antikörper-Antigen-Reaktion wird schlussendlich mit einem Farbstoff (Chromogen) sichtbar gemacht

Probenvorbereitung:

Von den in TissueTek® schockgefrorenen und bei (-80)°C gelagerten Gewebeproben wurden mithilfe des Leica CM3050 S Gefriermikrotoms (Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland) 4 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgebracht und diese bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Zusammensetzung der Testkomponenten:

Primärantikörper: anti-HNE-Michael-Addukte (Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 1:100 verdünnt in 50 %igem Glycerol (CARL ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland)

Sekundärantikörper: Esel-anti-Kaninchen (AP) (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, Suffolk, England), rekonstituiert mithilfe von 0,3 ml destilliertem Wasser, anschließend 1:2 verdünnt in Glycerol (Lagerung bei -20 °C)

Chromogen: Chromogensubstrat DAKO Real™ (Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) bestehend aus 750µl AP-Substrat-Puffer + 30µl Chromogen Rot 1 + 30µl Chromogen Rot 2 + 30µl Chromogen Rot 3

Waschpuffer: PBS

Durchführung:

Die Gewebeschnitte wurden zunächst kurz bei Raumtemperatur angetaut und im Anschluß 10 Minuten in eiskaltem Azeton fixiert. Nach kurzem Waschen in PBS, erfolgte die Blockierung mittels 1% BSA-PBS-Lösung für eine Stunde bei RT. Im Anschluss wurde der Primärantikörper in entsprechender Konzentration auf die Proben aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden am nächsten Tag mittels PBS abgewaschen und der Sekundärantikörper in angegebener Verdünnung auf die Schnitte gegeben. Nach 45 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte ein erneutes Abwaschen des überschüssigen Antikörpers mithilfe von PBS. Es konnte nun das Chromogen dazugegeben werden. Die Gewebeproben wurden erneut in PBS gewaschen und das überschüssige Chromogen entfernt. Zuletzt wurden die Proben mit Hämatoxylin gefärbt und 7 Minuten in Leitungswasser gebläut, bevor sie mit Glycerol-Gelatine eingedeckt wurden.

Die Auswertung der Gewebeproben erfolgte lichtmikroskopisch mithilfe des Axioscop 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) sowie der dazugehörigen Bildverarbeitungssoftware AxioVision Release 4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland), wobei der Anteil der mit dem Chromogen gefärbten Fläche an der Gesamtfläche des Gewebeschnittes in Prozent (%) angegeben wurde.

4.2.8 Histologie

4.2.8.1 Paraffineinbettung

Die in Formalin fixierten Gewebeproben wurden in einer Einbettkassette unter fließendem Leitungswasser 2 Stunden gewaschen. Im Anschluss erfolgte im Gewebeeinbettautomaten mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 96%, 100%) und anschließender Xylol-Fixierung, die Entwässerung der Proben. Anschließend wurden diese in Paraffin eingebettet. Mithilfe eines Schlittenmikrotoms wurden von jeder Myokardprobe 5 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Nach einer Trocknungszeit von mindestens 3 Tagen konnte die HE- bzw. EvG-Färbung durchgeführt werden.

4.2.8.2 Hämatoxylin/Eosin (HE) - Färbung

Die Paraffinschnitte wurden für 2 x 5 Minuten in Xylol gegeben und anschließend für je 3 Minuten in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 100%, 96%, 70%, 50%) behandelt. Nach Wässerung in Aqua bidestillata erfolgte die Färbung in Hämatoxylin und nach einer erneuten Spülung unter fließendem Leitungswasser die Gegenfärbung mit Eosin. Nach anschließender Spülung mit Aqua dest., wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70%, 96%, 100%) behandelt sowie nochmals in 100% Ethanol und zweimal in Xylol gegeben. Abschließend wurden die Gewebeschnitte erneut in Xylol gelagert und anschließend in Shandon Hypermount™ - Einbettmedium (Thermo Electron GmbH, Dreieich, Deutschland) eingedeckt.

4.2.8.3 Elastica-van-Giesson (EvG) -Färbung

Zunächst wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend mit destilliertem Wasser rehydratisiert. Anschließend erfolgte für 10 Minuten die Elastinfärbung nach Weigert (Resorcin-Fuchsin-Lösung, CARL ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Im Folgenden wurde die Gewebeschnitte unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend für 5 Minuten mit Weigerts Lösung (Eisenhämatoxylin, CARL ROTH GmbH, Karlsruhe, Deutschland) behandelt. Die Gewebeschnitte wurden erneut für eine Minute unter fließendem Leitungswasser gespült und anschließend mit der Pikrofuchsin-Lösung für 2 Minuten behandelt. Nach diesem Schritt erfolgte eine Spülung der Gewebeproben für eine Minute mit 70%igem Ethanol und anschließend eine Behandlung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe. Abschließend wurden die Schnitte mit Neo-Mount®-Einbettmedium (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

4.2.8.4 Analyse der Gewebeproben

Die Erfassung des Schweregrads der Transplantatabstoßung und der interstitiellen Fibrose erfolgte auf Grundlage des von Franz und Mitarbeitern entwickelten *Scoring*-Systems an Paraffin-Schnitten des entsprechenden Myokardgewebes, die einer konventionellen HE- und EvG- Färbung unterzogen wurden. Das verwendete *Scoring*-System stellt eine Erweiterung und Modifikation des histopathologischen

Grading-System zur Evaluation einer akuten Abstoßung am menschlichen Herztransplantat der *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) (Stewart 2005) dar. Dies wurde notwendig, da das ISHLT-System zur Detektion der akuten Abstoßung an Endomyokardbiopsien geeignet ist, in der vorliegenden Arbeit aber auch die chronische Abstoßung mit den Phänomenen TVP und interstitielle Fibrose erfasst werden soll. Ausserdem wurde die histopathologische Bewertung im vorliegenden Versuch an transmuralen Myokardschnitten und nicht an Biopsien durchgeführt.

Erfasst werden im hier verwendeten *Scoring-System* somit die Transplantatvaskulopathie, der Fibrosierungsgrad, das Vorhandensein einer kardiomyozytären Degeneration sowie die lymphozytäre Infiltration, wobei diese im gesamten Myokard erfasst wird und nicht nur in der Umgebung von Blutgefäßen. Jedem dieser vier Parameter werden Punktwerte zugeordnet, deren Summe Werte zwischen 0 und 10 annehmen können und ein Maß für den Schweregrad der chronischen Transplantatabstoßung darstellen (**Tabelle 5**) (Franz et al. 2011).

Tabelle 5: Beurteilung der Abstoßungsreaktion am transplantierten Rattenmyokard

Histopathologischer Befund	Beschreibung	Punkte
Transplantatvaskulopathie	nicht vorhanden	0
	vorhanden	2
lymphozytäre Infiltration	nicht vorhanden	0
	schwach vorhanden	1
	moderat vorhanden	2
	stark vorhanden	3
kardiomyozytäre Degeneration	nicht vorhanden	0
	vorhanden	2
interstitielle Fibrose	nicht vorhanden	0
	schwach vorhanden	1
	moderat vorhanden	2
	stark vorhanden	3
Summenscore: 0 = keine Abstoßung, 1 – 3 = schwache Abstoßung, 4 – 7 = moderate Abstoßung, 8 – 10 = schwere Abstoßung		

Auswertung

Die Bestimmung der Transplantatvaskulopathie bzw. des Schweregrades der chronischen Transplantatabstossung, erfolgte lichtmikroskopisch mithilfe des Axioscop 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) und der Bildverarbeitungssoftware AxioVision Release 4.8 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland). Hinsichtlich der Bewertung der TVP festgestellt, ob eine solche vorliegt und wenn ja, wieviele der Versuchstiere einer Gruppe eine TVP aufwies. Das Ergebnis wurde in Prozent angegeben. Die Bewertung der kardiomyozytären Degeneration erfolgte auf dieselbe Weise und das Ergebnis wurde in Prozent angegeben.

4.3 Statistische Verfahren

Die Ergebnisse der Biomarker des oxidativen Stresses werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben und als Balkendiagramm graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt mithilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics Version 18 (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland). Für die Auswertung der Biomarker wird der Mann-Whitney-Test angewandt. Die Auswertung des Schweregrades der chronischen Transplantatabstossung bzw. der Einzelparameter des *Scoring-Systems*, erfolgt mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests. Ein signifikanter Unterschied liegt bei beiden Tests bei $p \leq 0,05$ vor. Bei der Auswertung der Operationsprotokolle werden die Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben.

5. Ergebnisse

5.1 Auswertung der Operationsprotokolle der Transplantation

Für diesen Tierversuch erfolgte die im Abschnitt 4.1.3 ausführlich beschriebene heterotope Rattenherztransplantation in der Stammkombination Lewis-Ratte auf Fisher-Ratte. Von 78 Ratten, an denen die Transplantationsoperation durchgeführt wurde, überlebten 48 den gesamten Versuchszeitraum von 70 bzw. 140 Tagen. 30 Tiere sind perioperativ aufgrund eines erhöhten Blutverlustes oder eines Atemstillstandes verstorben. In die nachfolgenden Untersuchungen sind somit die Daten von 48 transplantierten Herzen eingegangen.

Die verwendeten Spendertiere (Lew) hatten zu Beginn der Entnahmeoperation ein durchschnittliches Gewicht von $266,18 \pm 43,08$ g, die Empfängertiere (F344) wogen $222,66 \pm 36,43$ g. Nach Einleitung der Narkose wurden die Transplantationen von Hautschnitt bis Hautnaht in $31,41 \pm 5,25$ Minuten durchgeführt, wobei die Aorta $24,84 \pm 3,80$ Minuten geklemmt war. Die Ischämiezeiten betragen für jene Tiere, die für eine dreißigminütige Ischämie ausgewählt wurden, $57,36 \pm 8,16$ Minuten und für die Tiere, die für eine achtstündige Ischämie ausgewählt wurden, $418,09 \pm 89,55$ Minuten. In den ersten 14 Tagen nach der Transplantationsoperation wurden die Tiere täglich gewogen und es erfolgte eine palpatorische Beurteilung des Spenderorgans durch die Bauchdecke hindurch. Im weiteren Verlauf erfolgte die Nachsorge zweimal wöchentlich durch Wiegen des Versuchstieres sowie der Beurteilung des Transplantats. Im gesamten Nachbeobachtungszeitraum konnte eine durchschnittliche Gewichtszunahme der Versuchstiere von 138,7 g festgestellt werden. Die Sektionsoperationen mit Entnahme der Transplantate, erfolgten je nach Gruppenzugehörigkeit nach 70 bzw. 140 Tagen. Die Transplantate wiesen nach der Transplantationsoperation alle eine gute bis sehr gute Transplantatfunktion auf lediglich in der Gruppe IP480/140 fand sich nach erfolgreicher Operation eine nur als ausreichend beurteilte Transplantatfunktion. Am Tag der Sektionsoperation wurde die Transplantatfunktion erneut palpatorisch sowie visuell bestimmt. Hier zeigte sich in den Gruppen V480/70 und IP480/140 eine ausreichende Transplantatfunktion, während in den anderen Gruppen eine gute bis sehr gute Transplantatfunktion zu beobachten war. In der Gruppe V480/70 fand sich der größte Funktionsverlust des Transplantates im Vergleich zum Ausgangswert (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: gemittelte Transplantatfunktion in den Versuchsgruppen

Gruppe	Transplantatfunktion nach Implantation	Transplantatfunktion bei Sektion
V30/70	3,83 ± 0,15	3,67 ± 0,30
IP30/70	4,00 ± 0	4,00 ± 0
V30/140	3,83 ± 0,15	3,50 ± 0,46
IP30/140	4,00 ± 0	3,50 ± 0,46
V480/70	4,00 ± 0	2,33 ± 0,61
IP480/70	3,83 ± 0,15	3,50 ± 0,46
V480/140	3,67 ± 0,19	3,83 ± 0,15
IP480/140	2,67 ± 0,65	2,50 ± 0,74

Transplantatfunktion: 0 = keine, 1 = schwach, 2 = ausreichend, 3 = gut, 4 = sehr gut

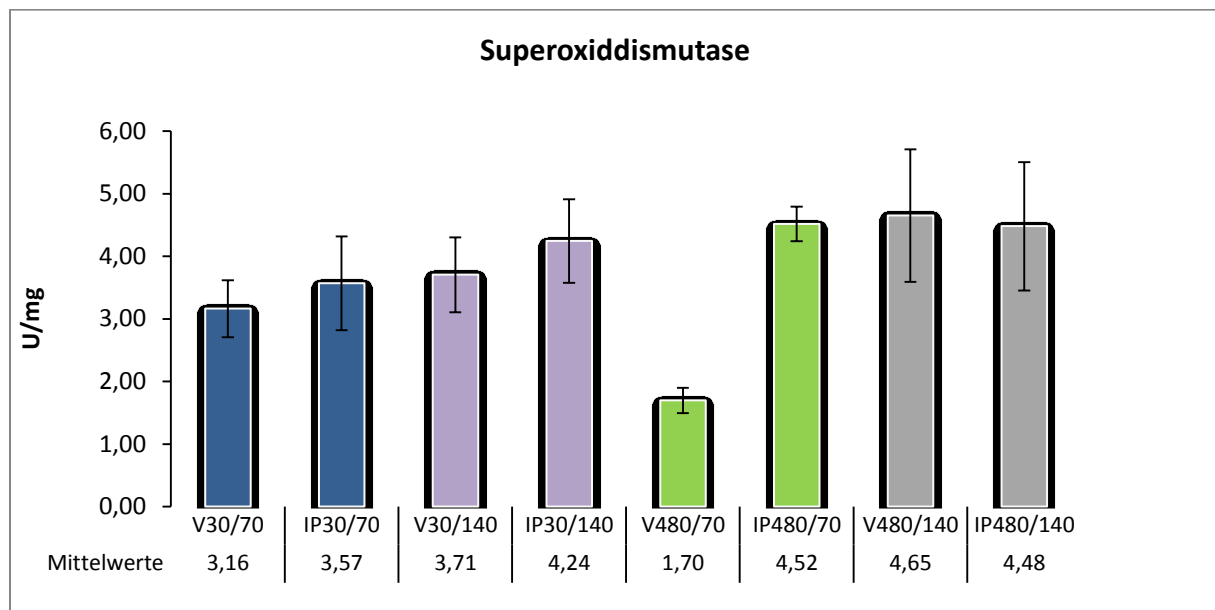
5.2 Einfluß unterschiedlicher Narkoseformen auf die Aktivität der enzymatischen Antioxidanzen

5.2.1 Einfluß der Narkoseform auf die Aktivität der Superoxiddismutase

Die gemessenen Daten zur Aktivität der SOD im Transplantat bei unterschiedlicher Narkoseform, Ischämiezeit und Nachbeobachtungszeit sind in Diagramm 1 als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt (**Diagramm 1**).

In der Auswertung der Ergebnisse konnte zwischen den unterschiedlichen Narkoseformen kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der Superoxiddismutase festgestellt werden, weder nach 70 Tagen (V30/70 vs. IP30/70: 3,16 ± 0,46 U/mg vs. 3,57 ± 0,75 U/mg; p = 0,855) noch nach 140 Tagen (V30/140 vs. IP30/140: 3,71 ± 0,60 U/mg vs. 4,24 ± 0,67 U/mg; p = 0,522). Die Ratten, die für die Transplantation das volatile Narkotikum erhalten haben, zeigten nach 8 Stunden Ischämie und 70 Tagen Nachbeobachtungszeit eine signifikant niedrigere Aktivität der Superoxiddismutase als die Ratten, die eine intraperitoneale Narkose verabreicht bekamen (V480/70 vs. IP480/70: 1,70 ± 0,20 U/mg vs. 4,52 ± 0,28 U/mg; p = 0,004).

Diagramm 1: Aktivität der Superoxiddismutase



Nach 8 Stunden Ischämie und 140 Tagen Nachbeobachtung wiederum fand sich zwischen den beiden Narkoseformen kein Unterschied in der Aktivität der Superoxiddismutase (V480/140 vs. IP480/140: $4,65 \pm 1,06$ U/mg vs. $4,46 \pm 1,03$ U/mg; $p = 0,917$).

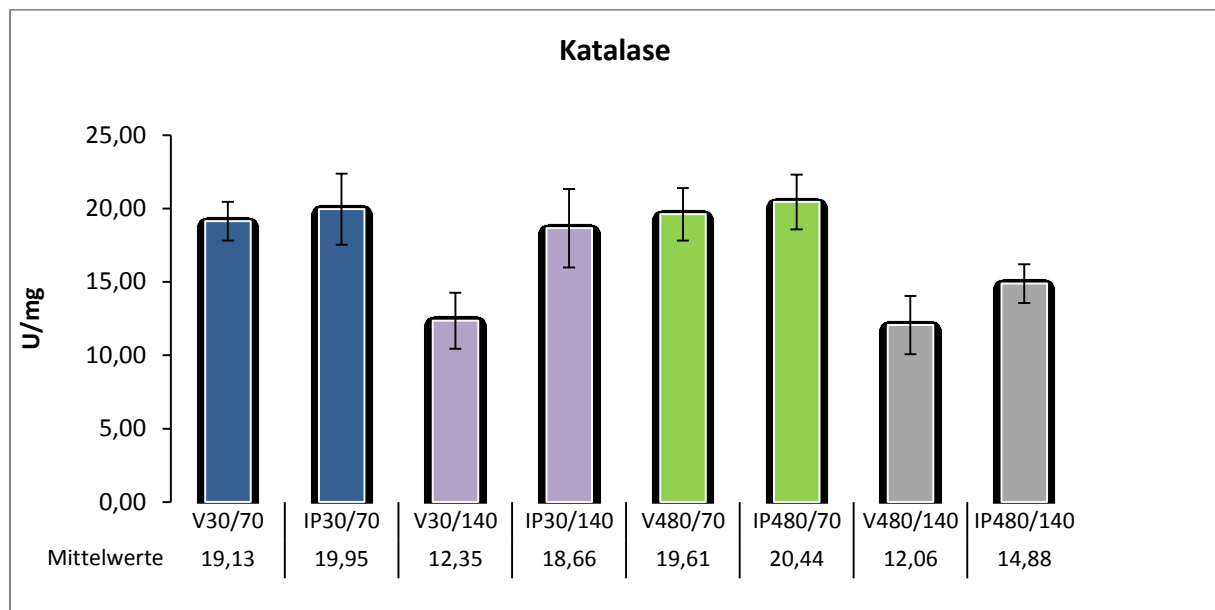
Bei Betrachtung der gemessenen Ergebnisse unter Fokussierung auf eine Narkoseform, war ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der Superoxiddismutase feststellbar.

Die Aktivität der SOD war nach 8 Stunden Ischämie unabhängig von der Nachbeobachtungszeit, bis auf die Gruppe, die das volatile Anästhetikum erhalten hatte und 70 Tage nachbeobachtet worden ist (V480/70), annähernd gleichhoch. Ebenso verhielt es sich in den Gruppen, die einer Ischämie von 30 Minuten ausgesetzt waren.

5.2.2 Einfluß der Narkoseform auf die Aktivität der Katalase

Die Ergebnisse zur Aktivität der Katalase im Hinblick auf die Narkoseform, die Ischämiezeit und die Nachbeobachtungszeit sind in Diagramm 2 als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt (**Diagramm 2**). Die Katalaseaktivität zeigte nach 30 Minuten Ischämie und 70 Tagen Nachbeobachtung keinen Unterschied zwischen den beiden Narkoseformen (V30/70 vs. IP30/70: $19,13 \pm 1,32$ U/mg vs. $19,95 \pm 2,42$ U/mg; $p = 0,749$).

Diagramm 2: Aktivität der Katalase



Auch nach 140 Tagen Nachbeobachtung war die Aktivität der Katalase in beiden Gruppen gleich (V30/140 vs. IP30/140: $12,35 \pm 1,91$ U/mg vs. $18,66 \pm 2,67$ U/mg; $p = 0,150$).

Ähnlich verhielt es sich nach 8 Stunden Ischämie und 70 Tage nach der Transplantation (V480/70 vs. IP480/70: $19,61 \pm 1,79$ U/mg vs. $20,44 \pm 1,86$ U/mg; $p = 0,749$) sowie nach 140 Tagen (V480/140 vs. IP480/140: $12,06 \pm 1,98$ U/mg vs. $14,88 \pm 1,32$ U/mg; $p = 0,261$).

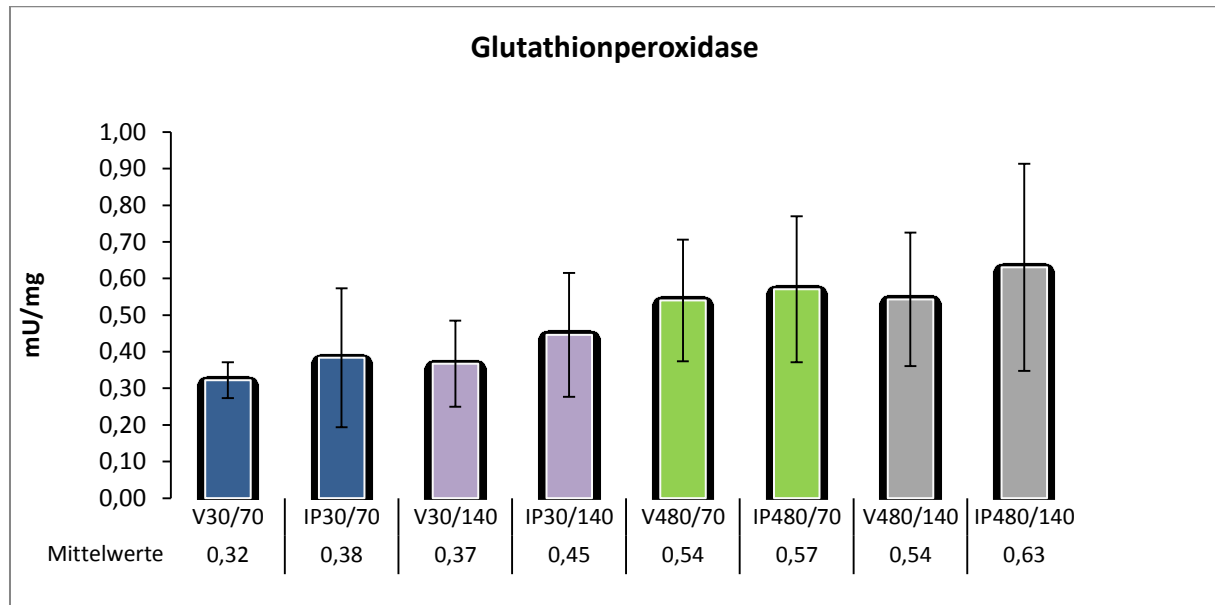
In 5 Gruppen (V30/70, IP30/70, IP30/140, V480/70, IP480/70) zeigte sich, unabhängig von der Narkoseform, der Ischämiezeit oder dem Nachbeobachtungszeitraum, eine annähernd gleichhohe Aktivität der Katalase, wobei die restlichen 3 Gruppen (V30/140, V480/140, IP480/140) im Trend eine nicht signifikant niedrigere Aktivität zeigten.

5.2.3 Einfluß der Narkoseform auf die Aktivität der Glutathionperoxidase

Die Ergebnisse zur Aktivität der Glutathionperoxidase sind in Diagramm 3 als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt (**Diagramm 3**). Zwischen den untersuchten Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Die Glutathionperoxidase zeigte nach 30 Minuten Ischämie und 70 Tagen Nachbeobachtung keinen signifikanten Unterschied in ihrer Aktivität zwischen den beiden Narkoseformen (V30/70 vs. IP30/70: $0,32 \pm 0,05$ mU/mg vs. $0,38 \pm 0,19$ mU/mg; $p = 0,337$). Ebenso

verhielt es sich auch nach 140 Tagen (V30/140 vs. IP30/140: $0,12 \pm 0,12$ mU/mg vs. $0,45 \pm 0,17$ mU/mg; $p = 0,748$).

Diagramm 3: Aktivität der Glutathionperoxidase



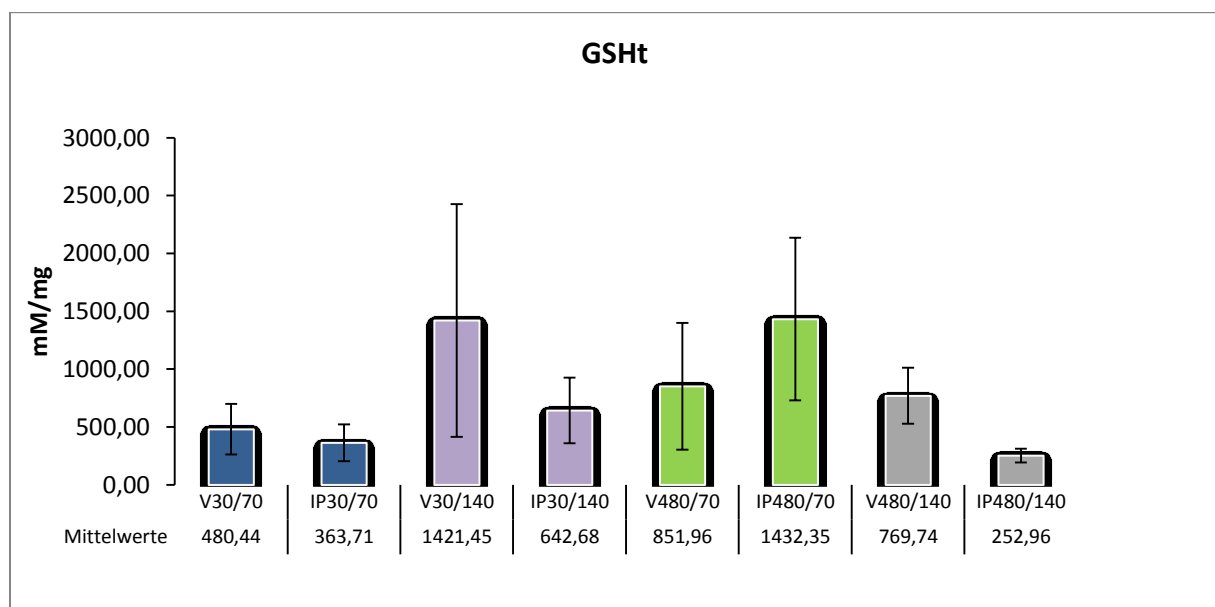
In den Gruppen, die einer achtstündigen Ischämie ausgesetzt waren, zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der Glutathionperoxidase zwischen den beiden Narkoseformen, weder nach 70 Tagen (V480/70 vs. IP480/70: $0,54 \pm 0,17$ mU/mg vs. $0,57 \pm 0,20$ mU/mg; $p = 0,810$) noch nach 140 Tagen (V480/140 vs. IP 480/140: $0,54 \pm 0,18$ mU/mg vs. $0,63 \pm 0,28$ mU/mg; $p = 0,873$). Unabhängig von der Nachbeobachtungszeit und der Narkoseform wiesen die Gruppen, die einer Ischämie von 30 Minuten ausgesetzt waren, eine niedrigere Aktivität der Glutathionperoxidase im Vergleich zu den Gruppen mit 480 Minuten Ischämiezeit auf, jedoch ohne signifikant unterschiedlich zu sein. Des Weiteren war die Aktivität der Glutathionperoxidase in den Gruppen mit 30 Minuten Ischämie untereinander annähernd gleichhoch, was auch auf die Gruppen mit 480 Minuten Ischämiezeit zutraf. Tendenziell war die Aktivität der Glutathionperoxidase in den Gruppen mit 8 Stunden Ischämie größer als in den Gruppen mit 30 Minuten Ischämie.

5.3 Einfluß unterschiedlicher Narkoseformen auf die nichtenzymatischen Antioxidanzien

5.3.1 Einfluß der Narkoseform auf den Gesamtgehalt des Glutathions (GSht)

Der Gesamtgehalt des Glutathions bezüglich der Narkoseform, der Ischämiezeit und der Nachbeobachtungszeit ist in Diagramm 4 als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt (**Diagramm 4**).

Diagramm 4: Gesamtgehalt von Glutathion



Der Gesamtgehalt an Glutathion zeigte nach 30 Minuten Ischämie und 70 Tage nach der Transplantation keinen Unterschied zwischen den beiden Narkoseformen (V30/70 vs. IP30/70: $480,44 \pm 218,95 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $363,71 \pm 159,61 \mu\text{M}/\text{mg}$; $p = 0,465$). Ebenso verhielt es sich nach 140 Tagen (V30/140 vs. IP30/140: $1421,45 \pm 1006,11 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $642,68 \pm 282,82 \text{ mM}/\text{mg}$; $p = 0,624$).

In den Gruppen, die einer achtstündigen Ischämie ausgesetzt waren, fand sich nach 70 Tagen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Narkoseformen (V480/70 vs. IP480/70: $851,96 \pm 547,01 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $1432,35 \pm 702,83 \mu\text{M}/\text{mg}$; $p = 0,423$).

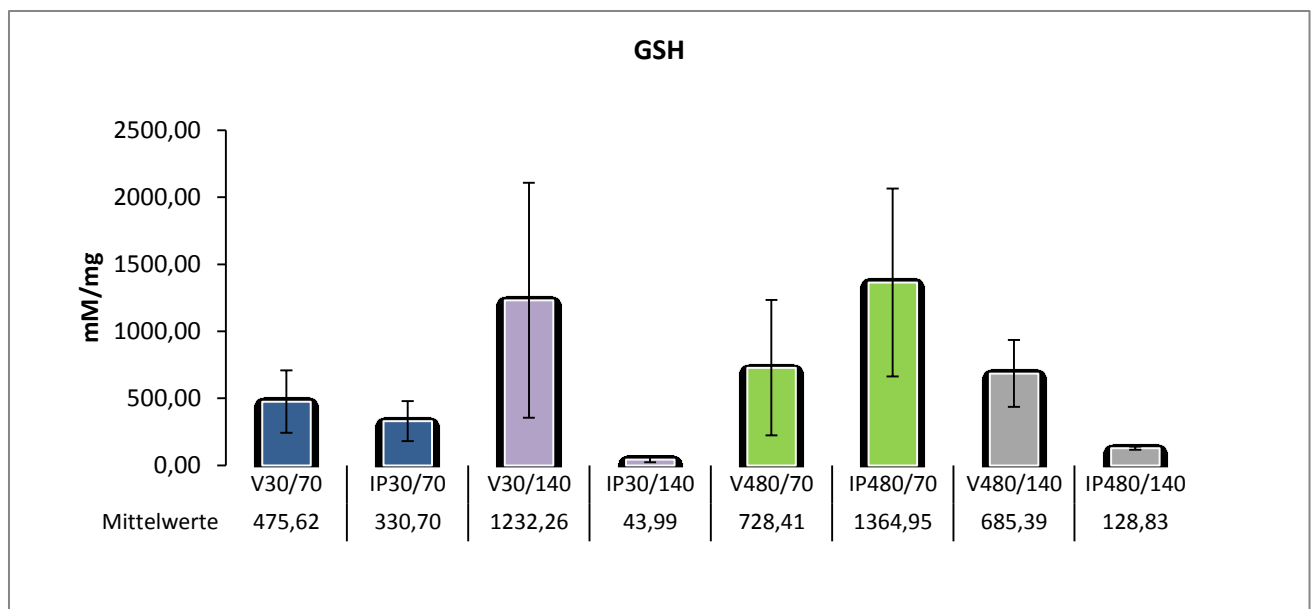
Nach 140 Tagen zeigte sich ebenfalls kein Unterschied (V480/140 vs. IP480/140: $769,74 \pm 242,24 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $252,96 \pm 58,52 \mu\text{M}/\text{mg}$; $p = 0,221$).

Auch untereinander verglichen zeigte der Gesamtgehalt an GSH zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied, wenngleich er in den Gruppen V30/140 und IP480/70 im Trend höher war als in den anderen Gruppen.

5.3.2 Einfluß der Narkoseform auf den Gehalt an reduziertem Glutathion (GSH)

Die Ergebnisse für das reduzierte Glutathion sind in Diagramm 5 als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt (**Diagramm 5**).

Diagramm 5: Gehalt an reduziertem Glutathion



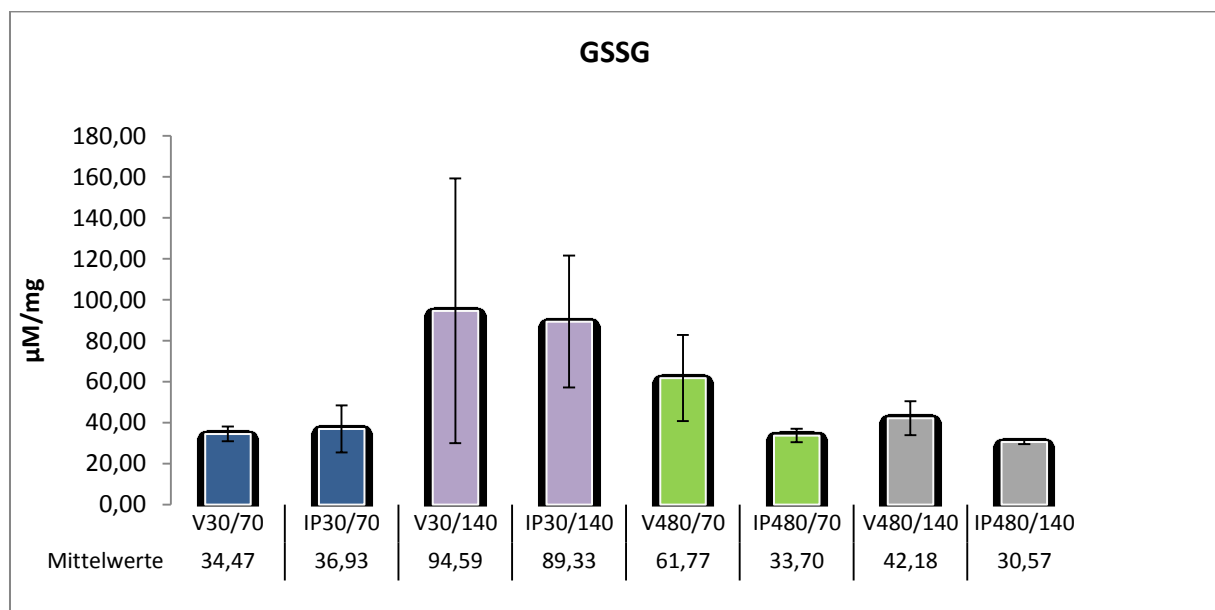
Die Konzentration des reduzierten Glutathions zeigte in den Gruppen, die einer Ischämie von 30 Minuten ausgesetzt waren, keinen signifikanten Unterschied, weder nach 70 Tagen (V30/70 vs. IP30/70: $475,62 \pm 232,58 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $330,70 \pm 149,3 \mu\text{M}/\text{mg}$; $p = 0,602$), noch nach 140 Tagen (V30/140 vs. IP30/140: $1232,26 \pm 876,93 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $43,99 \pm 19,88 \mu\text{M}/\text{mg}$; $p = 0,624$). Gleiches fand sich in den Gruppen, die einer Ischämie von 480 Minuten ausgesetzt waren. Weder nach 70 Tagen (V480/70 vs. IP480/70: $728,41 \pm 505,59 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $1364,95 \pm 701,16 \mu\text{M}/\text{mg}$; $p = 0,262$), noch nach 140 Tagen Nachbeobachtung (V480/140 vs. IP 480/140: $685,39 \pm 249,77 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $128,83 \pm 11,98 \mu\text{M}/\text{mg}$; $p = 0,327$) fanden sich ein signifikant unterschiedliche Werte. Unabhängig von der Narkoseform, der Ischämiezeit und der Nachbeobachtungzeit, zeigte sich zwischen den Gruppen untereinander kein

signifikanter Unterschied in der GSH-Konzentration, wenngleich die Konzentration in den Gruppen V30/140 und IP480/70 im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich erhöhte Werte zeigte.

5.3.3 Einfluß der Narkoseform auf den Gehalt an oxidiertem Glutathion (GSSG)

Der Gehalt an oxidiertem Glutathion bezogen auf die Narkoseform, die Ischämiezeit und die Nachbeobachtungszeit ist in Diagramm 6 als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Zwischen den untersuchten Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied (**Diagramm 6**).

Diagramm 6: Gehalt an oxidiertem Glutathion



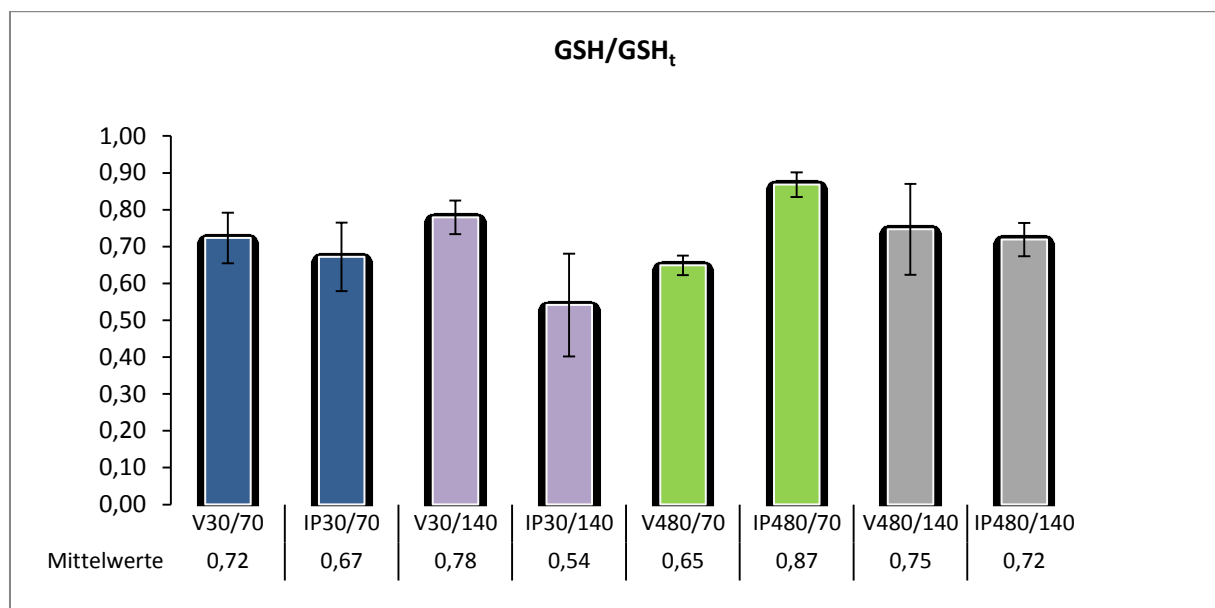
Nach einer Ischämiezeit von 30 Minuten und einem Nachbeobachtungszeitraum von 70 Tagen, zeigte das oxidierte Glutathion in beiden Gruppen eine nahezu gleichhohe Konzentration (V30/70 vs. IP30/70: $34,47 \pm 3,59$ µM/mg vs. $36,93 \pm 11,47$ µM/mg; $p = 0,602$). Gleiches fand sich auch im Falle einer Nachbeobachtung von 140 Tagen (V30/140 vs. IP 30/140: $94,59 \pm 64,62$ µM/mg vs. $89,33 \pm 32,20$ µM/mg; $p = 0,624$). In den Gruppen, die einer Ischämiezeit von 480 Minuten ausgesetzt waren und die 70 Tage nachbeobachtet wurden, zeigte sich in der Isoflurangruppe zwar eine nahezu doppelt so hohe Konzentration an GSH wie in der Nembutal®-Gruppe, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zu zeigen (V480/70 vs. IP480/70: $61,77 \pm$

21,06 $\mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $33,70 \pm 3,22 \mu\text{M}/\text{mg}$; $p = 0,150$). Nach weiteren 70 Tagen Nachbeobachtung zeigten beide Gruppen wieder annähernd gleichhohe GSH-Konzentrationen (V480/140 vs. IP 480/140: $42,18 \pm 8,27 \mu\text{M}/\text{mg}$ vs. $30,57 \pm 1,13 \mu\text{M}/\text{mg}$; $p = 0,624$). Auch hier konnte im Vergleich der Gruppen untereinander kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

5.3.4 Einfluß der Narkoseform auf die Redox-Ratio von Glutathion

Die Ergebnisse zur Redox-Ratio von Glutathion im Gewebe der Transplantate sind entsprechend der Gruppen in Diagramm 7 als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt (**Diagramm 7**).

Diagramm 7: Redox-Ratio von Glutathion in den Versuchsgruppen



Die Redox-Ratio zeigte nach 30 Minuten Ischämie und 70 bzw. 140 Tagen Nachbeobachtung keinen Unterschied zwischen den beiden Narkoseformen (V30/70 vs. IP30/70: $0,72 \pm 0,07$ vs. $0,67 \pm 0,09$; $p = 0,675$; V30/140 vs. IP30/140: $0,78 \pm 0,05$ vs. $0,54 \pm 0,14$; $p = 0,086$).

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nach 8 Stunden Ischämie und 70 Tagen Nachbeobachtung. Hier war die Redox-Ratio in der Gruppe mit dem intraperitoneal verabreichten Narkotikum wesentlich höher als in der Gruppe mit dem volatilen Narkosemittel (V480/70 vs. IP480/70: $0,65 \pm 0,03$ vs. $0,87 \pm 0,03$; $p = 0,004$).

Nach 140 Tagen wiederum zeigte sich kein Unterschied zwischen den

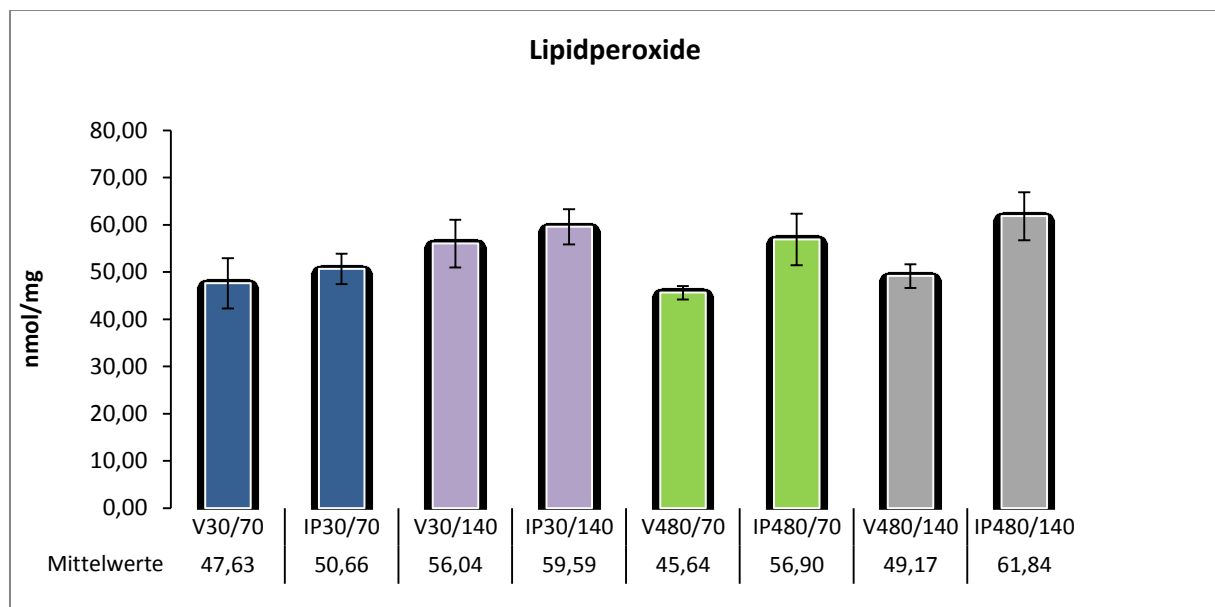
Narkoseformen (V480/140 vs. IP480/140: $0,75 \pm 0,12$ vs. $0,72 \pm 0,04$; $p = 0,221$).

5.4 Einfluß unterschiedlicher Narkoseformen auf die Lipidperoxidation

5.4.1 Einfluß der Narkoseform auf die Lipidperoxidation

Die Ergebnisse zum Einfluss der Narkoseform auf die Bildung von Lipidperoxiden ist in Diagramm 8 als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt (**Diagramm 8**).

Diagramm 8: Lipidperoxidkonzentration in den Versuchsgruppen



Die Lipidperoxidkonzentration zeigte nach 30 Minuten Ischämie und 70 bzw. 140 Tagen Nachbeobachtung keinen Unterschied zwischen den beiden Narkoseformen (V30/70 vs. IP30/70: $47,63 \pm 5,32$ nmol/mg vs. $50,66 \pm 3,22$ nmol/mg; $p = 0,465$; V30/140 vs. IP30/140: $56,04 \pm 5,05$ nmol/mg vs. $59,59 \pm 3,75$ nmol/mg; $p = 0,631$).

Auch nach 8 Stunden Ischämie und 70 bzw. 140 Tagen Nachbeobachtung fand sich kein Unterschied in der Lipidperoxidkonzentration zwischen den beiden Narkoseformen (V480/70 vs. IP480/70: $45,64 \pm 1,42$ nmol/mg vs. $56,90 \pm 5,47$ nmol/mg; $p = 0,055$; V480/140 vs. IP480/140: $49,17 \pm 2,51$ nmol/mg vs. $61,84 \pm 5,09$ nmol/mg; $p = 0,078$). In beiden Fällen konnte jedoch in der Nembutal[®]-Gruppe eine tendenziell höhere Lipidperoxidkonzentration gemessen werden.

Die Lipidperoxide wiesen untereinander auch unabhängig von der Narkoseform, der

Ischämiezeit und der Nachbeobachtungszeit keinen signifikanten Unterschied auf.

5.4.2 Einfluß der Narkoseform auf die Bildung von 4-HNE

Diagramm 9 zeigt die immunhistochemische Auswertung der Gewebepräparate auf ihren Gehalt an 4-Hydroxy-2-nonenal (**Diagramm 9**). Bei dieser Untersuchung wurden die 4-HNE-Addukte mittels eines spezifischen Antikörpers markiert und anschliessend mit einem Chromogen sichtbar gemacht. Zur besseren Darstellung wurden die Präparate mit Hämatoxylin gegengefärbt, so dass die Zellkerne dunkelblau und das Zytoplasma hellblau erscheinen. Während in gesunden Kontrollorganen kein immunhistochemischer Nachweis von 4-HNE im Gewebe möglich ist, findet sich in transplantierten Organen mit deutlichen histologischen Zeichen der chronischen Abstossung, eine eindrucksvolle Expression mit Betonung perivaskulärer Regionen um Gefäße, die eine TVP aufweisen (**Abb. 2**).

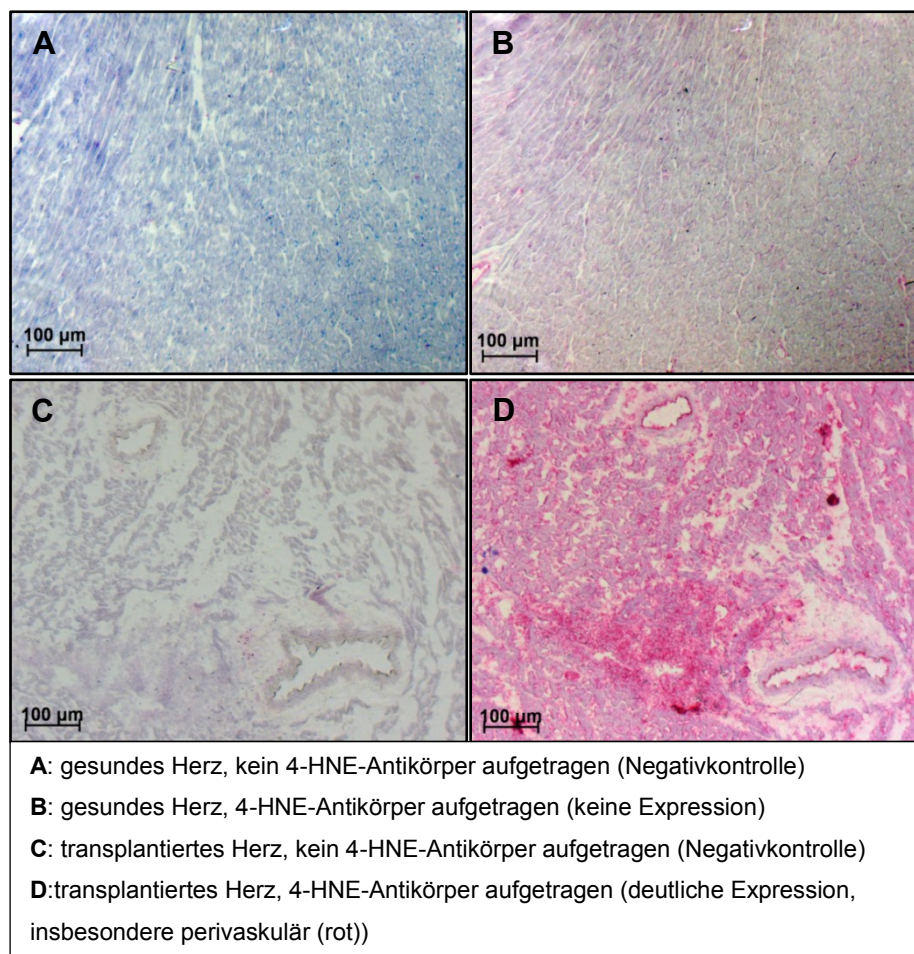
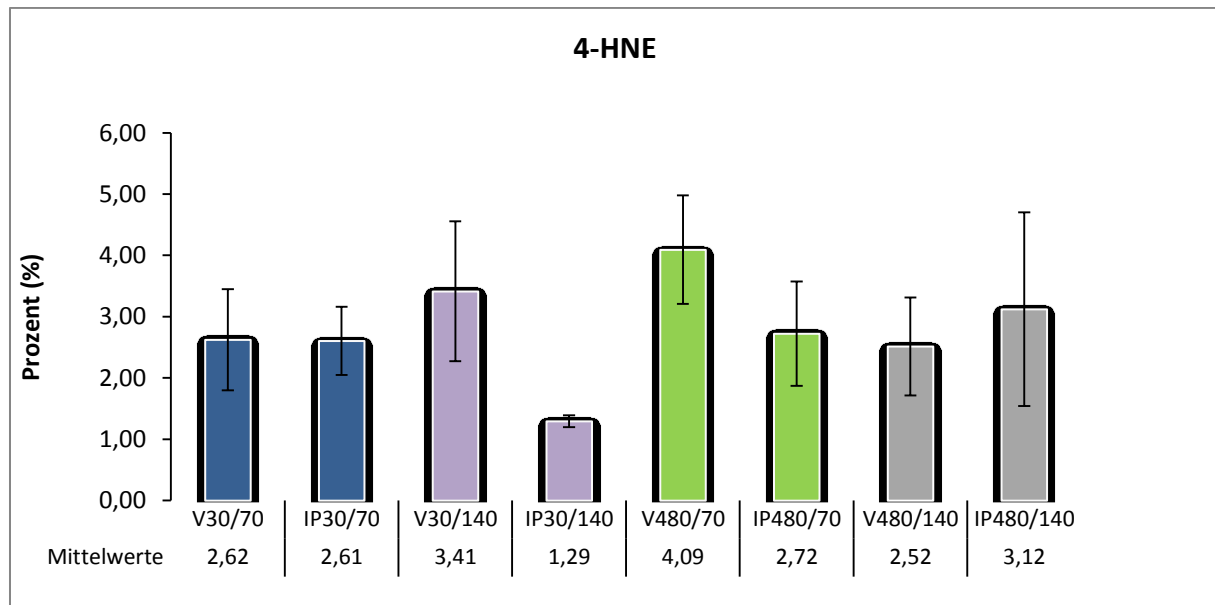


Abb. 2: immunhistologische Detektion von 4-HNE im Gewebe

Die quantitative Auswertung der immunhistochemischen Präparate erfolgte lichtmikroskopisch unter Zuhilfenahme einer Bildverarbeitungssoftware (Siehe Abschnitt 4.2.7). Die Ergebnisse sind in Prozent (%) als Anteil der mit dem Chromogen gefärbten Fläche (x %) bezogen auf die Gesamtfläche (100%) des aufgenommenen Bildes angegeben.

Diagramm 9: Gehalt von 4-HNE in den Gewebeschnitten



Immunhistochemisch fand sich nach 30 Minuten Ischämie und 70 Tagen Nachbeobachtung gleich viel 4-HNE in beiden Gruppen (V30/70 vs. IP30/70: $2,62 \pm 0,83$ % vs. $2,61 \pm 0,56$ %; $p = 0,631$). Auch nach 140 Tagen konnte kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die einer dreißigminütigen Ischämie ausgesetzt waren, beobachtet werden (V30/140 vs. IP30/140: $3,41 \pm 1,14$ % vs. $1,29 \pm 0,10$ %; $p = 0,262$). Gleiches zeigte sich nach 8 Stunden Ischämie und 70 Tage nach der Transplantation (V480/70 vs. IP480/70: $4,09 \pm 0,89$ % vs. $2,72 \pm 0,85$ %; $p = 0,150$), sowie nach 140 Tagen (V480/140 vs. IP480/140: $2,52 \pm 0,80$ % vs. $3,12 \pm 1,58$ %; $p = 0,873$).

5.5 Einfluss unterschiedlicher Narkoseformen auf die Entwicklung einer chronischen Transplantatabstossung

Die histopathologische Bewertung der in Paraffin eingebetteten Gewebeproben (**Abb. 3**) erfolgte anhand einer Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung, bei der basophile (saure) Strukturen, wie z.B. Zellkerne und Kalkablagerungen, durch das Hämatoxylin blau dargestellt werden. Das Eosin hingegen färbt azidophile (basische) Strukturen wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien oder Kollagen in verschiedenen Rottönen an. Zur Darstellung von interstitieller Fibrosierung ist eine Elastica-van-Giesson (EvG)-Färbung durchgeführt worden. Bei dieser Färbung werden elastische Fasern schwarzviolett, Kollagenfasern rot und Muskelgewebe gelb dargestellt. Die Beurteilung der Transplantatvaskulopathie, der kardiomyozytären Degeneration, der interstitiellen Fibrose und der lymphozytären Infiltration erfolgte anhand eines von Franz und Mitarbeitern entwickelten *Scoring-Systems* (Franz et al. 2011), welches in Abschnitt 4.2.8 beschrieben wurde. Die Ergebnisse des Scorings sind in Tabelle 7 als Mittelwert \pm Standardfehler bzw. in Prozent dargestellt (**Tabelle 7**).

Tabelle 7: Ergebnisse des Scorings der histologischen Präparate

Gruppe	TVP	Lymphozytäre Infiltration	kardiomyozytäre Degeneration	interstitielle Fibrose	Summenscore
V30/70	50,00 %	2,00 \pm 0,33	50,00 %	1,83 \pm 0,37	5,83 \pm 1,28
IP30/70	33,33 %	1,83 \pm 0,28	50,00 %	1,83 \pm 0,37	5,33 \pm 1,26
V30/140	66,67 %	2,17 \pm 0,37	66,67 %	2,00 \pm 0,47	6,83 \pm 1,55
IP30/140	83,33 %	1,67 \pm 0,30	33,33 %	1,67 \pm 0,45	5,67 \pm 1,24
V480/70	50,00 %	2,58 \pm 0,18	50,00 %	2,17 \pm 0,30	7,08 \pm 1,14
IP480/70	100 %	2,00 \pm 0,47	66,67 %	1,92 \pm 0,38	6,92 \pm 1,37
V480/140	83,33 %	1,50 \pm 0,31	33,33 %	1,50 \pm 0,46	5,33 \pm 1,19
IP480/140	66,67 %	1,92 \pm 0,38	83,33 %	1,75 \pm 0,44	6,67 \pm 1,36

(angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der Scores für jedes untersuchte Kriterium, für die TVP und die kardiomyozytäre Degeneration erfolgt die Angabe in Prozent)

TVP: 0 = keine vorhanden, 2 = vorhanden

Lymphatische Infiltration: 0 = keine, 1 = schwach, 2 = moderat, 3 = stark

Myokardiale Destruktion: 0 = keine vorhanden, 2 = vorhanden

Interstitielle Fibrose: 0 = keine, 1 = schwach, 2 = moderat, 3 = stark

Summenscore: 0 = keine Abstossung, 1 – 3 = schwache Abstossung, 4 – 7 = moderate Abstossung, 8 – 10 = schwere Abstossung

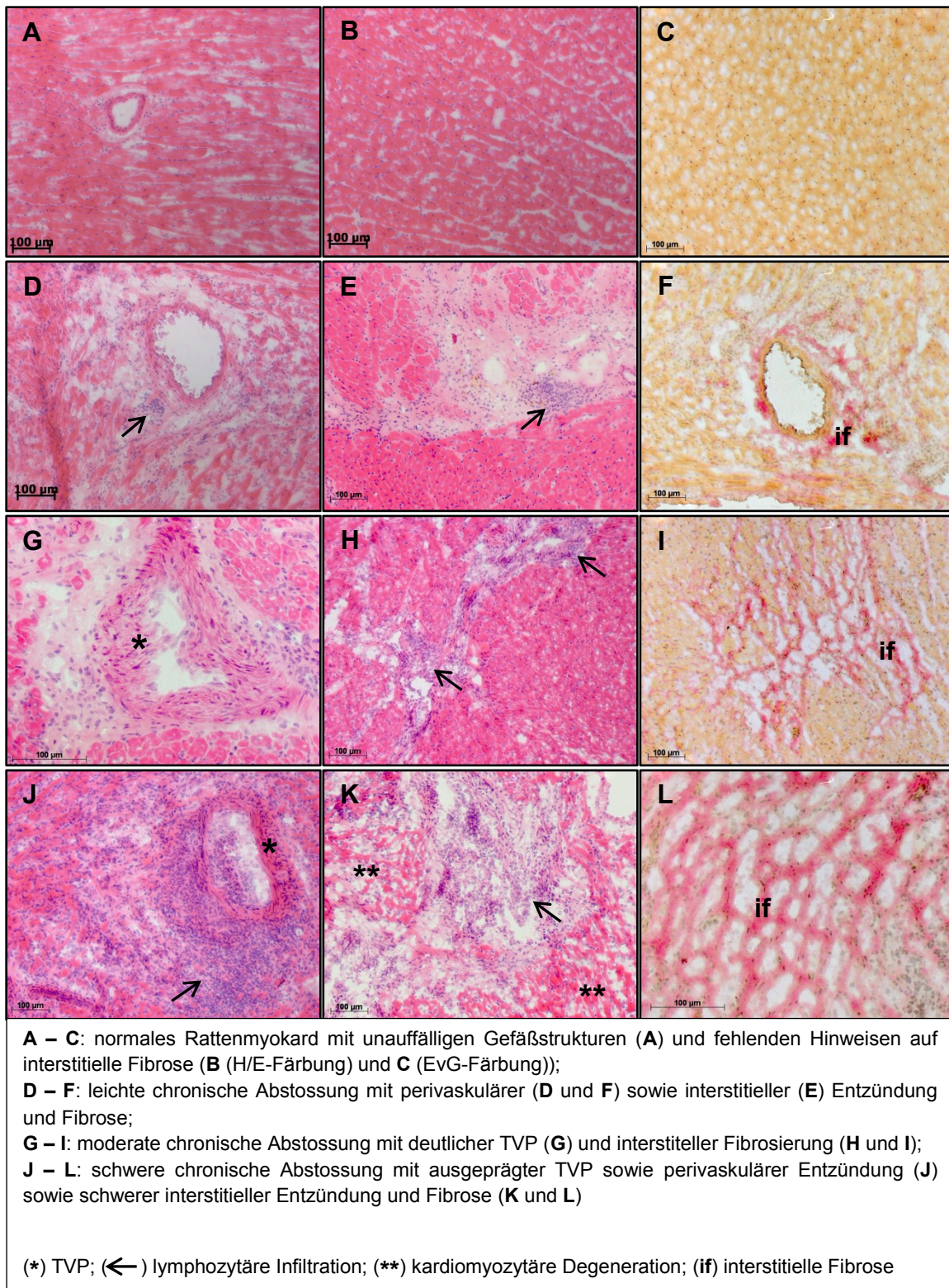
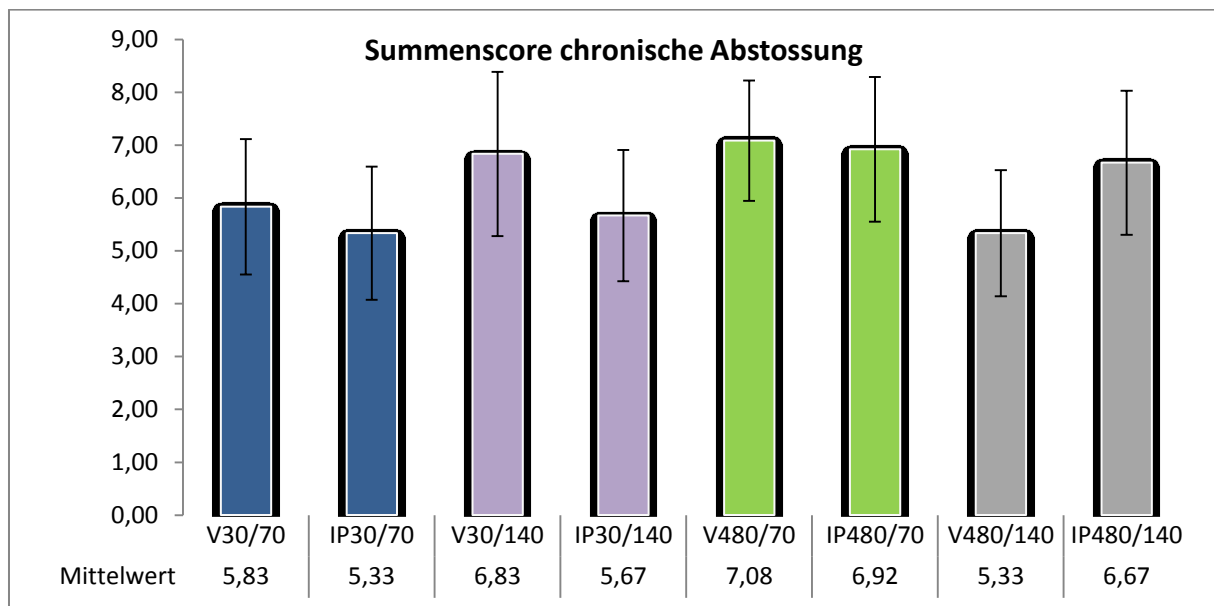


Abb. 3: Histopathologischer Befund der chronischen Transplantatabstossung

In allen histologischen Präparaten ließ sich auf Basis des Summenscores eine moderate Abstossungsreaktion feststellen, die zwischen den untersuchten Gruppen keinen signifikanten Unterschied aufzeigte (**Diagramm 10**).

Diagramm 10: Summescore für die chronische Abstossung in den Versuchsgruppen



Zwischen den Gruppen die einer 30 minütigen Ischämie ausgesetzt waren und die 70 Tage nachbeobachtet worden sind, zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Schweregrad der chronischen Transplantatabstossung (V30/70 vs. IP 30/70: $5,83 \pm 1,28$ vs. $5,33 \pm 1,26$; $p = 0,57$). Gleiches zeigte sich nach 140 Tagen (V30/140 vs. IP30/140: $6,83 \pm 1,55$ vs. $5,67 \pm 1,24$; $p = 0,568$). Trotzdem die chronische Abstossung in der Isoflurangruppe geringfügig höher bewertet wurde, war der Unterschied nicht signifikant. Eine nahezu gleichstarke Ausprägung der chronischen Abstossung fand sich in den Gruppen, deren Transplantate einer 8 stündigen Ischämie ausgesetzt waren und 70 Tage nachbeobachtet wurden (V480/70 vs. IP480/70: $7,08 \pm 1,14$ vs. $6,92 \pm 1,37$; $p = 0,809$). Im Vergleich zu den anderen Gruppen, fand sich in diesen beiden Gruppen der höchste Abstossungsgrad. Nach 8 stündiger Ischämie und 140 Tagen Nachbeobachtung war die chronische Abstossung zwar in der Isoflurangruppe geringer ausgeprägt als in der mit Nembutal® behandelten Gruppe, jedoch war der Unterschied nicht signifikant (V480/140 vs. IP480/140: $5,33 \pm 1,19$ vs. $6,67 \pm 1,36$; $p = 0,628$).

5.5.1 Einfluss unterschiedlicher Narkoseformen auf die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie

Abbildung 4 zeigt den histologischen Befund der TVP am transplantierten Herzen in der H/E-Färbung und der Elastica-van-Gieson-Färbung (**Abb. 4**).

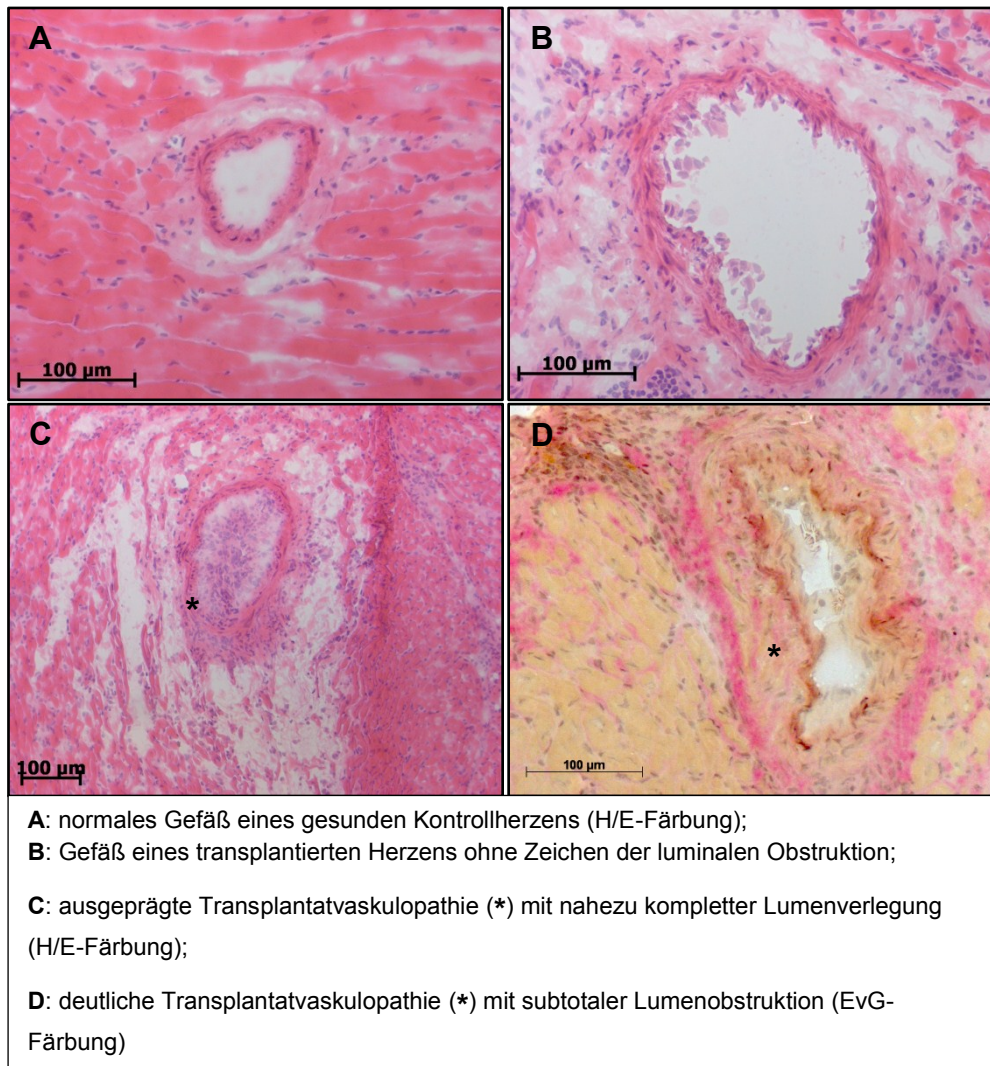
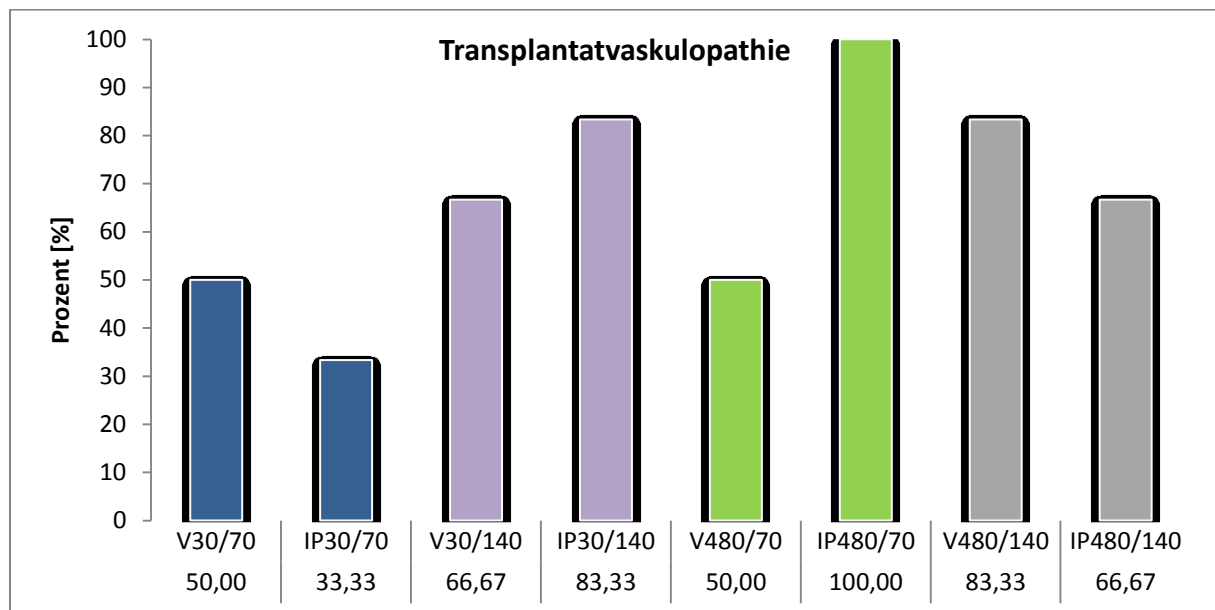


Abb. 4: histopathologische Darstellung der Transplantatvaskulopathie

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Transplantatvaskulopathie sind in Diagramm 11 dargestellt. Die Auswertung erfolgte als Anteil der Versuchstiere einer Versuchsgruppe mit nachgewiesener TVP an der Gesamtzahl der Tiere in dieser Gruppe in Prozent (**Diagramm 11**).

Diagramm 11: Ausmass der Transplantatvaskulopathie

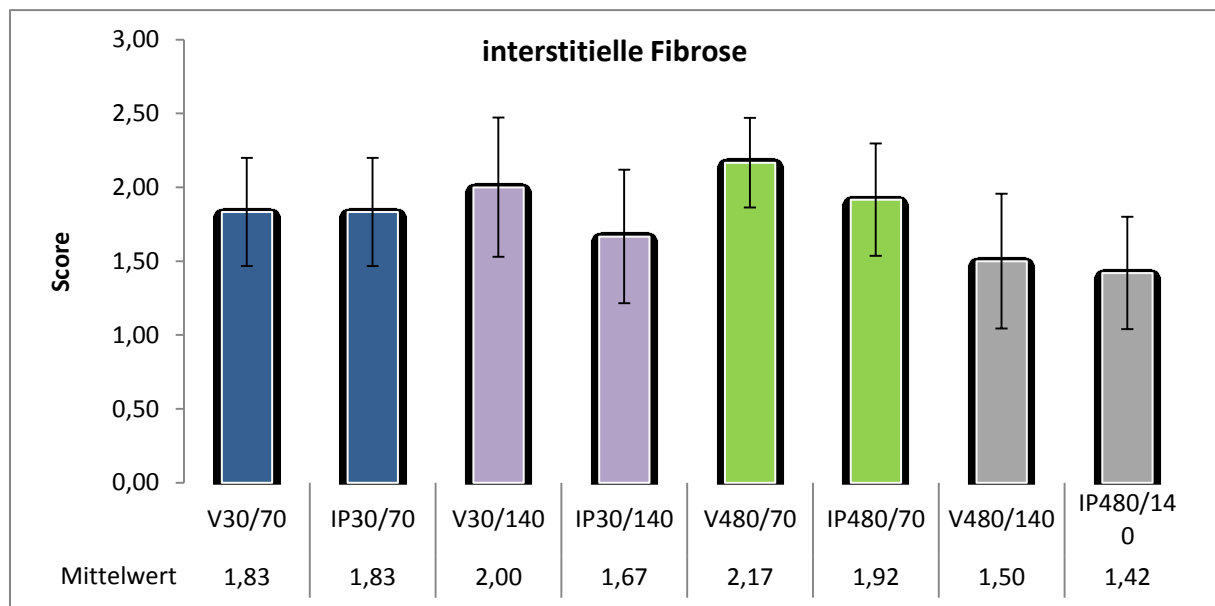


Nach 30 Minuten Ischämie und 70 Tagen Nachbeobachtung, fand sich zwischen den mit Nembutal[®] und Isofluran behandelten Tieren kein Unterschied hinsichtlich der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie (V30/70 vs. IP30/70: 50 % vs. 33,33 %; $p = 0,575$). Gleiches fand sich auch nach einer Nachbeobachtungszeit von 140 Tagen (V30/140 vs. IP30/140: 66,67 % vs. 83,33 %; $p = 0,523$). Zwischen den Gruppen die einer achtstündigen Ischämie ausgesetzt waren, zeigte sich ebenfalls kein Unterschied im Auftreten der Transplantatvaskulopathie, weder nach 70 Tagen (V480/70 vs. IP480/70: 50 % vs. 100 %; $p = 0,861$), noch nach 140 Tagen nach der Transplantation (V480/140 vs. IP480/140: 83,33 % vs. 66,67 %; $p = 0,523$).

5.5.2 Einfluss unterschiedlicher Narkoseformen auf die Entwicklung einer interstitiellen Fibrose

Die Ergebnisse des Scorings der interstitiellen Fibrose sind in Diagramm 12 als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt (**Diagramm 12**).

Diagramm 12: Scoring der interstitiellen Fibrose



Es zeigte sich, dass in allen Gruppen eine interstitielle Fibrose unterschiedlichen Schweregrades nachzuweisen war. Während sich in den Gruppen mit 30 Minuten Ischämie nach 70 Tagen die Fibrose nicht unterschieden hat (V30/70 vs. IP30/70: $1,83 \pm 0,37$ vs. $1,83 \pm 0,37$; $p = 1,0$), zeigte sich in der Isoflurangruppe nach 30 Minuten Ischämie und 140 Tagen Nachbeobachtung zwar eine stärker ausgeprägte Fibrose als in der Nembutal[®]-Gruppe, jedoch ohne signifikanten Unterschied (V30/140 vs. IP30/140: $2,00 \pm 0,47$ vs. $1,67 \pm 0,45$; $p = 0,614$). In den Gruppen, in denen die Ischämie 8 Stunden andauert hat und die 70 Tage nachbeobachtet wurden, zeigte sich ebenfalls in der Isoflurangruppe eine stärkere Fibrose als in der Nembutal[®]-Gruppe (V480/70 vs. IP480/70: $2,17 \pm 0,30$ vs. $1,92 \pm 0,38$; $p = 0,681$). Der Unterschied war nicht signifikant. Ebenso verhielt es sich nach 8 Stunden Ischämie und 140 Tagen Nachbeobachtung. Hier war in der Isoflurangruppe eine stärkere Fibrose nachzuweisen, allerdings ohne signifikanten Unterschied (V480/140 vs. IP480/140: $1,50 \pm 0,46$ vs. $1,42 \pm 0,38$; $p = 0,742$).

6. Diskussion

In vielen experimentellen (Chen et al. 2008, Muntean et al. 2012) und klinischen (Tritapepe et al. 2007, Ballester et al. 2011, Tempe et al. 2011) Studien konnte ein kardioprotektiver Effekt von volatilen Anästhetika nachgewiesen werden. Durch den Einsatz volatiler Anästhetika in der Herzchirurgie kommt es postoperativ zu einem geringeren Troponinanstieg als Ausdruck einer verminderten Myokardschädigung und es lassen sich geringere Konzentrationen von Lipidperoxiden als Biomarker für den oxidativen Stress nachweisen. Die Patienten profitieren insgesamt von einem geringeren Bedarf an Inotropika sowie einer kürzeren Krankenhausverweildauer (Tritapepe et al. 2007, Ballester et al. 2011, Tempe et al. 2011).

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, anhand eines heterotopen Rattenherztransplantationsmodells zu untersuchen, inwieweit Isofluran als Vertreter der volatilen Anästhetika im Vergleich zu einem intravenösen Anästhetikum (Nembutal®) in der Lage ist, das Myokard vor einem Ischämieereignis zu präkonditionieren. Dabei sollte in der Reperfusionsphase oxidativer Stress reduziert und damit langfristig der Entstehung chronischer Abstossungsprozesse, insbesondere der Transplantatvaskulopathie und der interstitiellen Fibrose, entgegengewirkt werden. Als Marker für den oxidativen Stress wurden enzymatische sowie nicht-enzymatische Antioxidanzien und die Bildung von Lipidperoxiden herangezogen. Das Ausmass der chronischen Abstossungsreaktion wurde anhand konventioneller histologischer Färbungen untersucht und mittels eines repräsentativen *Scoring*-Systems quantifiziert (Franz et al. 2011)

Ein in der tierexperimentellen Herztransplantation häufig verwendetes Tiermodell ist das heterotope Rattenherztransplantationsmodell nach Ono und Lindsey (Ono und Lindsey 1969, Yokoyama et al. 1995). Dies ist ein einfaches und reproduzierbares Modell, da es lediglich zweier Gefäßanastomosen bedarf und die Funktion des transplantierten Herzens durch einfache Palpation durch die Bauchdecke beurteilt werden kann. Da es sich um eine heterotope Transplantation handelt, kann die Transplantation auch zwischen Tieren unterschiedlicher Größe durchgeführt werden (Ono und Lindsey 1969). Ein Nachteil des Modells von Ono und Lindsey jedoch ist, dass es sich hierbei um ein „nicht-arbeitendes“ Modell handelt, bei dem lediglich eine Koronarperfusion bei kompetenter Aortenklappe stattfindet und der linke Ventrikel

keine Druck- und Volumenbelastung wie unter klinischen Bedingungen erfährt. Um ein klinisch realistischeres Modell zu erhalten, sind für den Tierversuch am zu transplantierenden Herzen die Modifikationen nach Yokoyama durchgeführt worden, welche im Abschnitt 4.1.3 beschrieben wurden. Mit den Modifikationen ist es gelungen, ein Herztransplantationsmodell zu erhalten, in welchem das transplantierte Herz vergleichbaren hämodynamischen Bedingungen wie ein orthotop transplantiertes Herz ausgesetzt ist. Ebenso kann das heterotop transplantierte Herz auf endogene wie exogene Katecholamine und auf Volumenveränderungen reagieren (Yokoyama et al. 1995). In der Literatur ist bisher kein vergleichbares Transplantationsmodell beschrieben worden, welches die Druck- und Volumenbelastung mitberücksichtigt (Bedi et al. 2010). Die Versuchstiere (Lewis-Ratten als Spender und Fisher-Ratten als Empfänger) sind deshalb gewählt worden, da sich diese beiden Stämme in vielen nicht-MHC-Antigenen unterscheiden, jedoch die MHC-I- und MHC-II-Antigene identisch sind, welches ein Langzeitüberleben der Transplantate ohne Immunsuppression gewährleistet und die Ausbildung einer chronischen Transplantatabstossung begünstigt. Die Transplantatvaskulopathie, die man hierbei sieht, ist identisch mit der am menschlichen Transplantat auftretenden (Adams et al. 1993, Bedi et al. 2010). Andere Herztransplantationsmodelle mithilfe von speziell gezüchteten Ratten oder Mäusen dienen eher der Untersuchung von immunologischen Komponenten der chronischen Transplantatschädigung. Ein weiterer Aspekt, der bei der Wahl des hier verwendeten Rattenherztransplantationsmodells entscheidend war, ist, dass dieses Modell das einzige ist, was ein Langzeitüberleben des Transplantates gewährleistet. Bedi und Mitarbeiter berichten in ihrer Übersichtsarbeit, in der verschiedene Herztransplantationsmodelle verglichen wurden, von einer Überlebenszeit der Transplantate von 20 bis 100 Tagen (Bedi et al. 2010). Adams und Mitarbeiter berichten bei der Herztransplantation von Lewis-Ratten auf Fisher344-Ratten von einem Transplantatüberleben von 120 Tagen, wobei jedoch lediglich 25 % der Transplantate auch einen längeren Zeitraum überleben (Adams et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit haben alle transplantierten Ratten den vorgegebenen Nachbeobachtungszeitraum überlebt.

Die Ratten, welche Nembutal® als Narkose erhalten haben und einer Ischämiezeit von 30 Minuten ausgesetzt waren, dienten bei diesem Versuch als Kontrollgruppe, da im Rahmen einer Herztransplantation selbst unter optimalen Bedingungen eine

Ischämiezeit von 30 Minuten nicht zu verhindern ist (Renner et al. 2004).

Hinsichtlich des oxidativen Stresses konnte anhand der in dem hier vorliegenden Tierversuch analysierten Biomarker kein wesentlicher Einfluß der Narkoseform auf die Aktivität bzw. Konzentration derselben nachgewiesen werden. Lediglich in der Gruppe, die einer achtstündigen Ischämie ausgesetzt war und 70 Tage nachbeobachtet wurde, ließ sich eine signifikant niedrigere Aktivität der SOD im Falle einer Isoflurannarkose finden, welches als Hinweis auf eine verminderte Bildung von Superoxidanionen ($\cdot\text{O}_2^-$) zu interpretieren ist. Wie bereits in der Einleitung zu dieser Arbeit beschrieben, findet in der mitochondrialen Atmungskette unter physiologischen Bedingungen die Hauptverwertung von molekularem Sauerstoff statt. Es ist bekannt, dass die präkonditionierende Wirkung von Isofluran auf einer Triggerung der Produktion von Superoxidanionen durch den Komplex III der mitochondrialen Atmungskette beruht (Ludwig et al. 2004). Zudem existieren verschiedene Mechanismen, die in der Reperfusion eines zuvor ischämischen Myokardareals als Quelle von Superoxidanionen in Frage kommen (siehe Abschnitt 2.4), so dass durch die Bestimmung der Aktivität der Superoxiddismutase das Ausmass des oxidativen Stresses abgeschätzt werden kann. Ausserdem ist die SOD der wichtigste zelluläre Abwehrmechanismus gegen Superoxidanionen (siehe Abschnitt 2.3.1). Chen und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Ratten, die vor einer 30 Minuten andauernden Okklusion des Ramus interventricularis anterior mit Isofluran behandelt wurden, nach 2 Stunden Reperfusion eine erhöhte Konzentration an Superoxidanionen und eine erhöhte Aktivität der Superoxiddismutase aufwiesen (Chen et al. 2008). Ludwig und Chen haben bei ihrem Versuch als führendes Narkosemittel Pentobarbital verwendet und Isofluran additiv zur Präkonditionierung verwendet, sodass diese Kurzzeitversuche einen Vergleich zwischen Isofluran und Pentobarbital, ähnlich dem experimentellen Ansatz dieser Dissertation, zulassen. In einer früheren Untersuchung der Arbeitsgruppe von Renner und Mitarbeitern am gleichen Transplantationsmodell konnte für das volatile Anästhetikum Enfluran ebenfalls nachgewiesen werden, dass nach einer Ischämiezeit von 480 Minuten und einer Reperfusion von 4 Stunden eine signifikant höhere Aktivität der SOD zu verzeichnen war, als nach einer dreißigminütigen Ischämie und gleicher Reperfusionsdauer (Renner et al. 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene SOD-Aktivität war jedoch deutlich niedriger als in den eben genannten Untersuchungen von Renner sowie Chen, wobei die von Renner und Mitarbeitern gemessene SOD-Aktivität

unmittelbar nach der Transplantation und somit nach einer kürzeren Reperfusionzeit bestimmt worden ist, als in dem hier vorliegenden Versuch. In einer Untersuchung von Türkan und Mitarbeitern wurde die SOD-Aktivität in verschiedenen Geweben (Leber, Niere, Lunge, Gehirn) der Ratte unter Applikation von Sevofluran bestimmt, ohne eine Ischämie zu induzieren (Türkan et al. 2011). Die hier bestimmten SOD-Aktivitäten in den verschiedenen Geweben waren annähernd vergleichbar mit jenen der im Rahmen der vorliegenden Dissertation beschriebenen Ergebnisse, wobei nicht die Aktivität im Myokardgewebe sondern den genannten anderen Organsystemen gemessen wurde. Es ist anzunehmen, dass die in den Versuchen von Renner und Mitarbeitern sowie Chen und Mitarbeitern gemessene erhöhte Aktivität der SOD nur zusammen mit der Reperfusion auftritt. Die SOD-Aktivität war in der hier vorliegenden Arbeit bis auf die Gruppe V480/70 in allen Gruppen vergleichbar hoch. Dies lässt den Schluß zu, dass kein erhöhter oxidativer Stress vorgelegen hat. Wenn dem so wäre, hätte man in den Gruppen, die einer achtstündigen Ischämie ausgesetzt gewesen waren, eine vermehrte Produktion von Superoxidanionen und somit eine höhere Aktivität der SOD erwarten können. Warum nun in der Gruppe V480/70 eine niedrigere Aktivität der SOD zu messen war, lässt sich nicht abschliessend beantworten, zumal die Aktivität der SOD nach 140 Tagen in der Isoflurangruppe mit einer achtstündigen Ischämie keinen Unterschied zu den anderen Gruppen zeigte. Man kann davon ausgehen, dass die verminderte Aktivität der SOD in der Gruppe V480/70 ohne pathologische Relevanz ist. Eine persistierende Bildung von Superoxidanionen, beispielsweise durch das initiale Ischämie-Reperfusionereignis oder einer chronischen Aktivierung des Immunsystems, würde vermutlich zu einer weitreichenden Funktionstörung der Herzmuskelzellen führen. Ursache wäre eine Interaktion der Superoxidanionen mit Bestandteilen der Herzmuskelzelle, was gegebenenfalls zu einer Abnahme der Pumpfunktion, zu Arrhythmien oder sogar einem kompletten Transplantatversagen führen könnte. Da sich aber in allen Gruppen am Ende der Nachbeobachtungszeit eine ausreichend gute Transplantatfunktion feststellen ließ und eben die Aktivität der Superoxiddismutase mit Ausnahme der Gruppe V480/70 vs. IP480/70 keinen signifikanten Unterschied zeigte, kann postuliert werden, dass zum Zeitpunkt der Transplantatentnahme kein erhöhter oxidativer Stress vorgelegen hat. Die Gruppe V480/70 zeigte hierbei von allen Gruppen die tendenziell schlechteste Transplantatfunktion, jedoch keine erhöhte SOD-Aktivität als Ausdruck von

oxidativem Stress. Die Aktivität der SOD stellt sich in dieser Gruppe sogar niedriger als in der Nembutal[®]-Gruppe mit 8 Stunden Ischämie und 140 Tagen Nachbeobachtung dar. In einer Untersuchung an Mäuseherzen konnten Kliment und Mitarbeiter zeigen, dass ein Mangel an extrazellulärer Superoxiddismutase mit einer verminderten Herzleistung einhergeht. Ein Fehlen an SOD war mit einer Abnahme der linksventrikulären Wanddicke und mit einer Zunahme des enddiastolischen Innendurchmessers des linken Ventrikels verbunden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass ein Mangel an SOD dazu führt, dass nach einem oxidativen Stressereignis vermehrt Entzündungszellen (Lymphozyten) in das Myokard einwandern (Kliment et al. 2009). Ebenfalls in der Gruppe V480/70 fand sich der größte Anteil an Lymphozyten, wenngleich die Lymphozyteninfiltration in den histologischen Präparaten dieser Gruppe, wie in allen Gruppen, insgesamt als moderat zu quantifizieren war. Die verminderte Transplantatfunktion in der Gruppe V480/70 wird somit durchaus nachvollziehbar.

Im erneuten Vergleich der Gruppen V480/70 vs. IP480/70 zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied in der Redox-Ratio des Glutathions (GSH/GSH_t). Eine verminderte GSH/GSH_t ist häufig mit oxidativem Stress assoziiert. Dies qualifiziert sie als nützlichen Indikator für oxidativen Stress (Circu und Aw 2011), weshalb dieses Redox-Verhältnis in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde. In den von uns untersuchten Gruppen war die GSH/GSH_t in der mit Isofluran behandelten Gruppe nach 480 Minuten Ischämie und 70 Tagen Nachbeobachtung signifikant niedriger als in der mit Nembutal[®] behandelten. Bei einfacher Betrachtung der Konzentrationen für GSH und GSSG nach 8 Stunden Ischämie und 70 Tagen Nachbeobachtung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Isoflurangruppe und der Nembutal[®]-Gruppe, wenngleich die Konzentration des GSSG in der Isoflurangruppe (V480/70) höher und entsprechend die GSH-Konzentration niedriger war als in der Nembutal[®]-Gruppe (IP480/70), was zu einem niedrigen GSH/GSH_t in der Isoflurangruppe führte. In Zusammenschau der verminderten Transplantatfunktion, der Lymphozyteninfiltration und der niedrigen Redox-Ratio, kann eine Belastungssituation der Transplantate in der Isoflurangruppe V480/70 angenommen werden, auch wenn in der beschriebenen Isoflurangruppe die SOD-Aktivität vermindert war und sich keine Unterschiede in der Aktivität der Katalase und der Glutathionperoxidase zeigten. Die niedrige GSH-Konzentration in der

Isoflurangruppe V480/70 lässt sich möglicherweise durch die 4-HNE-Konzentration in dieser Gruppe erklären, auch wenn diese im Vergleich zur Nembutal[®]-Gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied zeigte. GSH ist an der Detoxifikation von 4-HNE beteiligt (Yang et al. 2003), so dass eine erhöhte 4-HNE-Konzentration durchaus zu einer Abnahme der GSH-Konzentration führen kann. Leichtweis und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine verminderte GSH-Konzentration nach oxidativem Stress ebenfalls mit einer Abnahme der linksventrikulären Pumpfunktion verbunden ist (Leichtweis und Ji 2001). Aus dieser Überlegung könnte sich eine zusätzliche Erklärung für die verminderte Transplantatfunktion in der Isoflurangruppe V480/70 ergeben. In den anderen Gruppen fand sich ein genau entgegengesetztes Bild. Hier waren die GSH-Konzentrationen deutlich höher als die korrespondierenden GSSG-Konzentrationen. Die Redox-Ratio des Glutathions (GSH/GSH_t) zeigte zwischen diesen Gruppen keinen signifikanten Unterschied, sodass auch hier von einem vergleichsweise geringeren oxidativen Stress auszugehen ist. In einem früheren Versuch unserer Arbeitsgruppe unter Verwendung des gleichen Transplantationsmodells, fand sich nach einer achtstündigen Myokardischämie eine deutlich niedrigere Konzentration des gesamten Glutathions (Renner et al. 2004). In den hier beschriebenen Untersuchungen konnte kein signifikanter Unterschied in der Glutathiongesamtkonzentration zwischen den Gruppen errechnet werden. Die Bestimmung des reduzierten (GSH) und des oxidierten (GSSG) Glutathions erfolgte in Gewebehomogenaten, bei deren Aufarbeitung Informationen auf der Ebene von subzellulären Kompartimenten bzw. Zellorganellen verloren gehen (Morgan et al. 2013). In einer jüngst erschienen Arbeit von Morgan und Mitarbeitern wurde dieses Problem anhand von Hefezellen untersucht. Bei den herkömmlichen Bestimmungsmethoden des Glutathiongehaltes von Zellen fand sich im Zytosol in der Regel ein molares Verhältnis von GSH zu GSSG von 30 – 100 : 1. Es wurde nachgewiesen, dass, wenn man den Glutathiongehalt mittels bestimmter Fluoreszenz-Proteine (*Yellow-Fluoreszenz-Proteine* und *Green-Fluoreszenz-Proteine*) ermittelt, auch Informationen über die Verteilung des GSH und des GSSG in den Zellorganellen (z.B. Vakuolen) der Hefezellen gewonnen werden können. Somit konnte mit dieser Methode ein deutlich höheres molares Verhältnis von GSH zu GSSG von 50 000 : 1 im Zytosol errechnet werden (Morgan et al. 2013). Aus weiteren Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Morgan ist bekannt, dass das Redox-Verhältnis von Glutathion selbst unter Bedingungen des oxidativen Stresses

nahezu konstant bleibt. Es zeigte sich, dass es in den untersuchten Zellen verschiedene Mechanismen gibt, das GSSG zu GSH zu reduzieren, um ein konstantes Verhältnis von GSH zu GSSG im Zytosol zu erhalten und die Zellen somit vor oxidativen Stress zu schützen. Findet sich in den Hefezellen ein Überschuss an GSSG, so lag auf Basis der bisherigen Untersuchungen die Vermutung nahe, dass diese Zellen oxidativem Stress ausgesetzt sein mussten. Morgan und Mitarbeiter fanden heraus, dass bei einem zytosolischen Überschuss an GSSG ein Teil des GSSG, welcher nicht schnell genug zu GSH reduziert wird, durch spezielle Transporter in Vakuolen der Hefezellen geschleust wird. Dieser Transport erfolgt mit vergleichsweise hoher Geschwindigkeit mit dem Ziel, die Glutathionhomöostase wieder herzustellen. Des Weiteren kann das GSSG durch das Thioredoxinsystem, das Glutaredoxinsystem und die Glutathionperoxidase zu GSH reduziert werden (Circu und Aw 2011, Morgan et al. 2013). Betrachtet man die Messungen des Glutathions (GSH und GSSG) bzw. dessen Redox-Verhältniss in Herzmuskelzellen unter diesen Gesichtspunkten, so kann vermutet werden, dass eine Regulierung der Glutathionhomöostase unmittelbar nach Einsetzen des oxidativen Stresses, beispielsweise nach Ischämie und Reperfusion, geschieht und sich das zytosolische Redox-Verhältnis nicht signifikant verändert. Vor diesem Hintergrund wäre 70 bzw. 140 Tage nach der Transplantation kein Unterschied im Redox-Verhältnis zu erwarten. Dies wurde, mit Ausnahme der Gruppen V480/70 vs. IP480/70, in allen Gruppen der vorliegenden Arbeit beobachtet. Inwieweit eine Übertragung der Beobachtungen von Morgan und Mitarbeitern auf ein komplexes Organsystem wie dem Herzen erfolgen kann, muss erst noch überprüft werden. Eine weitere Einschränkung der Arbeit von Morgan und Mitarbeitern ist, dass lediglich intrazelluläre Transport- und Regulierungsmechanismen untersucht wurden. Der Transport von Glutathion in den extrazellulären Raum und damit verbunden ein intrazellulärer Glutathion-Verlust, wurde nicht untersucht (Morgan et al. 2013).

Die Glutathionperoxidase und die Katalase zeigten in der hier vorgelegten Arbeit im Vergleich aller Gruppen untereinander eine nahezu gleich hohe Aktivität. Beide Enzyme reduzieren Peroxide, wobei die Katalase in erster Linie Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff umwandelt. Die Glutathionperoxidase benötigt für ihre Aktivität GSH als Co-Substrat, welches zu GSSG oxidiert wird. Im oxidativen Stress ist eine erhöhte Katalase- und GPx-Aktivität zu erwarten. Diese Beobachtung konnte in einer Untersuchung von Hassan und Mitarbeitern gemacht werden. Es wurde der

zeitliche Verlauf der Aktivität verschiedener antioxidativer Enzyme, unter anderem der Glutathionperoxidase und der Katalase, nach Lebertransplantation untersucht. Dabei zeigte sich eine erhöhte Aktivität der Glutathionperoxidase und der Katalase innerhalb des ersten Tages nach der Transplantation. Beide Enzyme zeigten bis zu 7 Tage nach der Transplantation eine erhöhte Aktivität (Hassan et al. 2005). Eine weitere Bestimmung der Enzyme über 7 Tage hinaus fand nicht statt, sodass nicht gesagt werden kann, wann ein Maximum der Aktivität erreicht wird und ob die Aktivität der Enzyme wieder abnimmt, je weiter der Transplantationszeitpunkt zurückliegt. Für das in dieser Arbeit verwendete Rattenherztransplantationsmodell liegen für die Aktivität der GPX und der Katalase lediglich Daten aus Kurzzeitversuchen aus der eigenen Arbeitsgruppe vor (Renner et al. 2004). Hier zeigte sich, dass die Aktivität der Glutathionperoxidase in der vorliegenden Arbeit in allen Gruppen unter der von Renner und Mitarbeitern gemessenen GPX-Aktivität lag. In der jetzt genannten Untersuchung erfolgte die heterotope Rattenherztransplantation ebenfalls nach dem in dieser Arbeit verwendeten Modell. Die Ischämiezeiten der Spenderherzen betragen ebenfalls 30 bzw. 480 Minuten. Lediglich der Nachbeobachtungszeitraum belief sich auf maximal 6 Stunden. Die Aktivität der Katalase in der vorliegenden Arbeit wies im Vergleich zu den Daten von Renner und Mitarbeitern nach 70 bzw. 140 Tagen Nachbeobachtung sogar höhere Werte auf (Renner et al. 2004). In einer Studie von Kedzierska wird herausgestellt, dass eine verminderte GPX-Aktivität im oxidativen Stress eine Erhöhung der Katalase-Aktivität zur Folge hat (Kedzierska et al. 2011). In der eben herangezogenen Studie von Renner und Mitarbeitern wird die verminderte GPX-Aktivität kurz nach der Transplantation bzw. der Reperfusion durch einen Verbrauch von GSH durch die GPX selbst, aber auch durch eine unzureichende Bereitstellung von GSH aufgrund von oxidativem Stress erklärt, was sich in einer Abnahme des Gesamtglutathions in der Zelle zeigt (Renner et al. 2004). Der Gesamtgehalt an Glutathion sowie die Konzentration von GSH zeigten in der vorliegenden Arbeit keinen Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Trotzdem beide Parameter in den Gruppen V30/140 und IP480/70 am höchsten waren, zeigte die GPX in diesen beiden Gruppen keine signifikant höhere Aktivität verglichen mit den anderen Gruppen. Entsprechend dazu zeigte die Katalase-Aktivität ebenfalls keine Unterschiede. Da alle anderen untersuchten Marker des oxidativen Stresses keinen Hinweis auf ein aktuelles oxidatives Stressereignis erbrachten, lässt sich vermuten,

dass der im Rahmen des Ischämie-Reperfusionereignisses aufgetretene oxidative Stress entweder zu einer langfristigen Funktionseinbuße der GPX geführt hat, oder die Glutathionhomöostase anhaltend gestört ist. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die Aktivität der GPX nach 70 bzw. 140 Tagen ein normales Niveau erreicht hat. Da sich hinsichtlich der Narkoseform kein Unterschied der GPX- und Katalase-Aktivität fand, ist es unwahrscheinlich, dass die Narkoseform einen langfristigen Einfluss auf die Enzyme hatte.

Die Konzentration der Lipidperoxide zeigte sich nach 8 Stunden Ischämie und 70 Tagen Nachbeobachtung zwischen den Gruppen lediglich im Trend unterschiedlich ($p = 0,055$), wobei die Lipidperoxidkonzentration in der Nembutal[®]-Gruppe höher war als in der Isoflurangruppe. Dies kann auf einen erhöhten oxidativen Stress in dieser Gruppe hinweisen. Gleichzeitig fand sich aber kein Unterschied im Nachweis der 4-HNE-Addukte zwischen diesen beiden Gruppen. Tendenziell war der 4-HNE-Anteil im Gewebe in der Nembutal[®]-Gruppe sogar niedriger als in der Isoflurangruppe. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass eine myokardiale Ischämie zu einer erhöhten Bildung von Lipidperoxiden führt, es aber zu keinem Unterschied in der Lipidperoxidkonzentration nach 30 Minuten verglichen mit 480 Minuten Ischämie kommt (Renner et al. 2004). Ebenso ist bekannt, dass nach 30 Minuten und nach 240 Minuten Ischämie eine erhöhte Bildung von 4-HNE-Addukten stattfindet, allerdings ohne Signifikanz zwischen den beiden Ischämiezeiten (Renner et al. 2005). Ein wichtiger Schritt bei der Detoxifikation der 4-HNE-Addukte, ist die Konjugation mit GSH (Esterbauer et al. 1991). In Übereinstimmung damit zeigte sich eine Korrelation zwischen der Glutathionkonzentration und dem Anteil der 4-HNE-Addukte im Gewebe. Je geringer die GSH-Konzentration ist, desto höher ist der 4-HNE-Anteil (Renner et al. 2005). Bei dem hier diskutierten Versuch von Renner und Mitarbeitern handelt es sich um einen Kurzzeitversuch mit einer Reperusions- bzw. Nachbeobachtungszeit von 4 Stunden, sodass die dort ermittelte Korrelation zwischen GSH und 4-HNE die Verhältnisse in der Akutphase der Reperfusion und somit des oxidativen Stresses repräsentiert (Renner et al. 2005). In der hier vorliegenden Dissertation wurde eine Korrelation zwischen der GSH-Konzentration und dem Anteil an 4-HNE im Gewebe nicht durchgeführt, da primär untersucht werden sollte, ob sich das Ausmass von oxidativem Stress in der Ischämie-Reperusionsphase zu einem späteren Zeitpunkt bestimmen lässt. Aus

Untersuchungen von Charniot und Mitarbeitern ist bekannt, dass es bei der Verwendung verschiedener Konservierungslösungen, nach einer myokardialen Ischämie von 8 Stunden gefolgt von einer Reperfusion zunächst zu einem Anstieg des Lipidperoxidlevels kommt, dieses aber nach einer gewissen Zeit eine gleichbleibende Konzentration erreicht. Diese wiederum zeigten zwischen den untersuchten Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Charniot et al. 2010). Im Rahmen dieser Dissertation ist die Lipidperoxidkonzentration nicht zu verschiedenen Zeiten nach der Transplantation bestimmt worden, sondern lediglich zum Zeitpunkt der Transplantatentnahme nach 70 bzw. 140 Tagen, sodass bezüglich des Verlaufs der Entstehung bzw. des Anstieges der Lipidperoxidkonzentration in den Gewebeproben keine Aussage getroffen werden kann. Vergleicht man die hier gewonnenen Werte bezüglich der 4-HNE-Addukte mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Renner et al. 2005), so ist in der vorliegenden Arbeit nach 70 bzw. 140 Tagen die Konzentration von 4-HNE in den Gewebeproben der Transplantate sogar bis zur Hälfte niedriger als unmittelbar nach der Transplantation. Dies lässt vermuten, dass die Konzentration der 4-HNE-Addukte im Verlauf nach der Transplantation und dem Ischämie-Reperfusionereignis abnimmt, sodass zumindest zum Zeitpunkt der Transplantatentnahme keine oxidative Stresssituation vorgelegen hat. Die ebenfalls annähernd gleichen Konzentrationen der Lipidperoxide sprechen auch dafür, dass die Lipidperoxide nach der Transplantation ein stabiles Konzentrationslevel erreichen, anderenfalls hätte man zumindest zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher Ischämiezeit einen Unterschied in der Lipidperoxidkonzentration erwarten können. Hassan und Mitarbeiter haben an Lebertransplantaten aufzeigen können, dass nach einem anfänglichen Anstieg der Lipidperoxide kurz nach der Transplantation in den folgenden Tagen zunächst ein stabiles Konzentrationsniveau vorliegt und die Konzentration anschließend wieder abnimmt. In dieser Studie wurden auch weitere Parameter des oxidativen Stresses bestimmt (Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase), welche alle den Schluß zuließen, dass die Organtransplantate bis zu 5 Tage nach der Transplantation oxidativen Stress erfahren haben (Hassan et al. 2005). Diese Erkenntnis lässt vermuten, dass Lipidperoxide vorrangig in der frühen Phase eines oxidativen Stressereignisses entstehen. Anhand des Vorhandenseins von Lipidperoxiden bzw. von 4-HNE im Gewebe lässt sich ein zurückliegendes oxidatives Stressereignis zwar nachweisen, jedoch kann nicht auf dessen Schwere geschlossen

werden.

Der in dieser Dissertation verwendete Summenscore (Franz et al. 2011) ist ein geeignetes Mittel zur Bewertung des histopathologischen Gesamtbildes der chronischen Abstoßung. Für den Gesamtscore wird das Vorhandensein einer TVP und einer Myokarddestruktion, sowie das Ausmass der Lymphozyteninfiltration und der Myokardfibrose bewertet. Zwischen den untersuchten Gruppen zeigte sich bezüglich des Gesamtscores kein Unterschied: in allen Gruppen wurde eine moderate chronische Transplantatabstoßung nachgewiesen. In der Literatur sind die TVP und die Myokardfibrose die beiden Hauptmerkmale der chronischen Transplantatabstossung (Armstrong et al. 1998, Behrendt et al. 2000, Raichlin et al. 2009), während die Lymphozyteninfiltration und die Myokardnekrose Bestandteil des Grading-Systems zur Transplantatabstossung der ISHLT (Stewart et al. 2005) ist. Die Gewichtung der einzelnen Parameter am Gesamtscore wird erst deutlich, wenn man diese in den Gruppen bzw. für jedes Tier einzeln betrachtet. Das Ausmass der lymphozytären Infiltration und der Myokardfibrose kann hierbei bei entsprechend hohem Bewertungsgrad zu einem hohen Summenscore führen. Innerhalb der einzelnen Gruppen betrachtet, schien die TVP unabhängig von den anderen Parametern aufzutreten, während die Myokarddestruktion als schwerer beurteilt wurde, je stärker die lymphozytäre Infiltration war. Ähnliches ließ sich für die Myokardfibrose und die Myokarddestruktion feststellen. Diese Beobachtung zeigt, dass die für den Gesamtscore erhobenen Parameter zusammengenommen ein aussagekräftiges Bild der chronischen Abstoßung zeichnen. Bisherige histopathologische Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Tanaka et al. 2005, Schneeberger et al. 2010) verwenden kein einheitliches Beurteilungssystem der Transplantatabstossung, sodass ein Vergleich von histologischen Befunden der verschiedenen Arbeitsgruppen nur unzureichend möglich ist.

Histologische Untersuchungen an transplantierten Rattenherzen, die einer Ischämiezeit von 30 bzw. 120 Minuten und 90 Tagen Nachbeobachtung unterzogen worden sind, zeigten bei jenen Tieren, die einer 120 minütigen Ischämie ausgesetzt waren, eine ausgeprägtere TVP als bei den Tieren mit einer Ischämiezeit von 30 Minuten (Tanaka et al. 2005). Gleiches fand sich in einer Studie von Schneeberger und Mitarbeitern, welche ebenfalls Herzen von Lewis-Ratten analysierten, die nach dem Modell von Ono und Lindsey in Fisher-Ratten transplantiert wurden. Die

Ischämiezeit in diesem Versuch belief sich entweder auf 0 oder auf 10 Stunden und die Herzen wurden nach 2, 20, 40 und 60 Tagen explantiert. Mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Transplantation, zeigte sich in beiden Gruppen (0 Minuten vs. 10 Stunden Ischämie) eine stetige Abnahme der Transplantatfunktion, wobei der Unterschied in der Gruppe mit einer zehnstündigen Ischämie signifikant war. Des Weiteren fand sich nach 40 und 60 Tagen eine signifikant ausgeprägtere TVP bei jenen Tieren, die einer zehnstündigen Ischämie ausgesetzt waren. Der Versuch von Schneeberger und Mitarbeitern zeigt, dass mit zunehmender Ischämiezeit zum Einen die Transplantatfunktion beeinträchtigt wird, zum anderen die Ausprägung einer TVP zunimmt (Schneeberger et al. 2010). Diese Beobachtung konnte in den Untersuchungen der vorliegenden Dissertation nicht bestätigt werden. Die Funktion der Transplantate in der vorliegenden Dissertation war nach Abschluss des Nachbeobachtungszeitraumes in allen Gruppen trotz Transplantatvaskulopathie bzw. chronischer Abstossung vergleichbar gut. Bezogen auf die Ischämiezeit, wiesen die Transplantate nach 30 Minuten sowie 480 Minuten Ischämie unmittelbar nach der Transplantation und nach der entsprechenden Nachbeobachtungszeit eine gute Funktion auf. Lediglich in der Gruppe IP480/140 fand sich nach der Transplantation eine als ausreichend bewertete Transplantatfunktion. Mitropoulos und Mitarbeiter haben 2005 die Daten von 46 herztransplantierten Patienten, deren Transplantate einer Ischämiezeit von mehr als 300 Minuten ausgesetzt waren, mit 46 herztransplantierten Patienten verglichen, deren Transplantate einer Ischämiezeit von weniger als 240 Minuten ausgesetzt waren. Es zeigte sich, dass es zwischen den Gruppen hinsichtlich der 30-Tage-Mortalität, der 3-Jahres-Überlebensrate und dem Auftreten einer TVP, keinen signifikanten Unterschied gibt (Mitropoulos et al. 2005). Dies läßt vermuten, dass die Ischämietoleranz des Myokards bei entsprechender Konservierung bis zu 5 Stunden und länger beträgt. Da immer das Bestreben besteht, die Ischämiezeiten so kurz wie möglich zu halten, ist es sicherlich schwierig im klinischen Alltag bewußt längere Ischämiezeiten zu tolerieren, um die Ischämietoleranz des Myokards zu untersuchen. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Schneeberger und Mitarbeitern sowie Tanaka und Mitarbeitern sind die Herzen im von uns verwendeten Modell einer Druck- und Volumenbelastung ausgesetzt gewesen. Dies hat somit möglicherweise ebenfalls einen Einfluß auf das Myokard und dessen Veränderungen (Yokoyama et al. 1995). Die in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten Gewebeschnitte unserer Versuchsgruppen wiesen alle eine TVP auf,

jedoch zeigte sich ein eher gemischtes Bild im Vorhandensein der TVP allerdings ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. So fand sich zum Beispiel in den Gruppen die einer Ischämie von 30 Minuten ausgesetzt waren, in der Isoflurangruppe nach 70 Tagen ein häufigeres Auftreten einer TVP, als in der Nembutal[®]-Gruppe. Nach 140 Tagen wiederum konnte eine TVP in der Nembutal[®]-Gruppe häufiger beobachtet werden. In den Gruppen mit einer Ischämiezeit von 480 Minuten, war die TVP nach 70 Tagen vermehrt in der Nembutal[®]-Gruppe und nach 140 Tagen häufiger in der Isoflurangruppe zu detektieren. In der Arbeit von Franz und Mitarbeitern konnte ein Zusammenhang zwischen der Nachbeobachtungszeit und dem Auftreten einer TVP nachgewiesen werden. Nach 140 Tagen war eine TVP häufiger zu beobachten als nach 70 Tagen (Franz et al. 2011). Diese Beobachtung ist in der vorliegenden Dissertation nicht gemacht worden. In der vorliegenden Arbeit ließ sich die Entwicklung einer TVP nicht durch die Wahl der Narkoseform beeinflussen. Dass sich die Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie medikamentös beeinflussen lässt, konnte die Arbeitsgruppe von Abele und Mitarbeiter in verschiedenen Untersuchungen zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass nach der Transplantation eines Segmentes der Aorta descendens zwischen Mäusen mit einem kompletten MHC-Mismatch, die alleinige Gabe von Clopidogrel ohne zusätzliche Gabe eines Immunsuppressivums, gegenüber einer mit Kochsalz behandelten Kontrollgruppe ausreichend ist, die Entwicklung einer TVP signifikant zu reduzieren (Abele et al. 2006). In einem weiteren Versuch konnte dieser Effekt durch die Kombination von Clopidogrel mit Everolimus noch deutlich gesteigert werden (Eckl et al. 2010). Es ist jedoch zu bemerken, dass es sich bei den eben genannten Versuchen um ein einfaches Transplantationsmodell handelt, bei dem das Begleitgewebe inklusive des lymphatischen Gewebes des Transplantats entfernt wird. Dies führt dazu, dass inflammatorische Prozesse, insbesondere an den Anastomosen, nicht auf die Vorgänge bei einer chronischen Abstossung übertragen werden können (Bedi et al. 2010). Zum Anderen zielen beide Versuche auf die Beeinflussung der Transplantatvaskulopathie auf immunologischer Ebene ab.

In einer Arbeit von Iwanaga und Mitarbeitern wurde in einem heterotopen Mäuseherztransplantationsmodell dem Spendertier vor der Transplantatentnahme das Antioxidanz Riboflavin zur Unterdrückung des oxidativen Stresses appliziert. Nach 60 Tagen wiesen die mit Riboflavin behandelten Tiere, im Gegensatz zu den nichtbehandelten Tieren, keine TVP auf (Iwanaga et al. 2007). In einer

weiterführenden Studie derselben Arbeitsgruppe, wurde der zugrundeliegende Mechanismus untersucht. Unter Verwendung des gleichen Versuchsaufbaus wie bei Iwanaga und Mitarbeitern, wurden neben der Aktivität der Myeloperoxidase und der Mangan-Superoxiddismutase, die Bildung von Lipidperoxiden sowie die Expression der induzierbaren Nitritmonoxid-Synthase (iNOS) analysiert. Alle untersuchten Marker sowie die iNOS wiesen in den mit Riboflavin behandelten Versuchstieren deutlich geringere Werte auf als jene Tiere, die nicht mit Riboflavin behandelt wurden. Wie bereits in dem Vorversuch beschrieben, wiesen auch hier die mit Riboflavin behandelten Tiere keine TVP auf (Hasegawa et al. 2009). Das zeigt, dass der oxidative Stress ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung einer TVP ist.

Betrachtet man in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der Myokarddegeneration mit dem Vorhandensein einer TVP, so kann man auch hier keinen Zusammenhang herstellen. Eine schwere Myokarddegeneration war in der vorliegenden Arbeit nicht zwangsläufig mit dem Auftreten einer TVP verbunden ist. Gleiches ist auch zu der Lymphozyteninfiltration zu sagen. In der Arbeit von Semiletova und Mitarbeitern konnte eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad einer TVP und der Infiltration mit Lymphozyten nachgewiesen werden. Semiletova und Mitarbeiter verwendeten ebenfalls das Transplantationsmodell von Ono und Lindsey und führten die histologischen bzw. immunhistologischen Untersuchungen 120 Tage nach der Transplantation durch (Semiletova et al. 2010). In der vorliegenden Dissertation konnte dieser Zusammenhang nicht beobachtet werden, allerdings wurde nicht der Schweregrad, sondern lediglich das Vorhandensein einer TVP bestimmt. Geht man davon aus, dass eine TVP zu einer Durchblutungsstörung des Myokards führt, so hätte man erwarten können, dass es in Organen mit TVP zu einer stärkeren Fibrosierung gekommen wäre, als in Organen ohne TVP. Dies war nicht der Fall, was nicht nur mikroskopisch bestätigt werden konnte, sondern sich auch makroskopisch an den Transplantaten zeigte. Betrachtet man dazu auch die Marker des oxidativen Stresses, so kann man nicht sagen, dass ein bestimmter Marker mit dem Auftreten einer TVP, Myokarddegeneration, lymphozytären Infiltration oder interstitiellen Fibrose assoziiert ist. Da diese Marker 70 bzw. 140 Tage nach der Transplantation keinen Rückschluss auf das Ausmass des oxidativen Stresses unmittelbar nach der Transplantation zuzulassen scheinen, ist auch eine Korrelation mit dem Auftreten einer TVP bzw. der chronischen Abstossung nicht sinnvoll. Was jedoch beobachtet werden konnte war, dass eine lymphozytäre Infiltration immer zusammen mit einer

Myokardfibrose auftrat. Dies konnte bereits von Franz und Mitarbeitern nachgewiesen werden (Franz et al. 2011). In der Vergangenheit sind bereits verschiedene Untersuchungen zur Entstehung von Fibrosierungen am transplantierten Herzen durchgeführt worden. 1990 untersuchten Pickering und Boughner den Zusammenhang zwischen Ischämiezeit und der Entstehung einer Myokardfibrose an 36 herztransplantierten Patienten mit Ischämiezeiten ihrer Herzen von 0 bis mehr als 240 Minuten. Es zeigte sich, dass die Ischämiezeit einen Einfluss auf die Entwicklung einer Fibrose am transplantierten Herzen hat und je länger die Ischämie andauert, die Fibrose auch stärker ausgeprägt ist. Insbesondere die Herzen, die länger als 240 Minuten ischämisch waren, hatten die meisten Fibrosierungen (Pickering und Boughner 1990). Zu erwähnen ist, dass die Untersuchungen von Pickering und Boughner anhand von Myokardbiopsien durchgeführt wurden, die zwischen dem 5. und 10. Tag nach der Transplantation gewonnen wurden. Das ist insofern interessant, da Armstrong und Mitarbeiter einige Jahre später herausfanden, dass sich die Fibrosierungen am Herztransplantat relativ frühzeitig entwickeln und nach 2 Monaten ein Plateau erreichen, sodass die Fibrosierungen nach dieser Zeit keinen signifikanten Unterschied aufweisen (Armstrong et al. 1998). Der Grad der Fibrosierung an den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Myokardproben, unterschied sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht. Weder hatte die Narkoseform einen Einfluss auf die Entwicklung einer Myokardfibrose, noch führte eine längere Ischämiezeit zu einer stärkeren Fibrosierung oder unterschied sich der Fibrosierungsgrad zwischen den Proben, die nach 70 oder 140 Tagen gewonnen wurden. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem aus der Arbeit von Armstrong und Mitarbeitern.

In der Literatur liegen derzeit keine vergleichenden tierexperimentellen Daten bezüglich unterschiedlicher Narkoseformen bei der Herztransplantation mit einer Nachbeobachtungszeit von 140 Tagen oder länger vor, sodass in dem vorliegenden Versuch gezeigt werden konnte, dass die Narkoseform im Langzeitverlauf keinen Einfluß auf die Entwicklung einer chronischen Abstossung hat. Die Entstehung einer chronischen Abstossung ist zudem nicht allein von der Ischämiezeit und der Wahl der Narkose abhängig ist, sondern wird auch von immunologischen Reaktionen beeinflusst (Ramzy et al. 2005, Rahmani et al. 2006, Abele et al. 2009, Suzuki et al. 2010). Da es im vorliegenden Versuch selbst innerhalb einer Gruppe zu Unterschieden im Auftreten einer TVP kam, kann man sagen, dass sich die TVP

zeitlich nicht vorhersehbar entwickelt, was bereits von Baba und Mitautoren in ihren Ausführungen zur chronischen Transplantatabstossung aufgeführt wurde (Baba et al. 2011).

Das hier verwendete Transplantationsmodell bildet nicht das gesamte Szenario einer Herztransplantation im klinischen Alltag ab. Da es sich bei dem Modell um einen heterotopen Ansatz handelt, bei dem das transplantierte Herz nach den Modifikationen nach Yokoyama zwar ähnliche Druck- und Volumenbelastungen erfährt wie ein orthotop transplantiertes Herz, bleibt eine Funktionsstörung des Transplantats ohne Folgen für die nachgeschalteten Organsysteme. Ein weiterer Gesichtspunkt ist die Tatsache, dass Ischämiezeiten von 8 Stunden bei der humanen Herztransplantation vermieden werden. Auch sind die Operations-, Beatmungs- und Narkosedauer bei einer Herztransplantation im klinischen Alltag wesentlich länger als in dem hier vorliegenden Versuch. Ein weiterer Aspekt, der im Hinblick auf eine immunologische Komponente des Ischämie-Reperfusionsschadens und der Entwicklung einer Transplantatvaskulopathie in diesem Modell nicht erfasst wird, ist die Verwendung der Herz-Lungen-Maschine, ohne die eine Herztransplantation unmöglich durchzuführen ist. Es ist bekannt, dass der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine zu einer Aktivierung des Gerinnungs- und Immunsystems im Sinne einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS = systemic inflammatory response syndrome) führt (Warren et al. 2009b). Eine Strategie dieser Entzündungsreaktion entgegenzuwirken, ist die Gabe von Kortikosteroiden (Warren et al. 2009a), welche die Grundlage der Abstossungsprophylaxe nach einer Herztransplantation bilden (Siehe Abschnitt 2.1.6). In dem hier vorliegenden Modell kam weder eine extrakorporale Zirkulation zum Einsatz, noch wurde ein Kortikosteroid verabreicht. Insgesamt konzentriert sich dieses Tiermodell vorrangig auf die Entwicklung einer chronischen Transplantatabstossung, wobei dieses komplexe Geschehen in einem kleinen Zeitfenster betrachtet wird, was eine Übertragung in den klinischen Alltag schwierig macht (Bedi et al. 2010).

7. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Dissertation ist der langfristige Einfluss der Narkoseform auf die antioxidativen Schutzmechanismen sowie auf die Entwicklung einer chronischen Transplantatabstossung untersucht worden. Die analysierten Marker für den oxidativen Stress zeigten mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Transplantation (70 Tage bzw. 140 Tage) keine Unterschiede in ihrer Aktivität bzw. ihrer Konzentration. Die Aktivität der Superoxiddismutase gibt im Langzeitverlauf keinen Hinweis auf ein zurückliegendes oxidatives Stressereignis, da deren Aktivität mit zunehmendem zeitlichem Abstand zur Transplantation ein Niveau erreicht, welches wahrscheinlich im Normbereich liegt. Es lässt sich somit auch kein Rückschluss auf die Schwere des oxidativen Stresses ziehen. Die Aktivität der Glutathionperoxidase scheint langfristig nach einem Ischämie-Reperfusionereignis vermindert zu sein, was eine möglicherweise kompensatorische Erhöhung der Katalase-Aktivität nach sich zieht. Gemeinsam betrachtet geben beide Enzyme einen Hinweis auf ein zurückliegendes oxidatives Stressereignis. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, um zu prüfen, inwieweit auch der Schweregrad anhand beider Enzymaktivitäten abgeschätzt werden kann. Die Ergebnisse der Untersuchungen des Glutathionsystems lassen ebenfalls keinen Rückschluss auf oxidativen Stress in der Vergangenheit zu. Hinsichtlich der Produkte der Lipidperoxidation (Lipidperoxide und 4-HNE) kann festgestellt werden, dass diese im unmittelbaren Verlauf nach dem Ischämie-Reperfusionereignis ein Maximum zu erreichen scheinen, um dann ein stabiles Niveau zu halten und im weiteren Verlauf in ihrer Konzentration sogar wieder abzusinken. Mit dieser Beobachtung kann man feststellen, dass das Vorhandensein von Produkten der Lipidperoxidation zwar ein früheres oxidatives Stressereignis nachweist, deren Konzentration im Gewebe jedoch keine Rückschlüsse auf die Schwere des oxidativen Stresses zuzulassen scheint. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse lassen den allgemeinen Schluss zu, dass sich die antioxidativen Schutzmechanismen durch die Wahl der Narkoseform langfristig, das heißt über das initiale Ischämie-Reperfusionereignis hinaus, nicht beeinflussen lassen.

Bezüglich der chronischen Transplantatabstossung lässt sich schlussfolgern, dass eine Transplantatvaskulopathie unabhängig von anderen morphologischen Veränderungen des Myokards, wie der Myokarddegeneration, Lymphozyteninfiltration oder Fibrosierungen auftritt. Ebenso lässt sich die Entwicklung einer chronischen Abstossung nicht durch die Wahl der Narkoseform

positiv beeinflussen. Diese Aussage wird dadurch untermauert, dass es selbst innerhalb einer Gruppe zu einer unterschiedlichen Ausprägung der chronischen Transplantatabstossung gekommen ist.

Ob es nun sinnvoll ist im Rahmen der Herztransplantation bewusst ein volatiles Anästhetikum zu verwenden, lässt sich auf der Basis dieser Arbeit nicht abschliessend beantworten. Betrachtet man die Daten aus den Studien an herzchirurgischen Patienten, so kann man sagen, dass durch den Einsatz eines volatilen Anästhetikums der Patient zumindest in der Frühphase nach dem Eingriff von der Wahl des Narkotikums zu profitieren scheint.

Da auch in Zukunft Patienten mit terminalen Organerkrankungen bei entsprechender Indikation auf ein Spenderorgan angewiesen sein werden und einige Transplantationszentren in Hinblick auf die Organknappheit bereits Organe verpflanzen, die vor einigen Jahren noch als nicht transplantabel galten (sog. marginale Organe), wird es auch in Zukunft wichtig sein Strategien zu entwickeln, die Qualität von Spenderorganen zu erhalten. Des Weiteren sollte die medikamentöse Einflussnahme auf das Ischämie-Reperfusionsgeschehen sowie auf die akute wie chronische Abstossung Gegenstand weiterer, intensiver Forschungsarbeit sein.

8. Literaturverzeichnis

- Abele S, Weyand M, Wollin M, Hiemann NE, Harig F, Fischlein T, Ensminger SM. 2006. Clopidogrel reduces the development of transplant arteriosclerosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 131 (5):1161-1166.
- Abele S, Spriewald BM, Ramsperger-Gleixner M, Wollin M, Hiemann NE, Nieswandt B, Weyand M, Ensminger SM. 2009. Attenuation of transplant arteriosclerosis with clopidogrel is associated with a reduction of infiltrating dendritic cells and macrophages in murine aortic allografts. *Transplantation*, 87 (2):207-216.
- Adams DH, Russell ME, Hancock WW, Sayegh MH, Wyner LR, Karnovsky MJ. 1993. Chronic rejection in experimental cardiac transplantation: studies in the Lewis-F344 model. *Immunol Rev*, 134:5-19.
- Almondes KG, Leal GV, Cozzolino SM, Philippi ST, Rondo PH. 2010. The role of selenoproteins in cancer. *Rev Assoc Med Bras*, 56 (4):484-488.
- Andriantsitohaina R, Duluc L, Garcia-Rodriguez JC, Gil-del Valle L, Guevara-Garcia M, Simard G, Soleti R, Su DF, Velasquez-Perez L, Wilson JX, Laher I. 2012. Systems biology of antioxidants. *Clin Sci (Lond)*, 123 (3):173-192.
- Armstrong AT, Binkley PF, Baker PB, Myerowitz PD, Leier CV. 1998. Quantitative investigation of cardiomyocyte hypertrophy and myocardial fibrosis over 6 years after cardiac transplantation. *J Am Coll Cardiol*, 32 (3):704-710.
- Atkins PW, Jones L, Hrsg. 2006. *Chemie - einfach alles*. Zweite Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Baba HA, Wohlschlager J, Stypmann J, Hiemann NE. 2011. [Heart transplantation. Pathology, clinical work-up and therapy]. *Pathologe*, 32 (2):95-103.
- Baines CP. 2009. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*, 104 (2):181-188.
- Baines CP. 2011. The mitochondrial permeability transition pore and the cardiac necrotic program. *Pediatr Cardiol*, 32 (3):258-262.
- Ballester M, Llorens J, Garcia-de-la-Asuncion J, Perez-Griera J, Tebar E, Martinez-Leon J, Belda J, Juez M. 2011. Myocardial oxidative stress protection by sevoflurane vs. propofol: a randomised controlled study in patients undergoing off-pump coronary artery bypass graft surgery. *Eur J Anaesthesiol*, 28 (12):874-881.

- Becker LB, vanden Hoek TL, Shao Z-H, Li C-Q, Schumacker PT. 1999. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 277 (6):H2240-H2246.
- Bedi DS, Riella LV, Tullius SG, Chandraker A. 2010. Animal models of chronic allograft injury: contributions and limitations to understanding the mechanism of long-term graft dysfunction. *Transplantation*, 90 (9):935-944.
- Behrendt D, Ganz P, Fang JC. 2000. Cardiac allograft vasculopathy. *Curr Opin Cardiol*, 15 (6):422-429.
- Berry CE, Hare JM. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*, 555 (Pt 3):589-606.
- Beyersdorf F, Martin J, Hrsg. 2005. *Aktuelle Aspekte der Herztransplantation*. Erste Aufl. Bremen: UNI-MED Verlag AG.
- Bienengraeber MW, Weihrauch D, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. 2005. Cardioprotection by volatile anesthetics. *Vascul Pharmacol*, 42 (5-6):243-252.
- Booth AJ, Bishop DK. 2010. TGF-beta, IL-6, IL-17 and CTGF direct multiple pathologies of chronic cardiac allograft rejection. *Immunotherapy*, 2 (4):511-520.
- Bosco R, Melloni E, Celeghini C, Rimondi E, Vaccarezza M, Zauli G. 2011. Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside. *Mini Rev Med Chem*, 11 (3):185-199.
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu SS. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 287 (4):C817-833.
- Buchinger H, Grundmann U, Ziegeler S. 2005. [Myocardial preconditioning with volatile anesthetics. General anesthesia as protective intervention?]. *Anaesthesist*, 54 (9):861-870.
- Buja LM. 2005. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Pathol*, 14 (4):170-175.
- Burgis EH. 2005. *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. Dritte Aufl. München, Jena: Urban & Fischer.
- Charniot JC, Bonnefont-Rousselot D, Albertini JP, Dever S, Vignat N, Nataf P, Pavie A, Monsuez JJ, DeLattre J, Artigou JY. 2010. Oxidative stress implication after prolonged storage donor heart with blood versus crystalloid cardioplegia and reperfusion versus static storage. *J Surg Res*, 160 (2):308-314.

- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol Life Sci*, 61 (2):192-208.
- Chen CH, Liu K, Chan JY. 2008. Anesthetic preconditioning confers acute cardioprotection via up-regulation of manganese superoxide dismutase and preservation of mitochondrial respiratory enzyme activity. *Shock*, 29 (2):300-308.
- Circu ML, Aw TY. 2011. Redox biology of the intestine. *Free Radic Res*, 45 (11-12):1245-1266.
- Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, Anderson A, Chan M, Desai S, Fedson S, Fisher P, Gonzales-Stawinski G, Martinelli L, McGiffin D, Parisi F, Smith J, Taylor D, Meiser B, Webber S, Baran D, Carboni M, Dengler T, Feldman D, Frigerio M, Kfoury A, Kim D, Kobashigawa J, Shullo M, Stehlik J, Teuteberg J, Uber P, Zuckermann A, Hunt S, Burch M, Bhat G, Canter C, Chinnock R, Crespo-Leiro M, Delgado R, Dobbels F, Grady K, W K, Lamour J, Parry G, Patel J, Pini D, Pinney S, Towbin J, Wolfel G, Delgado D, Eisen H, Goldberg L, Hosenpud J, Johnson M, Keogh A, Lewis C, O'Connell J, Rogers J, Ross H, Russell S, Vanhaecke J. 2010. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 29 (8):914-956.
- Cross AR, Jones OT. 1991. Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta*, 1057 (3):281-298.
- de Groot H, Rauen U. 2007. Ischemia-reperfusion injury: processes in pathogenetic networks: a review. *39 (2):481-484*.
- Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, Makino N. 2000. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 47 (3):446-456.
- Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, Stromberg A, van Veldhuisen DJ, Atar D, Hoes AW, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori SG, Swedberg K. 2008. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J*, 29 (19):2388-2442.

- Eckl S, Heim C, Abele-Ohl S, Hoffmann J, Ramsperger-Gleixner M, Weyand M, Ensminger SM. 2010. Combination of clopidogrel and everolimus dramatically reduced the development of transplant arteriosclerosis in murine aortic allografts. *Transpl Int*, 23 (9):959-966.
- Elahi MM, Kong YX, Matata BM. 2009. Oxidative stress as a mediator of cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2 (5):259-269.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*, 11 (1):81-128.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, De Giuli F, Visioli O. 1992. Occurrence of oxidative stress during myocardial reperfusion. *Mol Cell Biochem*, 111 (1-2):61-69.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, De Giuli F, Albertini A. 1991. Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr*, 53 (1 Suppl):222.
- Forman HJ, Zhang H, Rinna A. 2009. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30 (1-2):1-12.
- Franz M, Berndt A, Grun K, Richter P, Kosmehl H, Neri D, Gummert J, Figulla HR, Brehm BR, Renner A. 2011. Expression of extra domain A containing fibronectin in chronic cardiac allograft rejection. *J Heart Lung Transplant*, 30 (1):86-94.
- Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science*, 201 (4359):875-880.
- Fridovich I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*, 201 (Pt 8):1203-1209.
- Grauhan O. 2003. Criteria for the assessment of the donor heart. *Transplant Proc*, 35 (6):2111-2112.
- Gueraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K. 2010. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*, 44 (10):1098-1124.
- Gutteridge JM. 1995. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*, 41 (12 Pt 2):1819-1828.
- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. 2004. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 61 (3):372-385.
- Halliwell B, Gutteridge JM. 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, 280 (1):1-8.

- Hasegawa T, Iwanaga K, Hultquist DE, Liao H, Visovatti SH, Pinsky DJ. 2009. Suppression of nitrosative and oxidative stress to reduce cardiac allograft vasculopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296 (4):H1007-1016.
- Hassan L, Bueno P, Ferron-Celma I, Ramia JM, Garrote D, Muffak K, Garcia-Navarro A, Mansilla A, Villar JM, Ferron JA. 2005. Time course of antioxidant enzyme activities in liver transplant recipients. *Transplant Proc*, 37 (9):3932-3935.
- Hess ML, Manson NH. 1984. Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 16 (11):969-985.
- Hippeli S, Elstner EF. 1997. OH-radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH-radical- and peroxynitrite toxicity. *Z Naturforsch C*, 52 (9-10):555-563.
- Horn F, Lindenmeier G, Moc I, Grillhösl C, Schneider N. 2005. *Biochemie des Menschen*. Dritte Aufl. Stuttgart, New York: Thieme Verlag.
- Hu ZY, Liu J. 2009. Mechanism of cardiac preconditioning with volatile anaesthetics. *Anaesth Intensive Care*, 37 (4):532-538.
- Hunt SA, Haddad F. 2008. The changing face of heart transplantation. *J Am Coll Cardiol*, 52 (8):587-598.
- Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B. 2005. ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*, 112 (12):e154-235.

- Iwanaga K, Hasegawa T, Hultquist DE, Harada H, Yoshikawa Y, Yanamadala S, Liao H, Visovatti SH, Pinsky DJ. 2007. Riboflavin-mediated reduction of oxidant injury, rejection, and vasculopathy after cardiac allotransplantation. *Transplantation*, 83 (6):747-753.
- Jennings RB, Reimer KA. 1991. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med*, 42:225-246.
- Jung JE, Kim GS, Chen H, Maier CM, Narasimhan P, Song YS, Niizuma K, Katsu M, Okami N, Yoshioka H, Sakata H, Goeders CE, Chan PH. 2010. Reperfusion and neurovascular dysfunction in stroke: from basic mechanisms to potential strategies for neuroprotection. *Mol Neurobiol*, 41 (2-3):172-179.
- Kaminski KA, Bonda TA, Korecki J, Musial WJ. 2002. Oxidative stress and neutrophil activation--the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *Int J Cardiol*, 86 (1):41-59.
- Kedzierska K, Sporniak-Tutak K, Bober J, Safranow K, Olszewska M, Jakubowska K, Domanski L, Golembiewska E, Kwiatkowska E, Laszczynska M, Dolegowska B, Ciechanowski K. 2011. Oxidative stress indices in rats under immunosuppression. *Transplant Proc*, 43 (10):3939-3945.
- Kelly KA, Havrilla CM, Brady TC, Abramo KH, Levin ED. 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ Health Perspect*, 106 (7):375-384.
- Kersten JR, Schmelting TJ, Pagel PS, Gross GJ, Warltier DC. 1997. Isoflurane mimics ischemic preconditioning via activation of K(ATP) channels: reduction of myocardial infarct size with an acute memory phase. *Anesthesiology*, 87 (2):361-370.
- Kirklin JK, Young JB, McGiffin DC, Hrsg. 2002. *Heart Transplantation*. Erste Aufl. Churchill Livingstone.
- Kliment CR, Suliman HB, Tobolewski JM, Reynolds CM, Day BJ, Zhu X, McTiernan CF, McGaffin KR, Piantadosi CA, Oury TD. 2009. Extracellular superoxide dismutase regulates cardiac function and fibrosis. *J Mol Cell Cardiol*, 47 (5):730-742.
- Krenning G, Zeisberg EM, Kalluri R. 2010. The origin of fibroblasts and mechanism of cardiac fibrosis. *J Cell Physiol*, 225 (3):631-637.

- Lange V, Renner A, Sagstetter M, Harms H, Elert O. 2006. Cardiac allograft vasculopathy after cardiac transplantation and hormone therapy: positive effects? *Transplantation*, 82 (2):234-240.
- Large S. 2007. Surgery for heart failure. *Heart*, 93 (3):392-402.
- Leichtweis S, Ji LL. 2001. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. *Acta Physiol Scand*, 172 (1):1-10.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC, Hrsg. 2007. *Biochemie und Pathobiochemie*. Achte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Lorsomradee S, Cromheecke S, De Hert SG. 2008. Cardioprotection with volatile anesthetics in cardiac surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*, 16 (3):256-264.
- Loscar M, Conzen P. 2004. [Volatile anesthetics]. *Anaesthesist*, 53 (2):183-198.
- Lu J, Holmgren A. 2009. Selenoproteins. *J Biol Chem*, 284 (2):723-727.
- Lucchesi BR. 1990. Myocardial ischemia, reperfusion and free radical injury. *Am J Cardiol*, 65 (19):141-231.
- Ludwig LM, Tanaka K, Eells JT, Weihrauch D, Pagel PS, Kersten JR, Warltier DC. 2004. Preconditioning by isoflurane is mediated by reactive oxygen species generated from mitochondrial electron transport chain complex III. *Anesth Analg*, 99 (5):1308-1315; table of contents.
- McCord JM. 1988. Free radicals and myocardial ischemia: overview and outlook. *Free Radic Biol Med*, 4 (1):9-14.
- Mehra MR, Kobashigawa J, Starling R, Russell S, Uber PA, Parameshwar J, Mohacsi P, Augustine S, Aaronson K, Barr M. 2006. Listing Criteria for Heart Transplantation: International Society for Heart and Lung Transplantation Guidelines for the Care of Cardiac Transplant Candidates—2006. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 25 (9):1024-1042.
- Mehra MR, Crespo-Leiro MG, Dipchand A, Ensminger SM, Hiemann NE, Kobashigawa JA, Madsen J, Parameshwar J, Starling RC, Uber PA. 2010. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. *J Heart Lung Transplant*, 29 (7):717-727.
- Minotti G, Aust SD. 1989. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. *Chem Biol Interact*, 71 (1):1-19.
- Minotti G, Aust SD. 1992. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids*, 27 (3):219-226.

- Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. 2009. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit*, 15 (10):209-219.
- Mitropoulos FA, Odum J, Marelli D, Karandikar K, Gjertson D, Ardehali A, Kobashigawa J, Laks H. 2005. Outcome of hearts with cold ischemic time greater than 300 minutes. A case-matched study. *Eur J Cardiothorac Surg*, 28 (1):143-148.
- Morgan B, Ezerina D, Amoako TN, Riemer J, Seedorf M, Dick TP. 2013. Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat Chem Biol*, 9 (2):119-125.
- Muntean DM, Ordodi V, Ferrera R, Angoulvant D. 2012. Volatile anaesthetics and cardioprotection - lessons from animal studies. *Fundam Clin Pharmacol*.
- Ndhlala AR, Moyo M, Van Staden J. 2010. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules? *Molecules*, 15 (10):6905-6930.
- Newton AC. 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J*, 370 (Pt 2):361-371.
- Niki E. 2008. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *Biofactors*, 34 (2):171-180.
- Nishino T. 1994. The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J Biochem*, 116 (1):1-6.
- Ono K, Lindsey ES. 1969. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 57 (2):225-229.
- Park JL, Lucchesi BR. 1999. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 68 (5):1905-1912.
- Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. 2011. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol*, 3 (6):186-200.
- Pickering JG, Boughner DR. 1990. Fibrosis in the transplanted heart and its relation to donor ischemic time. Assessment with polarized light microscopy and digital image analysis. *Circulation*, 81 (3):949-958.
- Piper HM, Kasseckert SA, Schluter KD, Abdallah Y. 2008. [Pathophysiology of myocardial reperfusion injury]. *Dtsch Med Wochenschr*, 133 (12):586-590.
- Porter NA, Caldwell SE, Mills KA. 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids*, 30 (4):277-290.

- Rahmani M, Cruz RP, Granville DJ, McManus BM. 2006. Allograft vasculopathy versus atherosclerosis. *Circ Res*, 99 (8):801-815.
- Raichlin E, Edwards BS, Kremers WK, Clavell AL, Rodeheffer RJ, Frantz RP, Pereira NL, Daly RC, McGregor CG, Lerman A, Kushwaha SS. 2009. Acute cellular rejection and the subsequent development of allograft vasculopathy after cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 28 (4):320-327.
- Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ. 2005. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg*, 48 (4):319-327.
- Renner A, Sagstetter MR, Harms H, Lange V, Gotz ME, Elert O. 2005. Formation of 4-hydroxy-2-nonenal protein adducts in the ischemic rat heart after transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 24 (6):730-736.
- Renner A, Sagstetter MR, Gotz ME, Lange V, Bengel D, Harms H, Riederer P, Elert O. 2004. Heterotopic rat heart transplantation: severe loss of glutathione in 8-hour ischemic hearts. *J Heart Lung Transplant*, 23 (9):1093-1102.
- Riahi Y, Cohen G, Shamni O, Sasson S. 2010. Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299 (6):E879-886.
- Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareno EJ, Romero B, Marin N, Roma J. 1998. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect*, 106 Suppl 5:1229-1234.
- Schmid C, Hirt S, Scheld HH, Hrsg. 2009. Leitfaden Herztransplantation. Dritte Aufl. Steinkopff Verlag.
- Schneeberger S, Amberger A, Mandl J, Hautz T, Renz O, Obrist P, Meusburger H, Brandacher G, Mark W, Strobl D, Troppmair J, Pratschke J, Margreiter R, Kuznetsov AV. 2010. Cold ischemia contributes to the development of chronic rejection and mitochondrial injury after cardiac transplantation. *Transpl Int*, 23 (12):1282-1292.
- Semiletova NV, Shen XD, Baibakov B, Andakyan A. 2010. Intensity of transplant chronic rejection correlates with level of graft-infiltrating regulatory cells. *J Heart Lung Transplant*, 29 (3):335-341.
- Sies H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, 215 (2):213-219.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82 (2):291-295.

- Sirker A, Zhang M, Shah AM. 2011. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol*, 106 (5):735-747.
- Solaini G, Harris DA. 2005. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J*, 390 (Pt 2):377-394.
- Son YK, Hong da H, Kim DJ, Firth AL, Park WS. 2011. Direct effect of protein kinase C inhibitors on cardiovascular ion channels. *BMB Rep*, 44 (9):559-565.
- Starling RC. 1997. Radical alternatives to transplantation. *Curr Opin Cardiol*, 12 (2):166-171.
- Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Aurora P, Christie JD, Kirk R, Dobbels F, Rahmel AO, Hertz MI. 2010. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-seventh official adult heart transplant report—2010. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 29 (10):1089-1103.
- Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Hertz MI. 2011. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplant Report--2011. *J Heart Lung Transplant*, 30 (10):1078-1094.
- Stehlik J, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Christie JD, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Hertz MI. 2012. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th Official Adult Heart Transplant Report—2012. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 31 (10):1052-1064.
- Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, Tazelaar HD, Kobashigawa J, Abrams J, Andersen CB, Angelini A, Berry GJ, Burke MM, Demetris AJ, Hammond E, Itescu S, Marboe CC, McManus B, Reed EF, Reinsmoen NL, Rodriguez ER, Rose AG, Rose M, Suci-Focia N, Zeevi A, Billingham ME. 2005. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant*, 24 (11):1710-1720.
- Struber M, Lange R, Gummert JF, Beyersdorf F, Jurmann M, Schmid C, El Banayosy A, Hoppe UC, Steinbeck G, Reichenspurner H, Liebold A, Franz WM, Ruhparwar A, Schmoeckel M. 2007. Alternatives to heart transplantation. Symposium of the "Treatment of End-stage Heart and Lung Failure" working group on October 22, 2005 in Munich. *Thorac Cardiovasc Surg*, 55 Suppl 2:S147-167.

- Suzuki J, Isobe M, Morishita R, Nagai R. 2010. Characteristics of chronic rejection in heart transplantation: important elements of pathogenesis and future treatments. *Circ J*, 74 (2):233-239.
- Tanaka K, Ludwig LM, Kersten JR, Pagel PS, Warltier DC. 2004. Mechanisms of cardioprotection by volatile anesthetics. *Anesthesiology*, 100 (3):707-721.
- Tanaka M, Mokhtari GK, Terry RD, Gunawan F, Balsam LB, Hoyt G, Lee KH, Tsao PS, Robbins RC. 2005. Prolonged cold ischemia in rat cardiac allografts promotes ischemia-reperfusion injury and the development of graft coronary artery disease in a linear fashion. *J Heart Lung Transplant*, 24 (11):1906-1914.
- Tempe DK, Dutta D, Garg M, Minhas H, Tomar A, Virmani S. 2011. Myocardial protection with isoflurane during off-pump coronary artery bypass grafting: a randomized trial. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 25 (1):59-65.
- Tritapepe L, Landoni G, Guarracino F, Pompei F, Crivellari M, Maselli D, De Luca M, Fochi O, D'Avolio S, Bignami E, Calabro MG, Zangrillo A. 2007. Cardiac protection by volatile anaesthetics: a multicentre randomized controlled study in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Eur J Anaesthesiol*, 24 (4):323-331.
- Turkan H, Aydin A, Sayal A, Eken A, Akay C, Karahalil B. 2011. Oxidative and antioxidative effects of desflurane and sevoflurane on rat tissue in vivo. *Arh Hig Rada Toksikol*, 62 (2):113-119.
- Valdivia A, Perez-Alvarez S, Aroca-Aguilar JD, Ikuta I, Jordan J. 2009. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. *J Physiol Biochem*, 65 (2):195-208.
- Warren OJ, Watret AL, de Wit KL, Alexiou C, Vincent C, Darzi AW, Athanasiou T. 2009a. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 2--anti-inflammatory therapeutic strategies. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 23 (3):384-393.
- Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C, Rogers PL, Jawad N, Vincent C, Darzi AW, Athanasiou T. 2009b. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1--mechanisms of pathogenesis. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 23 (2):223-231.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, 134 (3):489-492.

- Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. 2003. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. *Acta Biochim Pol*, 50 (2):319-336.
- Yellon DM, Hausenloy DJ. 2007. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357 (11):1121-1135.
- Yokoyama H, Ohmi M, Murata S, Nakame T, Tabayashi K, Mohri H. 1995. Proposal of a working left heart model with a heterotopic transplantation technique in rats. *J Heart Lung Transplant*, 14 (4):706-712.
- Zamocky M, Furtmuller PG, Obinger C. 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid Redox Signal*, 10 (9):1527-1548.
- Zweier JL, Talukder MA. 2006. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 70 (2):181-190.

Internetquelle:

<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/> ; The top ten causes of death
heruntergeladen am 05.12.2013

Anhang

Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Ort
Aqua bidestillata (Milli-Q Reference System)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Aqua destillata	Servoprax GmbH	Wesel, Deutschland
Desoxycholinsäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien	Seelze, Deutschland
DTT (Art.-Nr. 6908.1)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
EDTA (Art.-Nr. 8043.2)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Eosin (Art.-Nr X883.2)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (Art.-Nr. 9065.3)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Formalin (Art.-Nr. 7398.1)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Glycerol (Art.-Nr. 3783.1)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 3% (Art.-Nr. 9681.4)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun (Art.-Nr. T865.2)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Kochsalzlösung 0,25% (Art.-Nr. CN67.1)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Kochsalzlösung 0,9%	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Metaphosphorsäure 5%	Sigma-Aldrich Laborchemikalien	Seelze, Deutschland
Paraffin (Art.-Nr. CN48.1)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Shandon EZ-Mount™	Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, Massachusetts, USA
Tissue Tek Compound	Sakura Finetek Europe B.V.	Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tris-Puffer (Art.-Nr. 5429.3)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Laborchemikalien	Seelze, Deutschland

Reagenz	Hersteller	Ort
Xylol (Art.-Nr. 4436.1)	CARL ROTH GmbH	Karlsruhe, Deutschland

Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller	Ort
Bulldogklemme	Aesculap (B. Braun)	Melsungen, Deutschland
chirurgisches Besteck	Aesculap (B. Braun)	Melsungen, Deutschland
Einmalkanülen Sterican	B. Braun	Melsungen, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Gefriermikrotom (Leica CM 30502)	Leica	Wetzlar, Deutschland
Gewebeeinbettautomat (Leica TP1020)	Leica	Wetzlar, Deutschland
Isofluranverdampfer (VetMed Vapor 19.3)	Drägerwerk AG & Co. KGaA	Lübeck, Deutschland
Kurzzeitwecker	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Mikrotiterplatte	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Mikroskop (Axio Scope 2)	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Nahtmaterial (ETHIBOND, Mersilene, Prolene)	Ethicon (Johnson & Johnson Medical GmbH)	Norderstedt, Deutschland
Operationsmikroskop (Zeiss OPMI SV8)	Carl Zeiss GmbH	Jena, Deutschland
Paraffinausgiessstation (Leica EG 1160)	Leica	Wetzlar, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitze 5 ml (Combitips plus)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Probenröhrchen (Cellstar 10 ml, 2ml)	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland

Labormaterial	Hersteller	Ort
Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml	SARSTEDT AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Rotationsmikrotom (Leica RM 2165)	Leica	Wetzlar, Deutschland
Software Magellan 2	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Sunrise Remote Plattenreader	Tecan Group Ltd.	Männedorf, Schweiz
Vortexer (MS2 Minishaker)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Deutschland
Wasserbad (Fisherbrand FBH 712)	Fisher Scientific GmbH	Schwerte, Deutschland
Zentrifuge (Centrifuge 5810R)	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Dr. med. Marcus Franz und meinem Betreuer Herrn Dr. med. André Renner für die tatkräftige Unterstützung bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit danken.

Als Herr Dr. med. Renner mit der Idee zu dieser Arbeit auf mich zugekommen ist, war ich von Anfang an begeistert. Ihm möchte ich danken, dass er mir das wissenschaftliche Arbeiten näher gebracht hat. Meinem Doktorvater Herr Privatdozent Dr. Franz bin ich sehr zu Dank verpflichtet, da er mir stets mit kritischem Blick bei der schriftlichen Umsetzung des Themas zur Seite gestanden hat und jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Katja Grün und Frau Katrin Hornung, die Herrn Dr. med. Renner und mir bei der Durchführung der Tierversuche geholfen haben. Insbesondere verdanke ich den beiden die geduldige Unterstützung bei der Durchführung der Labortests. Frau Dr. rer. nat. Grün hat sich ausserdem die Zeit genommen, den Material- und Methodenteil der vorliegenden Arbeit Korrektur zu lesen.

Herrn Prof. Dr. oec. troph. Armin Zittermann danke ich für die Beratung und der Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten für diese Dissertation.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und meiner Freundin Julia danken, die mich bei meinen Zielen immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Name, Vorname: Helms, Sven
Geburtstag: 11.10.1980
Geburtsort: Berlin
Familienstand: ledig

Ausbildung und Studium

1987 – 1991 Besuch der Ulmen-Grundschule Berlin-Kaulsdorf
1991 – 2000 Besuch der Merian-Gesamtschule Berlin-Köpenick
2000 Abitur
2000 – 2001 Zivildienst, Deutsches Herzzentrum Berlin
2001 – 2003 Hilfskraft, Deutsches Herzzentrum Berlin
2003 – 2009 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
2009 Staatsexamen, Ärztliche Prüfung

Beruflicher Werdegang

2006 – 2009 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinik Jena
2006 – 2009 Tätigkeit im Perfusionsdienst für thorakale Organentnahmen, Deutsche Stiftung Organtransplantation
Seit 2010 Assistenzarzt, Klinik für Thorax- und Kardiovaskularchirurgie, Herz- und Diabesteszentrum NRW

Bad Oeynhausen, 05.12.2013

Sven Helms

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. med. Marcus Franz, Dr. med. André Renner, Dr. rer. nat. Katja Grün, Prof. Dr. oec. troph. Armin Zittermann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bad Oeynhausen, 05.12.2013

Sven Helms