

Aus der
Ambulatorischen und Geburtshilflichen Tierklinik
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und der
Abteilung Forschung und Lehre der Herzchirurgie des Herzzentrums
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Renoprotektive Effekte von
(-)-Epigallocatechin-3-Gallat
bei extrakorporaler Zirkulation mittels
Herz-Lungen-Maschine in einem Ferkelmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Miriam Twal
aus Rinteln

Leipzig, 2013

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Axel Sobiraj
Prof. Dr. Stefan Dhein

Gutachter: Prof. Dr. Axel Sobiraj
Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Stefan Dhein
Abteilung Forschung und Lehre der Herzchirurgie
des Herzzentrums der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Manfred Kietzmann
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 22.01.2013

meinem Mann

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Kinderherzchirurgie	3
2.2 Tierherzchirurgie	6
2.3 Die Herz-Lungen-Maschine	8
2.3.1 Hypothermie	10
2.3.2 Kardioplegie	11
2.4 Probleme nach Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine	12
2.4.1 Ischämie-Reperfusionsschaden	12
2.4.2 Inflammationsreaktion	15
2.5 Die Niere und die pädiatrische Kardiochirurgie mit Herz-Lungen-Maschine	17
2.6 (-)-Epigallocatechin-3-Gallat	19
3 Tiere, Material und Methoden	21
3.1 Versuchsdurchführung	21
3.1.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung	21
3.1.2 Anästhesie, Kreislaufstabilisierung und Monitoring	22
3.1.2.1 Prämedikation	22
3.1.2.2 Intubation und arterielle und venöse Zugänge	22
3.1.2.3 Medikamentöses Regime und Infusionen	23
3.1.3 Versuchsablauf	25
3.1.3.1 Operation	25
3.1.3.2 Herz-Lungen-Maschine	25
3.1.3.2.1 Primingvolumen	27
3.1.3.2.2 Medikamentöses Regime	28
3.1.3.2.3 Kardioplegie	28
3.2 Intraoperative Parameter	34
3.2.1 Blutfluss	34
3.2.2 Arterieller Blutdruck und Herz-Zeit-Volumen	34
3.2.3 Zentraler Venendruck	35
3.2.4 Sauerstoffsättigung	35

3.2.5 Arterielle Blutgasmessung	36
3.2.5.1 pH-Wert und Basenüberschuss	36
3.2.5.2 Elektrolyte	36
3.2.5.3 Hämatokrit	37
3.2.5.4 Laktat	37
3.2.6 Beatmungsparameter	37
3.3 Postoperative Untersuchungen	38
3.3.1 Probenentnahme und -aufbearbeitung	38
3.3.2 Histologie	38
3.3.2.1 HE-Färbung	39
3.3.2.2 Immunhistochemie	39
3.3.2.2.1 HIF-1-alpha-TSA-Färbung	39
3.3.2.2.2 Nitrotyrosin-AEC-Färbung	40
3.3.2.2.3 AIF-TSA-Färbung	41
3.3.3 Bildauswertung	42
3.3.4 Blutproben	43
3.3.5 Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography	44
3.4 Statistik	47
4 Ergebnisse	48
4.1 Versuchsdurchführung	48
4.2 Ergebnisse der postoperativen Untersuchungen	48
4.2.1 Histologie: HE-Färbung	48
4.2.1.1 Das Glomerulum, HE-Färbung	49
4.2.1.2 Der proximale Tubulus, HE-Färbung	53
4.2.2 Immunhistochemie: HIF-1-alpha-TSA-Färbung	58
4.2.3 Immunhistochemie: Nitrotyrosin-AEC-Färbung	61
4.2.4 Immunhistochemie: AIF-TSA-Färbung	64
4.3 Ergebnisse der Blutproben	67
4.3.1 Hämatokrit	67
4.3.2 Kreatinin im Serum	68
4.3.3 Harnstoff im Serum	69
4.3.4 Gesamteiweiß	70
4.4 Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalysen: Laktat	71

4.5 Ergebnisse der Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography	72
4.6 Vitalparameter und Blutgasanalyse	74
5 Diskussion	76
5.1 Schädigte die Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine die Niere?	79
5.2 Wiesen die gesetzten Schäden die Merkmale eines Ischämie-Reperfusionsschadens auf?	82
5.3 Konnte die Schädigung durch (-)-Epigallocatechin-3-Gallat abgemildert werden?	86
5.4 Schlussfolgerungen für die Humanmedizin	90
5.5 Schlussfolgerungen für die Veterinärmedizin	94
6 Zusammenfassung	96
7 Summary	98
8 Literaturverzeichnis	100
9 Anhang	113
9.1 Beatmungsparameter	113
9.2 Infusionen	114
9.3 Medikamentöses Regime: Katecholamine	115
9.4 Arterielle Blutgasmessung	116
9.4.1 pH-Wert und Basenüberschuss	116
9.4.2 Elektrolytkonzentrationen im Blut	119
9.5 Tabelle mit Werten aus den Blutgasanalysen: Arterielltes Laktat	123
9.6 Tabellen mit Werten der Blutproben	124
9.7 Ergebnisse der Blutproben: Leukozyten und Lymphozyten	125
9.8 Tabellen mit Werten der histologischen und immunhistochemischen Färbung	128
9.9 Protokolle der histologischen und immunhistochemischen Färbungen	132
9.10 Tabellen mit Werten der Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography	143
10 Danksagung	144

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACT	Activated Clotting Time
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AG	Aktiengesellschaft
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Ak	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AMV	Atemminutenvolumen
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
Aqua ddest.	Doppeltdestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BE	Base Excess
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celcius
CA	Kalifornien
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO	Colorado
Co.	Compagnie
CPB	cardiopulmonary bypass
D	Deutschland
d. h.	das heißt
DK	Dänemark
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EC	extracorporeal circulation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGCG	(-)-Epigallocatechin-3-Gallat
F	Frankreich

Fr	French
G	Gauge
g	Erdbeschleunigung (Maßeinheit beim Zentrifugieren)
g/l	Gramm pro Liter
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gpt/l	Giga-Parts pro Liter
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hg	Quecksilber (Hydrargyrum)
HIF-1-alpha	Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha
HLM	Herz-Lungen-Maschine
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
I	Italien
I.E.	Internationale Einheiten
IF-8 und -10	Interferon-8 und -10
i. m.	intramuskulär
IPPV	Intermittent Positive Pressure Ventilation
i. v.	intravenös
KG	Kommanditgesellschaft
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
l	Liter
li.	links
l/m	Liter pro Minute
M	Mol
MA	Massachusetts
mbar	Millibar
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
MCV	Mean Corpuscular Volume

mg/dl	Milligramm pro Deziliter
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
mg/ml/h	Milligramm pro Milliliter und Stunde
min	Minuten
ml	Milliliter
ml/kg	Milliliter pro Kilogramm
ml/kg/h	Milliliter pro Kilogramm und Stunde
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mmol/l	Millimol pro Liter
MN	Minnesota
MW	Mittelwert
n	Number
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H-Oxidase	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NH	New Hampshire
nm	Nanometer
NOS	Stickstoff-Synthase
Nr.	Nummer
OP	Operation
OR	Oregon
PA	Pennsylvania
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEEP	Positive End Expiratory Pressure
PiCCO	Pulse Contour Cardiac Output
P max	Maximal Pressure
PVC	Polyvinylchlorid
re.	rechts
rel. E.	relative Einheiten
RNS	reactive nitrogen species

ROS	reactive oxygen species
RP-HPLC	Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography
sec	Sekunden
SEM	Standard Error of Mean
s. u.	siehe unten
TBS	Tris Buffered Saline
TI:TE	Time Inspiration:Time Expiration
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TNT	Tris-NaCl-Tween Puffer
TSA	Tyramide Signal Amplification
USA	United States of America
UV	ultraviolett
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
Vol.-%	Volumenprozent
vs.	versus
Vt	Tidalvolumen
WA	Washington
z. B.	zum Beispiel
ZVK	zentralvenöser Katheter
µg/h	Mikrogramm pro Stunde
µg/kg	Mikrogramm pro Kilogramm
µg/kg/min	Mikrogramm pro Kilogramm und Minute
µg/mg	Mikrogramm pro Milligramm
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µl	Mikroliter
µl/min	Mikroliter pro Minute
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
µmol/l	Mikromol pro Liter

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1: Gesamtfläche der Glomeruli, HE-Färbung
- Abbildung 2: Spaltfläche in den Glomeruli, HE-Färbung
- Abbildung 3: Spaltbreite in den Glomeruli, HE-Färbung
- Abbildung 4: Glomeruli, HE-Färbung
- Abbildung 5: Epithelhöhe der proximalen Tubuli, HE-Färbung
- Abbildung 6: Kernpyknosen in den proximalen Tubuli, HE-Färbung
- Abbildung 7: Vakuolisierte Zellen in den proximalen Tubuli, HE-Färbung
- Abbildung 8: Proximale Tubuli, HE-Färbung
- Abbildung 9: Proximale Tubuli (Debris im Lumen), HE-Färbung
- Abbildung 10: Kernpositivität in den proximalen Tubuli, HIF-1-alpha-Färbung
- Abbildung 11: Proximale Tubuli, HIF-1-alpha-TSA-Färbung
- Abbildung 12: Positive distale Tubuli und Sammelrohre, Nitrotyrosin-AEC-Färbung
- Abbildung 13: Distale Tubuli und Sammelrohre, Nitrotyrosin-AEC-Färbung
- Abbildung 14: Kernpositivität in den Glomeruli, proximalen und distalen Tubuli und den Sammelrohren, AIF-TSA-Färbung
- Abbildung 15: Glomeruli, AIF-TSA-Färbung
- Abbildung 16: Korrigierte Kreatininwerte
- Abbildung 17: Korrigierte Harnstoffwerte
- Abbildung 18: Korrigierte Gesamteiweißwerte
- Abbildung 19: Laktatwerte (arteriell)
- Abbildung 20: Summe der ATP-, ADP- und AMP-Werte
- Abbildung 21: Dephosphorylierungsratios
- Abbildung 22: pH-Werte nach 0, 90 und 240 Minuten
- Abbildung 23: Basenüberschusswerte nach 0, 90 und 240 Minuten
- Abbildung 24: Natriumwerte nach 0, 90 und 240 Minuten
- Abbildung 25: Kaliumwerte nach 0, 90 und 240 Minuten
- Abbildung 26: Calciumwerte nach 0, 90 und 240 Minuten
- Abbildung 27: Chloridwerte nach 0, 90 und 240 Minuten
- Abbildung 28: Korrigierte Leukozytenwerte
- Abbildung 29: Korrigierte Lymphozytenwerte

Tabelle 1:	Verteilung der häufigsten kongenitalen Herzfehler
Tabelle 2:	Kongenitale Herzerkrankungen, die bei schwerer Ausprägung bzw. immer durch einen kardiochirurgischen Eingriff mit Verwendung einer HLM korrigiert werden
Tabelle 3:	Verteilung der häufigsten kongenitalen Herzfehler bei Hunden
Tabelle 4:	Einstellung des Beatmungsgerätes
Tabelle 5:	Zeitübersicht des Versuchsablaufes
Tabelle 6:	Angewandte Medikamente während der Operationen
Tabelle 7:	Verwendetes Zubehör für die Anästhesie, das Monitoring und die chirurgische Intervention
Tabelle 8:	Verwendetes Zubehör für die HLM
Tabelle 9:	Verwendetes Zubehör für die RP-HPLC
Tabelle 10:	Allgemeine Angaben zu den drei Ferkelgruppen
Tabelle 11:	Hämatokrit
Tabelle 12:	Vitalparameter
Tabelle 13:	Deltawerte der arteriellen Mitteldrücke bei 0 und 120 Minuten
Tabelle 14:	Beatmungsparameter 0, 90 und 240 Minuten während der OP
Tabelle 15:	Verabreichte Infusionen intra operationem
Tabelle 16:	Katecholamingaben während der letzten 120 Minuten der OP
Tabelle 17:	pH-Werte
Tabelle 18:	Basenüberschusswerte
Tabelle 19:	Natriumwerte
Tabelle 20:	Kaliumwerte
Tabelle 21:	Calciumwerte
Tabelle 22:	Chloridwerte
Tabelle 23:	Arterielle Laktatwerte
Tabelle 24:	Korrigierte Kreatininwerte
Tabelle 25:	Korrigierte Harnstoffwerte
Tabelle 26:	Korrigierte Gesamteiweißwerte
Tabelle 27:	Korrigierte Leukozytenwerte
Tabelle 28:	Korrigierte Lymphozytenwerte
Tabelle 29:	Gesamtfläche der Glomeruli, HE-Färbung
Tabelle 30:	Spaltfläche in den Glomeruli, HE-Färbung
Tabelle 31:	Spaltbreite in den Glomeruli, HE-Färbung

Tabelle 32:	Epithelhöhe der proximalen Tubuli, HE-Färbung
Tabelle 33:	Pyknotische Zellkerne in den proximalen Tubuli, HE-Färbung
Tabelle 34:	Vakuolisierte Zellen in den proximalen Tubuli, HE-Färbung
Tabelle 35:	Kernpositivität in verschiedenen Strukturen, HIF-1-alpha-Färbung
Tabelle 36:	Kernpositivität in proximalen Tubuli, HIF-1-alpha-TSA-Färbung
Tabelle 37:	Distale Tubuli und Sammelrohre, Nitrotyrosin-AEC-Färbung
Tabelle 38:	Glomeruli, proximale und distale Tubuli und Sammelrohre, AIF-TSA-Färbung
Tabelle 39:	Protokoll der HE-Färbung
Tabelle 40:	Protokoll der HIF-1-alpha-TSA-Färbung
Tabelle 41:	Protokoll der Nitrotyrosin-AEC-Färbung
Tabelle 42:	Protokoll der AIF-TSA-Färbung
Tabelle 43:	ATP-, ADP- und AMP-Werte (Summe der energiereichen Phosphate)
Tabelle 44:	Hypoxanthin- und Adenosinwerte
Tabelle 45:	Dephosphorylierungsratios $(\text{ATP}/(\text{ADP}+\text{AMP}))$ und $\text{ATP}/(\text{ADP}+\text{AMP}+\text{Adenosin})$

1 Einleitung und Fragestellung

Die Herz-Lungen-Maschine (HLM) ist ein unverzichtbares medizintechnisches Instrument, ohne das viele kardiochirurgische Eingriffe nicht möglich wären. Dies ist gerade für die Kinderkardiologie bzw. -herzchirurgie von Bedeutung, da einige der kongenitalen Herzdefekte, die post natum einer baldigen Korrektur bedürfen, komplexer Natur sind – erst seit der Einführung der HLM in die Herzchirurgie ist die chirurgische Versorgung vieler dieser Defekte möglich. Dennoch gibt es eine Reihe möglicher HLM-assoziiierter Komplikationen während und nach einer Herzoperation, die unterschiedlichste Organe betreffen können – eine der schwerwiegendsten ist die Nierenschädigung. Sie kann die Dauer des Krankenhausaufenthaltes verlängern (LI et al. 2011) und ist mit erhöhter Mortalität assoziiert (PICCA et al. 1995), was insgesamt die Prognose für den Patienten verschlechtern kann. Besonders in der Kinderherzchirurgie tritt sie nach einem kardiochirurgischen Eingriff mit Verwendung einer HLM relativ häufig auf, in seltenen Fällen kann sie bis zur Dialysepflichtigkeit führen (LI et al. 2011 und PICCA et al. 1995). Verantwortlich gemacht für die negative Beeinflussung der Niere wird vorrangig ein HLM-assoziiertes Ischämie-Reperfusionsschaden mit Entstehung freier Radikaler (MATATA et al. 2000) bzw. eine Minderperfusion der Niere während der HLM-Zeit, und auch eine HLM-assoziierte Entzündungsreaktion (LEVY und TANAKA 2003).

In dieser Dissertation wird nun eine Untersuchung vorgestellt, die die Beeinträchtigung der Niere durch die HLM während und nach einem kardiochirurgischen Eingriff behandelt und sich mit den genauen Ursachen für diese Beeinträchtigung auseinandersetzt – und von dieser Überlegung ausgehend eine in dieser Situation potentiell renoprotektiv wirksame Substanz untersucht. In der Vergangenheit wurden bereits Studien zu dieser Fragestellung mit „klassischen“ Antioxidantien wie zum Beispiel N-Acetylcystein durchgeführt (NAUGHTON et al. 2008), in der Hoffnung, dass diese einer Nierenschädigung entgegenwirkten, indem sie den durch eine Ischämie-Reperfusionssituation entstandenen oxidativen und nitrosativen Stress abschwächten – positive Ergebnisse blieben allerdings aus.

In dieser Dissertation wird nun (-)-Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) betrachtet. EGCG ist ein natürlicher Bestandteil des grünen Tees (MAK 2012) und ist aufgrund seiner unterschiedlichen positiven Eigenschaften in den letzten Jahren Gegenstand zahlreicher Studien gewesen – mit vielversprechenden Ergebnissen. Es zählt durch seine Radikalfänger- und Stickstoffmonoxidscavenger-Fähigkeiten zu den Antioxidantien (RIETVELD und WISEMAN 2003, PAQUAY et al. 2000), weist darüber hinaus aber noch einige andere Wirkweisen

auf: Es ist zum Beispiel antiapoptotisch (JANG et al. 2010) und antiinflammatorisch (EL-MOWAFY et al. 2011) wirksam – weswegen es in dieser Studie zum Forschungsobjekt wurde.

Bei den Versuchen wurden Ferkel mit einem Gewicht von 8 bis 15 kg verwendet, um die Ergebnisse auf pädiatrische Patienten in der Kinderkardiologie und -herzchirurgie beziehen zu können.

Zum Schluss schließt sich ein Einblick in die Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM in der klinischen Veterinärmedizin an, welche derzeit aus pekuniären Gründen weltweit nur in wenigen veterinärmedizinischen Zentren Anwendung findet. Diesbezüglich wird ein Ausblick auf mögliche Weiterentwicklungen in diesem Bereich gegeben.

Es ergeben sich folgende Fragestellungen für diese Dissertation:

1. Schädigte die Verwendung einer HLM (unter hypothermen Bedingungen, mit nicht-pulsatilem Blutfluss und Kardioplegie) die Niere?
2. Wiesen die gesetzten Schäden die Merkmale eines Ischämie-Reperfusionsschadens auf?
3. Konnte die Schädigung durch EGCG abgemildert werden?

2 Literaturübersicht

2.1 Kinderherzchirurgie

Kongenitale Herzerkrankungen – also die angeborene strukturelle Anomalie des Herzens oder eines oder mehrerer herznaher Gefäße – sind laut einer aktuellen Untersuchung im Rahmen des EUROCAT (European Registration of Congenital Anomalies and Twins) Programms die häufigste angeborene Pathologie eines bestimmten einzelnen Organs und kommen in Europa bei 0,6 % aller lebend geborenen Kinder vor (LOANE et al. 2011). Tabelle 1 zeigt die aktuelle prozentuale Verteilung der häufigsten kongenitalen Herzfehler in Deutschland. Sie können sich sehr unterschiedlich auswirken, und die Krankheitsbilder reichen von einfach (im Sinne von asyptomatisch) bis komplex, was bedeutet, dass die Patienten lebenslang körperlich eingeschränkt und medikamentenpflichtig sind. Heutzutage liegen die Raten pädiatrischer Patienten mit kongenitalen Herzfehlern, die das Erwachsenenalter erreichen, bei 90 % (SCHWEDLER et al. 2011).

Die meisten angeborenen Herzfehler werden pränatal oder kurz nach der Geburt diagnostiziert, manche offenbaren sich erst im Grundschulalter oder später. Viele schwerwiegende oder komplexe Fehlbildungen müssen bald nach der Geburt korrigiert werden, wobei die Einführung der Herz-Lungen-Maschine (HLM) die Korrektur vieler Defekte erst ermöglicht hat, wie Tabelle 2 darstellt. Nicht kongenitale pädiatrische Herzerkrankungen, die unter Zuhilfenahme einer HLM korrigiert werden müssen, sind außerdem Herztumore und die ultima ratio, die bei schwersten kardialen Erkrankungen bleibt: die Herztransplantation.

Tabelle 1: Verteilung der häufigsten kongenitalen Herzfehler in Prozent von allen kongenitalen Herzfehlern bei lebend geborenen Kindern in Deutschland (Juli 2006 bis Juni 2007) nach SCHWEDLER et al. (2011)

Kongenitaler Herzfehler	Auftreten in %
Ventrikelseptumdefekt (isoliert)	48,9
Atriumseptumdefekt	17
Pulmonalstenose	6,1
Persistierender Ductus arteriosus	4,3
Aortenisthmusstenose	3,6
Univentrikuläres Herz	2,8
Atrioventrikulärer Septumdefekt	2,5
Fallot-Tetralogie	2,5
Aortenstenose	2,2
Dexter-Transposition großer Arterien	2,2
Double outlet right ventricle (DORF)	1
andere	6,8

Tabelle 2: Kongenitale Herzerkrankungen, die bei schwerer Ausprägung (linke Spalte) bzw. immer (rechte Spalte) durch einen kardiochirurgischen Eingriff mit Verwendung einer HLM korrigiert werden (HAAS und KLEIDEITER 2011)

Nur bei schwerer Ausprägung des Defekts Korrektur durch kardiochirurgischen Eingriff mit einer HLM	In jedem Fall Korrektur des Defekts durch kardiochirurgischen Eingriff mit einer HLM
Vorhofseptumdefekt	Atrioventrikulärer Septumdefekt
Ventrikelseptumdefekt	Totale Lungenvenenfehlmündung
Partielle Lungenvenenfehlmündung	Aortopulmonales Fenster
Pulmonalstenose	Pulmonalatresie mit oder ohne Ventrikelseptumdefekt
Aortenstenose	Transposition der großen Arterien
Aorteninsuffizienz	Double outlet right ventricle
Aortenisthmusstenose	Truncus arteriosus communis
Kongenitale Gefäßbringe	Fallot-Tetralogie
Mitralstenose	Ebstein-Anomalie
Mitralinsuffizienz	Trikuspidalatresie
Mitralklappenprolaps	Singulärer Ventrikel
Heterotaxie-Syndrom	Hypoplastisches Linksherzsyndrom
	Unterbrochener Aortenbogen
	Bland-White-Garland Syndrom

2.2 Tierherzchirurgie

Bei Hunden treten angeborene Herzfehler durchschnittlich bei einem Welpen in 15 Würfen auf; 0,68 bis 0,8 % aller in Tierkliniken aufgenommenen Hunde weisen einen kongenitalen Herzfehler auf. Bei Katzen kommt diese Erkrankung seltener vor; bei etwa 0,02 bis 0,1 % aller in Tierkliniken aufgenommenen Katzen wird ein angeborener Herzfehler diagnostiziert (STRICKLAND 2008). Als limitierender Faktor von Studien und Angaben über das Vorkommen kongenitaler Defekte in der Veterinärmedizin muss in Betracht gezogen werden, dass natürlich keine mit der Humanmedizin vergleichbare pränatale Diagnostik oder pädiatrische Betreuung und Überwachung durchgeführt wird. Dementsprechend versterben viele Neonaten peripartal oder im Welpenalter an den Folgen kongenitaler kardialer Defekte – doch diese Todesursache wird oft nicht erkannt, da Autopsien nicht regelmäßig durchgeführt werden. Daher können keine genauen Angaben über das Vorkommen dieser Erkrankungen gemacht werden. Eine aktuelle Studie aus dem Jahre 2011 von OLIVEIRA et al. (siehe Tabelle 3) an 976 Hunden in Italien nennt die Pulmonal- und die Subaortenstenose, den persistierenden Ductus arteriosus und den Ventrikelseptumdefekt als häufigste angeborene Herzdefekte. Diese Ergebnisse gehen konform mit denen einer schwedischen Studie von TIDHOLM aus dem Jahre 1997 an 151 Hunden und einer Schweizer Studie von BAUMGARTNER und GLAUS aus dem Jahre 2003 an 146 Hunden. OLIVEIRA et al. (2011) stellten weiterhin eine Prädisposition für kardiale Erkrankungen bei den Rassen Boxer, Deutscher Schäferhund, Englische und Französische Bulldogge, Golden und Labrador Retriever und Neufundländer fest.

Kardiochirurgische Eingriffe werden in der Veterinärmedizin nicht routinemäßig durchgeführt. Obwohl aus der Versuchstierkunde ein reichhaltiger Erfahrungsschatz bezüglich der Herzchirurgie an Tieren vorliegt, wird dieser nur in spezialisierten Zentren in wenigen Ländern auf die kurative Veterinärmedizin übertragen. Symptomatische Herzerkrankungen werden gewöhnlich palliativ mit Medikamenten behandelt. Gründe dafür sind vor allem ökonomischer Natur. In Deutschland gibt es keine veterinärmedizinische Klinik oder Universität, die eine HLM verwendet. Pionierarbeit auf diesem Gebiet wird in den USA und in Japan geleistet (vgl. 5.5).

Tabelle 3: Verteilung der häufigsten kongenitalen Herzfehler in Prozent von allen kongenitalen Herzfehlern bei lebend geborenen und zur Untersuchung vorgestellten Hunden in Italien (1997-2010) nach OLIVEIRA et al. (2011)

Kongenitaler Herzfehler	Auftreten in %
Pulmonalstenose	32,1
Subaortenstenose	21,3
Persistierender Ductus arteriosus	20,9
Ventrikelseptumdefekt	7,5
Aortenstenose	5,7
Trikuspidalklappendysplasie	3,1
Mitralklappendysplasie	1,9
Double chamber right ventricle (DORF)	1,2
Vorhofseptumdefekt	1,1
Fallot-Tetralogie	1
andere	4,6

2.3 Die Herz-Lungen-Maschine

Die HLM in der Kardiochirurgie unserer Zeit ist zu einem vielfach verwendeten medizintechnischen Instrument geworden, und hat einen großen Teil zu der Entwicklung von Operationen am (offenen) Herzen beigetragen. Zum ersten Mal wurde eine HLM im Jahre 1953 im Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA von Dr. John Gibbon Jr. verwendet, welcher sie gemeinsam mit seiner Ehefrau Mary entwickelt hatte. Jene erfolgreiche Operation am offenen Herzen einer jungen Frau wurde unter Zuhilfenahme einer 45-minütigen HLM-Zeit von Dr. Gibbon Jr. selbst durchgeführt (EDMUNDS 2004 und STONEY 2009). Seitdem hat sich die HLM weiterentwickelt, und viele kardiochirurgische Eingriffe – besonders die Korrektur von angeborenen Herzdefekten bei Neugeborenen – wären unmöglich ohne sie.

Die Aufgabe einer HLM während einer Operation am offenen Herzen ist die Übernahme der Pumpfunktion des Herzens und der Gasaustauschfunktion der Lunge, außerdem auch die Übernahme der Thermoregulation während der Zeit, die der Patient an der HLM verbringt. Eine HLM besteht aus einem Reservoir, einem Oxygenator (die „künstliche Lunge“) mit integriertem Wärmeaustauscher, einer Pumpe (das „künstliche Herz“) und einem Schlauchsystem. Der Aufbau dieser Komponenten ist gewöhnlich der folgende: Das venöse Blut verlässt den Körper durch die venöse Kanüle bzw. den venösen Teil des Schlauchsystems und wird durch die Schwerkraft in ein Reservoir drainiert. In diesem Reservoir sind Filter (für Gewebstücke oder Thromben) und Entschäumer integriert. Daraufhin wird das Blut durch die Pumpe weitergeleitet zum Oxygenator, wo es oxygeniert und von Kohlendioxid befreit wird (Gasaustauschfunktion). In dem Oxygenator befindet sich ein Wärmeaustauschsystem. Bevor das Blut dann durch den arteriellen Teil des Schlauchsystems wieder in den Körper gelangen kann, ist oftmals noch ein Filter zwischengeschaltet, der Luft aus dem Blut filtern kann.

Das Blut muss vor Anschluss des Patienten an die HLM heparinisiert werden, damit es nicht in dem Schlauchsystem oder den Teilen der Maschine gerinnt. Nach Abgang von der HLM wird der Heparin-Antagonist Protamin gegeben, um die Gerinnung wieder zu normalisieren. Intraoperativ finden in regelmäßigen Abständen Kontrollen der Gerinnungszeit durch eine Bestimmung der Activated Clotting Time (ACT) statt.

Das Reservoir, welches das Blut aus dem venösen Kreislauf durch Gravitationskraft aufnimmt, hat die Aufgaben – abhängig von seinem Fassungsvermögen – das zirkulierende Blutvolumen zu variieren, Gewebstücke, Thromben und – durch seine Entschäumerfunktion, welche meist aus einer Polyurethanbeschichtung besteht – Luft aus dem Blut heraus zu filtern.

Es kann sich um ein offenes System mit einem Hartplastikreservoir, oder um ein geschlossenes System mit einem weichen Reservoir handeln (ULLMANN 2005). In das Reservoir wird auch ein HLM-Sauger drainiert, mit welchem zur besseren Übersicht Blut aus dem OP-Situs entfernt werden kann, und in manchen Fällen ein linksventrikulärer Vent, welcher direkt über die Herzspitze oder durch die rechte V. pulmonalis in den linken Ventrikel eingeführt werden kann, um diesen zusätzlich zu entlasten.

Neben dem in das Reservoir integrierten Filter passiert das Blut oft noch einen weiteren Filter mit gleicher Funktion, bevor es wieder in den Körper zurückgeleitet wird.

Es existieren zwei verschiedene Arten von Pumpen: Die Zentrifugal- und die Rollerpumpe. Erstere transportiert das Blut mithilfe der Zentrifugalbeschleunigung durch die Maschine, wobei kinetische Kraft auf das Blut übertragen wird. Die Geschwindigkeit des Blutes hängt dabei vom Druck ab, aber auch von der Umdrehungszahl, mit der die Pumpe betrieben wird (LARSEN 2012). Sie ist nicht okklusiv, wodurch das Blut zwar weniger traumatisiert wird und es zu weniger Embolien kommt, was aber auf der anderen Seite dazu führt, dass sie abhängig von der Blutlast ist (d. h., dass das Blut langsamer fließt, wenn sich der Widerstand erhöht) (ULLMANN 2005). Ihr Verwendungsgebiet bei kardiochirurgischen Operationen mit einer HLM sind lange Eingriffe von über vier Stunden (LARSEN 2012).

Bei der Rollerpumpe ist der Schlauch, der das Blut durch die Maschine leitet, U-förmig um vier rotierende Rollen gelegt, die durch ihre Rotation das Blut vorwärts bewegen. Die Geschwindigkeit des Blutes ist also abhängig vom Schlauchdurchmesser und auch von der Umdrehungszahl, mit der die Pumpe betrieben wird. Diese Art der Pumpe ist okklusiv, erzeugt einen nicht-pulsatilen Fluss und ist die in der Kardiochirurgie meistverwendete Pumpe (LARSEN 2012).

Der erste erfolgreich verwendete Oxygenatortyp war der Filmoxygenator, den Dr. Gibbon Jr. selbst erfand (COHN 2003). Bei diesem System wurde das Blut zum Zweck des Gasaustausches über eine große Fläche geleitet, auf der es einen dünnen Blutfilm bildete. Eine Weiterentwicklung war der Blasenoxxygenator, der von den 50er bis in die 80er Jahre des letzten Jahrhunderts hinein genutzt wurde (IWAHASHI et al. 2004). Hierbei wurde Sauerstoff direkt in Form von Blasen in das Blut eingeleitet. Heutzutage wird fast ausschließlich der Membranoxygenator verwendet, der mit einer mikroporösen Hohlfasermembran aus Polypropylene (IWAHASHI et al. 2004) ausgestattet ist. Bei diesem Oxygenatortyp sind Blut und Gas durch diese Membran voneinander getrennt; Sauerstoff kann aufgrund der Partialdruckdifferenz ins Blut hinein- und Kohlendioxid herausdiffundieren. Membranoxygenatoren sind beschichtet (z. B. mit Heparin oder amphiphilen Polymeren), um das Blut durch den Fremd-

oberflächenkontakt möglichst wenig zu schädigen und eine Aktivierung des Komplementsystems zu mindern (VIDEM et al. 1992).

Die Schlauchsysteme verbinden die Bestandteile der HLM und leiten das Blut durch sie. Sie werden an den Patienten angepasst, d. h. in der Kinderkardiologie haben sie kleinere Durchmesser und sind insgesamt kürzer. Sie bestehen aus Silikon oder PVC und können, ebenso wie der Oxygenator, beschichtet sein (VIDEM et al. 1992). Durch die venöse Kanüle (im rechten Herzhohr oder in beiden Venae cavae, falls am rechten Herzen manipuliert wird) verlässt das Blut den Körper, und durch die arterielle Kanüle (in der Aorta ascendens oder in der Arteria femoralis, falls an der Aorta manipuliert wird) tritt es wieder in den Körper ein (FRÖMKE 2003). Vor Anschluss des Patienten an die HLM werden diese Schläuche, und auch die sonstigen Komponenten des Systems, mit dem sogenannten Primingvolumen befüllt. Dies ist das initiale Füllungsvolumen der HLM, welches für gewöhnlich aus einer isotonen Elektrolytlösung besteht, welche unterschiedliche Zusätze bekommen kann, wie zum Beispiel Hydroxyethylstärke, 5-%iges Albumin, 5-%ige Glukose, Natriumbikarbonat oder Mannitol (STRIEBEL 2010). Gerade in der Pädiatrie muss oft auch Blut zugegeben werden, um einer zu starken Hämodilution durch das Primingvolumen entgegenzuwirken (STRIEBEL 2010).

2.3.1 Hypothermie

In den Oxygenator ist ein Wärmeaustauscher integriert. In diesem wird das Blut durch dünne, spiralförmige Schläuche geleitet und dabei von Wasser umspült, sodass das Blut die Temperatur des Wassers annimmt – die Körpertemperatur wird beeinflusst. Dadurch kann es heruntergekühlt bzw. erwärmt werden, ganz wie gewünscht bzw. wie nötig in der jeweiligen Phase des kardiochirurgischen Eingriffes. Die meisten Eingriffe werden unter einer moderaten Hypothermie durchgeführt, die nach Anschluss der HLM an den Körper begonnen wird. Bevor die HLM nach dem Eingriff vom Patienten abgekoppelt wird, wird der Körper wieder auf eine physiologische Temperatur erwärmt.

Eine moderate – also ca. 28 °C – Hypothermie während der Anwendung einer HLM bietet einen Schutz für das Myokard im Hinblick auf Ischämie-induzierte und inflammatorische Schäden (VAZQUEZ-JIMENEZ et al. 2001). Ist die Hypothermie kombiniert mit niedrigem peripherem arteriellem Widerstand, höherem Blutfluss und niedrigem arteriellen Druck, so ergibt das optimale Bedingungen für den Sauerstoffstoffwechsel des Körpers während der HLM-Zeit (PAROLARI et al. 1999).

2.3.2 Kardioplegie

Die Kardioplegie, also der medikamentös ausgelöste Herzstillstand ohne Herzaktion, hat während eines kardiochirurgischen Eingriffes zwei Vorteile: Sie ermöglicht dem Chirurgen zum einen eine bessere Übersicht und bessere Manipulationsmöglichkeiten, und sie schützt zum anderen das Herz vor den negativen Einwirkungen der Ischämie, die die Verwendung der HLM mit sich bringt (LARSEN 2012). Dabei ist besonders wichtig, dass die Herzaktion schnell und vollständig aussetzt, damit nicht unnötig Energie der Kardiomyozyten verloren geht (HEARSE et al. 1976). Meist wird dieses Ziel durch eine Lösung mit hohem Kalium- und niedrigem Natriumgehalt erreicht. Der durch sie ausgelöste Anstieg des Kaliums sorgt für eine Depolarisation; andere, in der Lösung enthaltene Elektrolyte sorgen für eine Stabilisierung der Membran in diesem Zustand – der Herzmuskel ist schlaff gelähmt. Eine darüber hinausgehende Kardioprotektion wird durch die in der Kardioplegielösung enthaltenen Puffersubstanzen erreicht.

SCHAFF et al. veröffentlichten schon 1978 eine Studie, die zeigte, dass die Kombination von Hypothermie und (hyperkalämischer) Kardioplegie positive Auswirkungen auf das Herz während bzw. nach einem kardiochirurgischen Eingriff mit Verwendung einer HLM hat. Der Großteil der Myokardprotektion geht von der Kardioplegie aus, unterstützt durch die Hypothermie (STRIEBEL 2010).

Nach Anschluss des Patienten an die HLM schlägt das Herz zunächst weiter, obwohl das Blutvolumen schon durch die Maschine gefördert wird. Erst, nachdem die Aorta abgeklemmt wird, werden die Koronargefäße nicht mehr perfundiert. Daraufhin wird die Aortenwurzel mit einer Kardioplegiekanüle punktiert und die Gabe der kardioplegischen Lösung erfolgt, was den Herzstillstand auslöst. Die Kanüle wird dort belassen, sodass Kardioplegielösung nachgegeben werden kann, sollte sich während des kardiochirurgischen Eingriffes wieder eine Herzaktion einstellen. Nach Abschluss des Eingriffes am Herzen wird die Aortenklammer geöffnet, sodass die Koronarien wieder mit Blut perfundiert werden. Oft stellt sich daraufhin wieder eine Herzaktion ein; falls nicht, muss defibrilliert werden. Die Entwöhnung des Patienten von der HLM kann erst vorgenommen werden, wenn das Herz stabil arbeitet und wenn eine physiologische Körpertemperatur wiederhergestellt ist.

2.4 Probleme nach Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine

Die Verwendung einer HLM während eines kardiochirurgischen Eingriffes führt immer zu Reaktionen des Körpers, welche leichter oder stärker ausgeprägt sein können. Die beiden wichtigsten Mechanismen, mit denen der Körper auf den chirurgischen Eingriff und insbesondere auf die HLM reagiert, sind eine Inflammationsreaktion (LEVY und TANAKA 2003) und ein Ischämie-Reperfusionsschaden, bei dem es zur Entstehung von oxidativem und nitrosativem Stress kommt (MATATA et al. (2000), Studie an 20 Patienten, an denen kardiochirurgische Eingriffe mit und ohne Verwendung einer HLM durchgeführt wurden, und bei denen Marker für oxidativen Stress und Inflammation ausgewertet wurden). Die Inflammationsreaktion und der Ischämie-Reperfusionsschaden hängen teilweise voneinander ab (Übersichtsarbeiten von LEVY und TANAKA (2003) und RAJA und DREYFUS (2005)) – im Folgenden wird näher auf beide eingegangen.

2.4.1 Ischämie-Reperfusionsschaden

Während der Zeit, die der Patient an der HLM verbringt, kommt es zu hypoxischen oder ischämischen Zuständen des ganzen Körpers und/oder bestimmter Organe, die sensibler sind – wie z. B. die Niere durch ihren hohen Grad an Vaskularisierung (WEIGHT et al. im Jahre 1998, Studie am Rattenmodell über die Pathophysiologie von Nieren, die einer warmen Ischämie und anschließender Reperfusion ausgesetzt waren). Ein wichtiger Grund dafür ist eine inadäquate Durchblutung (LEURS et al. 1989) während der HLM-Zeit. Laut LEURS et al. (1989) kann ein anhaltendes starkes Absinken der Hämodynamik perioperativ zu einem akuten Nierenversagen führen. Dieses Absinken kann entweder durch eine zu geringe Herzauswurfleistung oder eine andere funktionelle Störung der Herzleistung prä-, intra- oder/und postoperativ bedingt sein, oder durch einen zu geringen Perfusionsdruck während der HLM-Zeit. Im klinischen Alltag akzeptierte Perfusionsdrücke bewegen sich zwischen 40 und 60 mmHg; kontrastierend dazu veröffentlichten FISCHER et al. im Jahre 2002 eine Studie an 143 Patienten, an denen Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM durchgeführt wurde, und bei der sich zeigte, dass bei Patienten, die postoperativ eine Nierenschädigung entwickelten, länger Perfusionsdrücke von unter 60 mmHg angewendet wurden als bei Patienten, die postoperativ keine Nierenschädigung zeigten. Die HLM selbst ist außerdem für eine Veränderung des vasomotorischen Tonus der Niere verantwortlich, was den renalen Perfusionsdruck um bis zu 30 % verringern kann (KUMAR und SUNEJA 2011).

Wird der Körper bzw. das betroffene Organ nach Abgang von der HLM wieder physiologisch durchblutet – die sogenannte Reperfusion – kann dies zu einer Verschlimmerung der Problematik führen: Zellen, die während der Ischämie reversibel geschädigt wurden, können nun, in der Reperfusionphase, irreversible Schädigungen davontragen (MCCOLL et al. 1998). In der Reperfusionphase werden Endotoxine ausgeschwemmt (weil die Mitochondrien ihre Arbeit wieder aufnehmen und damit die oxidative Phosphorylierung wieder einsetzt), und es kommt – wie in der Ischämiephase schon eingeleitet – zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS), welche Lipidperoxidationsreaktionen auslösen, die ihrerseits Zellmembranen destabilisieren (LEHNERT und MARZI 2011). Die Bildung dieser ROS durch die Verwendung einer HLM wurde von zahlreichen Studien bestätigt, und wird auf das Vorkommen der Ischämie mit anschließender Reperfusion während bzw. nach der Verwendung der HLM zurückgeführt (zum Beispiel KANAOKA et al. (2010), Studie an 21 Patienten, an denen kardiochirurgische Eingriffe mit Verwendung einer HLM durchgeführt wurden und bei denen die reaktiven Sauerstoffmetabolite ausgewertet wurden).

Außerdem kommt es zu einer Zunahme von Stickstoffmonoxid (WEIGHT et al. 1998).

ROS – die Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale umfassen – und Stickstoffmonoxid sind Moleküle, die im Besitz mindestens eines ungepaarten Elektrons und dadurch sehr reaktionsfreudig sind. Superoxidanionen werden entweder physiologisch bei der mitochondrialen Atmung als Nebenprodukt, oder während eines Entzündungsgeschehens in Leukozyten und Endothelzellen durch die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase oder durch die Aktivität der Xanthinoxidase (welche durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme, wie sie bei Entzündungen und Sauerstoffmangel im Gewebe auftreten, aus der Xanthindehydrogenase entsteht) gebildet (GROTE und POHL 2005). Zwei Superoxidanionen ergeben zusammen mit zwei Protonen unter Einwirkung der Superoxiddismutase Wasserstoffperoxid. Das Enzym Superoxiddismutase (und auch die Katalase, s. u.) gilt daher als körpereigenes Antioxidans, weil es das reaktionsfreudige Superoxidanion in weniger reaktionsfreudiges Wasserstoffperoxid umwandeln kann. Wasserstoffperoxid wird im günstigen Fall durch Katalase weiter zu Wasser und Sauerstoff abgebaut, oder allerdings, im ungünstigen Fall, entweder in Gegenwart zweiwertigen Eisens und anderer Übergangsmetallionen, oder durch die Radiolyse von Wasser in ein Hydroxylion und ein Hydroxylradikal gespalten (BRANDT 2003). Hydroxylradikale wiederum sind sehr reaktionsfreudig.

Stickstoffmonoxid ist ein wichtiges Signalübertragungsmolekül und ein bekannter Vasodilatator. Es entsteht physiologisch in Zellen durch die Reaktion der Aminosäure L-Arginin mit Sauerstoff unter der Einwirkung der Stickstoff-Synthase. Es gibt drei verschiedene Iso-

formen dieser Synthese: Zwei unter physiologischen Bedingungen in den Neuronen bzw. in dem Endothel aktive (die nNOS bzw. die eNOS) und eine induzierbare (iNOS) in den Makrophagen, deren Expression durch Entzündungsreaktionen getriggert wird. Geschieht nun eine solche Reaktion im Gewebe, liegt mehr Stickstoffmonoxid als gewöhnlich vor. Dies kann zum einen – nachdem es als Vasodilatator initial von Vorteil für hypoxisches Gewebe ist – zu einer refraktorischen Hypotension führen (LAFHEY et al. 2002), welche in der Reperfu-sionsphase das Gewebe noch mehr schädigt. Außerdem reagiert das in pathologisch großen Quantitäten vorliegende Stickstoffmonoxid nun mit den ebenfalls durch die oben erklärte Re-aktion im Überfluss vorhandenen Superoxidanionen zu dem sehr reaktionsfreudigen Oxidans Peroxinitrit, welches Schäden in den Zellen anrichtet (DEUTZMANN 2006). Stickstoffmo-noxid und sein Nachfolgeprodukt Peroxinitrit werden zusammen als reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS) bezeichnet.

Da die ROS und die RNS Oxidantien sind, müssen sie sich immer im Gleichgewicht mit körpereigenen Antioxidationsmechanismen befinden. Solche Antioxidantien sind z. B. die oben erwähnten Enzyme Superoxiddismutase und Katalase oder auch Peroxidasen, außerdem Metallionen-bindende- und Heat-Shock-Proteine sowie Radikalfänger wie die Vitamine E und C, Glutathion, Bilirubin oder Harnsäure (GROTE und POHL 2005). Ist die Balance zwischen diesen Mechanismen und den Oxidantien gestört, so spricht man davon, dass oxidativer (im Falle der ROS) bzw. nitrosativer (im Falle der RNS) Stress auf die Zellen einwirkt. Dies äußert sich durch Protein- und Lipidperoxidation und durch Schädigung der DNS (KÖSE et al. (2011), Studie an 60 Patienten, die hämo- bzw. peritonealdialysiert wurden und bei denen anschließend verschiedene Marker für oxidativen und nitrosativen Stress ausgewertet wurden) – was zu Zellschäden bzw. -tod führt.

Diese DNS-Schädigungen werden vor allem durch ROS ausgelöst, aber auch durch den Apoptose-induzierenden Faktor AIF, welcher sich physiologisch im intramembranösen Raum der Mitochondrien aufhält, aber bei einer Schädigung der Zelle (und damit des Mitochondriums) austritt und durch das Zytosol in den Zellkern wandern kann, wo es neben DNS-Schädigung auch Chromatin-Kondensation verursacht (CANDÈ et al. 2002). Die DNS-Schädigungen lösen ihrerseits die Aktivierung der poly-ADP-Ribose Polymerase aus, welche ein Reparaturenzym ist – für ihre Arbeit benötigt sie vermehrt Adenosintriphosphat (ATP), was dessen Verbrauch steigert (STROSZNAJDER et al. 2005). Das verschlimmert allerdings den Zustand der Zellen, da während der vorhergegangenen Ischämie das in den Zellen vorhandene ATP bereits stark verbraucht wurde (es entstehen sukzessive ADP, AMP, Adenosin, Inosine und am Ende Hypoxanthin (KLONER et al. 1989)), es aber aufgrund des Sauerstoff-

mangels nicht wieder nachgebildet werden kann. Die Zellen können ihre physiologischen Ionengradienten nicht aufrecht halten, was nicht nur zu direkten Zellschädigungen wie Schwellungen und Ödemen führt, sondern auch zur Freisetzung chemotaktischer Faktoren (GERRITSEN et al. (2001), Studie an 40 Patienten, an denen Kardiochirurgie mit bzw. ohne Verwendung einer HLM vorgenommen wurde. Marker für oxidativen Stress und für eine Nierendysfunktion wurden ausgewertet).

2.4.2 Inflammationsreaktion

Wenn vaskularisiertes Gewebe auf irgendeine Art geschädigt wird, reagiert es mit dem Versuch, den Verursacher der Schädigung zu eliminieren – durch eine lokalisierte Entzündungsreaktion. Diese kann sich, abhängig von der Stärke der Schädigung bzw. ihrer Ursache, generalisieren bzw. außer Kontrolle geraten. Während und nach der Verwendung einer HLM ist eine Inflammationsreaktion, die in unterschiedlichen Ausprägungen in verschiedenen Organen auftreten kann, immer eine Antwort des Körpers (LEVY und TANAKA 2003). Mehrere Studien – vorgestellt in der Übersichtsarbeit von ATLURI et al. (2009) – haben kardiochirurgische Operationen mit und ohne die Verwendung einer HLM untersucht und sind zu dem Schluss gekommen, dass die Eingriffe ohne eine HLM signifikant weniger negative systemische Begleiterscheinungen und daraus resultierende Pathologien zeigten.

Auslöser der Inflammationsreaktion sind vor allem der Fremdkontakt des Blutes mit der HLM (COURTNEY et al. 1999), aber auch die Chirurgie an sich (GIANNOUDIS et al. 2006), außerdem Endotoxine, die durch eine Schädigung der Darmbarriere – ausgelöst durch eine splanchnische Vasokonstriktion während der HLM-Zeit – in den Blutstrom gelangen und indirekt eine Entzündungsreaktion triggern (MCNIKOL et al. 1999). Ein weiterer Faktor ist der Ischämie-Reperfusionsschaden. Der dabei entstehende oxidative Stress (vgl. 2.4.1) führt dazu, dass das Endothel in den minderperfundierten Gefäßen verstärkt Adhäsionsmoleküle (E- und P-Selektine und Angehörige der Immunglobulin-Superfamilie) exprimiert und eine Emigration von Leukozyten induziert (GROTE und POHL 2005). Außerdem werden in dieser Phase vermehrt polymorphkernige neutrophile Granulozyten aktiviert, welche sich dann zu jenen Adhäsionsmolekülen begeben und dort Zytotoxine freisetzen (ROYSTON 1997). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass Hypothermie, ein Absinken des Blutdruckes (bei nicht-pulsatilem Blutfluss), eine relative Anämie und Medikamente oder auch die Gabe von Fremdblut eine Rolle spielen (ROYSTON 1997).

Bei einer systemischen Inflammation arbeiten unterschiedliche Mechanismen zusammen, wovon laut LAFHEY et al. (2002) die Schlüsselkomponenten folgende sind: Die Komplement-, die Zytokin- und die Koagulationskaskade, Stickstoffmonoxid (vgl. 2.4.1) und Endothel- und andere Zellen der zellulären Immunantwort. Das durch die Chirurgie gesetzte Trauma und die HLM zusammen führen zu einer Aktivierung des Komplementsystems, laut LAFHEY et al. (2002) sind ursächlich für diese Aktivierung außerdem der Reperfusionvorgang ischämischen Gewebes und die Antagonisierung von Heparin mit Protamin. Das Komplementsystem aktiviert seinerseits zum einen zusammen mit der ebenfalls durch die HLM ausgelösten Ischämie-Reperfusionssituation das Endothel, und zum anderen Mono- und Lymphozyten sowie Makrophagen – die als Leukozyten der zellulären Immunantwort angehören und außerdem auch durch den Fremdkontakt mit der HLM aktiviert werden. Die Endothelzellen und die aktivierten Zellen sezernieren nun Zytokine. Die pro- (z. B. IL-8 und TNF-alpha) und antiinflammatorischen (z. B. IL-10) Zytokine geraten in eine Imbalance (BRIXCHRISTENSEN 2001), ihr Vorhandensein lockt zusätzlich polymorphkernige neutrophile Granulozyten in das geschädigte Gebiet. Diese degranulieren und setzen Zytotoxine frei und produzieren durch den oxidative burst ROS (KAWAHITO et al. (2000), Studie an elf Patienten, an denen ein kardiochirurgischer Eingriff mit Verwendung einer HLM vorgenommen wurde und bei denen der Neutrophilenstatus bestimmt wurde). Dies alles schädigt Endothel und umliegendes Gewebe, was bis zur Organbeeinflussung bzw. -schädigung führen kann.

Eine wichtige Rolle spielt auch die Koagulationskaskade, die über humorale und zelluläre Wege eng mit der Entzündungsantwort verbunden ist, wobei Thromboplastin eine große Rolle spielt. Die Koagulationskaskade wird unter anderem von Zytokinen bzw. dem geschädigten Endothel aktiviert. Körpereigene Pro- und Antikoagulantien befinden sich nach Durchführung eines kardiochirurgischen Eingriffes mit einer HLM oft in Imbalance (LAFHEY et al. 2002) und es kann zu Koagulations- bzw. Blutungspathologien kommen.

Studien haben gezeigt, dass die HLM offensichtlich das Komplementsystem und polymorphkernigen neutrophile Granulozyten (gemessen durch die Erhöhung der Elastase, ein Enzym aus der Granula dieser Granulozyten) aktiviert (ASCIONE et al. (2000), Studie an 60 Patienten, an denen Herzchirurgie mit bzw. ohne eine HLM vorgenommen wurde), die Sekretion verschiedener Zytokine (IL-8, IL-10 und TNF-alpha) triggert (DIEGELER et al. (2000), Studie an 30 Patienten, an denen Herzchirurgie mit bzw. ohne eine HLM vorgenommen wurde) und das C-reaktive Protein – ein Akute-Phase-Protein und ein im klinischen Alltag oft genutzter Marker für Entzündungen – im Blutplasma erhöht (SCHULZE et al. (2000), Studie an 26 Patienten, an denen Herzchirurgie mit bzw. ohne eine HLM vorgenommen wurde).

2.5 Die Niere und die pädiatrische Kardiochirurgie mit Herz-Lungen-Maschine

Eine Nierenschädigung oder sogar ein akutes Nierenversagen mit oder ohne Dialysepflichtigkeit sind schwerwiegende und nicht selten vorkommende Komplikationen kardiochirurgischer Eingriffe bei Kindern. Eine Beeinträchtigung der Niere kann alleine oder auch im Rahmen eines Multiorganversagens vorkommen und ist assoziiert mit einer hohen Mortalitätsrate und einer Verlängerung des Intensivstation- und auch des gesamten Krankenhausaufenthaltes. Laut LI et al. (2011) tritt eine akute Nierenschädigung (hier definiert als Anstieg des Serumkreatininwertes vom präoperativen Wert auf 50 % oder mehr innerhalb der ersten sieben Tage nach dem Eingriff) assoziiert mit einer Operation am kindlichen Herzen mit einer Wahrscheinlichkeit von 42 % auf, eine signifikant erhöhte Mortalität ist nicht assoziiert. In diese Studie wurden Korrekturen angeborener Herzfehler mit Verwendung einer HLM an 311 pädiatrischen Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 3,8 Jahren einbezogen. In einer 2005 von BASKIN et al. vorgestellten Untersuchung an 64 Kindern mit einem durchschnittlichen Alter von drei Monaten trat akutes Nierenversagen (definiert als ein Serumkreatininwert von über 1,2 mg/dl und/oder eine Urinausscheidung von weniger als 0,5 ml/kg/h über mehr als vier Stunden ohne dass ein Ansprechen auf die Gabe von Flüssigkeiten, Diuretika oder Inotropika gezeigt wurde) nach einem herzchirurgischen Eingriff mit einer HLM mit einer Wahrscheinlichkeit von 32,8 % auf. Die Mortalitätsrate lag bei diesen Patienten bei 66,7 %. Nierenversagen mit Dialysepflichtigkeit tritt mit einer Wahrscheinlichkeit von 2,7 % auf und zeigt eine Mortalität von 79 % (laut PICCA et al. (1995), Studie an 2262 Kindern, an denen kardiochirurgische Eingriffe mit einer HLM vorgenommen wurden).

LEVY und TANAKA zeigten in ihrer Übersichtsarbeit aus dem Jahre 2003, dass das generelle Risiko, ein Nierenversagen nach einer Operation am offenen Herzen mit Verwendung einer HLM zu entwickeln, signifikant erhöht ist.

Risikofaktoren für eine Nierenschädigung im Kontext einer Herzoperation bei Kindern sind laut LI et al. (2011) ein junges Alter – was darauf zurückgeführt wird, dass die glomeruläre Filtrationsrate erst im Alter von zwei Jahren maximal ausgebildet ist und die Nieren jüngerer Patienten daher anfälliger für Ischämien oder Inflammationsgeschehen sind – und die HLM-Zeit. Erwähnenswert bezüglich der Risikofaktoren ist nach LI et al. (2011) auch, dass sich diejenigen von Kindern im Gegensatz zu denjenigen Erwachsener dahingehend grundlegend unterscheiden, dass Kinder in den meisten Fällen zum Zeitpunkt des kardiochirurgischen Eingriffes keine sonstigen Begleitkrankheiten aufweisen. Risikofaktoren für das Auftreten

eines akuten Nierenversagens sind laut BASKIN et al. (2005) die Zeit, die der Patient an der HLM verbrachte, die Dauer der Aortenverschlusszeit, eine starke Hypotension und niedrige Serumalbuminwerte; nach PICCA et al. (1995) das Patientenalter, die Zeit, die der Patient an der HLM verbrachte, die Dauer der Aortenverschlusszeit – wobei darauf hingewiesen wird, dass komplexe kongenitale Herzfehler, die eine längere Korrekturzeit benötigen, oft in einem sehr jungen Patientenalter durchgeführt werden – eine arterielle Hypo- und/oder eine venöse Hypertension und die Gabe von Dopamin in einer Dosierung von mehr als 15 µg/kg/min.

Gründe für die empfindliche Reaktion der Niere auf diese Art von Operation sind laut PICCA et al. (1995) die hämodynamischen Beeinflussungen und Veränderungen, die die Niere während der HLM-Zeit erleidet (vgl. 2.4.1). In der Studie von BASKIN et al. (2005) war der Grund für alle in der Untersuchung erfassten Fälle von akutem Nierenversagen eine renale Ischämie, ausgelöst durch den kardiochirurgischen Eingriff mit einer HLM. Laut der Übersichtsarbeit von ABU-OMAR und RATNATUNGA aus dem Jahre 2006 können auch Nephrotoxine unterschiedlicher Genese und Mikroembolien Schuld an einer Nierenschädigung durch die HLM tragen.

ASCIONE et al. zeigten im Jahre 1999 beim Vergleich koronarer Bypassoperationen mit und ohne eine HLM an 50 adulten Patienten, dass das Weglassen der HLM eine weitaus bessere Protektion der Nierenfunktion bietet.

2.6 (-)-Epigallocatechin-3-Gallat

(-)-Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) ist ein natürlich vorkommender Bestandteil des grünen Tees. In Asien wird der grüne Tee (frische, getrocknete Blätter der Pflanze *Camellia sinensis*, also unfermentiert) schon seit Jahrtausenden von einem breiten Bevölkerungsspektrum tagtäglich konsumiert und ist nach Wasser eines der am meisten konsumierten Getränke der Welt. Grüner Tee besteht zu 20 bis 40 % aus Polyphenolen, von denen 60 bis 80 % Katechine sind, womit er den Katechingehalt aller anderen Teesorten übertrifft (MAK 2012). Von diesen Katechinen des grünen Tees wiederum macht EGCG mehr als 50 % aus; ihm wird der Großteil der positiven Auswirkungen auf die Gesundheit, die mit dem Genuss von grünem Tee assoziiert werden, zugeschrieben (NAGLE et al. 2006).

EGCG wurde in den letzten Jahren intensiv von mehreren Standpunkten ausgehend erforscht und es stellte sich heraus, dass es unterschiedliche Fähigkeiten hat. LAMBERT und ELIAS zeigten in ihrer 2010 veröffentlichten Übersichtsarbeit, dass EGCG in Tiermodellen die Tumorgenese in verschiedenen Stadien hemmen kann. LEVITES et al. veröffentlichten 2001 eine Mausmodell-Studie über die neuroprotektiven Fähigkeiten von EGCG. THAWONSUWAN et al. untersuchten 2010 an der Regenbogenforelle die immunstimulierenden Eigenschaften von EGCG. EL-MOWAFY et al. wiesen 2011 in ihrer Studie über Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität am Rattenmodell antiinflammatorische Effekte von EGCG nach. JANG et al. untersuchten 2010 Gehirnzellen, die Chinolinsäure ausgesetzt worden waren, und zeigten dabei, dass EGCG antiapoptotisch wirksam ist. SCHROEDER et al. veröffentlichten 2009 eine in-vitro-Untersuchung an Rattenneuronen, die zeigte, dass der antiapoptotische Effekt von EGCG darauf zurückzuführen ist, dass es sich in Mitochondrien anreichert, wo es als Radikalfänger wirkt. An dieser Stelle muss berücksichtigt werden, dass EGCG in der in-vitro-Forschung auch proapoptotische Effekte gezeigt hat – dies ist besonders für die Krebsforschung von großer Relevanz. Diese Effekte sind jedoch dosis- und zeitabhängig, wie auch von QIN et al. im Jahre 2007 in einer in-vitro-Studie an menschlichen Harnblasenkrebszellen gezeigt wurde.

Für die in dieser Dissertation vorgestellten Studie sind vor allem die beiden letztgenannten Forschungsergebnisse (bezüglich der antiinflammatorischen und der antiapoptotischen Effekte von EGCG) relevant. Von noch größerer Wichtigkeit aber ist die von RIETVELD und WISEMAN im Jahre 2003 vorgestellte direkte antioxidative Wirkweise von EGCG durch seine Radikalfänger-Fähigkeit, welche in vitro schon vielfach bewiesen worden war, unter anderem 1999 von NANJO et al. Die bereits oben erwähnte Studie an Gehirnzellen

von JANG et al. (2010) zeigte außerdem, dass EGCG die Stickstoffmonoxidproduktion hemmen kann – eine antinitrosative Wirkweise, die bei nitrosativem Stress von Wichtigkeit ist. Auch einige in-vivo-Studien zeigen die antioxidativen Fähigkeiten von EGCG (z. B. FIORINI et al. (2005) am Mausmodell an der Leber, CHOI et al. (2004) am Rattenmodell nach vorübergehender Okklusion einer Hirnarterie). KHAN et al. (2009) veröffentlichten eine Studie über die renoprotektive Wirkung von grünem Tee nach Cisplatingabe, die zeigte, dass die Katechine des grünen Tees, deren Großteil EGCG ausmacht, in der Lage sind, körpereigene Antioxidantien zu verstärkter Aktivität zu veranlassen.

Mit diesen Fähigkeiten ist es EGCG möglich, den Körper bzw. Zellen vor ROS (in-vitro-Studie von GUO et al. 1999) und RNS (in-vitro-Studie von PAQUAY et al. 2000) und den damit einhergehenden oxidativen bzw. nitrosativen Schäden zu schützen. Diese Schäden spielen nicht nur bei vielen Tumoren, bei kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen (also chronischen Krankheiten) eine Rolle, sondern auch bei den hier untersuchten Auswirkungen eines kardiochirurgischen Eingriffes mit einer HLM.

Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass EGCG mehr als ein einfaches Antioxidans ist. Wie oben dargestellt, hat es neben seinen antioxidativen (Radikalfänger) auch antinitrosative, antiapoptotische und antiinflammatorische Fähigkeiten, was es zu einer vielseitigen und vielversprechenden Substanz macht. Die Kombination dieser Wirkweisen war Grund zu der Annahme, dass EGCG in der Situation, in der sich der Körper während und nach einer kardiochirurgischen Intervention mit Verwendung einer HLM befindet, anderen Antioxidantien gegenüber überlegen sein könnte. Daher wurde EGCG in der in dieser Dissertation vorgestellten Studie eingesetzt.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Versuchsdurchführung

3.1.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um ca. vier Wochen alte, 8 bis 15 kg schwere Ferkel der Rasse Angler-Sattelschwein. Die Ferkel waren entweder noch nicht oder wenige Tage zuvor abgesetzt worden und daher nicht nüchtern. Die Operationen fanden unter der Genehmigungsnummer W 05/11 statt und wurden genehmigt vom Regierungspräsidium Leipzig, Referat 24, Braustraße 2 in 04013 Leipzig am 2.12.2010. Bezugsquelle der Tiere war das Lehr- und Versuchsgut Oberholz der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

Es wurden zuerst Vorversuche mit insgesamt vier Ferkeln vorgenommen. Dann wurde mit den Hauptversuchen begonnen, für die 23 Versuchstiere verwendet wurden. Diese wurden in drei Gruppen geteilt: Eine Kontrollgruppe (n=7; drei männliche und vier weibliche Ferkel), eine HLM-Gruppe (n=10; sechs männliche und vier weibliche Ferkel) und eine EGCG-Gruppe (n=6; drei männliche und drei weibliche Ferkel).

Die Tiere der HLM- und der EGCG-Gruppe wurden jeweils anästhesiert, thorakotomiert und für 90 Minuten an die HLM angeschlossen. Darauf folgten 30 Minuten Reperfusionzeit (während denen das Herz wieder selbständig zu schlagen begann, wobei die Ferkel jedoch noch an die HLM angeschlossen waren) und weitere 90 Minuten Rekonvaleszenzzeit, während denen die HLM stand und die Tiere mit eröffnetem Thorax in Narkose lagen. Die Ferkel der EGCG-Gruppe bekamen zu zwei definierten Zeitpunkten (15 Minuten vor Anschluss an die HLM und direkt nach Entwöhnung von der HLM) während des Versuches jeweils eine i. v. Injektion des untersuchten Wirkstoffs EGCG („Epigallocatechingallate“ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) in der Dosierung 10 mg/kg KM aufgelöst in 10 ml 0,9 %-igem NaCl. Am Ende des Versuches erfolgte die Euthanasie aller Tiere durch Entbluten in tiefer Narkose.

Zusätzlich zu diesen beiden Gruppen existierte eine Kontrollgruppe, welche ebenfalls anästhesiert und thorakotomiert, nicht aber an die HLM angeschlossen wurde. Die Kontrollgruppe zeigt, welche Veränderungen bereits durch eine Narkose und Thorakotomie verursacht werden. Im Vergleich mit der HLM-Gruppe wird dann offensichtlich, wie der Zustand nach Anästhesie, Thorakotomie und Durchführung einer extrakorporalen Zirkulation ist. Die

EGCG-Gruppe wiederum zeigt den Einfluss des EGCG auf den Körper und insbesondere natürlich auf die in dieser Dissertation untersuchte Niere nach Anästhesie, Thorakotomie und Durchführung der HLM.

3.1.2 Anästhesie, Kreislaufstabilisierung und Monitoring

3.1.2.1 Prämedikation

Das genaue Gewicht der Ferkel wurde im Stall festgestellt, dann bekamen sie eine Prämedikation mit Atropinsulfat („Atropinsulfat 0,5 mg/ml“ B. Braun, Melsungen, D in der Dosierung 0,02 mg/kg KM i. m.) und Midazolam („Midazolam-ratiopharm“ 15 mg/3ml Injektionslösung Ratiopharm GmbH, Ulm, D in der Dosierung 0,5 mg/kg KM i. m.) und wenige Minuten darauf Ketaminhydrochlorid („Ursotamin“ 100 mg/ml Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D in der Dosierung 25 mg/kg KM i. m.) intramuskulär in die Halsmuskulatur nahe des Ohrgrundes injiziert. Nach Wirkungseintritt der Prämedikation wurden die Ferkel in den Tier-Operationstrakt des Herzzentrums verbracht.

3.1.2.2 Intubation und arterielle und venöse Zugänge

Im Tier-Operationstrakt wurde den Ferkeln ein Zugang in die V. auricularis des Ohrs („Vasofix Safety“ B. Braun, Melsungen, D in der Größe 22 G, 0,9 * 25 mm) gelegt, durch den bei Bedarf Ketaminhydrochlorid zur Verlängerung der Sedation injiziert werden konnte.

Die Tiere wurden dann in Rückenlage auf den OP-Tisch gelagert und mit einem elastischen Einmaltubus der Größe 5,5 French („Profile Soft Seal Cuff“ Portex, Keene, NH, USA) oral intubiert. Ein elektrostatischer, kleiner Filter („DAR“ Covidien, Mansfield, MA, USA) wurde zwischen Tubus und Beatmungsgerät („Cato“ der Firma Dräger, Lübeck, D) geschaltet, und das Beatmungsgerät wurde wie in Tabelle 4 dargestellt eingestellt.

Tabelle 4: Einstellung des Beatmungsgerätes

Ventilation	TI:TE	V t	PEEP	P max	Atemfrequenz	Sauerstoff	Luft	Isofluran
IPPV	1:1,2	10 ml/kg	0 mbar	25 mbar	31/min	1,5 l/min	1,5 l/min	1-1,5 Vol.-%

Während des gesamten Versuches wurden die Ferkel engmaschig überwacht, um bei Bedarf – vor allem natürlich während der kritischen HLM-Zeit – Einstellungsänderungen vornehmen zu können.

Es wurden Zugänge in die V. jugularis und in die A. und die V. femoralis gelegt. Über den zentralvenösen Katheter (ZVK, „viellumiger Polyurethan-Verweilkatheter“ Arrow, Reading, PA, USA der Größe 7 Fr * 20 cm mit Blue Flex Tip) in der V. jugularis liefen die Analgesie und zeitweise die Narkose (vgl. 3.1.2.3). Dieser dreischenklige Zugang ermöglichte ebenso die Gabe anderer eventuell notwendiger Medikamente, auf die im weiteren Verlauf näher eingegangen wird. Des Weiteren lagen in diesem Zugang auch die Sonde zur Ermittlung des zentralvenösen Druckes und die Temperatursonde für die Kalibrierung der „Pulse Contour Cardiac Output“ („PiCCO“)-Messung.

Über den arteriellen Zugang („Pulsioath 5 F Thermodilution Catheter 20 cm“ Pulsion Medical Systems AG, München, D der Größe 5 Fr * 20 cm) erfolgte ein hämodynamisches Monitoring durch die invasive Bestimmung des Blutdruckes und des Herz-Zeit-Volumens (vgl. 3.2.2) über das „PiCCO“-System. Er diente außerdem zur Blutprobenentnahme arteriellen Blutes.

Der Zugang in der V. femoralis („Hemostasis Introducer“ St. Jude Medical, Minnetonka, MN, USA der Größe 4 Fr) ermöglichte die Gabe von Infusionen (vgl. 3.1.2.3) und die Probenentnahme venösen Blutes.

An der Zunge wurde ein Pulsoximeter zur Messung der Sauerstoffsättigung platziert.

Das Monitoring konnte nun mithilfe des Gerätes „Infinity Delta“ der Firma Dräger, Lübeck, D erfolgen.

In halbstündigem Abstand wurden arterielle Blutgasanalysen mit dem Gerät „ABL 725“ der Firma Radiometer Medical ApS, Bronshøj, DK durchgeführt, um nötigenfalls Einstellungsänderungen vorzunehmen (siehe Tabelle 7, Verwendetes Zubehör für die Anästhesie, das Monitoring und die chirurgische Intervention).

3.1.2.3 Medikamentöses Regime und Infusionen

Von dem Moment der Intubation an erfolgte die künstliche Beatmung mit Isofluran („Isoba“ Intervet, Unterschleißheim, D in der Dosierung 2,5 bis 5 Volumenprozent zur Anflutung und 1 bis 1,5 Volumenprozent als Erhaltungsdosis), Sauerstoff und Luft (jeweils 1,5 l/min) über den Verdampfer „Vapor 19.3“ Dräger, Lübeck, D durch ein halbgeschlossenes System (Beatmungsgerät „Cato“ der Firma Dräger, Lübeck, D).

Während der 120 Minuten, die die Ferkel insgesamt an der HLM verbrachten, wurde die künstliche Beatmung auf ein Minimum reduziert, da die HLM die Oxygenierung des Blutes übernahm. In dieser Zeit wurde die Narkose durch die intravenöse Gabe von Propofol („Propofol 2%“ 20 mg/ml MCT Fresenius Kabi, Bad Homburg, D in der Dosierung 13 bis 17 mg/kg/ml/h i. v. durch die Perfusorpumpe) aufrechterhalten. Kurz vor Ende der HLM- und Reperfusionzeit wurde der positive endexpiratorische Druck (PEEP) kurzzeitig auf 10 mbar eingestellt, um die Lunge zu blähen und somit Atelektasenbildung vorzubeugen. Diese Umstellung der Narkose von Isofluran auf Propofol wurde selbstverständlich auch bei der Kontrollgruppe, die nicht an die HLM angeschlossen wurde, vorgenommen. Diese Tiere wurden während der 120 Minuten mit einem Sauerstoff-Luft-Gemisch beatmet.

Die Analgesie wurde während der gesamten Dauer des Versuches durch Sulfentanildihydrogencitrat („Sufenta“ 50 µg/ml Injektionslösung Janssen-Cilag, Neuss, D in der Dosierung 3 µg/kg Bolus initial, 1 bis 2 µg/h/10 kg Erhaltung i. v. durch die Perfusorpumpe) gewährleistet.

Vor Beginn der chirurgischen Intervention bekamen die Ferkel Pancuroniumbromid („Pancuronium-ratiopharm“ Ratiopharm GmbH, Ulm, D in der Dosierung 0,2 mg/kg KM i. v.) als Muskelrelaxans.

Zur Abdeckung des Flüssigkeitsbedarfs und um den Mitteldruck und den Hämatokrit in physiologischen Bereichen zu halten, wurden jedem Ferkel individuell unterschiedliche Quantitäten unterschiedlicher Infusionslösungen infundiert (Natriumchlorid „Isotonische Kochsalzlösung 0,9 % 500 ml“ Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D; Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchloriddihydrat, Magnesiumchloridhexahydrat, Natriumacetattri-hydrat „E 158 Elektrolyt Infusions Lösung 500 ml“ Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D; Hydroxyethylstärke „HES 6 130/0,42 in Ringer Acetat 500 ml Vitafusal 6 %“ Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D; Glucose-Monohydrat „Glucosteril 5% 500 ml“ Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D; vgl. Tabelle 15).

Sonstige Medikationen waren abhängig von der jeweiligen Herz-Kreislauf-Situation, dem Säure-Basen-Haushalt und dem Blutdruck bzw. dem Flüssigkeitshaushalt. Nötig waren in fast allen Fällen in der Rekonvaleszenzphase Katecholamine („Arterenol“ (Norepinephrin) und „Suprarenin“ (Epinephrin), Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt a. M., D in der Dosierung 0,01 mg/Tier i. v. in Notfallsituation; 0,1 mg/ml/h i. v. aus dem Perfusor als Erhaltungsbedarf), außerdem zur Rhythmusstabilisierung Magnesiumsulfatheptahydrat („Mg 10% Inresa“ Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, D in der Dosierung 1 g/Tier i. v.) und Calciumgluconat („Calciumgluconat 10%“ B. Braun, Melsungen, D in der Dosierung 23

mmol/Tier i. v.). Als Puffer gegen azidotische Stoffwechsellagen standen Natriumhydrogencarbonat („Natriumhydrogen-carbonat 1 molar 8,4 %“ Serag Wiessner KG, Naila, D) oder Trometamol („3 M-Trometamol-Lösung Baxter“ Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D) zur Verfügung. Dosierungen für beide Medikamente errechnete man mit der Standardformel $(-BE) * 0,3 * \text{kg KM} = \text{mmol Natriumhydrogencarbonat bzw. Trometamol/Tier i. v.}$ (siehe Tabelle 6 für eine genaue Auflistung aller Medikamente).

3.1.3 Versuchsablauf

3.1.3.1 Operation

Nachdem alle Messsonden und Zugänge wie oben beschrieben platziert waren, wurde chirurgisch über einen lateralen Zugang durch die Bauchdecke die linke Niere freigelegt, und unter Verwendung einer Biopsiezange wurden zwei Proben entnommen. Der Hautschnitt wurde durch Einzelhefte wieder verschlossen.

Nach Beendigung dieser Vorbereitung wurden die Ferkel median sternotomiert. Durch einen Thoraxspreizer konnten das Herz und die herznahen Gefäße dargestellt werden. Nach teilweiser Resektion des Thymus und Ligatur der A. mammaria zur besseren Übersicht über das Operationsfeld wurde das Perikard eröffnet. In das rechte Herzohr, in den Aortenbogen und in die Aortenwurzel wurden Tabaksbeutelnähte eingebracht. Daraufhin erfolgte an eben-diesen anatomischen Strukturen die Kanülierung für die HLM, wobei die arterielle Kanüle den Aortenbogen, die venöse Kanüle das rechte Herzohr und die Kardioplegienadel die Aortenwurzel punktierte. Die Kanülen wurden mittels Tourniquets gesichert.

Nun wurden die mit dem Primingvolumen (vgl. 3.1.3.2.1) gefüllten Schläuche der HLM mit den Kanülen verbunden und dieselbe wurde gestartet. Damit begann die 90-minütige sogenannte HLM-Zeit.

3.1.3.2 Herz-Lungen-Maschine

Das Gerät, mit dem bei diesem Versuch gearbeitet wurde, war ein „SIII“ der Firma Stöckert Instrumente GmbH, München, D bestehend aus Rollerpumpen, die mit nicht-pulsatilem Fluss verwendet wurden, Konsolen und Monitoringgeräten. Aufgrund der Größe und des Gewichtes der Ferkel wurden pädiatrische Einmal-Schlauchsysteme („Kinder Kompl. Set“ Sorin Group Deutschland GmbH, München, D) mit einem Durchmesser von 1 cm und pädiatrische Ein-

mal-Membranoxygenatoren mit vorgeschaltetem Hartplastikreservoir („D901 Lilliput“ Dideco, Mirandola, I) verwendet. Dieses Reservoir hatte eine Kapazität von 1800 ml. Die venöse und die arterielle Kanülierungsnadeln stammten ebenfalls aus der Pädiatrie („Venous Catheter Dia 6/8 mm 24 F Soft Tip“ Polystan A/S, Värölse, DK und „Arterielle Kanüle 10 F“ Polystan A/S, Värölse, DK).

Vor Anschluss der HLM wurden die Schläuche mit dem Primingvolumen befüllt (vgl. 3.1.3.2.1).

Aus dem rechten Herzohr floss das Blut aufgrund der Gravitation durch die venöse Kanüle in das räumlich tiefer gelegene venöse Reservoir. Auch der HLM-Sauger („Sauger 5 mm“ Stöckert Instrumente GmbH, München, D) wurde in dieses Reservoir drainiert. Dabei passierte das Blut einen Filter, welcher kleine Gewebspartikel und Thromben aufhalten, und einen Entschäumer aus Polyurethan, welcher die Bildung von Schaum verhindern sollte. Daraufhin wurde das Blut durch das Schlauchsystem durch die Rollerpumpe geleitet und dadurch weiter zu dem mit amphiphilen Phospholipiden beschichteten Membranoxygenator geführt, dessen Aufgabe in der Oxygenierung und Kohlendioxideliminierung des Blutes besteht. In diesem System sind Blut und Gas durch eine mikroporöse Hohlfasermembran voneinander getrennt, durch die das Gas aufgrund der unterschiedlichen Druckgradienten diffundiert und somit das Blut mit Sauerstoff angereichert und von Kohlendioxid befreit wird. In diesen Oxygenator war ein Wärmeaustauscher („Normohypothermiegerät“ der Firma Stöckert Instrumente GmbH, München, D) integriert, welcher die Temperatur des Blutes – und damit auch die innere Körpertemperatur – auf eine bestimmte Gradzahl abkühlte, bzw. am Ende der HLM-Zeit wieder erwärmte. Dieser Mechanismus funktioniert über feine Rohre, durch die das Blut geleitet wird, und die von Wasser in der gewünschten Temperatur umspült werden. Bei dem hier beschriebenen Versuch wurde die Körpertemperatur der Tiere zu Beginn der HLM-Zeit auf 28 °C abgekühlt. Nach 60 Minuten begann die Wiedererwärmung auf 37 °C.

Durch einen weiteren Teil des Schlauchsystems wurde das gefilterte und oxygenierte Blut zu einem weiteren Filtermedium mit hohen Adhäsionskräften („40 Micro Lilliput Concept D 736“, Dideco, Mirandola, I) geleitet, welches eventuell vorhandene Luft aus dem Blut filtern konnte, bevor das Blut in die arterielle Kanüle und somit durch den Aortenbogen wieder zurück in die Ferkel befördert wurde.

Nach erfolgter Kanülierung und Anschluss an die HLM wurde die Aortenwurzel mit der Kardioplegiekanüle („Kardioplegiekanüle 4Fr 18G“ Medtronic GmbH Deutschland, Meerbusch, D) punktiert, danach wurde die Aorta ascendens abgeklemmt (siehe Tabelle 8, Auflistung des Zubehörs für die HLM). Um darauffolgend den Herzstillstand auszulösen,

wurde die kalte (4 °C) Kardioplegielösung (vgl. 3.1.3.2.3) injiziert. Aufgrund der Abklemmung der Aorta wurden die Koronargefäße nun nur von der Kardioplegielösung durchströmt. Dadurch hielt der Stillstand des Herzens an.

Am Ende der 90-minütigen HLM-Zeit wurde die Aortenklemme geöffnet. Falls sich in dieser Situation der Sinusrhythmus nicht selbstständig wiedereinstellte, wurde das Herz mit 10 Joule defibriert. Nach der sich anschließenden 30-minütigen Reperfusionzeit wurde die HLM gestoppt.

Die Ferkel wurden noch 90 Minuten mit eröffnetem Thorax in Narkose belassen, bis die Euthanasie in tiefer Narkose durch Entbluten durchgeführt wurde. Diese sogenannte Rekonvaleszenzzeit wurde so gewählt, damit durch die chirurgische Intervention bzw. durch die extrakorporale Zirkulation eventuell gesetzte Läsionen die Möglichkeit bekamen, sich biochemisch und strukturell zu manifestieren (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Zeitübersicht des Versuchsablaufes

Vorbereitungszeit	OP- bzw. HLM-Zeit	Reperfusionzeit	Rekonvaleszenzzeit
ca. 30-60 Minuten	90 Minuten	30 Minuten	90 Minuten

3.1.3.2.1 Primingvolumen

Das Primingvolumen der HLM, also die Flüssigkeit, die sich bei Anschluss der HLM in den Schläuchen und in dem Reservoir befand, bestand aus 200 ml Hydroxyethylstärke („HES 6 130/0,42 in Ringer Acetat 500 ml Vitafusal 6 %“ Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D), 50 ml Natriumhydrogencarbonat („Natriumhydrogen-carbonat 1 molar 8,4 %“ Serag Wiessner KG, Naila, D), Heparin-Natrium („Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm“ Ratiopharm GmbH, Ulm, D in der Dosierung 1000 I.E./10 kg KM) und einer Blutkonserve á 200 ml.

Die in dem Primingvolumen enthaltene Blutkonserve wurde gegeben, um zum einen die Blutverluste auszugleichen, die bei der Operation bzw. beim Kanülieren des Herzens entstanden, und zum anderen, um der Hämodilution durch Infusionen entgegenzuwirken. Das Blut stammte von Schweinen, die in der Abteilung Forschung und Lehre des Herzzentrums operiert worden waren. Das Spenderblut wurde in Transfusionssystemen („CPDA-1 Single Blood Bag 450 ml“ Terumo Europe N.V., Leuven, B) aufgefangen und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Transfusionssysteme enthielten 100 ml der folgenden Inhaltsstoffe: Acidum citricum (monohydrate) 0,327 g, Natrii citras (dihydrate) 2,63 g, Mononatrii phosphas

(dihydrate) 0,251 g, Dextrosium (anhydrate) 2,90 g, Adenine 0,0275 g, Aq. ad iniectabilia q.s. 100 ml. Auch die Tiere der Kontrollgruppe erhielten jeweils eine Blutkonserve á 200 ml.

3.1.3.2.2 Medikamentöses Regime

Bevor das Herz kanüliert wurde, gab man allen Tieren Heparin-Natrium („Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm“ Ratiopharm GmbH, Ulm, D in der einmaligen Dosierung von 5.000 I.E. pro Tier i. v.), um eine Koagulation des Blutes zu verhindern und die Activated Clotting Time (ACT) über 400 Sekunden zu halten. Die ACT wurde vor der Kanülierung und während der HLM-Zeit regelmäßig durch das ACT-Gerät („Automated Coagulation Timer“ Medtronic HemoTec, Inc., Englewood, CO, USA) kontrolliert.

Nach Abschluss der insgesamt 120-minütigen HLM- und Reperfusionzeit bekamen die Ferkel Protaminhydrochlorid („Protamin ME 5.000 IE/ml“ MEDA Pharma GmbH & Co. KG, Bad Homburg, D in der Dosierung 5.000 I.E. pro Tier i. v.) intravenös injiziert, um die Wirkung des Heparin-Natriums zu antagonisieren.

Die Medikament-Gruppe erhielt zwei i. v. EGCG-Injektionen („Epigallocatechingallate“ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D in der Dosierung 10 mg/kg KM i. v. Die berechnete Menge EGCG wurde vor Gabe in 10 ml 0,9 % Natriumchlorid aufgelöst.), und zwar 15 Minuten vor Anschluss an die HLM und direkt nach Entwöhnung von der HLM.

3.1.3.2.3 Kardioplegie

Um einen chirurgischen Eingriff am Herzen mithilfe einer HLM durchführen zu können, ist oft der medikamentös herbeigeführte Stillstand des Herzens unerlässlich. Die sogenannte Kardioplegie bewirkt eine Unterbrechung der Herzaktion, und zwar durch folgenden Wirkmechanismus: Aufgrund der Zusammensetzung der Elektrolyte in der Kardioplegielösung (hoher Kalium- und niedriger Natriumgehalt) sinken das Natrium und auch das Calcium auf Werte ähnlich denen des Zytoplasma einer ruhenden Zelle herab. Kalium hingegen wird angehoben. Durch diese Vorgänge wird das Membranpotential der Zelle stabilisiert. Elektrolytein- bzw. -ausströmungen werden unterdrückt, sodass die Zelle nicht aktiviert werden kann.

Neben dem gewünschten Stillstand des Herzens zur Erleichterung chirurgischer Interventionen ist ein weiterer Grund für die Verwendung einer Kardioplegie deren protektive Wirkung auf das Myokard. Diese ist bei der hier verwendeten Kardioplegielösung vor allem bei längerer Dauer der HLM groß (SCRASCIA et al. 2011). Die Injektion kalter Kardiople-

gielösung akzeleriert außerdem die Herabkühlung des Herzens. Wie oben beschrieben, wurde die Aortenwurzel mit einer Kardioplegienadel kanüliert, durch welche nach Abklemmung der Aorta initial 350 ml einer kalten (4 °C) kristalloiden Lösung nach Bretschneider („Custodiol“ Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, D), eingegeben wurden. Dadurch kam es gewöhnlich zum Herzstillstand. Zeigten sich im Verlaufe der 90-minütigen HLM-Zeit wieder Herzaktionen, so wurde Kardioplegielösung nachgegeben.

1000 ml der „Custodiol“-Lösung enthalten folgende Inhaltsstoffe: Natriumchlorid 0,8766 g, Kaliumchlorid 0,671 g, Magnesiumchlorid x 6 H₂O 0,8132g, Histidinhydrochlorid x H₂O 3,7733 g, L-Histidin 27,9289 g, Tryptophan 0,4085 g, Mannitol 5,4651 g, 2-Oxoglutarsäure 0,146 g, Calciumchlorid x 2 H₂O 0,0022g.

Tabelle 6: Angewandte Medikamente während der Operationen

Wirkstoff	Präparatname und Firma	Konzentration und Applikationsart	Applikationszeitpunkt
Atropinsulfat	„Atropinsulfat 0,5 mg/ml“ B. Braun, Melsungen, D	0,02 mg/kg KM i. m.	Prämedikation
Midazolam	„Midazolam-ratiopharm“ 15 mg/3ml Injektionslösung Ratiopharm GmbH, Ulm, D	0,5 mg/kg KM i. m.	Prämedikation
Ketaminhydrochlorid	„Ursotamin“ 100 mg/ml Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D	25 mg/kg KM i. m.	Prämedikation
Isofluran	„Isoba“ Intervet, Unterschleißheim, D	2,5-5 Volumenprozent zur Anflutung und 1-1,5 Volumenprozent als Erhaltungsdosis Inhalation	Narkose-Erhaltung ohne HLM
Sulfentanildihydrogencitrat	„Sufenta“ 50 µg/ml Injektionslösung Janssen-Cilag, Neuss, D	3 µg/kg Bolus initial, 1-2 µg/h/10 kg Erhaltung i. v. aus dem Perfusor	Ständig
Propofol	„Propofol 2%“ 20 mg/ml MCT Fresenius Kabi, Bad Homburg, D	13-17 mg/kg/ml/h i. v. aus dem Perfusor	Narkose-Erhaltung während HLM
EGCG	„Epigallocatechin-gallate“ Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D	10 mg/kg KM i. v. aufgelöst in 10 ml 0,9 % Natriumchlorid	Zweimalig als Bolus 15 Min. vor Anschluss an und direkt nach Entwöhnung von der HLM
Pancuroniumbromid	„Pancuronium-ratiopharm“ Ratiopharm GmbH, Ulm, D	0,2 mg/kg KM i. v.	Einmalig vor chirurgischer Intervention
Heparin-Natrium	„Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm“ Ratiopharm GmbH, Ulm, D	5.000 I.E. pro Tier i. v. bzw. 1000 I.E./10 kg KM	Einmalig vor Kanülierung, bzw. mehrmals nach ACT-Bestimmung bei Bedarf
Protaminhydrochlorid	„Protamin ME 5.000 IE/ml“ MEDA Pharma GmbH & Co. KG, Bad Homburg, D	5.000 I.E. pro Tier i. v.	Einmalig nach Abgang von der HLM
Natriumchlorid	„Isotonische Kochsalzlösung 0,9 % 500 ml“ Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D	Nach Bedarf i. v.	Bei Bedarf
Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Calciumchloriddihydrat, Magnesiumchlorid-hexahydrat, Natriumace-	„E 158 Elektrolyt Infusions Lösung 500 ml“ Serumwerk Bernburg	Nach Bedarf i. v.	Bei Bedarf

tattrihydrat	AG, Bernburg, D		
Hydroxyethylstärke	„HES 6 130/0,42 in Ringer Acetat 500 ml Vitafusal 6 %“ Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D	Nach Bedarf i. v.	Bei Bedarf
Glucose-Monohydrat	„Glucosteril 5% 500 ml“ Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D	Nach Bedarf i. v.	Bei Bedarf
Trometamol	„3 M-Trometamol-Lösung Baxter“ Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D	Standardformel (-BE) * 0,3 * kg KM = mmol Trometamol/Patient i. v.	Bei Bedarf
Natriumhydrogencarbonat	„Natriumhydrogencarbonat 1 molar 8,4 %“ Serag Wiessner KG, Naila, D	Standardformel (-BE) * 0,3 * kg KM = mmol Natriumhydrogencarbonat/Tier i. v.	Bei Bedarf
Norepinephrin	„Arterenol“ Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt a.M., D	0,01 mg/Tier in Notfallsituation i. v.; 0,1 mg/ml/h als Erhaltungsbedarf i. v. aus dem Perfusor	Bei Bedarf
Epinephrin	„Suprarenin“ Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt a.M., D	0,01 mg/Tier in Notfallsituation i. v.; 0,1 mg/ml/h als Erhaltungsbedarf i. v. aus dem Perfusor	Bei Bedarf
Magnesiumsulfatheptahydrat	„Mg 10 % Inresa“ Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, D	1 g/Tier i. v.	Bei Bedarf zur Rhythmusstabilisierung nach Entwöhnung von der HLM
Calciumgluconat	„Calciumgluconat 10 %“ B. Braun, Melsungen, D	23 mmol/Tier i. v.	Bei Bedarf zur Rhythmusstabilisierung nach Entwöhnung von der HLM
Kardioplegie-Lösung nach Bretschneider (enthält u. a. Natriumchlorid: 0,8766 g und Kaliumchlorid: 0,671 g)	„Custodiol“ Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Bensheim, D	Initial 350 ml, danach bei Bedarf mehr i. v.	Kardioplegielösung

**Tabelle 7: Verwendetes Zubehör für die Anästhesie, das Monitoring
und die chirurgische Intervention**

Zubehör	Gerätname und Firma	Größe und Beschreibung
Venenverweilkatheter	„Vasofix Safety“ B. Braun, Melsungen, D	22 G, 0,9 * 25 mm In der V. auricularis
Trachealtubus	„Profile Soft Seal Cuff“ Portex, Keene, NH, USA	5,5 Fr
Filter	„DAR“ Covidien, Mansfield, MA, USA	Elektrostatischer Filter, klein
Verdampfer für Isofluran	„Vapor 19.3“ Dräger, Lübeck, D	Verdampfung von Isofluran zur Anästhesie
Beatmungsgerät	„Cato“ Dräger, Lübeck, D	Halbgeschlossenes System für künstliche Beatmung
3-lumiger zentralvenöser Katheter	„viellumiger Polyurethan- Verweilkatheter“ Arrow, Reading, PA, USA	7 Fr * 20 cm mit Blue Flex Tip In der V. jugularis
Arterieller Katheter/ „PiCCO“	„Pulsioath 5 F Thermodilution Catheter 20 cm“ Pulsion Medical Systems AG, München, D	5 Fr * 20 cm In der A. femoralis
Venöse Schleuse	„Hemostasis Introducer“ St. Jude Medical, Minnetonka, MN, USA	4 Fr In der V. femoralis
Monitoring Device	„Infinity Delta“ Dräger, Lübeck, D	Überwachung der Vitalfunktionen
„PiCCO“-Gerät	„PiCCO“ „Pulsion Medical Systems“, München, D	„Pulse Contour Cardiac Output“; Herz-Zeit-Volumen- und invasive arterielle Blutdruckmessung
Blutgasanalysegerät	„ABL 725“ Radiometer Medical ApS, Bronshøj, DK	Halbstündige Durchführung von Blutgasanalysen

Tabelle 8: Verwendetes Zubehör für die HLM

Zubehör	Name und Firma	Beschreibung
Venöse Kanüle	„Venous Catheter Dia 6/8 mm 24 F Soft Tip“ Polystan A/S, Värnlöse, DK	24 Fr Im rechten Herzohr
Arterielle Kanüle	„Arterielle Kanüle 10 F“ Polystan A/S, Värnlöse, DK	10 Fr Im Aortenbogen
Kardioplegiekanüle	„Kardioplegiekanüle 4 Fr 18 G“ Medtronic GmbH Deutschland, Meerbusch, D	4 Fr, 18 G In der Aortenwurzel
Sauger	„Sauger 5 mm“ Stöckert Instrumente GmbH, München, D	Führt abgesaugtes Blut zum Reservoir
Membranoxygenator zusammen mit Hartplastik-Reservoir	„D901 Lilliput“ Dideco, Mirandola, I	Hohlfaser Membranoxygenator für Kinder mit integriertem Hartplastikreservoir und Filter für Gewebsteile und Thromben
Filter	„40 Micro Lilliput Concept D 736“, Dideco, Mirandola, I	Filtereinheit für Luft
HLM-Gerät/Rollerpumpe	„SIII“ Stöckert Instrumente GmbH, München, D	Rollerpumpe, Monitoring, Konsolen
Normohypothermiegerät	„Normohypothermiegerät“ Stöckert Instrumente GmbH, München, D	Wärmeaustauscher, der für die Abkühlung bzw. Wiedererwärmung des Tieres sorgt
Schläuche	„Kinder Kompl. Set“ Sorin Group Deutschland GmbH, München, D	Verbindung der verschiedenen Komponenten der HLM untereinander und zum Tier
ACT-Gerät	„Automated Coagulation Timer“ Medtronic HemoTec, Inc., Englewood, CO, USA	Bestimmung der Gerinnungszeit vor und während HLM-Zeit; Ziel: > 400 Sekunden
Hydroxyethylstärke	„HES 6 130/0,42 in Ringer Acetat 500 ml Vitafusal 6 %“ Serumwerk Bernburg AG, Bernburg, D	200 ml davon als Teil des Primingvolumens in den Schläuchen und dem Reservoir
Natriumhydrogencarbonat	„Natriumhydrogen-carbonat 1 molar 8,4 %“ Serag Wiessner KG, Naila, D	50 ml davon als Teil des Primingvolumens in den Schläuchen und dem Reservoir
Heparin-Natrium	„Heparin-Natrium-25.000-ratiopharm“ Ratiopharm GmbH, Ulm, D	1.000 I.E./10 kg KM als Teil des Primingvolumens in den Schläuchen und dem Reservoir
Bluttransfusionssystem	„CPDA-1 Single Blood Bag 450 ml“ Terumo Europe N.V., Leuven, B	Bluttransfusionsbeutel, Inhalt als Teil des Primingvolumens in den Schläuchen und dem Reservoir

3.2 Intraoperative Parameter

3.2.1 Blutfluss

Während der HLM-Zeit war es das Ziel, den Blutfluss der Ferkel durchgängig bei 100 ml/min/kg KM zu belassen. Die in diesem Versuch verwendete HLM („SIII“ Stöckert Instrumente GmbH, München, D) ist jedoch in der Lage, in gewissen Situationen den Blutfluss selbständig herunterzuregulieren, z. B. wenn ein suboptimales intravasales Volumenangebot herrscht und zu wenig Blut aus dem Ferkel durch die venöse Kanüle in die Maschine zurückströmt. In diesen Situationen musste mehr Volumen infundiert werden, um den Blutfluss im oben angegebenen Bereich zu halten.

3.2.2 Arterieller Blutdruck und Herz-Zeit-Volumen

Da die Niere ein wichtiger und potenter Regulator des Blutdruckes ist, und der Blutdruck im Umkehrschluss für die Durchblutung des Körpers und somit auch für die adäquate Sauerstoffversorgung der Niere verantwortlich ist, wurde dieser während des Versuches ständig überwacht. Insbesondere während der Zeit, die das Ferkel an der HLM verbrachte, war es das Ziel, den systemischen mittleren Blutdruck nicht unter 40 bis 60 mmHg fallen zu lassen. 40 bis 60 mmHg sind ein allgemein akzeptierter Bereich während der Durchführung eines Eingriffes am Herzen mit Benutzung einer HLM. Bei einem Abfall konnte medikamentös z. B. mit Epinephrin oder Norepinephrin oder auch mit einer Infusion interveniert werden.

Gemessen wurde der Blutdruck invasiv in der A. femoralis mit dem „Pulsioath 5 F Thermodilution Catheter 20 cm“ der Firma Pulsion Medical Systems AG, München, D und wurde durch das „PiCCO“-System der Firma Pulsion Medical Systems, München, D über das Monitoringgerät „Infinity Delta“ Dräger, Lübeck, D dargestellt. Mit dieser Instrumentierung wurde außerdem das Herz-Zeit-Volumen bestimmt. Dieses spielte eine Rolle für die Beurteilung der Herz-Kreislaufsituation bzw. -stabilität des Patienten. Über den oben beschriebenen Zugang in der A. femoralis und den zentralvenösen Zugang wurde zuerst die Kalibrierung des Systems mit der sogenannten Thermodilutionsmethode vorgenommen. Hierbei wurden 10 ml 0,9 %-iges NaCl (4 °C) schnell über den ZVK in eine herznahe Vene gegeben, durchflossen das rechte Herz, den Lungenkreislauf, das linke Herz und wurden dann beim Durchfließen des Körperkreislaufes von der Messsonde in der A. femoralis detektiert. Daraufhin war die kontinuierliche Erfassung der Pulskontur durch das „PiCCO“-System möglich, woraus sich fortan

das aktuelle Herz-Zeit-Volumen bestimmen ließ. Die Berechnung des Herz-Zeit-Volumens erfolgt mit dem modifizierten Stewart-Hamilton-Algorithmus, welcher auf die durch den „PiCCO“-Katheter aufgezeichnete Fläche unter der Kurve der Thermodilution angewendet wird. Diese Fläche ist umgekehrt proportional zum ermittelten Herz-Zeit-Volumen.

Die Formel ist folgende:

$$HZV_{TDa} = ((T_b - T_i) \times V_i \times K) / (\int \Delta T_b \times dt)$$

T_b = Bluttemperatur

T_i = Injektattemperatur

V_i = Injektatvolumen

$\int \Delta T_b \times dt$ = Fläche unter der Thermodilutionskurve

K = Korrekturfaktor, aus spezifischem Gewicht und spezifischer Wärmekapazität von Blut und Injektat

(DITTMANN 2006)

Um akkurate Messergebnisse zu erhalten, musste die Kalibrierung mit der Thermodilutionsmethode während des Experiments wiederholt durchgeführt werden.

3.2.3 Zentraler Venendruck

Der zentrale Venendruck ist ein Parameter, der Hinweise zum intravasalen Volumen gibt (welches, wie oben beschrieben, besonders wichtig für die Einstellung des Blutflusses an der HLM ist). Im Falle eines Absinkens konnte durch die Gabe von Infusionen gegenreguliert werden. Bei diesem Versuch wurde der zentrale Venendruck durch einen „viellumigen Polyurethan-Verweilkatheter“ der Firma Arrow, Reading, PA, USA in der V. jugularis bestimmt. Die Zielgröße des zentralen Venendruckes betrug bei den Ferkeln 7 bis 9 mmHg.

3.2.4 Sauerstoffsättigung

Durch ein an der Zunge befestigtes Pulsoximeter konnte die Sauerstoffsättigung des Blutes ermittelt werden, welche optimalerweise nicht längerfristig unter 98 % liegen sollte, um keine Schädigung der Niere und anderer Organe durch eine Minderversorgung mit Sauerstoff zu verursachen.

Dieser Parameter wurde, ebenso wie der zentrale Venendruck, kontinuierlich durch das Monitoringgerät „Infinity Delta“ Dräger, Lübeck, D dargestellt.

3.2.5 Arterielle Blutgasmessung

In halbstündigem Abstand wurden während des gesamten Versuches Blutgasanalysen mit dem Gerät „ABL 725“ der Firma Radiometer Medical ApS, Bronshøj, DK aus 1 ml Vollblut aus der A. femoralis durchgeführt. Dabei wurden die Parameter in ihrer Gesamtheit zur Einschätzung der intraoperativen Situation des Ferkels verwendet und gaben Anhaltspunkte für nötige medikamentöse Interventionen. Die Niere betreffend fanden die vier folgenden Parameter besondere Beachtung.

3.2.5.1 pH-Wert und Basenüberschuss

Der pH-Wert und seine Regulationsmechanismen, hier insbesondere der Basenüberschuss, waren wichtige Parameter zur Einschätzung der metabolischen Situation der Ferkel während und nach der HLM-Zeit. Die Frage war nicht nur, ob es zu azidotischen oder alkalischen Stoffwechsellagen kam, sondern auch, in welchem Maße diese kompensiert werden mussten bzw. konnten. Während des Versuches wurde ein physiologischer pH-Wert angestrebt, welcher beim Ferkel bei 7,35 bis 7,45 liegt, damit eine azidotische oder eine alkalische Stoffwechsellage nicht die Versuchsergebnisse beeinflussen könnte.

3.2.5.2 Elektrolyte

Die von dem Blutgasanalysen (BGA)-Messgerät dargestellten Elektrolyte waren Natrium, Kalium, Calcium und Chlorid. Deren Filtration und Resorption werden durch die Niere gesteuert. Das Ziel war, die Elektrolyte im physiologischen Rahmen zu halten, um Beeinflussungen der Ergebnisse durch Elektrolytverschiebungen zu vermeiden.

Die physiologischen Werte des Ferkels sind folgende:

Natrium: 130-170 mmol/l

Kalium: 4,5-6,5 mmol/l

Calcium: 2,5-3,3 mmol/l

Chlorid: 100-110 mmol/l

3.2.5.3 Hämatokrit

Durch die Thorakotomie, die operative Vorbereitung auf die HLM – hier insbesondere die Kanülierung von rechtem Herzohr und Aortenbogen – und auch durch die HLM an sich, welche das Blut durch den Oberflächenkontakt mit Schlauchsystemen und Filtern schädigt, war eine regelmäßige Überwachung des Hämatokrits der Ferkel unerlässlich. Um die Funktionsfähigkeit des Körpers nach Entwöhnung von der HLM zu gewährleisten, war der Richtwert des Hämatokrit zu diesem Zeitpunkt 11 bis 15 % oder mehr (nach HIEBL et al. 2010).

3.2.5.4 Laktat

Laktate sind die Salze und Ester der 2-Hydroxypropansäure, also Milchsäure. Im menschlichen und tierischen Körper entsteht Laktat durch anaerobe Glykolyse. Dieser biochemische Vorgang stellt für den Körper eine Ausweichmöglichkeit der ATP-Produktion dar, wenn zu wenig Sauerstoff vorhanden ist. Anstatt des Citratzyklus und anschließender Atmungskette wird nach der Glykolyse die Substratkettenphosphorylierung eingeleitet.

In der Intensivmedizin ist ein erhöhter Laktatwert unter anderem ein Marker für Gewebshypoxien. Bei inadäquater Gewebserfusion und eine dadurch entstehende Ischämie steigt das Laktat im Blut. Daraus kann zwar nicht auf einen bleibenden Zellschaden, wohl aber auf eine zeitweilige Minderperfusion der Zelle geschlossen werden.

In diesem Versuch wurde der Laktatwert der Ferkel regelmäßig während des Versuches durch die Durchführung von arteriellen Blutgasanalysen bestimmt.

3.2.6 Beatmungsparameter

An drei Zeitpunkten während des Versuches, nämlich am Anfang des Versuches nach dem Platzieren aller Zugänge und Messsonden (zum Zeitpunkt 0 Minuten), nach der 90-minütigen OP- bzw. HLM-Zeit (zum Zeitpunkt 120 Minuten) und ein drittes Mal am Ende des Versuches, nach der 30-minütigen Reperfusion- und der daran anschließenden 90-minütigen Rekonvaleszenzzeit (zum Zeitpunkt 240 Minuten), wurden folgende Beatmungsparameter aufgezeichnet: der positive endexpiratorische Druck (PEEP), das Atemminutenvolumen (AMV), das Tidalvolumen (V_t) und die Atemfrequenz.

3.3 Postoperative Untersuchungen

3.3.1 Probenentnahme und -aufbearbeitung

Zu Beginn des Versuches, sobald alle Zugänge platziert waren, wurden zwei Blutproben in jeweils ein EDTA- und ein Serumröhrchen entnommen, welche zur Bestimmung von geforderten Laborwerten (vgl. 3.3.4) zum MVZ Labor Dr. Reising-Ackermann und Kollegen, Leipzig, D gesandt wurden. Mit einer Biopsiezange wurden über einen lateralen Zugang durch die Bauchdecke auf der linken Seite zwei Nierenproben von der konvexen Seite der Niere gegenüber der Ansatzstelle des Ureters entnommen, und in 4 %-igem Formalin nach Lillie fixiert. Danach erst begann die chirurgische Vorbereitung des Ferkels für den Anschluss an die HLM.

Nach der 90-minütigen OP- bzw. HLM-Zeit wurden zwei weitere EDTA- und Serumröhrchen mit Blut befüllt. Dieser Vorgang wurde ein drittes Mal am Ende des Versuches, nach der 30-minütigen Reperfusion- und der daran anschließenden 90-minütigen Rekonvaleszenzzeit, wiederholt. Danach wurde das Ferkel in tiefer Narkose durch Entbluten euthanasiert, und die linke Niere wurde entnommen. Aus dem Zentrum der Niere, im konvexen und konkaven Bereich gegenüber dem Ureter, wurden mehrere Gewebeproben entnommen, welche in 4 %-igem Formalin nach Lillie fixiert wurden. Dabei wurde der Bereich, aus dem zu Beginn des Versuches die Biopsien entnommen worden waren, ausgespart. Außerdem wurde eine weitere Gewebeprobe aus der Niere entnommen und direkt nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefrostet, und danach bis zur weiteren Verwendung – der Durchführung einer Chromatographie zur Bestimmung von Adenosintri-, Adenosindi- und Adenosinmonophosphat (ATP, ADP, AMP), Adenosin und Hypoxanthin (vgl. 3.3.5) – im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Histologie

Die entnommenen Proben wurden durchschnittlich fünf Tage in 4 %-igem Formalin belassen, um dann in Paraffin eingebettet (Einbettautomat „Tissue Tek VIP“ Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, D) zu werden. Danach wurden sie mit dem Schlittenmikrotom „HM 400“ der Firma Microm Micromarketing-Systeme und Consult GmbH, Neuss, D in 5 bzw. 2 µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger verbracht.

3.3.2.1 HE-Färbung

Zuerst wurde eine Routineübersichtsfärbung mit Hämatoxylin-Eosin an 5 µm dicken Parafinschnitten vorgenommen, um einen histomorphologischen Überblick zu gewinnen und etwaige Läsionen beurteilen zu können. Diese Methode funktioniert folgendermaßen: Das Hämatoxylin ist ein natürlicher, basischer Farbstoff, der sich an die sauren Strukturen der DNS bindet – somit färbt es die Kerne des histologischen Präparates an, und zwar in den Farbnuancen violett, dunkelblau oder blauschwarz. Der andere Farbstoff hingegen, das synthetisch hergestellte Eosin, bindet an die positiv geladenen Strukturen im Gewebe, beispielsweise Proteine im Zytoplasma der Zellen – welche sich daraufhin rosa bzw. rot anfärben. Das zu färbende Präparat bleibt nur so lange in der mit Hämalaun gefüllten Küvette, bis der Färbungsgrad der Kerne ausreicht (progressive Färbung), wogegen es mit dem Eosin durchtränkt wird (regressive Färbung) (Protokoll siehe Tabelle 39 im Anhang).

Bei dieser Färbung wurden die zu Beginn des Versuches entnommenen Biopsien ebenso wie die post mortem entnommenen Proben angefärbt und miteinander verglichen.

3.3.2.2 Immunhistochemie

3.3.2.2.1 HIF-1-alpha-TSA-Färbung

Der Hypoxie-induzierte Faktor (HIF) 1-alpha ist ein intrazellulärer Transkriptionsfaktor, bestehend aus einer labilen alpha- und einer stabilen beta-Untereinheit, welcher eine große Rolle bei der Sauerstoffversorgung der Zelle spielt. In physiologisch arbeitenden Zellen wird HIF-1-alpha immer in geringer Menge exprimiert und auch fortwährend abgebaut. Der Abbau ist nur möglich nach vorangegangener Hydroxylierung der labilen alpha-Untereinheit, und zwar durch die Prolyl-Hydroxylase. Für diese Hydroxylierung jedoch muss Sauerstoff in der Zelle vorhanden sein (LEE et al. 2004). Ist dies nicht der Fall, wie zum Beispiel bei einer Zellhypoxie oder -ischämie, so akkumuliert HIF-1-alpha in der Zelle, und tritt vom Zytoplasma in den Zellkern über, was als HIF-1-alpha Translokation bezeichnet wird. Das führt letztlich zur Induktion von z. B. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor).

Diesen Vorgang macht sich die HIF-1-alpha-TSA-Färbung zu Nutzen.

Die Antikörperdetektion bei dieser Färbung geschieht auf indirektem Weg. Das bedeutet, dass der primäre Antikörper mit dem zu untersuchenden Gewebe reagiert, wogegen der sekundäre Antikörper mit dem Immunglobulin G der Spezies reagiert, aus der der primäre

Antikörper gewonnen wurde. Somit bindet der sekundäre an den primären Antikörper. Der sekundäre Antikörper ist, im Gegensatz zum primären, markiert, wodurch es möglich ist, den sekundären Antikörper durch eine weitere Reaktion farblich nachzuweisen.

Zuerst wurde das 2 µm dicke Paraffinpräparat mit dem primären Antikörper Rabbit-Anti-HIF-1-alpha (H-206) sc-10790 Lot-Nr. A2706 der Firma Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA in der Verdünnung 1:100 beschichtet. Am folgenden Tag wurde der sekundäre Antikörper Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L) Horseradish Peroxidase conjugate T-20921 Lot-Nr. 790477 aus dem TSA-Kit Nr. 11 T-20921 der Firma Invitrogen, Eugene, OR, USA in der Verdünnung 1:100 aufgetragen und zwei Stunden belassen. Nach einigen Waschschrritten wurde nun das Tyramid, welches der Namensgeber dieser Färbung ist (TSA bedeutet Tyramide Signal Amplification), in einer Amplifikations- und Wasserstoffperoxidlösung aufgetragen. In Anwesenheit des Wasserstoffperoxids wird das Tyramid durch das an den sekundären Antikörper gebundene Horseradish Peroxidase (HRP) aktiviert. Diese Reaktion vervielfacht und verstärkt das Antikörper-Signal und erleichtert die Antikörperdetektion.

In einem späteren Schritt wurde Streptavidin aufgetragen, an welches ebenso HRP gebunden ist. Dieses HRP ermöglicht dem zuletzt aufgetragenen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) den in den Zellen vorhandenen HIF-1-alpha rosa bzw. rot anzufärben (Protokoll siehe Tabelle 40 im Anhang).

Wie eingangs erwähnt, findet sich im Zytosol der Zellen unter physiologischen Bedingungen immer HIF-1-alpha. Daher färbt sich das Zytosol rosa oder rötlich an. Eine pathologische Akkumulation von HIF-1-alpha in der Zelle aufgrund einer Abbauehemmung, welche wiederum ursächlich auf eine Gewebsischämie zurückzuführen ist, ist erst bei Kernpositivität bewiesen. Das bedeutet, dass sich nicht nur das Zytosol, sondern auch der Zellkern rot bzw. dunkelrot (dunkler als das Zytosol) darstellt.

Bei dieser Färbung wurden die post mortem entnommenen Proben verwendet.

3.3.2.2 Nitrotyrosin-AEC-Färbung

Bei dieser Färbung wird die nicht-proteinogene Aminosäure 3-Nitrotyrosin als Biomarker für die Detektion von einer Läsion des Gewebes durch nitrosativen Stress, z. B. durch Nitrosylierung von Tyrosinresten, genutzt (TARPEY und FRIDOVICH 2001). Nitrosativer Stress wird verursacht durch reaktive Stickstoffspezies wie z. B. Peroxynitrit. Peroxynitrit entsteht in der Zelle aus Stickstoffmonoxid und Superoxid, wenn diese beiden zusammen oder in zu hohen Konzentrationen vorkommen, und/oder wenn natürliche Schutzmechanismen des Körpers

wegfallen. Reagiert nun die in den meisten körpereigenen Proteinen natürlich vorkommende Aminosäure Tyrosin mit der hochreaktiven Stickstoffverbindung Peroxinitrit, so entsteht Nitrotyrosin.

Auch bei dieser immunhistochemischen Färbung erfolgt die Erkennung des Antikörpers auf indirektem Wege (vgl. 3.3.2.2.1). Der in diesem Färbeprotokoll verwendete primäre Antikörper Mouse-Anti-3-Nitrotyrosine mAb clone 39B6 der Firma Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, USA mit der Katalognummer MC-374 wurde in der Verdünnung 1:200 auf die 2 µm dicken Paraffinschnitte aufgetragen und über Nacht belassen. Am nächsten Tag wurde der Sekundärantikörper Goat-Anti-Mouse-IgG2alpha-HRP sc-2970, Lot-Nr. D2806 der Firma Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA in der Verdünnung 1:100 aufgetragen. Aufgrund der an diesen zweiten Antikörper gebundenen Horseradish-Peroxidase in Verbindung mit dem am Ende der Färbung aufgetragenen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) bildet sich im positiven Fall eine rosa oder rote Färbung (Protokoll siehe Tabelle 41 im Anhang). Das Auftreten bzw. die Intensität dieser Farbe beweist, dass nitrosativer Stress auf das Gewebe eingewirkt hat.

Bei dieser Färbung wurden die post mortem entnommenen Proben verwendet.

3.3.2.2.3 AIF-TSA-Färbung

Der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) ist ein Protein, welches physiologisch in den Zellen des Körpers in den Mitochondrien vorkommt. Normalerweise befindet es sich im intramembranösen Raum des Mitochondriums, und ist so von den anderen Zellorganellen abgeschirmt. Erleidet das Mitochondrium jedoch eine Schädigung, so tritt der AIF aus dem Mitochondrium aus. Er ist dann in der Lage, einen programmierten Tod der Zelle (die sogenannte Apoptose) zu induzieren, indem er sich aus dem Mitochondrium heraus in das Zytosol und von dort aus weiter in den Zellkern begibt, und dort die Fragmentierung von DNS und die Kondensation von Chromatin verursacht (CANDÈ et al. 2002).

Diese Färbung zeigt also an, ob das betrachtete Organ – oder, genauer gesagt, die Mitochondrien der Zellen – sich in einer potentiell die Apoptose auslösenden Situation befunden hat, bzw. starken negativen Reizen und Schädigungen ausgesetzt war.

Bei der Auswertung dieser Färbung werden die Zellen auf eine mögliche Kernpositivität hin untersucht. Erst wenn AIF aus dem geschädigten Mitochondrium ausgetreten und durch das Zytosol in den Zellkern übergetreten ist – der Kern sich also dunkelrot anfärbt – gilt die Färbung als positiv.

Auch bei dieser immunhistochemischen Färbung erfolgt die Erkennung des Antikörpers auf indirektem Wege (vgl. 3.3.2.2.1). Für diese Färbung wurden 2 µm dicke Paraffinpräparate verwendet. Im ersten Schritt wurde auf diese der primäre Antikörper Rabbit-Anti-AIF (H-300) polyclonal IgG sc-5586 Lot-Nr. J2605 der Firma Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA in der Verdünnung 1:100 aufgetragen und über Nacht belassen. Am folgenden Tag wurde der sekundäre Antikörper Goat-Anti-Rabbit IgG Sigma A9169 Lot-Nr. 022M4810 Horseradish Peroxidase conjugate T-20021 aus dem TSA-Kit Nr. 21 T-20931 der Firma Invitrogen, Eugene, OR, USA in der Verdünnung 1:250 aufgetragen und eine Stunde belassen. Darauf folgten einige Waschschrte. Dann wurde das Tyramid in einer Amplifikations- und Wasserstoffperoxidlösung aufgetragen – ebenso wie bei der HIF-1-alpha-TSA-Färbung (vgl. 3.3.2.2.1). In Anwesenheit des Wasserstoffperoxids findet die Aktivierung des Tyramid durch die an den sekundären Antikörper gebundene Horseradish Peroxidase (HRP) statt. Dadurch wird das Antikörper-Signal vervielfacht und verstärkt, was die Antikörperdetektion erleichtert. Später wurde noch Streptavidin aufgetragen, an das auch wiederum HRP gebunden ist. Am Ende der Färbung wurde 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) aufgetragen, welches – durch das HRP unterstützt – nun die Anfärbung von AIF in den Zellen in einem roten Farbton ermöglicht (Protokoll siehe Tabelle 42 im Anhang).

Eine pathologische Akkumulation von AIF im Zellkern, welche auf eine Schädigung des Mitochondriums zurückzuführen ist, wird bewiesen durch eine rote bzw. dunkelrote Anfärbung des Zellkernes – die sogenannte Kernpositivität.

Bei dieser Färbung wurden die post mortem entnommenen Proben verwendet.

3.3.3 Bildauswertung

Die gefärbten Präparate wurden mit dem Mikroskop „AxioPlan 2“ der Firma Carl Zeiss, Jena, D untersucht. Auf das Mikroskop war eine Kamera („AxioCam MRc5“, Carl Zeiss, Jena, D) montiert, mit welcher Fotos von den Präparaten geschossen werden konnten, welche dann direkt auf den Computer und in das Programm „AxioVision Release 4.8.2“, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, D übertragen wurden, wo sie weiter bearbeitet, gespeichert und geblindet ausgewertet werden konnten. Von jedem Präparat wurden fünf Übersichtsbilder in der 100x Vergrößerung aufgenommen, in welche jeweils fünf (zur Begutachtung von Tubuli und Sammelrohren) bzw. zehn Mal (zur Begutachtung von Glomeruli) mit einer 400x Vergrößerung hineingezoomt wurde, um die Strukturen besser sichtbar zu machen. In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung lag das Augenmerk dabei auf Glomeruli und proximalen Tubuli; in der

Nitrotyrosin-AEC-Färbung wurden distale Tubuli und Sammelrohre untersucht und in der AIF-TSA-Färbung Glomeruli, proximale und distale Tubuli und Sammelrohre. In der HIF-1-alpha-Färbung wurden zunächst vier histologische Präparate von jeweils zwei Kontroll- und zwei HLM-Tieren in Bezug auf Glomeruli, proximale und distale Tubuli und Sammelrohre ausgewertet. Dabei stellte sich heraus, dass sich nur in den proximalen Tubuli signifikante Unterschiede bei den beiden Gruppen erkennen ließen. Aufgrund dessen wurden bei allen anderen HIF-1-alpha-TSA gefärbten Präparaten im folgenden Verlauf nur die proximalen Tubuli ausgewertet.

3.3.4 Blutproben

Die Blutproben wurden im MVZ Labor Dr. Reising-Ackermann und Kollegen auf folgende Werte hin untersucht: Blutchemie (Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Serumkreatinin und -harnstoff), Eiweißelektrophorese (Gesamteiweiß, Albumin, alpha-1 und alpha-2, beta- und gamma-Globuline, Immunglobuline G, A und M und das C-reaktive Protein; mit Ausnahme des Gesamteiweißes konnten diese Werte aus technischen Gründen nicht bei allen Ferkeln bestimmt werden), großes Blutbild und Thrombozyten mit mikroskopischer Differenzierung (Leuko- und Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Mean Corpuscular Volume (MCV), Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH), Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration (MCHC), Thromb- und Metamyelozyten, stabförmige und segmentkernige Neutrophile, Eosino- und Basophile, Lymphozyten und lymphozytäre Reizformen, Monozyten).

In dieser Dissertation findet sich eine Auswertung der für die Bewertung des Zustandes der Niere und auch des ganzen Körpers relevanten Werte Serumkreatinin, -harnstoff und Gesamteiweiß und – im Anhang – Leuko- und Lymphozyten. Besonderes Augenmerk wurde hier auf die nierenspezifischen Werte Kreatinin und Harnstoff gelegt. Des Weiteren waren die Ergebnisse des Gesamteiweißes von Bedeutung, welche Hinweise darauf geben konnten, ob vermehrt Protein über (möglicherweise durch die HLM) geschädigte Membranen bzw. Körperbarrieren verloren wurde. Aus dem Blutbild wurden nur die Leukozyten und die Lymphozyten ausgewertet, welche auf eine inflammatorische Reaktion hinweisen können.

All diese Werte wurden unter Einbeziehung des zum jeweiligen Zeitpunkt vorhandenen Hämatokrit korrigiert, da durch die Infusionen immer ein gewisser Grad einer Hämodilution vorlag, welche berücksichtigt werden musste.

3.3.5 Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Die Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) ist definitionsgemäß eine Methode aus der Chemie, um Substanzgemische in ihre Bestandteile aufzutrennen, wobei eine mobile und eine stationäre Phase verwendet werden. Diese Bestandteile können im Weiteren analysiert werden.

In diesem Versuch wurde der jeweilige Gehalt der energiereichen Phosphate Adenosintri-, Adenosindi- und Adenosinmonophosphat (ATP, ADP, AMP) und von Adenosin und Hypoxanthin mittels Ionenpaarchromatographie mit einer Reversed Phase-Säule bestimmt (Verfahren nach VOLONTÉ et al. 2004).

Die dafür verwendeten Proben waren aus dem Zentrum der Niere, im konvexen und konkaven Bereich gegenüber dem Ureter entnommen, und dann unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefrostet worden, um danach bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert zu werden.

Die verwendete HPLC war eine aus mehreren Modulen bestehende HPLC-Anlage der Firma Knauer GmbH, Berlin, D mit den folgenden Komponenten: Pumpe, Probeninjektor, Trennsäule (stationäre Phase), mobiles Phasensystem und UV-Detektor. Durch den vorgekühlten Probeninjektor wurde das Filtrat in die mobile Phase gegeben und dann durch die Pumpe in die stationäre Phase befördert. Nach dem Durchlauf durch die stationäre Phase wurde das Ergebnis der Chromatographie von einem UV-Detektor gemessen.

Als Trennsäule stand eine C18-(Octadecyl-) Säule $240 * 4,5\ \mu\text{m}$ („LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18“, Merck KG Darmstadt, D) zur Verfügung. Das bedeutet, dass an das Silicagel, das gewöhnlich die stationäre Phase darstellt, 18 Methylengruppen kovalent gebunden werden, wodurch die stationäre Phase apolar wird. Da ATP, ADP, AMP, Adenosin und Hypoxanthin jedoch polar sind, musste der mobilen Phase eine Substanz zugesetzt werden, die die Verbindung zwischen den jeweiligen Bestandteilen und der apolaren Säule herstellt. Für diese Aufgabe wurde Tetrabutylammoniumhydrogensulfat $2,3\ \text{mmol/l}$ („Tetrabutylammoniumhydrogensulfat 97 %“, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D) verwendet. Die weiteren Bestandteile der mobilen Phase waren Kaliumdihydrogenphosphat $215\ \text{mmol/l}$ („Kaliumdihydrogenphosphat“, Merck KG Darmstadt, D), Acetonitril $4\ \%$ („Acetonitril“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D) und Kaliumhydroxid $1\ \text{M}$, $0,4\ \%$ („Kaliumhydroxid“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D).

Vor Durchführung der RP-HPLC wurden die Gewichte der jeweiligen Proben genau ermittelt. Es wurde auf Eis gearbeitet. Das Gewebe wurde zuerst in $5\ \text{ml}$ $0,4\ \text{M}$ Perchlorsäure

(„Perchlorsäure Supra-Qualität ROTIPURAN Supra 70 %“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D) mit dem Homogenisator „T25 digital ULTRA-TURRAX“ der Firma IKA GmbH und Co. KG, Staufen, D über zehn Minuten homogenisiert, dann wurden 0,8 ml 0,2 M Kaliumhydroxid („Kaliumhydroxid“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D) zugegeben um eine Ausfällung der Proteine zu verursachen, und alles wurde über zehn Minuten bei 4 °C und 3000x g mit der „Biofuge Stratos“ der Heraeus Holding GmbH, Hanau, D zentrifugiert. Die hier verwendeten Lösungen wurden immer mit hochaufgereinigtem Wasser („Wasser ROTISOLV HPLC Gradient Grade“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D) angesetzt. Der Überstand wurde danach mit einem Spritzenvorsatzfilter filtriert, und jeweils 20 µl des Filtrates wurde dann zur Durchführung der RP-HPLC verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, und die Temperatur lag bei 25 °C. Die UV-Detektion erfolgte bei 254 nm (siehe Tabelle 9, Zubehör für die RP-HPLC).

Die Retentionszeiten, also die Zeiten, bei denen die jeweiligen maximalen Spitzenwerte auftraten, waren 2,9 Minuten für Hypoxanthin, 5,03 Minuten für AMP, 6,55 Minuten für ADP, 6,57 Minuten für Adenosin und 9,85 Minuten für ATP. Jede Probe durchlief die RP-HPLC drei Mal, sodass die jeweilige Konzentration aus dem Mittelwert der Ergebnisse dieser drei Durchläufe ermittelt werden konnte.

Für die Kalibrierung liefen neben den tatsächlichen Proben auch immer drei Standards mit, die unterschiedliche Probenkonzentrationen enthielten: AMP: 6, 60 und 180 µg/ml; ADP: 0,5, 5 und 15 µg/ml; ATP: 2, 20 und 60 µg/ml; Adenosin: 0,4, 4 und 12 µg/ml und Hypoxanthin: 0,9, 9 und 27 µg/ml. Anhand dieser Standards konnte die lineare Regression (R^2 : 0,96 bis 1,0) ermittelt werden, welche die Grundlage für die spätere Berechnung der jeweiligen Quantität des gesuchten Bestandteils darstellt.

Tabelle 9: Verwendetes Zubehör für die RP-HPLC

Zubehör	Name und Firma	Beschreibung
RP-HPLC	HPLC-Anlage, Knauer GmbH, Berlin, D	Ionenaustauschchromatographie mit RP-Säule
Stationäre Phase	„LiChroCART 250-4 LiChrospher 100 RP-18“, Merck KG Darmstadt, D	RP-Säule
Acetonitril	„Acetonitril“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	Bestandteil der mobilen Phase, 4 %
Kaliumdihydrogenphosphat	„Kaliumdihydrogenphosphat“, Merck KG Darmstadt, D	Bestandteil der mobilen Phase, 215 mmol/l
Kaliumhydroxid	„Kaliumhydroxid“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	Bestandteil der mobilen Phase, 0,4 %
Tetrabutylammoniumhydrogensulfat	„Tetrabutylammoniumhydrogensulfat 97 %“, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D	Bestandteil der mobilen Phase, 23 mmol/l
Perchlorsäure	„Perchlorsäure Supra-Qualität ROTIPURAN Supra 70 %“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	Homogenisierung der Probe
Hochleistungsdispersierer	„T25 digital ULTRA-TURRAX“, IKA GmbH und Co. KG, Staufen, D	Homogenisierung der Proben
Kaliumhydroxid	„Kaliumhydroxid“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	Ausfällung
Wasser	„Wasser ROTISOLV HPLC Gradient Grade“, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D	Hochaufgereinigtes Wasser
Zentrifuge	„Biofuge Stratos“, Heraeus Holding GmbH, Hanau, D	Zentrifugiert gekühlt auf 4 °C über zehn Minuten bei 3000x g

3.4 Statistik

Die Ergebnisse aller erfassten Daten wurden als Mittelwert und dessen Standardfehler (MW mit SEM) von n Experimenten angegeben. Um festzustellen, ob Unterschiede der Werte signifikant waren, wurde der Mann-U-Whitney-Test für ungepaarte und der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für gepaarte Beobachtungen durchgeführt. Dabei wurde als Signifikanzniveau ein Wert von $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsdurchführung

Die Versuche wurden, wie im Abschnitt „Tiere, Material und Methoden“ beschrieben, durchgeführt. Die dort aufgeführten Proben bzw. Parameter konnten zu den vorgesehenen Zeiten entnommen bzw. bestimmt werden.

**Tabelle 10: Allgemeine Angaben zu den drei Ferkelgruppen
(Mittelwerte und ihre Standardfehler)**

Gruppe	Gewicht in kg	Länge in cm	Anfangs- Hämatokrit in %	Gesamt-OP Zeit in Stunden
Kontrolle	12 ± 1,23	76,43 ± 3,26	21 ± 2	5 ± 0,22
HLM	11,75 ± 0,92	71 ± 2,65	25 ± 1	5,5 ± 0,3
EGCG	11,17 ± 0,06	75,33 ± 1,63	21 ± 3	5,08 ± 0,35

4.2 Ergebnisse der postoperativen Untersuchungen

4.2.1 Histologie: HE-Färbung

Mit dieser histologischen Übersichtsfärbung war es möglich, einen histomorphologischen Überblick über das Präparat zu gewinnen. Verschiedene strukturelle Veränderungen in der Niere wurden beurteilt, welche einen Hinweis auf eine Schädigung dieses Organs gaben.

Bei der Auswertung wurde auf zwei Strukturen in der Niere fokussiert: das Glomerulum und den proximalen Tubulus. Es wurden jeweils die zu Anfang des Versuches entnommenen Biopsien angefärbt und mit den post mortem gewonnenen, angefärbten Proben verglichen. Es wurde so verfahren, um nicht nur einen Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen ziehen, sondern, um auch einen Vorher-Nachher-Vergleich bei den individuellen Tieren durchführen zu können.

4.2.1.1 Das Glomerulum, HE-Färbung

In den Glomeruli wurden die Gesamtfläche eines Glomerulums, die Gesamtfläche des Spaltes zwischen Bowmanscher Kapsel und dem Kapillarknäuel und die Breite an der breitesten Stelle ebendieses Spaltes gemessen (siehe Abbildung 4).

Die Gesamtfläche der Glomeruli vergrößerte sich in allen drei Gruppen im Vergleich zur Gesamtfläche in den Biopsien vom Anfang der Versuche signifikant ($p < 0,05$). Allerdings unterschied sich der post-OP-Wert der EGCG-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) von den post-OP-Werten der anderen beiden Gruppen. Diese Veränderungen sollten mit Vorsicht interpretiert werden, da die Biopsien aufgrund der Entnahmetechnik stark gequetscht wurden und daher möglicherweise keine verlässlichen Aussagen bezüglich der Größenveränderung der Gesamtfläche der Glomeruli getroffen werden können (siehe Abb. 1; Tabelle 29 im Anhang).

Die Größe der Spaltfläche stieg nur in der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) an. Die Spaltfläche in der Kontrollgruppe vergrößerte sich nicht. In der EGCG-Gruppe konnte eine Vergrößerung der Fläche durch das EGCG verhindert werden. Außerdem war der post-OP-Wert der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) größer als die Werte der Kontroll- und der EGCG-Gruppe. Dagegen gab es keinen Unterschied zwischen den post-OP-Werten der Kontroll- und der EGCG-Gruppe (siehe Abb. 2; Tabelle 30 im Anhang).

Ebenso wie die Spaltfläche verhielt sich die Spaltbreite: Nur in der HLM-Gruppe stieg ihre Größe signifikant ($p < 0,05$) an. Der Wert der Kontrollgruppe stieg nicht an. In der EGCG-Gruppe konnte einer signifikanten ($p < 0,05$) Verbreiterung des Spaltes durch das EGCG entgegengewirkt werden. Außerdem unterschieden sich auch hier die post-OP-Werte der Kontroll- und der EGCG-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) von dem der HLM-Gruppe – die Werte der Kontroll- und der EGCG-Gruppe unterschieden sich nicht voneinander, wogegen der Wert der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) größer als die beiden anderen war (siehe Abb. 3; Tabelle 31 im Anhang).

HE-Färbung:
Gesamtfläche der Glomeruli

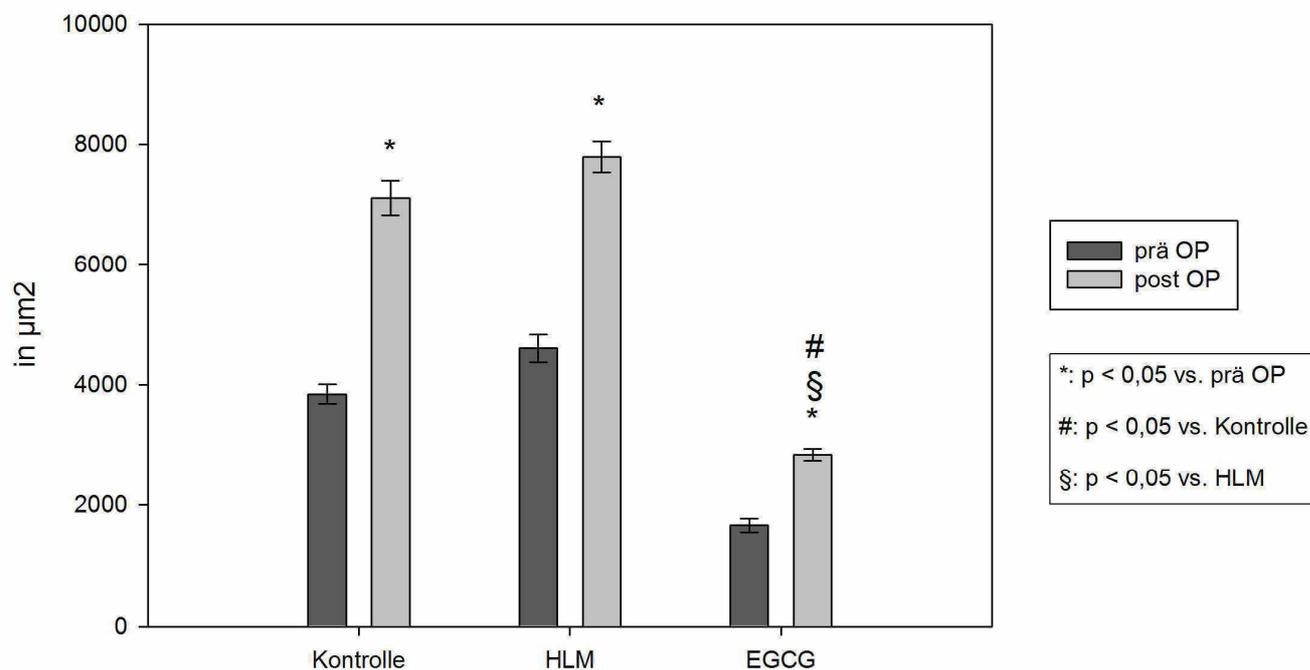


Abbildung 1: Gesamtfläche der Glomeruli, HE-Färbung

HE-Färbung:
Spaltfläche in den Glomeruli

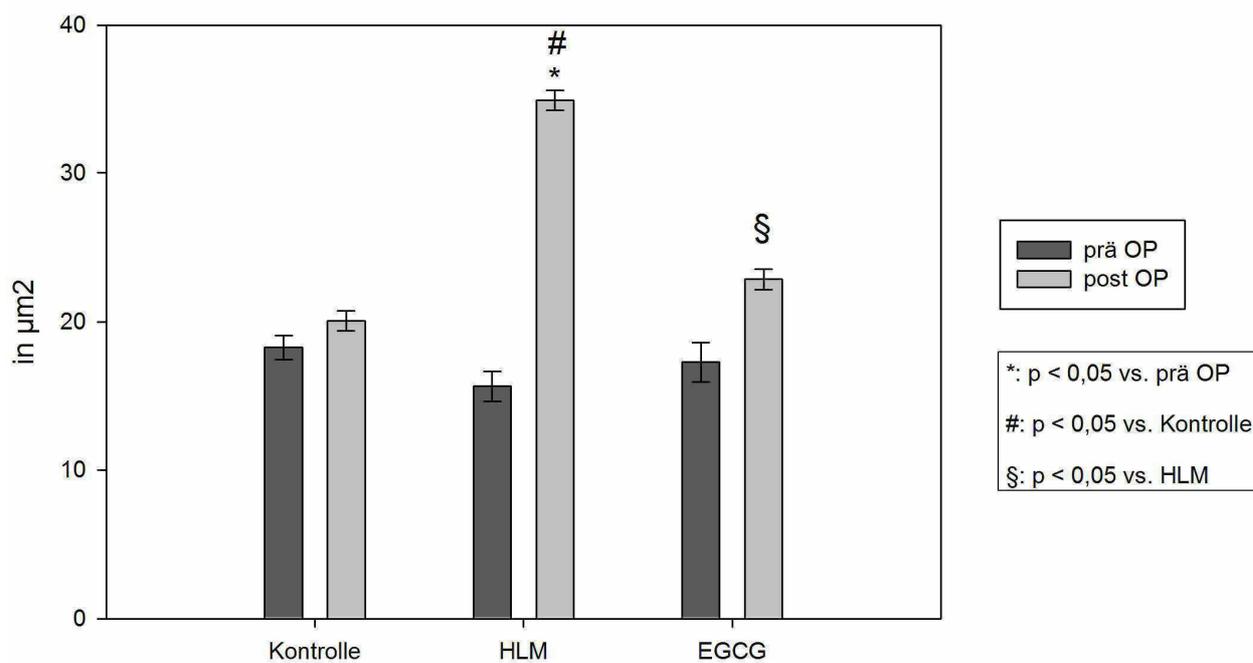


Abbildung 2: Spaltfläche in den Glomeruli, HE-Färbung

HE-Färbung:
Spaltbreite in den Glomeruli

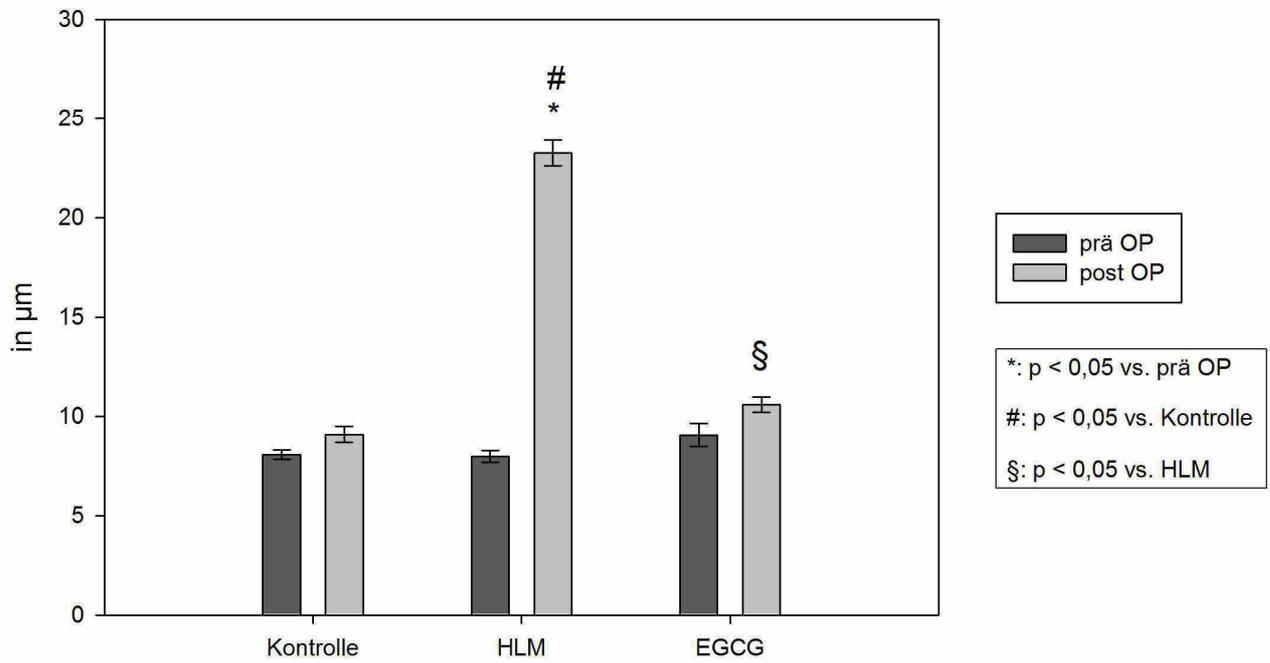


Abbildung 3: Spaltbreite in den Glomeruli, HE-Färbung

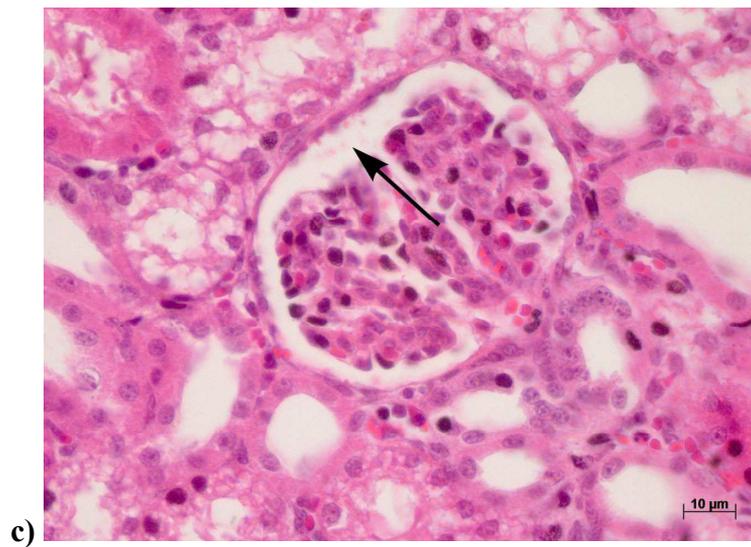
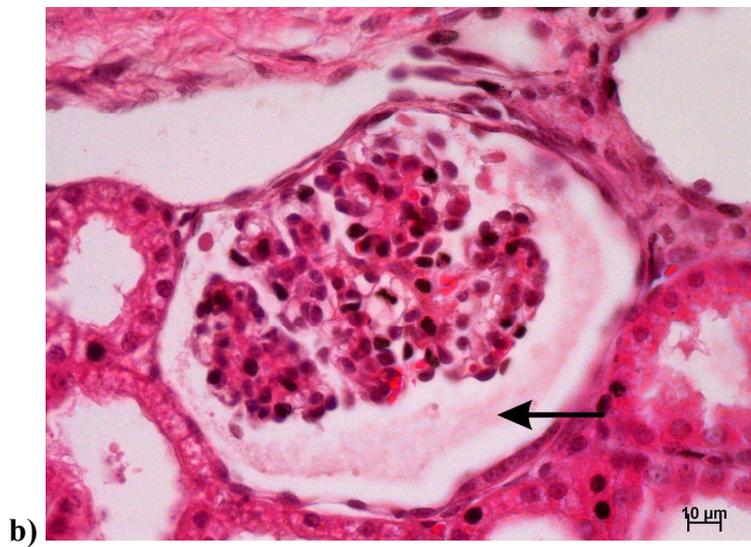
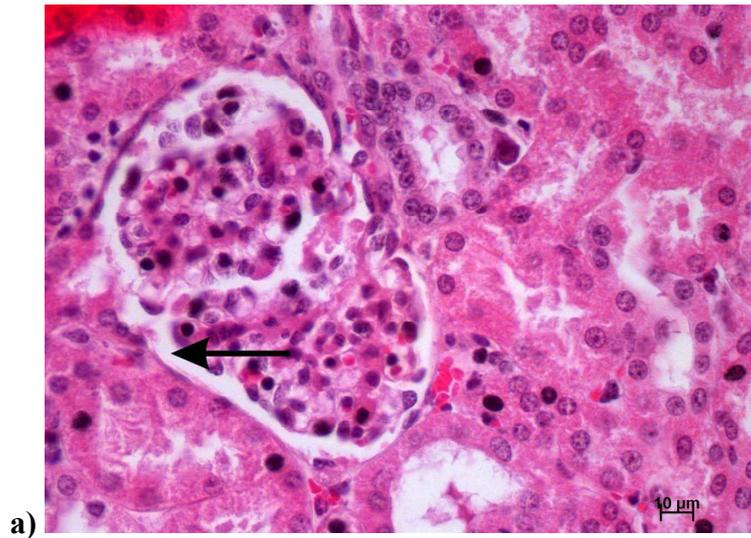


Abbildung 4: Glomeruli, HE-Färbung

a) Kontrolle und c) EGCG: Glomerulum (Pfeil zeigt den Spalt)

**b) HLM: Glomerulum (Pfeil zeigt den Spalt), deutlich erweiterter Spaltbereich,
Debris im Spalt erkennbar**

4.2.1.2 Der proximale Tubulus, HE-Färbung

In den proximalen Tubuli wurden die Epithelhöhe und das prozentuale Vorkommen von pyknotischen Veränderungen an den Zellkernen und von vakuolisierten Zellen ausgewertet (bei den beiden letztgenannten Strukturen wurde der prozentuale Anteil pyknotischer Zellkerne von deren Gesamtzahl bzw. der prozentuale Anteil von proximalen Tubuli mit vakuolisierten Zellen von deren Gesamtzahl angegeben) (siehe Abb. 8). Außerdem wurden die Lumina der Tubuli auf das Vorhandensein von Debris untersucht (siehe Abb. 9).

Die Epithelhöhen der Kontroll- und der HLM-Gruppe stiegen signifikant ($p < 0,05$) an, die der EGCG-Gruppe jedoch nicht. Des Weiteren unterschied sich der post-OP-Wert der EGCG-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) von den entsprechenden Werten der anderen zwei Gruppen. Diese Ergebnisse bezüglich der Unterschiede der Epithelhöhen erscheinen fragwürdig. Sie sollten kritisch betrachtet werden. Aufgrund der Entnahmetechnik der Biopsien wurden diese stark gequetscht, und es ist möglicherweise nicht immer angebracht, die Werte der Biopsien mit denen der post mortem entnommenen Proben – bei denen eine wesentlich schonendere Entnahme möglich war – zu vergleichen (siehe Abb. 5; Tabelle 32 im Anhang).

Die Prozentzahl der pyknotischen Zellkerne stieg bei allen drei Gruppen signifikant ($p < 0,05$) an. Dies war bei der HLM-Gruppe am stärksten und bei der Kontrollgruppe am schwächsten ausgeprägt; die HLM-Gruppe zeigte signifikant ($p < 0,05$) mehr pyknotische Kerne als die Kontrollgruppe. In der EGCG-Gruppe war erkennbar, dass EGCG den Kernpyknosen zwar leicht, aber nicht signifikant ($p < 0,05$), entgegenwirken konnte – der EGCG Wert unterschied sich weder vom Wert der Kontroll- noch von dem der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) (siehe Abb. 6; Tabelle 33 im Anhang).

Die Prozentzahl proximaler Tubuli, welche vakuolisierte Zellen beinhalteten, erhöhte sich nur in der HLM- und in der EGCG-Gruppe signifikant ($p < 0,05$), in der Kontrollgruppe war keine Veränderung zu bemerken – weder im Vergleich mit den Biopsien aus der Kontrollgruppe, noch im Vergleich mit den post-mortem-Werten der anderen Gruppen. In der EGCG-Gruppe waren bemerkenswerterweise signifikant ($p < 0,05$) weniger proximale Tubuli mit vakuolisierten Zellen sichtbar als in der HLM-Gruppe – EGCG konnte die Zahl jener pathologisch veränderten proximalen Tubuli vermindern (siehe Abb. 7; Tabelle 34 im Anhang).

Debris, ein weiteres Zeichen für pathologische Veränderungen, war in verschiedenen Tubuluslumina immer wieder auffindbar, allerdings ohne dass sich signifikante Unterschiede hätten darstellen lassen können.

HE-Färbung:
Epithelhöhe der proximalen Tubuli

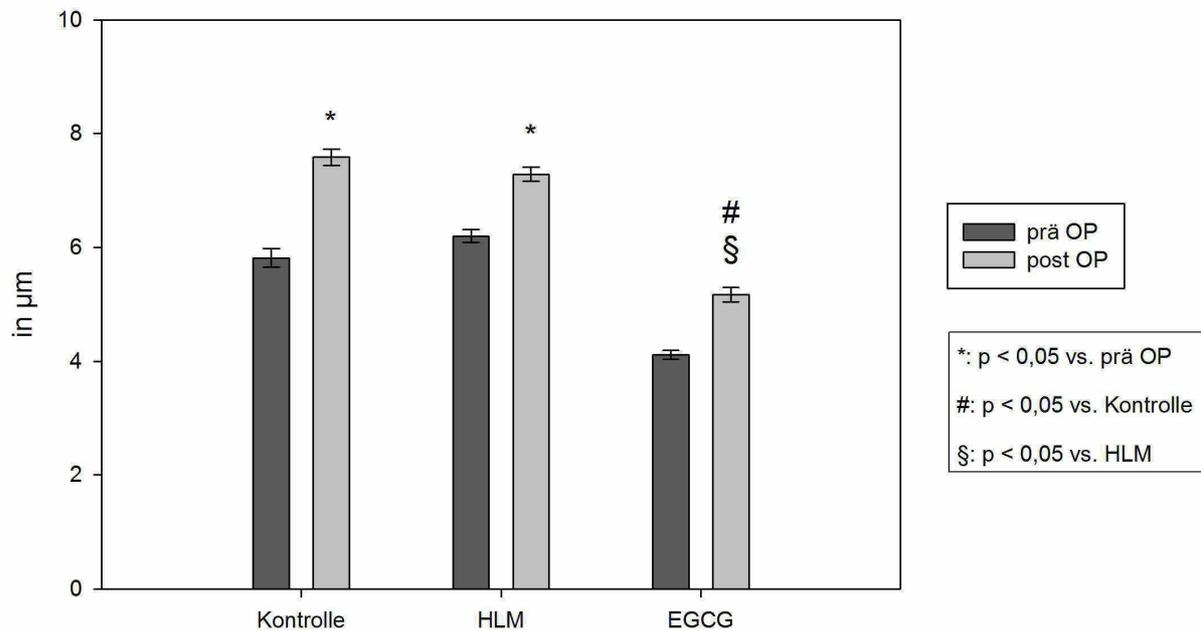


Abbildung 5: Epithelhöhe der proximalen Tubuli, HE-Färbung

HE-Färbung:
Kernpyknosen in den proximalen Tubuli

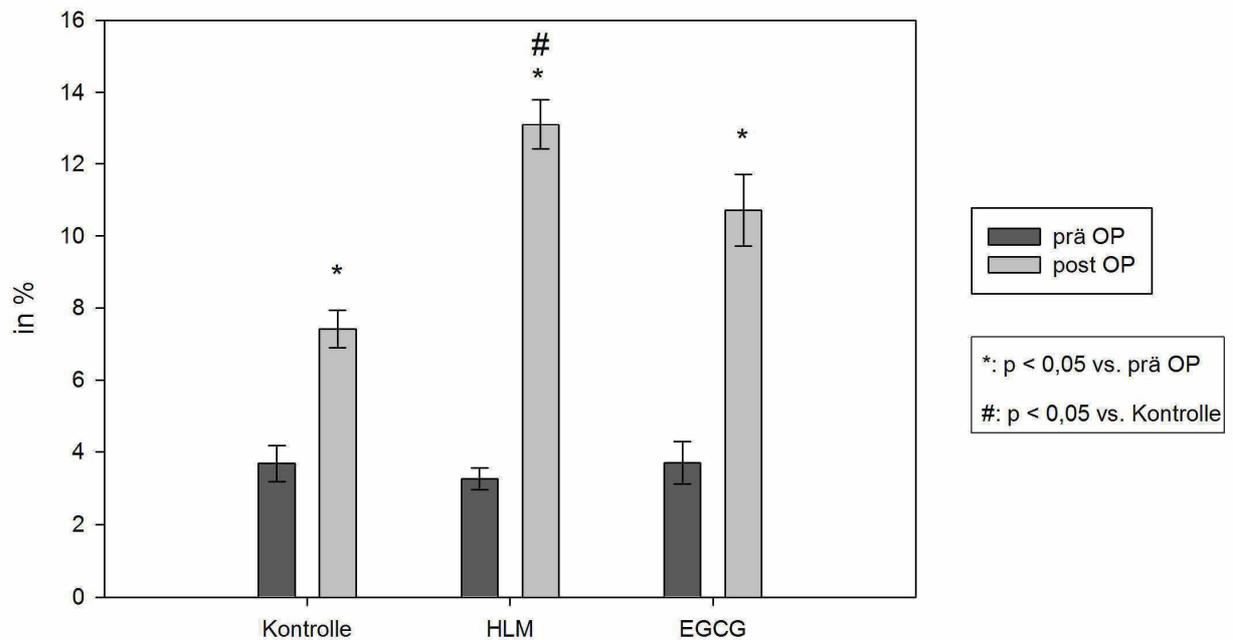


Abbildung 6: Kernpyknosen in den proximalen Tubuli, HE-Färbung;
angegeben ist der prozentuale Anteil pyknotischer Zellkerne
in den proximalen Tubuli von deren Gesamtzahl

HE-Färbung:
Vakuolisierte Zellen in den proximalen Tubuli

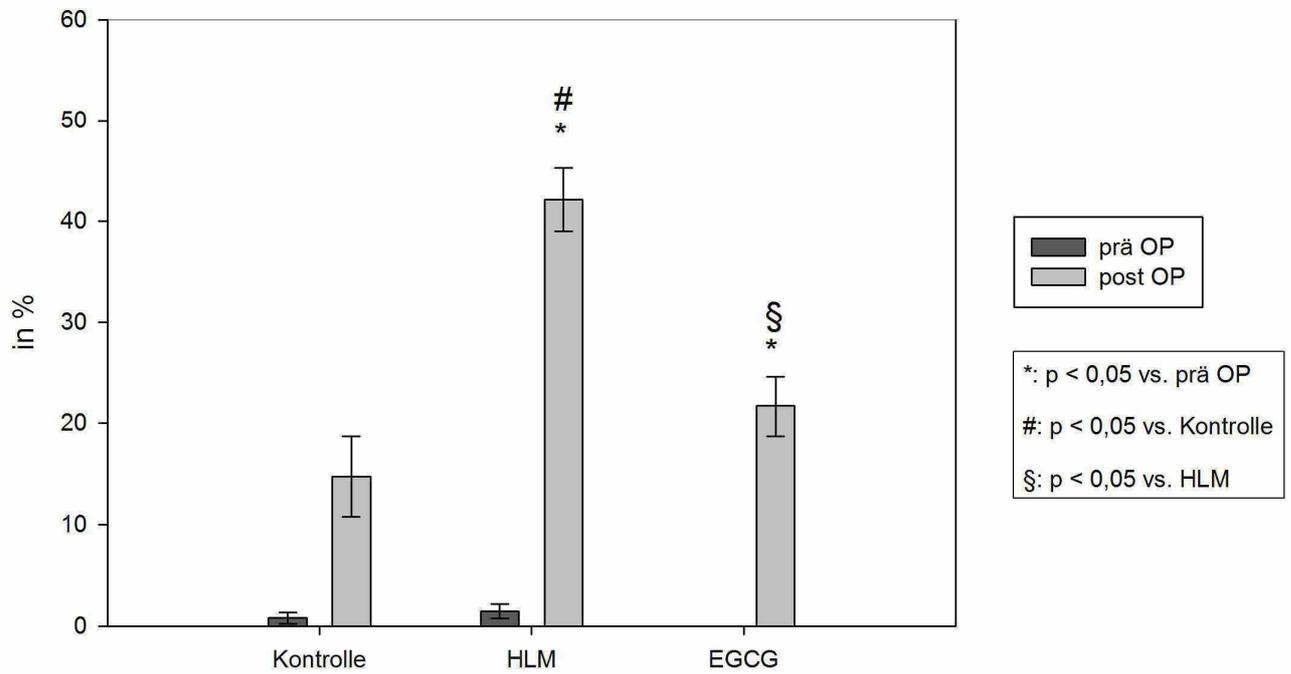


Abbildung 7: Vakuolisierte Zellen in den proximalen Tubuli, HE-Färbung;
angegeben ist der prozentuale Anteil proximaler Tubuli
mit vakuolisierten Zellen von deren Gesamtzahl

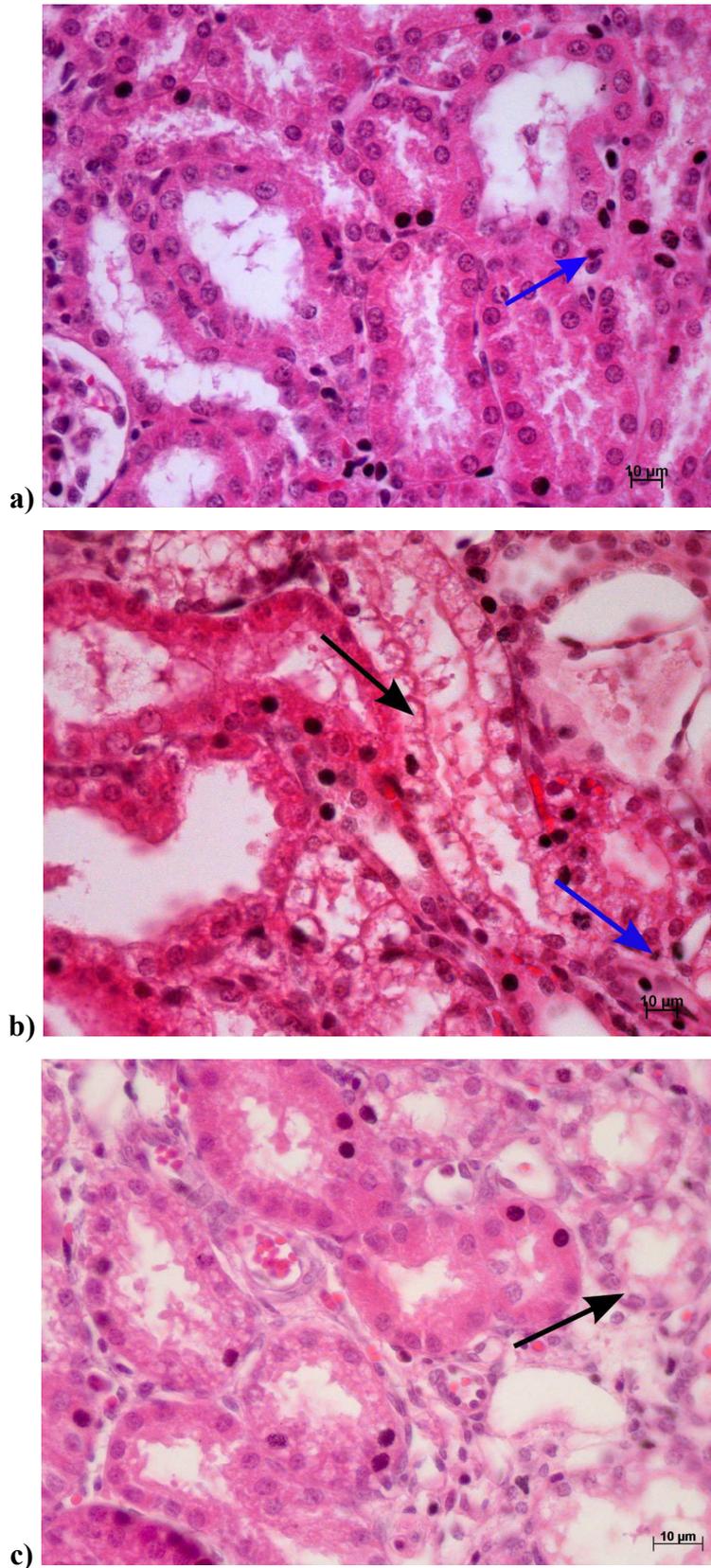


Abbildung 8: Proximale Tubuli, HE-Färbung

a) Kontrolle, b) HLM und c) EGCG: Pyknotische Zellkerne (blauer Pfeil) und vakuolierte Zellen (schwarzer Pfeil) in proximalen Tubuli

Anmerkung: Durch Vakuolenbildung scheinen betroffene Tubuli heller als gewohnt

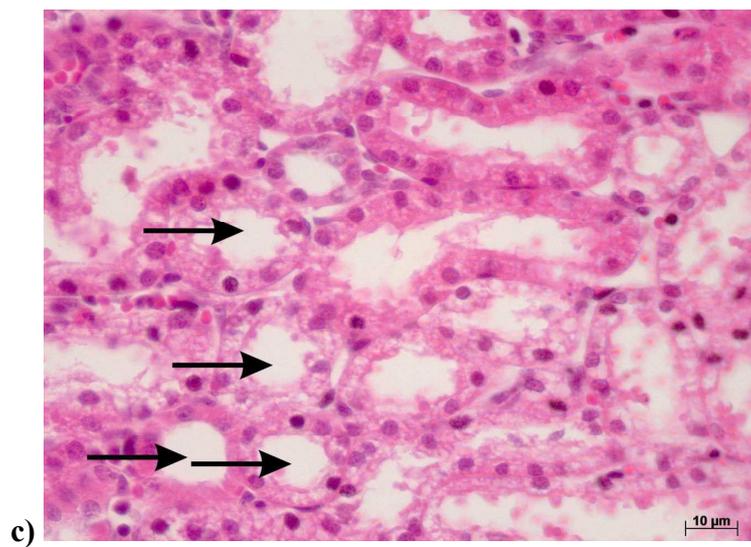
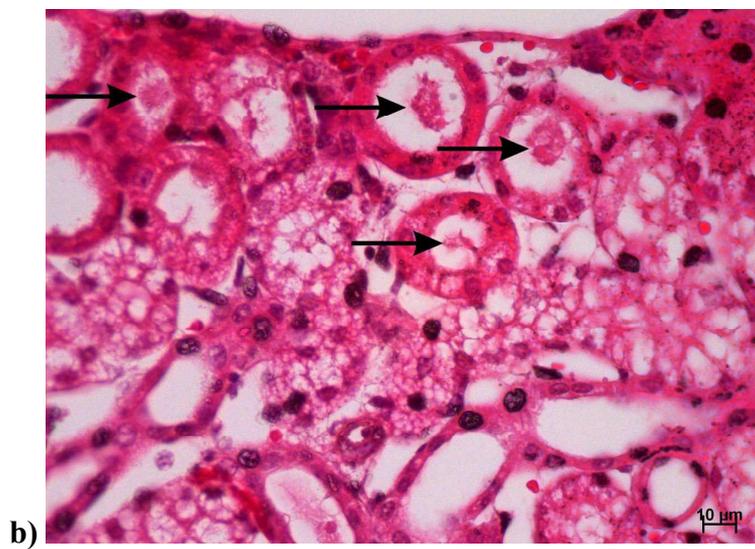
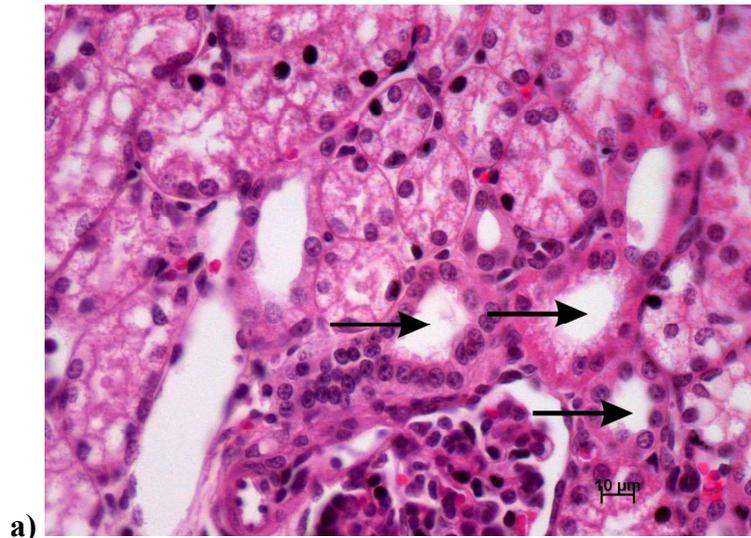


Abbildung 9: Proximale Tubuli (Debris im Lumen), HE-Färbung

a) Kontrolle und c) EGCG: Proximale Tubuli ohne Debris im Lumen (schwarze Pfeile)

b) HLM Debris (schwarze Pfeile) im Lumen proximaler Tubuli

4.2.2 Immunhistochemie: HIF-1-alpha-TSA-Färbung

Bei dieser immunhistochemischen Färbung wird das Auftreten von HIF-1-alpha im Zellkern nachgewiesen. Zellen, die von einer Zellhypoxie oder -ischämie betroffen waren, zeigen eine Akkumulation von HIF-1-alpha im Zellkern. Diese sogenannte Kernpositivität stellt sich in Form von dunkel- bis braunrot angefärbten Kernen dar (vgl. 3.3.2.2.1; siehe Abb. 11).

Nach einer Vorauswertung von vier Ferkeln (jeweils zwei Tiere aus der Kontroll- und zwei aus der HLM-Gruppe) wurde beschlossen, die Zellkerne der proximalen Tubuli auszuwerten, weil sich hier die größte Veränderung zeigte (siehe Tabelle 35 im Anhang).

Der Prozentsatz von positiv angefärbten Kernen in den proximalen Tubuli war in der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die EGCG-Gruppe zeigte einen signifikant ($p < 0,05$) höheren Prozentsatz von positiv angefärbten Kernen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings wies die EGCG-Gruppe trotzdem signifikant ($p < 0,05$) weniger kernpositive Zellen auf als die HLM-Gruppe – was bedeutet, dass EGCG das Auftreten von Kernpositivität signifikant ($p < 0,05$) mindern konnte (siehe Abb. 10; Tabelle 36 im Anhang).

HIF-1-alpha-TSA-Färbung:
Kernpositivität in den proximalen Tubuli

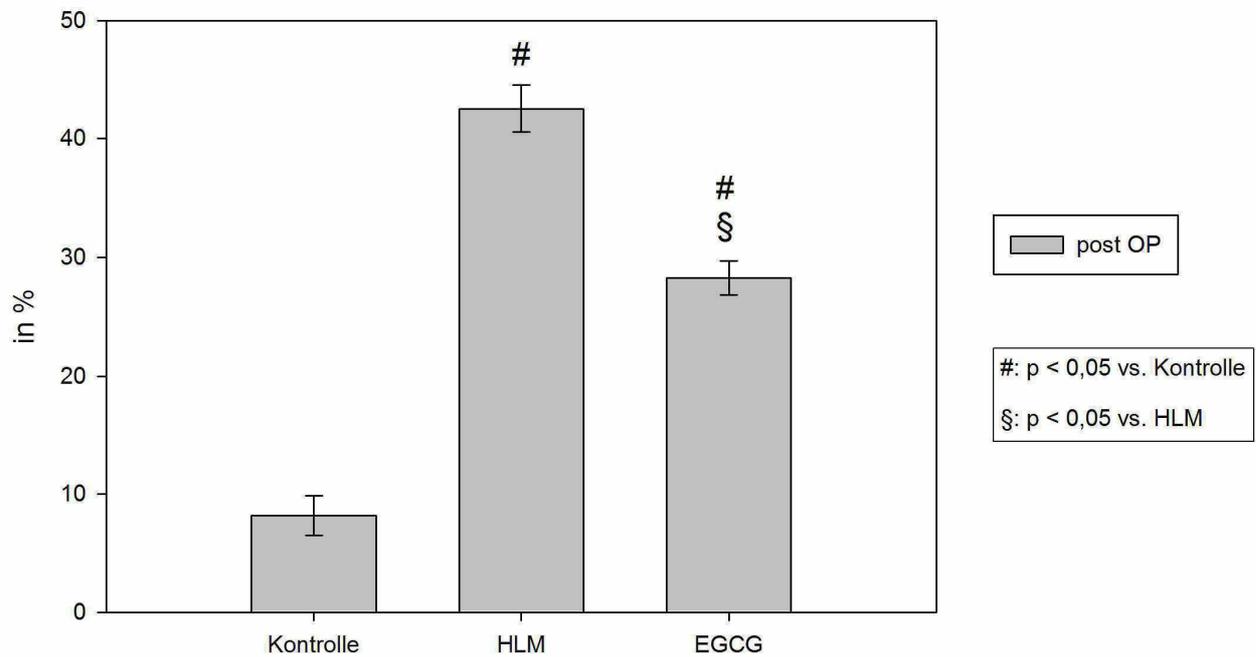


Abbildung 10: Kernpositivität in den proximalen Tubuli, HIF-1-alpha-TSA-Färbung; angegeben ist der prozentuale Anteil positiver Zellkerne in den proximalen Tubuli von deren Gesamtzahl

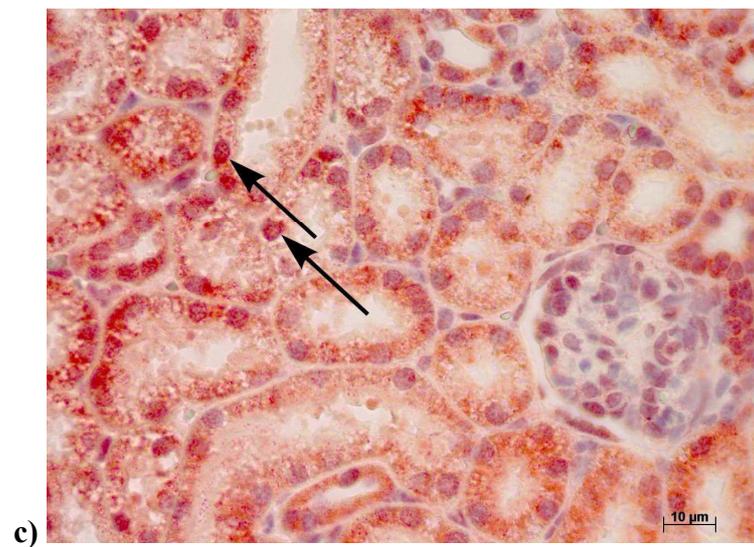
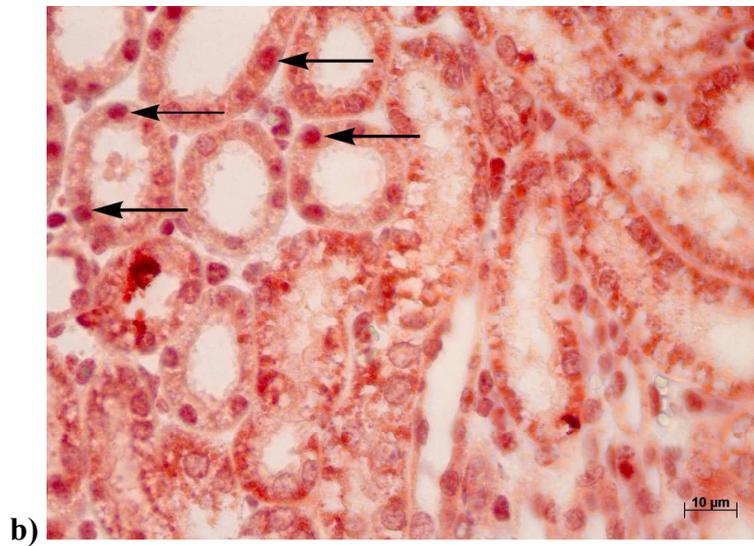
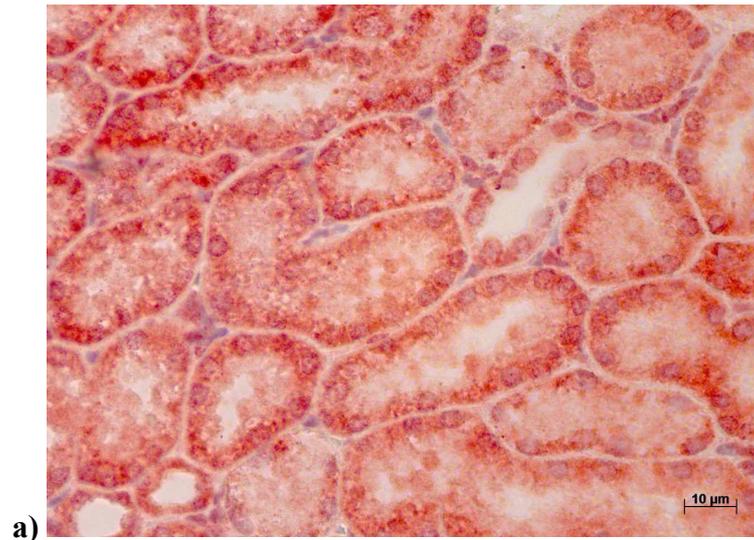


Abbildung 11: Proximale Tubuli, HIF-1-alpha-TSA-Färbung

a) Kontrolle: Keine Kernpositivität in proximalen Tubuli

b) HLM und c) EGCG: Kernpositivität (schwarze Pfeile) in proximalen Tubuli

4.2.3 Immunhistochemie: Nitrotyrosin-AEC-Färbung

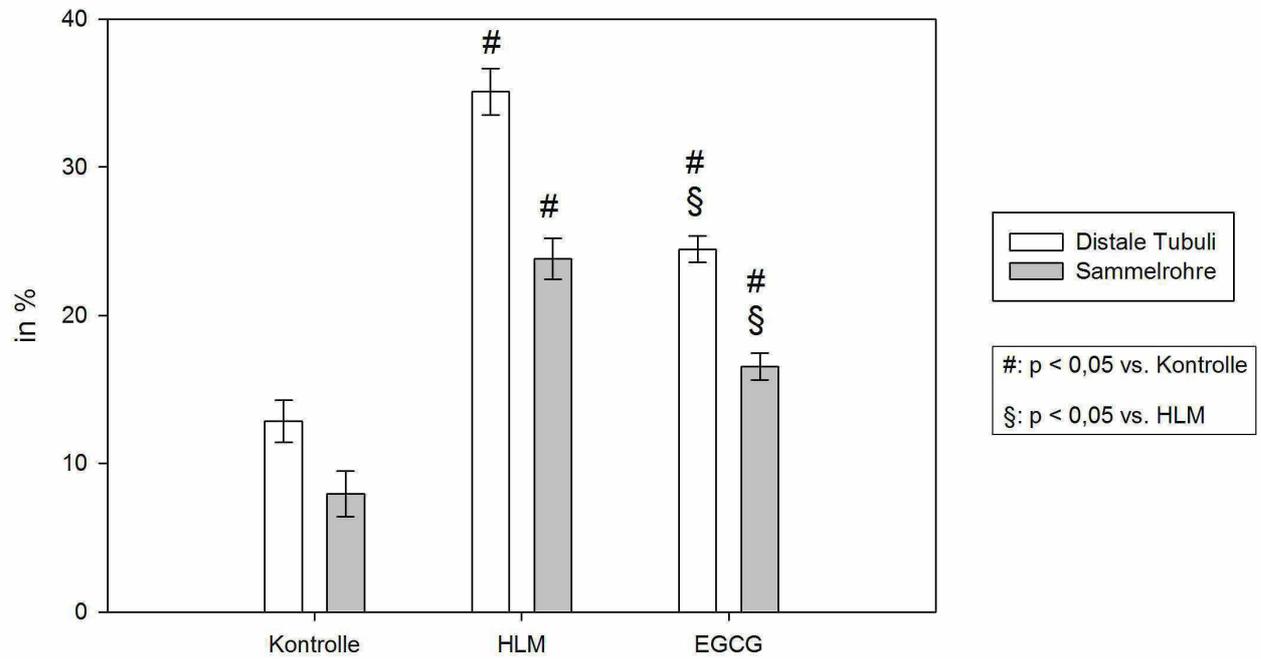
Bei dieser immunhistochemischen Färbung lassen sich Zellen darstellen, die nitrosativem Stress ausgesetzt waren. Dies geschieht durch die Anfärbung von Nitrotyrosin, welches bei nitrosativem Stress in der Zelle gebildet wird. Bei Positivität stellen sich die betroffenen Zellen rosafarben bis rot dar (vgl. 3.3.2.2.2; siehe Abb. 13).

Folgende histologische renale Strukturen wurden beurteilt: die distalen Tubuli und die Sammelrohre. Glomeruli und proximale Tubuli färbten sich nach dem hier verwendeten Protokoll entweder gar nicht oder durchgängig sehr blass rosa an – zeigten also keine Bildung von Nitrotyrosin und wurden daher nicht beurteilt.

Die Prozentsatz von positiv angefärbten distalen Tubuli war in der HLM-Gruppe der signifikant ($p < 0,05$) höchste von allen drei Gruppen. Die Kontrollgruppe wies signifikant ($p < 0,05$) weniger positiv angefärbte distale Tubuli als die HLM- und die EGCG-Gruppe auf. Die EGCG-Gruppe zeigte zwar signifikant ($p < 0,05$) mehr Nitrotyrosin-positive distale Tubuli als die Kontrollgruppe, allerdings auch signifikant ($p < 0,05$) weniger als die HLM-Gruppe. Das zeigt, dass EGCG im Stande war, die Bildung von Nitrotyrosin in den Zellen zu mindern.

In den Sammelrohren wurden ähnliche Resultate wie in den distalen Tubuli gefunden (siehe Abb. 12; Tabelle 37 im Anhang).

Nitrotyrosin-AEC-Färbung:
Positive distale Tubuli und Sammelrohre



**Abbildung 12: Positive distale Tubuli und Sammelrohre, Nitrotyrosin-AEC-Färbung;
angegeben ist der prozentuale Anteil
positiver distaler Tubuli und Sammelrohre von deren Gesamtzahl**

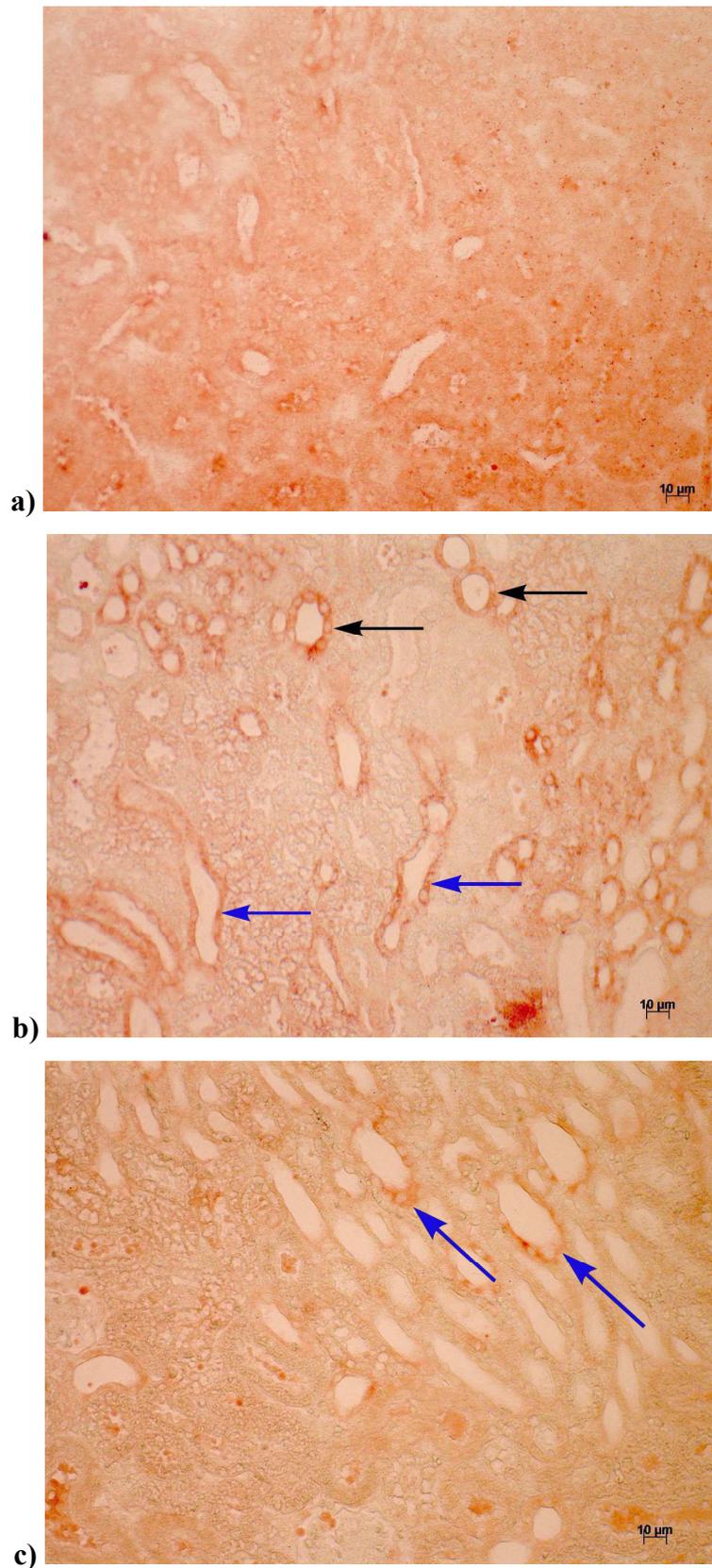


Abbildung 13: Distale Tubuli und Sammelrohre, Nitrotyrosin-AEC-Färbung

a) Kontrolle: Keine eindeutige Bildung von Nitrotyrosin erkennbar

**b) HLM und c) EGCG: Positiv angefärbte distale Tubuli (schwarze Pfeile)
und positiv angefärbte Sammelrohre (blaue Pfeile)**

4.2.4 Immunhistochemie: AIF-TSA-Färbung

Bei dieser immunhistochemischen Färbung wird das Auftreten von Apoptose-induzierendem Faktor (AIF) im Zellkern nachgewiesen. Befindet sich AIF im Kern, so zeigt das, dass die Zelle eine Schädigung erlitten hat, bei welcher die Mitochondrien in Mitleidenschaft gezogen wurden. AIF ist daraufhin aus seiner physiologischen Lokalisation zwischen den beiden Membranen des Mitochondrions ausgetreten, hat das Zytosol durchwandert und ist in den Zellkern eingetreten.

Befindet sich AIF im Zellkern, so stellt sich dieser in der AIF-TSA-Färbung rot bis dunkelrot dar – dies wird als Kernpositivität bezeichnet.

In dieser Färbung wurden die Glomeruli, die proximalen und die distalen Tubuli und die Sammelrohre bezüglich des prozentualen Anteils an Kernpositivitäten von der Gesamtheit der Kerne der jeweiligen Struktur ausgewertet.

Der Prozentsatz von positiv angefärbten Kernen war in der HLM-Gruppe bei allen vier betrachteten Strukturen signifikant ($p < 0,05$) erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Glomeruli wiesen dabei den höchsten Anteil an Kernpositivitäten auf. Die EGCG-Gruppe jedoch zeigte nur bei zwei der betrachteten Strukturen – den proximalen Tubuli und den Sammelrohren – einen signifikant ($p < 0,05$) höheren Prozentsatz von positiv angefärbten Kernen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Prozentsatz von Kernpositivitäten in den distalen Tubuli der EGCG-Gruppe befand sich genau zwischen dem der Kontroll- und dem der HLM-Gruppe dieser Struktur, ohne dass zu einem von beiden eine Signifikanz ($p < 0,05$) bestand. Die Glomeruli der EGCG-Gruppe wiesen signifikant ($p < 0,05$) weniger Kernpositivitäten auf als die der HLM-Gruppe und unterschieden sich nicht signifikant ($p < 0,05$) zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 14; Tabelle 38 im Anhang).

Diese Färbung zeigt also, dass die Mitochondrien der renalen Zellen durch die Durchführung des kardiochirurgischen Eingriffes mit Verwendung einer HLM eine Schädigung erlitten, welche das Potential hat, eine Apoptose der Zelle zu verursachen. Durch die Gabe von EGCG konnte diese Schädigung teilweise abgemildert werden.

Es werden repräsentativ für diese Färbung Bilder der Glomeruli aus den drei verschiedenen Gruppen gezeigt, da diese Struktur die Unterschiede am deutlichsten aufzeigt (siehe Abb. 15).

AIF-TSA-Färbung:
Kernpositivität in den Glomeruli, den proximalen und
distalen Tubuli und in den Sammelrohren

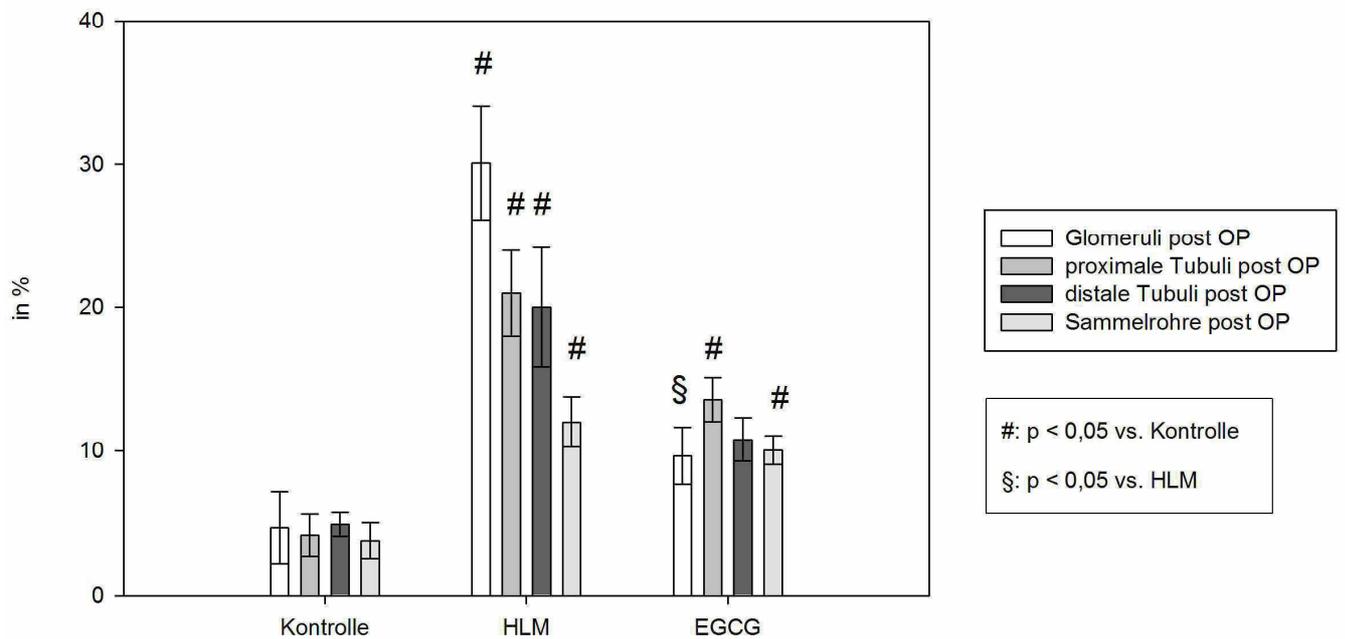


Abbildung 14: Kernpositivität in den Glomeruli, proximalen und distalen Tubuli und den Sammelrohren, AIF-TSA-Färbung; angegeben ist der prozentuale Anteil positiver Zellkerne in den Glomeruli, proximalen und distalen Tubuli und in den Sammelrohren von deren Gesamtzahl

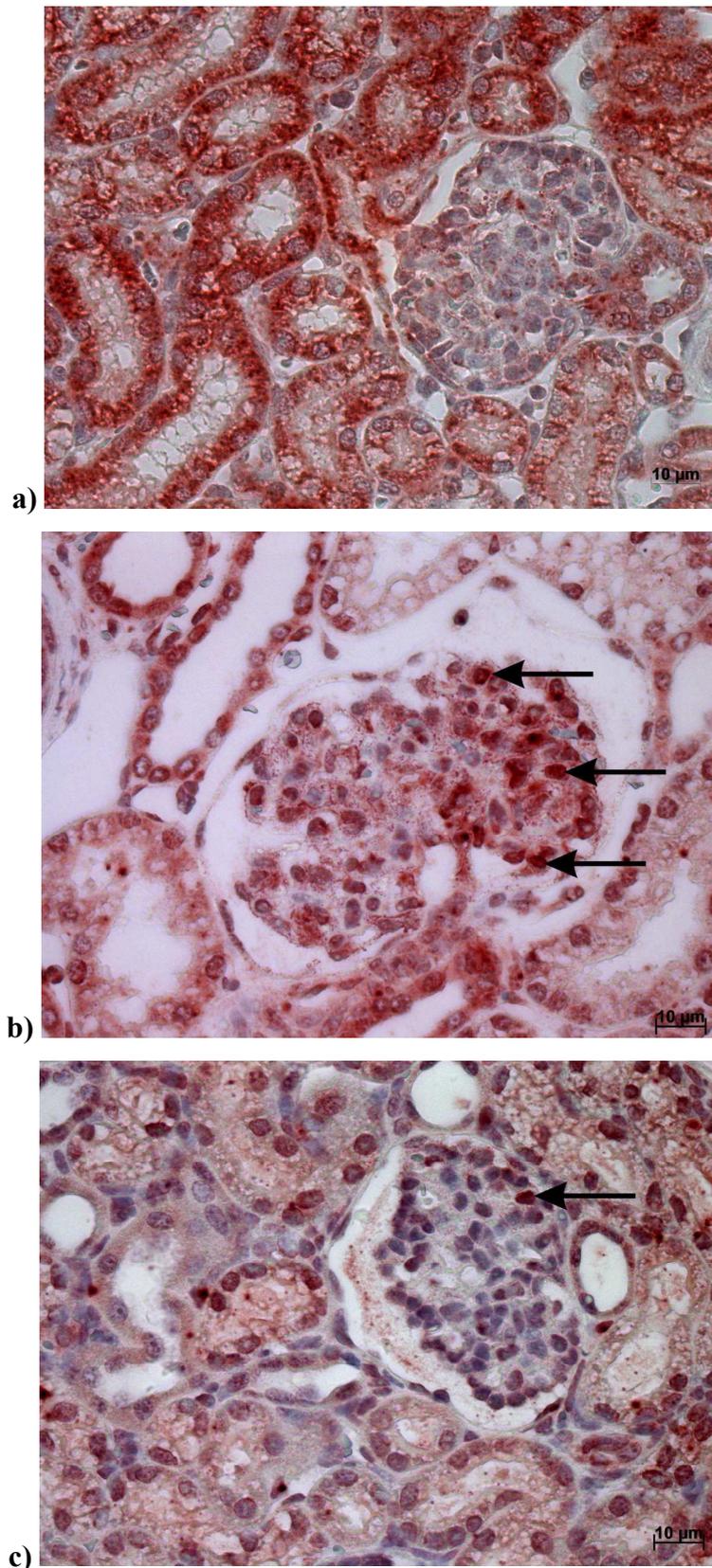


Abbildung 15: Glomeruli, AIF-TSA-Färbung

a) Kontrolle: Keine Kernpositivität im Glomerulum

b) HLM und c) EGCG: Kernpositivität (schwarze Pfeile) im Glomerulum

4.3 Ergebnisse der Blutproben

Von allen bestimmten Blutwerten (Blutchemie, Eiweißelektrophorese, großes Blutbild und Thrombozyten mit mikroskopischer Differenzierung; vgl. 3.3.4) werden an dieser Stelle ausschließlich die für die Bewertung des Zustandes der Niere und des gesamten Körpers relevanten Werte Serumkreatinin, -harnstoff und Gesamteiweiß ausgewertet.

Da es während des Versuches aufgrund von Blutverlusten oder Hämodilution einerseits, und von Bluttransfusionsgaben (enthalten im Primingvolumen der HLM) andererseits zu teils erheblichen Schwankungen des Hämatokrits der Ferkel kam, wurden alle nun folgenden Blutwerte mit dem zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelten Hämatokrit korrigiert.

Die dafür verwendete Formel war:

Jeweiliger Blutwert in der jeweiligen Einheit / Hämatokrit in Prozent.

Wegen dieser Korrektur sind die nun folgenden Serumkreatinin-, -harnstoff- und Gesamteiweißwerte als relative Einheiten (rel. E.) angegeben.

4.3.1 Hämatokrit

Die Hämatokritwerte der Ferkel wurden regelmäßig überprüft, um sie über dem kritischen Wert von 11 bis 15 % zu halten. Im Falle eines Absinkens des Hämatokrit musste Volumen infundiert werden (vgl. 3.1.2.3; siehe Tabelle 11). In Tabelle 15 im Anhang finden sich die Infusionsmengen, die den jeweiligen Gruppen während des Versuches verabreicht wurden.

Tabelle 11: Hämatokrit (Mittelwerte und ihre Standardfehler.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. 0 Minuten wird durch einen Asterisk (*) angezeigt,

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)

Gruppen	Hämatokrit in % 0 Minuten	Hämatokrit in % 90 Minuten	Hämatokrit in % 240 Minuten
Kontrolle	17,8 ± 1,31	19,49 ± 1,25	22,06 ± 2,19
HLM	22,69 ± 1,01 #	20,12 ± 1,04	14,08 ± 0,93 * #
EGCG	19,55 ± 2,4	16,13 ± 0,94 §	16,48 ± 1,85

4.3.2 Kreatinin im Serum

Das Kreatinin ist ein typischer nierenspezifischer Blutwert, welcher sich bald nach einer Funktionseinschränkung der Niere im Blut erhöhen kann.

Die Kreatininwerte (in dem großen Graphen) der HLM-Gruppe stiegen im Zeitraum von 0 bis 240 Minuten signifikant ($p < 0,05$) an. Die Werte der Kontrollgruppe zeigten keine signifikanten ($p < 0,05$) Veränderungen. Die Werte der EGCG-Gruppe verhielten sich ebenso wie die der Kontrollgruppe (siehe Abb. 16; Tabelle 24 im Anhang).

Durch die Berechnung des Deltawertes (im Inset-Graphen dargestellt) von 0 und 240 Minuten aller drei Gruppen wurde deutlich, dass der Kreatininwert der HLM-Gruppe der signifikant ($p < 0,05$) höchste war. Durch die Deltawerte wird deutlich ersichtlich, dass das Kreatinin durch EGCG signifikant ($p < 0,05$) gesenkt werden konnte.

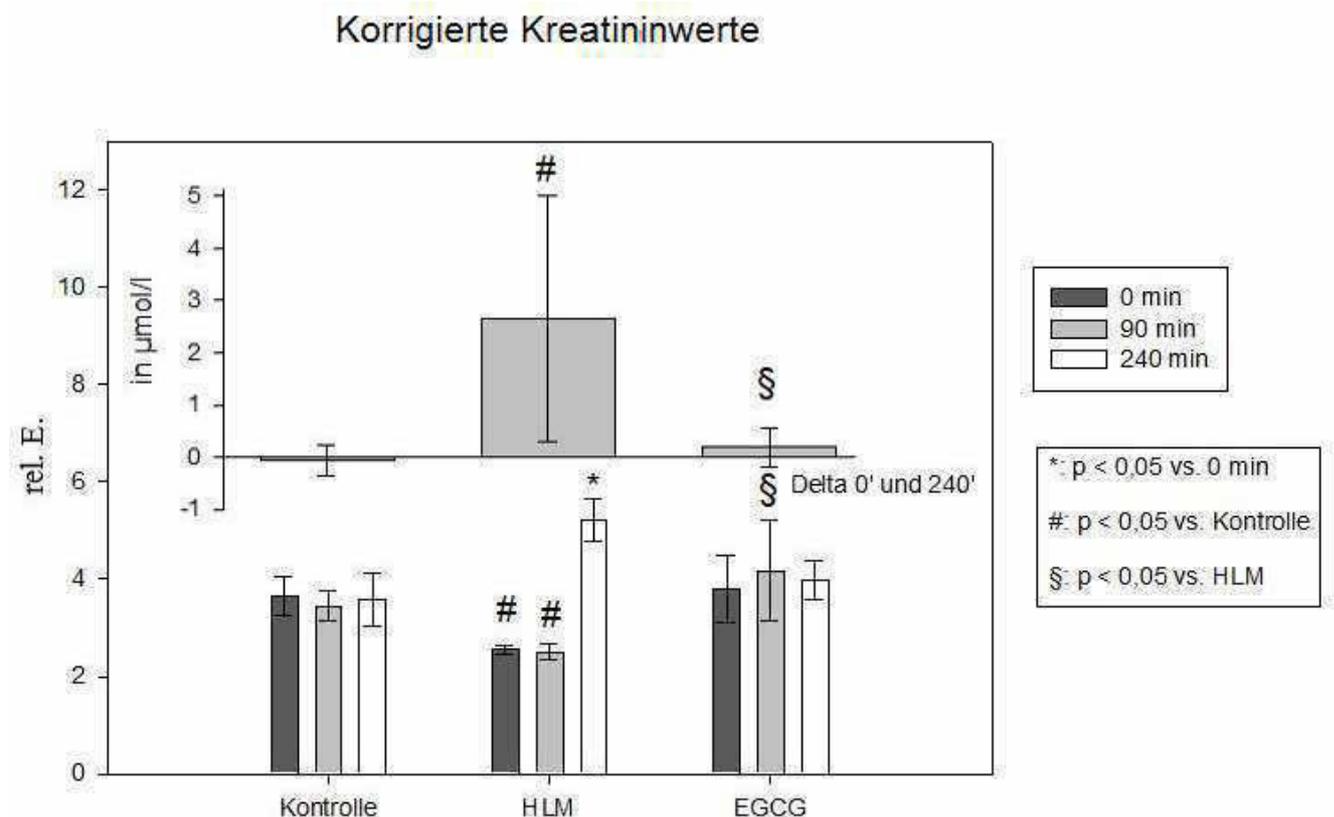


Abbildung 16: Korrigierte Kreatininwerte (im großen Graphen) und Delta der korrigierten Kreatininwerte (im Inset-Graphen). Die Werte des großen Graphen sind angegeben als relative Einheiten, da sie sich aus der Formel $\text{Kreatinin in } \mu\text{mol/l} / \text{Hämatokrit in Prozent}$ ergeben.

Die Werte des Inset-Graphen sind angegeben in $\mu\text{mol/l}$, weil sie das Delta der korrigierten Kreatininwerte bei 0 Minuten und bei 240 Minuten darstellen

4.3.3 Harnstoff im Serum

Harnstoff ist, ebenso wie Kreatinin, ein typischer nierenspezifischer Blutwert, der auch kurz nach einem Niereninsult reagieren und ansteigen kann.

Ebenso wie bei den Kreatininwerten fand sich auch bei den Harnstoffwerten (in dem großen Graphen) im Zeitraum von 0 bis 240 Minuten nur in der HLM-Gruppe ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg. Die Kontrollgruppe zeigte keine signifikante ($p < 0,05$) Veränderung, ebenso wenig die EGCG-Gruppe (siehe Abb. 17; Tabelle 25 im Anhang).

Die Deltawerte (dargestellt im Inset-Graphen) der jeweiligen Gruppen von 0 und 240 Minuten zeigten, dass der Harnstoff in der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) am stärksten anstieg. Auch hier konnte EGCG gegensteuern und den Harnstoffwert signifikant ($p < 0,05$) senken.

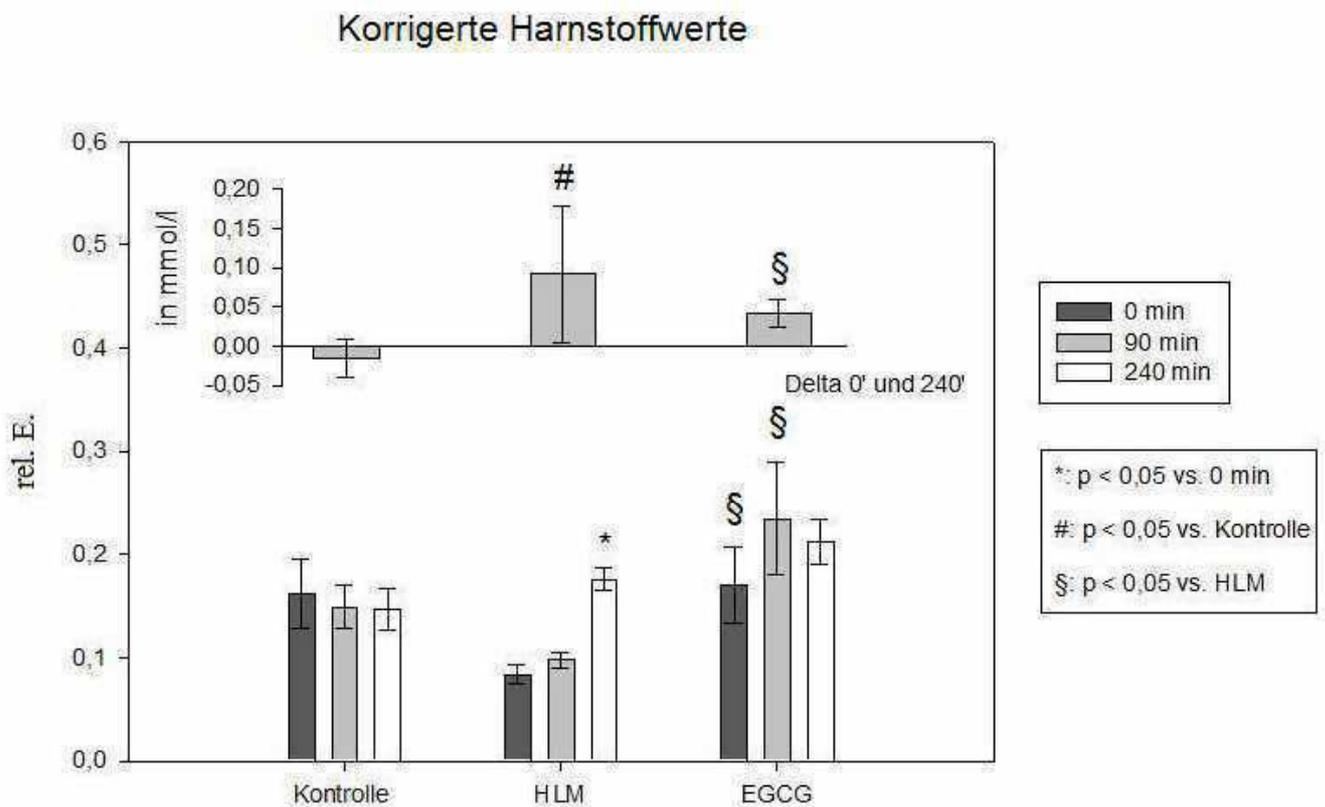


Abbildung 17: Korrigierte Harnstoffwerte (im großen Graphen) und Delta der korrigierten Harnstoffwerte (im Inset-Graphen). Die Werte des großen Graphen sind angegeben als relative Einheiten, da sie sich aus der Formel Harnstoff in mmol/l / Hämatokrit in Prozent ergeben.

Die Werte des Inset-Graphen sind angegeben in mmol/l, weil sie das Delta der korrigierten Harnstoffwerte bei 0 Minuten und bei 240 Minuten darstellen

4.3.4 Gesamteiweiß

Ein verringerter Eiweißwert im Blut kann hinweisend auf einen Eiweißverlust des Körpers aufgrund von geschädigten Membranen bzw. Barrierefunktionen sein. Das würde sich im Blut als abfallende Werte des Gesamteiweiß äußern.

In der Auswertung des Gesamteiweißes im Blut zeigt sich, dass die Werte der HLM-Gruppe im Zeitraum von 0 bis 90 und 0 bis 240 Minuten tatsächlich signifikant ($p < 0,05$) abfielen (siehe Abb. 18; Tabelle 26 im Anhang).

Erwähnenswert ist außerdem, dass sich zwar bei allen drei Gruppen die gleiche, abfallende Tendenz der Werte zeigte, dass die Werte sich aber nur in der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) unterschieden. EGCG ist offensichtlich in der Lage, den durch die HLM gesetzten Schaden im Körper abzufangen.

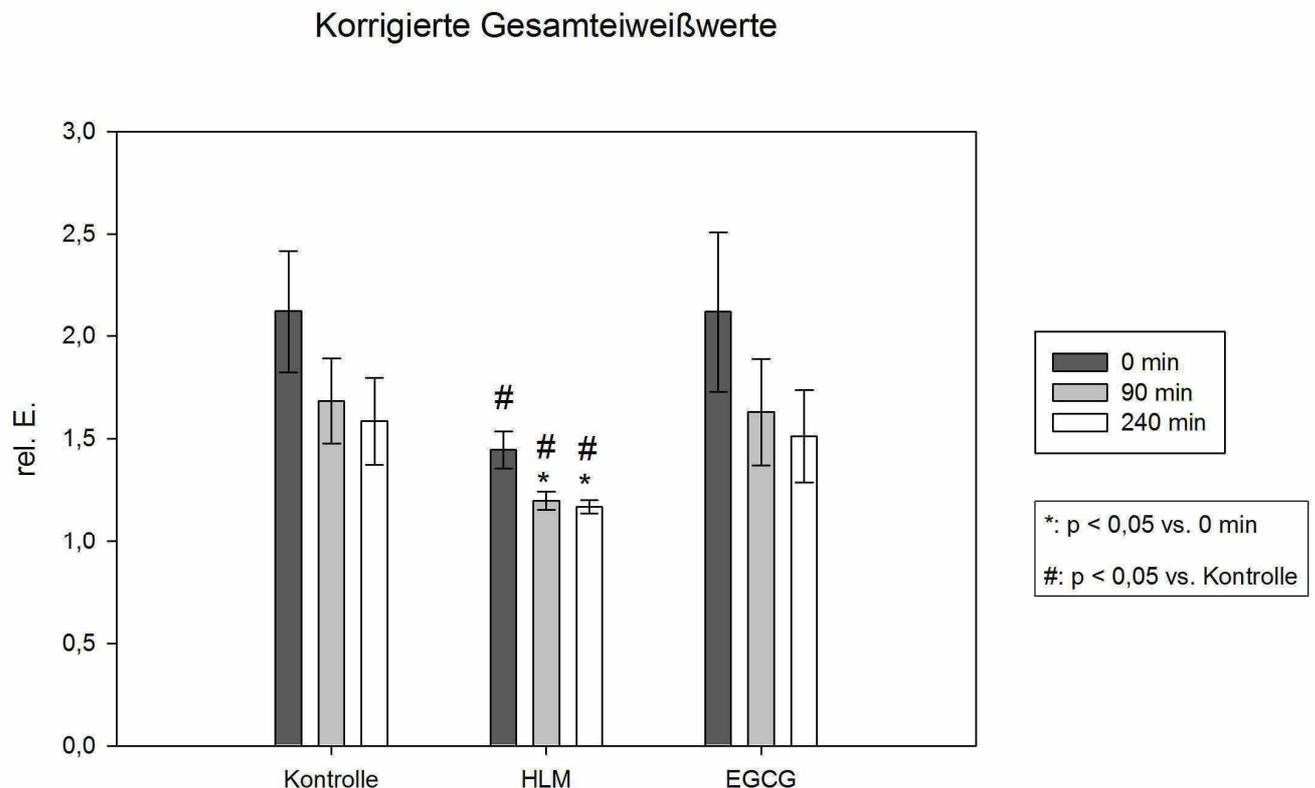


Abbildung 18: Korrigierte Gesamteiweißwerte. Die Werte sind angegeben als relative Einheiten, da sie sich aus der Formel Gesamteiweiß in g/l / Hämatokrit in Prozent ergeben

4.4 Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalysen: Laktat

Während des Versuches wurde der Laktatwert mittels BGA aus 1 ml arteriellem Vollblut regelmäßig bestimmt. Die Werte des Laktat im Blut steigen an, wenn im Körper Gewebe nicht adäquat durchblutet wird, was zu einer Gewebsischämie führen kann.

Bei den Laktatwerten der Kontrollgruppe waren keine signifikanten ($p < 0,05$) Veränderungen zu vermerken. Verglichen damit zeigte die HLM-Gruppe bei 90 und bei 240 Minuten einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der Werte, welche sich signifikant ($p < 0,05$) von denen der Kontrollgruppe unterschieden. Auch die EGCG Werte stiegen bei 90 und 240 Minuten signifikant ($p < 0,05$) an, der Endwert der EGCG-Gruppe war jedoch signifikant ($p < 0,05$) niedriger als der der HLM-Gruppe und unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe (siehe Abb. 19; Tabelle 23 im Anhang).

Im untenstehenden Graphen lassen sich besonders gut Tendenzen erkennen, wonach der Laktatwert der HLM-Gruppe nach 90 Minuten weiter anstieg, jener der EGCG-Gruppe sich dagegen auf dem bei 90 Minuten erreichten Level hielt – ein mildernder Einfluss von EGCG auf die durch die HLM verursachten Schäden wird deutlich.

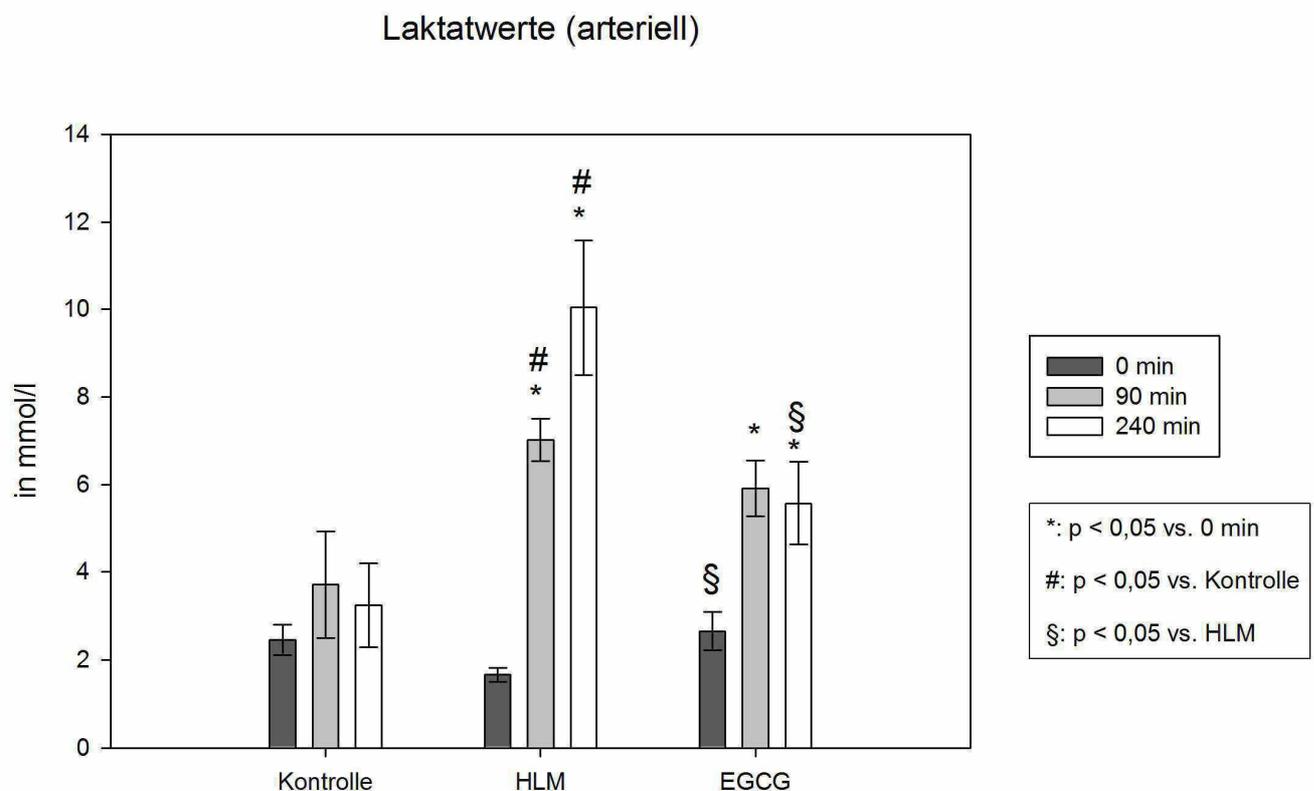


Abbildung 19: Laktatwerte (arteriell)

4.5 Ergebnisse der Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Bei der hier durchgeführten Ionenpaarchromatographie mit Reversed-Phase-Säule wurden die jeweiligen Gehalte von Adenosintri-, Adenosindi- und Adenosinmonophosphat (ATP, ADP, AMP), Adenosin und Hypoxanthin bestimmt. Dadurch lässt sich darstellen, ob eine ischämische Schädigung vorlag, in welchem Maße das Nierengewebe beansprucht wurde bzw. ob es zu einem erhöhten Energieverbrauch kam.

Die Summe der ATP-, ADP- und AMP-Werte – zusammengenommen als Summe der energiereichen Phosphatverbindungen – war in der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) niedriger als die Summe der EGCG-Gruppe. Die Summen der Kontroll- und der EGCG-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant ($p < 0,05$) (siehe Abb. 20; Tabelle 43 im Anhang). Das bedeutet, dass EGCG in der Lage war, den Effekt der HLM abzuschwächen.

Außerdem wurden die Dephosphorylierungsratios ($ATP/(ADP+AMP)$ und $ATP/(ADP+AMP+Adenosin)$) gebildet. Hier waren die Werte der HLM-Gruppe jeweils signifikant ($p < 0,05$) niedriger als die der EGCG-Gruppe. Die Werte der Kontroll- und der EGCG-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant ($p < 0,05$) (siehe Abb. 21; Tabelle 44 und 45 im Anhang).

Vor allem die Werte dieser beiden Dephosphorylierungsratios zeigten also, dass EGCG in der Lage war, die negativen Auswirkungen der HLM auf die Nieren zu vermindern, was sich hier durch eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Dephosphorylierung von ATP in der EGCG-Gruppe im Vergleich zur HLM-Gruppe zeigte.

Summe der ATP-, ADP- und AMP-Werte

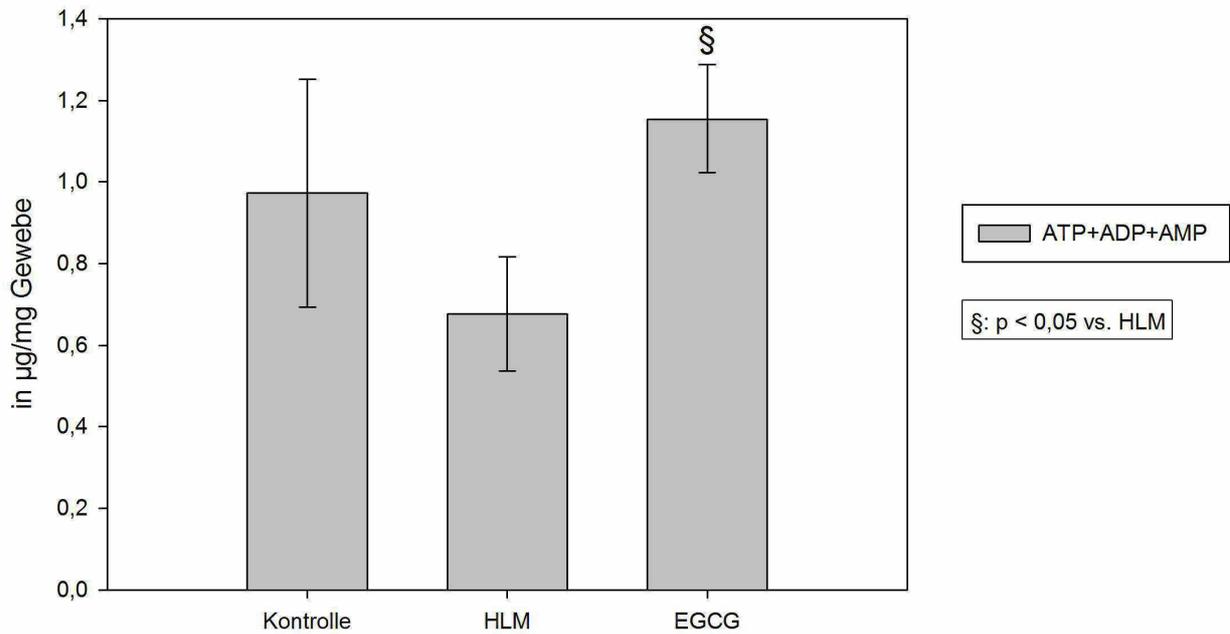


Abbildung 20: Summe der ATP-, ADP- und AMP-Werte

Dephosphorylierungsratios
(ATP/(ADP+AMP) und ATP/(ADP+AMP+Adenosin))

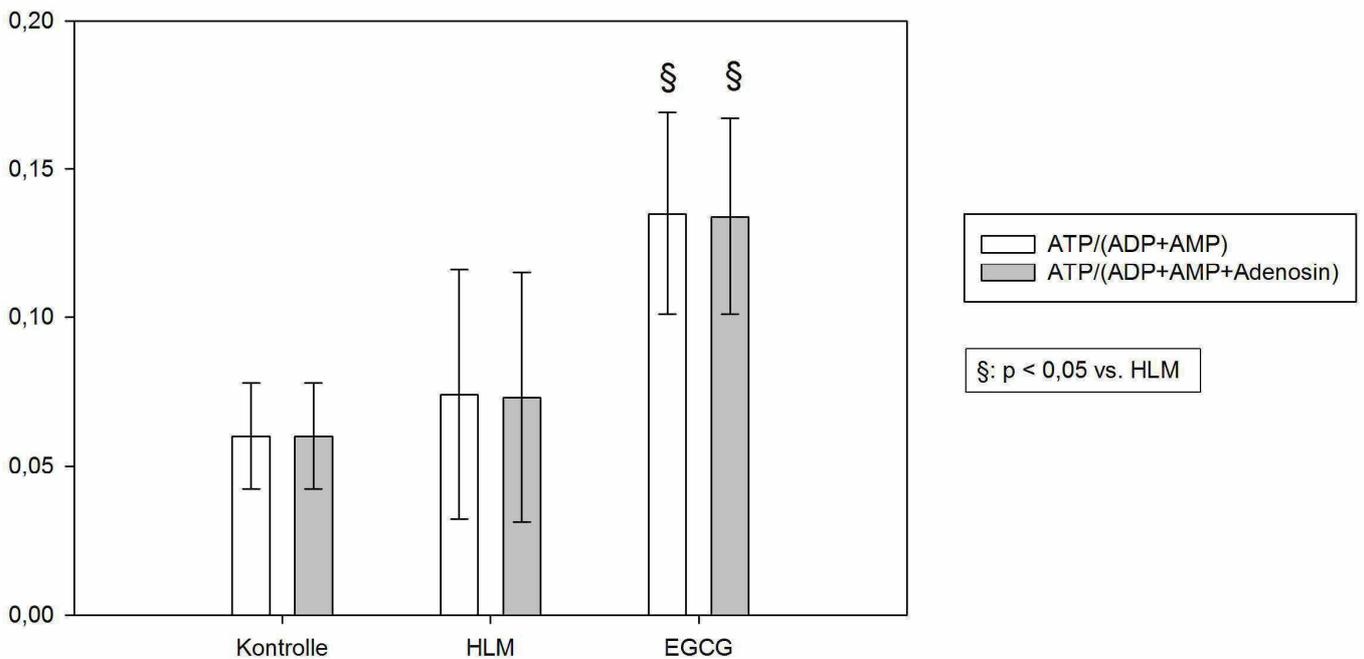


Abbildung 21: Dephosphorylierungsratios (ATP/(ADP+AMP) und ATP/(ADP+AMP+Adenosin)); Werte ohne Einheit

4.6 Vitalparameter und Blutgasanalyse

Alle Ferkel begannen den Versuch mit vergleichbaren Vitalparametern. Während des Versuches war es das Ziel, diese Vitalparameter im physiologischen Rahmen zu halten, sodass etwaige Entgleisungen die Ergebnisse nicht beeinflussen würden. Bei Bedarf konnten unterschiedliche medikamentöse Interventionen (vgl. 3.1.2.3) vorgenommen oder Geräteeinstellungen verändert werden, um den Zustand der Tiere stabil zu halten.

Arterielle Blutgasanalysen wurden in halbstündigen Abständen durchgeführt, um den metabolischen Zustand der Ferkel zu überwachen (vgl. 3.2.5). Die aus den Blutgasanalysen aufgezeichneten Werte finden sich unter 4.3.1, unter 4.4 und im Anhang.

Außerdem wurden die folgende Parameter regelmäßig überwacht: Der systolische und der diastolische arterielle Druck sowie der arterielle Mitteldruck, die Herzfrequenz, die Sauerstoffsättigung und der zentralvenöse Druck. In der Kontrollgruppe stiegen der systolische arterielle und der zentralvenöse Druck sowie der arterielle Mitteldruck im Zeitraum von 0 bis 240 Minuten signifikant ($p < 0,05$) an. In der HLM-Gruppe stieg die Herzfrequenz im Zeitraum von 0 bis 240 Minuten signifikant ($p < 0,05$) an und der arterielle Mitteldruck und der diastolische arterielle Druck fielen im selben Zeitraum signifikant ($p < 0,05$) ab. In der EGCG-Gruppe fiel der diastolische arterielle Druck im Zeitraum von 0 bis 240 Minuten signifikant ($p < 0,05$) ab. Im Vergleich der Gruppen miteinander zeigte sich, dass der diastolische arterielle und der zentralvenöse Druck der HLM-Gruppe bei 0 Minuten signifikant ($p < 0,05$) größer waren, als die der Kontrollgruppe, ebenso verhielt sich die Herzfrequenz bei 240 Minuten, wogegen der diastolische arterielle Druck und der Mitteldruck der HLM-Gruppe zu diesem Zeitpunkt signifikant ($p < 0,05$) niedriger als die der Kontrollgruppe waren. Der systolische arterielle Druck der EGCG-Gruppe war bei 240 Minuten signifikant ($p < 0,05$) niedriger als der der Kontrollgruppe, zum gleichen Zeitpunkt waren der diastolische arterielle und der zentralvenöse Druck der EGCG-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) größer bzw. kleiner als der der HLM-Gruppe, wobei der zentralvenöse Druck der EGCG-Gruppe bei 0 Minuten schon signifikant ($p < 0,05$) kleiner als der der HLM-Gruppe gewesen war (siehe Tabelle 12).

Die Angaben der Vitalparameter und der durchgeführten Blutgasanalysen sind von größter Relevanz, um zu verdeutlichen, dass die Ferkel während der Versuche in stabilen Zuständen waren, dass sie sich im metabolischen Gleichgewicht befanden, und dass ihre Vitalparameter sich im physiologischen Rahmen bewegten.

Tabelle 12: Vitalparameter

(Mittelwerte und ihre Standardfehler.

Signifikanz (p < 0,05) vs. 0 Minuten wird durch einen Asterisk (*) angezeigt,

Signifikanz (p < 0,05) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und

Signifikanz (p < 0,05) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)

Gruppe	Systolischer arterieller Druck in mmHg	Arterieller Mitteldruck in mmHg	Diastolischer arterieller Druck in mmHg	Herzfrequenz in Schlägen/min	Arterielle O ₂ Sättigung in %	Zentralvenöser Druck in mmHg
Kontrolle 0 Min	68,86 ± 2,75	48,86 ± 1,99	34,29 ± 2,14	95,71 ± 4,89	99,89 ± 0,11	7,14 ± 1,12
Kontrolle 120 Min	83,71 ± 4,77 *	55,14 ± 2,13	40,29 ± 2,16	104,14 ± 4,49	98,97 ± 0,68	9,14 ± 0,94
Kontrolle 240 Min	85,57 ± 3,79 *	57,14 ± 1,5 *	38,57 ± 2,08	108,43 ± 5,02	99,71 ± 0,21	9,71 ± 1,34 *
HLM 0 Min	74,3 ± 3,42	53,5 ± 1,92	40,9 ± 1,42 #	107,5 ± 3,27	99,77 ± 0,1	12,1 ± 1,54 #
HLM 120 Min	85,5 ± 5,47	50 ± 3,55	34,2 ± 2,37 *	129,44 ± 8,07	98,1 ± 1,58	13,7 ± 1,39 #
HLM 240 Min	76,9 ± 4	43,7 ± 1,69 * #	25,1 ± 1,89 * #	150,5 ± 8,42 * #	95,14 ± 3,1	12 ± 0,99
EGCG 0 Min	73,5 ± 7,02	59,67 ± 6,44	44 ± 4,68	111,5 ± 5,68	99,67 ± 0,33	7,67 ± 0,62 §
EGCG 120 Min	83 ± 10,5	58 ± 4,97	41,6 ± 4,99	128 ± 15,95	99,8 ± 0,2	9,25 ± 2,5
EGCG 240 Min	72,33 ± 3,76 #	52,67 ± 4,21	34,6 ± 1,97 * §	139 ± 9,09	98,5 ± 0,96	7 ± 1,47 §

Tabelle 13: Deltawerte der arteriellen Mitteldrücke bei 0 und 120 Minuten

(Mittelwerte und ihre Standardfehler)

Gruppe	Delta in mmHg
Kontrolle	-6,29 ± 2,12
HLM	3,5 ± 2,9
EGCG	3,6 ± 8,85

5 Diskussion

In dieser Dissertation stehen drei Fragestellungen im Vordergrund:

1. Schädigte die Verwendung einer HLM (unter hypothermen Bedingungen, mit nicht-pulsatilem Blutfluss und Kardioplegie) die Niere?
2. Wiesen die gesetzten Schäden die Merkmale eines Ischämie-Reperfusionsschadens auf?
3. Konnte die Schädigung durch EGCG abgemildert werden?

Als Untersuchungsmaterial standen histologische (HE-Färbung) und immunhistochemische (HIF-1-alpha-TSA-Färbung, Nitrotyrosin-AEC-Färbung und AIF-TSA-Färbung) Präparate, Blutproben (Serumkreatinin und -harnstoff und Gesamteiweiß), Blutgasanalysen (Laktat) und die Ergebnisse einer RP-HPLC (ATP, ADP, AMP, Adenosin) zur Verfügung.

Des Weiteren wurde während der Versuche eine Fülle von Parametern aufgezeichnet, evaluiert und – falls nötig – beeinflusst, um die Ferkel soweit möglich unter physiologischen Bedingungen zu halten. Diese Werte befinden sich teils im Ergebnisteil und teils im Anhang dieser Dissertation und umfassen die Ergebnisse von Blutgasanalysen (pH, Basenüberschuss, Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid), Vitalparametern (systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, arterielle Sauerstoffsättigung, zentralvenöser Druck) und Beatmungsparameter (Positive End Expiratory Pressure, Atemminutenvolumen, Tidalvolumen, Atemfrequenz). Sie verdienen insofern Beachtung, als sie zeigen, dass sich die Ferkel während der Versuche immer in physiologischen Bereichen bewegt haben, bzw., dass im Falle einer Entgleisung sofort gegengesteuert wurde. An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass offenbar zu keiner Zeit ein zu niedriger Blutdruck bestanden hat.

Aus den Werten dieser Parameter ist abzuleiten, dass aufgetretene pathologische Veränderungen nicht auf Monitoring- oder Managementfehler – etwa eine falsch durchgeführte Beatmung oder eine schwere Azidose, der nicht entgegengewirkt wurde – zurückgeführt werden können. Veränderungen in den Ergebnissen der histologischen oder immunhistochemischen Färbungen, den Blutwerten oder den Ergebnissen der RP-HPLC müssen also durch die Verwendung der HLM bzw. durch die hier untersuchte Substanz EGCG entstanden sein.

Außerdem ist ebenfalls im Anhang eine Auflistung der nötig gewordenen Infusionen und medikamentösen Interventionen mit Katecholaminen zu finden. Die den unterschiedlichen Gruppen insgesamt infundierten Mengen unterschieden sich nicht signifikant ($p < 0,05$). Auch die Epinephringaben waren in den drei Gruppen nicht signifikant ($p < 0,05$) verschie-

den. Obwohl es bei den Norepinephringaben signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede gab, soll vor allem betont werden, dass sich bei beiden Katecholaminen deutliche Tendenzen zeigten, nach denen die Kontrollgruppe die kleinste bzw. die HLM-Gruppe die größte Menge von Katecholaminen bekam, während sich die EGCG-Gruppe bei beiden Wirkstoffen zwischen Kontroll- und HLM-Gruppe bewegte. Der hohe Katecholaminverbrauch der HLM-Gruppe könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch das Herz durch die HLM Schädigungen davonträgt (was durch die Gabe von EGCG positiv beeinflusst wird). Eine genauere Untersuchung dieser HLM-assoziierten Schäden am Herzen mit Auswertung aller Daten hat dies bestätigt (KIEFER et al. 2012).

Das Management einer HLM kann großen Einfluss auf die Niere haben. Risikofaktoren für ein Nierenversagen nach einem operativen Eingriff am Herzen mit Verwendung einer HLM sind laut SIRVINSKAS et al. (2008) ein fortgeschrittenes Alter des Patienten (≥ 70 Jahre), eine lange Aortenklemmzeit ($\geq 75,11$ Minuten), eine lange Dauer der Zeit an der HLM ($\geq 134,74$ Minuten) und bestimmte Arten der Herzchirurgie. SIRVINSKAS et al. (2008) untersuchten dabei die Daten von 179 nierengesunden Patienten, an denen ein kardiochirurgischer Eingriff vorgenommen wurde. Die Patienten waren in Gruppen aufgeteilt, bei denen jeweils unterschiedliche Perfusionsdrücke verwendet wurden – anschließend wurden verschiedene Parameter im Hinblick auf eine postoperative Nierenproblematik ausgewertet. BAHAR et al. veröffentlichten 2005 eine Studie an 14437 Patienten über die Risikofaktoren und die Prognose von akutem Nierenversagen nach Herzoperation am offenen Herzen, die belegte, dass bestehende Allgemeinerkrankungen (Diabetes mellitus, Hypertension, eingeschränkte Funktionsfähigkeit des linken Ventrikels, eine niedrige Herzauswurfleistung) und eine eingeschränkte Nierenfunktion (ein hoher präoperativer Serumkreatininwert) das Risiko für ein akutes Nierenversagen ebenso erhöhen wie eine Hypothermie unter $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ während der HLM-Zeit. BAHAR et al. (2005) nannten außerdem die drei oben erstgenannten von SIRVINSKAS et al. (2008) angeführten Risikofaktoren, und als weitere Risikofaktoren Notoperation, Reoperation, weitere erforderliche Eingriffe, Reexploration wegen Blutung oder Tamponade und Infektion. KANJI et al. veröffentlichten 2010 eine Studie an 157 Risikopatienten, an denen ein kardiochirurgischer Eingriff mit einer HLM vorgenommen wurde. Die prä- und intraoperativen arteriellen Mitteldrücke wurden betrachtet mit Hinblick auf eine postoperative Nierenproblematik. Diese Studie zeigte, dass ein Blutfluss von $< 54\text{ ml/kg/min}$ und ein Deltawert des mittleren arteriellen Druckes von $\geq 26\text{ mmHg}$ das Risiko für einen akuten Nierenschaden erhöhen.

Beim Vergleich von kardioplegisch wirksamen Lösungen durch SCRASCIA et al. (2011) an 112 Patienten zeigte die kristalloide Lösung nach Bretschneider eine gute Zellprotektion und Wirksamkeit.

In einer Untersuchung von COOK et al. (1997) wurden pulsatile und nicht-pulsatile Blutfluss und ihre Auswirkungen auf die Nierendurchblutung am Hundemodell verglichen – es zeigte sich kein Unterschied. NAKAMURA et al. widersprachen dem allerdings in ihrer Untersuchung am Schafmodell aus dem Jahre 2004, welche zeigte, dass der pulsatile Blutfluss in der Lage ist, einen höheren regionalen renalen Blutfluss in der äußeren und in der medullären Kortikalis und damit eine bessere Nierenperfusion zu erzeugen. Ist der nicht-pulsatile Fluss dazukommend noch mit einem geringen arteriellen Mitteldruck verknüpft, so erniedrigt sich die renale Durchblutung um ca. 30 % (nach WOO et al. (2002), Studie an 50 Patienten, die ein Risiko für eine renale Dysfunktion aufwiesen und an denen Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM durchgeführt wurde. In dieser Studie wurde das renoprotektive Potential von Dopamin untersucht).

Um also die Bedingungen für Ferkel während der Versuche so optimal wie möglich zu halten und nicht etwa eine Schädigung der Niere durch das bloße Management der HLM hervorzurufen, wurden die oben genannten Faktoren berücksichtigt. Da junge, gesunde Ferkel verwendet wurden, konnten erhöhtes Alter und bestehende Allgemeinerkrankung als Risikofaktoren ausgeschlossen werden. Die zu Beginn des Versuches entnommenen Blutproben zeigten, dass paraklinisch keine Einschränkung der Nierenfunktion vorlag. Die Aortenklemmzeit mit 60 Minuten und die gesamte Dauer der HLM-Zeit mit 90 Minuten unterschritten beide die oben genannten, das Risiko eines Nierenschadens erhöhenden Zeiträume. Die Hypothermie während der HLM-Zeit betrug nicht weniger als 28 °C, der Blutfluss wurde bei 100 ml/kg/min gehalten (vgl. 3.2.1), und der mittlere arterielle Druck wurde regelmäßig überwacht, um ein starkes Absinken bzw. einen zu großen Deltawert zu verhindern (vgl. 3.2.2 und 4.6, siehe Tabelle 13). Die kristalloide Lösung nach Bretschneider wurde als Kardioplegie verwendet (vgl. 3.1.3.2.3).

In diesem Versuch wurde eine HLM mit nicht-pulsatilem Blutfluss verwendet, da dies im klinischen Alltag gebräuchlich ist.

5.1 Schädigte die Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine die Niere?

Nach Auswertung und unter Einbeziehung der oben genannten Untersuchungsergebnisse und Werte konnte eine Schädigung der Niere durch die HLM zweifelsfrei nachgewiesen werden – somit kann die erste Fragestellung der vorliegenden Dissertation bejaht werden.

Die HE-Färbung diente als histomorphologische Übersichtsfärbung, welche einen ersten Einblick in die Ergebnisse der Versuche geben sollte. Verschiedene Strukturen wurden begutachtet und ausgewertet.

Die Ergebnisse der Gesamtfläche der Glomeruli und der Epithelhöhe der proximalen Tubuli werden an dieser Stelle ausgelassen. Es ist zu vermuten, dass die suboptimale Entnahmetechnik der Biopsien und die daraus resultierten Quetschdefekte derselben für die fragwürdigen Ergebnisse dieser beiden untersuchten Strukturen verantwortlich zu machen sind. Die Ergebnisse können nicht interpretiert werden.

Debris in den Lumina proximaler Tubuli – ein weiteres Zeichen für pathologische Veränderungen in der Niere (LEE et al. (2009) am Mausmodell) – wurde vor allem in der HLM-Gruppe in individuellen Tubuli gefunden. Dies konnte aber nicht statistisch belegt werden.

Deutliche Ergebnisse, die eine Schädigung der Niere durch die HLM beweisen, brachte vor allem die Betrachtung der Vergrößerung und Verbreiterung des glomerulären Spaltes und der Bildung von Vakuolen in den tubulären Zellen zu Tage. Die Veränderung des glomerulären Spaltes im Sinne einer Flächenvergrößerung und Verbreiterung war schon beim ersten Blick auf die Präparate der HLM-Gruppe ersichtlich, und ließ sich auch statistisch belegen – der Spalt vergrößerte und verbreiterte sich signifikant ($p < 0,05$), nicht nur im Vorher-Nachher-Vergleich innerhalb der HLM-Gruppe, sondern vor allem auch im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Vergleich von Biopsien und post-mortem-Präparaten innerhalb der Kontrollgruppe zeigte keine Veränderungen.

Auch die Bildung von Vakuolen in den Zellen der proximalen Tubuli war in der HLM-Gruppe nicht nur im Vergleich der Biopsien mit den post-mortem-Präparaten, sondern insbesondere auch im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Die Kontrollgruppe zeigte im Vorher-Nachher-Vergleich keine Veränderung bezüglich einer Vakuolenbildung. Ein solches Anschwellen der Tubuli weist auf eine Beeinträchtigung derselben hin (wie auch von GOBÉ et al. (1999) am Rattenmodell ebenso gewertet).

Der Bildung pyknotischer Zellkerne in den Zellen der proximalen Tubuli geht einer Apoptose bzw. einer Tubulusnekrose voraus, und kann daher ebenfalls als deutliches Zeichen

für eine Schädigung der Tubuli gewertet werden (siehe auch SCHUMER et al. (1992), am Rattenmodell). Im Vorher-Nachher-Vergleich wurde sowohl in der Kontroll- als auch in der HLM-Gruppe eine signifikante ($p < 0,05$) Vermehrung pyknotischer Zellkerne gesehen. Die zunehmende Zahl von Kernpyknosen in der Kontrollgruppe ist auf den physischen Stress der Narkose und der Thorakotomie zurückzuführen. Wichtig ist, dass die HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) mehr Kernpyknosen aufwies – was dementsprechend nur durch die HLM ausgelöst worden sein kann. Ein vermehrtes Auftreten von Kernpyknosen weist auf eine mögliche Apoptose hin. Aufgrund dessen wurde die immunhistochemische AIF-TSA-Färbung durchgeführt, welche das Vorhandensein des Apoptose-induzierenden Faktors im Zellkern einer Zelle detektiert. Wie unten weiter ausgeführt wird (vgl. 5.2), zeigte diese Färbung erwartungsgemäß teilweise ein vermehrtes Auftreten von AIF in den Zellkernen der HLM-Gruppe – was mit den Ergebnissen der HE-Färbung übereinstimmt.

Diese Ergebnisse der histologischen Auswertung deuteten stark auf eine Schädigung der Niere durch die HLM hin. Bei der Begutachtung der Blutbilder trat das paraklinische Korrelat zu den histologisch festgestellten Nierenschäden zu Tage, nämlich eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der nierenspezifischen Blutwerte Serumkreatinin- und -harnstoffwerte in der HLM-Gruppe – die in der Kontrollgruppe nicht zu finden war.

Serumkreatinin und -harnstoff können sich rasch nach einer Funktionseinschränkung der Niere erhöhen. Gerade das Serumkreatinin ist ein wichtiger Marker, um Nierenschädigungen einschätzen zu können (SCHNEIDER et al. (2010), retrospektive Studie an 3396 pädiatrischen Patienten). Beide Marker wiesen somit auf eine Beeinträchtigung der Niere durch die HLM hin und zeigten, dass die HLM nicht nur für histologische, sondern auch für paraklinisch detektierbare, für die Nierenfunktion an sich relevant werdende Schädigungen der Niere verantwortlich ist.

Die angeführten Werte und Ergebnisse unterschiedlicher Untersuchungen zeigen deutlich, dass der Niere während des Versuches ein Schaden durch die HLM zugefügt wurde.

Betrachtet man die Werte des Gesamteiweißes aus dem Serum, so fällt auf, dass sich das Gesamteiweiß in der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) verringerte. In der Kontrollgruppe dagegen ist keine signifikante ($p < 0,05$) Veränderung der Proteine im Blut feststellbar. Ein Absinken von Gesamteiweißwerten im Blut assoziiert mit der Durchführung einer HLM ist auch schon von anderen Autoren beschrieben worden (z. B. GABRIEL et al. (2011), Studie an 18 Patienten, bei denen unterschiedliche Blutwerte während und nach einem herzchirurgischen Eingriff mit Verwendung einer HLM bestimmt und ausgewertet wurden). OKAMURA et al. veröffentlichten 2010 eine Untersuchung am Schweinmodell, die zeigte,

dass die HLM (bzw. ihre pathologischen Folgen) die Gefäßpermeabilität erhöht und die Funktion von Schrankensystemen (in der Untersuchung von OKAMURA et al. (2010) die Funktion der Blut-Hirn-Schranke) schädigt, wodurch es zu einem Übertritt von Proteinen aus dem Blut in den Liquor kommt. SEGHAYE et al. stellten 1996 eine Studie an 24 neonatalen Patienten vor, bei denen die Inflammationsreaktion nach Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM untersucht wurde. Diese Studie zeigte unter anderem an Hand absinkender Konzentration von Proteinen im Blut ein HLM-assoziiertes Kapillarleck-Syndrom. Die zitierten Autoren machen die durch die HLM ausgelöste Entzündungsreaktion für das Absinken der Gesamteiweißwerte im Blut verantwortlich. Da bei dem hier vorgestellten Versuch keine Urinalysen durchgeführt wurden, kann nicht bewiesen werden, dass die HLM auch die Nierenschranke bzw. die Filtrierungs- und Resorptionsfunktion der Niere soweit schädigte, dass es zu einem Übertritt von Eiweiß aus dem Blut in den Urin kam. Daher ist das Absinken des Gesamteiweißes im Blut der HLM-Gruppe als Zeichen für eine generelle Schädigung des Körpers durch die HLM zu werten, sei diese ischämischer Genese oder Folge einer generalisierten Entzündungsreaktion. Gegen eine entzündliche Reaktion sprechen jedoch die kurze Induktionszeit und das Fehlen entzündlicher Infiltrate zumindest in dem Zeitfenster der vorliegenden Studie.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Niere eine HLM-assoziierte Schädigung davon getragen hat. Im Folgenden wird nun auf die Natur dieser Schädigung eingegangen.

5.2 Wiesen die gesetzten Schäden die Merkmale eines Ischämie-Reperfusionsschadens auf?

Auch die zweite Fragestellung dieser Dissertation ist zu bejahen.

Dafür sprechen in erster Linie die Ergebnisse der drei immunhistochemischen Färbungen. Die HIF-1-alpha-TSA-Färbung kann eine Akkumulation von HIF-1-alpha in den Zellkernen der Zellen der proximalen Nierentubuli zeigen (was sich in der Färbung als sogenannte Kernpositivität darstellt). Diese Akkumulation findet nach einer hypoxischen Schädigung statt (nach ZAGÓRSKA und DULAK 2004); dies weist darauf hin, dass eine Gewebischämie bestanden hat. HIF-1-alpha wird physiologisch stets in den Zellen exprimiert, aber auch fortwährend abgebaut. Der Abbau kann allerdings nur in Anwesenheit von Sauerstoff stattfinden. Eine Gewebshypoxie führt dementsprechend zu einer Abbauehemmung von HIF-1-alpha, woraufhin es sich in der Zelle anhäuft und in den Kern übertritt – was als HIF-1-alpha-Translokation bezeichnet wird.

In den mit der HIF-1-alpha-TSA-Färbung gefärbten Präparaten der HLM-Gruppe ließ sich eine deutliche Kernpositivität darstellen, im Gegensatz zu den Präparaten der Kontrollgruppe. Die HLM-Gruppe zeigte signifikant ($p < 0,05$) mehr positive Reaktionen auf diese Färbung. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Niere während der HLM-Zeit einer hypoxischen Phase ausgesetzt war, welche sie ischämisch schädigte.

Bei der zweiten durchgeführten immunhistochemischen Färbung, der Nitrotyrosin-AEC-Färbung, wurde Nitrotyrosin in den Zellen der distalen Tubuli und der Sammelrohre detektiert. Nitrotyrosin wird durch reaktive Stickstoffspezies gebildet, welche während der HLM-Zeit in großen Mengen im Organismus entstehen (nach HAYASHI et al. (2004) am Rattenmodell). Ein wichtiger Vertreter der reaktiven Stickstoffspezies ist Peroxinitrit, welches aus Stickstoffmonoxid und Superoxidanionen entsteht. Es ist in Gegenwart von Kohlendioxid seinerseits verantwortlich für die Entstehung von Stickstoffdioxid und Carbonat-Radikalanionen. Diese beiden wiederum reagieren mit der körpereigenen Aminosäure Tyrosin (SZABÓ et al. 2007). Diese als Nitrosylierung bezeichnete Reaktion führt zur Entstehung von Nitrotyrosin, welches in der Immunhistochemie dazu verwendet wird, das Einwirken von Peroxinitrit auf die Zellen sichtbar zu machen – Nitrotyrosin wurde daher als „Fußabdruck des Peroxinitrit“ bezeichnet (VIRÁG et al. 1998). Nitrotyrosin zeigt also nitrosativen Stress an, der auf die Zelle eingewirkt hat – wie es auch bei einer Zellischämie geschieht.

In dieser Färbung reagierten die Präparate aus der HLM-Gruppe deutlich positiv; sie zeigten signifikant ($p < 0,05$) mehr positive distale Tubuli und Sammelrohre als jene der Kon-

trollgruppe. Dieses Ergebnis – das Vorkommen von Nitrotyrosin in den Nierenzellen – zeigt, dass die HLM für die Generierung von nitrosativem Stress verantwortlich ist, welcher auf die Nierenzellen eingewirkt hat.

Die dritte immunhistochemische Färbung, die AIF-TSA-Färbung, zeigt an, ob Stress und negative Kräfte auf die Zelle gewirkt haben, welche zu einer Schädigung der Mitochondrien und dadurch letztendlich zu einer Freisetzung von AIF, dem Apoptose-induzierenden Faktor, geführt haben. Durch die oxidative Phosphorylierung, welche an der mitochondrialen Membran stattfindet, ist das Mitochondrium auf der einen Seite verantwortlich für die Produktion von radikalen Sauerstoffspezies (ROS), gerät auf der anderen Seite aber auch leicht in den Einfluss der ROS und wird von ihnen geschädigt (OTT et al. 2007). Wirkt ein oxidativer Stress auf eine Zelle ein und zieht die Mitochondrien in Mitleidenschaft, so kann dies zur Freisetzung von AIF führen, welches sich physiologisch in den intramembranösen Räumen der Mitochondrien befindet. Freigesetztes AIF durchwandert das Zytosol und führt letztendlich im Zellkern zur Kondensation von Chromatin und zur Fragmentierung von DNS (CANDÈ et al. 2002) – kann also, wie sein Name schon sagt, letztendlich eine Apoptose der Zelle induzieren.

In der AIF-TSA-Färbung zeigten die Präparate der HLM-Gruppe in allen vier betrachteten renalen Strukturen signifikant ($p < 0,05$) höhere prozentuale Anteile an Kernpositivitäten als die der Kontrollgruppe. Die Kernpositivität zeigt bei dieser Färbung an, dass AIF aufgrund einer (oxidativen) Schädigung der Mitochondrien ausgetreten ist und sich nunmehr im Zellkern befindet, wo er Apoptose auslösen kann. Dies ist also als weiterer Hinweis auf eine durch die HLM ausgelöste Ischämie mit vermehrter Produktion von oxidativem Stress zu werten, und außerdem als Zeichen für das Apoptose auslösende Potential der HLM.

Bei den beiden letztgenannten immunhistochemischen Färbungen muss eine Limitation erwähnt werden: Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei beiden Färbungen war es nicht möglich, alle Präparate anzufärben und auszuwerten. Es konnten dementsprechend nicht alle Versuchstiere, aber die Mehrzahl (d. h. mindestens fünf Tiere aus jeder Gruppe), in die Auswertung einfließen.

Einen weiteren Hinweis für die durch die HLM gesetzte Ischämie lieferte die Messung der energiereichen Phosphate durch die RP-HPLC. Die RP-HPLC ist ein etabliertes unter anderem von der Transplantationsmedizin genutztes Verfahren, um Ischämie-Reperfusionsschäden zu erkennen (MAESSEN et al. 1988). Energie in Form von ATP wird in den Zellen des Körpers durch oxidative Phosphorylierung aus Nucleosid-Phosphaten und Adenosin hergestellt. Für die Funktion der ATP-Synthase ist die Arbeit der Atmungskette im Mitochondrion

notwendig. Diese Atmungskette beinhaltet einen sauerstoffabhängigen Komplex. Besteht ein hypoxischer Zustand, so können die energiereichen Phosphatverbindungen im Mitochondrion nicht mehr produziert werden.

Die Evaluation der renalen RP-HPLC Ergebnisse dieses Versuches zeigte diesen Vorgang im Ansatz. In der HLM-Gruppe ist der Wert der Summe der energiereichen Phosphatverbindungen ATP, ADP und AMP der tendenziell niedrigste Wert, obwohl kein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zur Kontrollgruppe bestand. Dieses Ergebnis ist also als weiterer Hinweis für eine ischämische Schädigung durch die HLM zu werten.

Bei der Auswertung der renalen RP-HPLC muss eine Limitation beachtet werden: Die Entnahme und das Schockfrieren der Gewebeproben aus der Niere konnte aus technischen Gründen erst mehrere Minuten nach dem Exitus des jeweiligen Tieres erfolgen. Da die Halbwertszeiten, besonders von Adenosin, aber auch von den drei energiereichen Phosphaten und von Hypoxanthin, sehr kurz sind, ist es möglich, dass bei einigen Ferkeln der Zeitraum zwischen Euthanasie und Entnahme und weiterer Bearbeitung der Probe zu lang war, sodass die Dephosphorylierung überschätzt werden könnte.

Ein Blutwert, der regelmäßig kontrolliert wurde, ist das arterielle Laktat. Laktatwerte erhöhen sich, wenn es im Körper zu hypoxischen Zuständen kommt, die zu Ischämien führen können. Das Laktat zeigte keine signifikanten ($p < 0,05$) Veränderungen in der Kontrollgruppe, wohl aber in der HLM-Gruppe, wo es sich bis zum Ende der Versuche stetig und signifikant ($p < 0,05$) erhöhte. Dies scheint auf den ersten Blick ein eindeutiger weiterer Hinweis für das Vorliegen eines ischämischen Nierenschadens zu sein, muss aber mit Vorsicht betrachtet werden. Da es sich bei den untersuchten Laktatwerten um Körperlaktat – und nicht um renales Laktat – handelt und Laktat kein nierenspezifischer Wert ist, können auch extrarenale Organschädigungen zur Erhöhung des Laktats beigetragen haben. Es kann zwar behauptet werden, dass das Laktat durch die HLM ansteigt; dies muss aber nicht, bzw. nicht nur auf einen ischämischen Schaden an der Niere zurückzuführen sein. RANUCCI et al. veröffentlichten 2006 eine Studie an 500 Patienten, an denen Herzchirurgie mit Verwendung einer HLM durchgeführt worden war, und bei denen peri- und postoperativ Blutproben entnommen und ausgewertet worden waren. Die Forscher kamen unter anderem zu der Erkenntnis, dass eine Hyperlaktämie (definiert als ein Blutlaktatwert von mehr als 3 mmol/l) während der Durchführung einer HLM auf einen maskierten Kreislaufchock hindeute, der vor allem in der postoperativen Phase schädliche Einflüsse besonders auf die Nierenfunktion nehmen würde.

Ein ischämischer Nierenschaden kann zu der Ausbildung des pathologischen Bildes der sogenannten Schockniere führen. Einige der histologischen Merkmale einer Schockniere –

Epithelnekrosen, trübe Schwellung oder hydropische Degeneration in den proximalen Tubuli (WEISS 2007) – wurden, wie oben beschrieben (vgl. 5.1), in den mit HE gefärbten histologischen Präparaten aus der HLM-Gruppe gefunden: Die Kernpyknoten in Zellen der proximalen Tubuli, welche eine Vorstufe von Epithelnekrosen bilden, und die vakuolisierten Zellen in den proximalen Tubuli (Vakuolisierung ist neben trüber Schwellung und hydropischer Degeneration ein anderer Ausdruck für ein Zellödem).

Das klinische Bild einer Schockniere ist das akute Nierenversagen, was sich im paraklinischen Bereich durch einen Anstieg von Serumkreatinin äußert (KINDGEN-MILLES 2009). Wie ebenfalls bereits oben beschrieben kam es in der HLM-Gruppe zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg des Serumkreatinins.

Nach zusammenfassender Betrachtung all dieser Ergebnisse kann also davon ausgegangen werden, dass die Niere einen durch die HLM ausgelösten ischämischen Schaden erlitten hat, welcher sich unter anderem durch die Ausbildung einer beginnenden Schockniere äußerte. Wie schon unter 2.4.1 erläutert, kommt es bei einem HLM-assoziierten Ischämie-Reperfusionsschaden – wie hier nach Sichtung der oben erläuterten Ergebnisse offensichtlich vorliegend – zunächst während der ischämischen Phase zu reversiblen Zellschädigungen, welche sich für gewöhnlich erst in der Reperfusionsphase als irreversibel manifestieren (MCCOLL et al. 1998). Die festgestellte HLM-assoziierte Nierenschädigung weist – nach Betrachtung der in diesem Absatz vorgestellten Ergebnisse – also vorrangig die Natur eines Ischämie-Reperfusionsschadens auf.

5.3 Konnte die Schädigung durch (-)-Epigallocatechin-3-Gallat abgemildert werden?

Die Antwort, die für die dritte Fragestellung dieser Dissertation gefunden werden konnte, ist sehr interessant: EGCG milderte tatsächlich die Schädigung der Niere durch die HLM ab. Diese Studie zeigt, dass EGCG in der Lage ist, durch die HLM ausgelöste Nierenschädigungen teilweise unvollständig und teilweise sogar vollständig zu verhindern.

Die Auswertung der mit HE angefärbten Präparate der EGCG-Gruppe zeigte, dass die Bildung pyknotischer Zellkerne in den Zellen der proximalen Tubuli in allen drei Gruppen im Vorher-Nachher-Vergleich der Präparate zunahm. Während die HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) mehr Kernpyknosen aufwies als die Kontrollgruppe, befand sich die Anzahl der in der EGCG-Gruppe aufgefundenen Pyknosen zwischen der der Kontroll- und der der HLM-Gruppe. Die EGCG-Gruppe unterscheidet sich von keiner der beiden anderen Gruppen signifikant ($p < 0,05$).

Die Bildung vakuolisierter Zellen in den proximalen Tubuli, ebenfalls durch die HE-Färbung sichtbar gemacht, verstärkte sich zwar in der EGCG-Gruppe im Vergleich der post mortem entnommenen Proben mit den Biopsien; verglich man jedoch die post-mortem-Proben der drei Gruppen, so zeigte sich, dass die HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) mehr proximale Tubuli mit vakuolisierten Zellen aufwies als die EGCG- und die Kontrollgruppe. Zwischen letzteren beiden bestand kein Unterschied. Bezüglich der vakuolisierten Zellen kann also von einer unvollständigen Verhinderung bzw. einer Abmilderung der durch die HLM gesetzten Schäden gesprochen werden.

Eine ebensolche unvollständige Verhinderung bzw. Abmilderung durch das EGCG wird in den beiden immunhistochemischen Färbungen HIF-1-alpha-TSA und Nitrotyrosin-AEC erkennbar. In den beiden Erstgenannten zeigte die HLM-Gruppe die signifikant ($p < 0,05$) höchste Anzahl an Kernpositivitäten bzw. positiv angefärbten distalen Tubuli und Sammelrohren, während die Kontrollgruppe die niedrigste Anzahl zeigte. Die EGCG-Gruppe befand sich genau dazwischen, indem sie eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Anzahl an positiven Kernen bzw. positiven distalen Tubuli und Sammelrohren als die HLM-Gruppe enthielt, aber eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Anzahl als die Kontrollgruppe. Wie oben beschrieben (vgl. 5.2), weisen diese beiden immunhistochemischen Färbungen auf einen (durch die HLM gesetzten) Ischämie-Reperfusionsschaden in der Niere hin – die HIF-1-alpha-TSA-Färbung beweist, dass in den Zellen der Niere der HLM-Gruppe ein ischämischer bzw. hypoxischer Zustand geherrscht hat, und die Nitrotyrosin-AEC-Färbung beweist, dass es in der

HLM-Gruppe zur Entstehung von Stickstoffmonoxid und freien Sauerstoffradikalen (durch die Hypoxie ausgelöst) kam, welche sich zu dem zellschädlichen Peroxinitrit (dessen Vorhandensein durch diese Färbung angezeigt wird) verbunden haben. Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der EGCG-Gruppe zeigte sich nun, dass EGCG diese beiden unterschiedlichen Schädigungen der Niere durch die HLM nicht völlig verhindern kann. EGCG ist jedoch in der Lage, sie signifikant ($p < 0,05$) abzumildern.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen der EGCG-Gruppe sind aus einem weiteren Grund von Interesse: Die Tatsache, dass EGCG offensichtlich mildernden Einfluss auf (durch freie Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid gesetzte) Schäden nahm, deren Vorhandensein ein Beweis für einen entstandenen Ischämie-Reperfusionsschaden sind, lässt sich auf den Wirkmechanismus von EGCG – auf den später weiter eingegangen wird – zurückführen: Es ist ein Antioxidans und wirkt in dieser Funktion zum einen der Bildung freier Sauerstoffradikale entgegen – wie die Ergebnisse der HIF-1-alpha-TSA-Färbung in der EGCG-Gruppe zeigen – und zum anderen als Stickstoffmonoxidscavenger – wie die Ergebnisse der Nitrotyrosin-AEC-Färbung in der EGCG-Gruppe zeigen.

Bei der dritten immunhistochemischen Färbung, der AIF-TSA-Färbung, zeigte EGCG in einer der vier betrachteten Strukturen – in den distalen Tubuli – eine abmildernde Wirkung, konnte aber den durch die HLM gesetzten Schäden nicht vollständig entgegenwirken: Die distalen Tubuli in der EGCG-Gruppe zeigten weder signifikant ($p < 0,05$) weniger Kernpositivitäten als die der HLM-Gruppe, noch signifikant ($p < 0,05$) mehr Kernpositivitäten als die der Kontrollgruppe. Bei einer anderen Struktur in dieser Färbung – den Glomeruli – zeigte die EGCG-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) weniger Kernpositivitäten als in der HLM-Gruppe, und keinen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied zur Kontrollgruppe. Hier konnte EGCG dem negativen Effekt der HLM also vollständig entgegenwirken. Diese Färbung gibt – ebenso wie die beiden anderen immunhistochemischen Färbungen – Hinweise auf eine ischämische Schädigung der Zelle während der HLM-Zeit. Des Weiteren zeigt sie die negative Einwirkung von radikalen Sauerstoffspezies auf die Zelle an, und die Induktion einer Apoptose. Die Ergebnisse dieser Färbung sind dahingehend sehr interessant, als dass sie nicht nur zeigen, dass EGCG dem durch die HLM-assoziierte Ischämie ausgelösten oxidativen Stress entgegenwirken konnte, sondern auch, dass EGCG offensichtlich ein antiapoptotisches Potential besitzt. Diese antiapoptotische Wirkung wurde schon von SCHROEDER et al. (2009) nach ihrer in-vitro-Untersuchung an Rattenneuronen beschrieben und darauf zurückgeführt, dass EGCG sich in Mitochondrien anreichert, wo es als Radikalfänger wirkt.

Noch eindeutiger zeigte sich die Wirkung von EGCG in der Betrachtung der Größe und Breite des glomerulären Spaltes, auch zu sehen in der HE-Färbung. Beide Parameter veränderten sich im Vorher-Nachher-Vergleich innerhalb der EGCG-Gruppe nicht. Der Spalt vergrößerte und verbreiterte sich also nicht, wie der der HLM-Gruppe, sondern verhielt sich ebenso wie der der Kontrollgruppe. Im Vergleich der post mortem entnommenen Proben kann gesehen werden, dass der Spalt der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) größer und breiter war als der der EGCG-Gruppe, während es zwischen EGCG- und Kontrollgruppe keine Unterschiede gab. Insgesamt kann hier also von einer vollständigen Verhinderung der negativen Auswirkungen, die die HLM auf die Nieren hat, gesprochen werden.

Auch bei der Betrachtung der nierenspezifischen Blutwerte Serumkreatinin und -harnstoff zeigte sich eine vollständige Verhinderung der durch die HLM gesetzten Nierenschäden. Ebenso wie die Kontrollgruppe stiegen beide Blutwerte bei der EGCG-Gruppe nicht signifikant ($p < 0,05$) an. Die Werte der HLM-Gruppe wiederum zeigten einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg am Versuchsende. Auch im Vergleich der Deltawerte aller drei Gruppen fiel deutlich auf, dass die Serumkreatinin- und -harnstoffwerte der HLM-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) höher als die der EGCG-Gruppe waren, während sich zwischen der EGCG- und der Kontrollgruppe kein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zeigte. Ein Anstieg dieser beiden Blutparameter, welche paraklinisch auf eine Funktionseinschränkung der Niere hinweisen, konnte also durch EGCG verhindert werden.

Auch die Betrachtung der RP-HPLC Ergebnisse zeigte ein weiteres Mal, dass EGCG die durch die HLM gesetzten Schäden teilweise vollständig verhindern konnte. Die Summe der energiereichen Phosphatverbindungen der EGCG-Gruppe unterschied sich nicht signifikant ($p < 0,05$) von der der Kontrollgruppe. Diejenige der HLM-Gruppe war signifikant ($p < 0,05$) niedriger als die der EGCG-Gruppe. Diese Werte lassen erkennen, dass EGCG der Niere einen wesentlich geringeren Energieverbrauch während der Versuchszeit ermöglichte. Die Werte der Dephosphorylierungsratios $ATP/(ADP+AMP)$ und $ATP/(ADP+AMP+Adenosin)$ zeigen eine signifikante ($p < 0,05$) Erhaltung von ATP in der EGCG-Gruppe im Vergleich zur HLM-Gruppe. Dies lässt sich aus den unterschiedlichen Wirkweisen von EGCG erklären (vgl. 2.6), die hier offensichtlich zusammen arbeiten: Die Wirkung als Antioxidans – Radikalfänger (in-vitro-Studie von GUO et al. 1999) und Stickstoffmonoxidscavenger (in-vitro-Studie von PAQUAY et al. 2000) – ebenso wie die antiapoptotische Wirkung (in-vitro-Studie von JANG et al. 2010); EGCG ist in der Lage, die Zellen der Niere vor den negativen Einflüssen von (durch einen Ischämie-Reperfusionsschaden ausgelöstem) oxidativem und nitrosativem Stress zu schützen, da dieser zu einem erhöhten ATP-Verbrauch geführt hätte. Außerdem zeigt

EGCG auch hier wieder – wie bei den Ergebnissen der AIF-TSA-Färbung – sein antiapoptisches Potential.

An dieser Stelle muss auch eine Beachtung des arteriellen Laktats erfolgen. Während es sich in der Kontroll- und in der HLM-Gruppe eindeutig verhielt – es zeigte keine Veränderung in der Kontrollgruppe und einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg in der HLM-Gruppe – zeigte es in der EGCG-Gruppe zwar in der ersten Messperiode (von 0 bis 90 Minuten) einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg, blieb dann aber auf dem erreichten Level und stieg bis zum Versuchsende nicht weiter an, bzw. zeigte sogar eine abfallende Tendenz. Hinzukommend stellte sich der Laktatendwert der EGCG-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) niedriger dar als der Endwert der HLM-Gruppe, und zeigte keinen signifikanten ($p < 0,05$) Unterschied zur Kontrollgruppe. Wie oben beschrieben (vgl. 5.2), ist ein erhöhter Laktatwert ein weiteres Zeichen für eine Ischämie, die auf den Körper eingewirkt hat. Auch durch diese Ergebnisse zeigt sich die Wirkung des EGCG, welches in der Lage ist, die durch die HLM gesetzten ischämischen Schäden abzumildern. Trotzdem darf auch bei diesem Ergebnis aus der Auswertung der Laktatwerte nicht die oben erwähnte Limitation außer Acht gelassen werden: Es wurde hier Körperlaktat untersucht, kein renales Laktat, und somit zeigt dieser Wert zwar, dass EGCG die Bildung ischämischer Schäden abmildern kann, nicht aber, dass es sich hierbei um Schäden renaler Genese handelt.

Das Gesamteiweiß, ein anderer untersuchter Blutparameter, zeigte in der HLM-Gruppe einen signifikanten ($p < 0,05$) Abfall. Das kann zwar nicht auf einen spezifischen Nierenschaden, wohl aber auf eine HLM-assoziierte Schädigung des Körpers hinweisen. Die EGCG-Gruppe verhielt sich auch bei diesem Wert wie die Kontrollgruppe – es zeigte sich kein signifikanter ($p < 0,05$) Abfall. Die Auswertung dieses Blutwertes zeigt also auch einen positiven, protektiven Effekt, den EGCG den durch die HLM ausgelösten Schäden entgegenzusetzen konnte.

Insgesamt zeigen die genannten Ergebnisse, dass EGCG in der in diesen Versuchen verwendeten Dosierung (10 mg/kg KM) eine protektive Wirkung auf die Niere gegen die durch die HLM gesetzten Schäden hat. Bei dieser offensichtlichen Nierenprotektion arbeiten die unterschiedlichen Wirkprinzipien von EGCG (vgl. 2.6) zusammen – wie oben durch die verschiedenen Färbungen, die Blutproben, die Blutgasanalysen und die Ergebnisse der RP-HLPC dargestellt – um die HLM-assoziierten pathologischen Einwirkungen auf den Körper – allen voran der Ischämie-Reperfusionsschaden – teilweise abzumildern oder ihnen teilweise sogar ganz entgegenzuwirken.

5.4 Schlussfolgerungen für die Humanmedizin

Ein kardiochirurgischer Eingriff beispielsweise zur Korrektur angeborener Herzfehler bei Kindern – der in den meisten Fällen den Einsatz einer HLM erfordert – ist mit mehreren möglichen Komplikationen assoziiert, welche die postoperative Morbidität und Mortalität erhöhen und für die Patienten die Dauer des Krankenhausaufenthalts verlängern können. Eines der bedeutendsten Probleme ist eine Schädigung der Niere, welche bei Kindern mit einer höheren Wahrscheinlichkeit auftritt als bei Erwachsenen (vgl. 2.5). Akutes Nierenversagen bzw. eine Schädigung der Niere nach Herzchirurgie wird beim Erwachsenen laut einer Übersichtsarbeit von ROSNER und OKUSA aus dem Jahre 2006 in bis zu 30 % der Fälle – abhängig von der Untersuchung und der Definition der Nierenbeeinträchtigung – beobachtet. KARKOUTI et al. veröffentlichten zum Beispiel in ihrer Studie an 3500 Patienten aus dem Jahre 2009, an denen ein Eingriff am offenen Herzen mit Verwendung einer HLM durchgeführt wurde, folgende Zahlen: 24 % der Patienten zeigten einen mehr als 25 %-igen Rückgang der geschätzten glomerulären Filtrationsrate innerhalb einer Woche nach dem Eingriff, 7 % einen mehr als 50 %-igen Rückgang und 3 % einen mehr als 75 %-igen Rückgang. CONLON et al. kamen 1999 in ihrer Studie an 2844 Patienten, an denen Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM durchgeführt wurde, zu folgenden Ergebnissen: 7,9 % der Patienten entwickelten ein akutes Nierenversagen (definiert als Anstieg des Serumkreatinins auf 1 mg/dl über den Ausgangswert), wobei die Mortalität in dieser Patientengruppe bei 14 % lag, und 0,7 % der Patienten entwickelten ein akutes Nierenversagen, welches mit Dialyse therapiert werden musste – in dieser Patientengruppe lag die Mortalität bei 28 %.

Eine negative Beeinflussung der Niere durch die HLM war bereits Gegenstand vieler Studien, so z. B. durch STALLWOOD et al. (2004), die in ihrer Studie an 2199 Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko für akutes Nierenversagen assoziiert mit der Verwendung einer HLM nach Koronararterienbypass beobachteten, und durch TIRILOMIS et al. (2009), die histologische Veränderungen in den Nieren von Ferkeln nach Eingriffen am Herzen mit Verwendung einer HLM nachwiesen.

Bei einem 2007 in Italien durchgeführten Acute Dialysis Quality Initiative Konsensustreffen zum Thema Kardiochirurgie-assoziierte akute Nierenschädigung wurden fünf Mechanismen angeführt, welche als pathophysiologische Ursachen für die Funktionseinschränkung der Niere in dieser Situation gelten: exogene und endogene Toxine, metabolische Faktoren, Ischämie-Reperfusionsschaden, neurohormonale Aktivierung, Inflammationsreaktion und oxidativer Stress (SHAW et al. 2008). Laut den Übersichtsarbeiten von LAFFEY et al. (2002)

und ATLURI et al. (2009) sind die Begleiterscheinungen der HLM – das Verursachen einer Inflammationsreaktion und eines Ischämie-Reperfusionsschadens – für die Schädigungen der Niere verantwortlich zu machen. Auch ASIMAKOPOULOS stellte 1999 die Vermutung an, dass Nierenschädigung nach einem kardiochirurgischen Eingriff mit einer HLM vor allem auf einen Ischämie-Reperfusionsschaden, möglicherweise mit Beteiligung einer Inflammationsreaktion, zurückzuführen sei. Dass ein Ischämie-Reperfusionsschaden immer mit der Produktion freier Radikaler einhergeht, wurde schon unter 2.4.1 dargelegt. An dieser Stelle soll nochmals betont werden, dass auch die Inflammationsreaktion selbst zu einer pathologischen Überproduktion freier Radikaler im Körper führt (KAWAHITO et al. (2000), Studie an elf Patienten, an denen kardiochirurgische Eingriffe mit Verwendung einer HLM durchgeführt wurden, und deren Blut dann auf das Vorhandensein von freien Radikalen und bestimmten Entzündungswerten untersucht wurde). Allerdings spricht die in der vorliegenden Studie beobachtete gleichzeitige nukleäre Translokation von HIF-1-alpha in diesem Fall für einen Schaden hypoxischer bzw. ischämischer Genese.

Der Ischämie-Reperfusionsschaden, der dadurch ausgelöste oxidative Stress und seine negativen Auswirkungen auf die Niere können durch eine Operation am Herzen ohne Verwendung der HLM signifikant gemindert werden (GERRITSEN et al. (2001), Studie an 40 Patienten, an denen Kardiochirurgie mit bzw. ohne Verwendung einer HLM vorgenommen wurde. Verschiedene Marker für oxidativen Stress und für eine Nierendysfunktion wurden ausgewertet). Die Möglichkeit, auf die Verwendung einer HLM zu verzichten, ist allerdings nicht bei jeder Art kardiochirurgischer Eingriffe gegeben (vgl. Tabelle 2). Besonders die Korrektur schwerwiegender kongenitaler Herzfehler, die oft komplexe und lange Operationen am kindlichen Organismus erfordern, ist ohne eine HLM meist nicht möglich. Daher wird nach Möglichkeiten gesucht, die Niere vor Schädigungen durch die HLM zu schützen.

Da, wie oben dargelegt, oxidativer und nitrosativer Stress eine wichtige Rolle bei der negativen Beeinflussung der Niere durch die HLM spielen, lag es für viele Forscher nahe, Antioxidantien und ihre diesbezügliche Wirkung zu untersuchen. Dabei wurden nicht nur positive Erfahrungen gemacht: Das „klassische“ Antioxidans N-Acetylcystein zum Beispiel zeigte keine renoprotektive Wirkung nach Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM (NAUGHTON et al. (2008) und RISTIKANKARE et al. (2006), Studie an 80 Patienten, die mildes bis moderates Nierenversagen aufwiesen und kardiochirurgischen Eingriffen mit Verwendung einer HLM unterzogen wurden. Die prophylaktische Gabe von N-Acetylcystein zeigte keine renoprotektive Wirkung). MCCOLL et al. stellten dagegen 1998 eine Studie an 24 Patienten vor, an welchen ein Eingriff am Herzen mit Verwendung einer HLM vorge-

nommen wurde, und welche ermutigendere Ergebnisse zeigte. Prä- und postoperativ wurde Blut abgenommen, und unter anderem der Status aller Plasmaantioxidantien (TPAS) und das Ausmaß der Lipidperoxidation – eine durch freie Radikale verursachte Schädigung der Zellmembran – bestimmt. MCCOLL und ihre Kollegen schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass sich ein präoperativ hoher Wert von TPAS und der Konsum von Plasmaantioxidantien positiv für den Patienten auswirken könnte, indem diese Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies und die mit diesen assoziierte Lipidperoxidation bieten könnten. Auch BELBOUL et al. veröffentlichten 2001 eine ex-vivo-Untersuchung an dem Blut von 34 Patienten, an denen Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM durchgeführt worden war, und konnten zeigen, dass das Antioxidans Allopurinol Lipidperoxidation von Erythrozyten reduzierte.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Antioxidans EGCG verwendet. Die Besonderheit von EGCG und der Grund, warum gerade dieses Antioxidans in der hier vorgestellten Studie untersucht wurde, ist, dass es nicht nur als Radikalfänger (in-vitro-Studie von GUO et al. 1999) und Stickstoffmonoxidscavenger (in-vitro-Studie von PAQUAY et al. 2000) agiert. EGCG verfügt über weitere Wirkmechanismen, die es – im Zusammenhang mit seiner antioxidativen Aktivität – in der Situation, in der der Körper sich während und nach einem kardiochirurgischen Eingriff mit Verwendung einer HLM befindet, zu einer potentiell organprotektiv wirksamen Substanz machen: Es ist antiinflammatorisch (EL-MOWAFY et al. (2011), Studie über Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität am Rattenmodell) und antiapoptotisch (in-vitro-Studie von JANG et al. (2010); diese Studie zeigte auch die Stickstoffmonoxid inhibierenden Fähigkeiten von EGCG) wirksam.

EGCG ist ein natürlicher Bestandteil des grünen Tees (*Camellia sinensis*). Von den unterschiedlichen, in grünem Tee enthaltenen Katechinen macht EGCG den größten Anteil aus. Obwohl EGCG und seine unterschiedlichen Wirkungen und Vorzüge in den letzten Jahren ein viel erforschtes Gebiet darstellte und sich herausstellte, dass es der Medizin auf unterschiedlichen Gebieten von einigem Nutzen sein kann, wurde eine vergleichbare Untersuchung bis jetzt noch nicht vorgestellt. Es existieren bereits einige vielversprechende Studien über die organprotektive Funktion von EGCG nach Ischämie-Reperfusionssituationen: ANEJA et al. stellten 2004 eine Untersuchung am Rattenmodell vor, die zeigte, dass EGCG das Herz während einer Ischämie-Reperfusion schützen konnte, FIORINI et al. zeigten 2005 die hepatoprotektiven Fähigkeiten von EGCG nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden am Mausmodell und CHOI et al. veröffentlichten 2004 eine Untersuchung über die schützende Wirkung von EGCG auf das Gehirn nach einer Ischämie-Reperfusionssituation am Rattenmodell.

Außerdem gibt es einige ermutigende Untersuchungen mit signifikanten Ergebnissen über die renoprotektive Wirkung von EGCG durch seine antioxidativen Mechanismen. EL-MOWAFY et al. zeigten 2011 am Rattenmodell, dass EGCG die Nephrotoxizität des Chemotherapeutikums Cisplatin reduziert. KAKUTA et al. erforschten ebenfalls 2011 am Rattenmodell, dass ein aus einer 45-minütigen vollständigen Okklusion der Nierenarterie resultierender Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere von EGCG abgemildert werden kann, und ITOH et al. zeigten 2005 in vitro, dass EGCG die kanine Niere vor Urolithiasis schützen kann. JANG et al. stellten 2006 eine Studie am Rattenmodell über die positive Wirkung von EGCG auf Nieren von normo- und hypertensiven Tieren vor, welchen ein Ischämie-Reperfusionsschaden zugefügt worden war – allerdings im Rahmen einer Transplantation, nicht durch Herzchirurgie mit Verwendung einer HLM.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass eine Nierenschädigung nach Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM eine schwerwiegende Komplikation in der Kinderkardiologie bzw. -chirurgie darstellt, über deren Vorkommen und Entstehen eine Fülle an Forschungsmaterial vorliegt. Aufgrund der bereits beschriebenen pathologischen Mechanismen, die Organschädigungen nach Eingriffen am Herzen mit einer HLM bedingen, sind Antioxidantien und ihre vorteilhaften Wirkungen auf unterschiedliche Organe in den letzten Jahren intensiv erforscht worden. Es existieren einige Studien über EGCG, welche mit vielversprechenden Ergebnissen aufwarten – allerdings bislang nicht in Bezug auf renoprotektive Wirkung in der Situation eines kardiochirurgischen Eingriffes mit Verwendung einer HLM. Die in dieser Dissertation vorgestellte Untersuchung ist die erste, die sich mit der durch die HLM während eines kardiochirurgischen Eingriffes ausgelösten Nierenschädigung und der Möglichkeit ihrer positiven Beeinflussung durch EGCG auseinandersetzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen eindeutig, dass EGCG nicht nur in seiner Funktion als Antioxidans – als Radikalfänger – auf den Körper einwirkte und sich renoprotektiv verhielt, sondern auch durch seine antiapoptotischen und Stickstoff bindenden Fähigkeiten wirkt. EGCG präsentierte sich in dieser Untersuchung als eine wirksame und sichere Substanz, die die negativen Effekte der HLM auf die Nieren abmildern und ihnen teilweise vollständig entgegenwirken konnte. Für die Humanmedizin stellt das ein interessantes Ergebnis da, welches Beachtung finden und zu weiteren Forschungsbemühungen motivieren sollte.

5.5 Schlussfolgerungen für die Veterinärmedizin

Für die Zukunft der Veterinärmedizin hat diese Studie ebenso Relevanz. Wie schon zuvor beschrieben (vgl. 2.2) werden kardiochirurgische Eingriffe bei Tieren noch selten durchgeführt. Auch sind bisher nur wenige veterinärmedizinischen Chirurgen mit dem wichtigsten medizintechnischen Hilfsmittel der humanmedizinischen Kardiochirurgie, welches viele Operationen am Herzen in der heutzutage üblichen Form überhaupt erst ermöglicht – der HLM – vertraut. Dennoch kommen kongenitale kardiovaskuläre Defekte, die einer Korrektur bedürfen, natürlich ebenso bei Tieren vor. Die Rolle und die Bedeutung, die Tiere für Menschen haben, hat sich in den letzten Jahrzehnten weiterentwickelt und geändert – das Tier ist gerade in der westlichen Welt nicht mehr nur Helfer bei der Arbeit oder Nahrungsquelle, sondern vor allem Freund, Begleiter und Familienmitglied. Dies hat auch in der Veterinärmedizin zu Veränderungen geführt: Diagnostik und Therapie orientieren sich bezüglich den zur Verfügung stehenden Methoden und Instrumenten und auch bezüglich der Qualität zunehmend am Vorbild der Humanmedizin. Es besteht begründete Hoffnung, dass immer mehr Tierhalter in der Zukunft weniger Kosten und Mühen scheuen werden, um „ihren“ Tieren ein gesundes, schmerzfreies und einschränkungsarmes Leben zu ermöglichen.

Bezogen auf den Bereich der Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM ist diese Entwicklung heute schon zum einen bei in menschlicher Obhut gehaltenen Wildtieren zu sehen – als Beispiel seien etwa Zootiere wie das Elefantenkalb „Lola“ aus dem Münchner Zoo genannt, das im Januar 2012 im Rahmen einer Kollaboration von Veterinär- und Humanmedizinern an einem Septumdefekt und einer Gefäßfehllokation operiert werden sollte, aber präoperativ verstarb (ANON. 2012); oder der Bengalische Tigerwelppe „Karma“ aus dem Tiger Creek Wildlife Refuge, Texas, USA, dessen Fallot-Tetralogie schon im Jahre 2000 ebenfalls durch ein Ärzteteam aus Veterinär- und Humanmedizin korrigiert wurde (STERNBERG 2000), der aber postoperativ verstarb (FUERST 2000).

Zum anderen gibt es beispielsweise in den USA und Japan veterinärmedizinische Chirurgen, die erfolgreich kongenitale Herzdefekte unter Verwendung einer HLM mit Hypothermie und Kardioplegie bei privat gehaltenen Hunden korrigieren: YAMANO et al. veröffentlichten 2011 einen Bericht über die Korrektur eines atrioventrikulären Septumdefektes mit zugehöriger schwerer Atrioventrikularklappen- Fehlbildung bei einem fünf Monate alten Sheltie. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung war der Hund fast sieben Jahre alt und zeigte keine klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz, obwohl sich echokardiographisch eine Mitralinsuffizienz feststellen ließ. Eine retrospektive Analyse von TANAKA et al. aus dem

Jahre 2009 berichtet über zehn Hunde unterschiedlicher Rassen mit bis zu zehn Kilogramm Körpergewicht, deren Pulmonalstenosen in den Jahren 1992 bis 2002 kardiochirurgisch mit Verwendung einer HLM korrigiert wurden. Zwei der Tiere starben postoperativ. Zum Zeitpunkt der Zusammenstellung der Analyse lebten sieben Tiere und hatten keine klinischen Zeichen einer Herzinsuffizienz, obwohl zwei von ihnen auskultatorisch einen leichten Befund aufwiesen. KOMTEBEDDE et al. veröffentlichten 1993 eine detaillierte Beschreibung über eine Herzoperation mit Verwendung einer HLM an einer Reihe veterinärmedizinischer Patienten. Bei sieben Hunden wurde eine kongenitale subvalvuläre Aortenstenose kardiochirurgisch korrigiert. Die Tiere wurden im Mittel 15,8 Monate nach dem Eingriff kontrolliert. Zu diesem Zeitpunkt waren sechs der sieben Patienten am Leben und wiesen einen stabilen Zustand auf.

Diese Veröffentlichungen zeigen, dass in einigen veterinärmedizinischen Zentren schon seit Jahren erfolgreich komplexe kardiochirurgische Eingriffe mithilfe von einer HLM auf humanmedizinischem Niveau durchgeführt werden. Eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet auch in Deutschland wäre wünschenswert. Aus experimentellen Tierversuchen für die Humanmedizin steht ein reicher kardiochirurgischer Erfahrungsschatz zur Verfügung. Außerdem wären Kollaborationen von Veterinär- und Humankardiologen und -chirurgen, und die Unterstützung durch herzchirurgisch erfahrene veterinärmedizinische Kollegen aus dem Ausland vielversprechend, um auch in Deutschland Kardiochirurgie an Tieren zu etablieren. Fortschritte in diesem Bereich würden zum einen zoologischen Gärten zu Gute kommen, für die Fälle wie die oben beschriebenen – nämlich potentiell korrigierbare kongenitale Herzfehler bei unter Artenschutz stehender und oft unter schwierigen, kostenintensiven Bedingungen reproduzierter Nachzucht – einen großen finanziellen wie emotionalen Verlust darstellt. Zum anderen würden sie eine wichtige Option für private Tierhalter von herzkranken Haustieren bieten, welche über die derzeit zur Verfügung stehende medikamentöse – und damit oft nur palliative – Therapie weit hinausgeht.

6 Zusammenfassung

Miriam Twal

Renoprotektive Effekte von (-)-Epigallocatechin-3-Gallat bei extrakorporaler Zirkulation mittels Herz-Lungen-Maschine in einem Ferkelmodell

Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Abteilung Forschung und Lehre der Herzchirurgie des Herzzentrums der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im August 2012

(99 Seiten, 21 Abbildungen, 13 Tabellen, 120 Literaturangaben, Anhang)

Schlüsselwörter: Antioxidans, (-)-Epigallocatechin-3-Gallat, Ferkelmodell, Herz-Lungen-Maschine, Ischämie-Reperfusionsschaden, Nierenschädigung

In dieser Dissertation wurden am Ferkelmodell (8-15 kg, drei Gruppen: „Kontrolle“ n=7, „Herz-Lungen-Maschine (HLM)“ n=10, „(-)-Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG)“ n=6, die Kontrollgruppe wurde thorakotomiert, die HLM- und die EGCG-Gruppe wurden thorakotomiert und für 90 Minuten an eine HLM angeschlossen, die EGCG-Gruppe erhielt vor und nach der HLM-Zeit EGCG) drei Fragestellungen behandelt: Erstens wurde untersucht, ob die Verwendung einer HLM während eines kardiochirurgischen Eingriffes unter hypothermen Bedingungen mit nicht-pulsatilem Blutfluss und Kardioplegie die Niere schädigte. Dafür wurden Paraffinschnitte der Niere aus der Kontroll- und der HLM-Gruppe mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt und unterschiedliche Strukturen betrachtet, wobei histopathologische Veränderungen in der HLM-Gruppe auffielen. Paraklinisch fanden sich erhöhte nierenspezifische Blutwerte (Serumkreatinin und -harnstoff) in der HLM-Gruppe. Diese Ergebnisse waren hinweisend für eine funktionell relevante Schädigung der Niere durch die HLM. Unterstützend kam ein Absinken des Gesamteiweißes im Serum der HLM-Gruppe hinzu, was auf eine generelle Schädigung des Organismus durch die HLM hindeutete.

Zweitens wurde betrachtet, ob die gesetzten Schäden die Merkmale eines Ischämie-Reperfusionsschadens aufwiesen. Hierzu wurden Paraffinschnitte der Niere aus der Kontroll- und der HLM-Gruppe immunhistochemisch (Hypoxie-induzierter-Faktor-1-alpha-Tyramide-Signal-Amplification (HIF-1-alpha-TSA)-, Nitrotyrosin-3-Amino-9-Ethylcarbazol (Nitrotyrosin-AEC)- und Apoptose-induzierender-Faktor-Tyramide-Signal-Amplification (AIF-TSA)-Färbung) angefärbt. Dabei zeigte sich, dass sich die HLM-Gruppe in einer hypoxischen Situation befand (HIF-1-alpha Akkumulation in den Zellkernen), nitrosativem Stress ausgesetzt war (Nitrotyrosin in den Tubuli) und dass sie teilweise so stark geschädigt wurde, dass Apoptose induziert wurde (AIF in Zellkernen) – alle drei Färbungsergebnisse waren hinweisend für einen ischämischen Zustand, in dem sich die HLM-Gruppe befunden hat. Auch die Ergebnisse der durchgeführten renalen Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) deuteten auf ebendies hin. Unterstützend wirkten die Ergebnisse des arteriellen Laktats – die HLM-Gruppe zeigte eine Hyperlaktämie – und die Tatsache, dass einige der histologischen Merkmale für eine frühe Schockniere (welche ischämischen Ursprungs sein kann) in der HLM-Gruppe gefunden wurden. Dies alles zeigte, dass der HLM-assoziierte Nierenschaden vorrangig die Natur eines Ischämie-Reperfusionsschadens aufwies. Drittens wurde untersucht, ob EGCG diese HLM-assoziierte Schädigung abmildern konnte. Dafür wurden bei der EGCG-Gruppe alle oben genannten Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass EGCG in der Dosierung 10 mg/kg eine renoprotektive Wirkung gegen die HLM-assoziierten Schäden hatte, und diese abmildern bzw. ihnen entgegenwirken konnte.

Diese Ergebnisse sind für die pädiatrische Kardiochirurgie interessant, welche zum Beispiel bei der Korrektur angeborener Herzdefekte auf die Verwendung der HLM angewiesen ist. Komplikationen wie eine Nierenschädigung post operationem sind nicht selten und verkomplizieren den Verlauf. Die vorliegende Dissertation zeigt das renoprotektive Potential des in grünem Tee vorkommenden Katechins EGCG im Umfeld eines kardiochirurgischen Eingriffes mit Verwendung einer HLM. Die Wirksamkeit dieser Substanz ist wahrscheinlich darin begründet, dass sie mehr als ein Antioxidans ist. Neben seiner Radikalfänger- und Stickstoffmonoxidscavenger-Fähigkeiten ist EGCG außerdem antiapoptotisch wirksam.

Derzeit wird die Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM in der Veterinärmedizin nur in wenigen Zentren angewendet. Es besteht für die Zukunft jedoch die Hoffnung, dass gerade für Kleintierbesitzer, die ihre Tiere als Familienmitglied betrachten, und auch für zoologische Einrichtungen bei der Diagnose eines Herzfehlers die Kardiochirurgie mit Verwendung einer HLM als Therapiemöglichkeit eine interessante und realistische Alternative zur bislang angewandten palliativen medikamentösen Therapie darstellen kann.

7 Summary

Miriam Twal

Renoprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate in a piglet model of extracorporeal circulation with a heart-lung-machine

Large Animal Clinic for Theriogenology and Ambulatory Services, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Research Laboratory of the Clinic for Cardiac Surgery, Heart Center Leipzig, Faculty of Medicine, University of Leipzig

Submitted in August 2012

(99 pages, 21 figures, 13 tables, 120 references, appendix)

Keywords: Antioxidant, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), piglet model, heart-lung-machine, ischemia/reperfusion injury, kidney injury

In this dissertation a piglet model (8-15 kg, three groups: “control” n=7, “extracorporeal circulation (EC)” n=10, “EGCG” n=6, the control-group was thoracotomized, the EC- and the EGCG-group were thoracotomized and underwent cardiopulmonary bypass (CPB) for 90 minutes, and the EGCG-group received EGCG before and after the CPB) is presented. Three questions were raised and answered: Firstly, it was investigated if the use of a CPB during cardiac surgery with hypothermia, non-pulsatile blood flow and cardioplegia caused damage to the kidney. In order to answer this question, paraffin slices of the kidney of the control- and the EC-group were stained with hematoxylin-eosin (HE), and different structures were evaluated – this staining showed histopathological changes in the EC-group. Paraclinical, the EC-group showed elevated kidney-specific blood parameters (serumcreatinine and -urea). These findings indicated a functionally relevant impairment of the kidney caused by the CPB. Supporting this, the EC-group also showed a decline of the total amount of proteins in the serum, which was suggestive of a generalized injury of the body by the CPB.

Secondly, it was investigated whether the injury of the kidney might have been caused by an ischemia/reperfusion injury. Therefore, paraffin slices of the kidney of the control- and the

EC-group were immunohistochemically stained (hypoxia-induced-factor-1-alpha-tyramide-signal-amplification (HIF-1-alpha-TSA)-, nitrotyrosine-3-amino-9-ethylcarbazole (nitrotyrosine-AEC)- and apoptosis-inducing-factor-tyramide-signal-amplification (AIF-TSA)-staining). These stainings revealed, that the EC-group had suffered from a hypoxemic situation (accumulation of HIF-1-alpha in the nuclei), from nitrosative stress (presence of nitrotyrosine in the tubuli), and that the kidney was partly damaged to the point of an induction of apoptosis (presence of AIF in the nuclei) – all three of these findings indicated, that the kidneys of the EC-group were put into an ischemic situation. The findings of the renal reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) indicated the same thing. This was also supported by the blood parameter of lactate – the EC-group showed a hyperlactemia – and by some histological findings in the EC-group, which were characteristic for an early shock-kidney (which may be caused by ischemia). Taken together, these findings showed that the CPB-associated kidney injury was primarily caused by an ischemia/reperfusion injury. Thirdly, it was investigated, whether EGCG might attenuate the CPB-associated kidney injury. For that purpose, all of the investigation methods mentioned above were carried out with the samples of the EGCG-group. The findings showed that EGCG (dose: 10 mg/kg) had a protective effect on the kidney, protecting it against the damage caused by the CPB, and was able to partly attenuate this damage and partly even fully counteract it.

These findings are of interest for pediatric cardiac surgery, which for example for the correction of innate heart defects depends on the use of CPB. Complications – like acute renal injury post operationem – occur frequently and complicate the recovery. This dissertation demonstrates the renoprotective potential of the natural compound EGCG in the setting of cardiac surgery with the use of CPB. The reason for the effectiveness of EGCG in this situation probably is that EGCG is more than an antioxidant. EGCG not only works as a radical- and nitric-oxide-scavenger, but also is antiapoptotic.

In veterinary medicine cardiac surgery with CPB is done by few centers only. However for the future there is hope that people – especially pet owners who view their companion animals as family members, and zoos – become more and more willing to and interested in having an animal diagnosed with a heart defect treated with cardiac surgery including the use of an CPB, instead of – like its usually done nowadays – only giving palliative medication to the animal.

8 Literaturverzeichnis

Abu-Omar Y, Ratnatunga C. Cardiopulmonary bypass and renal injury. *Perfusion*. 2006;21:209-13.

Aneja R, Hake PW, Burroughs TJ, Denenberg AG, Wong HR, Zingarelli B. Epigallocatechin, a green tea polyphenol, attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Mol Med*. 2004;10:55-62.

Anon. Hellabrunn plant Herz-Operation bei Elefantenbaby Lola. 2012 (zitiert vom 3.5.2012): <http://www.tierpark-hellabrunn.de/index.php?id=30&tx_ttnews%5Btt_news%5D=290&cHash=3a176f467ea28eaf4b8146bdfc3c80ed>.

Anon. Hellabrunn trauert um Elefantenbaby Lola. 2012 (zitiert vom 3.5.2012): <http://www.tierpark-hellabrunn.de/index.php?id=30&tx_ttnews%5Btt_news%5D=294&cHash=2e0bd92d57cae842c06684d6af5733ac>.

Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Gomes WJ, Angelini GD. On-Pump versus off-pump coronary revascularization: evaluation of renal function. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:493-8.

Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2000;69:1198-204.

Asimakopoulos G. Mechanisms of the systemic inflammatory response. *Perfusion*. 1999;14:269-77.

Atluri P, Kozin ED, Hiesinger W, Woo YJ. Off-pump, minimally invasive and robotic coronary revascularization yield improved outcomes over traditional on-pump CABG. *Int J Med Robotics Comput Assist Surg*. 2009;5:1-12.

Bahar I, Akgul A, Ozatik MA, Vural KM, Demirbag AE, Boran M, Tasdemir O. Acute renal failure following open heart surgery: risk factors and prognosis. *Perfusion*. 2005;20:317-22.

Baskin E, Saygili A, Harmanci K, Agras PI, Özdemir FN, Mercan S, Tokel K, Saatci U. Acute renal failure and mortality after open-heart surgery in infants. *Renal Failure*. 2005;27:557-60.

Baumgartner C, Glaus TM. Congenital cardiac diseases in dogs: a retrospective analysis. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 2003;145:527-33,535-6.

Belboul A, Roberts D, Börjesson R, Johnsson J. Oxygen free radical generation in healthy blood donors and cardiac patients: the protective effect of allopurinol. *Perfusion*. 2001;16:59-65.

Brandt U. Redoxreaktionen, Sauerstoff und oxidative Phosphorylierung. In: Löffler G, Petrides PE, Hrsg. *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2003. p. 531-56.

Brix-Christensen V. The systemic inflammatory response after cardiac surgery with cardiopulmonary bypass in children. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2001;45:671-9.

Candè C, Cohen I, Dugas E, Ravagnan L, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie*. 2002;84:215-22.

Choi YB, Kim YI, Lee KS, Kim BS, Kim DJ. Protective effect of epigallocatechin gallate on brain damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*. 2004;1019:47-54.

Cohn LH. Fifty years of open-heart surgery. *Circulation*. 2003;107:2168-70.

Conlon PJ, Stafford-Smith M, White WD, Newman MF, King S, Winn MP, Landolfo K. Acute renal failure following cardiac surgery. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14:1158-62.

Cook DJ, Orszulak TA, Daly RC. The effects of pulsatile cardiopulmonary bypass on cerebral and renal blood flow in dogs. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1997;11:420-7.

Courtney JM, Zhao X, Qian H. Biomaterials in cardiopulmonary bypass. *Perfusion*. 1999;14:263-7.

Deutzmann R. Mediatoren. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, Hrsg. *Biochemie*. Stuttgart: Georg Thieme; 2006. p. 627-44.

Diegeler A, Doll N, Rauch T, Haberer D, Walther T, Falk V, Gummert J, Autschbach R, Mohr FW. Humoral immune response during coronary artery bypass grafting: A comparison of limited approach, "off-pump" technique, and conventional cardiopulmonary bypass. *Circulation*. 2000;102(19 Suppl 3):III95-100.

Dittmann, N. Hämodynamisches Monitoring. 2006 (zitiert vom 5.6.2012): [http://www.pulsion.de/index.php?id=2570&no_cache=1&sword_list\[\]=monitoring](http://www.pulsion.de/index.php?id=2570&no_cache=1&sword_list[]=monitoring).

Edmunds LH. Cardiopulmonary bypass after 50 years. *N Engl J Med*. 2004;351:1603-6.

El-Mowafy AM, Salem HA, Al-Gayyar MM, El-Mesery ME, El-Azab MF. Evaluation of renal protective effects of the green-tea (EGCG) and red grape resveratrol: role of oxidative stress and inflammatory cytokines. *Natural Product Research* 2011;25:850-6.

Fiorini RN, Donovan JL, Rodwell D, Evans Z, Cheng G, May HD, Milliken CE, Markowitz JS, Campbell C, Haines JK, Schmidt MG, Chavin KD. Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl*. 2005;11:298-308.

Fischer UM, Weissenberger WK, Warters RD, Geissler HJ, Allen SJ, Mehlhorn U. Impact of cardiopulmonary bypass management on postcardiac surgery renal function. *Perfusion*. 2002;17:401-6.

Frömke J. Kardiopulmonaler Bypass. In: Frömke J, Hrsg. *Standardoperationen in der Herzchirurgie*. Darmstadt. Steinkopff; 2003. p. 117-36.

Fuerst M. First tiger to have open-heart surgery dies. 2000 (zitiert vom 3.5.2012): <http://www.theheart.org/article/292625.do>.

Gabriel EA, Locali RF, Matsuoka PK, Cherbo T, Buffolo E. On-pump coronary artery bypass graft surgery: biochemical, hormonal and cellular features. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 2011;26:525-31.

Gerritsen WBM, van Boven WJP, Driessen AHG, Haas FJLM, Aarts LPHJ. Off-pump versus on-pump coronary artery bypass grafting: oxidative stress and renal function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001;20:923-9.

Giannoudis PV, Dinopoulos H, Chalidis B, Hall GM. Surgical stress response. *Injury.* 2006;37 Suppl 5:S3-9.

Gobé G, Willgoss D, Hogg N, Schoch E, Endre Z. Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 1999;56:1299-1304.

Grote J, Pohl U. Der Sauerstoff im Gewebe: Substrat, Signal und Noxe. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G, Hrsg. *Physiologie des Menschen.* 29. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2005. p. 807-24.

Guo Q, Zhao B, Shen S, Hou J, Hu J, Xin W. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1427:13-23.

Haas NA, Kleideiter U. Angeborene Herzfehler. In: Haas NA, Kleideiter U, Hrsg. *Kinderkardiologie.* Stuttgart New York. Georg Thieme; 2011. p. 101-49.

Hayashi Y, Sawa Y, Nishimura M, Fukuyama N, Ichikawa H, Ohtake S, Nakazawa H, Matsuda H. Peroxynitrite, a product between nitric oxide and superoxide anion, plays a cytotoxic role in the development of post-bypass systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;26:276-80.

Hearse DJ, Stewart DA, Braimbridge MV. Cellular protection during myocardial ischemia: the development and characterization of a procedure for the induction of reversible ischemic arrest. *Circulation.* 1976;54:193-202.

Hiebl B, Mrowietz C, Ploetze K, Matschke K, Jung F. Critical hematocrit and oxygen partial pressure in the beating heart of pigs. *Microvasc Res.* 2010;80:389-93.

Itoh Y, Yasui T, Okada A, Tozawa K, Hayashi Y, Kohri K. Examination of the anti-oxidative effect in renal tubular cells and apoptosis by oxidative stress. *Urol Res.* 2005;33:261-6.

Iwahashi H, Yuri K, Nosé Y. Development of the oxygenator: past, present, and future. *J Artif Organs.* 2004;7:111-20.

Jang S, Jeong HS, Park JS, Kim YS, Jin CY, Seol MB, Kim BC, Lee MC. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against quinolinic acid-induced excitotoxicity via PI3K pathway and NO inhibition. *Brain Res.* 2010;1313:25-33.

Jang YH, Lee YC, Park NH, Shin HY, Mun KC, Choi MS, Lee MY, Kim AR, Kim JM, Lee SR, Park HR. Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate protection from ischemia/reperfusion-induced renal injury in normotensive and hypertensive rats. *Transplant Proc.* 2006;38:2190-4.

Kakuta Y, Okumi M, Isaka Y, Tsutahara K, Abe T, Yazawa K, Ichimaru N, Matsumura K, H SH, Takahara S, Nonomura N. Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration. *Transpl Int.* 2011;24:514-22.

Kanaoka Y, Inagaki E, Hamanaka S, Masaki H, Tanemoto K. Analysis of reactive oxygen metabolites (ROMs) after cardiovascular surgery as a marker of oxidative stress. *Acta Med Okayama.* 2010;64:323-30.

Kanji HD, Schulze CJ, Hervas-Malo M, Wang P, Ross DB, Zibdawi M, Bagshaw SM. Difference between pre-operative and cardiopulmonary bypass mean arterial pressure is independently associated with early cardiac surgery-associated acute kidney injury. *J Cardiothorac Surg.* 2010;5:71.

Karkouti K, Wijeyesundera DN, Yau TM, Callum JL, Cheng DC, Crowther M, Dupuis JY, Fremes SE, Kent B, Laflamme C, Lamy A, Legare JF, Mazer CD, McCluskey SA, Rubens FD, Sawchuk C, Beattie WS. Acute kidney injury after cardiac surgery: focus on modifiable risk factors. *Circulation*. 2009;119:495-502.

Kawahito K, Kobayashi E, Ohmori M, Harada K, Kitoh Y, Fujimura A, Fuse K. Enhanced responsiveness of circulatory neutrophils after cardiopulmonary bypass: increased aggregability and superoxide producing capacity. *Artif Organs*. 2000;24:37-42.

Khan SA, Priyamvada S, Khan W, Khan S, Farooq N, Yusufi AN. Studies on the protective effect of green tea against cisplatin induced nephrotoxicity. *Pharmacol Res*. 2009;60:382-91.

Kiefer P, Salameh A, Krausch M, Oelmann K, Emrich F, Seeburger J, Kostelka M, Dhein S, Mohr FW. Myocardial stunning after extracorporeal circulation: myth or fact? An experimental analysis in piglets. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;60-V237.

Kindgen-Milles D. Epidemiologie und prognostische Relevanz des akuten Nierenversagens. In: Jörres A, Hrsg. *Akutes Nierenversagen beim Intensivpatienten: Therapie und Praxis*. Köln: Deutscher Ärzteverlag; 2009. p. 1-14.

Kloner RA, Przyklenl K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation*. 1989;80:1115-27.

Köse FA, Seziş M, Akçiçek F, Pabuççuoğlu A. Oxidative and nitrosative stress markers in patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. *Blood Purif*. 2011;32:202-8.

Komtebedde J, Ilkiw JE, Follette DM, Breznock EM, Tobias AH. Resection of subvalvular aortic stenosis. Surgical and perioperative management in seven dogs. *Vet Surg*. 1993;22:419-30.

Kumar AB, Suneja M. Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury. *Anesthesiology*. 2011;114:964-70.

Laffey JG, Boylan JF, Cheng DCH. The systemic inflammatory response to cardiac surgery. *Anesthesiology*. 2002;97:215-52.

Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501:65-72.

Larsen R. Herz-Lungen-Maschine und extrakorporale Zirkulation. In: Larsen R, Hrsg. *Anästhesie und Intensivmedizin in der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie*. 8. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer; 2012. p. 71-104.

Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;36:1-12.

Lee HT, Park SW, Kim M, D'Agati VD. Acute kidney injury after hepatic ischemia and reperfusion injury in mice. *Lab Invest*. 2009;89:196-208.

Lehnert M, Marzi I. Polytrauma. In: Burchardi H, Larsen R, Marx G, Muhl E, Schölmerich J, Hrsg. *Die Intensivmedizin*. 11. Aufl. Berlin Heidelberg: Springer Medizin; 2011. p. 845-58.

Leurs PB, Mulder AW, Fiers HA, Hoorntje SJ. Acute renal failure after cardiovascular surgery. Current concepts in pathophysiology, prevention and treatment. *Eur Heart J*. 1989;Dec 10 Suppl H:38-42.

Levites Y, Weinreb O, Maor G, Youdim MB, Mandel S. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevents N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. *J Neurochem*. 2001;78:1073-82.

Levy JH, Tanaka KA. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2003;75:715-20.

Li S, Krawczeski CD, Zappitelli M, Devarajan P, Thiessen-Philbrook H, Coca SG, Kim RW, Parikh CR. Incidence, risk factors, and outcome of acute kidney injury after pediatric cardiac surgery: A prospective multicenter study. *Crit Care Med*. 2011;39:1493-9.

Loane M, Dolk H, Kelly A, Teljeur C, Greenlees R, Densem J; EUROCAT Working Group. Paper 4: EUROCAT statistical monitoring: identification and investigation of ten year trends of congenital anomalies in Europe. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011;91 Suppl 1:S31-43.

Maessen JG, van der Vusse GJ, Vork M, Kootstra G. Nucleotides, nucleosides, and oxypurines in human kidneys measured by use of reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Clin Chem.* 1988;34:1087-90.

Mak JC. Potential role of green tea catechins in various disease therapies: progress and promise. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012;39:265-73.

Matata BM, Sosnowski AW, Galiñanes M. Off-pump bypass graft operation significantly reduces oxidative stress and inflammation. *Ann Thorac Surg.* 2000;69:785-91.

McColl AJ, Keeble T, Hadjinikolaou L, Cohen A, Aitkenhead H, Glenville B, Richmond W. Plasma antioxidants: evidence for a protective role against reactive oxygen species following cardiac surgery. *Ann Clin Biochem.* 1998;35:616-23.

McNicol L, Andersen LW, Liu G, Doolan L, Baek L. Markers of splanchnic perfusion and intestinal translocation of endotoxins during cardiopulmonary bypass: effects of dopamine and milrinone. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1999;13:292-8.

Nagle DG, Ferreira D, Zhou YD. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry.* 2006;67:1849-55.

Nakamura K, Harasaki H, Fukumura F, Fukamachi K, Whalen R. Comparison of pulsatile and non-pulsatile cardiopulmonary bypass on regional renal blood flow in sheep. *Scand Cardiovasc J.* 2004;38:59-63.

Nanjo F, Mori M, Goto K, Hara Y. Radical scavenging activity of tea catechins and their related compounds. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999;63:1621-3.

Naughton F, Wijeyesundera D, Karkouti K, Tait G, Beattie WS. N-acetylcysteine to reduce renal failure after cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. *Can J Anaesth.* 2008;55:827-35.

Okamura T, Ishibashi N, Zurakowski D, Jonas RA. Cardiopulmonary bypass increases permeability of the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Ann Thorac Surg.* 2010;89:187-94.

Oliveira P, Domenech O, Silva J, Vannini S, Bussadori R, Bussadori C. Retrospective review of congenital heart disease in 976 dogs. *J Vet Intern Med.* 2011;25:477-83.

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12:913-22.

Paquay JB, Haenen GR, Stender G, Wiseman SA, Tijburg LB, Bast A. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J Agric Food Chem.* 2000;48:5768-72.

Parolari A, Alamanni F, Gherli T, Bertera A, Dainese L, Costa C, Schena M, Sisillo E, Spirito R, Porqueddu M, Rona P, Biglioli P. Cardiopulmonary bypass and oxygen consumption: oxygen delivery and hemodynamics. *Ann Thorac Surg.* 1999;67:1320-7.

Picca S, Principato F, Mazzera E, Corona R, Ferrigno L, Marcelletti C, Rizzoni G. Risks of acute renal failure after cardiopulmonary bypass surgery in children: a retrospective 10-year case-control study. *Nephrol Dial Transplant.* 1995;10:630-6.

Qin J, Xie LP, Zheng XY, Wang YB, Bai Y, Shen HF, Li LC, Dahiya R. A component of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate, promotes apoptosis in T24 human bladder cancer cells via modulation of the PI3K/Akt pathway and Bcl-2 family proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354:852-7.

Raja SG, Dreyfus GD. Modulation of systemic inflammatory response after cardiac surgery. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2005;13:382-95.

Ranucci M, De Toffol B, Isgrò G, Romitti F, Conti D, Vicentini M. Hyperlactatemia during cardiopulmonary bypass: determinants and impact on postoperative outcome. *Crit Care*. 2006;10:R167.

Rietveld A, Wiseman S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. *J Nutr*. 2003;133:3285S-3292S.

Ristikankare A, Kuitunen T, Kuitunen A, Uotila L, Vento A, Suojaranta-Ylinen R, Salmenperä M, Pöyhä R. Lack of renoprotective effect of i.v. N-acetylcysteine in patients with chronic renal failure undergoing cardiac surgery. *Br J Anaesth*. 2006;97:611-6.

Rosner MH, Okusa MD. Acute kidney injury associated with cardiac surgery. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1:19-32.

Royston D. The inflammatory response and extracorporeal circulation. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1997;11:341-54.

Schaff HV, Dombroff R, Flaherty JT, Bulkley BH, Hutchins GM, Goldman RA, Gott VL. Effect of potassium cardioplegia on myocardial ischemia and post arrest ventricular function. *Circulation*. 1978;58:240-9.

Schneider J, Khemani R, Grushkin C, Bart R. Serum creatinine as stratified in the RIFLE score for acute kidney injury is associated with mortality and length of stay for children in the pediatric intensive care unit. *Crit Care Med*. 2010;38:933-9.

Schroeder EK, Kelsey NA, Doyle J, Breed E, Bouchard RJ, Loucks FA, Harbison RA, Linseman DA. Green tea epigallocatechin 3-gallate accumulates in mitochondria and displays a selective antiapoptotic effect against inducers of mitochondrial oxidative stress in neurons. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:469-80.

Schulze C, Conrad N, Schütz A, Egi K, Reichenspurner H, Reichart B, Wildhirt SM. Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;48:364-9.

Schumer M, Colombel MC, Sawczuk IS, Globé G, Connor J, O'Toole KM, Olsson CA, Wise GJ, Buttyan R. Morphologic, biochemical, and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia. *Am J Pathol.* 1992;140:831-8.

Schwedler G, Lindinger A, Lange PE, Sax U, Olchvary J, Peters B, Bauer U, Hense HW. Frequency and spectrum of congenital heart defects among live births in Germany: a study of the Competence Network for Congenital Heart Defects. *Clin Res Cardiol.* 2011;100:1111-7.

Scrascia G, Guida P, Rotunno C, De Palo M, Mastro F, Pignatelli A, de Luca Tuppiti Schinosa L, Paparella D. Myocardial protection during aortic surgery: comparison between Bretschneider-HTK and cold blood cardioplegia. *Perfusion.* 2011;26:427-33.

Seghaye MC, Grabitz RG, Duchateau J, Busse S, Däbritz S, Koch D, Alzen G, Hörnchen H, Messmer BJ, Von Bernuth G. Inflammatory reaction and capillary leak syndrome related to cardiopulmonary bypass in neonates undergoing cardiac operations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1996;112:687-97.

Shaw A, Swaminathan M, Stafford-Smith M. Cardiac surgery-associated acute kidney injury: putting together the pieces of the puzzle. *Nephron Physiol.* 2008;109:55-60.

Sirvinskas E, Andrejaitiene J, Raliene L, Nasvytis L, Karbonskiene A, Pilvinis V, Sakalauskas J. Cardiopulmonary bypass management and acute renal failure: risk factors and prognosis. *Perfusion.* 2008;23:323-7.

Stallwood MI, Grayson AD, Mills K, Scawn ND. Acute renal failure in coronary artery bypass surgery: Independent effect of cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2004;77:968-72.

Sternberg S. The heart of a tiger. 2000 (zitiert vom 3.5.2012): <http://www.tigerlink.org/7b.html>.

Stoney WS. Evolution of Cardiopulmonary Bypass. *Circulation.* 2009;119:2844-53.

Strickland KN. Congenital Heart Disease. In: Tilley LP, Smith FWK Jr, Oyama MA, Sleeper MM, Hrsg. Manual of canine and feline cardiology. 4. Aufl. St. Louis, Missouri: Saunders; 2008. p. 215-39.

Striebel HW. Anästhesie in der Herzchirurgie. In: Striebel HW, Hrsg. Die Anästhesie: Grundlagen und Praxis. 2. Aufl. Stuttgart: Schattauer; 2010. p. 1529-74.

Strosznajder RP, Jesko H, Zambrzycka A. Poly(ADP-ribose) polymerase: the nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol.* 2005;31:149-67.

Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:662-80.

Tanaka R, Shimizu M, Hoshi K, Soda A, Saida Y, Takashima K, Yamane Y. Efficacy of open patch-grafting under cardiopulmonary bypass for pulmonic stenosis in small dogs. *Aust Vet J.* 2009;87:88-93.

Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circ Res.* 2001;89:224-36.

Thawonsuwan J, Kiron V, Satoh S, Panigrahi A, Verlhac V. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) affects the antioxidant and immune defense of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem.* 2010;36:687-97.

Tidholm A. Retrospective study of congenital heart defects in 151 dogs. *J Small Anim Pract.* 1997;38:94-8.

Tirilomis T, Tempes T, Waldmann-Beushausen R, Ballat C, Bensch M, Schoendube FA. Histological changes in neonatal kidneys after cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;57:7-9.

Ullmann C. Extracorporeal Circulation. In: Dhein S, Mohr FW, Delmar M, Hrsg. Practical methods in cardiovascular research. Berlin Heidelberg. Springer; 2005. p. 26-36.

Vazquez-Jimenez JF, Qing M, Hermanns B, Klosterhalfen B, Wöltje M, Chakupurakal R, Schumacher K, Messmer BJ, von Bernuth G, Seghaye MC. Moderate hypothermia during cardiopulmonary bypass reduces myocardial cell damage and myocardial cell death related to cardiac surgery. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:1216-23.

Videm V, Svennevig JL, Fosse E, Semb G, Osterud A, Mollnes TE. Reduced complement activation with heparin-coated oxygenator and tubings in coronary bypass operations. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1992;103:806-13.

Virág L, Scott GS, Cuzzocrea S, Marmer D, Salzman AL, Szabó C. Peroxynitrite-induced thymocyte apoptosis: the role of caspases and poly(ADP-ribose) synthetase (PARS) activation. *Immunology.* 1998;94:345-355.

Volonté MG, Yuln G, Quiroga P, Consolini AE. Development of an HPLC method for determination of metabolic compounds in myocardial tissue. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35:647-53.

Weight SC, Furness PN, Nicholson ML. Nitric oxide is increased in experimental renal warm ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1998;85:1663-8.

Weiss E. Harnorgane. In: Dahme E, Weiss E, Hrsg. *Grundriss der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere.* 6. Aufl. Stuttgart: Enke; 2007. p. 173-95.

Woo EB, Tang AT, el-Gamel A, Keevil B, Greenhalgh D, Patrick M, Jones MT, Hooper TL. Dopamine therapy for patients at risk of renal dysfunction following cardiac surgery: science or fiction? *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002;22:106-11.

Yamano S, Uechi M, Tanaka K, Hori Y, Ebisawa T, Harada K, Mizukoshi T. Surgical repair of a complete endocardial cushion defect in a dog. *Vet Surg.* 2011;40:408-12.

Zagórska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol.* 2004;51:563-85.

9 Anhang

9.1 Beatmungsparameter

Die Beatmung der Ferkel sollte möglichst einheitlich in allen drei Phasen (Vorbereitungs-, OP- bzw. HLM- und Rekonvaleszenzphase) vorgenommen werden, um eine unterschiedliche Beeinflussung der entnommenen Proben bzw. der aufgezeichneten Parameter zu unterbinden. In halbstündigem Abstand wurden Blutgasanalysen bei den Ferkeln vorgenommen, welche – neben dem sorgfältigen Überwachen der Monitore – helfen konnten, bei Bedarf die Beatmungsparameter individuell zu verändern, um das Überleben der Tiere bis zum Versuchsende zu sichern. Zu drei definierten Zeitpunkten, nämlich ganz am Anfang des Versuches nach dem Platzieren aller Zugänge und Messsonden (zum Zeitpunkt 0 Minuten), nach der 90-minütigen OP- bzw. HLM-Zeit (zum Zeitpunkt 90 Minuten) und ein drittes Mal am Ende des Versuches, nach der 30-minütigen Reperfusion- und der daran anschließenden 90-minütigen Rekonvaleszenzzeit (zum Zeitpunkt 240 Minuten) wurden folgende Beatmungsparameter festgehalten: der positive endexpiratorische Druck (PEEP), das Atemminutenvolumen (AMV), das Tidalvolumen (V_t) und die Atemfrequenz (siehe Tabelle 14). Angegeben sind die Mittelwerte und ihre Standardfehler.

**Tabelle 14: Beatmungsparameter 0, 90 und 240 Minuten während der OP
(Mittelwerte und ihre Standardfehler)**

Gruppen	PEEP in mmHg	AMV in l/min	V_t in l	Frequenz in 1/min
Kontrolle 0 Min	$1,33 \pm 0,33$	$2,8 \pm 2,2$	$0,14 \pm 0,01$	$27,3 \pm 1,38$
Kontrolle 90 Min	$1,33 \pm 0,21$	$3,5 \pm 0,47$	$0,16 \pm 0,02$	$22 \pm 1,34$
Kontrolle 240 Min	$1,86 \pm 0,55$	$3,24 \pm 0,69$	$0,15 \pm 0,02$	$22 \pm 2,16$
HLM 0 Min	$1,63 \pm 0,18$	$3,7 \pm 0,35$	$0,13 \pm 0,01$	$26,8 \pm 1,56$
HLM 90 Min	$1,43 \pm 0,65$	$0,64 \pm 0,22$	$0,06 \pm 0,01$	$9,38 \pm 1,53$
HLM 240 Min	$2 \pm 0,5$	$2,87 \pm 0,33$	$0,12 \pm 0,01$	$24,4 \pm 1,52$
EGCG 0 Min	$1,5 \pm 0,22$	$3,4 \pm 0,26$	$0,13 \pm 0,01$	$28,5 \pm 1,45$
EGCG 90 Min	$1 \pm 0,63$	$0,62 \pm 0,42$	$0,05 \pm 0,02$	$9,5 \pm 2,22$
EGCG 240 Min	$1,5 \pm 0,34$	$3,37 \pm 0,19$	$0,12 \pm 0,01$	$28 \pm 1,59$

9.2 Infusionen

Während des Versuches mussten die Ferkel aus verschiedenen Gründen – insbesondere, um die Mitteldrücke und den Hämatokrit in physiologischen Bereichen zu halten – Infusionen erhalten. Die Art der Infusion (vgl. 3.1.2.3) und auch die infundierte Menge unterschieden sich im Einzelfall.

Die verabreichten Infusionsmengen waren nicht signifikant ($p < 0,05$) unterschiedlich voneinander (siehe Tabelle 15).

**Tabelle 15: Verabreichte Infusionen intra operationem
(Mittelwerte und ihre Standardfehler)**

Gruppe	Infusionen in ml
Kontrolle	1128,57 ± 140,94
HLM	930 ± 206,59
EGCG	385 ± 258,25

9.3 Medikamentöses Regime: Katecholamine

Hauptsächlich in den Phasen der Reperfusion und der Rekonvaleszenz wurde bei fast allen Ferkeln die Gabe von Katecholaminen, Norepinephrin und/oder Epinephrin (Dosierungen vgl. Tabelle 6), nötig.

Die Norepinephrinwerte der Kontroll- und HLM-Gruppe, und die der Kontroll- und EGCG-Gruppe unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander. Obwohl alle anderen Unterschiede nicht signifikant ($p < 0,05$) waren, so sind doch deutliche Tendenzen erkennbar, nach denen die Kontrollgruppe die kleinste bzw. die HLM-Gruppe die größte Menge von Katecholaminen bekam, während sich die EGCG-Gruppe bei beiden Wirkstoffen im Mittelfeld zwischen Kontroll- und HLM-Gruppe bewegte (siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16: Katecholamingaben während der letzten 120 Minuten der OP
(Mittelwerte und ihre Standardfehler.**

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe wird durch einen Hashtag (#) angezeigt)

Gruppe	Norepinephrin in mg/kg	Epinephrin in mg/kg
Kontrolle	0,006 ± 0,001	0,001 ± 0,001
HLM	0,037 ± 0,01 #	0,005 ± 0,002
EGCG	0,022 ± 0,005 #	0,003 ± 0,001

9.4 Arterielle Blutgasmessung

Die durch die in halbstündigen Abständen regelmäßig durchgeführten Blutgasanalysen ermittelten Werte lieferten wichtige Informationen über die metabolischen Zustände der Ferkel. Aufgrund dieser Werte konnten unterschiedliche medikamentöse Interventionen vorgenommen oder Geräteeinstellungen verändert werden, um den Zustand der Tiere stabil zu halten.

9.4.1 pH-Wert und Basenüberschuss

Der pH-Wert und sein in den Blutgasanalysen aussagekräftigster Regulationsmechanismus, der Basenüberschuss, wurden regelmäßig überwacht, um gegebenenfalls durch z. B. die Infusion von Pufferlösungen gegensteuern zu können (vgl. Tabelle 6), falls ein Abrutschen in eine azidotische oder alkalische Stoffwechsellage drohte.

Eine signifikante ($p < 0,05$) Veränderung des pH-Wertes innerhalb der drei Gruppen war nur in der EGCG-Gruppe feststellbar, und zwar im Zeitraum von 0 bis 90 Minuten. Vergleich man die Gruppen miteinander, so wurde erkennbar, dass sich die Kontroll- von der HLM- und der EGCG-Gruppe bei 240 Minuten signifikant ($p < 0,05$) unterschied, die HLM- und die EGCG-Gruppen aber ihrerseits schon signifikant ($p < 0,05$) unterschiedliche Anfangswerte hatten. Die Kontrollgruppe zeigte eine nach oben gerichtete Tendenz, wogegen die HLM-Gruppe die genau gegenteilige Tendenz aufwies. Bei der EGCG-Gruppe war keine Tendenz erkennbar. Zu bemerken ist, dass sich fast alle Werte immer im physiologischen Bereich befanden (siehe Abb. 22 und Tabelle 17).

Bei den Basenüberschusswerten war bei der Kontrollgruppe ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg im Zeitraum von 0 bis 90 und von 0 bis 240 Minuten erkennbar, bei der HLM-Gruppe ein signifikanter ($p < 0,05$) Abfall im Zeitraum von 0 bis 90 Minuten. Vergleich man die Gruppen miteinander, so unterschieden sich die Werte der Kontrollgruppe bei 90 und bei 240 Minuten signifikant ($p < 0,05$) von denen der HLM- und der EGCG-Gruppe, wobei diese beiden Gruppe schon signifikant ($p < 0,05$) unterschiedliche Ausgangswerte hatten (siehe Abb. 23 und Tabelle 18).

pH-Werte

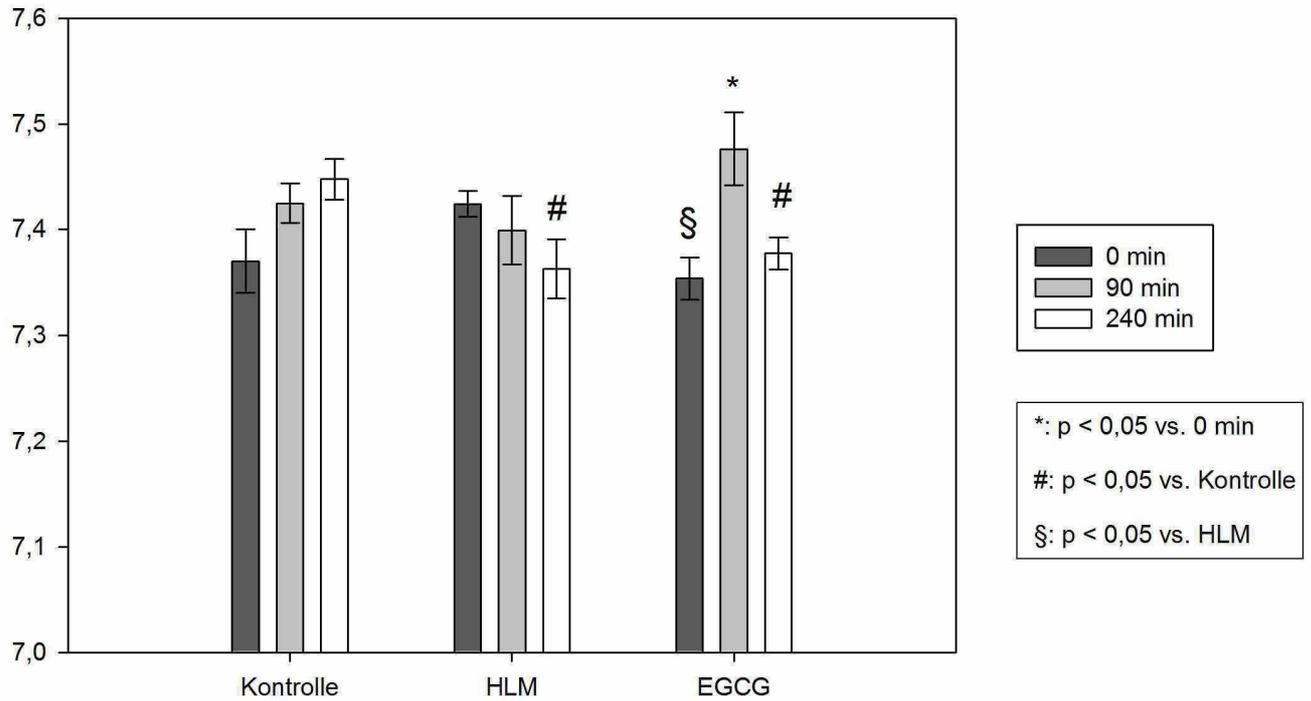


Abbildung 22: pH-Werte nach 0, 90 und 240 Minuten

Basenüberschusswerte

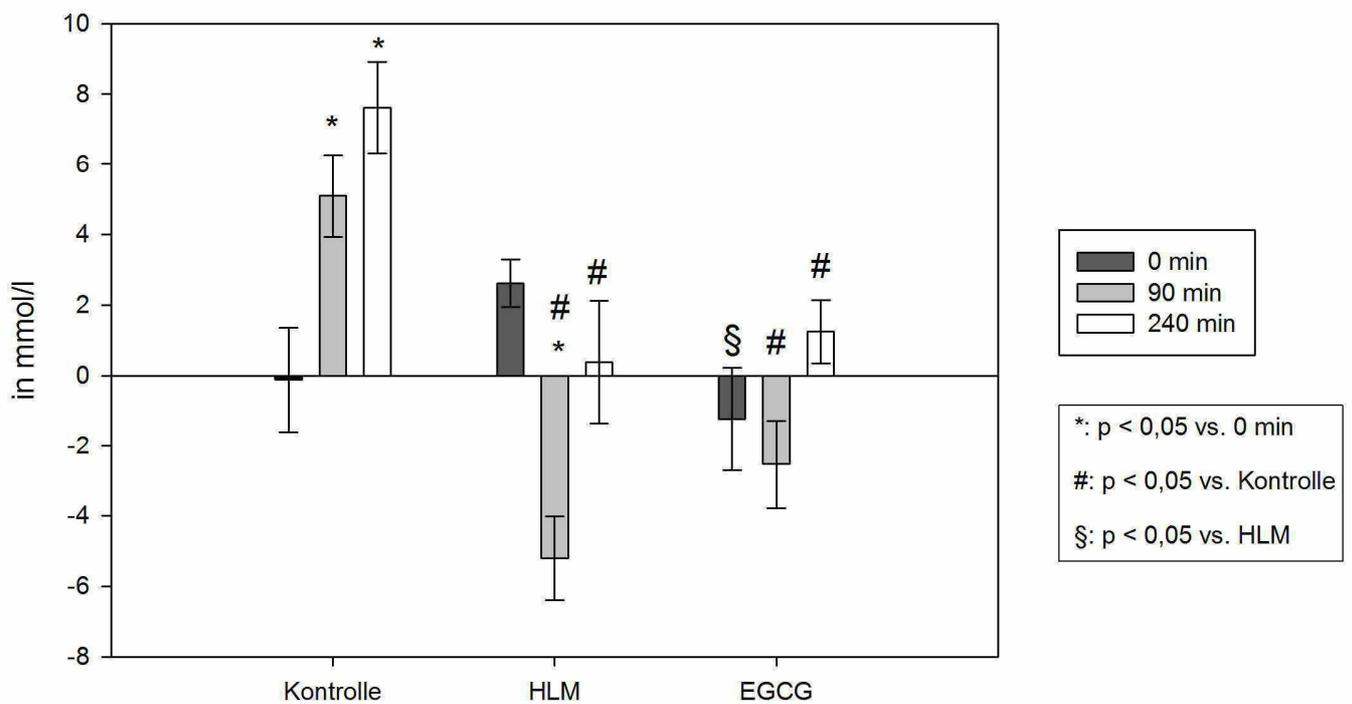


Abbildung 23: Basenüberschusswerte nach 0, 90 und 240 Minuten

Tabelle 17: pH-Werte (Mittelwerte und ihre Standardfehler.

**Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt,
**Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)****

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	7,37 ± 0,03	7,42 ± 0,02	7,45 ± 0,02
HLM	7,42 ± 0,01	7,4 ± 0,03	7,36 ± 0,03 #
EGCG	7,35 ± 0,02 §	7,48 ± 0,03 *	7,38 ± 0,02 #

Tabelle 18: Basenüberschusswerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler.

**Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt,
**Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)****

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	-0,11 ± 1,48 mmol/l	5,1 ± 1,17 mmol/l *	7,61 ± 1,29 mmol/l *
HLM	2,62 ± 0,67 mmol/l	-5,2 ± 1,19 mmol/l * #	0,39 ± 1,74 mmol/l #
EGCG	-1,23 ± 1,46 mmol/l §	-2,53 ± 1,25 mmol/l #	1,25 ± 0,9 mmol/l #

9.4.2 Elektrolytkonzentrationen im Blut

Die von dem BGA-Gerät gemessenen Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium und Chlorid wurden regelmäßig überwacht, um bei etwaigen Verschiebungen Gegenmaßnahmen, wie z. B. die Gabe von Pufferlösungsinfusionen (vgl. Tabelle 6), ergreifen zu können, und so den Elektrolythaushalt im Rahmen zu halten.

Die Natriumwerte der HLM- und der EGCG-Gruppe fielen jeweils im Zeitraum von 0 bis 90 Minuten signifikant ($p < 0,05$) ab, die der HLM-Gruppe auch im Zeitraum von 0 bis 240 Minuten. Im Vergleich der Gruppen miteinander unterschieden sich die Werte der Kontroll- und der EGCG-Gruppe bei 90 Minuten signifikant (siehe Abb. 24 und Tabelle 19).

Die Kaliumwerte der HLM- und der EGCG-Gruppe stiegen jeweils im Zeitraum von 0 bis 90 Minuten signifikant ($p < 0,05$) an. Im Zeitraum von 0 bis 240 Minuten stiegen sie bei allen drei Gruppen signifikant ($p < 0,05$) an (siehe Abb. 25 und Tabelle 20).

Die Calciumwerte der HLM- und der EGCG-Gruppe fielen im Zeitraum von 0 bis 90 Minuten signifikant ($p < 0,05$) ab (siehe Abb. 26 und Tabelle 21).

Die Chloridwerte der HLM- und der EGCG-Gruppe fielen jeweils im Zeitraum von 0 bis 90 Minuten signifikant ($p < 0,05$) ab, die der HLM-Gruppe auch im Zeitraum von 0 bis 240 Minuten. Die Werte der Kontroll- und der HLM-Gruppe unterschieden sich bei 90 Minuten signifikant ($p < 0,05$) voneinander, die der Kontroll- und der EGCG-Gruppe bei 240 Minuten (siehe Abb. 27 und Tabelle 22).

Natriumwerte

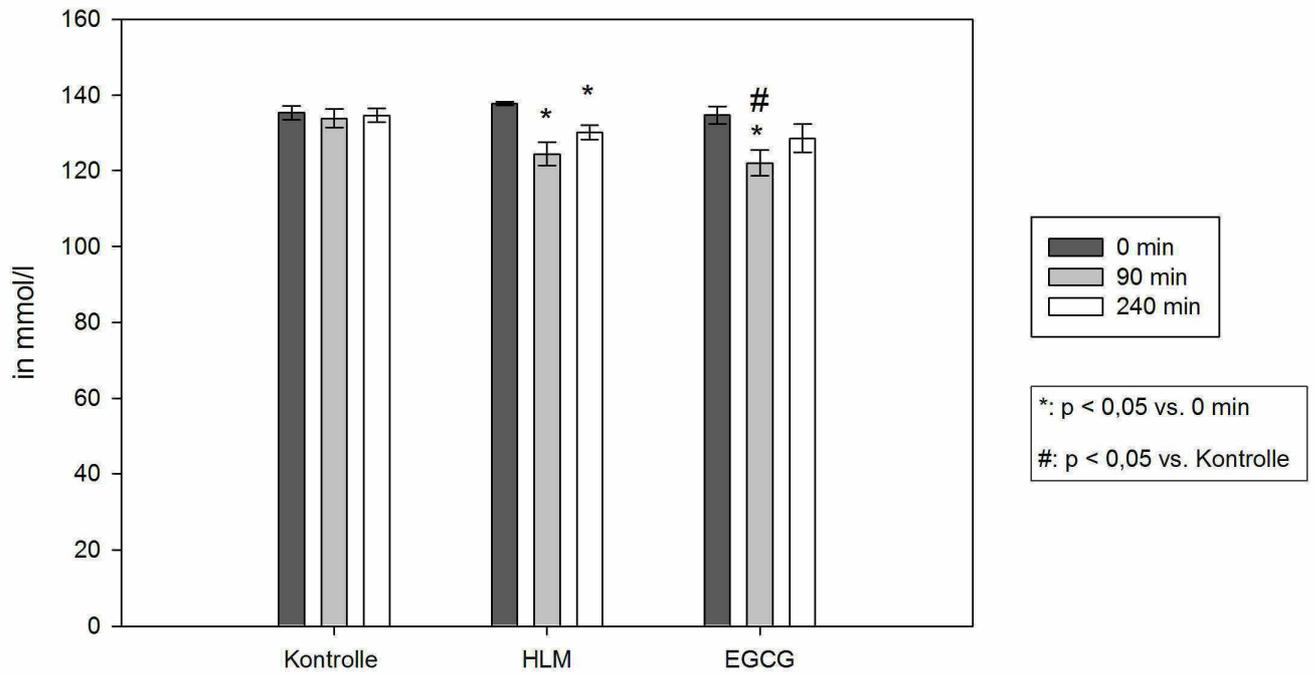


Abbildung 24: Natriumwerte nach 0, 90 und 240 Minuten

Kaliumwerte

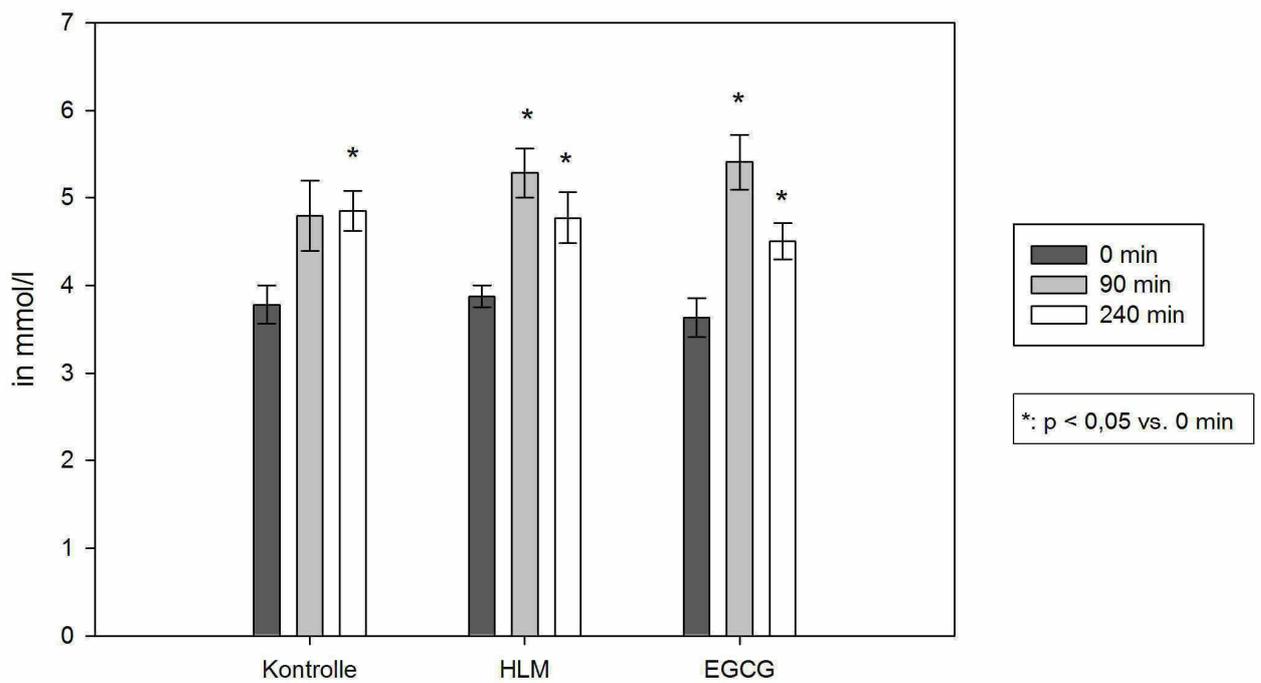


Abbildung 25: Kaliumwerte nach 0, 90 und 240 Minuten

Calciumwerte

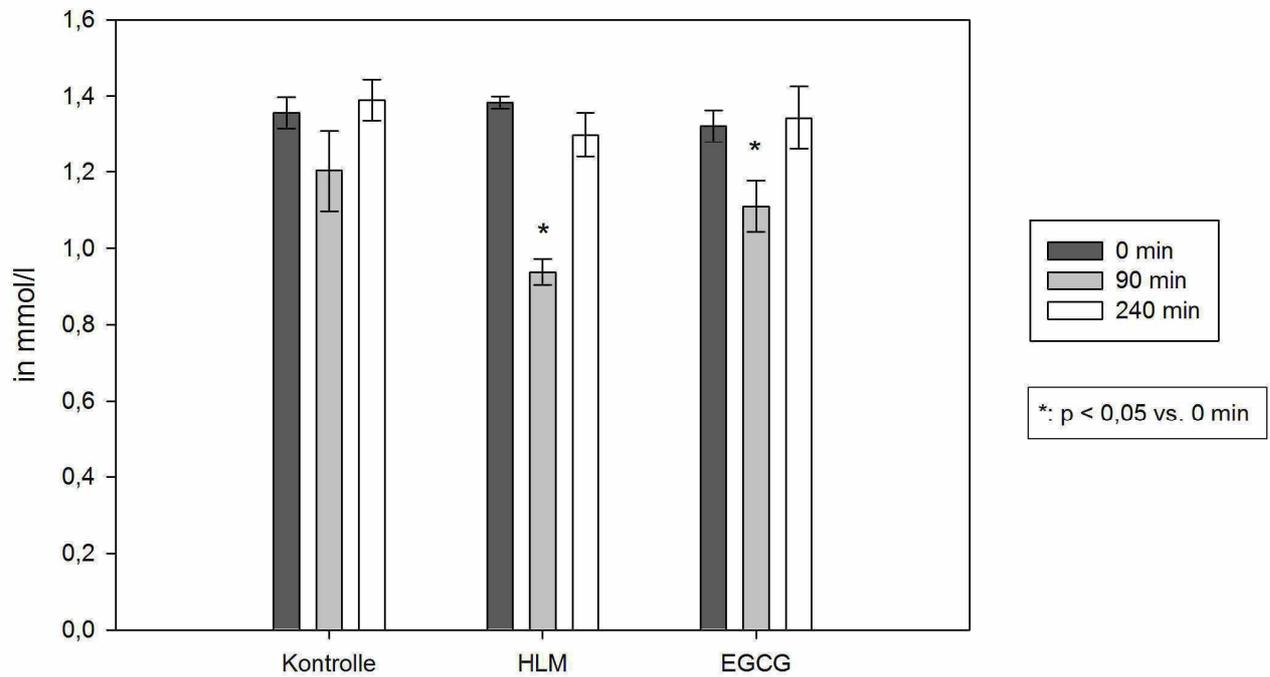


Abbildung 26: Calciumwerte nach 0, 90 und 240 Minuten

Chloridwerte

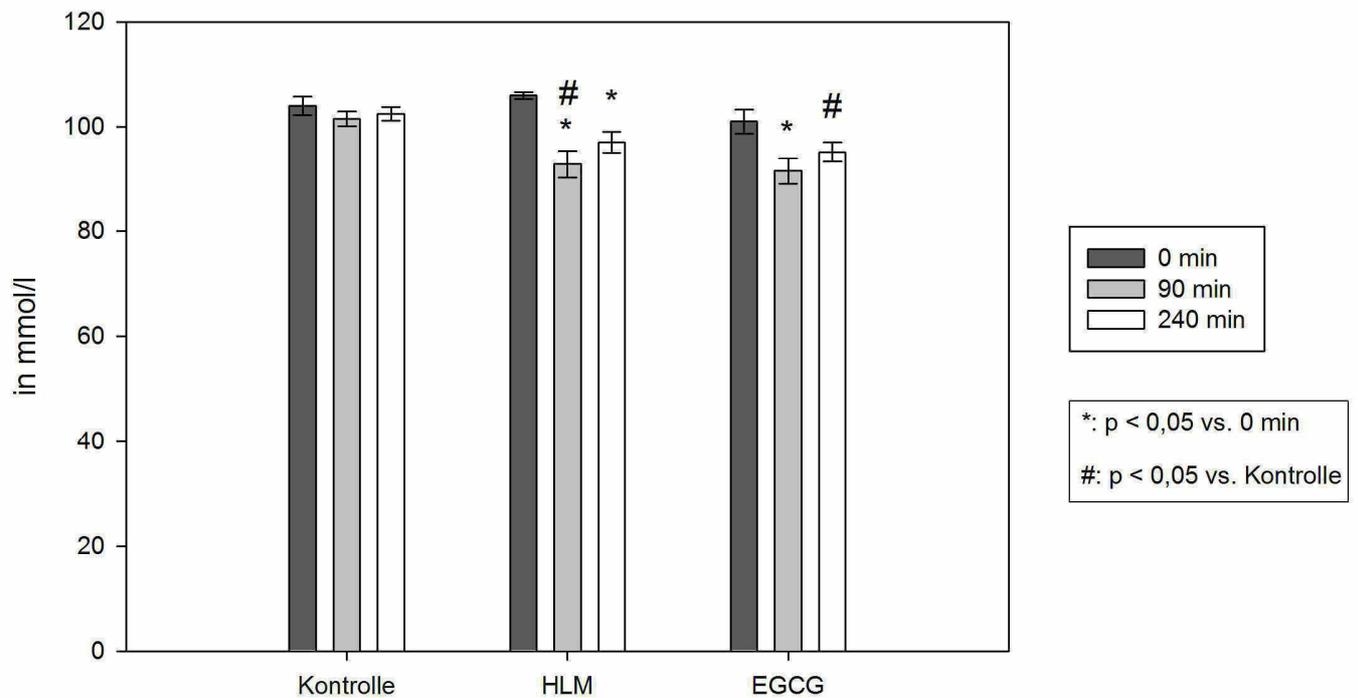


Abbildung 27: Chloridwerte nach 0, 90 und 240 Minuten

Tabelle 19: Natriumwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler.

**Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt und
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#))**

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	135,5 ± 1,84 mmol/l	134 ± 2,41 mmol/l	134,8 ± 1,83 mmol/l
HLM	137,9 ± 0,54 mmol/l	124,4 ± 3,07 mmol/l *	130,31 ± 1,83 mmol/l *
EGCG	134,9 ± 2,27 mmol/l	122,1 ± 3,4 mmol/l * #	128,7 ± 3,84 mmol/l

Tabelle 20: Kaliumwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt)

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	3,78 ± 0,22 mmol/l	4,79 ± 0,4 mmol/l	4,85 ± 0,23 mmol/l *
HLM	3,87 ± 0,12 mmol/l	5,28 ± 0,28 mmol/l *	4,77 ± 0,29 mmol/l *
EGCG	3,63 ± 0,22 mmol/l	5,41 ± 0,32 mmol/l *	4,5 ± 0,21 mmol/l *

Tabelle 21: Calciumwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt)

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	1,36 ± 0,04 mmol/l	1,2 ± 0,11 mmol/l	1,39 ± 0,05 mmol/l
HLM	1,38 ± 0,02 mmol/l	0,94 ± 0,03 mmol/l *	1,3 ± 0,06 mmol/l
EGCG	1,32 ± 0,04 mmol/l	1,11 ± 0,07 mmol/l *	1,34 ± 0,08 mmol/l

Tabelle 22: Chloridwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler.

**Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt und
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#))**

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	104 ± 1,81 mmol/l	101,5 ± 1,41 mmol/l	102,43 ± 1,31 mmol/l
HLM	106 ± 0,63 mmol/l	92,8 ± 2,58 mmol/l * #	97 ± 1,98 mmol/l *
EGCG	101 ± 2,29 mmol/l	91,5 ± 2,5 mmol/l *	95,17 ± 1,92 mmol/l #

9.5 Tabelle mit Werten aus den Blutgasanalysen: arterielles Laktat

Tabelle 23: Arterielle Laktatwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler. Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt, Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§))

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	2,46 ± 0,34 mmol/l	3,71 ± 1,22 mmol/l	3,24 ± 0,95 mmol/l
HLM	1,66 ± 0,16 mmol/l	7,02 ± 0,49 mmol/l * #	10,04 ± 1,54 mmol/l * #
EGCG	2,65 ± 0,43 mmol/l §	5,92 ± 0,63 mmol/l *	5,57 ± 0,95 mmol/l * §

9.6 Tabellen mit Werten der Blutproben

Tabelle 24: Korrigierte Kreatininwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler. Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt, Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§))

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	3,65 ± 0,4	3,45 ± 0,31	3,584 ± 0,55
HLM	2,56 ± 0,09 #	2,51 ± 0,17 #	5,22 ± 0,42 *
EGCG	3,79 ± 0,69	4,18 ± 1,03 §	3,98 ± 0,39

Tabelle 25: Korrigierte Harnstoffwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler. Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt und Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§))

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	0,162 ± 0,03	0,149 ± 0,02	0,147 ± 0,02
HLM	0,084 ± 0,01	0,098 ± 0,01	0,176 ± 0,01 *
EGCG	0,171 ± 0,04 §	0,234 ± 0,05 §	0,213 ± 0,02

Tabelle 26: Korrigierte Gesamteiweißwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler. Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt und Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#))

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	2,12 ± 0,3	1,68 ± 0,21	1,59 ± 0,21
HLM	1,45 ± 0,09 #	1,2 ± 0,04 * #	1,17 ± 0,03 * #
EGCG	2,12 ± 0,39	1,63 ± 0,26	1,51 ± 0,22

9.7 Ergebnisse der Blutproben: Leukozyten und Lymphozyten

Die Leukozyten- und die Lymphozytenzahlen geben Hinweise auf eine inflammatorische Reaktion im Körper. Sie wurden hier ausgewertet, um darzustellen, ob der Körper während der Versuchszeit bereits Abwehrmaßnahmen gegen eventuell inflammatorisch wirkende Reize ergriff.

Da es während des Versuches aufgrund von Blutverlusten oder Hämodilution einerseits und von Bluttransfusionsgaben andererseits zu teils erheblichen Schwankungen des Hämatokrits der Ferkel kam, wurden beide Werte mit dem zum jeweiligen Zeitpunkt ermittelten Hämatokrit korrigiert. Die dafür verwendete Formel war:

Leuko- bzw. Lymphozyten / Hämatokrit in Prozent.

Daher sind die Werte als relative Einheiten (rel. E.) angegeben.

Die Werte der Leukozyten der HLM- und der EGCG-Gruppe fielen im Zeitraum von 0 bis 90 Minuten signifikant ($p < 0,05$) ab. Die Werte der Kontrollgruppe veränderten sich nicht signifikant ($p < 0,05$). Außerdem war der Unterschied zwischen den Werten der Kontroll- und der HLM-Gruppe bei 90 Minuten signifikant ($p < 0,05$) (siehe Abb. 28 und Tabelle 27).

Die Lymphozytenwerte der Kontroll- und HLM-Gruppe bei 90 Minuten unterschieden sich signifikant ($p < 0,05$) voneinander (siehe Abb. 29 und Tabelle 28).

Insgesamt sind hier also keine eindeutigen Hinweise auf einen gesetzten Schaden inflammatorischer Genese erkennbar. Dies ist auf den relativ kurzen Versuchszeitraum zurückzuführen, der möglicherweise nicht ausreichte, um dem inflammatorischen Geschehen – was für gewöhnlich mehr oder minder stark ausgeprägt nach der Verwendung einer HLM auftritt (vgl. 2.4.2) – Raum zur Entwicklung zu geben.

Korrigierte Leukozytenwerte

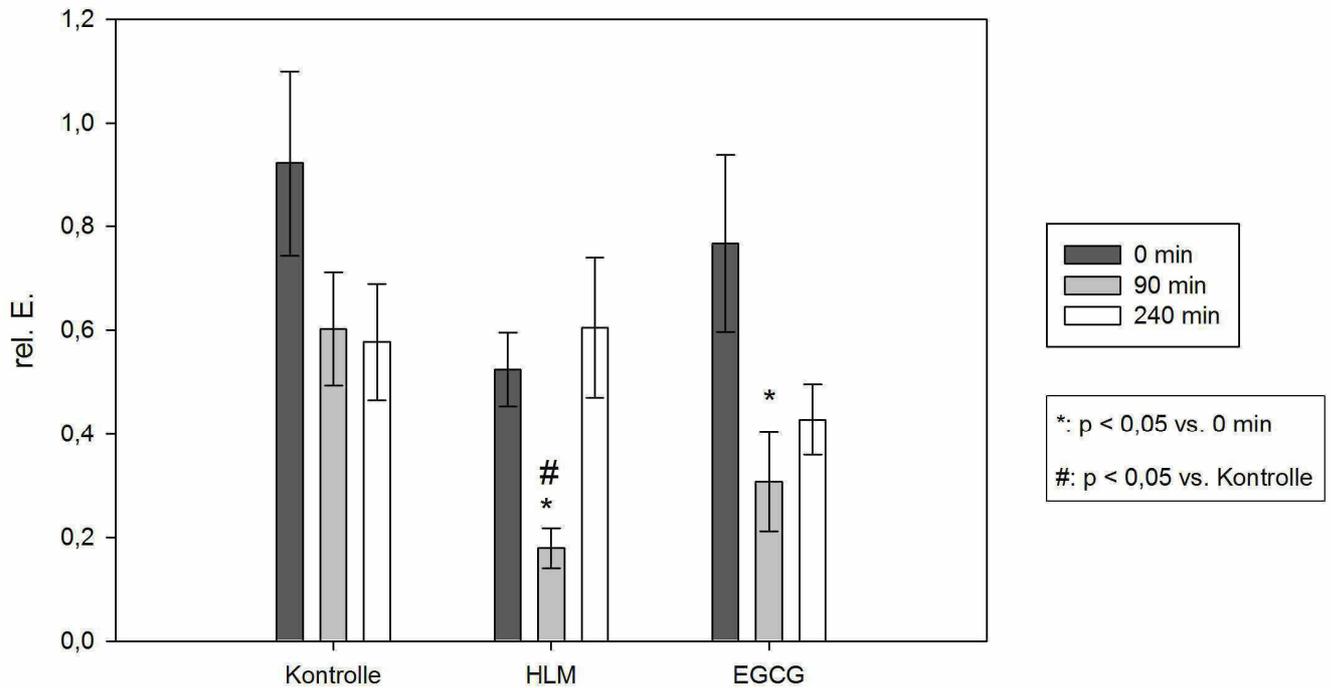


Abbildung 28: Korrigierte Leukozytenwerte.

Die Werte sind angegeben als relative Einheit, da sie sich aus der oben genannten Formel (in diesem Falle Leukozyten in Gpt/l / Hämatokrit in Prozent) ergeben.

Tabelle 27: Korrigierte Leukozytenwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler. Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt und Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#))

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	0,92 ± 0,18	0,6 ± 0,11	0,58 ± 0,11
HLM	0,53 ± 0,07	0,18 ± 0,04 * #	0,6 ± 0,13
EGCG	0,77 ± 0,17	0,31 ± 0,1 *	0,43 ± 0,07

Korrigierte Lymphozytenwerte

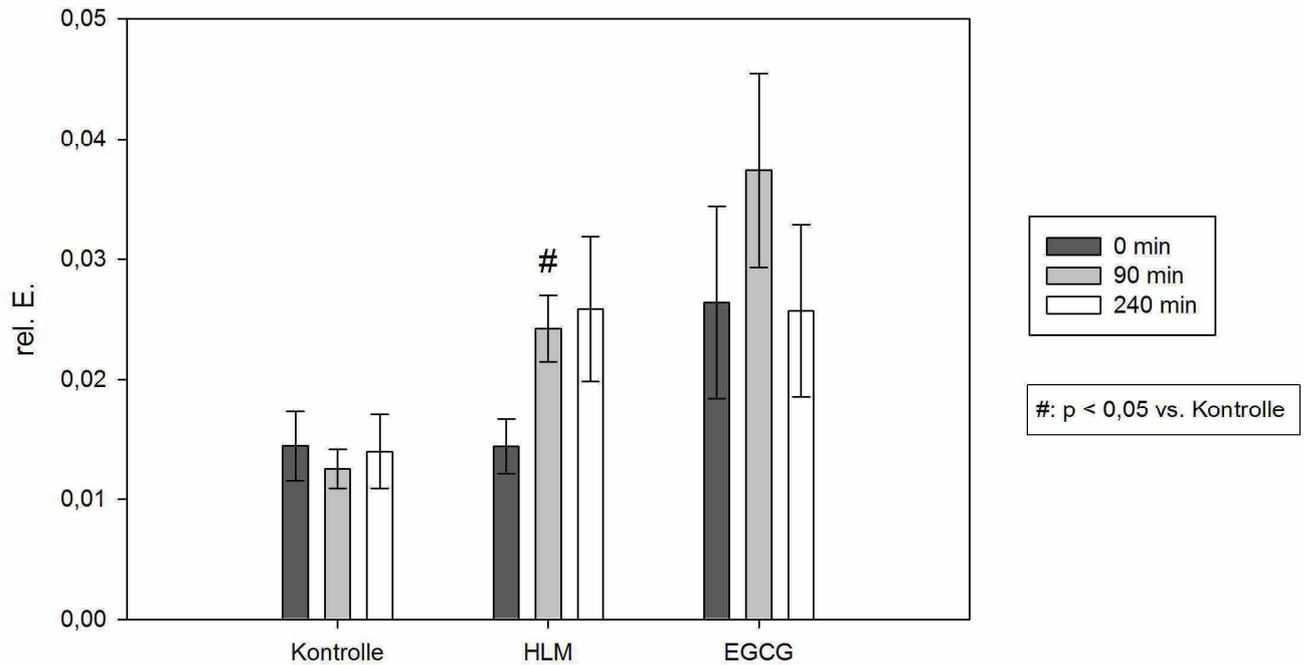


Abbildung 29: Korrigierte Lymphozytenwerte.

Die Werte sind angegeben als relative Einheit, da sie sich aus der oben genannten Formel (in diesem Falle Lymphozyten in Gpt/l / Hämatokrit in Prozent) ergeben.

Tabelle 28: Korrigierte Lymphozytenwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler. Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe wird durch einen Hashtag (#) angezeigt)

Gruppe	0 Minuten	90 Minuten	240 Minuten
Kontrolle	0,0144 ± 0	0,0125 ± 0	0,0139 ± 0
HLM	0,0144 ± 0	0,0242 ± 0 #	0,0258 ± 0,01
EGCG	0,0264 ± 0,01	0,0374 ± 0,01	0,0257 ± 0,01

9.8 Tabellen mit Werten der histologischen und immunhistochemischen Färbung

Tabelle 29: Gesamtfläche der Glomeruli, HE-Färbung
(Mittelwerte und ihre Standardfehler.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt,
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)

Gruppe	prä OP	post OP
Kontrolle	3843,42 ± 162,64 μm^2	7111,81 ± 282,68 μm^2 *
HLM	4603,99 ± 226,36 μm^2	7792,71 ± 257,65 μm^2 *
EGCG	1657,07 ± 113,12 μm^2	2836,95 ± 99,48 μm^2 * # §

Tabelle 30: Spaltfläche in den Glomeruli, HE-Färbung
(Mittelwerte und ihre Standardfehler.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt,
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)

Gruppe	prä OP	post OP
Kontrolle	18,31 ± 0,81 μm^2	20,1 ± 0,66 μm^2
HLM	15,7 ± 1 μm^2	34,93 ± 0,67 μm^2 * #
EGCG	17,32 ± 1,32 μm^2	22,87 ± 0,7 μm^2 §

Tabelle 31: Spaltbreite in den Glomeruli, HE-Färbung

(Mittelwerte und ihre Standardfehler.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt,

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)

Gruppe	prä OP	post OP
Kontrolle	8,06 ± 0,24 µm	9,09 ± 0,39 µm
HLM	7,96 ± 0,29 µm	23,26 ± 0,64 µm * #
EGCG	9,05 ± 0,56 µm	10,58 ± 0,38 µm §

Tabelle 32: Epithelhöhe der proximalen Tubuli, HE-Färbung

(Mittelwerte und ihre Standardfehler.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt,

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)

Gruppe	prä OP	post OP
Kontrolle	5,82 ± 0,16 µm	7,58 ± 0,14 µm *
HLM	6,2 ± 0,11 µm	7,28 ± 0,12 µm *
EGCG	4,12 ± 0,08 µm	5,17 ± 0,13 µm # §

Tabelle 33: Pyknotische Zellkerne in den proximalen Tubuli, HE-Färbung

(Mittelwerte und ihre Standardfehler. Angegeben ist der prozentuale Anteil pyknotischer Zellkerne der proximalen Tubuli von deren Gesamtzahl.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt und

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#)

Gruppe	prä OP	post OP
Kontrolle	3,68 ± 0,5 %	7,42 ± 0,52 % *
HLM	3,26 ± 0,3 %	13,11 ± 0,7 % * #
EGCG	3,7 ± 0,58 %	10,72 ± 0,99 % *

**Tabelle 34: Vakuolisierte Zellen in den proximalen Tubuli, HE-Färbung
(Mittelwerte und ihre Standardfehler. Angegeben ist der prozentuale Anteil proximaler Tubuli mit vakuolisierten Zellen von deren Gesamtzahl.**

**Signifikanz ($p < 0,05$) vs. prä OP wird durch einen Asterisk (*) angezeigt,
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe durch einen Hashtag (#) und
Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)**

Gruppe	prä OP	post OP
Kontrolle	0,79 ± 0,56 %	14,7 ± 3,98 %
HLM	1,46 ± 0,71 %	42,15 ± 3,14 % * #
EGCG	0 %	21,66 ± 2,98 % * §

**Tabelle 35: Kernpositivität in verschiedenen Strukturen, HIF-1-alpha-TSA-Färbung
(Angegeben ist der prozentuale Anteil positiver Zellkerne des Glomerulums/der proximalen bzw. distalen Tubuli/Sammelrohre von deren Gesamtzahl)**

Ferkel	Kernpositivität in Glomeruli in %	Kernpositivität in proximalen Tubuli in %	Kernpositivität in distalen Tubuli in %	Kernpositivität in Sammelrohren in %
Kontrolle Schw13	5,6	8	4,4	6
Kontrolle Schw16	3,6	4,4	5,2	3,2
HLM Schw7	2	55,4	5,2	4,8
HLM Schw11	6,8	46	6,8	6

Tabelle 36: Kernpositivität in proximalen Tubuli, HIF-1-alpha-TSA-Färbung
(Mittelwerte und ihre Standardfehler. Angegeben ist der prozentuale Anteil positiver Zellkerne der proximalen Tubuli von deren Gesamtzahl.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe wird durch einen Hashtag (#) angezeigt und Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)

Gruppe	post OP
Kontrolle	8,17 ± 1,65 %
HLM	42,56 ± 2,03 % #
EGCG	28,27 ± 1,44 % # §

Tabelle 37: Distale Tubuli und Sammelrohre, Nitrotyrosin-AEC-Färbung
(Mittelwerte und ihre Standardfehler. Angegeben ist der prozentuale Anteil positiver distale Tubuli und Sammelrohre von deren Gesamtzahl.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe wird durch einen Hashtag (#) angezeigt und Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)

Gruppe	Distale Tubuli post OP	Sammelrohre post OP
Kontrolle	12,83 ± 1,43 %	7,95 ± 1,55 %
HLM	35,13 ± 1,56 % #	23,83 ± 1,39 % #
EGCG	24,48 ± 0,87 % # §	16,58 ± 0,91 % # §

Tabelle 38: Glomeruli, proximale und distale Tubuli und Sammelrohre, AIF-TSA-Färbung
(Mittelwerte und ihre Standardfehler. Angegeben ist der prozentuale Anteil positiver Zellkerne der Glomeruli, distalen und proximalen Tubuli und der Sammelrohre von deren Gesamtzahl.

Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe wird durch einen Hashtag (#) angezeigt, Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§)

Gruppe	Glomeruli post OP	Proximale Tubuli post OP	Distale Tubuli post OP	Sammelrohre post OP
Kontrolle	4,69 ± 2,49 %	4,17 ± 1,44 %	4,92 ± 0,83 %	3,79 ± 1,22 %
HLM	30,09 ± 3,96 % #	21,00 ± 2,99 % #	20,02 ± 4,15 % #	12,03 ± 1,74 % #
EGCG	9,66 ± 2,00 % §	13,53 ± 1,55 % #	10,80 ± 1,53 %	10,06 ± 0,99 % #

9.9 Protokolle der histologischen und immunhistochemischen Färbungen

Tabelle 39: Protokoll der HE-Färbung

Lösung, Konzentration	Zeit	Wirkweise/Vorgang	Firma
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 100 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 96 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 70 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 50 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Aqua dest.	2 min	Rehydrieren	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D
Hämalaun	10 min	Kernanfärbung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Leitungswasser	15 min	Bläuen	
0,1 HCl	5 sec	Kurz spülen	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig, D
Eosin G (0,25 %)	5 min	Färbung	Merck KG Darmstadt, D
Aqua dest.	1 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D
Ethanol 70 %	3 min	Dehydrieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 96 %	3 min	Dehydrieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 100 %	3 min	Dehydrieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	3 min	Klären	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	3 min	Klären	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Entellan		Eindeckeln	Merck KG Darmstadt, D

Tabelle 40: Protokoll der HIF-1-alpha-TSA-Färbung

Lösung, Konzentration	Zeit	Wirkweise/Vorgang	Firma
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 100 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 96 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 70 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Aqua dest.	5 min	Rehydrieren	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D
60 % Methanol, 40 % 1x PBS, 0,3 % H ₂ O ₂ (42 ml Methanol, 27,3 ml 1x PBS, 700 µl H ₂ O ₂ 30 %)	20 min	Unterdrückung der endogenen Peroxidase	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4 (10x PBS pH 7,5: 1l Aqua dest. 13,34 g Na ₂ HPO ₄ 3,9 g NaH ₂ PO ₄ 58,44 g NaCl)	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
0,01 Mol Natrium-Citrat pH 6,0 (1l Aqua dest. 2,941g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat)	30 min	Permeabilisieren in Mikrowelle bei höchster Stufe	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
	30 min	Abkühlen	
Fettstift		Umranden	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
1 % Blocking Solution in 1x PBS	1 h	Blockieren, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer	TSA-Kit Nr. 21 T-20931, Invitrogen, Eugene, OR, USA Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rabbit-Anti-HIF-1-alpha (H-206) sc-10790 Lot-Nr. A2706 mit 1 % Blocking Solution in der Verdünnung 1:100	Über Nacht	Primärer Antikörper, bei 4 °C in feuchter Kammer	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA TSA-Kit Nr. 21 T-20931, Invitrogen, Eugene, OR, USA Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“,

			Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
	30 min	Wärmen bei Raumtemperatur	
1x TNT-Puffer pH 7,4 (1x TNT-Puffer pH 7,4: 1l Aqua dest. 12,114 g Tris 8,766 g NaCl 500 µl Tween-20)	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L) Horseradish Peroxidase conjugate T-20921 Lot-Nr. 790477 mit 1 % Blocking Solution in der Verdünnung 1:100	2 h	Sekundärer Antikörper, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer	TSA-Kit Nr. 11 T-20921 Invitrogen, Eugene, OR, USA TSA-Kit Nr. 21 T-20931, Invitrogen, Eugene, OR, USA Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D

			D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Tyramid-Stammlösung mit Amplifikationspuffer/0,0015 % H ₂ O ₂ in der Verdünnung 1:100	10 min	Signalverstärkung, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer	TSA-Kit Nr. 21 T- 20931, Invitrogen, Eu- gene, OR, USA
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Streptavidin-Horseradish- Peroxidase mit 1 % Blo- cking Solution in der Ver- dünnung 1:100	30 min	Signalverstärkung, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer	TSA-Kit Nr. 21 T- 20931, Invitrogen, Eu- gene, OR, USA Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
AEC + High Sensitivity Substrate Chromogen	30 min	Färben	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
1x TNT-Puffer pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

Hämalaun	60 sec	Kerngegenfärbung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Aqua dest.	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D
Mounting Medium		Eindeckeln	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
Nagellack		Versiegeln	„Diorlisse“, Dior, Paris, F

Tabelle 41: Protokoll der Nitrotyrosin-AEC-Färbung

Lösung, Konzentration	Zeit	Wirkweise/Vorgang	Firma
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 100 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 96 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 70 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Aqua dest.	5 min	Rehydrieren	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D
1x TBS pH 7,6 (10x TBS pH 7,6: 1 l Aqua dest. 60,57 g Tris 87 g NaCl)	10 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
70 µl Triton X-100 in 70 ml 1x TBS	30 min	Permeabilisieren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
60 % Methanol, 40 % 1x TBS, 0,3 % H ₂ O ₂ (36 ml Methanol, 24 ml 1x TBS, 180 µl H ₂ O ₂ 30 %)	10 min	Unterdrückung der endogenen Peroxidase	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	10 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Fettstift		Umranden	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
2 % BSA in TBS pH 7,6	1 h	Blockieren, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Mouse-Anti-3-Nitrotyrosine mAb, clone 39B6,	Über Nacht	Primärer Antikörper, bei 4 °C in feuchter Kammer	Kamiya Biomedical Company, Seattle, WA, USA

Cat.-Nr. MC-374 mit AK-Diluent in der Verdünnung 1:200			Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
	30 min	Wärmen	
1x TBS	10 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	10 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	10 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Goat-Anti-Mouse-Ig G2alpha-HRP s- 2970, Lot-Nr D2806 mit AK-Diluent in der Verdünnung 1:100	1 h	Sekundärer Antikörper, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
1x TBS	10 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	10 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	10 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
AEC + High Sensitivity Substrate Chromogen	20 min	Färben	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
Aqua dest.	3 sec	Spülen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D
Mounting Medium		Eindeckeln	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
Nagellack		Versiegeln	„Diorlisse“, Dior, Paris, F

Tabelle 42: Protokoll der AIF-TSA-Färbung

Lösung, Konzentration	Zeit	Wirkweise/Vorgang	Firma
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Xylol	10 min	Entparaffinieren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 100 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 96 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ethanol 70 %	5 min	Waschen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Aqua dest.	5 min	Rehydrieren	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D
1x TBS (10x TBS pH 7,6: 1 l Aqua dest. 60,57 g Tris 87 g NaCl)	10 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
0,01 Mol Natrium-Citrat pH 6,0 (1l Aqua dest. 2,941g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat)	30 min	Permeabilisieren in Mikrowelle bei höchster Stufe	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
	30 min	Abkühlen	
1x TBS	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
60 % Methanol, 40 % 1x TBS, 0,3 % H ₂ O ₂ (36 ml Methanol, 24 ml 1x TBS, 180 µl H ₂ O ₂ 30 %)	10 min	Unterdrückung der endogenen Peroxidase	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach,

			D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x TBS	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Fettstift		Umranden	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
2 % BSA in TBS pH 7,6	1 h	Blockieren, bei Raum- temperatur in feuchter Kammer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Rabbit-Anti-AIF (H-300) polyclonal IgG sc-5586 Lot-Nr. J2605 mit AK-Diluent in der Verdünnung 1:100	Über Nacht	Primärer Antikörper, bei 4 °C in feuchter Kammer	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
	30 min	Wärmen bei Raumtempe- ratur	
1x PBS pH 7,4 (10x PBS pH 7,5: 1l Aqua dest. 13,34 g Na ₂ HPO ₄ 3,9 g NaH ₂ PO ₄ 58,44 g NaCl)	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Goat-Anti-Rabbit IgG Sigma A9169 Lot-Nr. 022M4810 Horseradish Peroxidase con- jugate T-20021 mit 1 % Blo- cking Solution in der Verdün- nung 1:250	1 h	Sekundärer Antikörper, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D TSA-Kit Nr. 21 T- 20931, Invitrogen, Eu- gene, OR, USA Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D

			Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tyramid-Stammlösung mit Amplifikationspuffer/0,0015 % H ₂ O ₂ in der Verdünnung 1:100	10 min	Signalverstärkung, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer	TSA-Kit Nr. 21 T-20931, Invitrogen, Eugene, OR, USA
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Streptavidin-Horseradish-Peroxidase mit 1 % Blocking Solution in der Verdünnung 1:100	30 min	Signalverstärkung, bei Raumtemperatur in feuchter Kammer	TSA-Kit Nr. 21 T-20931, Invitrogen, Eugene, OR, USA Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D

			Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
AEC + High Sensitivity Substrate Chromogen	10-30 min (optisch einschätzen!)	Färben	Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA
1x PBS pH 7,4	1 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
1x PBS pH 7,4	1 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Hämalaun	5 sec	Kerngegenfärbung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Fließendes Leitungswasser	5 min	Waschen	
Aqua ddest.	5 min	Waschen	Wasser destilliert durch „Milli-Q-Academic“, Millipore, Schwalbach, D
Kaisers Glyceringelatine Glycerolgelatine		Eindeckeln	Merck KG Darmstadt, D
Nagellack		Versiegeln	„Diorlisse“, Dior, Paris, F

9.10 Tabellen mit Werten der Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography

Tabelle 43: ATP-, ADP- und AMP-Werte
 (Summe der energiereichen Phosphatverbindungen)
 (Mittelwerte und ihre Standardfehler.
 Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe wird durch
 ein Paragraphenzeichen (§) angezeigt)

Gruppe	ATP, ADP und AMP in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe
Kontrolle	$0,973 \pm 0,279$
HLM	$0,677 \pm 0,139$
EGCG	$1,154 \pm 0,133$ §

Tabelle 44: Hypoxanthin- und Adenosinwerte (Mittelwerte und ihre Standardfehler.
 Signifikanz ($p < 0,05$) vs. Kontrollgruppe wird durch einen Hashtag (#) angezeigt und
 Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe durch ein Paragraphenzeichen (§))

Gruppe	Adenosin in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe	Hypoxanthin in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Gewebe
Kontrolle	$0,008 \pm 0,001$	$0,013 \pm 0,004$
HLM	$0,005 \pm 0,001$ #	$0,008 \pm 0,003$
EGCG	$0,007 \pm 0$ §	$0,003 \pm 0$

**Tabelle 45: Dephosphorylierungsratios (ATP/(ADP+AMP) und
 ATP/(ADP+AMP+Adenosin))**
 (Mittelwerte und ihre Standardfehler.
 Signifikanz ($p < 0,05$) vs. HLM-Gruppe wird durch
 ein Paragraphenzeichen (§) angezeigt.
 Die Werte besitzen keine Einheit)

Gruppe	ATP/(ADP+AMP) Ratio	ATP/(ADP+AMP+Adenosin) Ratio
Kontrolle	$0,060 \pm 0,018$	$0,060 \pm 0,018$
HLM	$0,044 \pm 0,033$	$0,043 \pm 0,033$
EGCG	$0,135 \pm 0,034$ §	$0,134 \pm 0,033$ §

10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. F.-W. Mohr, dem Direktor der Klinik/ärztlichen Direktor des Herzzentrums Leipzig für die Bereitstellung der Räumlichkeiten (Labor und Tier-OP).

Außerdem möchte ich meinem Betreuer und Doktorvater aus der Humanmedizin Herrn Prof. Dr. med. S. Dhein für die Überlassung des interessanten Themas und für die Betreuung danken.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Doktorvater aus der Veterinärmedizin Herrn Prof. Dr. med. vet. A. Sobiraj für seine Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt außerdem allen, die an den Tierversuchen beteiligt waren: Den beiden Tierärztinnen Frau Dr. med. vet. K. Oelmann und Frau Dr. med. vet. S. Oßmann für die Hilfe bei der Betreuung und Anästhesie der Ferkel, dem Humanmediziner Herrn P. Kiefer, der die Operationen durchgeführt hat, dem Leiter der Kardioteknik des Herzzentrums Herrn K. Krämer und seinen Mitarbeitern für die Bedienung der Herz-Lungen-Maschine und der Humanmedizinerin Frau PD Dr. med. A. Salameh, die die Ferkel vor allem kardiologisch betreut hat.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern aus dem Labor der Abteilung Forschung und Lehre der Herzzentrums bedanken, insbesondere bei den Biologinnen Frau Dr. rer. nat. S. von Salisch für die Durchführung der RP-HPLC, Frau J. Schnabel für die praktische Durchführung der AIF-TSA-Färbung und Frau F. Schlegel für ihre Beratung bei praktische Fragestellungen während meiner Laborarbeit.

Mein Dank gilt außerdem dem Lehr- und Versuchsgut Oberholz, Großpösna, für die Bereitstellung der Versuchstiere und dem Labor Dr. Reising-Ackermann und Kollegen, Leipzig, welches die Blutproben (Serumkreatinin, -harnstoff, Gesamteiweiß) analysiert hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, besonders bei meinen Eltern, für ihre Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion bedanken. Vor allem danke ich meinem Bruder T. Krausch und meiner lieben Freundin S. Bodenstedt für die Durchsicht der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann R. Twal für seine Geduld, sein Interesse und seine praktische und emotionale Unterstützung während meiner gesamten Promotion.