

**Aus der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Arthur Lichtenberg**

**Über den Einfluss einer präoperativen Supplementation mit Selen als
mögliche Interventionsstrategie des durch extrakorporale Zirkulation und
hypothermen Kreislaufstillstand induzierten Ischämie- und Reperfusionss-
Schadens:**

**Modifikation der oxidativen Organschädigung und Entzündungsreaktion
in einem *in vivo* Ratten-Modell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**vorgelegt von
Lena Marie Wollschläger
2019**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Udo Boeken

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Meinem Großvater

Publikationen zu dieser Arbeit

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- 1. Engels M, Bilgic E, Pinto A, Vasquez E, Wollschläger L, Steinbrenner H, Kellermann K, Akhyari P, Lichtenberg A, Boeken U.** A cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage. *European Journal of Inflammation*. **2014**;11:26.
- 2. Steinbrenner H, Bilgic E, Pinto A, Engels M, Wollschläger L, Dohrn L, Kellermann K, Boeken U, Akhyari Payam, Lichtenberg Artur.** Selenium Pretreatment for Mitigation of Ischemia/Reperfusion Injury in Cardiovascular Surgery: Influence on Acute Organ Damage and Inflammatory Response. *Inflammation*. **2016**;39(4):1363-76.

Zusammenfassung

Nach herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kann es zu postoperativen Komplikationen mit teilweise schweren Folgen für die betroffenen Patienten kommen. Ursächlich hierfür sind Ischämie- und Reperfusionphasen, denen die inneren Organe im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (DHCA) ausgesetzt sind. Der daraus resultierende sogenannte Ischämie- und Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) ist einerseits durch eine massive systemische Immunantwort gekennzeichnet [Jennings *et al.*, 1960; Kirklin *et al.*, 1983], andererseits führt der I/R-Schaden im Rahmen einer übermäßigen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu oxidativem Stress [Wan *et al.*, 1997; Zweier *et al.*, 1987]. Gegenwärtige Interventionsstrategien zur Unterdrückung des I/R-Schadens zielen auf die Gabe von Antioxidantien, Kortikosteroiden, Adenosin und Aprotinin ab sowie den Einsatz Heparin-beschichteter EKZ-Systeme und intraoperativer Ultrafiltration [Wan *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 1997]. Therapieansätze zur direkten Unterdrückung des I/R-Schadens existieren bisher jedoch nicht. Das essentielle Spurenelement Selen könnte in diesem Zusammenhang eine interessante Option darstellen, da es anti-oxidative sowie anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist [Venardos *et al.*, 2007]. Studien an isolierten Organen zeigten, dass die anorganische Selenverbindung Natriumselenit vor I/R-Schaden schützen kann [Venardos *et al.*, 2004; Sinci *et al.*, 1998]. In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Natriumselenit auch *in vivo* einen protektiven Einfluss auf den durch die EKZ und den DHCA entstandenen I/R-Schaden hat. Nach Etablierung des dafür benötigten Kleintier-EKZ-Modells an der Ratte [Engels *et al.*, 2014] und geeigneten Vorversuchen zur Wirksamkeit einer Natriumselenit-Fütterung, wurden für die Natriumselenit-Studie männliche Wistar-Ratten in zwei Gruppen (Kontrolle und Natriumselenit) zu je 7 Tieren eingeteilt und erhielten fünf Wochen lang selenadäquates (0,3 ppm Selen; Kontrolle) bzw. selenangereichertes Futter (1 ppm Selen; Natriumselenit). Danach wurden die Tiere einer EKZ mit DHCA und anschließender normothermer Reperfusion unterzogen. Nach Versuchsende wurden Herz, Leber, Lungen und Nieren entnommen. Aus den Organlysaten wurde die GPx-Aktivität und der Gewebeselen Spiegel bestimmt. Während der EKZ entnommene Blutproben dienten der Analyse von klinisch-chemischen Laborparametern und Serumspiegeln proinflammatorischer Zytokine. Mittels Immunoblots sowie eines ELISAs zur Bestimmung der AKT-Phosphorylierung wurden molekulare Signalwege, die mit dem I/R-Schaden in Verbindung gebracht werden, untersucht. Die Messung der Aktivität der Caspase 3/7 und der Poly (Adenosin Diphosphate-Ribose) Polymerase (PARP) dienten zur Analyse des Zelltods in den Geweben der Tiere. Überdies wurden die während des Versuchs dokumentierten hämodynamischen Parameter und Vitalparameter statistisch ausgewertet.

In den Organen der mit Natriumselenit supplementierten Tiere zeigte sich eine signifikant erhöhte GPx-Aktivität sowie ein signifikant erhöhter Gewebeselen Spiegel, welche auf eine gleichmäßige Verteilung des Selen im Körper der Tiere hindeutet. Verglichen mit der Kontrollgruppe waren in der Natriumselenit-Gruppe die Plasmaspiegel der klinisch-chemischen Parameter Alanin-Aminotransferase (ALT) und Troponin I leicht erniedrigt, Aspartat-Aminotransferase (AST) und die Laktatdehydrogenase (LDH) signifikant erniedrigt. Bezogen auf die Kontrollgruppe zeigten die Tiere der Natriumselenit-Gruppe einen tendenziell geringeren Katecholaminbedarf und einen signifikant erniedrigten Volumenbedarf. Hämoglobin- und Hämatokritwerte der Kontrolltiere nahmen im Verlauf der EKZ stärker ab als die der mit Natriumselenit supplementierten Tiere. Auch die I/R-induzierte Leukozytose konnte durch Natriumselenit positiv beeinflusst werden. Anhand der Western Blot Analysen zeigte sich, dass die Phosphorylierungs- und Expressionsmuster von Stressproteinen und Kinasen durch Natriumselenit organspezifisch beeinflusst werden konnten. Die AKT Aktivität war in Leber und Lunge der Natriumselenit-Gruppe signifikant erhöht.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass eine Supplementierung mit Natriumselenit in unserem EKZ-Versuchsaufbau einen positiven Einfluss auf mehrere, mit Ischämie und Reperfusion assoziierte, klinische und molekularbiologische Parameter hatte. Dabei ist insbesondere die Unterdrückung der akut nach I/R auftretenden Leukozytose sowie die Normalisierung der auf nekrotischen Zelltod in verschiedenen Geweben hindeutenden Enzyme im Serum der mit Natriumselenit supplementierten Tiere hervorzuheben. Die Bestimmung des Selenstatus und gegebenenfalls eine Supplementierung mit Selen im Vorfeld von geplanten Eingriffen am Herzen könnten demzufolge sinnvoll sein, um I/R-induzierte Organschäden bei Patienten zu vermindern.

Summary

After Cardiac surgery requiring cardiopulmonary bypass (CPB) and circulatory arrest (CA), postoperative complications with potentially severe consequences for the affected patients may occur. Ischemia and reperfusion during CPB cause a massive systemic immune response [Jennings *et al.*, 1960; Kirklin *et al.*, 1983] as well as the excessive formation of reactive oxygen species (ROS) [Wan *et al.*, 1997; Zweier *et al.*, 1987] which both result in oxidative tissue damage. This so-called ischemia/reperfusion injury (IRI) contributes to morbidity and mortality after CPB and CA. Current intervention strategies for the suppression of IRI include the administration of antioxidants, corticosteroids, adenosine, aprotinin as well as the use of heparin-coated extracorporeal circulation systems and intraoperative ultrafiltration [Wan *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 1997]. However, therapy approaches for the direct suppression of the I/R injury do not exist so far. Supplementation of Sodium Selenite (Se), an anorganic selenocompound with anti-oxidative as well as anti-inflammatory properties, is known to induce selenoproteins and thus counteracts oxidative damage [Venardos *et al.*, 2007]. The present work should therefore investigate whether Sodium Selenite has a protective influence on the I/R injury caused by CPB and CA. After the establishment of a small animal CPB model with deep hypothermic circulatory arrest (DHCA) [Engels *et al.*, 2014] and suitable preliminary tests for the efficacy of sodium selenite pretreatment, male Wistar rats were divided into two groups (control and sodium selenite) and were fed either a selenium-adequate diet (0.3 ppm Se; Control) or Se-supplemented feed (1 ppm Se; Sodium Selenite) for five weeks. The animals were then connected to a heart-lung-machine and slowly cooled down to a core body temperature of 16°C. At 16°C, CPB was temporarily interrupted and the animals underwent 45 minutes of DHCA. After rewarming followed by 60 minutes of reperfusion, CPB was terminated and tissue samples (heart, liver, lungs and kidneys) were harvested. The requirement of catecholamine and vital parameters were documented continuously throughout the experiment. Glutathionperoxidase activity (GPx) was determined and tissue selenium levels were measured. Blood samples taken during CPB were used to analyse markers of oxidative tissue damage (ALT, AST, LDH, troponin) as well as serum levels of proinflammatory cytokines. Immunoblots were used to investigate the effect of Se-supplementation on molecular signaling pathways associated with I/R injury. Caspase 3/7 and poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase (PARP) activity were measured in order to analyze cell death in the different tissues. Sodium Selenite increased GPx activity and tissue selenium levels. Moreover, supplementation with Sodium selenite counteracted the increase in plasma levels of markers of oxidative tissue damage (ALT, AST, LDH, troponin) and suppressed leucocytosis induced by I/R injury. Se-supplemented animals required less catecholamine substitution and volume replacement. In addition, Se-supplementation increased HO-1 expression and STAT3 phosphorylation in the liver while counteracting IRI-induced ERK 1/2 phosphorylation and decreasing HSP-70 expression and STAT3 phosphorylation in the heart. In summary, Se-supplementation showed several positive effects on markers of oxidative tissue damage and influenced expression and phosphorylation of proteins associated with oxidative stress response and inflammation. Preoperative supplementation with Selenite proved to be effective for prevention of acute I/R-induced tissue damage occurring during CPB and DHCA. The determination of blood selenium levels in patients undergoing major cardiac surgery with CPB and CA could therefore represent a promising intervention strategy to counteract I/R-induced organ damage and thus decrease morbidity and mortality after cardiovascular surgery with CPB and CA. Thus, these results demonstrate the feasibility of a therapeutic approach using Sodium Selenite to reduce I/R injury and inflammation during major cardiac surgical procedures. The implications of its different actions regarding proteins related to inflammation and oxidative stress response on recovery after CPB with CA require further investigation.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen	kB	kiloBasen
ALT	Alanin-Aminotransferase	kDa	kiloDalton
APS	Ammoniumpersulfat	KG	Körpergewicht
AST	Aspartat-Aminotransferase	LDH	Lactat-Dehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat	LDL	<i>low-density Lipoprotein</i>
BGA	Blutgasanalyse	LPS	Lipopolysaccharid
BSA	Bovines Serum Albumin	MAD	mittlerer arterieller Druck
bzw.	beziehungsweise	MAPK	<i>mitogen-activated-protein-Kinasen</i>
CAT	Katalase	MAPKK	<i>mitogen-activated-protein-Kinasen-Kinasen</i>
CK	Creatin-Kinase	MAPKKK	<i>mitogen-activated-protein-Kinasen-Kinasen-Kinasen</i>
CK-MB	MB-Isoform der Creatin-Kinase	MeOH	Methanol
CO	Kohlenmonoxid	mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
CO₂	Kohlenstoffdioxid	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
CPB	<i>cardiopulmonary Bypass</i>	NaCl	Natriumchlorid
DAN	2,3-Diaminophtalin	NaCl	Natriumchlorid
DHCA	<i>deep hypothermic circulatory arrest</i>	NADPH	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>	NaN₃	Natriumazid
d.h.	das heißt	nm	Nanometer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	NO	Stickstoffmonoxid
EKG	Elektrokardiogramm	O₂	Sauerstoff
EKZ	Extrakorporale Zirkulation	O₂⁻	Superoxidanion
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase	OH⁻	Hydroxylradikale
et al.	<i>et alia</i>	ONOOH	Peroxynitrit
g	Gramm	PAF	Plättchenaktivierender Faktor
GPx	Glutathionperoxidase	PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
GR	Glutathion-Reduktase	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
GSH	Glutathion	PLT	<i>platelets / Thrombozyten</i>
GSSG	Glutathiondisulfid	Prx	Peroxiredoxine
H₂O₂	Wasserstoffperoxid	PVDF	Polyvinylidenfluorid
HAES	Hydroxyethylstärke	RBC	<i>red blood cells / rote Blutkörperchen</i>
Hb	Hämoglobin	ROS	<i>reactive oxygen species</i>
HCl	Salzsäure	s.	siehe
HClO₄	Perchlorsäure	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
HDL	<i>high-density Lipoprotein</i>	SDS-Page	<i>sodium dodecyl sulfate polcrylamid gel electrophoresis</i>
H/K-ATPase	Protonen-/Kalium-Pumpe	Sec	Selenocystein
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>	SECIS	Selenocystein-Insertions-Sequenz
Hkt	Hämatokrit	SeP	Selenoprotein P
HLM	Herz-Lungen-Maschine	s.o.	siehe oben
HNO₃	Salpetersäure	SOD	Superoxiddismutase
HO-1	Hämoxygenase 1	STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
HRP	Meerrettichperoxidase	s.u.	siehe unten
HSP	<i>heat shock protein</i>	Tab.	Tabelle
IE	Internationale Einheit	tert-BuOOH	tertiäres butyl-Hydroperoxid
IgG	Immunglobulin G	TBST	<i>tris-buffered saline and Tween 20</i>
IL	Interleukin	TEMED	Tetramethylethylendiamin
I/R	Ischämie / Reperfusion	TNF- α	Tumornekrosefaktor α
JAK	Janus Kinase	TRIS	Tromethamin
JNK	c-JUN N-terminale Kinase		
IL-6	Interleukin-6		

tRNA	<i>transfer ribonucleic acid</i>
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
u.a.	unter anderem
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumenanteil
w/v	Massenanteil (Gewicht / Volumen)
WBC	<i>red blood cells</i> / rote Blutkörperchen
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Ischämie- und Reperfusionsschaden.....	1
1.1.1 Extrakorporale Zirkulation mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine.....	1
1.1.2 EKZ mit tief hypothermem Kreislaufstillstand.....	1
1.1.3 Ischämie- und Reperfusionsschaden und oxidativer Stress.....	2
1.1.4 Systemische Inflammation und therapeutische Möglichkeiten.....	5
1.1.5 Wichtige Signalwege während Ischämie und Reperfusion.....	8
1.1.6 Apoptotischer Zelltod in Ischämie und Reperfusion.....	14
1.2 Selen.....	15
1.2.1 Entdeckung des Selens und seine Eigenschaften.....	15
1.2.2 Selen in der Nahrungskette.....	15
1.2.3 Auswirkungen von Selen auf die menschliche Gesundheit.....	17
1.2.4 Selenmetabolismus.....	18
1.2.5 Selenoproteine und die antioxidative Wirkung von Selen.....	19
1.2.6 Einfluss von Selen auf den I/R-Schaden.....	22
1.2.7 Natriumselenit.....	24
1.3 Etablierung eines Kleintier-EKZ-Modells.....	25
1.4 Fragestellung.....	26
2 Material und Methoden.....	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Labormaterialien.....	27
2.1.2 Antikörper.....	28
2.1.3 Equipment.....	29
2.1.4 Tierhaltung.....	30
2.2 Methoden.....	30
2.2.1 Versuchsgruppen.....	30
2.2.2 Vorversuche zur Natriumselenitsupplementierung.....	31

2.2.3	Untersuchungen zur Wirkung von Natriumselenit auf den I/R-Schaden	32
2.2.4	Biochemische Methoden.....	41
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Vorversuche zur Supplementierung mit Natriumselenit	47
3.1.1	Erhöhte Glutathionperoxidase – Aktivität in den Organen der nicht behandelten Natriumselenit-Tiere.....	47
3.1.2	Blutanalysen	48
3.1.3	Expression bzw. Phosphorylierung ausgewählter Stressproteine in Organen	50
3.2	Untersuchungen zur protektiven Wirkung der Selen-Supplementation auf den I/R-Schaden	53
3.2.1	GPx-Aktivitätsmessung	53
3.2.2	Selengehalt.....	54
3.2.3	Blutanalysen	55
3.2.4	Hämodynamische- und Vitalparameter	57
3.2.5	Proinflammatorische Zytokine	63
3.2.6	Expression bzw. Phosphorylierung ausgewählter Stressproteine in Organen	69
3.2.7	AKT-Elisa.....	77
3.2.8	Caspase 3 /7-Assay	78
3.2.9	Poly (Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase-Aktivität.....	80
4	Diskussion	82
4.1	Vorversuche zur Effizienz und Sicherheit einer Supplementierung mit Natriumselenit	83
4.2	Protektive Wirkung von Natriumselenit auf den I/R-Schaden	88
4.3	Limitationen der Studie	96
	Schlussfolgerungen.....	98
	Literatur– und Quellenverzeichnis.....	99
	Abbildungsverzeichnis	119
	Tabellenverzeichnis.....	121
	Danksagung	VIII

1 Einleitung

1.1 Ischämie- und Reperfusionsschaden

1.1.1 Extrakorporale Zirkulation mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine

Die erste Herz-Lungen-Maschine (HLM) wurde bereits 1885 von Max Gruber und Maximilian von Frey an der Universität in Leipzig entwickelt. Jedoch erst 68 Jahre später fand die erste erfolgreiche extrakorporale Zirkulation (EKZ) mit Hilfe der HLM am Menschen statt: Am 6. Mai 1953 operierte John Gibbon unter Einsatz der HLM mit EKZ einen Vorhofseptumdefekt und führte somit den ersten herzchirurgischen Eingriff unter Verwendung der EKZ am Menschen durch [Kirklin et al, 1956; Gibbon, 1954].

Im Rahmen der EKZ wird ein Teil des Blutkreislaufs aus dem körpereigenen Gefäßsystem ausgelagert: Über einen im Gefäß platzierten Katheter fließt das Blut aus dem körpereigenen Gefäßsystem und gelangt über ein in sich geschlossenes Schlauchsystem durch einen zweiten Katheter an anderer Stelle wieder in den Körper. Kommt es dabei zu einer Umgehung von Herz und Lunge, so spricht man von einem kardiopulmonalen Bypass (cardiopulmonary bypass, CPB). Der CPB ermöglicht das Stilllegen zentraler Herz- oder auch Gefäßabschnitte für herzchirurgische Eingriffe. Die hierbei in den Kreislauf eingeschaltete HLM übernimmt die Pumpfunktion des Herzens und den Gasaustausch der Lungen: Mittels Oxygenator können Gase, z.B. Sauerstoff oder Kohlenstoffdioxid, dem Blut sowohl zu- als auch abgeführt werden. Über eine Rollerpumpe werden ein konstanter Blutfluss und folglich eine kontinuierliche Perfusion der Organe aufrechterhalten. Die Möglichkeit, somit ein bewegungs- und auch blutarmes Operationsfeld am Herzen zu schaffen, revolutionierte die Herzchirurgie [Mack, 2003]. Anwendung findet die EKZ heutzutage vor allem im Bereich des aortokoronaren Bypasses sowie bei dem Ersatz von Herzklappen. Neue technische Möglichkeiten und jahrelange Weiterentwicklung der EKZ führten dazu, dass es durch die Anwendung der EKZ zu einer kontinuierlichen Verringerung der Mortalitäts- und einer signifikanten Reduktion der Morbiditätsrate bei herzchirurgischen Eingriffen kam [Taylor *et al.*, 1998].

1.1.2 EKZ mit tief hypothermem Kreislaufstillstand

Die Anwendung von therapeutischer Hypothermie lässt sich bis in die Antike zurückverfolgen. Hippokrates beispielsweise empfahl, verwundete Patienten mit Eis zu kühlen, um so Blutungen zu reduzieren. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts machte Napoleons Leibarzt die Entdeckung, dass verwundete, unterkühlte Soldaten, die näher an ein Feuer gelegt wurden, schneller starben als diejenigen unter ihnen, die unterkühlt blieben [Polderman, 2004].

1953 wurde der erste erfolgreiche Einsatz eines tief-hypothermen Kreislaufstillstands (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) beschrieben [Lewis *et al.*, 1953; Lewis *et al.*, 1954]. Die Wärmeaustauscher der HLM ermöglichten es, die Temperatur des extrakorporal zirkulierenden Blutes zu senken und somit die Ischämietoleranz u.a. des Herzens zu erhöhen. Bigelow *et al.* zeigten 1959, dass Hypothermie während kardiochirurgischer Eingriffe auch eine Schutzfunktion für das Gehirn darstellt [Bigelow *et al.*, 1959]. In den darauffolgenden Jahren kam der DHCA vermehrt bei

herzchirurgischen Eingriffen zum Einsatz, wie beispielsweise bei der Therapie der Fallot – Tetralogie [Drew *et al.*, 1959] und beim Aortenersatz [Griep *et al.*, 1979]. Vorteile des DHCA sind zum einen, dass durch den Kreislaufstillstand ein blutleeres und bewegungsarmes Operationsfeld geschaffen werden kann. Zum anderen führt die tiefe Hypothermie zu einem signifikant niedrigeren Sauerstoffbedarf und ermöglicht somit, die Blutversorgung des Gehirns für einen längeren Zeitraum zu unterbrechen [Gega *et al.*, 2007].

Zu den Nachteilen des DHCA gehören unter anderem die Entwicklung von Koagulopathien sowie die Entstehung einer globalen Ischämie [Haverich *et al.*, 2003]. Auch die auf den DHCA folgende Reperfusion des ischämischen Gewebes kann die Entwicklung von Nekrose in bereits irreversibel geschädigten Kardiomyozyten beschleunigen [Jennings *et al.*, 1960]. Pathophysiologische Ursache dieses Phänomens ist der sogenannte Ischämie- und Reperfusionsschaden.

1.1.3 Ischämie- und Reperfusionsschaden und oxidativer Stress

Anfangs herrschte die Meinung, dass die Wiederherstellung des Blutflusses zu einem ischämischen Organ oder Gewebe essentiell ist, um irreversible Gewebeschäden zu verhindern und nur eine schnelle Reperfusion des ischämischen Gewebes permanente Schäden verhindern kann. In den 1990er Jahren zeigten Menger *et al.* jedoch, dass ein signifikanter Anteil an dieser Schädigung der Reperfusion von ischämischem Gewebe zugeschrieben werden kann [Menger *et al.*, 1992]. Im Jahr 2000 bezeichneten Carden und Granger die morphologischen und funktionellen Veränderungen, die durch die Reperfusion ischämischen Gewebes entstehen als „Ischämie- und Reperfusionsschaden“ (I/R- Schaden) [Carden *et al.*, 2000].

Ischämie bezeichnet die Verminderung der Blutversorgung eines Organs oder Gewebes aufgrund von fehlender arterieller Durchblutung [Gruyter Wd., 2002]. Ursächlich ist vor allem die hierbei auftretende Hypoxie, d. h. die mangelnde Sauerstoffversorgung des Gewebes. Die dadurch entstehende Zellschädigung ist zunächst reversibel. Bei länger anhaltender Ischämie kommt es jedoch zu irreversiblen Schäden und schließlich zum Zelltod [de Groot, 2005]. Grundlegender Pathomechanismus in der Ischämiephase ist die Hypoxie und die mit ihr assoziierten Folgen: zum einen kommt es zu einer Hypoxie-induzierten intrazellulären Azidose. Dies kann durch Störung der viskoelastischen Eigenschaften von Leukozyten insbesondere der Granulozyten und einer somit verstärkten Leukozytenaggregation zur Obstruktion von Kapillaren führen [Schmid-Schonbein, 1987]. Zum anderen führt die Hypoxie zu einer verminderten Synthese von energiereichen Metaboliten wie beispielsweise des Adenosintriphosphats (ATP) oder des Kreatinphosphats [Kerrigan *et al.*, 1993]. In Folge dessen kommt es zu einer Aktivitätsabnahme der membranständigen ATP-abhängigen $\text{Na}^{2+}/\text{K}^{+}$ -Kanäle wodurch der Eintritt von Calcium, Natrium und Wasser in die Zelle begünstigt wird und die Zelle daraufhin anschwillt [Eltzschig *et al.*, 2004]. Der durch die Kapillarobstruktion und die daraus resultierende eingeschränkte Perfusion des Gewebes sowie durch die Zellschwellung bedingte Gewebeschaden ist als sog. *no reflow* Phänomen bekannt [Kloner *et al.*, 1974]. Dieses Phänomen besagt, dass der Blutfluss in einem zuvor ischämischen Gewebe oftmals nicht vollständig wiederhergestellt werden kann. Die in der Ischämiephase entstandene Hypoxie und die damit assoziierten Folgen können auch nach wiedereinsetzender Reperfusion weiterhin bestehen und sich möglicherweise im Verlauf verschlechtern [Menger *et al.*, 1991; Menger *et al.*, 1992A; Menger *et al.*, 1992B].

In der Reperfusionphase kommt es durch die Wiederherstellung des Blutflusses und der daraus resultierenden Reoxygenierung des ischämischen Gewebes zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Mittels Elektronen-Resonanz-Spektrometrie konnten Zweier et al zeigen, dass während der Reperfusionphase große Mengen an ROS freigesetzt wurden [Zweier *et al.*, 1988]. Zu den ROS gehören unter anderem das Superoxidanion (O_2^-), Hydroxylradikale (OH^\cdot), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Peroxynitrit (ONOOH).

Auch unter aeroben Stoffwechselbedingungen kommt es zur Bildung von ROS, z.B. durch zelluläre Enzyme wie NAD(P)H-Oxidasen und Xanthinoxidase sowie bei unvollständiger Reduktion des molekularen Sauerstoffs in der mitochondrialen Atmungskette. Unter physiologischen Bedingungen sind Zellen jedoch in der Lage die ROS durch antioxidativ wirkende, enzymatische und nicht enzymatische Radikalfänger zu reduzieren und somit ein Gleichgewicht zwischen der Bildung und Beseitigung von ROS zu halten [Sies, 1997]. Zu diesen zellulären „Antioxidantien“ gehören unter anderem die Glutathionperoxidasen (GPx) und Glutathion (GSH), die Thioredoxinreduktasen (TrxR), Peroxiredoxine (Prx) und Thioredoxin (Trx), die Katalase (CAT) sowie die Superoxiddismutasen (SOD). Wird das Gleichgewicht von pro- und anti-oxidativ wirkenden Substanzen zu Gunsten der ROS verschoben, so spricht man von „oxidativem Stress“ [Sies *et al.*, 1985]. Oxidativer Stress kann in einer Beschädigung von zellulären Makromolekülen resultieren, die sich z.B. in Oxidation und Denaturierung von Proteinen, Mutationen der DNA durch Oxidation von Basen und Induktion von Strangbrüchen sowie Peroxidation von Membranlipiden äußert [Sies, 1993]. Durch verschiedene Mechanismen können ROS Gewebeschäden verursachen: so können sie durch Lipidperoxidation die Zellmembran schädigen [Li et al, 2002], zu einer vermehrten Leukozytenaktivierung führen sowie Proteine denaturieren [Jaeschke *et al.*, 1990], was letztlich zu Nekrose und Zelltod führen kann [Lazzarino *et al.*, 1994]. Außerdem sind ROS in der Lage, die Expression von Adhäsionsmolekülen in Leukozyten zu erhöhen und zudem durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel NFκB eine vermehrte Expression und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen zu bewirken [Toyokuni *et al.*, 1999]. Die Bildung von ROS wird hierbei verschiedenen Mechanismen zugeschrieben: während der Reperfusionphase kommt es zur erneuten Bereitstellung von molekularem Sauerstoff im Gewebe, der zusammen mit Hypoxanthin über die Xanthinoxidase zu Superoxidanion (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reagiert. Diese werden in Gegenwart von freien Eisen(II)-Ionen über die Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen umgesetzt. Hydroxylradikale sind hochreaktive, zytotoxische Radikale, die Lipidperoxidation verursachen und Substanzen freisetzen, welche eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von Granulozyten spielen [Granger, 1988]. Einen wichtigen Beitrag zur Bildung von ROS im Rahmen des I/R wird aktivierten Leukozyten zugeschrieben [Granger, 1988]. Kurz nach Beginn der Reperfusion kommt es in dem ischämisch geschädigten Gewebe zu einer Aktivierung von polymorphen Neutrophilen [Dreyer *et al.*, 1991]. Über die NADPH-Oxidase reduzieren sie molekularen Sauerstoff zu Superoxidanionen und setzen somit ROS frei. Außerdem sezernieren sie Proteasen und pro-inflammatorische Mediatoren, welche ebenfalls eine Infiltration von Neutrophilen in das geschädigte Gewebe verursachen und somit zu einer Verstärkung des I/R-Schadens führen [Hansen, 1995]. Durch Freisetzung von chemotaktischen Wirkstoffen wie Thrombozyten-aktivierendem Faktor (PAF) und Leukotrienen führen ROS außerdem zu einer erhöhten Leukozytenaktivierung und auf Endothelzellen zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, was wiederum zu einer Anhäufung von Leukozyten in Kapillaren und somit zu deren Obstruktion führt. Dadurch wird die Perfusion in den Kapillaren weiter verschlechtert und das Gewebe weiter geschädigt [Granger, 1988].

Dabei resultieren hohe ROS-Level u.a. über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor kappa B* (NFκB) in Inflammation, Apoptose und Nekrose. Niedrige bis moderate ROS-Level können dagegen vor allem über Aktivierung von Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) zu einer vermehrten Genexpression von antioxidativen und Phase 2 Enzymen führen und damit letztlich die antioxidative Abwehr verbessern [Rodrigo *et al.*, 2013]; dies wird auch als „Hormese“ bezeichnet und steht in den letzten Jahren vermehrt im Fokus wissenschaftlichen Interesses.

Ursächlich für die Entstehung des I/R Schadens sind neben der Bildung von ROS außerdem die Aktivierung des Komplementsystems, die Inhibierung von Na⁺/Ca²⁺-Austauschern sowie inflammatorische Prozesse [Moens *et al.*, 2005]. Die Aktivierung des Komplementsystems führt über die Anaphylatoxine C3a, C4a und C5a zur Bildung des sog. *membrane attack complexes*, welcher in die Zellmembran eingelagert wird. Dieser erhöht die Zellpermeabilität und führt somit zur Zellschädigung. Zusätzlich bewirken Komplementfaktoren, allen voran C5a, eine Leukozytenaktivierung, die Produktion von Superoxidradikalen [Moens *et al.*, 2005] und die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie beispielsweise der Interleukine 2 (IL-2) und 6 (IL-6) und des Tumornekrosefaktors α (TNF α) [Eltzschig *et al.*, 2004]. Die während der Hypoxie verminderte Synthese energiereicher Phosphate bedingt eine Abnahme der Aktivität der membranständigen ATP-abhängigen Na⁺/K⁺-Kanäle. Dadurch kommt es zum Anstieg der intrazellulären Na⁺-Konzentration. Dies führt zu einer vermehrten Aktivierung des Na⁺/Ca²⁺-Austauschers, wodurch die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ansteigt. Durch den intrazellulären Ca²⁺-Überschuss kommt es zu einer Hyperkontraktur der Herzmuskelzellen, die irreversibel ist [Siegmund *et al.*, 1991] und letztendlich zum Zelltod führt [Moens *et al.*, 2005]. Dieses Phänomen wird als *reflow paradox* beschrieben: Anders als bei dem bereits beschriebenen *no reflow* Phänomen kommt es hierbei durch die Reperfusion zu einer Reoxygenierung des Gewebes. Dies führt jedoch wie oben bereits beschrieben zur Bildung von ROS, zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, zur Oxidation von Membranlipiden, zu einer Leukozytenakkumulation und verstärkter Leukozytenadhärenz, zu inflammatorischen, durch Neutrophile vermittelte Prozesse und dadurch zu postischämischen Gewebeschäden [Prasad *et al.*, 2009]. Diese Mechanismen bewirken letztendlich eine Schädigung des ischämischen Gewebes und können schlimmstenfalls zu Multiorganversagen und zum Tod des Patienten führen [Eltzschig *et al.*, 2004]. Somit ist die Wirkung des Sauerstoffs während der Reperfusionphase zweischneidig: einerseits benötigt die ischämische Zelle den Sauerstoff, andererseits kommt es durch den wieder zur Verfügung stehenden Sauerstoff während der Reperfusionphase zur Bildung von ROS und damit eventuell zu weiterer Zellschädigung [Kleikers *et al.*, 2012]. Ein schematischer Überblick über die Pathophysiologie des Reperfusionsschadens ist in Abbildung 1 dargestellt.

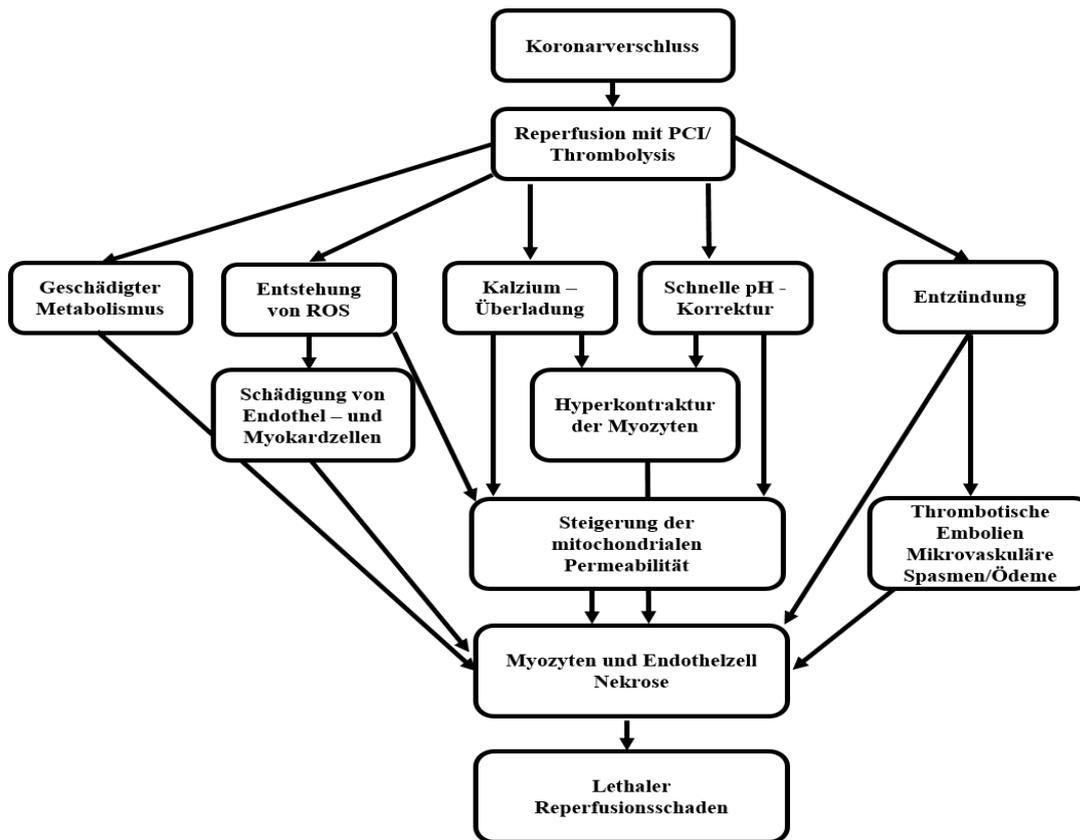


Abb. 1 Schematischer Überblick über die Pathophysiologie des Reperfusionsschadens [modifiziert nach Prasad *et al.*, 2009].

1.1.4 Systemische Inflammation und therapeutische Möglichkeiten

SYSTEMISCHE REAKTION AUF DIE EXTRAKORPORALE ZIRKULATION

Wenngleich sich die technischen Möglichkeiten konsequent verbessert haben und die Mortalitätsrate stetig gesunken ist, löst die Anwendung der EKZ weiterhin schwerwiegende Komplikationen, wie beispielsweise Massenblutungen und systemische Immunreaktionen aus und kann bis zum Multiorganversagen führen [Boeken *et al.*, 2008; Svyatets *et al.*, 2010]. Durch die Verwendung der EKZ kann ein systemisches Entzündungssyndrom hervorgerufen werden [Hess *et al.*, 2005]. Dieses sogenannte Post-Perfusions-Syndrom (PPS), welches bei fast 25 % aller Patienten auftritt, kann in 2-10% der Fälle in ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) übergehen [Boeken & Feindt, 2008]. Während die Sepsis die systemische Antwort auf eine lokale Entzündungsreaktion darstellt, handelt es sich bei SIRS um einen Symptomkomplex, der infolge inflammatorischer Prozesse auftritt, ohne dass eine Infektion nachweisbar ist [Boeken & Feindt, 2008]. Definitionsgemäß liegt ein SIRS vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien zutreffen [Levy *et al.*, 2003]:

1. Körpertemperatur: $<36^{\circ}\text{C}$ oder $>38^{\circ}\text{C}$
2. Herzfrequenz: $>90/\text{min}$
3. Atemfrequenz: $>20/\text{min}$ und einem $\text{PaCO}_2 <32\text{ mmHg}$
4. Leukozytenzahlen $>12.000/\mu\text{l}$ oder $<4000/\mu\text{l}$ oder $>10\%$ stabkernige Granulozyten im Differenzialblutbild

Im Auftrag der *European Society of Intensive Care Medicine* und der *Society of Critical Care Medicine* wurden 2016 jedoch neue Sepsis-Kriterien definiert. Demnach ist Sepsis definiert als „lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine fehlregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion verursacht wird“ [Singer *et al.*, 2016]. Als Screeningmethode für eine Sepsis wurde der *Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score* entwickelt. Dieser beurteilt mithilfe spezifischer Parameter den Grad der durch die Sepsis entstehenden Organdysfunktion sowie das damit verbundene Mortalitätsrisiko. Zu den Kriterien des SOFA Scores gehören die *Glasgow Coma Scale (GCS)*, der Horowitz-Quotient ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) und der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO_2), der Katecholaminbedarf, die Thrombozytenzahl, Serumbilirubinlevel, Serumkreatininlevel und das Urinvolumen. Der vom SOFA Score abgeleitete *quick SOFA Score (qSOFA)* kann ohne zusätzliche Labortests durchgeführt werden und dient somit als einfaches *Screeningtool* im bspw. prähospitalen Setting. Definitionsgemäß liegt eine Sepsis vor, wenn mindestens zwei von drei Kriterien des qSOFA zutreffen:

1. Atemfrequenz $\geq 22/\text{min}$
2. Verändertes Bewusstsein ($\text{GCS} < 15$)
3. Systolischer Blutdruck $\leq 100\text{mmHg}$

Ein qSOFA Score von 2 Punkten geht mit einer dreifach höheren Sterblichkeit einher, ein qSOFA Score mit 3 Punkten sogar mit einer 14fach höheren Sterblichkeit.

Die o.g. SIRS-Kriterien können laut Singer *et al.* einerseits auch bei einfachen, unkomplizierten Infektionen oder durch nicht-infektiöse Auslöser (Trauma, Pankreatitis, etc.) erfüllt sein. Andererseits können sie bei kritisch kranken Patienten mit einer lebensbedrohlichen Infektion und neu aufgetretenem Organversagen teilweise oder vollständig fehlen. Einer Studie von Kaukonen *et al.* zufolge, erfüllt einer von acht Patienten mit einer Infektion und neu aufgetretenem Organversagen das erforderliche Minimum von zwei SIRS-Kriterien nicht [Kaukonen *et al.*, 2015]. Die SIRS-Kriterien seien daher zu unspezifisch und nur noch von geringem klinischen Nutzen [Singer *et al.*, 2016].

Ursächlich für die überschießende Immunreaktion im Rahmen der EKZ sind Faktoren wie der Kontakt von fremden, nicht physiologischen Oberflächen des EKZ-Kreislaufs (z.B. der Rollerpumpe) mit dem Blut des Patienten, das chirurgisch verursachte Gewebstrauma, die Änderung der Körpertemperatur sowie die Ischämie und anschließende Reperfusion der Organe. Dies verstärkt die postoperativen Entzündungsreaktionen und kann komplexe Immunreaktionen hervorrufen [Wan *et al.*, 1997; Boeken & Feindt, 2008]. Zu diesen Immunreaktionen zählen u.a. die Aktivierung des Komplementsystems und der Leukozyten sowie die Freisetzung diverser Substanzen wie bspw. ROS, Plättchen aktivierendem Faktor (PAF), Arachidonsäure, Endothelin und Stickstoffmonoxid (NO) [Wan *et al.*, 1997]. Die hierdurch entstehende Immunantwort kann zur Entwicklung von postoperativen Organdysfunktionen wie z. B. respiratorischer Insuffizienz, Nierenfunktionsstörungen, Blutungsstörungen und neurologischen Funktionsstörungen beitragen und letztendlich zum Multiorganversagen führen [Wan *et al.*, 1997; Boeken & Feindt, 2008].

Ein schematischer Überblick der systemischen Reaktion auf die extrakorporale Zirkulation ist in Abbildung 2 dargestellt.

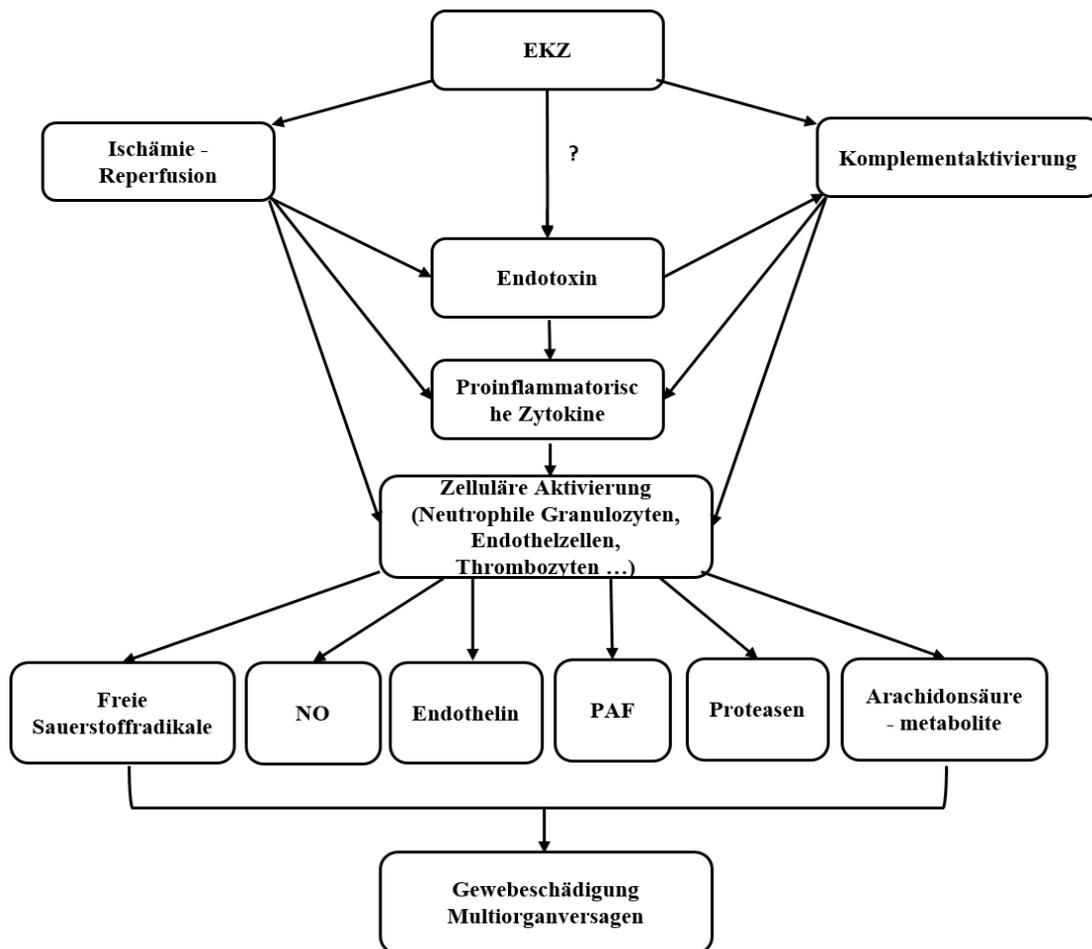


Abb. 2 Schematischer Überblick der systemischen Reaktion auf die extrakorporale Zirkulation (modifiziert nach Wan *et al.*, 1997). NO = Stickstoffmonoxid, PAF = Plättchen aktivierender Faktor.

THERAPEUTISCHE ANSÄTZE

SIRS stellt ein multifaktorielles, komplexes Ereignis dar, das auf dem Zusammenspiel vielfältiger inflammatorischer Systeme und Kaskaden beruht. Um die systemische Inflammation therapeutisch gezielt beeinflussen zu können, müssen Therapieansätze zur Suppression dieser Reaktion die Komplexität dieser Systeme und Kaskaden berücksichtigen [Boeken & Feindt, 2008]. Zu den derzeit angewandten Therapieansätzen zählen unter anderem die Heparinbeschichtung der EKZ-Materialien, intraoperative Hämofiltration [Groeneveld *et al.*, 1990], die Verwendung von Leukozytenfiltern sowie die Gabe von Antioxidantien [Suter *et al.*, 1994], Glukokortikoiden [Lee *et al.*, 1988], Proteaseinhibitoren wie Aprotinin [Kubes *et al.*, 1993] oder auch Zytokinadsorbern wie CytoSorb® [Houschyar *et al.*, 2017]. CytoSorb® wirkt über die Adsorption proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-10 und TNF- α der Entzündungsreaktion entgegen und kann somit die Überlebensrate von kritisch kranken Patienten positiv beeinflussen [Houschyar *et al.*, 2017].

Abbildung 3 zeigt eine Übersicht über die zurzeit angewandten Therapieansätze zur Beeinflussung der systemischen Inflammation:

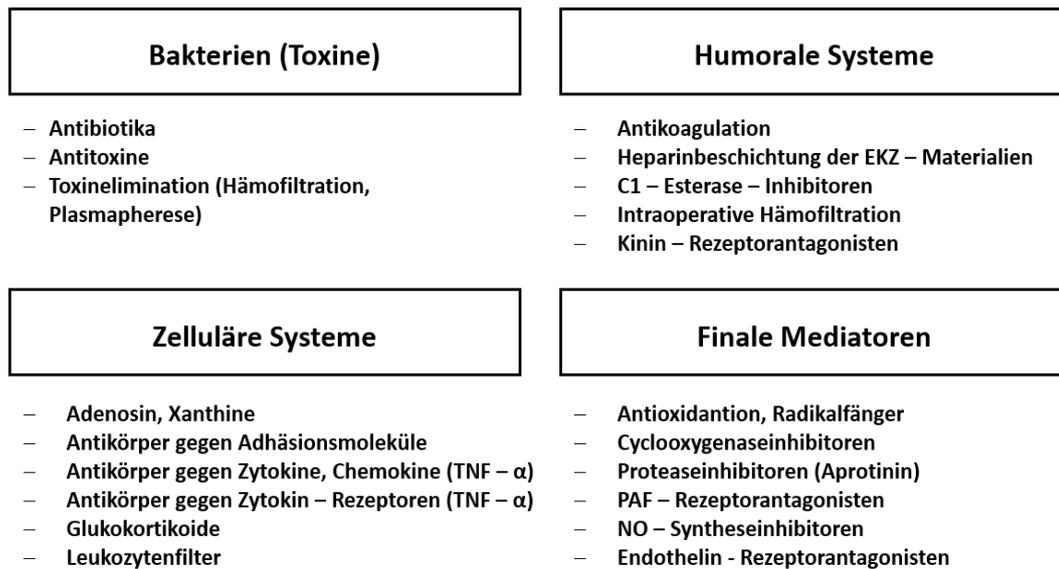


Abb. 3 Therapieansätze zur Beeinflussung der systemischen Inflammation [modifiziert nach Boeken *et al.*, 2008]

1.1.5 Wichtige Signalwege während Ischämie und Reperfusion

Im Rahmen eines Ischämie- und Reperfusionsschadens kommt es zur Aktivierung von Entzündungszellen sowie zur Expression und Sekretion von zytotoxischen Zytokinen [Lopez-Neblina & Toledo-Pereyra, 2006]. Die Aktivierung und Expression dieser Entzündungsmediatoren bringt mehrere miteinander verbundene Signalkaskaden in Gang, die durch reversible Phosphorylierungsreaktionen reguliert werden. Diese hochkomplexen Signalkaskaden führen zur Genexpression von inflammatorischen sowie anti-inflammatorischen Mediatoren und (bei positiver Auflösung) zur Reparatur und Regeneration geschädigter Zellen. Auch die für I/R charakteristische übermäßige Produktion von ROS initiiert Signalkaskaden, die durch diverse Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen reguliert werden und zur Expression inflammatorischer Gene führen [Lopez-Neblina & Toledo-Pereyra, 2006]. Zu diesen Signalwegen gehören unter anderem der PI3K-Signalweg, der Akt-Signalweg, der JAK/STAT-Signalweg, der MAP-Kinasen Signalweg und die Expression von Hitzeschock-Proteinen (HSP) [Lopez-Neblina & Toledo-Pereyra, 2006].

Bei der Phosphorylierung handelt es sich um eine reversible posttranslationale Modifikation von Proteinen wie z.B. Enzymen, Transkriptionsfaktoren und Membrankanälen, wodurch deren Aktivität reguliert wird. Phosphorylierungsreaktionen werden durch Proteinkinasen katalysiert, die in zwei Klassen unterteilt werden: zum einen in Serin- und Threoninkinasen, zum anderen in Thyrosinkinasen [Lopez-Neblina & Toledo-Pereyra, 2006]. Zur Phosphorylierung von Proteinen wird ATP benötigt, welches eine Phosphorylgruppe bereitstellt, die dann auf die freie Hydroxyl- Gruppe von spezifischen Serin-, Threonin- oder Tyrosinresten übertragen wird. Die Phosphorylierung von Proteinen kann durch die hydrolytische Entfernung der Phosphorylgruppe wieder rückgängig gemacht werden. Diese Dephosphorylierungsreaktionen werden von Proteinphosphatasen katalysiert [Lopez-Neblina & Toledo-Pereyra, 2006].

MITOGEN-AKTIVIERTE PROTEINKINASEN (MAPK)

Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) gehören zu den Serin- / Threonin- Proteinkinasen und werden durch viele verschiedene Stimuli wie beispielsweise Ischämie, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und Stress aktiviert [Toledo-Pereyra *et al.*, 2008]. Die MAP-Kinasen werden mittels eines hochkomplexen Kaskadensystems aktiviert, welches aus drei aufeinander folgenden Stufen besteht: den Anfang bildet eine MAPK-Kinase Kinase (MAPKKK), die die MAPK-Kinase (MAPKK) phosphoryliert und somit aktiviert, welche wiederum eine MAP-Kinase aktiviert [Toledo-Pereyra, 2008]. Im Rahmen von I /R spielen drei Gruppen der MAP Kinasen eine essentielle Rolle: die extrazellulär-Signal-regulierten Kinasen (ERK), die p38 MAPK sowie die c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) [Lopez-Neblina & Toledo-Pereyra, 2006]. Die MAPKKK werden durch Stimuli wie Ischämie, oxidativen Stress, Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert und führen ihrerseits zur Aktivierung ihrer spezifischen MAPK [Toledo-Pereyra *et al.*, 2008]. Abbildung 4 zeigt einen schematischen Überblick der drei MAP-Kinasen Signalwege, die im Rahmen von Ischämie und Reperfusion eine wichtige Rolle spielen:

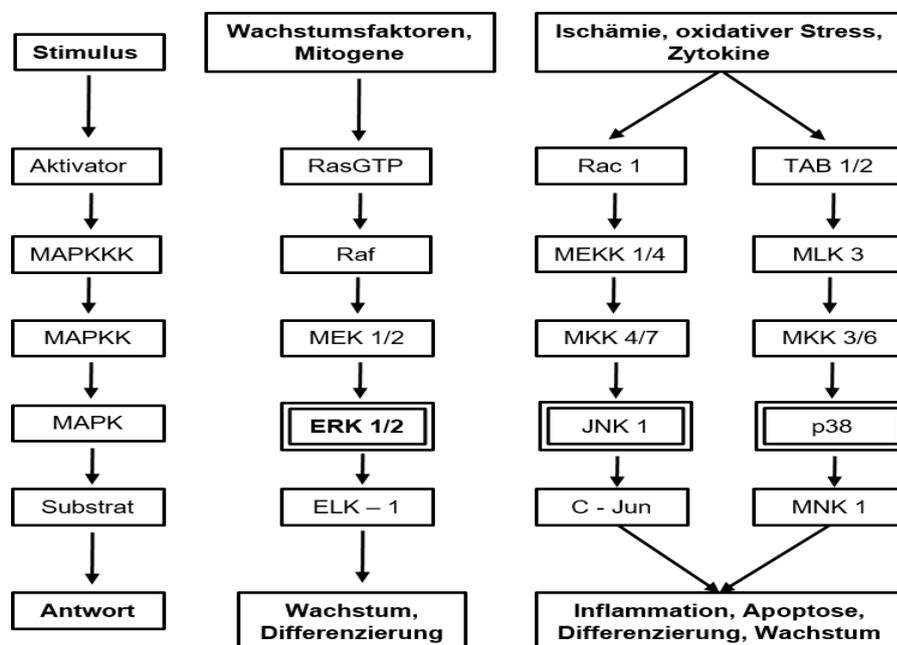


Abb. 4 Schematischer, vereinfachter Überblick über die MAPK-Signalwege. Raf= rapidly accelerated fibrosarcoma; MEK=MAP-ERK-Kinase; ELK= ets-like transcription factor; MKK=mitogen-activated protein kinase kinase; MLK=mixed lineage kinase; MNK=MAP Kinase interacting kinase [modifiziert nach Toledo – Pereyra *et al.*, 2008].

Die extrazelluläre-Signal-regulierte Kinase (ERK), auch bekannt als p42/p44 MAPK, wird durch zwei Gene (ERK 1 und ERK 2) kodiert. Zur Aktivierung der ERK1/2 wird eine duale Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierung an den beiden Stellen Thr203-Glu-Tyr205 (ERK1) und Thr185-Glu-Tyr187 (ERK2) benötigt [Raman *et al.*, 2007].

I/R aktiviert die Signalkaskade der ERK: Eine Inhibierung dieser Signalkaskade schützt die betroffenen Zellen somit vor ischämischen Schädigungen [Kindy *et al.*, 1993]. Dieser protektive Effekt konnte ebenfalls in Bezug auf ischämische Gehirnschäden festgestellt werden [Wang *et al.*, 2003].

Stresszustände im Organismus, z.B. oxidativer Stress, I/R und UV-Strahlung, führen zur Expression von sog. Stress-regulierten MAPK. Diese wiederum aktivieren Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK),

zu denen die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) sowie die p38 MAPK gehören. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Zellproliferation, im Rahmen der Immunantwort und bei der Induktion der Apoptose [Yin *et al.*, 1997]. C-Jun N-terminale Kinasen (JNK) sind MAPK, die N-terminale Aminosäurereste von c-Jun, einem Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1, phosphorylieren. Der JNK Signalweg wird durch I/R-Schaden, vasoaktive Substanzen, Entzündungsmediatoren wie Wachstumsfaktoren und proinflammatorische Zytokine, TNF- α und IL-1, sowie externe Stimulanzen wie Hitze, UV-Strahlung und oxidativen Stress aktiviert [Dougherty *et al.*, 2004; Dérijard *et al.*, 1994]. Eine enorme oxidative Belastung des Organismus, wie sie im Rahmen von I/R durch die initiale Hypoxie und anschließende Reoxygenierung auftreten kann, führt zur Aktivierung von JNK und zur übermäßigen Produktion von ROS [López-Neblina, 2006]. Eine Studie von Dougherty *et al.* zeigte, dass die durch Reoxygenierung entstandene JNK-Aktivierung durch die Behandlung mit Antioxidantien verhindert werden konnte [Dougherty *et al.*, 2004]. Die Aktivierung des p38-MAPK Signalwegs erfolgt, ähnlich dem JNK-Signalweg, durch oxidativen Stress und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α und IL-1 [Dougherty *et al.*, 2004]. Die p38 MAPK kommen in vier Isoformen vor (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ) und werden, analog zu den ERK MAPK, über eine duale Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierung an den beiden Stellen Thr180/Tyr182 aktiviert [Toledo-Pereyra *et al.*, 2008]. Die Aktivierung des p38-Signalwegs und damit verbundene Entzündungsprozesse sind von enormer Bedeutung für die Entstehung postischämischer Schäden in Herz, Leber und auch im Gehirn [Clerk *et al.*, 1998; Teoh *et al.*, 2002; Irving *et al.*, 2000]. Studien von Xia *et al.* zeigten, dass die JNK und p38-MAPK einen großen Einfluss auf die Induktion des apoptotischen Zelltods haben. Andererseits spielt die Hemmung der ERK ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Induktion von Apoptose. Somit ist das Gleichgewicht zwischen der Aktivität von JNK/SAPK und ERK von enormer Bedeutung für die Regulation der Apoptose [Xia *et al.*, 1995].

DER JAK / STAT-SIGNALWEG

Januskinasen (JAK) sind zytosolische Tyrosinkinasen, die in Säugetieren in vier Formen vorkommen: JAK1, JAK2, JAK 3 und TYK 2 [Horvath & Darnell, 1997]. Sie bestehen aus einer Kinasedomäne (JH1) und einer Pseudokinasedomäne (JH2) [Wilks *et al.*, 1991]. Während JH1 das katalytische Zentrum der Januskinasen bildet, inhibiert JH2 vermutlich die Kinaseaktivität [Chen *et al.*, 2000]. Durch die Aktivierung von JAKs kommt es zur Stimulierung von Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Apoptose [Rawlings *et al.*, 2004].

Anders als die meisten Rezeptoren von Wachstumsfaktoren besitzen Zytokin-Rezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität [Aaronson & Horvath, 2002]. Zur Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden benötigen sie daher die Hilfe von Kinasen. Diese Aufgabe übernehmen u.a. die Januskinasen, die mit den Zytokin-Rezeptoren interagieren können. Die JAKs binden dabei spezifisch an die intrazellulären Domänen der Zytokin-Rezeptoren. Die Bindung eines Zytokins an seinen Rezeptor induziert die Dimerisierung des Rezeptors, was in einer Phosphorylierung der beiden an den Rezeptor gebundenen JAKs resultiert. In diesem aktivierten Zustand phosphorylieren die JAKs einen Tyrosinrest des im Zytoplasma gelegenen Teils des Rezeptors, wodurch eine Bindungsstelle für die *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Proteine zugänglich wird [Aaronson & Horvath, 2002]. STAT-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die, ohne spezifische Rezeptor-Stimulation, in inaktivem Zustand im Zytoplasma vorliegen. In Säugetierzellen sind bisher 6 STAT-Proteine bekannt: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6. Mit Hilfe einer SH2-

Domäne können die STATs nun an die freigelegte Bindungsstelle andocken. Nach Bindung der STATs an den phosphorylierten Tyrosinrest des zytoplasmatischen Rezeptors kommt es zur Phosphorylierung der STAT-Proteine durch die JAKs [Rawlings *et al.*, 2004]. Die Phosphorylierung bewirkt, dass sich die STAT-Proteine vom Rezeptor lösen und sich zu Homo- bzw. Heterodimeren zusammenlagern. Diese translozieren aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo sie an DNA binden und als Transkriptionsfaktoren die Transkription ihrer Zielgene bewirken [Aaronson & Horvath, 2002]. Abbildung 5 zeigt eine schematische Übersicht über die Abläufe des JAK/STAT-Signalwegs:

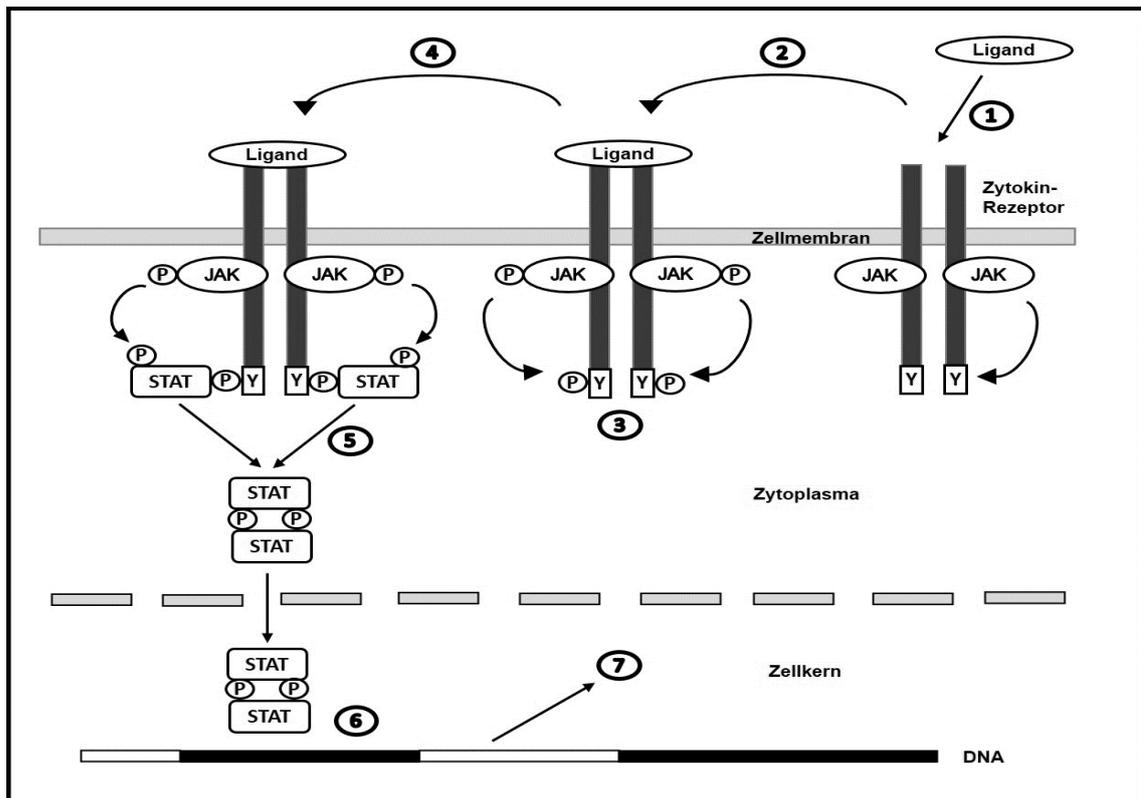


Abb. 5 Schematischer, vereinfachter Überblick über den JAK/STAT-Signalweg. 1 = Ligandenbindung, 2 = Rezeptordimerisierung, 3 = Tyrosinphosphorylierung, 4 = STAT-Bindung, 5 = STAT-Dimerisierung, 6 = DNA-Bindung, 7 = Transkription, JAK= Januskinase, Y=Tyrosinrest, STAT=signal transducer and activator of transcription [modifiziert nach Toledo-Pereyra *et al.*, 2008].

DER PI3K/AKT SIGNALWEG

Der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) Signalweg spielt eine wichtige Rolle im Hinblick auf das Überleben von Zellen. Er gilt als wichtiger Initiator der zellulären Schutzreaktion auf I/R-Schaden [Cai & Semenza, 2004]. AKT, auch Proteinkinase B (PKB) genannt, gehört, ebenso wie die MAPK, zu den Serin/Threonin Kinasen und stellt die zentrale Schaltstelle des PI3K-Signalwegs dar. Es gibt drei Isoformen der Akt: AKT1/PKB α , AKT2/PKB β , AKT3/PKB γ [López-Neblina, 2006]. Der AKT-Signalweg spielt eine wichtige Rolle für das Überleben der Zelle und die Regulierung von Apoptose, Zellproliferation und Zellstoffwechsel. Dies erfolgt u.a. durch Inhibierung von Caspasen, z.B. Caspase 9, und pro-apoptischen Proteinen aus der Familie der Bcl-2 Proteine. So wird bspw. das pro-apoptische Bcl2-Protein BAD durch AKT phosphoryliert und somit inhibiert [Datta *et al.*, 1997]. Studien haben gezeigt, dass I/R den anti-apoptischen PI3K-Signalweg aktiviert, wodurch ein protektiver Effekt auf den postischämischen Zelltod ausgeübt werden kann [Hausenloy *et al.*, 2004].

Müller *et al.* zeigten an Rattenlebern, dass eine Präkonditionierung mit Liponsäure und die daraus resultierende vermehrte Akt-Phosphorylierung einem hepatischen I/R-Schaden entgegenwirken konnte und postulierten, dass der PI3K/AKT-Signalweg somit eine zentrale Rolle im Hinblick auf den I/R-Schaden spielt [Müller *et al.*, 2003]. Eine Regulation dieses Signalwegs könnte daher eine neue Therapieoption darstellen, um die Schädigung der Organe durch I/R zu verhindern [López-Neblina, 2006].

HITZESCHOCKPROTEINE

Hitzeschockproteine (Heat Shock Proteins, HSPs) sind Stressproteine, die eine wichtige Rolle bei der Faltung von Proteinen und der Aufrechterhaltung des Proteingleichgewichts spielen. Eingeteilt werden die HSPs anhand ihres Molekulargewichts in niedrig- und hochmolekulare HSPs. Niedrig-molekulare HSPs sind HSPs mit einem Molekulargewicht <34 kDa. HSP-40, HSP-60, HSP-70, HSP-90, HSP-100 und HSP-110 zählen dagegen zu den hochmolekularen HSPs [Calderwood *et al.*, 2007]. HSPs können intra- und extrazellulär vorliegen; zu den HSP-sezernierenden Zellen zählen u.a. Neuronen und Zellen des Immunsystems wie z.B. Monozyten, Makrophagen und B-Zellen [Clayton *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2006]. Unter physiologischen Bedingungen unterstützen HSPs den Proteintransport zwischen Zellorganellen, die Auflösung fehlgefalteter Proteinkomplexe und, in ihrer Funktion als Chaperone, die Faltung neu-synthetisierter Proteine. In Situationen zellulären Stresses durch z.B. Temperaturanstieg, Hypoxie, oxidativen Stress, pH-Wert-Änderungen, Schwermetallbelastung und UV-Strahlung, kommt es zu einer vermehrten Synthese von HSPs [Murphy *et al.*, 2013]. Die HSPs sichern das Überleben der Zellen, indem sie zelluläre Proteine vor Denaturierung schützen oder den Abbau funktionsloser Proteine initiieren. Außerdem entfalten die HSPs eine anti-apoptotische Wirkung. Dies geschieht auf mehreren Wegen. Zum einen inhibieren HSPs die Aktivität pro-apoptotischer Proteine wie z.B. Bax, Bak, Bok und Bad aus der Familie der Bcl-2-Proteine, zum anderen verhindern sie die Bildung von Apoptosomen, wodurch eine Aktivierung von Caspasen und somit die Induktion der Apoptose verhindert werden kann [Beere *et al.*, 2004]. Des Weiteren modulieren HSPs auch andere Signalwege, die in die Regulation von Apoptose involviert sind. Hierzu zählen der JNK-, NFκB sowie der AKT-Signalweg [Beere *et al.*, 2004]. Bei den Mitgliedern der Familie der Hitzeschockproteine 70 (HSP 70) handelt es sich um molekulare Chaperone, die als Antwort auf Stresszustände exprimiert werden. Bisher sind acht homologe HSP 70 Chaperone bekannt, die ein Molekulargewicht von 66 bis 78 kDa aufweisen [Heck *et al.*, 2011]. Das Endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien besitzen spezifische HSP 70 Proteine (HSP 70-5 und HSP 70-9), wohingegen die restlichen sechs HSP 70 Proteine im Zytosol und im Nukleus lokalisiert sind [Daugaard *et al.*, 2007]. Die HSP 70 Proteine bestehen aus drei Domänen: einer ca. 44 kDa großen N-terminalen Nukleotid-bindenden ATPase Domäne (NBD), einer ca. 15 kDa Substrat-bindenden Domäne (SBD) und einer 10 kDa großen C-terminalen Co-Chaperon-bindenden Domäne [Evans *et al.*, 2010; Heck *et al.*, 2011]. Man unterscheidet eine konstitutive von einer induzierten Form der HSP 70. Die konstitutive Form liegt unter physiologischen Bedingungen vor, während die induzierte Form der HSP 70 in Stresssituationen vermehrt synthetisiert wird [Heck *et al.*, 2011]. HSP 70 spielt eine wichtige Rolle bei der Faltung von Proteinen. Unter physiologischen Bedingungen existieren in Zellen Kontrollsysteme, die die Qualität der Faltung von Proteinen überwachen und eine Aggregation fehlgefalteter Proteine verhindern [Liberek *et al.*, 2008]. Durch Mutationen, Alterungsprozesse und oxidativen Stress kann es jedoch zu einer Fehlfaltung und Denaturierung von Proteinen kommen [Soskic *et al.*, 2008]. Im Gegensatz zu anderen HSPs ist HSP 70 in der Lage, diese durch Stress denaturierten

Proteine in einer ATP- und Co-Chaperon- abhängigen Reaktion neu zu falten [Hartl *et al.*, 2002]. HSP 70 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im Hinblick auf I/R. Intrazellulär entfaltet HSP 70 seine protektive Wirkung über eine Hemmung des NF κ B-Signalwegs und besitzt somit anti-inflammatorische und zytoprotektive Eigenschaften [Heck *et al.*, 2011]. Über die direkte oder indirekte Inhibierung intrazellulärer Signalkaskaden wie JNK-sowie der AKT-Signalweg hat HSP 70 auch eine anti-apoptotische Wirkung. Im Gegensatz zu intrazellulärem HSP 70 wirkt das extrazelluläre HSP 70 über eine Stimulation der Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 und TNF- α) pro-inflammatorisch [Heck *et al.*, 2011]. Ein weiteres Hitzeschockprotein ist das auch als HSP 32 bekannte Enzym Hämoxigenase 1 (HO-1) [Keyse *et al.*, 1989; Morse *et al.*, 2002]. Hämoxigenasen katalysieren im Rahmen des Hämoglobinstoffwechsels die Freisetzung von Eisen (II)-Ionen aus Häm-Molekülen [Kikuchi *et al.*, 2005]. Die dabei entstehenden Metabolite, Kohlenstoffmonoxid (CO) und Biliverdin lösen Signalkaskaden aus, die anti-oxidative, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Schutzmechanismen der Zellen aktivieren und somit oxidativem Stress entgegenwirken können [Haines *et al.*, 2012]. Bisher sind drei Isoformen der Hämoxigenase bekannt: HO-1, HO-2 und HO-3. Die am besten untersuchte HO-1 wird vorwiegend in Zellen der Milz, der Leber und dem Knochenmark exprimiert, wohingegen HO-2 überwiegend in Zellen des Gehirns, Hodens und des Gefäßsystems vorkommt [Wang *et al.*, 2010]. Über die dritte existierende Isoform, HO-3, ist bisher nur sehr wenig bekannt [Haines *et al.*, 2012]. Die Transkription des HO-1 Gens wird durch MAPK initiiert, die durch externe Faktoren wie oxidativen Stress, Hypoxie oder UV-Strahlung aktiviert werden [Wang *et al.*, 2009]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass HO-1 anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist [Otterbein *et al.*, 2003]. Minamino *et al.* fanden heraus, dass eine Expression von HO-1 den durch Hypoxie bedingten Entzündungsreaktionen in der Lunge entgegenwirken konnte, indem eine vermehrte HO-1-Expression die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine unterdrückte [Minamino *et al.*, 2001]. In einem Mausmodell mit HO-1 defizienten Tieren, führte eine induzierte Hypoxie zur Entstehung rechtsventrikulärer Herzinfarkte und einer oxidativen Schädigung der Kardiomyozyten [Yet *et al.*, 1999].

Das während des durch die HO-1 katalysierten Hämoglobinabbaus entstehende CO unterdrückt die pro-inflammatorischen bei gleichzeitiger Stimulation der anti-inflammatorischen Effekte von Makrophagen. Makrophagen sind Zellen, die, wenn sie in Kontakt mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) kommen, pro-inflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF- α , [Beutler *et al.*, 1985] aber auch anti-inflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin-10 (IL-10) produzieren [Gerard *et al.*, 1993]. Kommen die Makrophagen nun in Kontakt mit CO bevor sie Berührung mit bakteriellen LPS haben, so führt dies zu einer Änderung des Gleichgewichts von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokine zu Gunsten der anti-inflammatorischen Zytokine [Minamino *et al.*, 2001]. Des Weiteren besitzt CO anti-apoptotische Effekte [Brouard *et al.*, 2002], inhibiert die Plättchenaggregation und vermittelt somit auch anti-thrombotische Effekte [Brune *et al.*, 1987].

Somit besitzt die HO-1 anti-apoptotische, anti-inflammatorische, anti-oxidative und anti-proliferative Eigenschaften [Otterbein *et al.*, 2003]. Biliverdin, ein weiterer Metabolit des Hämoglobinstoffwechsels, wird mithilfe der Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert. Clark *et al.* konnten zeigen, dass Bilirubin eine wichtige Rolle beim Schutz des Herzens vor I/R Schaden spielt [Clark *et al.*, 2000]. Somit vermitteln Bilirubin und Biliverdin als Antioxidantien anti-oxidative Wirkungen der HO-1 [Stocker *et al.*, 1987].

1.1.6 Apoptotischer Zelltod in Ischämie und Reperfusion

Unter dem Begriff Apoptose versteht man den programmierten Tod einer Zelle. Apoptose kommt sowohl unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen vor. Physiologischerweise spielt Apoptose eine zentrale Rolle bei der embryonalen Entwicklung, der Elimination entarteter Zellen und der kontinuierlichen Kontrolle der Zellzahl adulter Gewebe [Kroemer *et al.*, 1995]. Neben diesen physiologischen Kontrollmechanismen der Apoptose können jedoch auch diverse pathologische Prozesse wie oxidativer Stress, radioaktive Strahlung, Temperaturanstieg, UV-Strahlung und Hypoxie zu einer Schädigung und Entartung von Zellen führen und die Apoptose dieser geschädigten Zellen hervorrufen [Cohen, 1993; Kroemer *et al.*, 1995].

Bei der Apoptose wird ein intrinsischer von einem extrinsischen Weg unterschieden. Beide besitzen eine gemeinsame Endstrecke [Beere, 2004]. Die Aktivierung des intrinsischen Wegs erfolgt durch eine Permeabilisierung der Außenmembran der Mitochondrien [Beere *et al.*, 2004]. Stimulanzen wie bspw. I/R, oxidativer Stress und UV-Strahlung führen zu einer übermäßigen Produktion von ROS, welche wiederum zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien ins Zytosol führt [López-Neblina, 2005]. Der extrinsische Weg hingegen wird durch die Bindung externer Signalmoleküle an sog. Todesrezeptoren (*death receptors*) auf der Zellmembran aktiviert [Heck *et al.*, 2011]. Die rezeptorspezifischen Signalmoleküle binden an diese Todesrezeptoren und aktivieren sie. Dies führt zur Aktivierung der Procaspasen 8, 10 und 12 (Initiator-Caspasen), die wiederum die Procaspasen 3, 6 und 7 (Effektor-Caspasen) aktivieren [López-Neblina, 2005]. Die aktivierten Effektor-Caspasen leiten die gemeinsame Endstrecke der Apoptose ein, welche letztendlich zur Fragmentierung der DNA und zum Zelluntergang führt [Kroemer *et al.*, 1995]. Eine wichtige Rolle bei der Fragmentierung der DNA spielt außerdem die Poly (ADP-Ribose) -Polymerase (PARP). PARP besitzt die Fähigkeit, DNA zu reparieren. Wird PARP nun durch die aktivierte Caspase 3 gespalten, so nimmt ihre DNA-Reparaturfähigkeit ab, was die Apoptose der Zelle begünstigt [López-Neblina, 2005]. Dies ist ein wichtiger Angriffspunkt für HSP 70. Durch eine Inhibierung der Caspase-3-Aktivität verhindert HSP 70 die Proteolyse von PARP und erhält somit diesen DNA-Reparaturmechanismus aufrecht [Beere *et al.*, 2004]. In Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der ex- und intrinsischen Apoptosewege:

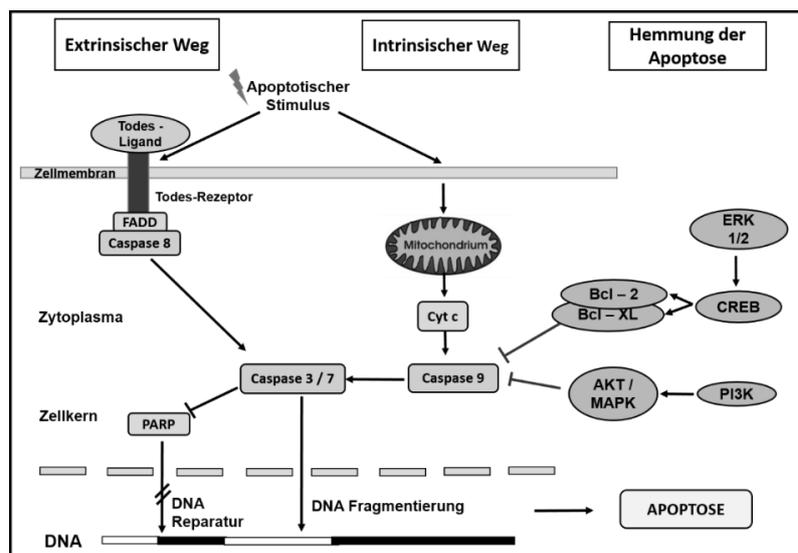


Abb. 6 Schematischer, vereinfachter Überblick des extrinsischen und intrinsischen Apoptosewegs sowie die hemmenden Mechanismen [modifiziert nach López-Neblina *et al.*, 2005].

1.2 Selen

1.2.1 Entdeckung des Selens und seine Eigenschaften

Im Jahr 1817 entdeckte der schwedische Chemiker Jöns Jakob Freiherr von Berzelius im Bleikammerschlamm einer Schwefelsäurefabrik erstmals das Element Selen (Se). Aufgrund seiner nahen chemischen Verwandtschaft mit dem von Franz Joseph Müller von Reichenstein entdeckten Element Tellur (griech. Erde) benannte er es nach der griechischen Mondgöttin Selene (griech. Mond) [Römp *et al.*, 1996].

Selen ist ein halbmimetisches Element, das in vielen seiner Eigenschaften eine Ähnlichkeit zu Schwefel aufweist und daher lange Zeit für eine Sonderform des Schwefels gehalten wurde.

Im Laufe der Jahre hat sich das Verständnis von der Wirkung des Selens sehr gewandelt: Im Jahr 1842 wurde die toxische Wirkung des Selens anhand von pathologischen Leberveränderungen bei, mit selenhaltigem Getreide gefütterten, Ratten entdeckt [Japha, 1842]. 1957 entdeckten Schwartz und Foltz jedoch die Bedeutung von Selen als essentielles Spurenelement [Schwarz & Foltz, 1957]. Durch die Entdeckung von Selen als Bestandteil der Selenoproteine Glutathionperoxidasen (GPx) im Jahr 1973 durch Rotruck *et al.* wurde das wissenschaftliche Interesse am Element Selen geweckt und der Grundstein für die biochemische Erforschung von Selen war gelegt [Rotruck *et al.*, 1973].

1.2.2 Selen in der Nahrungskette

Selen kommt in vier Oxidationsstufen vor: Selen (0), Selenid (-2), Selenit (+4) und Selenat (+6). Ähnlich wie Schwefel besitzt es somit die Fähigkeit, Elektronenpaare abzugeben bzw. aufzunehmen. Während die anorganischen Selenverbindungen Selenat und Selenit vorwiegend im Wasser vorkommen, finden sich die organischen Selenverbindungen in pflanzlichen und tierischen Eiweißen als Aminosäuren Selenocystein ($C_3H_7NO_2Se$) und Selenomethionin ($C_3H_{11}NO_2Se$) [Barceloux, 1999]. Auch die anorganischen Formen von Selen, Selenit und Selenat, können vom Menschen als Selenquelle verwendet werden [Kyriakopoulos *et al.*, 2002]. Nahrungsmittel wie Paranüsse, Haferflocken, Eier, Getreide, Milchprodukte, Meerestiere und Innereien weisen einen hohen Selengehalt auf, wohingegen Obst, Gemüse und Kartoffeln nur niedrige Selengehalte besitzen [Souci *et al.*, 2007]. Manche Gemüse wie z.B. Brokkoli und Knoblauch können aber Selen akkumulieren, wenn sie auf Böden mit hohem Selengehalt angebaut werden.

Die Aufnahme von Selen aus der Nahrung ist regional unterschiedlich. So spielen die Beschaffenheit der Böden sowie die Niederschlagsrate eine wichtige Rolle in Bezug auf den Selengehalt der Erde. Ebenso wie Iod ist Selen ein wasserlösliches Element, das in niederschlagsreichen Ländern aus dem Boden gespült wird. Häufig treten daher Selen- und Iodmangel gleichzeitig auf [Schrauzer, 1998]. Auch die Azidität der Böden spielt für den Selengehalt der dort wachsenden Pflanzen eine wichtige Rolle. Saurer Regen und ein hoher Gebrauch an Ammoniumsulfat- oder Kalziumsulfatdünger sind von entscheidender Bedeutung für die Übersäuerung der Böden, die in Verbindung mit einem hohen Eisengehalt des Erdreichs zu einer Verringerung der Bioverfügbarkeit von Selen für die dort wachsenden Pflanzen führt [Schrauzer, 1998]. Somit kann es auch in Gegenden mit selenreichen Böden zu einem niedrigen Selengehalt bei Pflanzen kommen. Gebiete mit niedrigem Selengehalt (0,09-0,17 $\mu\text{g/g}$) finden sich besonders in einigen Regionen Chinas, großen Teilen von Australien, im Osten der USA und Kanadas, Skandinavien sowie Ost- und Mitteleuropa [Brown *et al.*, 2001]. Zudem zeigt sich außerdem in den Ländern Mitteleuropas ein Nord-Süd-Gefälle: die Böden im Norden weisen einen

höheren Selengehalt auf als die im Süden [Hartfield and Schulte, 1988]. In Westchina, Israel, Venezuela sowie den südwestlichen Teilen der USA haben die Böden einen extrem hohen Selengehalt ($>1,7\mu\text{g/g}$), sodass die in diesen Gebieten wachsenden Pflanzen bei den dortigen Nutztieren sogar eine Selenvergiftung (Selenose) hervorrufen können [Brown *et al.*, 2001]. Auch bei der Nutztierhaltung sind die regionalen Unterschiede in der Selenzufuhr von enormer Bedeutung. Daher wird in Deutschland ein mit Natriumselenit (Na_2SeO_3) oder Natriumselenat (Na_2SeO_4) angereichertes Futter verwendet. Bereits ein Natriumselenitgehalt von $0,1\text{ mg / kg}$ Trockenfutter reicht aus, um den täglichen Selenbedarf der Tiere zu sichern [Löscher *et al.*, 2006].

Die von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfohlene Tagesdosis (Recommended Daily Intake (RDI)) für Selen beträgt $60\text{ }\mu\text{g}$ pro Tag ($\mu\text{g/d}$) für Frauen und $70\text{ }\mu\text{g/d}$ für Männer. Die European Food Safety Authority (EFSA) hat ihre Empfehlungen für eine adäquate Selenzufuhr von Erwachsenen im Jahre 2015 generell auf $70\text{ }\mu\text{g/d}$ angehoben. Für stillende Frauen wird ein leicht erhöhter Referenzwert von $75\text{ }\mu\text{g/d}$ angegeben, der um $2\text{ }\mu\text{g}$ höhere Bedarf bei Schwangeren ist vernachlässigbar [Kipp *et al.*, 2015]. Die tägliche Selenzufuhr bei Erwachsenen zeigt enorme regionale Unterschiede (s. Abbildung 7).

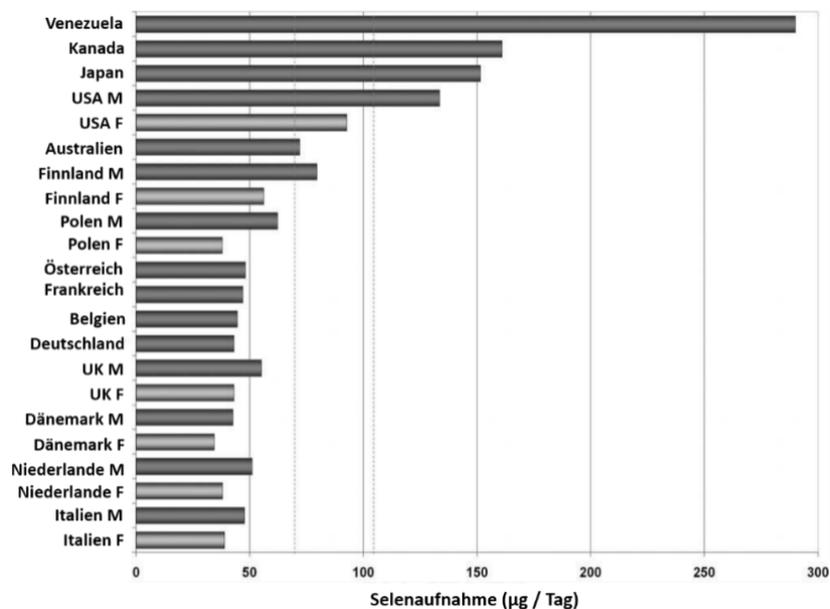


Abb. 7: Globale Unterschiede in der Selenaufnahme. M = Selenaufnahme bei Männern, F = Selenaufnahme bei Frauen. (modifiziert nach Fairweather-Tait *et al.*, 2011).

In den europäischen Ländern beträgt die durchschnittliche Aufnahme von Selen $< 50\text{ }\mu\text{g/d}$ und liegt somit unter der empfohlenen Tagesdosis [Flynn *et al.*, 2009]. Deutschland liegt mit einer täglichen Selenaufnahme von durchschnittlich $38\text{ }\mu\text{g/d}$ bei Frauen und $47\text{ }\mu\text{g/d}$ bei Männern im europäischen Mittel. Verglichen damit ist die tägliche Selenzufuhr in den USA mit $92\text{-}133\text{ }\mu\text{g/d}$ wesentlich höher [US Department of Agriculture Agricultural Research Service, 2008]. In einigen Regionen Indiens kommt es zu Selenaufnahmen, die deutlich über der empfohlenen Tagesdosis liegen: $475\text{ }\mu\text{g/d}$ bei Frauen und $632\text{ }\mu\text{g/d}$ bei Männern. Dies beruht auf dem Verzehr von Getreide, welches auf extrem selenhaltigen Böden wächst [Hira *et al.*, 2004]. Die höchste Selenaufnahme mit $> 4990\text{ }\mu\text{g/d}$ konnte jedoch in China beobachtet werden [Yang *et al.*, 1983].

1.2.3 Auswirkungen von Selen auf die menschliche Gesundheit

Seit der 1957 gemachten Entdeckung, dass Selen ein essentielles Spurenelement ist und somit eine wichtige Rolle im menschlichen Organismus spielt [Schwarz & Foltz, 1957], ist das wissenschaftliche Interesse an den Auswirkungen von Selen auf die menschliche Gesundheit stetig gestiegen [Navarro-Alarcon & López-Martinez, 2000]. Eine adäquate Aufnahme von Selen ist essentiell, um physiologische Aufgaben des Immunsystems, der Schilddrüse, des zentralen Nervensystems (ZNS), der Reproduktion, von Mechanismen der Tumorprävention und auch des Herz-Kreislauf-Systems zu gewährleisten [Rayman 1997]. Viele internationale Studien lassen vermuten, dass ein Selenmangel im menschlichen Körper bei der Entstehung von Krankheiten wie Krebs, Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen, Zirrhose, Virusinfektionen und vielen mehr beteiligt sein können [Taylor *et al.*, 1997; Navarro-Alarcon & López-Martinez, 2000]. Auch konnte nachgewiesen werden, dass Selendefizienz in Ländern mit extremer Selenunterversorgung (s. Kapitel 1.2.2) mit Endemien in Form von juvenilen Kardiomyopathien (Keshan-Krankheit) [Yang *et al.*, 1984] oder nekrotischen Osteoarthritis (Kashin-Beck-Krankheit) [Sokoloff, 1989] assoziiert ist.

Ein niedriger Selenstatus wird mit einem erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, chronischer Herzinsuffizienz und Arteriosklerose in Verbindung gebracht [Néve, 1996]. Bereits 1998 zeigten Tanguy *et al.* an isolierten Ratten-Herzen, dass eine Supplementierung mit Selen zu einer signifikanten Verringerung der Schweregrade von durch Reperfusion induzierten Arrhythmien führte. Gleichzeitig konnten sie einen deutlichen Anstieg der kardialen mitochondrialen und zytosolischen GPx-Aktivität in den Ventrikeln beobachten, was zu der Vermutung führte, dass Peroxide bei der Entstehung der durch Reperfusion verursachten Schädigung eine wichtige Rolle spielen [Tanguy *et al.*, 1998]. Im Jahr 2005 zeigten Altekin *et al.*, dass die Serumselenkonzentrationen in Patienten mit erhöhten Troponin und CK-MB-Werten erniedrigt waren, was vermuten lässt, dass die Höhe der Serumselenspiegel in direktem Zusammenhang mit dem Grad der myokardialen Schädigung steht und Serumselenspiegel somit als prognostische Faktoren im Rahmen des akuten Koronarsyndroms dienen könnten [Altekin *et al.*, 2005].

Im Rahmen der Keshan-Krankheit, die in Regionen Chinas mit sehr selenarmen Böden in Erscheinung tritt, kommt es zu juvenilen Kardiomyopathien. Yang *et al.* zeigten, dass eine Selensupplementation der Nahrung durch Zufuhr von 13-19 µg/d Selen das Auftreten der Keshan-Krankheit verhindern konnte, so dass diese Erkrankung in China seit den 1970er Jahren praktisch nicht mehr beobachtet wurde [Yang *et al.*, 1984]. Die Rolle der Selendefizienz in der Keshan-Krankheit lässt sich vermutlich einerseits anhand einer bei Selenmangel abgeschwächten Immunantwort auf eine Infektion mit dem Coxsackie B3 (CVB 3/0) Virus erklären. Andererseits kann oxidativer Stress, bedingt durch eine bei Selenmangel erniedrigte GPx-Aktivität, in vermehrten Mutationen des viralen Genoms und in einer erhöhten Pathogenität der eigentlich vergleichsweise harmlosen Coxsackie-Viren resultieren [Beck *et al.*, 2003]. Des Weiteren scheint eine adäquate Selenzufuhr positive Auswirkungen auf das Plasmacholesterin zu haben [Rayman, 2012]. Untersuchungen im Rahmen der UK PRECISE Studie zeigten, dass sich mit steigendem Selenspiegel das Verhältnis von *Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin* (LDL) zu *High-Density-Lipoprotein-Cholesterin* (HDL) zu Gunsten des HDL-Cholesterins veränderte. Dies deutet auf einen protektiven Einfluss von Selen auf das kardiovaskuläre Risiko hin [Rayman *et al.*, 2011].

Neben seiner Eigenschaft als essentielles Spurenelement besitzt Selen auch eine toxische Wirkung, die seit langem bekannt ist [Japha, 1842]. Eine kurzfristige Seleneinnahme von mehr als 3000 µg/d oder eine chronische Seleneinnahme von über 800 µg/d können Intoxikationen verursachen. Akute Intoxikationen mit Selen führen zu Allgemeinsymptomen wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen sowie Lungenödemen [Lech *et al.*, 2002]. Untersuchungen in China zeigten, welche Folgen eine chronische Selenintoxikation („Selenose“) mit sich bringt. In einigen Regionen Chinas sind die Böden derart selenreich, dass die dort lebenden Menschen täglich 3000 bis 6000 µg Selen über die Nahrung aufnehmen. Geschieht dies über einen längeren Zeitraum (2-3 Monate), so sind Diarrhö, Fatigue, Veränderungen an der Haut (Rötung, Schwellung, Blasenbildung), Nagelveränderungen (Brüchigkeit, Verfärbung), Haarveränderungen (Brüchigkeit, Haarverlust), Keratosen, Rachitis sowie periphere Neuropathien die Folge [Brown *et al.*, 2001; Hira *et al.*, 2004; MacFarquhar *et al.*, 2010]. Akute Intoxikationen mit hohen Dosen an Selen können durch Verursachen von Hämolysen, toxischen Hepatosen sowie Kardiomyopathien bis hin zum Kreislaufversagen sogar lebensbedrohliche Situationen hervorrufen [Barceloux, 1999].

1.2.4 Selenmetabolismus

Der menschliche Selenstoffwechsel dient der Synthese lebensnotwendiger Selenoproteine aus organischen (Selenomethionin, Selenocystein) und anorganischen (Selenit, Selenat) Selenverbindungen sowie der Bildung methylierter Selenverbindungen und Selenzuckern, die dann vom Körper ausgeschieden werden können. Die zentrale Schaltstelle des zellulären Selenmetabolismus ist der Selenwasserstoff (H_2Se). Eine vereinfachte, schematische Darstellung ist in Abbildung 8 zu sehen:

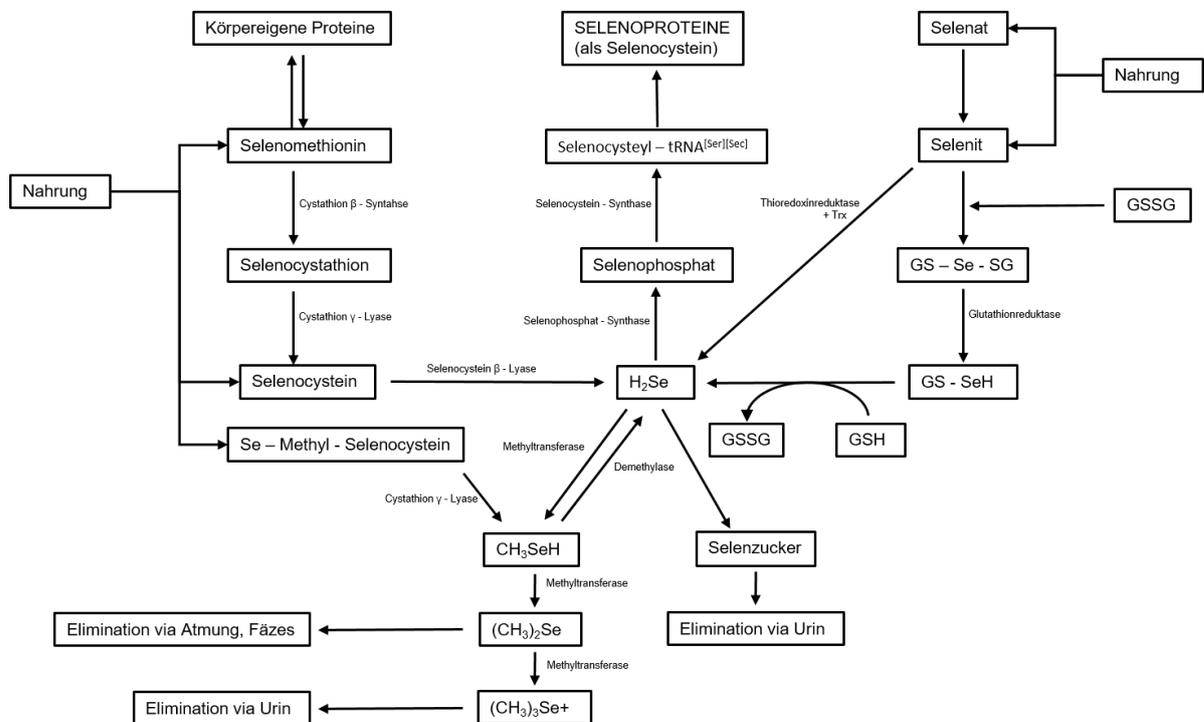


Abb. 8 Schematische Darstellung des Selenmetabolismus [modifiziert nach Fairweather-Tait *et al.*, 2011].

Die Umwandlung organischer Selenverbindungen zu Selenwasserstoff (H_2Se) kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: Selenomethionin, Selenocystein und Se-Methyl-Selenocystein werden mit der Nahrung aufgenommen und mittels verschiedener Enzyme verstoffwechselt. Aufgenommenes Selenomethionin wird von Cystathion β -Synthase und Cystathion γ -Lyase über das Zwischenprodukt Selenocystathion in Selenocystein umgewandelt. Aus Selenocystein wird über die Selenocystein β -Lyase Selenwasserstoff gebildet [Ohta *et al.*, 2008]. Auch aus der Nahrung aufgenommenes Se-Methylselenocystein kann in einer Cystathion γ -Lyase katalysierten Reaktion zu Methylselenol (CH_3SeH) umgewandelt werden, welches dann in einem zweiten Schritt zu Selenwasserstoff demethyliert werden kann [Pinto *et al.*, 2010].

Für die Umwandlung anorganischer Selenverbindungen (Selenat, Selenit) gibt es zwei verschiedene Möglichkeiten: Selenit kann über die Thioredoxinreduktase mit Thioredoxin als Kofaktor direkt zu Selenwasserstoff reduziert werden oder alternativ über eine Reaktion mit Glutathion (GSH) Selenodiglutathion bilden [Lu *et al.*, 2009]. Selenodiglutathion wird dann von der Glutathionreduktase zu Glutathioselenol reduziert, welches dann mit GSH zu Selenwasserstoff reagiert. Es wird angenommen, dass Selenat über die gleichen Reaktionswege zu Selenwasserstoff umgewandelt wird wie Selenit [Lu *et al.*, 2009]. Der weitere Selenmetabolismus läuft über Selenwasserstoff. Die Selenophosphat-Synthetase katalysiert die Reaktion von Selenwasserstoff zu Selenophosphat. Selenophosphat ist hochreaktiv und somit gut dazu geeignet, Selen für die Synthese der Selenoproteine bereitzustellen. Für diesen Schritt wird die Selenocystein-Synthetase benötigt [Tamura *et al.*, 2004]. Diese wandelt O-Phospho-L-Seryl-tRNA^[Ser|Sec] in Selenocysteyl-tRNA^[Ser|Sec] unter Verwendung von Selenophosphat als Selendonator um [Ganichkin *et al.*, 2007].

Selen kann über verschiedene Wege aus dem menschlichen Organismus eliminiert werden. Hierbei spielt ebenfalls Selenwasserstoff eine zentrale Rolle: wird wenig Selen über die Nahrung aufgenommen, so erfolgt die Elimination über die Umwandlung von Selenwasserstoff in Selenzucker, der dann mit dem Urin ausgeschieden wird [Ohta *et al.*, 2008]. Bei hohen Selenkonzentrationen im Körper wird der Selenwasserstoff über Methyltransferasen methyliert und entweder als Dimethylselenid über die Atmung oder Fäzes eliminiert oder aber erneut methyliert und als Trimethylselenonium-Ion im Urin ausgeschieden [Ohta *et al.*, 2008].

1.2.5 Selenoproteine und die antioxidative Wirkung von Selen

Im humanen Genom kodieren 25 Gene für Selenoproteine [Kryokov *et al.*, 2003]. Zu den Selenoproteinen zählen Proteine, die die Aminosäure Selenocystein (Sec) enthalten. Daher ist die Aktivität der Selenoproteine abhängig von der Verfügbarkeit von Selen im menschlichen Organismus. Es wird vermutet, dass Selenoproteine hauptverantwortlich für den positiven Effekt von Selen auf die menschliche Gesundheit sind [Labunskyy *et al.*, 2014]. Daher ist es wichtig zu verstehen, in welchen Schritten die Biosynthese der Selenoproteine abläuft und welche Funktionen die daraus resultierenden Selenoproteine besitzen. Zu den bekanntesten dieser Selenoproteine gehören:

- Oxidoreduktasen wie die Glutathion-Peroxidasen (GPx), die eine wichtige Rolle beim „Scavenging“ von reaktiven Sauerstoffspezies spielen und Wasserstoffperoxid sowie andere organische Hydroperoxide reduzieren [Brigelius-Flohé *et al.*, 2013].
- Thioredoxinreduktasen (TrxR), die über das Thioredoxinsystem einen wesentlichen Beitrag zur Erhaltung der intrazellulären Redoxsysteme leisten [Arnér *et al.*, 2000].

- Iodothyronin-Deiodasen (Dio), die zur Aktivierung und Deaktivierung der Schilddrüsenhormone benötigt werden [Bianco *et al.*, 2002].
- Selenoprotein P (SePP1), das aufgrund seines hohen Selengehalts als Plasmaselentransportprotein dient [Hill *et al.*, 2003]. Außerdem wird ihm eine Funktion als Radikalfänger zugewiesen [Burk *et al.*, 2003].

Der Einbau von Selen in Selenoproteine erfolgt in Form von Selenocystein. Dabei handelt es sich um die 21. proteinogene Aminosäure im genetischen Code. Anders als die Aminosäure Cystein enthält Selenocystein kein Schwefel- sondern ein Selenatom und wird über das UGA-Codon kodiert, welches auch als Stopp-Codon fungiert. Dieses Stopp-Codon würde im Normalfall zu einer Beendigung der Proteinbiosynthese führen. Um dies zu verhindern, muss eine Mitteilung an den Translationsapparat erfolgen, ob das UGA-Codon in der mRNA als Stopp-Codon oder als Selenocystein-Codon abgelesen werden soll. Hierzu dient die sog. Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS), die in allen Selenoprotein-mRNAs vorkommt. Dabei handelt es sich um „haarnadelförmige Sekundärstrukturen“ in Form einer doppelgängigen Umkehrschleife im 3'-untranslatierten Abschnitt (3'-UTR) der Selenoprotein-mRNAs [Hatfield *et al.*, 2002].

Die Biosynthese von Selenoproteinen verläuft in zwei Schritten: zunächst erfolgt die Biosynthese von Selenocystein, welches anschließend co-translational in Proteine eingebaut wird [Small-Howard *et al.*, 2006]. Zu Beginn der Biosynthese der Selenoproteine wird die spezifische tRNA^{ser[sec]} mit der Aminosäure Serin beladen. Nach Phosphorylierung durch das Enzym Phosphoserin-tRNA^{ser[sec]}-Kinase entsteht O-Phospho-L-Seryl-tRNA^{[Ser][Sec]}. Zur Bereitstellung von Selen für die Synthese der Selenoproteine wird nun ein hochreaktives selenhaltiges Substrat als Selendonator benötigt. Hierzu eignet sich Selenophosphat gut. Dieses wird über eine von der Selenophosphat-Synthase katalysierte Reaktion aus Selenwasserstoff synthetisiert (s. Abbildung 8). Anschließend wird mithilfe der Selenocystein-Synthetase die O-Phospho-L-Seryl-tRNA^{[Ser][Sec]} unter Verwendung von Selenophosphat als Selendonator in Selenocysteyl-tRNA^{[Ser][Sec]} umgewandelt [Ganichkin *et al.*, 2007].

Die anti-oxidative Wirkung von Selen wird hauptsächlich über die Aktivität der Selenoenzyme vermittelt [Lu *et al.*, 2009]. Zu den wichtigsten ROS-entgiftenden Selenoproteinen zählen die Glutathionperoxidasen (GPx) [Steinbrenner *et al.*, 2009]. Diese reduzieren Wasserstoffperoxid (H₂O₂), organische Hydroperoxide sowie Phospholipidhydroperoxide unter Verwendung von reduziertem Glutathion (GSH) als Kofaktor. Eine 1972 durchgeführte grundlegende Studie zeigte erstmals, dass die Aktivität des Enzyms Glutathionperoxidase (GPx) bei Ratten mit einem Selenmangel erniedrigt war. Nach Gabe von Selen konnte eine erhöhte Aktivität der GPx gemessen werden [Rotruck *et al.*, 1972]. Heute sind in der Familie der GPx fünf humane Selen-abhängige Isoenzyme bekannt. Diese wurden nach ihrem jeweiligen zuerst beschriebenen Wirkort benannt [Brigelius-Flohé *et al.*, 2013]. Zu diesen Isoformen zählen:

- die zytosolische und mitochondriale GPx (GPx 1, cGPx)
- die intestinale GPx (GPx 2, iGPx)
- die plasmatische GPx (GPx 3, pGPx)
- die membrangebundene Phospholipid-Hydroxyperoxid GPx (GPx 4, PH-GPx)
- die im Riechepithel vorhandene GPx (GPx 6)

Superoxidanionen werden durch Kupfer/Zink- bzw. Manganabhängige Superoxiddismutasen (SOD) zu H₂O₂ und O₂ umgewandelt [Schrauzner GN, 1998]. Danach sind u.a. die GPx (GPx 1-3) für die weitere

ROS-Entgiftung verantwortlich, indem sie die Reaktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie von organischen Hydroperoxiden zu Wasser katalysieren. Parallel dazu erfolgt die Oxidation von reduziertem Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG). Die Regeneration des oxidierten Glutathions (GSSG) zu GSH wird durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GR) in einer NADPH-abhängigen Reaktion katalysiert [Ursini *et al.*, 1995] (s. Abbildung 9). Über die GPx 4 werden Lipid- oder Cholesterol-Hydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen reduziert [Schrauzer GN, 1998].

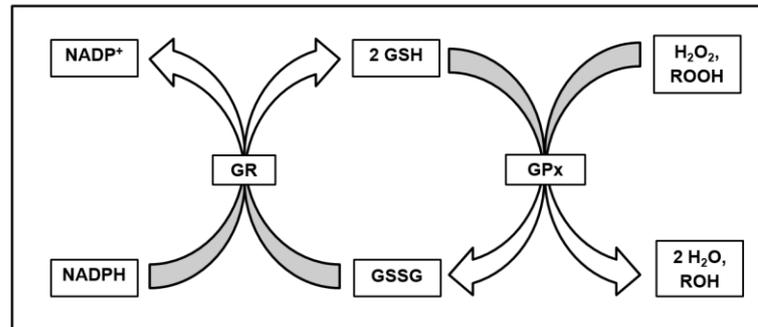


Abb. 9: Reaktionsschema der durch GPx katalysierten Reaktion zur Neutralisation von Wasserstoffperoxiden sowie anderen organischen Hydroperoxiden. NADP⁺=Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, GR=Glutathion-Reduktase, GSH=reduziertes Glutathion, GSSG=Glutathiondisulfid, ROH=organische Hydroperoxide.

Bei einem Selenmangel wird das wenige vorhandene Selen nicht gleichmäßig verteilt. Vielmehr kommt es zu einer Selenumverteilung zwischen den einzelnen Selenoproteinen, die in einem unterschiedlich stark ausgeprägten Expressions- bzw. Aktivitätsverlust der einzelnen Selenoproteine resultiert. Einige Selenoproteine verschwinden bereits bei leichtem Mangel an Selen, andere Selenoproteine sind stabiler und zeigen erst einen Aktivitätsabfall, wenn der Selenmangel gravierender wird. Dies wird auch als „Hierarchie der Selenoproteine“ bezeichnet [Wingler *et al.*, 1999]. Schon bei milden Selenmangelzuständen kommt es zu einer verminderten Expression von GPx 1, gefolgt von GPx 3, GPx 4 und schließlich GPx 2 [Brigelius-Flohé, 2013]. Folglich hat die GPx 2 innerhalb dieser Hierarchie den höchsten Rang inne, ist somit die stabilste GPx, wohingegen die GPx 1 den niedrigsten Rang innehat. Daher ist es notwendig, eine ausreichende Menge an Selen über die Nahrung aufzunehmen, damit auch die GPx 1 entsprechend exprimiert wird [Brigelius-Flohé, 2013].

Auf Grund der anti-oxidativen Eigenschaften von Selen ist anzunehmen, dass die Pathogenese vieler Krankheiten, die mit oxidativem Stress einhergehen, wie zum Beispiel Pankreatitis, Asthma oder rheumatoide Arthritis, durch die Höhe der Selenkonzentration beeinflusst werden kann [Raymann MP, 2000]. Dies gilt auch für Erkrankungen des Herzkreislaufsystems: So wurde gezeigt, dass niedrige Serumseleknkonzentrationen mit einem erhöhten Risiko, an einer chronischen koronaren Herzkrankheit zu erkranken, einhergehen [Hassanzadeh *et al.*, 2006]. Als Ursache hierfür wird eine oxidative Schädigung des vaskulären Endothels postuliert. Es ist zu vermuten, dass eine adäquate Selensubstitution einer oxidativen Schädigung des Endothels entgegenwirkt [Lum *et al.*, 2001; Steinbrenner *et al.*, 2009]. Dies kann z.B. über eine Regulierung des Arachidonsäurezyklus, die Entgiftung von Hydroperoxiden durch Glutathionperoxidasen sowie die Hemmung der LDL-Oxidation und durch Beeinflussung des Immunsystems über den sog. *oxidative burst* der Phagozyten vermittelt werden [Alissa *et al.*, 2003]. Einen wesentlichen Anteil an den anti-oxidativen und anti-atherogenen Eigenschaften von Selen tragen die Glutathionperoxidasen; bei einer durch Selenmangel bedingten

verringerten Aktivität der GPx entstehen vermehrt Hydroperoxide aus Lipoproteinen und Phospholipiden, die zur Oxidation von Membranlipiden führen können. An der somit geschädigten Gefäßwand kann es nun zur Anlagerung von oxidiertem LDL kommen und infolgedessen die Entstehung von Arteriosklerose begünstigt werden [Néve J, 2006]. Auch führt eine erhöhte Konzentration an Hydroperoxiden über eine Hemmung der Prostaglandin-Synthetase zu einer verminderten Prostazyklinsynthese in den Endothelzellen. Prostazykline bewirken unter anderem eine Vasodilatation und hemmen die Thrombozytenaggregation. Somit kommt es bei niedrigen Prostazyklinkonzentrationen zu Vasokonstriktionen und vermehrter Thrombozytenaggregation, wodurch die Entstehung von Thromboembolien begünstigt wird [Rayman MP, 2000]. Auch kommt es durch die bei Selenmangel vermehrt vorhandenen Hydroperoxide zu einem Anstieg der Thromboxanproduktion. Thromboxan A_2 bewirkt eine Vasokonstriktion und fördert die Thrombozytenaggregation, was wiederum die Entstehung von Thromben und Thromboembolien begünstigt [Néve J, 1996; Rayman MP, 2000].

1.2.6 Einfluss von Selen auf den I/R-Schaden

An verschiedenen Tiermodellen konnte *in vivo* nachgewiesen werden, dass eine Supplementation mit Selenverbindungen positive (protektive) Effekte bei I/R-induzierter Gewebeschädigung bewirkt. In einem I/R-Modell an der Maus konnte gezeigt werden, dass die durch den I/R-Schaden induzierte Nierenschädigung durch die Gabe von Selen positiv beeinflusst werden konnte, indem oxidativer Stress reduziert und der PI3K / NO-Signalweg aktiviert wurde [Liu *et al.*, 2015]. 2010 beobachteten Wang *et al.*, dass Selen anti-apoptotische Effekte auf Neuronen im Hippocampus, die zuvor einen zerebralen I/R-Schaden erlitten hatten, ausübt. Dieser Effekt ist am Ehesten auf eine Inhibierung der Expression inflammatorischer Faktoren wie TNF- α und IL-1 β zurückzuführen [Wang *et al.*, 2010]. Anhand eines Ratten-Modells konnten Ahmad *et al.* nachweisen, dass die Vorbehandlung mit Selen zu Beginn der Reperfusion geeignet ist, um eine postischämische Schädigung zu verringern und das neurologische *Outcome* nach transienter fokaler zerebraler Ischämie zu verbessern [Ahmad *et al.*, 2011]. In einem I/R-Modell an der Ratte konnte zudem beobachtet werden, dass Selen durch die Wirkung als Radikalfänger einen direkten protektiven Effekt auf den nach warmer hepatischer Ischämie entstandenen I/R-Schaden hat und dabei hilft, die anti-oxidative Kapazität der Leber zu erhalten [Zapletal *et al.*, 2008]. In einer Studie an schwangeren Ratten konnte gezeigt werden, dass Selen unreife Rattenherzen vor einem I/R-Schaden schützen kann, indem es die Ischämietoleranz der Herzen erhöht [Ostadalova *et al.*, 2007]. Im Tierversuch an Rattenherzen, die einem I/R-Schaden ausgesetzt waren, konnte gezeigt werden, dass ein Selenmangel zu einer reduzierten GPx- und TRxR-Aktivität führt. Die Herzen der Selen defizient ernährten Tiere waren anfälliger für I/R-Schaden im Vergleich zur Kontrolle. Auch wurden bei den Ratten mit niedrigeren Selenkonzentrationen signifikant erhöhte Lipidperoxide und eine verstärkte Oxidation von Membranproteinen gemessen. Bei den selensupplementierten Tieren hingegen zeigten sich erhöhte GPx- und TRxR-Aktivitäten, signifikant niedrigere Konzentrationen an Lipidperoxiden und oxidierten Proteinen und eine verbesserte postischämische Wiederherstellung der Herzfunktion [Venardos *et al.*, 2004].

Weltweit sterben jährlich 1,5 Millionen Patienten an den Folgen einer Sepsis [Rangel-Frausto *et al.*, 1995]. Daher ist es wichtig, schnell wirkende sowie möglichst kostengünstige und nebenwirkungsfreie

Therapien zu entwickeln. Im Rahmen eines septischen Schocks kommt es immer wieder zu Ischämie- mit darauffolgenden Reperfusionphasen. Die hierbei entstehenden Sauerstoffradikale führen zu einer enormen oxidativen Belastung für den menschlichen Organismus. Abbildung 10 zeigt die Pathophysiologie von Sepsis:

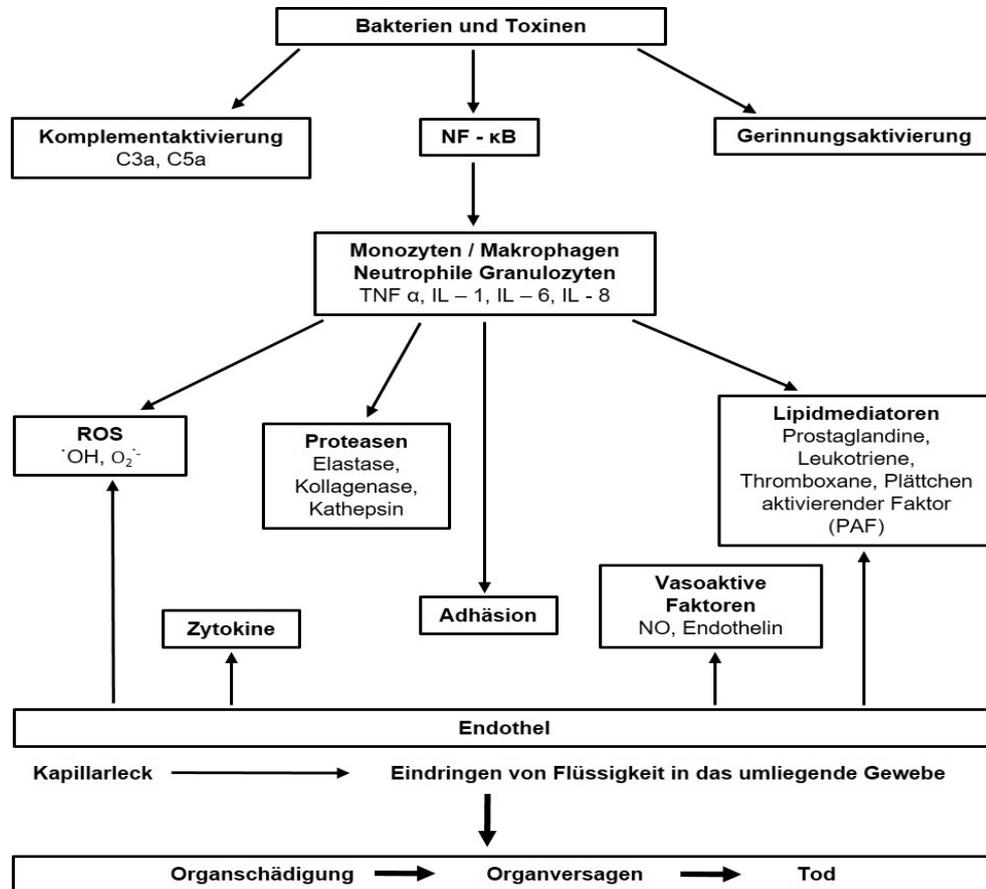


Abb. 10: Pathophysiologie von Sepsis

Durch die Gabe von Selen kann Einfluss auf die zentralen Mediatoren bei der Entstehung von Sepsis genommen werden:

Endothelzellen exprimieren GPx 1 und GPx 4 sowie Thioredoxinreduktasen. Diese Selenoenzyme sind in die Regulation des Gefäßtonus (Erhaltung des O_2^- / NO-Gleichgewichts), der Zelladhäsion (Kontrolle sowie Expression von Zelladhäsionsmolekülen), der Apoptose (Aktivierung und Inhibition der *apoptosis signal regulating kinase 1*) sowie der Produktion von Eikosanoiden (Kontrolle und Aktivierung von Zyklooxygenasen und Lipoxygenasen) involviert. Eine durch Selen erhöhte Aktivität der GPx 3 und GPx 4 inhibiert außerdem die Thromboxan Synthese und führt somit zu einer Vasodilatation und verminderten Koagulation [Brigelius-Flohé *et al.*, 2003]. Auch führt die Gabe von Selen zu einer verminderten Aktivierung von NFκB einem Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Entzündungen spielt [Flohé *et al.*, 1997; Brigelius-Flohé *et al.*, 2003]. Gleichzeitig inhibiert Selen die durch TNF α induzierte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, E-Selectin, P-Selectin) [Zhang *et al.*, 2002; Boeken & Feindt, 2008]. Des Weiteren kommt es unter Gabe von Selen zu einer verminderten Komplementaktivierung [Hou, 1997].

Patienten mit einem Sepsis-Syndrom weisen, verglichen mit den Referenzwerten von gesunden Kontrollpersonen, erniedrigte Selenkonzentrationen auf. Auch wurde eine inverse Korrelation zwischen den Selenspiegeln der Patienten sowie der Schwere der Erkrankung und dem Mortalitätsrisiko postuliert: niedrige Selenspiegel gehen mit einem schwereren Krankheitsgrad sowie einer erhöhten Mortalität einher [Sakr *et al.*, 2007]. Untersuchungen an Intensivpatienten zeigten außerdem, dass eine Injektion von Selenit (allerdings in sehr hohen Dosen) zu einer signifikanten Reduktion von Entzündungsreaktionen und akutem Nierenversagen führte und die Belastung mit freien Radikalen senkte [Angstwurm *et al.*, 1999]. Eine Studie von Berger *et al.* zeigte, dass durch Verabreichung von 540 µg Selen (Tag 1 und 2) und 270 µg Selen (Tag 3-5) die Plasmaselenlevel sowie die GPx-Aktivität stiegen, die CRP – Werte sanken und die Dauer des Krankenhausaufenthaltes von schwer traumatisierten Patienten verkürzt wurde [Berger *et al.*, 2008]. Im Jahr 2011 konnten Manzanares *et al.* nachweisen, dass Sepsis Patienten, die initial 200 µg Selen i.v. gefolgt von 1600 µg/d Selen i.v. erhielten, weniger nosokomiale Pneumonien entwickelten als Patienten ohne Selensubstitution. Es ist daher anzunehmen, dass durch eine Selensubstitution das *Outcome* kritisch kranker Patienten verbessert werden kann [Manzanares *et al.*, 2011]. In einer weiteren Studie, in der Intensivpatienten über 7 Tage 500 µg Selen erhielten, konnte beobachtet werden, dass es bei den mit Selen supplementierten Patienten zu weniger Infektionen kam [Andrews *et al.*, 2011]. Im Rahmen der sog. *Selenium in Intensive Care* (SIC) Studie wurde Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock täglich 1000 µg Selen in Form von Natriumselenit verabreicht, zunächst als einmalige Bolus-Infusion und anschließend über 14 Tage kontinuierlich *per infusionem*. Somit konnten Angstwurm *et al.* zeigen, dass die Patienten der Selengruppe eine um 10,3 % geringere 28-Tage-Mortalität aufwiesen als die Patienten der Placebogruppe [Angstwurm *et al.*, 2007].

Die Ergebnisse der oben genannten Studien deuten darauf hin, dass Selen einen protektiven Effekt auf die oxidative Schädigung, die im Rahmen einer postischämischen Reperfusion auftritt, ausüben kann [Guo *et al.*, 2012].

1.2.7 Natriumselenit

Natriumselenit (Na₂SeO₃) gehört zu den anorganischen Selenverbindungen. Die Herstellung von Natriumselenit erfolgt durch eine Reaktion von Selendioxid (SeO₂) mit Natriumhydroxid (NaOH): $\text{SeO}_2 + 2 \text{NaOH} \rightarrow \text{Na}_2\text{SeO}_3 + \text{H}_2\text{O}$.

Eine Nahrungsergänzung mit Natriumselenit kann einen Anstieg der Serumselenkonzentrationen im Blut bewirken. Stoppe *et al.* konnten zeigen, dass eine präoperative Supplementation mit Natriumselenit die Selenkonzentrationen im Blut auf Normwerte erhöhte [Stoppe *et al.*, 2013]. Auch eine zweiwöchige Supplementation mit Natriumselenit führte zu einem signifikanten Anstieg der Serumselenkonzentration [Abdulah *et al.*, 2007]. Außerdem kann eine Supplementation mit Natriumselenit die Aktivität von Selenoproteinen positiv beeinflussen. 2010 kamen Abedelahi *et al.* zu der Erkenntnis, dass eine Supplementierung mit Natriumselenit zu einer erhöhten GPx-Aktivität führte sowie der Bildung von ROS entgegenwirkte und somit *in vitro* die Entwicklung von Follikeln maßgeblich beeinflusste [Abedelahi, 2010]. Eine Studie von Xiang *et al.* zeigte, dass Natriumselenit über den intrinsischen Apoptoseweg zu einer Induktion von Zelltod und Apoptose führt [Xiang *et al.*, 2009]. Auch wurden anti-virale Eigenschaften von Natriumselenit untersucht. Im Jahr 1981 zeigten Balansky und Argirova, dass eine Natriumselenitsupplementation die Reproduktion onkogener RNA-

Viren inhibierte [Balansky & Argirova, 1981]. Ebenso konnte die Expression, Transkription und Genomreplikation von Hepatitis B Viren durch die Gabe von Natriumselenit unterdrückt werden [Cheng *et al.*, 2016]. Natriumselenit besitzt außerdem auch anti-onkogene Eigenschaften. Eine Supplementation von Natriumselenit konnte die Expression des pro-angiogenen VEGF und der immunsuppressiven Zytokine *Transforming growth factors β* (TGF β) und IL-6 durch LPS in humanen Prostatakrebszellen inhibieren [Pei *et al.*, 2010]. Fang *et al.* zeigten, dass Natriumselenit durch eine Aktivierung von JNK 1 und eine Unterdrückung des β -Catenin Signalwegs die intestinale Karzinogenese supprimieren [Fang *et al.*, 200]. Des Weiteren vermittelt Natriumselenit auch anti-diabetogene Wirkungen. In einem Tiermodell an Ratten zeigten Ayaz *et al.*, dass durch die Gabe von Natriumselenit der Diabetes-induzierten Abnahme der Konzentrationen an SOD, GR und GPx entgegengewirkt werden konnte [Ayaz *et al.*, 2006]. Natriumselenit besitzt außerdem anti-oxidative und anti-apoptotische Eigenschaften. Eine Langzeitbehandlung mit Natriumselenit konnte die durch Strahlung verursachte Gewebeschädigung in den Ovarien von Ratten reduzieren [Said *et al.*, 2014]. Somit besitzt Natriumselenit vielfältige Eigenschaften und wirkt anti-oxidativ, anti-inflammatorisch, anti-diabetogen, anti-viral und anti-apoptotisch.

1.3 Etablierung eines Kleintier-EKZ-Modells

Das im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendete Versuchsmodell wurde von der Arbeitsgruppe im Rahmen einer Modelletablierung als Kleintier-EKZ-Modell an der Ratte etabliert [Engels *et al.*, 2014]. Dies diente dazu, die operationstechnische Handhabung sowie den Einfluss der Herz-Lungen-Maschine auf den Ischämie- und Reperfusionsschaden zu testen. Im Anschluss an die Intubation der Tiere und die Kanülierung der Gefäße erfolgte der Anschluss an die extrakorporale Zirkulation (EKZ) mit tief hypothermem Kreislaufstillstand (*deep hypothermic circulatory arrest*, DHCA). Danach wurden die Tiere reperfundiert. Somit konnte ein kliniknahes EKZ-Modell getestet und etabliert werden.

Unter Verwendung dieses EKZ-Modells konnte nachgewiesen werden, dass die EKZ mit DHCA zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL- und TNF- α führte. Klinisch-chemische Marker für Gewebeschädigung darunter Troponin I, AST, ALT, LDH, Kalium, Kreatinin und Harnstoff waren erhöht. Auch konnte im Verlauf der EKZ ein tendenzieller Anstieg der Leukozyten beobachtet werden. Des Weiteren konnten I/R- induzierte Veränderungen des Expressions-/ Phosphorylierungsmusters von Stressproteinen nachgewiesen werden [Engels *et al.*, 2014]. Mithilfe dieses Kleintier-EKZ-Modells können somit die pathophysiologischen und molekularen Veränderungen, die im Rahmen einer Sepsis entstehen, imitiert und so die dem I/R-Schaden zugrundeliegenden Pathomechanismen untersucht werden.

1.4 Fragestellung

Nach herzchirurgischen Eingriffen, die den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine erforderlich machen, kann es postoperativ zu schweren Gewebe- und Endothelschäden kommen. Auslöser dieses Ischämie- und Reperfusionsschadens sind unter anderem eine komplexe systemische Immunantwort sowie oxidativer Stress, der durch eine exzessive Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst wird. Selen ist ein essentielles Spurenelement, welches in Form der Aminosäure Selenocystein in anti-oxidativ wirkende Selenoproteine wie die GPx eingebaut wird und zu einer gesteigerten Aktivität dieser Selenoproteine führt. Mehrere Studien an isolierten Organen haben Hinweise darauf geliefert, dass die Selenverbindung Natriumselenit protektive Wirkungen gegen einen Ischämie- und Reperfusionsschaden aufweist [Sinci *et al.*, 1998; Venardos *et al.*, 2004]. *In vivo* Studien, die die Organsysteme des gesamten Organismus in Betracht ziehen, fehlen allerdings bis heute.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Natriumselenit auch *in vivo* einen protektiven Einfluss auf den durch die EKZ und den DHCA entstandenen I/R-Schaden hat. Das hier verwendete Versuchsmodell wurde im Rahmen einer Modelletablierung von der Arbeitsgruppe als Kleintier-EKZ-Modell an der Ratte etabliert [Engels *et al.*, 2014]. Mithilfe dieses Modells ist es möglich, den I/R-Schaden, der im Rahmen von EKZ mit DHCA entsteht *in vivo* zu simulieren. Darauf aufbauend sollten hier im Einzelnen sollten die folgenden Fragestellungen untersucht werden:

1. Welche Auswirkungen hat eine fünfwöchige Fütterung mit Natriumselenit auf den Selenstatus dieser Tiere?
2. Zeigen die mit Natriumselenit supplementierten Tiere verglichen mit den Kontrolltieren Unterschiede im Hinblick auf hämodynamische Parameter (z.B. Katecholamin- und Volumenbedarf), klinisch-chemische Labor- (z.B. ALT, AST, LDH und Troponin) sowie Vitalparameter (z. B. Blutdruck, Herzfrequenz, Temperatur)?
3. Welchen Einfluss hat die Supplementation von Natriumselenit auf die Plasma- sowie Gewebespiegel pro-inflammatorischer Zytokine (IL 6 und TNF α)?
4. Hat die Behandlung mit Natriumselenit Auswirkungen auf die durch I/R-induzierte oxidative Gewebeschädigung? Hierbei sollte der Einfluss von Natriumselenit auf das Expressions-/Phosphorylierungsmuster ausgewählter Kinasen (ERK 1/2, JNK) und Stressproteine (HSP 70, HO-1) untersucht werden.
5. Wie wirkt sich die Behandlung mit Natriumselenit auf I/R-induzierte Apoptosevorgänge aus?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Labormaterialien

Tabelle 1: Reagenzien

Präparat / Wirkstoff	Hersteller
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Dinatriumethyldiamintetraacetat-dihydrat)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glutathion-Reduktase	Sigma, Deisenhofen
HAES 6%	Voluven, Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
HCl	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mammalian Protein Extraction Reagent M-PER	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL
NaCl	Merck, Darmstadt
NADH	Boehringer, Mannheim
NADPH	Roche, Mannheim
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
Proteinmarker Pageruler	Thermo Scientific Fermentas, St. Leon-Roth,
Rotiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe
Super-Signal-West-Pico	Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL
Super-Signal-West-Femto Chemiluminescent-Substrat	Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL
TEMED	Roth, Karlsruhe
tert-Butylhydroperoxid	Sigma, Deisenhofen
TRIS	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt
TWEEN 20	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Reagenzien
Anode-I Puffer	300 mM Tris; 10% (v/v) Methanol; pH 10,4
Anode-II Puffer	25 mM Tris; 10% (v/v) Methanol; pH 10,4
Blockierungspuffer Western Blot	5% (w/V) Trockenmilchpulver in 1x-TBST
EDTA (0,5M, pH 8,0)	186,12 g EDTA in 1 Liter Wasser; pH 8,0
GPx-Assay-Puffer	100 mM Tris; 5 mM EDTA; 1 mM NaN ₃ ; 0,1% (v/v) Triton X-100; pH 7,6
Kathodenpuffer	25 mM Tris; 10% (v/v) Methanol; 40 mM Glycin; pH 9,4
SDS-Page Laufpuffer	50 mM Tris; 500 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS
SDS-Page Probenpuffer	300 mM Tris-HCl; pH 6,8; 8% SDS; 40% Glycin; 400 mM Mercaptoethanol; 0,04% Bromphenolblau
TBS-T	5 mM Tris-HCl; pH 7,5; 15 mM NaCl; 0,01% (v/v) Tween-20

Tabelle 3: Polyacrylamidgele für SDS-Page

Polyacrylamidgele	Reagenzien
5% Sammelgel	720 µl Rotiphorese Gel 40; (37,5:1); 650 µl Tris 1mM; pH 6,8; 3,5 ml H ₂ O; 50 µl SDS 10% (w/v); 50 µl APS 10% (w/v); 5 µl TEMED
10% Trenngel	2,5 ml Rotiphorese Gel 40; (37,5:1); 2,5 ml 1,5 mM Tris; pH 8,8; 4,8 ml H ₂ O; 100 µl SDS 10% (w/v); 100 µl APS 10% (w/v); 5 µl TEMED

Tabelle 4: Assay-Kits

Assay-Kits	Hersteller
AKT 1/2/3 SimpleStep ELISA Kit	Abcam, Cambridge, UK
Caspase Glo 3/7 Assay	Promega, Madison, USA
Rat IL – 6 ELISA Kit	Diaclone SAS, France
Rat TNF- α ELISA Kit	Diaclone SAS, France
PARP – Inhibitor Assay	Trevigen, USA

2.1.2 Antikörper

Tabelle 5: Primäre Antikörper

Antigen	Hersteller	Donor
Phospho-STAT-3	Cell-Signaling	Kaninchen
Total-STAT-3	Cell-Signaling	Kaninchen
Phospho-ERK1/2	Cell-Signaling	Kaninchen
Total-ERK1/2	Cell-Signaling	Kaninchen
Beta-actin	Sigma-Aldrich	Kaninchen
Anti-HSP-70	StressMarq Biosciences Inc.	Kaninchen
Anti-HO-1	Epitomics	Kaninchen

Tabelle 6: Sekundäre Antikörper

Antigen	Hersteller	Donor
Rabbit IgG (H+L)-HRP	Dianova	Kaninchen
Mouse IgG-HRP	Thermo Scientific Pierce	Maus

Tabelle 7: Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Discofix C3 3-Wege-Hahn	Braun, Melsungen
Ethibond 4/0 Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Ethicon Prolene 5/0 Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Gelkassetten (1.5 mm)	Invitrogen, Karlsruhe
Gel Blotting Papier Whatman	Schleier & Schuell, Dassel
High-performance Chemilumineszenz Film	Amersham, Freiburg
Küvetten	Sarstedt, Nürmbrecht
Polylab Pipettenspitzen	Welabo, Düsseldorf
Vasofix Safety 16 G Braunülen	Braun, Melsungen
Vasofix Safety 20 G Braunülen	Braun, Melsungen

2.1.3 Equipment

Tabelle 8: Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage AB-204S	Mettler, Tolebo, Schweiz
Barolog A	Dräger, Lübeck
Blutgasanalysegerät ABL 510	Radiometer GmbH, Willich
Capnomac Ultima	Datex, Helsinki, Finnland
Destillierfilteranlage Milli – Q	Millipore, Schwalbach
Druckdom	Medex Medical GmbH, Klein-Winterheim
EKG	Marquette Heilige GmbH, Freiburg
Hämatologiegerät scil Vet abc	Scil animal care company GmbH, Viernheim
Herz-Lungen-Maschine inkl. Zubehör	Dipl.-Ing. Martin Humbs, Valley
IBS Pipetboy acu	Marquette Heilige GmbH, Freiburg,
Isovapor 19.3 Forene	Dräger, Lübeck
IKA-Vibrax-VxR-Schüttler / Janke & Kunkel Typ VxR	Integra Biosciences, Fernwald
Mikrowelle	IKA, Staufen
Monitor Eagle 4000	Dräger, Lübeck
Perkin Elmer LS 50B Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer, Rodgau
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Power Wave X Select Microplate-reader	BIO-TEK Instruments Inc., Friedrichshall
Semi-Dry-Blotter	Roth, Karlsruhe
Ultrasonic Disintegrator No. 7100	Scientific Industries, Bohemia, USA
UV/SVIS Spectrometer Lambda 2	Perkin Elmer Instruments, Düsseldorf
Vortex-Genie2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wärmeaustauscher	Thermo Haake, Karlsruhe
Zentrifuge 5417C und 5804R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 9: Arzneimittel

Arzneimittel / Wirkstoff	Hersteller
Arterenol® 1 mg/ ml	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Calciumgluconat 10%	Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fentanyl 0,5 MG	ROTEXMEDICA GmbH, Trittau
HAES 6% 130/4	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Heparin-Natrium 25.000 IE/ 5 ml	ROTEXMEDICA GmbH, Trittau
Isofluran	Actavis, Langenfeld
Kodan Tinktur forte farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Lidocain – HCl	Braun, Melsungen
NaBiC 8,4%	Braun, Melsungen
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen
Suprarenin 1 mg / ml	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Tris, 3M Trometamol-Lösung	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

2.1.4 Tierhaltung

Gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes wurde das Tierversuchsvorhaben durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt (Aktenzeichen 87-51.04.2010.A334). Der entsprechende Fachkundenachweis gemäß § 9 des geltenden Tierschutzgesetzes wurde zu Beginn der Promotionsarbeit am 24.08.2012 von der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums Düsseldorf erteilt.

Für die Eingriffe wurden männliche Wistar-Ratten (Janvier-Breeding Center, Le Genest St. Isle, Frankreich) mit einem Körpergewicht von 500-600 g verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere zur Eingewöhnung in Gruppen von mindestens zwei bis maximal vier Tieren in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Bis zum Tag der Operation waren die Tiere in einem fensterlosen, klimatisierten Tierstall mit einer durchschnittlichen Raumtemperatur von 22°C und einer durchschnittlichen relativen Luftfeuchtigkeit von 55% untergebracht. Ein Hell-/Dunkelrhythmus von jeweils 12 Stunden wurde durch eine Zeitschaltuhr gewährleistet, wobei die Lichtintensität im Käfig gemäß den Vorschriften für Albinotiere (GV-SOLAS, 1988) maximal 60 Lux betrug.

Den Tieren der nicht behandelten (NB) sowie operierten Kontrollgruppen (K) stand selenadäquates Futter (300 µg Se/kg; Haltungsfutter Ratte, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) über Futterraufen zur Verfügung. Die Tiere der nicht behandelten (NBSe) und der operierten Natriumselenitgruppe (Se) wurden vor Versuchsbeginn für fünf Wochen mit natriumselenithaltigem Futter (1000 µg Se/kg) der Firma Altromin (Lage, Deutschland) gefüttert (40 g Futter/Tier/Tag). Das Futter wurde über Futterraufen, das Wasser über Nippeltränken gegeben. Sowohl Futter als auch Wasser stand allen Tieren bis zum Zeitpunkt der Operation *ad libitum* zur Verfügung.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsgruppen

Als Versuchsmodell wurde das von der Arbeitsgruppe etablierte Kleintier-EKZ-Modell an der Ratte verwendet (Engels *et al.*, 2014).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen lassen sich in Vorversuche (Untersuchungen im Hinblick auf die Wirksamkeit der Natriumselenitfütterung zur Verbesserung des Selenstatus der Tiere) und Hauptversuche (Untersuchungen zur protektiven Wirkung von Natriumselenit auf den I/R-Schaden) einteilen: Sowohl für die Vor- als auch für die Hauptversuche wurden jeweils zwei Gruppen (Kontrolle und Natriumselenit) gebildet und die Tiere dieser beiden Gruppen miteinander verglichen. Da die Tiere der Vorversuche keiner extrakorporalen Zirkulation unterzogen worden sind, werden sie fortan als „nicht behandelt“ bezeichnet. Abbildung 11 zeigt eine Gesamtaufstellung aller in dieser Arbeit vorkommenden Gruppen. Die Gruppen, an denen die Vorversuche durchgeführt wurden, sind blau unterlegt. Orange unterlegt sind die Gruppen, die zur Untersuchung der protektiven Wirkung von Natriumselenit auf den I/R-Schaden herangezogen werden:

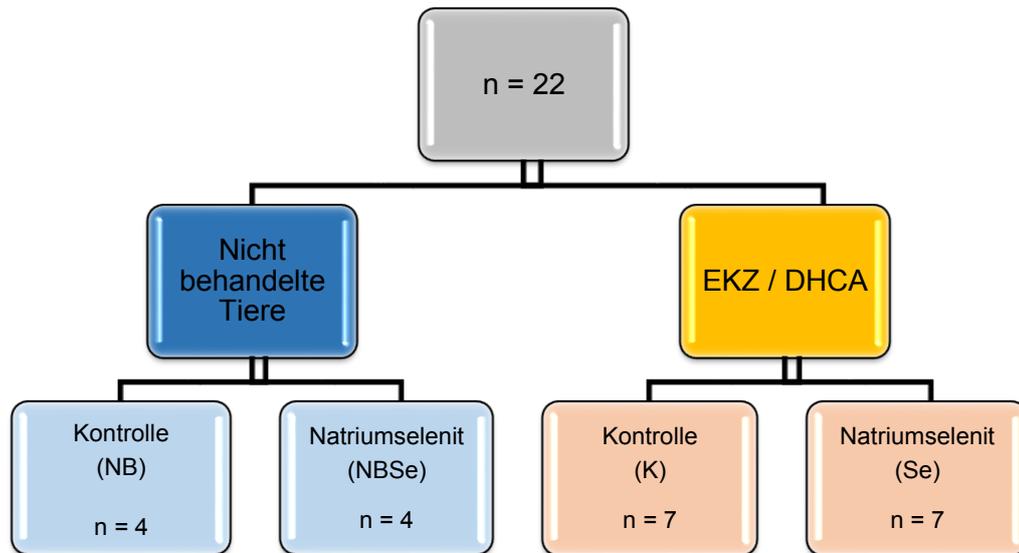


Abb. 11 Gesamtübersicht der Versuchsgruppen (NB = nicht behandelte Kontrollgruppe; NBSe = nicht behandelte Selengruppe; K = operierte Kontrollgruppe; Se = operierte Selengruppe).

Einzelheiten zur Fütterung und Versuchsdurchführung der vier oben aufgeführten Gruppen werden in Kapitel 2.2.2 und Kapitel 2.2.3 beschrieben.

2.2.2 Vorversuche zur Natriumselenitsupplementierung

Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, um herauszufinden, ob eine Fütterung der Tiere mit Natriumselenit-angereichertem Futter zu einer Akkumulation von Selen und folglich zu einer erhöhten Aktivität des Selenoenzyms GPx in ausgewählten Geweben der Tiere führte. Hierfür wurden zwei Gruppen (Kontrolle und Natriumselenit) gebildet und die Tiere dieser beiden Gruppen miteinander verglichen (s. Abb. 11). Die Tiere der nicht behandelten Kontrollgruppe (NB; n = 4) wurden selenadäquat ernährt (0,3 ppm Selen). Die Selengruppe (NBSe; n = 4) wurde fünf Wochen lang mit natriumselenithaltigem Futter gefüttert (1 ppm Selen). Die Tiere aus beiden Gruppen wurden nicht an die EKZ angeschlossen und somit keinem DHCA unterzogen wurden. Nach Intubation und Anästhesieren erfolgte direkt die Euthanasie der Tiere. Daher werden sie im Folgenden als „nicht behandelt“ bezeichnet (NB: nicht behandelte Kontrollgruppe; NBSe: nicht behandelte Selengruppe). Die beiden Gruppen der Vorversuche sind in Abbildung 11 hellblau hervorgehoben. Im Folgenden wird das Vorgehen beim Tierversuch (nach Ablauf der fünfwöchigen Selensupplementation) detailliert beschrieben:

ANÄSTHESIEEINLEITUNG

Zur Anästhesieeinleitung wurden die Ratten in einen Glasexsikkator gesetzt. Dieser bestand aus zwei Kammern. In die untere Kammer wurde isoflurangetränkte Watte gelegt. Verschlossen wurde die untere Kammer mit einer Lochplatte aus Porzellan. Auf diese Lochplatte wurde die Ratte gesetzt. In dem Augenblick, da die gewünschte Narkosetiefe mit Bewusstseinsverlust erreicht war, wurde die Ratte aus dem Exsikkator genommen und in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert.

INTUBATION

Die endotracheale Intubation erfolgte unter Zuhilfenahme einer externen Lichtquelle, eines Metallspatels und eines Trachealspreizers. Intubiert wurde mit einer grauen 16-Gauge-Venenverweilkanüle. Nach erfolgreicher Intubation wurde die Ratte in Rückenlage auf dem Operationstisch gelagert, fixiert und über ein Kleintierbeatmungsgerät ventiliert. Die dabei zugeführte Luft bestand aus einem Gemisch aus durchschnittlich zwei Litern Sauerstoff und 2,5-3,5 % Isofluran. Die durchschnittliche Atemfrequenz betrug 70 Atemzüge pro Minute mit einem Beatmungsdruck von 10-15 mmHg, der endexpiratorische CO₂-Wert 30-40 mmHg. Nach erfolgter Intubation wurde den Tieren Blut entnommen.

EUTHANASIE

Im Anschluss daran wurden die Tiere unter 2,5-3,5 %iger Isoflurannarkose durch Applikation von 200 ml NaCl Lösung exsanguiniert und die Tiere somit euthanasiert. Die Narkose und Analgesie wurden währenddessen aufrechterhalten. Sobald das EKG eine Asystolie zeigte, wurde das Tier enthauptet und die Organe entnommen. Dabei wurde immer dieselbe Reihenfolge eingehalten: Herz, Lunge, Leber und Niere. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, damit sie später für die in Kapitel 2.2.5 beschriebenen, molekularen Untersuchungen verwendet werden konnten.

2.2.3 Untersuchungen zur Wirkung von Natriumselenit auf den I/R-Schaden

Nach der erfolgreichen Etablierung des Kleintier-EKZ-Modells an der Ratte [Engels *et al.*, 2014] sowie den in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Vorversuchen zur Selensupplementation, wurden Analysen im Hinblick auf eine postulierte protektive Wirkung von Natriumselenit auf den I/R-Schaden durchgeführt. Hierfür wurden Ratten randomisiert in zwei Gruppen zu je sieben Tieren eingeteilt. Die beiden Gruppen der Hauptversuche (Kontrolle (K) und Natriumselenit (Se)) sind in Abbildung 11 hellorange hervorgehoben. Die Tiere dieser beiden Gruppen wurden nach Intubation, Anästhesieren und Kanülierung einer extrakorporalen Zirkulation mit tief hypothermem Kreislaufstillstand unterzogen (detaillierte Versuchsbeschreibung s.u.). Die Gruppen der Hauptversuche sind in Abbildung 11 hellorange dargestellt. Die Fütterung mit selenadäquatem und natriumselenitangereichertem Futter erfolgte hierbei präoperativ nach gleichem Schema wie bei den nicht behandelten Gruppen (vgl. Kapitel 2.2.2). Im Anschluss an den Versuch erfolgte die Euthanasie der Tiere unter Aufrechterhaltung der Anästhesie durch Exsanguination (detaillierte Versuchsbeschreibung s.u.). Die Organentnahme erfolgte in derselben Reihenfolge wie bei den nicht behandelten Gruppen: Herz, Lunge, Leber, Niere. Nach Entnahme wurden die Organe in physiologischer Kochsalzlösung abgespült, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

AUFBAU DER EKZ

Die hier verwendete Kleintier-Herz-Lungen-Maschine ist eine Spezialanfertigung der Firma Humbs und besteht aus folgenden Komponenten: einer Rollerpumpe, einem Membranoxygenator mit integriertem Wärmeaustauscher, sowie einem venösen Reservoir. Über ein speziell angefertigtes Schlauchsystem aus Plastik sind die einzelnen Elemente miteinander verbunden. Der Membranoxygenator besteht aus zwei runden Plexiglasscheiben. Die beiden Plexiglasscheiben umfassen eine dreischichtige

Diffusionsmembran. Durch diese Diffusionsmembran kann der Gasaustausch stattfinden. Ein über Schläuche mit dem Membranoxygenator verbundenes, temperaturgesteuertes Wasserbad ermöglicht hierbei den Wärmeaustausch. Über diese Konstruktion kann das hindurchströmende Blut je nach Bedarf gekühlt oder erwärmt werden. Die A. sacralis mediana diente im HLM-Kreislauf als arterielle Linie. Als venöse Linie der EKZ diente die rechte V. jugularis. Abbildung 12 zeigt eine schematische Darstellung aller Komponenten der Herz-Lungen-Maschine:

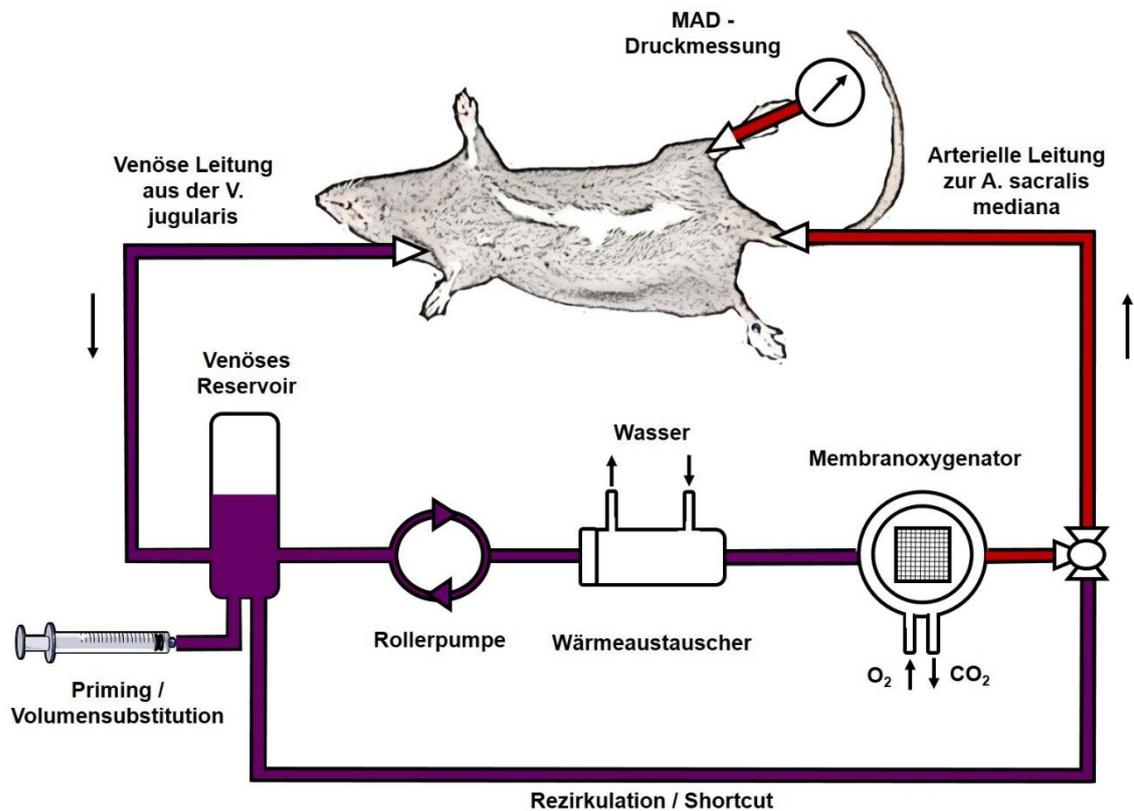


Abb. 12: Schematische Darstellung des HLM-Kreislaufs an der Ratte.

Bevor das Tier an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen werden kann, ist es notwendig, das Schlauchsystem zu entlüften. Dies geschieht durch „Auffüllen“ des Kreislaufs mit 15 ml 6%iger Hydroxyethylstärke (HAES), auch „Priming“ genannt. Dabei wird die HLM mit einer Flussrate von 10 ml / min gestartet und solange laufen gelassen, bis sich die Luft aus dem gesamten System im Reservoir gesammelt hat. Während der gesamten Operationsdauer erhielten die Tiere über das Reservoir in regelmäßigen Abständen Fentanyl-Boli (0,5 µl Fentanyl/Stunde). Somit konnte eine ausreichende Analgesie gewährleistet werden. Die Blutentnahmen erfolgten ebenfalls über das Reservoir.

VERSUCHSABLAUF

Eine Übersicht des Zeit- und Temperaturverlaufs während der Operation ist in Abbildung 13 dargestellt. An fünf definierten Zeitpunkten (T1, T2, T3, T4 und T5) wurden Blutproben entnommen und Blutgasanalysen durchgeführt:

- **T1:** Vor Anschluss an die EKZ
- **T2:** Nach 25 Minuten Kühlung
- **T3:** Bei 20 °C Wiedererwärmung
- **T4:** Bei 35 °C Wiedererwärmung
- **T5:** Nach 60 Minuten Reperfusion

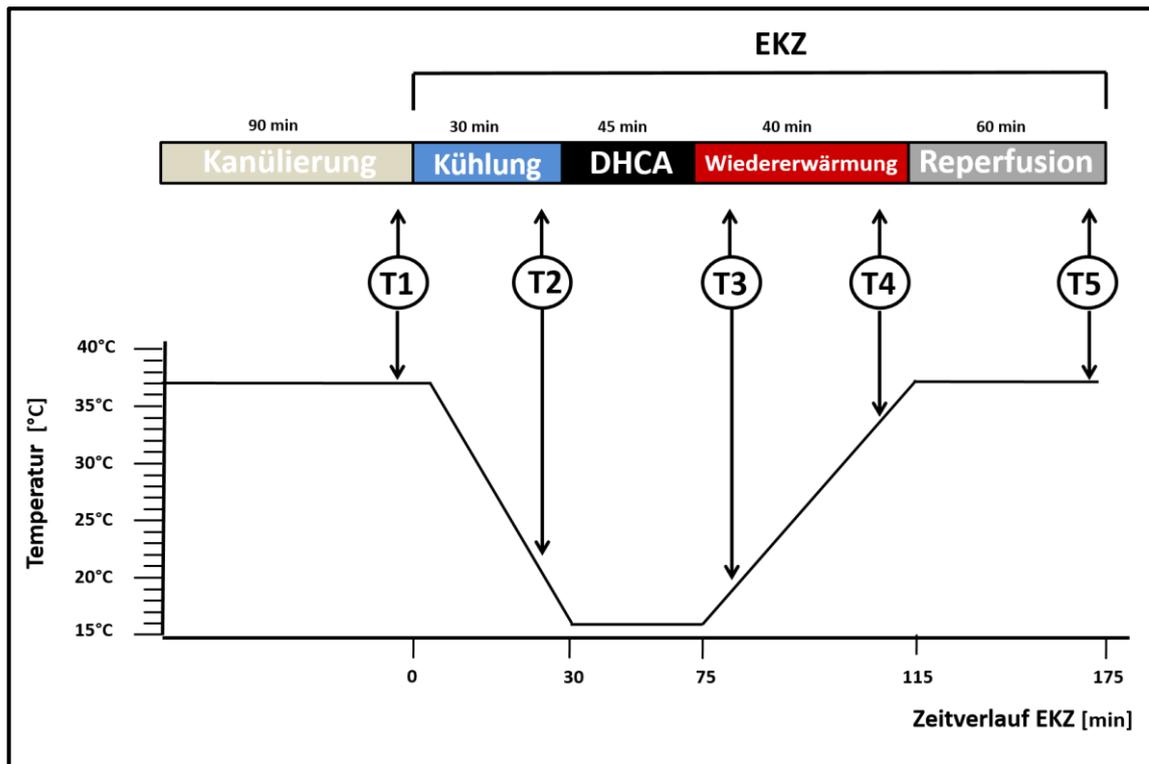


Abb. 13: Schematische Darstellung des Zeit- und Temperaturverlaufs während der Operation [modifiziert nach Engels et al, 2014]. T1 = vor Anschluss der EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 °C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 °C Wiedererwärmung, T5 = nach 60 min Reperfusion.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Versuchstieren um gesunde Tiere handelte, erfolgte vor Beginn der Operation eine klinische Untersuchung der Tiere. Futter und Wasser standen den Tieren bis zum Operationsbeginn *ad libitum* zur Verfügung.

ANÄSTHESIEEINLEITUNG UND INTUBATION

Die Anästhesieeinleitung und die Intubation der Tiere erfolgte bei den operierten Tiergruppen nach dem gleichen Schema wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Nach erfolgreicher Intubation wurde die Ratte in Rückenlage auf dem Operationstisch gelagert und über ein Kleintierbeatmungsgerät ventiliert. Die dabei zugeführte Luft bestand aus einem Gemisch aus durchschnittlich zwei Litern Sauerstoff und 2,5-3,5 % Isofluran. Die durchschnittliche Atemfrequenz betrug 70 Atemzüge pro Minute mit einem Beatmungsdruck von 10-15 mmHg, der endexpiratorische CO₂-Wert lag bei 30-40 mmHg. Im

Anschluss an die Intubation wurden die Präparationsgebiete im Bereich der V. jugularis, der A. femoralis und der A. sacralis mediana rasiert und mit Kodan desinfiziert.

PRÄPARATION UND KANÜLIERUNG

Zum Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine mussten folgende Gefäße präpariert und kanüliert werden: die auf der Ventralseite des Schwanzes gelegene A. sacralis mediana, die rechte A. femoralis sowie die auf der kaudoventralen Halsseite gelegene rechte V. jugularis. Der Ablauf war bei jeder Operation genau gleich und geschah nach folgendem Schema:

Vor Inzision erfolgte zunächst eine Hautdesinfektion. Nach dem Hautschnitt wurde das subkutane Gewebe mit einer kleinen Schere stumpf durchtrennt, bis die zu kanülierende Arterie bzw. Vene frei lag. Um einer Gefäßspastik vorzubeugen, wurde Lidocainhydrochlorid lokal auf das Gefäß appliziert. Nach kurzer Einwirkzeit wurde das Gefäß kaudal ligiert. Um den Katheter später fest mit der Gefäßwand verbinden zu können, wurde kranial eine Ligatur vorgelegt. Danach wurde die Gefäßwand mithilfe einer mikrochirurgischen Schere von oben behutsam eingeschnitten. Unter Zuhilfenahme von mikrochirurgischen Pinzetten wurde das Gefäß offengehalten und der Katheter vorsichtig eingeführt. Durch Verknoten der vorgelegten Ligatur wurde der Katheter im Gefäß fixiert. Um die Bildung von Blutgerinnseln zu verhindern, wurden die Katheter vorher mit Heparin gespült.

Die A. sacralis mediana diente im HLM-Kreislauf als arterielle Linie. Als venöse Linie der EKZ diente die rechte V. jugularis. Die A. femoralis hingegen diente der invasiven Blutdruckmessung. Da die drei Gefäße mit unterschiedlichen Kathetern kanüliert wurden, werden diese im Einzelnen nochmals erläutert:

Eine 20-Gauge-Venenverweilkanüle diente bei der Kanülierung der A. sacralis mediana als Katheter. Im Anschluss an die Kanülierung der A. sacralis mediana, wurden über diesen Zugang Heparin (400 IE pro kg Körpergewicht) appliziert. Somit konnte eine ausreichende Heparinisierung des Tieres gewährleistet werden.

Um den mittleren arteriellen Druck (MAD) zu überwachen, wurde die A. femoralis mit einem angespitzten Polyethylenkatheter katheterisiert. An diesen Katheter wurde ein Druckdom angeschlossen und der MAD gemessen.

Zur Kanülierung der V. jugularis wurde ein mehrfach perforierter Katheter verwendet. Dieser wurde bis in den rechten Vorhof vorgeschoben. Da sowohl die rechte hintere als auch die bei Ratten paarig angelegte linke und rechte vordere Hohlvene in den rechten Vorhof drainieren, konnte somit eine vollständige Drainage des gesamten venösen Systems sichergestellt werden. Sowohl der Katheter für die A. femoralis als auch der Katheter für die V. jugularis waren Spezialanfertigungen der Firma Humbs.

MONITORING

Um eine exakte Durchführung des Versuchsprotokolls zu gewährleisten, war das Monitoring der Tiere während der Operation von entscheidender Bedeutung. Zur exakten Einstellung der Temperatur während der hypothermen Ischämiephase, der Wiedererwärmungsphase und der anschließenden normothermen Reperfusionphase, wurde die Temperatur während der gesamten Operation mittels einer rektal eingeführten Temperatursonde kontrolliert.

Um die Herzaktivität zu überwachen, wurden die Tiere an ein Elektrokardiogramm angeschlossen. Zur Kontrolle der endexpiratorischen Gaskonzentrationen von O₂ und CO₂ diente der Capnomac Ultima®.

Über einen Pulsoxymeter-Clip an einer Pfote des Tieres wurde die periphere Sauerstoffsättigung gemessen.

Ein besonderes Augenmerk lag während der Operation auf dem MAD. Der in der A. femoralis liegende Katheter wurde über einen Druckdom an einen Monitor angeschlossen. Dadurch konnte der mittlere arterielle Druck (MAD) gemessen werden. Bei einem MAD von unter 40 mmHg ist eine ausreichende Perfusion der Organe nicht mehr gewährleistet. Daher wurde dem Tier bei Bedarf in physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol®, 0,02 mg/ml) verabreicht, um den MAD anzuheben. An den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4, und T5 wurden Blutproben (vgl. Kapitel 2.2.2) entnommen und Blutgasanalysen durchgeführt. Folgende Werte wurden bei der Blutgasanalyse bestimmt:

- pH
- pCO₂ (mmHg)
- pO₂ (mmHg)
- Hb (g/dl)
- SaO₂ (%)
- HCO_s (mmol/L)
- BE (mmol/L)

Bei Bedarf konnten auch weitere Blutgasanalysen durchgeführt werden.

Der Säure-/Basen-Haushalt konnte durch verschiedene Gegenregulationsmechanismen korrigiert werden: Der Ausgleich einer metabolischen Azidose erfolgte entweder durch respiratorische Kompensation über eine gesteigerte Ventilation bei einem pCO₂ über 40 mmHg oder, bei physiologischem pCO₂ durch die Applikation von 8,4%iger Natriumbikarbonat-Lösung (NaBiC) nach der Formel Bikarbonat = -BE x 0,3 x kg KG. Analog dazu wurde bei einer metabolischen Alkalose die Ventilation verringert. Eine respiratorische Azidose (CO₂>40 mmHg, pH<7,4) wurde durch eine gesteigerte Ventilation oder die Gabe von 0,5 ml Trometamol (TRIS 36,34 %) ausgeglichen. Bei einer respiratorischen Alkalose wurde CO₂ über den Oxygenator gegeben.

Im Falle eines Hb-Abfalls konnte Blut aus der HLM aufbereitet werden. Das Blut wurde aus dem Reservoir der HLM genommen und bei 1000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert. Das auf diese Weise gewonnene Erythrozytenkonzentrat wurde mit 6% HAES und Calciumgluconat versetzt und über das Reservoir in die HLM retransfundierte.

Des Weiteren wurden zu diesen fünf Zeitpunkten hämodynamische und Vital-Parameter dokumentiert. Hierzu gehörten:

- Herzfrequenz (/min)
- MAD (mmHg)
- O₂-Sättigung (%)
- Temperatur rektal (°C)
- Isofluran (Vol. %)
- O₂ (L / min)
- CO₂ (Vol. %)
- Beatmungsfrequenz (/min)
- Beatmungsdruck (mmHg)

BEGINN DER EKZ

Um das Tier an die Herz-Lungen-Maschine anzuschließen, wurde der Katheter der A. sacralis mediana mit der arteriellen Linie verbunden und der Katheter in der V. jugularis an die venöse Linie angeschlossen. Exakt neunzig Minuten nach Kanülierung der A. sacralis mediana wurde sowohl die arterielle als auch die venöse Linie über Dreiwegehähne geöffnet und die EKZ gestartet. Um das physiologische Herzzeitvolumen einer Ratte zu imitieren wurde initial eine Blutflussrate von 160 bis 180 ml/kg/min eingestellt.

Durch den Start der EKZ floss das Blut aus dem rechten Vorhof über die venöse Linie in das Reservoir. Vom Reservoir aus gelangte das Blut über eine Rollerpumpe in den Membranoxygenator. Dort erfolgte über die Diffusionsmembran eine Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und Isofluran. Das derart oxygenierte Blut gelangte von dem Membranoxygenator aus über die arterielle Linie und die A. sacralis mediana zurück ins Tier. Dadurch entstand ein geschlossener Kreislauf.

KÜHLUNG

Sobald das Tier an der Herz-Lungen-Maschine kreislaufstabil war, begann die Kühlungsphase. Währenddessen wurde die Anästhesie auf 2,0 % Isofluran runterreguliert und die Atemfrequenz von 70 auf 10 Atemzüge pro Minute runtergestellt. Ein positiver endexpiratorischer Beatmungsdruck von 5mmHg und ein FiO₂ von 0,21 dienten der Prävention von Lungenatelektasen. Ziel während der Kühlung war es, das Tier innerhalb von 30 Minuten nach einem reproduzierbaren Schema auf eine rektale Körpertemperatur von 16°C herunterzukühlen. Dabei wurde das Tier auf zwei verschiedenen Wegen gekühlt: indirekt über den Wärmeaustauscher mit temperaturgesteuertem Wasserbad und direkt durch die externe Applikation von Eis. Synchron zur Kühlung des Tieres wurde ebenfalls die Blutflussrate verringert. Tabelle 10 zeigt ein Schema zur Temperatur- und Blutflussregulierung während der Kühlungsphase der EKZ:

Tabelle 10: Temperatur- und Blutflussregulierung während der Kühlungsphase der EKZ am Beispiel einer 500g schweren Ratte:

Zeitpunkt (Minute)	Temperatur (°C)	Blutflussrate (ml / min)
0	35	79
10	28	79
15	25	64
20	22	64
25	19	50
30	16	50

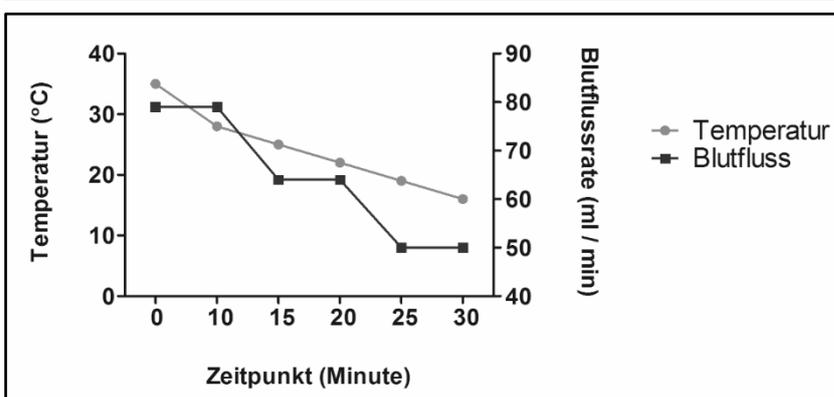


Abb. 14:
Schema der Temperatur- und Blutflussregulierung während der Kühlungsphase der EKZ am Beispiel einer 500g schweren Ratte.

Von entscheidender Bedeutung für die Regulierung der Blutflussrate war das Gewicht der Tiere. An dieses wurde das Schema vor Operationsbeginn angepasst und die Blutflussrate entsprechend heruntergefahren. Um eine ausreichende Analgesie zu gewährleisten wurde den Tieren nach wie vor stündlich 5µg Fentanyl i.v. verabreicht. In Ergänzung dazu erhielten die Tiere zur Muskelrelaxierung Zisatrakurium (Nimbex®; 0,8 mg/h) über das Reservoir.

TIEF HYPOTHERMER KREISLAUFTILLSTAND (DHCA)

An die Kühlungsphase schloß sich ein 45-minütiger, hypothermer Kreislaufstillstand an:

In dem Augenblick, da nach 30 Minuten Kühlung eine rektale Körpertemperatur von 16 °C erreicht worden war, wurde die Herz-Lungen-Maschine ausgeschaltet. Kardioplegische Substanzen wurden nicht benötigt: die tiefe, unphysiologische Körpertemperatur war ausreichend, um ein Sistieren des Herzschlags zu erreichen. Kennzeichnend für einen tief hypothermen Kreislaufstillstand war neben der Asystolie auch ein MAD von Null. Unterdessen wurde die arterielle Linie geschlossen, die venöse Linie jedoch offengelassen. Dadurch wurde das Tier passiv in das venöse Reservoir entblutet und somit das Herz des Tieres entlastet. Sobald der Blutspiegel im Reservoir aufhörte zu steigen, wurde auch die venöse Linie geschlossen. Ein Shortcut zwischen venöser und arterieller Linie wurde geöffnet und die Herz-Lungen-Maschine auf eine Blutflussrate von 10 ml/min eingestellt. Die Zirkulation des Blutes sollte eine Thrombenbildung in den zu Beginn des Versuchs heparinisierten Schläuchen verhindern. Um das Herz weiterhin zu entlasten wurde während des DHCA in Abständen von 10 Minuten der Shortcut geschlossen, die venöse Linie geöffnet und das Tier in das Reservoir entblutet. Dadurch konnte einer Herzdilatation entgegengewirkt und ein Blutrückstau verhindert werden.

Durch die externe Applikation von Eis mit Hilfe von Handschuhen, die mit Eis befüllt wurden, wurde auch während des Kreislaufstillstands die rektale Körpertemperatur bei 16 °C gehalten.

Sowohl Anästhesie als auch Beatmung wurden während der 45 Minuten Kreislaufstillstand unterbrochen.

WIEDERERWÄRMUNG

An den Kreislaufstillstand schloss sich eine 40-minütige Wiedererwärmungsphase des Tieres an. Innerhalb dieser Zeit wurde das Tier nach einem festgelegten Schema wieder auf eine rektale Körpertemperatur von 35,5 °C gebracht:

Die Narkose wurde mit 2,0 % Isofluran wiederaufgenommen. Wie in der Kühlungsphase wurde die Beatmung mit einer Atemfrequenz von 10 Atemzügen pro Minute wiederaufgenommen. Der positive endexpiratorische Beatmungsdruck von 5mmHg und ein FiO₂ von 0,21 wurden ebenfalls erneut eingestellt. War dies geschehen, konnte mit der Wiedererwärmung begonnen werden. Die mit einer Blutflussrate von 10 ml/min laufende Herz-Lungen-Maschine wurde ausgestellt, der Shortcut geschlossen und sowohl die arterielle als auch die venöse Linie zum Tier hin geöffnet. War dies geschehen, so konnte die HLM langsam wieder gestartet werden.

Unter Zuhilfenahme des temperaturgesteuerten Wasserbades sowie einer Infrarotlampe wurde das Tier an der EKZ innerhalb von 40 Minuten auf eine rektale Körpertemperatur von 35,5 °C wiedererwärmt. Zur Analgesie wurden weiterhin stündlich 5µg Fentanyl-Boli sowie Zisatrakurium (Nimbex®; 0,8 mg/h) zur Muskelrelaxierung über das Reservoir verabreicht. Unterdessen wurden hämodynamische und Vitalparameter kontrolliert und dokumentiert sowie regelmäßig und bei Bedarf Blutgasanalysen durchgeführt.

Analog zur Kühlungsphase erfolgte die Regulierung der Blutflussrate und der Temperatur auch während der Wiedererwärmungsphase nach einem bestimmten Schema. Ziel war es dabei, nach den 40 Minuten Wiedererwärmung den Ausgangswert der Blutflussrate von 160 bis 180 ml/kg/min zu erreichen. Auch hier wurde das Schema individuell an das jeweilige Gewicht der Tiere angepasst. Tabelle 11 zeigt ein Schema zur Temperatur- und Blutflussregulierung während der Kühlungsphase der EKZ. Das Schema zur Temperatur- und Blutflussregulierung am Beispiel einer 500g schweren Ratte ist in Abbildung 15 dargestellt:

Tabelle 11: Temperatur- und Blutflussregulierung während der Wiedererwärmungsphase der EKZ am Beispiel einer 500g schweren Ratte:

Zeitpunkt (Minute)	Temperatur (°C)	Blutflussrate (ml / min)
0	16	50
10	21	57
15	24	57
20	27,5	57
25	30	57
30	32	71
40	35,5	71

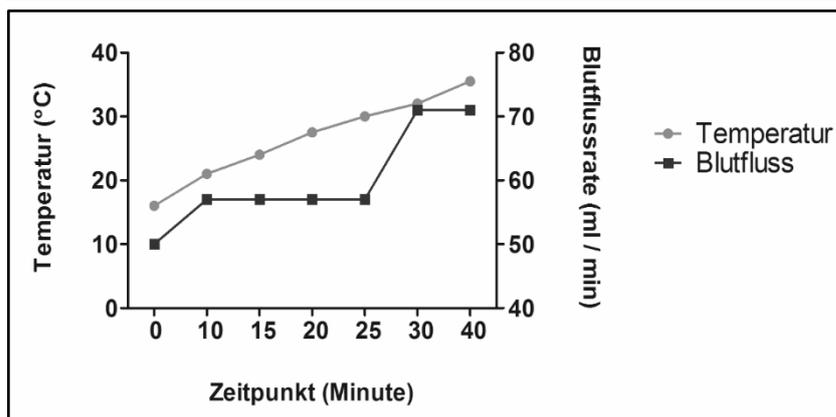


Abb. 15: Schema der Temperatur- und Blutflussregulierung während der Wiedererwärmungsphase der EKZ am Beispiel einer 500g schweren Ratte.

Durch die ansteigende Körpertemperatur im Verlauf der Wiedererwärmung setzte die Herzaktivität eigenständig ohne weitere zusätzliche Maßnahmen wieder ein: mit steigender Temperatur war im EKG zunächst Kammerflimmern und -flattern zu sehen. Nach vereinzelt Herzaktionen mit verbreiterten QRS-Komplexen folgte dann der Übergang in den Sinusrhythmus.

REPERFUSION

Im Anschluss an die Wiedererwärmung erfolgte eine 60-minütige Reperfusionphase. Alle 15 Minuten wurden hierbei Blutgasanalysen zur Kontrolle des Säure-/Basen-Haushalts durchgeführt. Durch die unter Monitoring beschriebenen Gegenmaßnahmen konnte dieser bei Bedarf korrigiert werden. Des Weiteren wurde, wie unter Monitoring beschrieben, auf den MAD geachtet, damit eine ausreichende Perfusion der Organe sichergestellt werden konnte.

EUTHANASIE

Unter 2,5-3,5 %iger Isoflurannarkose wurde das Tier nach Beendigung der Operation euthanasiert. Dazu wurden über den arteriellen Zugang an der A. sacralis mediana 200ml isotone Kochsalzlösung verabreicht. Diese konnten über den venösen Zugang an der V. jugularis abfließen und führten somit zur Exsanguination des Tieres.

Sobald das EKG eine Asystolie zeigte und der MAD Null betrug, wurde das Tier enthauptet und die Organe entnommen. Dabei wurde immer dieselbe Reihenfolge eingehalten: Herz, Lunge, Leber und Niere. Unmittelbar nach der Entnahme wurden die Organe in physiologischer Kochsalzlösung abgespült und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Auf Grund des oben beschriebenen sehr aufwändigen und technisch höchst anspruchsvollen Versuchsaufbaus, welcher die ständige Anwesenheit von zwei Personen erfordert, wurden sämtliche Tiere in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. vet. Melanie Engels operiert. Da es sich bei den Experimenten nicht nur um sehr komplexe, Ressourcen- und Zeitaufwendige, sondern auch für die Tiere stark belastende Versuche handelt, wurden in der Dissertation von Frau Dr. med. vet. Melanie Engels [Engels, 2013] und der hier vorliegenden Arbeit dieselben Tiere als Kontrollgruppe (K) verwendet. Somit sind die im Verlauf der EKZ erhobenen Hämodynamischen- und Vitalparameter, Blutgase sowie die Plasma- und Serumparameter der Kontrollgruppe in beiden Arbeiten identisch, an der Erhebung dieser Daten waren beide Autoren jedoch gleichermaßen beteiligt. Da die Arbeit von Frau Dr. med. vet. Engels jedoch früher erschienen ist als die hier vorliegende Arbeit, werden in der hier vorliegenden Arbeit diejenigen Daten, die sich in beiden Arbeiten überschneiden durch ein Zitat gekennzeichnet. Zu diesen Daten gehören:

- Hämodynamische- und Vitalparameter
- Blutbild (z.B. Leukozyten, Hkt, Hb)
- Blutgase
- Plasma- und Serumparameter (z.B. ALT, AST, LDH, Troponin, ...)
- IL-6- und TNF α -Serumspiegel

Die Herstellung der in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Gewebelysate wurde gemeinsam mit Frau Dr. med. vet. Engels [Engels, 2013] durchgeführt, da für die unterschiedlichen Versuche in beiden Doktorarbeiten dieselben Gewebelysate verwendet werden sollten, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Arbeiten zu erreichen.

Alle anderen Versuche sowie alle Experimente an Tieren der Therapiegruppen (NB, NBSe und Se) wurden nur im Hinblick auf die hier vorliegende Arbeit durchgeführt und ausgewertet und werden somit nicht durch ein Zitat gekennzeichnet.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinbestimmung von Gewebelysaten

Zunächst wurde aus den entnommenen Organen Organpulver hergestellt. Dafür wurden die Organe unter Verwendung von Flüssigstickstoff gemörsert. Jeweils 50µg Organpulver wurde in Eppendorftubes abgewogen, mit 700µl Lysepuffer versetzt und 15 Minuten lang geschüttelt. Darauf folgten 15 Sekunden Ultraschall, um das Gemisch zu homogenisieren. Danach wurden die Eppendorftubes für 15 Minuten bei 14.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und anschließend der Überstand (das Proteinlysate) vom Pellet abpipettiert.

Tabelle 12: Präparation des Lysepuffers (Stocklösung)

Substanz	Volumen
ProteoJET Mammalian Cell lysis reagent (Fermentas)	10 ml
Proteaseinhibitor	40 µl
Phosphataseinhibitor I	10 µl
Phosphataseinhibitor II	10 µl

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Gewebelysaten wurde der DC Protein Assay (BioRad) verwendet. Dabei wird 1ml Reagenz A mit 20µl Reagenz S gemischt. Somit erhält man Reagenz A'. Von dem Reagenz A' wurden 100µl mit 20µl der unbekannt Probe (Lysat, Lysis-Puffer, oder Verdünnung) in eine Einmalküvette pipettiert und eine Minute lang inkubiert. Danach wurden 800µl Reagenz B hinzugefügt, weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend, nach Kalibrierung des Photometers gegen einen Leerwert (Lysis-Puffer), die optische Dichte bei 750nm gemessen.

Eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin (BSA) diente als Proteinstandardkurve (Tabelle 12) und wurde parallel zu den Proben bestimmt.

Tabelle 13: Standardkurve zur BioRad Proteinkonzentrationsbestimmung

Konzentration (mg / ml)	BSA (10 mg / ml)	Lysis-Puffer
2	200 µl	800 µl
Konzentration (mg / ml)	BSA (2 mg / ml)	Lysis-Puffer
1,6	160 µl	40 µl
1,2	120 µl	80 µl
0,8	80 µl	120 µl
0,4	40 µl	160 µl
0	-	200 µl

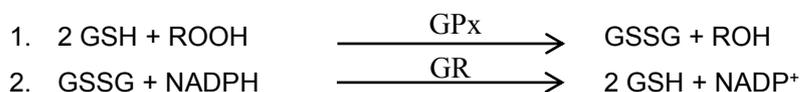
BSA = Rinderserumalbumin

2.2.4.2 Bestimmung der GPx-Aktivität im Gewebe

Zur Bestimmung der GPx-Aktivität in den Gewebelysaten wurde ein gekoppelter optischer Test verwendet (Muller *et al.*, 1984):

Ziel dieses gekoppelten optischen Tests ist es, die enzymatische Aktivität der Glutathion-abhängigen Glutathion-Peroxidase (GPx) zu bestimmen. Diese katalysiert die Reduktion von Hydroperoxiden unter Umsetzung von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) (s. 1.

Reaktionsgleichung). Bei der Regeneration von GSSG zu GSH hingegen, die durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GR) katalysiert wird, wird NADPH zu NADP⁺ oxidiert (s. 2. Reaktionsgleichung). Der NADPH-Verbrauch während der zweiten Reaktion wird photometrisch bestimmt und aus den Werten mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die enzymatische Aktivität der Glutathionperoxidase berechnet (Florian *et al.*, 2010). Die beiden zugrundeliegenden Reaktionsgleichungen sind unten aufgeführt:



Für die Durchführung des GPx-Assays wurden in eine Quarzküvette 830µl Assay-Puffer, 100µl GSR/GSH, 50µl NADPH (2,5µM) und, abhängig vom Gewebe, 10- 40µl Lysat pipettiert (Herz: 40µl, Leber: 10µl, Lunge: 40µl, Niere: 20µl). Um die Reaktion zu starten, wurden 10µl *tert*-Butylhydroperoxid (5mM) hinzugefügt und mit einem Plastikspatel durchmischt. Mit Hilfe eines Perkin Elmer Lambda 25 Spektrometers wurde dann, durch eine Messung der Abnahme der Absorption bei 340nm, der Verbrauch von NADPH bestimmt. Jede Messung dauerte 240 Sekunden. Als Basalwert diente ein Blank ohne Zugabe von Lysat. Dieser wurde von den übrigen Messergebnissen subtrahiert. Anhand der Proteinkonzentration des Lysats wurde die spezifische GPx-Aktivität (in mU/mg Protein) errechnet.

Tabelle 14: GPx Assay

GPx Assaypuffer		GSR/GSH Stocklösung	
Substanz	Konzentration	Substanz	Menge
Tris	100 mM	GSH	45 mg
EDTA	5 mM	GSR	33,2 µl
NaN ₃	1 mM	Assay-Puffer	5 ml
Triton – X 100	0,1 % (v/v)		

NADP⁺=Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, GR=Glutathion-Reduktase, GSH=reduziertes Glutathion, GSSG=Glutathiondisulfid, ROH=organische Hydroperoxide

2.2.4.3 Bestimmung des Selengehalts im Gewebe

Die Bestimmung des Selengehalts der Gewebe erfolgte in Anlehnung an das von Sheehan und Mitarbeitern etablierte Modell [Sheehan *et al.*, 1990]:

Zu Beginn wurden Lysate aus 50mg Organpulver, 100µl M-PER Mammalian Cell Lysis Reagent und 100µl Triton-X 0,1% hergestellt. Anschließend wurden 100µl der Lysate in Reagenzgläser gegeben und 500µl einer Säuremischung (in einem 3:2 Verhältnis: HNO₃ 65% und HClO₄ 70%) hinzugefügt. Der so entstandene Ansatz wurde für 90 Minuten auf 190°C erhitzt. Nach anschließendem Abkühlen der Reagenzgläser und der Zugabe von 500µl konzentrierter HCl wurde der Ansatz bei 150°C für weitere 30 Minuten erhitzt. Dies führte dazu, dass entstandene Nitroverbindungen zersetzt wurden. Nach 30 Minuten wurden die Reagenzgläser erneut abgekühlt und in jedes 2ml EDTA (2,5mM pH 8,0), 500µl 2,3-Diaminonaphthalin (DAN; 6,3 mM in 0,2 M HCl) und 3ml Cyclohexan gegeben. Die Reagenzgläser wurden verschraubt und 30 Minuten lang bei 60°C erhitzt. Für weitere 15 Minuten wurden die Reagenzgläser geschüttelt und dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Die durch diesen Vorgang entstandene Cyclohexanphase wurde in Eppendorftubes pipettiert und mit Hilfe einer Quarzküvette die Fluoreszenz des gebildeten Se-DAN bestimmt. Zu diesem Zweck wurde ein Emissionsspektrum von

490-580nm Wellenlänge bei 366nm Anregungswelle aufgenommen. Der Selengehalt der Probe wurde mit Hilfe einer Kalibriergeraden aus Selenitstandards aus den Emissionsmaxima bei 520nm bestimmt.

2.2.4.4 Blutanalysen

An den fünf, in Kapitel 2.2.3, definierten Zeitpunkten (T1, T2, T3, T4, und T5) wurden Blutgasanalysen durchgeführt und Blutproben entnommen. Beides erfolgte entweder über den arteriellen Zugang an der A. sacralis mediana (T1) oder über die arterielle Linie an der HLM (T2, T3, T4 und T5). Zur Auswertung der arteriellen Blutgase diente ein Blutgasanalysegerät (ABL 510 Radiometer, Willich). Hiermit wurde der Blut pH-Wert, die Partialdrücke von CO₂ und O₂ [mmHg], Hämoglobin (Hb) [g/dl], die Sauerstoffsättigung [%], der Bikarbonat-Gehalt [mmol/L] sowie der Base-Excess (BE) [mmol/L] bestimmt. Mithilfe des ABC Animal Blood Counter (scil animal care, Viernheim) konnte aus dem abgenommenen Blut ein Blutbild angefertigt werden und somit die Hämoglobin-Konzentration [g/dl], der Hämatokrit-Wert (Hkt) [%], die Zahl der Erythrozyten (RBC) [$\times 10^3/\text{mm}^3$], die absolute Leukozytenzahl (WBC) [$\times 10^3/\text{mm}^3$] sowie die Zahl der Thrombozyten (PLT) [$\times 10^3/\text{mm}^3$] bestimmt werden. Zusätzlich wurden aus den zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5 entnommenen Blutproben wie oben beschrieben Plasma und Serum gewonnen und diese Proben zur weiteren Analyse ebenfalls an die Firma LABOKLIN (Bad Kissingen) versendet. Dort wurden aus den Proben die folgenden Werte bestimmt:

- Alanin-Aminotransferase (ALT)
- Aspartat-Amino-Transferase (AST)
- Calcium (Ca²⁺)
- Creatin- Kinase (CK)
- MB- Isoform der Creatin-Kinase (CK-MB)
- Harnstoff
- Kalium (K⁺)
- Kreatinin
- Laktat
- Troponin I

Die Werte von Troponin I-, CK- und CK-MB wurden mittels ELISA nach Angaben des Herstellers bestimmt (Troponin I: Antibody-online, Produktnummer ABIN 579682; CK- und CK-MB: My Biosource, Produktnummer MBS 705376). Alle weiteren Parameter wurden spektrophotometrisch nach standardisierter Roche-Hitachi-Methodik (Roche Diagnostics, Mannheim) analysiert.

2.2.4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western Blot

SDS-PAGE

Um die Proteine in den gewonnenen Gewebelysaten (s. Kapitel 2.2.4.1) entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen, wurde die SDS-Polyacrylamidelektrophorese verwendet. SDS-PAGE-Gele wurden nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 15: SDS-PAGE Gele

Sammelgel		Trenngel		
Substanz	Menge	Substanz	Menge 10% Gel	Menge 15% Gel
Wasser	3,53 ml	Wasser	4,8 ml	3,55 ml
Rotiphorese Gel 40	700 µl	Rotiphorese Gel 40	2,5 ml	3,75 ml
1 M Tris pH 6,8	650 µl	1 M Tris pH 6,8	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	50 µl	10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	50 µl	10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl	4 µl

Tris=Tromethatim, SDS=sodium dodecyl sulfate, APS=Ammoniumpersulfat, TEMED= Tetramethylethylen-diamin

Zunächst wurde das Trenngel in eine Gelkassette gegossen. Sobald das Trenngel polymerisiert war, wurde das Sammelgel hinzugegeben. Für die Protein-Gelelektrophorese wurden 10 bis 20µl Lysat mit 4x Laemmli-Puffer versetzt, für 5 Minuten auf 92°C erhitzt und zusammen mit Pageruler, einem vorgefärbten Protein-Molekulargewichtsmarker, auf das Gel aufgetragen. Bei konstantem Strom (Sammelgel: 0,02 Ampère/Gel; Trenngel: 0,04 Ampère/Gel) wurden die Proteine dann in einer X-Cell-II-Elektrophorese-Kammer, ihrem Molekulargewicht entsprechend, aufgetrennt.

ELEKTROTRANSFER UND IMMUNDETEKTION

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran transferiert. Blotting-Papier (Whatman) und Membran wurden auf Gelgröße zugeschnitten. Je ein Whatman-Papier wurde in Anode-I- und Anode-II-Puffer äquilibriert, das SDS-Gel sowie zwei weitere Whatman-Papiere in Kathoden-Puffer. Die Membran wurde ebenfalls in Anode-II-Puffer äquilibriert. Der Elektrotransfer erfolgte mittels einer Semi-Dry-Blotapparatur durch Anlegen von 1,5mA/cm² für 90 Minuten. Auf die Anode des Blotters wurden zwei Whatman-Papiere gelegt, darauf die Membran, dann das SDS-Gel und anschließend die beiden Kathoden-Whatman-Papiere. Nach 90 Minuten Transfer wurde mithilfe einer Ponceau S-Lösung die Übertragung der Proteine auf die Membran überprüft. Das Ponceau S wurde im Anschluss mittels TBST abgewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen bei Raumtemperatur eine Stunde lang in Blockierlösung (5% Milchpulver in 1 x TBST) inkubiert. Über Nacht wurde die Membran unter ständiger Bewegung bei 4 °C mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1: 1000 in Blockierlösung) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 15 Minuten lang in TBST gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (Verdünnung 1: 5000 in Blockierlösung) eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 3 x 15 Minuten lang in TBST gewaschen. Mithilfe des Super Signal Chemilumineszenz – Systems erfolgte die Detektion der Proteine. Dafür wurde die Membran mit SuperSignal West Pico oder Femto Chemilumineszenz Substraten 5 Minuten inkubiert. Unter Dunkelraumbedingungen wurde die Membran mit einem lichtsensitiven Chemilumineszenz Film belegt. Nach Entwicklung wurden die untersuchten Proteine (HO-1, HSP-70, STAT3 und ERK 1/2) auf dem Film durch emittierte Lichtquanten als Schwärzung sichtbar.

2.2.4.6 Interleukin-6 ELISA

IL-6-SERUMSPIEGEL

Um die Serumspiegel von IL-6 zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5 zu bestimmen, wurde ein Sandwich-ELISA der Firma DIACLONE verwendet. Zu Beginn wurde in die durchsichtige 96-well-Platte jeweils 100µl der Probe (Blank, Negativkontrolle oder Serum) vorgelegt. 50µl Biotin-Konjugat wurden hinzugefügt und der Ansatz für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden in jedes well 100µl Streptavidin-HRP pipettiert, für eine weitere Stunde inkubiert und jeweils 100µl TMB-Substrat hinzugefügt. Nach 20 Minuten Inkubation wurde die Reaktion mit 100µl Phosphorsäure (1M) gestoppt und die Absorption des Produktes bei einer Wellenlänge von 450nm mit Hilfe des *Power Wave X Microplate-readers* gemessen. Die Standardkurve reichte von 31,25 bis 1000ng/ml IL-6.

IL-6 IM GEWEBE

Die Quantifizierung von IL-6 im Gewebe erfolgte ebenfalls mithilfe des oben beschriebenen ELISA nach Angaben des Herstellers. Untersucht wurden hierbei Gewebe von Herz, Leber, Lunge und Niere. Die Absorption des Produkts wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe des *Power Wave X Microplate-readers* gemessen. Die Standardkurve reichte von 125 bis 2000ng/ml IL-6.

2.2.4.7 Tumornekrosefaktor- α ELISA

TNF- α -SERUMSPIEGEL

Um die Serumspiegel von TNF- α zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5 zu bestimmen, wurde ein Sandwich-ELISA der Firma DIACLONE verwendet. Zu Beginn wurde in die durchsichtige 96-well-Platte jeweils 100µl der Probe (Blank, Negativkontrolle oder Lysat) vorgelegt. 50µl Biotin-Konjugat wurde hinzugefügt und der Ansatz für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden in jedes well 100µl Streptavidin-HRP pipettiert, für weitere 30 Minuten inkubiert und jeweils 100µl Tetramethylbenzidin (TMB)-Substrat hinzugefügt. Nach 20 Minuten Inkubation wurde die Reaktion mit 100µl Phosphorsäure (1M) gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450nm mit dem *Power Wave X Microplate-reader* gemessen. Anhand der Standardkurve von 25 bis 500ng/ml TNF- α wurden die Zytokin-Werte kalkuliert.

TNF- α IM GEWEBE

Die Quantifizierung von TNF- α in den Geweben von Herz, Leber, Lunge und Niere erfolgte ebenfalls mithilfe des oben erwähnten ELISA nach Angaben des Herstellers aus Gewebe-Lysaten. Bei einer Wellenlänge von 450nm wurde die Absorption mit dem *Power Wave X Microplate-reader* gemessen. Die Standardkurve reichte von 31,25 bis 1000ng/ml TNF- α .

2.2.4.8 Caspase 3/7-Aktivitätsassay

Mittels eines Chemilumineszenz-Assays der Firma PROMEGA wurde die Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 im Gewebe bestimmt. Dafür wurden in eine weiße 96-well-Platte jeweils 100µl der Probe (Blank, Negativkontrolle oder Lysat) vorgelegt, mit 50µl Reagenz (Caspase-Glo 3/7 Puffer und Caspase-Glo 3/7 Z-DEVD-Aminoluciferin Substrat; Verhältnis: 1:1) versetzt und für 60 bis 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Chemilumineszenz mit dem *Power Wave X Microplate-reader* bei 450nm gemessen. Diese ist proportional zur Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7.

2.2.4.9 AKT-ELISA

Um die Phosphorylierung der AKT am Serinrest quantifizieren zu können wurde ein Sandwich-ELISA verwendet. Jeweils 50µl der Probe (Blank, Negativkontrolle oder Lysat) wurden in eine weiße 96-well-Platte vorgelegt, mit 50µl des AKT-Antikörpers (Ser473) versetzt und bei Raumtemperatur 60 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden in jedes *well* 100µl TMB-Substrat pipettiert. Nach 15 Minuten Inkubation wurde die Reaktion mit 100µl der stop-Solution gestoppt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450nm mit dem *Power Wave X Mircoplate-reader* gemessen.

2.2.4.10 PARP-Aktivitätsassay

Ein Sandwich-ELISA diente der Bestimmung der PARP-Aktivität in den Gewebelysaten. Jeweils 25µl Probe wurde in die *wells* einer 96-well-Platte pipettiert. Dabei wurden die Gewebe-Lysate mithilfe von PARP-Puffer so vorverdünnt, dass die Proben von Leber und Niere jeweils 10µg und die Herz- und Lungen-Proben 20µg Protein enthielten. Den Proben wurde das PARP-Enzym hinzugefügt (0.5 Units/well) und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden in jedes *well* 25µl PARP Cocktail hinzugefügt und der Ansatz für weitere 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden jeweils 50µl Streptavidin-HRP beigegeben, erneut 60 Minuten inkubiert und 50µl vorgewärmtes TACS-SAPPHIRE kolorimetrisches Substrat hinzugefügt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation wurde die Reaktion mit 50µl HCl (0,2M) gestoppt und die Absorption bei 450nm mit dem *Power Wave X Mircoplate-reader* gemessen.

2.2.4.11 Statistische Auswertung

Mit Hilfe des Computerprogramms GraphPad Prism erfolgte die statistische Auswertung der physiologischen und hämodynamischen Parameter, die zu den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4, T5 dokumentiert worden waren. Auch die Auswertung der Blutwerte, der pro-inflammatorischen Zytokine sowie der ELISA erfolgte mittels GraphPad Prism. Alle erhobenen Parameter sind als Mittelwert ± Standardfehler (S.E.M.) angegeben. Mittels der zweifachen Varianzanalyse ANOVA und dem post-Bonferroni-Test erfolgte ein Vergleich der Zeitpunkte untereinander. Die einfache Varianzanalyse ANOVA und der post-Tukey-Test wurde verwendet, um die Gruppen zeitunabhängig miteinander zu vergleichen. Ein *p*-Wert <0,05 zeigt statistisch signifikante Unterschiede an.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche zur Supplementierung mit Natriumselenit

Um zu untersuchen, ob die Supplementation mit Natriumselenit einen Effekt auf den Selengehalt in ausgewählten Organen der Tiere hat und damit den Erfolg der Selen-Supplementierung zu beurteilen, wurden gesunde Tiere, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, in zwei Gruppen geteilt: Beide Gruppen wurden keiner EKZ unterzogen. Die nicht behandelte Kontroll-Gruppe (NB) erhielt selenadäquates Futter (0,3ppm Selen), die nicht behandelte Natriumselenit-Gruppe (NBSe) fünf Wochen natriumselenithaltiges Futter (1ppm Selen). Analog zu den Tieren der EKZ-Gruppe wurden die Tiere anästhesiert und im Anschluss euthanasiert, jedoch nicht an die EKZ angeschlossen.

3.1.1 Erhöhte Glutathionperoxidase – Aktivität in den Organen der nicht behandelten Natriumselenit-Tiere

Im Rahmen einer Selensupplementation kommt es zu einem Anstieg der endogenen GPx-Aktivität. Die GPx ist ein Selenocystein abhängiges Selenoenzym, dessen Aktivität von der Verfügbarkeit von Selen abhängig ist. Daher ist zu erwarten, dass die Aktivität der GPx bei erhöhtem Selengehalt gesteigert ist (Venardos *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2012). Allerdings nur dann, wenn die GPx- Biosynthese in den einzelnen Organen noch nicht gesättigt war. Auch wird die GPx- Biosynthese in den unterschiedlichen Organen durch Selen unterschiedlich gut stimuliert.

Hierfür wurde die GPx-Aktivität in den Organen der nicht behandelten Natriumselenitgruppe (NBSe) sowie der nicht behandelten Kontrollgruppe (NB) photospektrometrisch bestimmt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Die Analysen zeigten, dass die GPx-Aktivität in allen untersuchten Organen der nicht behandelten Natriumselenit-Tiere signifikant höher war als bei den Tieren der nicht behandelten Kontrollgruppe (s. Abbildung 16 und Tabelle 16).

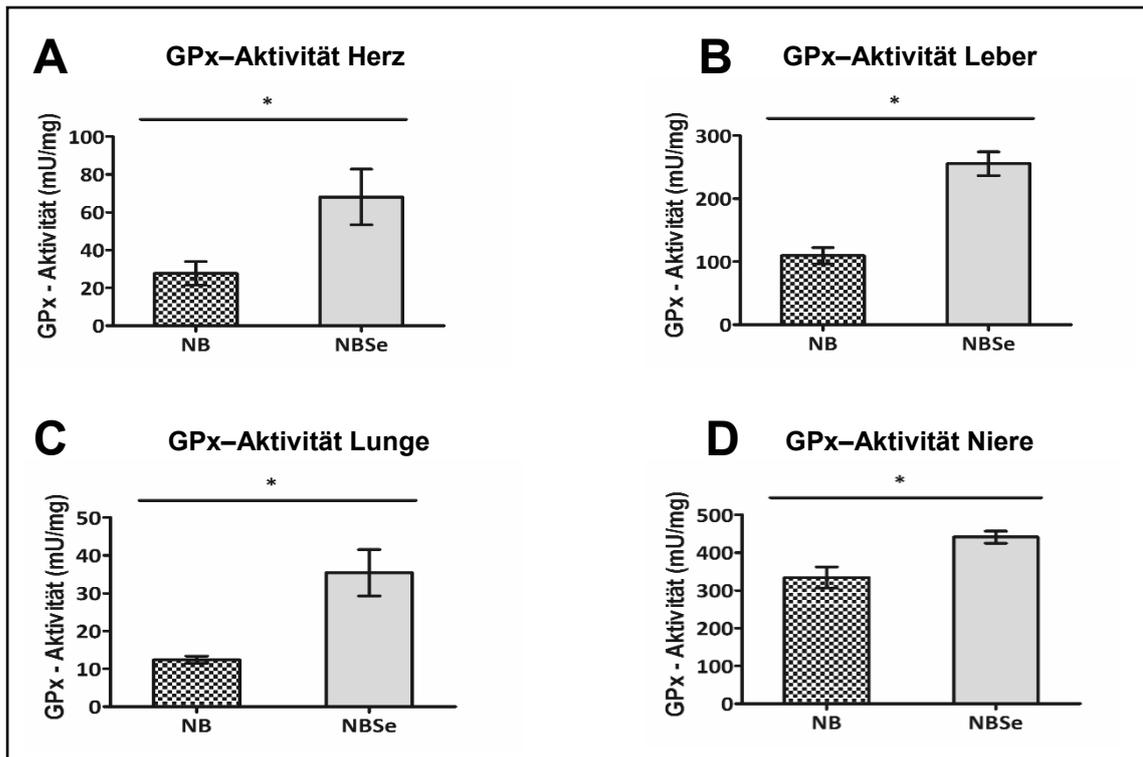


Abb. 16: GPx-Aktivität von Herz, Leber, Lunge und Niere der nicht behandelten Kontroll- und nicht behandelten Natriumselenitgruppe. NB = nicht behandelt, NBSe = nicht behandelte Selenitiere. Die GPx-Aktivität ist angegeben in mU/mg. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils vier Tieren pro Gruppe: * = $p < 0,05$.

Tabelle 16: GPx-Aktivität der nicht behandelten Tiere

	Herz	Lunge	Leber	Niere
NB	27,75 (\pm 6,12)	12,46 (\pm 0,94)	109,67 (\pm 12,75)	334,43 (\pm 28,17)
NBSe	68,08 (\pm 1,67)	35,42 (\pm 6,13)	255,53 (\pm 18,92)	441,33 (\pm 15,98)

NB = nicht behandelt, NBSe = nicht behandelte Selenitiere. Die GPx-Aktivität ist angegeben in mU/mg. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils vier Tieren pro Gruppe

Aus diesem Ergebnis konnte geschlossen werden, dass eine Supplementation mit Natriumselenit in allen vier Organen zu einer signifikanten Erhöhung der GPx-Aktivität geführt hat. In Herz, Lunge und Leber der nichtbehandelten Selenitiere wurde die Aktivität der GPx im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren mehr als doppelt so stark aktiviert. In der Niere jedoch kam es nur zu einer leicht gesteigerten GPx-Aktivität der nicht behandelten Selenitiere.

3.1.2 Blutanalysen

Um herauszufinden, ob die Supplementation mit Natriumselenit einen positiven Einfluss auf ausgewählte klinisch-chemische Blutparameter hat, die im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschaden eine wichtige Rolle spielen, wurden Blutproben der nicht behandelten Kontroll- und Natriumselenitgruppe (NB und NBSe) genommen und die Plasmaspiegel dieser Parameter miteinander verglichen:

Die ALT- und AST-Aktivität war in den Plasmaproben der Natriumselenitgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (s. Abbildung 17 (A) und (B)). Die Troponin I-Plasmaspiegel der

Natriumselenit-Tiere hingegen waren signifikant erhöht (s. Abbildung 17 (D)). Des Weiteren konnte eine erniedrigte LDH-Aktivität in den Proben der Natriumselenit-Tiere festgestellt werden, jedoch erreichten die Unterschiede keine Signifikanz (s. Abbildung 17 (C)). Der Kreatinin- wie auch der Harnstoff-Wert waren bei den Natriumselenit-Tieren tendenziell niedriger als bei den Kontrolltieren, jedoch ohne signifikanten Unterschied.

Die Plasmaspiegel von ALT, AST, LDH und Troponin I sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Ergebnisse aller bestimmten Parameter können Tabelle 17 entnommen werden.

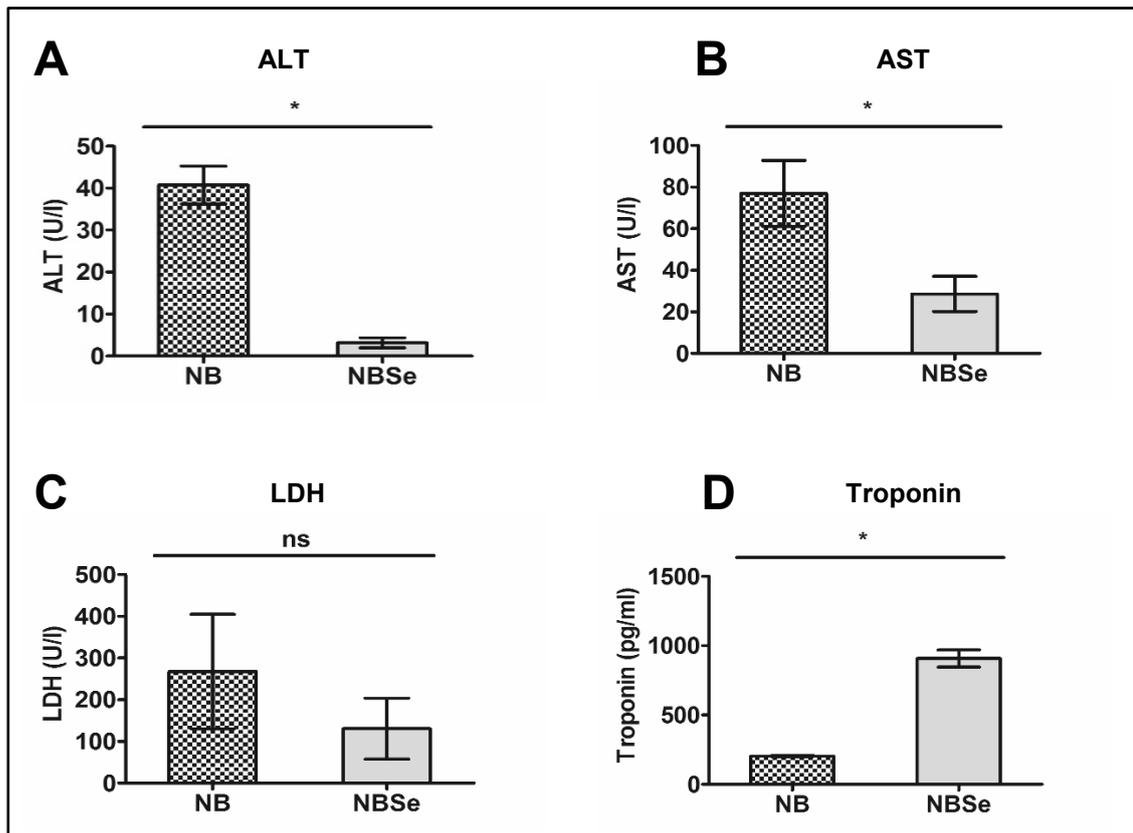


Abb. 17: Einfluss einer Supplementation mit Natriumselenit auf ausgewählte klinisch- chemische Blutparameter. Plasmaspiegel der Parameter ALT (A), AST (B), LDH (C) und Troponin (D) der nicht behandelten Kontroll- und nicht behandelten Natriumselenitgruppe. NB = nicht behandelt, NBSe = nicht behandelte Selen-tiere. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils vier Tieren pro Gruppe. * = $p < 0,05$ vs.

Tabelle 17: Klinisch-chemische Blutparameter der nicht behandelten Tiergruppen

Parameter	Gruppe	Wert
ALT (U/l)	NB	40,75 (\pm 4,52)
	NBSe	3,13 (\pm 1,19)
AST (U/l)	NB	77,00 (\pm 15,87)
	NBSe	28,65 (\pm 8,44)
CK-MB (ng/ml)	NB	0,10 (\pm 0,00)
	NBSe	0,10 (\pm 0,00)
Harnstoff (mmol/l)	NB	4,37 (\pm 0,14)
	NBSe	4,25 (\pm 0,13)
Kreatinin (μ mol/l)	NB	18,00 (\pm 0,00)
	NBSe	14,50 (\pm 1,91)
LDH (U/l)	NB	267,50 (\pm 137,13)
	NBSe	130,78 (\pm 72,98)
Troponin I (pg/ml)	NB	203,53 (\pm 4,65)
	NBSe	907,60 (\pm 61,99)

NB = nicht behandelt, NBSe = nicht behandelte Seleniere. ALT = Alanin-Aminotransferase, AST = Aspartat-Aminotransferase, CK = Creatin-Kinase, CK-Mb = MB-Isoform der Creatin-Kinase, LDH = Laktat-Dehydrogenase. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils vier Tieren pro Gruppe.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Natriumselenitsupplementation zu einer signifikant geringeren ALT- und AST-Aktivität geführt hat, wohingegen der Troponin I-Plasmaspiegel signifikant erhöht war.

3.1.3 Expression bzw. Phosphorylierung ausgewählter Stressproteine in Organen

Danach wurde untersucht, welchen Einfluss die Natriumselenitsupplementation auf molekulare Signalwege hat, die mit dem I/R-Schaden in Verbindung gebracht werden. Hierfür wurden Western Blots aus Herz-, Leber- sowie Lungenlysaten von Tieren der nicht behandelten Kontrollgruppe (NB) sowie der Natriumselenitgruppe (NBSe) angefertigt und folgende Proteine untersucht:

- MAP-Kinase ERK 1/2
- Hitze-Schock-Protein HO-1
- Hitze-Schock-Protein HSP-70
- Transkriptionsfaktor STAT3

Da oxidativer Stress im Rahmen von Ischämie und Reperfusion zu einer Aktivierung von ERK 1/2 führt, wurde das Phosphorylierungsmuster von ERK 1/2 an den Stellen Y202/T204 mittels Western Blot untersucht (Aikawa *et al.*, 1997). Zusätzlich wurden die Hitze-Schock-Proteine HO-1 und HSP-70 analysiert: Diese haben eine zytoprotektive Wirkung und werden nach hypothermer globaler Ischämie und normothermer Reperfusion induziert. Der Transkriptionsfaktor STAT3 dient als Mediator der zellulären Immunantwort. Daher wurde die Phosphorylierung von STAT3 an der Stelle Y705 analysiert (Barry *et al.*, 2009).

Die Expressions-/Phosphorylierungsmuster der oben genannten Proteine werden im Folgenden organspezifisch dargestellt und erläutert:

HERZ

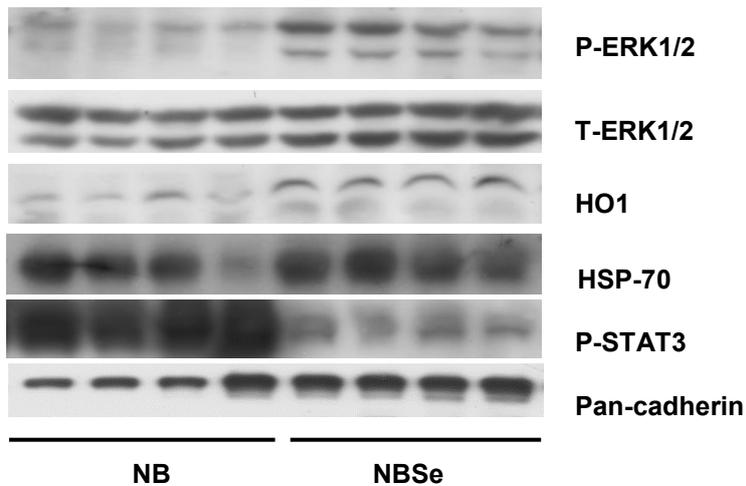


Abb. 18: Western Blots aus Herzlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der nicht behandelten Kontroll- und der nicht behandelten Selen-tiere. ERK 1/2 = Extrazellulärregulierte Kinase, T-ERK 1/2 = total ERK 1/2 = phospho + non-phospho ERK 1/2, HO -1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription, Pan-Cadherin = Ladungskontrolle.

Im Vergleich zur selenadäquat ernährten Kontrollgruppe (NB) konnte bei den vier Tieren der nicht behandelten Natriumselenitgruppe (NBSe) in den Herzen ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 beobachtet werden. Die HO-1 Proteinexpression war bei allen vier nicht behandelten Natriumselenit-Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht erhöht. Auch die HSP-70 Proteinexpression zeigte in der Natriumselenitgruppe einen leichten Anstieg. Dagegen war bei allen vier Natriumselenit-Tieren eine erheblich verringerte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 feststellbar.

LEBER

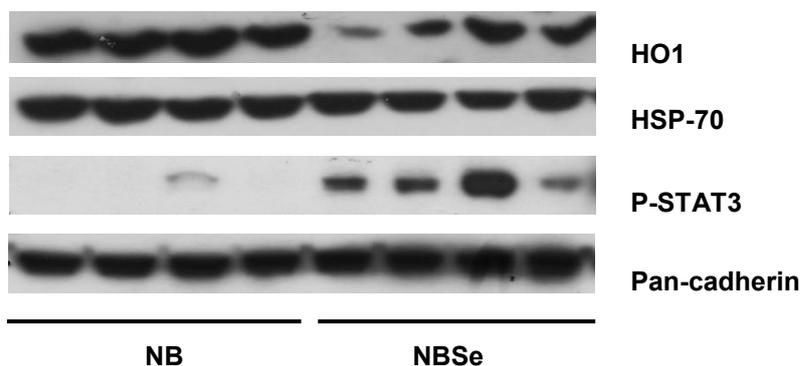


Abb. 19: Western Blots aus Leberlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der nicht behandelten Kontroll- und der nicht behandelten Selen-tiere. HO-1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription, Pan-Cadherin = Ladungskontrolle.

Verglichen mit den nicht behandelten Kontrolltieren war die Proteinexpression des Hitze-Schock-Proteins HO-1 in der Leber der nicht behandelten Natriumselenit-Tiere leicht erniedrigt. Bei der Analyse

der Proteinexpression von HSP-70 konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Dagegen war bei allen vier Tieren der Natriumselenitgruppe eine erheblich vermehrte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 zu sehen. Die Phosphorylierung der ERK 1/2 war in der Leber bei keiner der beiden nicht behandelten Gruppen nachweisbar.

LUNGE

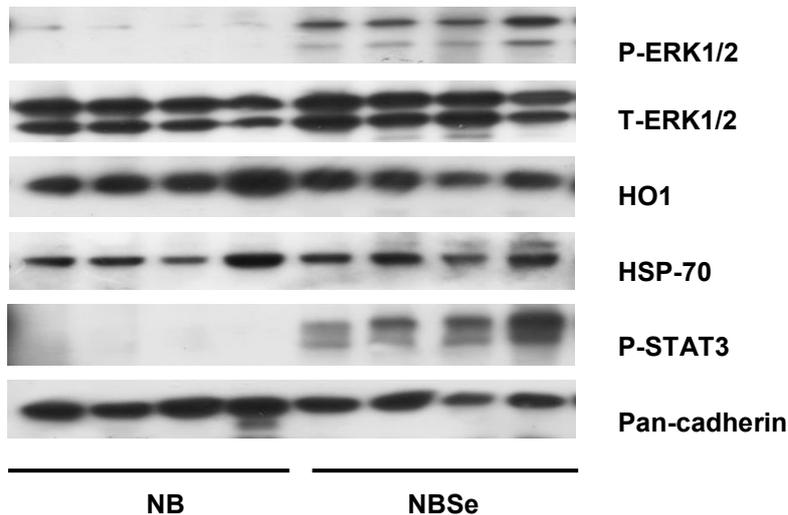


Abb. 20: Western Blots aus Lungenlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der nicht behandelten Kontroll- und der nicht behandelten Selenitiere. ERK 1/2 = Extrazellulärregulierte Kinase, T-ERK 1/2 = total ERK 1/2 = phospho + non-phospho ERK 1/2, HO -1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription, Pan-Cadherin = Ladungskontrolle.

In den Lungen führte die Natriumselenitsupplementation bei vier von vier Tieren zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2. Bei den Hitze-Schock-Proteinen HO-1 und HSP-70 hingegen konnten keine Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Bei allen vier Tieren der nicht behandelten Natriumselenitgruppe konnte eine deutlich vermehrte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 beobachtet werden.

NIERE

Da die Untersuchung der GPx-Aktivität in den Nieren der nicht behandelten Selenitiere im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren, verglichen mit den anderen Organen, nur zu einem leichten Anstieg der GPx-Aktivität führte, wurden die Gewebeproben der Niere bei den Vorversuchen nicht zu weiteren molekularen Untersuchungen herangezogen.

3.2 Untersuchungen zur protektiven Wirkung der Selen-Supplementation auf den I/R-Schaden

3.2.1 GPx-Aktivitätsmessung

Die Selenverteilung im Körper der operierten Tiere (K und Se) wurde ebenfalls durch Bestimmung der GPx-Aktivität in allen vier Organen (Herz, Leber, Lunge, Niere) untersucht (s. Kapitel 3.1.1). Mittels spektrophotometrischer Messung konnte in Herz, Leber und Nieren der Natriumselenit-Tiere eine signifikant höhere GPx-Aktivität nachgewiesen werden als in den Organen der Kontrolltiere (s. Abbildung 21). Die GPx-Aktivität in den Lungen der operierten Natriumselenit-Tiere war erhöht, der Unterschied jedoch nicht signifikant ($p=0,0973$) (s. Abbildung 21). Im Einzelnen sind die Werte der GPx-Aktivität in Tabelle 18 aufgeführt.

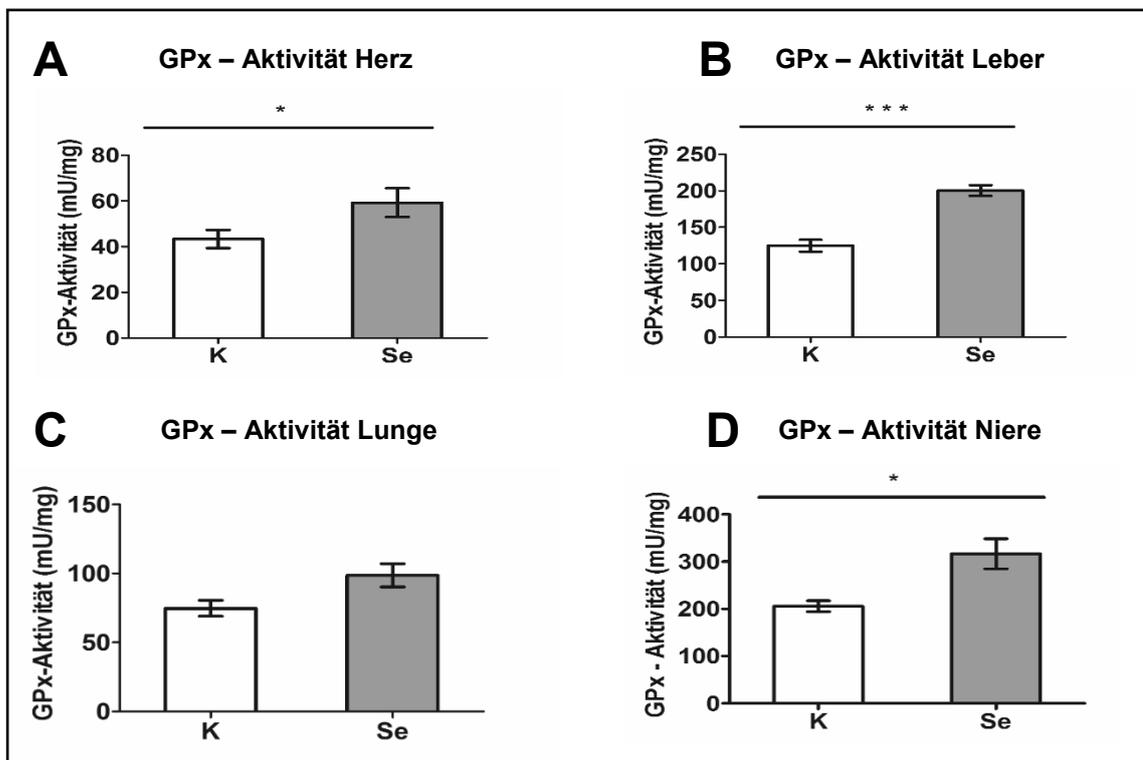


Abb. 21: GPx-Aktivität von Herz, Leber, Lunge und Niere. K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die GPx-Aktivität ist angegeben in mU/mg. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. * = $p < 0,05$. *** = $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe.

Tabelle 18: GPx-Aktivität der operierten Tiere

	Herz	Lunge	Leber	Niere
K	43,33 (\pm 3,96)	74,72 (\pm 5,79)	124,92 (\pm 8,07)	205,68 (\pm 11,64)
Se	61,34 (\pm 7,46)	96,51 (\pm 9,21)	209,85 (\pm 4,91)	316,75 (\pm 31,67)

K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die GPx-Aktivität ist angegeben in mU/mg. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Supplementation mit Natriumselenit in allen vier Organen zu einem Anstieg der GPx-Aktivität geführt hat.

3.2.2 Selengehalt

Parallel zur Bestimmung der GPx-Aktivität wurde der Selengehalt in den vier Organen (Herz, Lunge, Leber, Niere) der Tiere bestimmt, um zu untersuchen, ob die Natriumselenitsupplementation zu einem Anstieg der Selenlevel in den vier untersuchten Organen geführt hat.

Die Selenkonzentration war in allen Organen der Natriumselenit-Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (s. Abbildung 22 und Tabelle 19). Auf Grund dieser Ergebnisse kann gesagt werden, dass die Supplementation mit Selen zu einem Anstieg der Gewebeselenspiegel in den vier untersuchten Organen geführt hat.

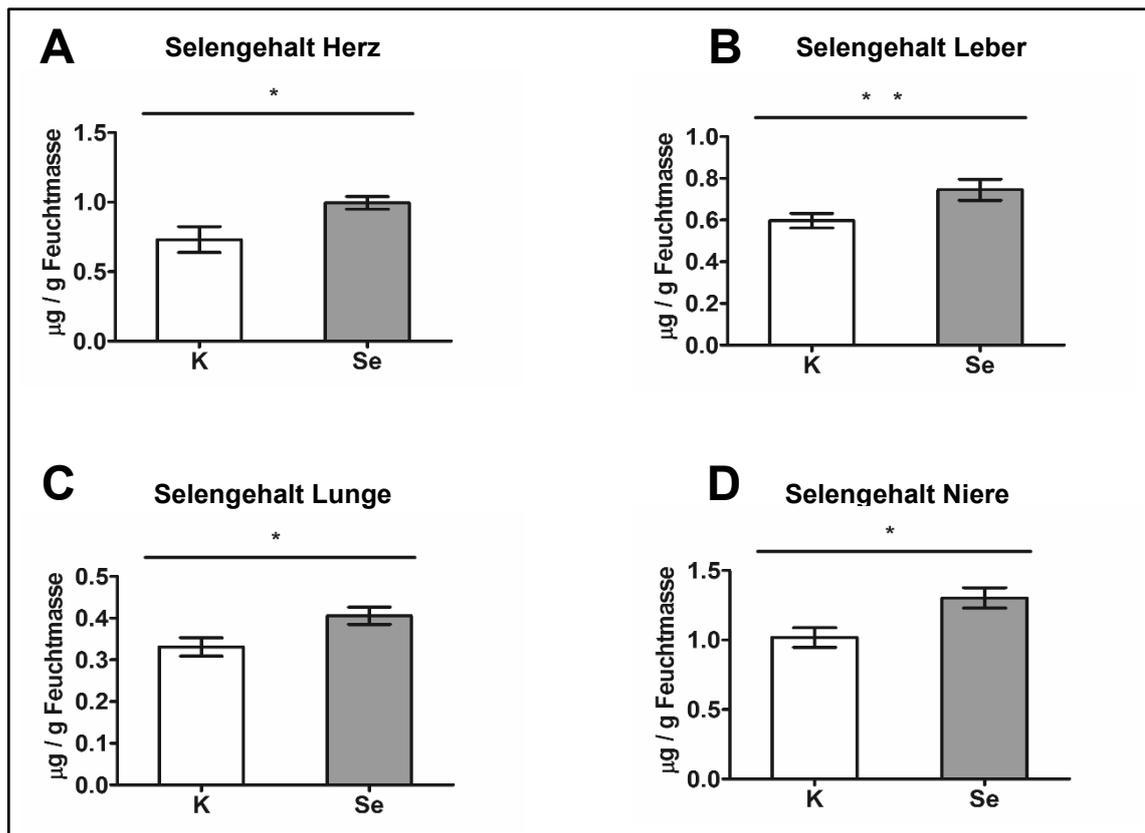


Abb. 22: Selengehalt von Herz, Leber, Lunge und Niere. Abbildung X zeigt den Selengehalt der Organe der Kontrollgruppe im Vergleich zu der Natriumselenitgruppe: K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Der Selengehalt ist angegeben in µg/g Feuchtmasse. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von jeweils sechs Tieren pro Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe. ** = $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe.

Tabelle 19: Selengehalt in den Gewebelysaten der operierten Tiere

	Herz	Leber	Lunge	Niere
K	0,73 (± 0,09)	0,60 (± 0,04)	0,33 (± 0,02)	1,02 (± 0,07)
Se	1,00 (± 0,05)	0,75 (± 0,05)	0,41 (± 0,02)	1,30 (± 0,07)

K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Der Selengehalt ist angegeben in µg/g Feuchtmasse. * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von jeweils sechs Tieren pro Gruppe.

3.2.3 Blutanalysen

Um den potenziellen positiven Einfluss von Natriumselenit auf klinisch-chemische Blutparameter im Verlauf der EKZ zu untersuchen, wurden die Plasmaspiegel der Kontroll- und der Natriumselenitgruppe im Verlauf der EKZ miteinander verglichen. Die Plasmaspiegel von ALT (A), AST (B), LDH (C) und Troponin I (D) sind in Abbildung 23 dargestellt:

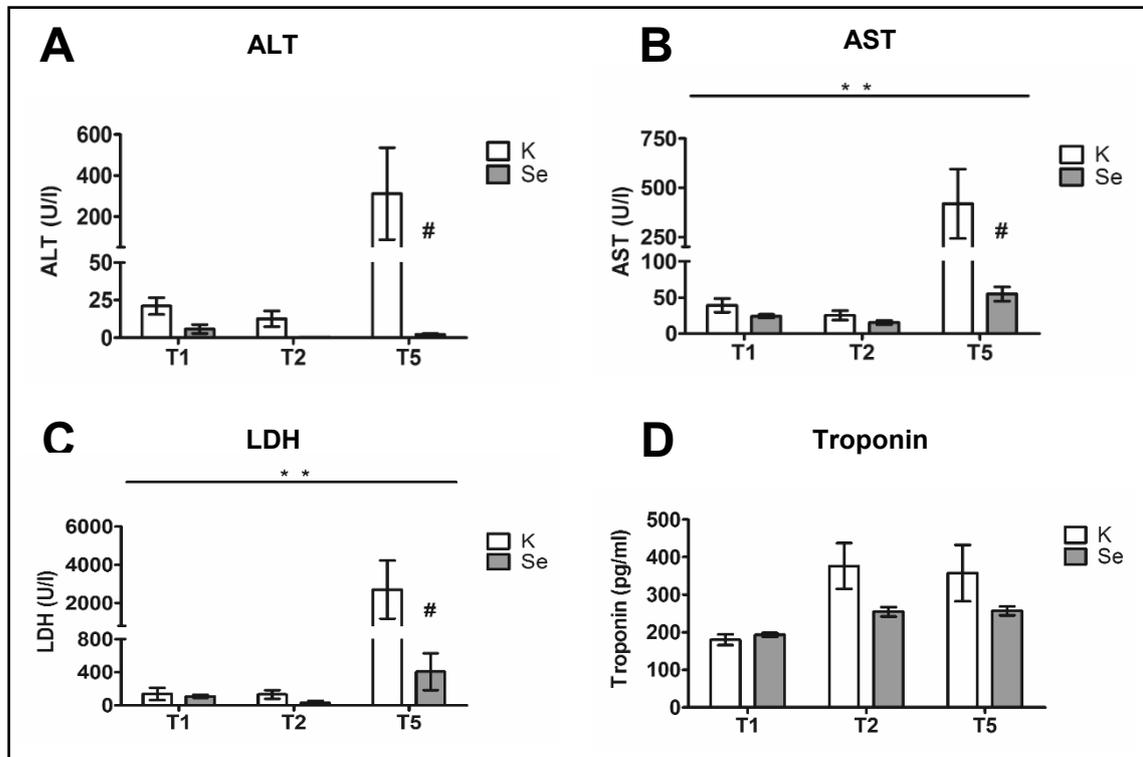


Abb. 23: Einfluss von Natriumselenit auf den Verlauf ausgewählter klinisch-chemischer Blutparameter zu definierten Zeitpunkten der EKZ. Plasmaspiegel der Parameter ALT (A), AST (B), LDH (C) und Troponin (D) der Kontroll- [Engels, 2013] und Natriumselenitgruppe an den Zeitpunkten T1, T2 und T5. K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss der EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sechs bis sieben Tieren pro Gruppe. ** = $p < 0,01$ # $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

Die I/R-induzierte Zunahme der ALT-Aktivität konnte durch die Natriumselenitsupplementation deutlich, jedoch nicht signifikant unterdrückt werden (s. Abbildung 23 (A)). Die AST Plasmaspiegel waren zum Zeitpunkt T5 in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Natriumselenitgruppe (s. Abbildung 23 (B)). Auch die LDH Plasmaspiegel der Kontrollgruppe waren zum Zeitpunkt T5 signifikant höher als die der Natriumselenitgruppe (s. Abbildung 23 (C)). Die Troponin-Plasmaspiegel der Kontrollgruppe waren im Verlauf der EKZ zu allen drei Zeitpunkten höher als die der Natriumselenit-Tiere, zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied (s. Abbildung 23 (D)).

Tabelle 18 zeigt, dass die CK- wie auch die Laktat- Plasmaspiegel zum Zeitpunkt T5 in der Kontrollgruppe deutlich höher als in der Natriumselenitgruppe, die Unterschiede jedoch nicht signifikant waren. Calcium-, Harnstoff- sowie Kreatinin- Werte zeigten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

Die Zahlenwerte (Mittelwerte \pm SEM) aller bestimmten Parameter sind in Tabelle 20 aufgeführt:

Tabelle 20: Klinisch-chemische Blutparameter zu definierten Zeitpunkten der EKZ

Parameter	T1	T2	T5
ALT (U/l)			
K	21,58 (\pm 6,58)	13,18 (\pm 6,20)	350,22 (\pm 260,92)
Se	5,84 (\pm 2,98)	0,29 (\pm 0,1)	* 2,24 (\pm 0,66)
AST (U/l)			
K	43,20 (\pm 10,20)	28,10 (\pm 7,14)	467,87 (\pm 200,54)
Se	24,14 (\pm 2,52)	15,34 (\pm 2,73)	* 54,97 (\pm 9,77)
Calcium (mmol/l)			
K	1,69 (\pm 0,08)	1,35 (\pm 0,25)	1,64 (\pm 0,31)
Se	1,7 (\pm 0,14)	1,63 (\pm 0,12)	2,36 (\pm 0,36)
CK (ng/ml)			
K	21,83 (\pm 10,69)	23,13 (\pm 9,58)	131,53 (\pm 82,34)
Se	41,29 (\pm 3,32)	15,16 (\pm 7,47)	52,76 (\pm 11,68)
CK-MB (ng/ml)			
K	0,57 (\pm 0,33)	0,38 (\pm 0,28)	0,97 (\pm 0,81)
Se	2,43 (\pm 0,55)	1,66 (\pm 0,51)	2,76 (\pm 1,14)
CRP (mg/ml)			
K	0,49 (\pm 0,08)	0,17 (\pm 0,04)	0,22 (\pm 0,08)
Se	0,15 (\pm 0,03)	0,12 (\pm 0,05)	0,12 (\pm 0,09)
Harnstoff (mmol/l)			
K	4,81 (\pm 0,21)	5,39 (\pm 0,92)	6,38 (\pm 0,93)
Se	4,77 (\pm 0,17)	6,19 (\pm 0,2)	6,31 (\pm 1,05)
Kreatinin (μmol/l)			
K	19,10 (\pm 1,49)	51,05 (\pm 2,00)	64,53 (\pm 5,57)
Se	25,00 (\pm 3,49)	54,86 (\pm 2,15)	69,71 (\pm 2,18)
Laktat (mmol/l)			
K	2,42 (\pm 0,19)	2,47 (\pm 1,16)	36,42 (\pm 10,53)
Se	2,7 (\pm 0,2)	4,99 (\pm 0,43)	21,44 (\pm 6,3)
LDH (U/l)			
K	160,68 (\pm 83,90)	154,50 (\pm 56,61)	2404,80 (\pm 1721,63)
Se	108,59 (\pm 17,85)	31,59 (\pm 20,8)	* 407,53 (\pm 221,99)
Troponin I (pg/ml)			
K	180,36 (\pm 13,66)	376,46 (\pm 60,73)	357,51 (\pm 75,13)
Se	193,20 (\pm 4,88)	254,64 (\pm 12,62)	256,69 (\pm 12,03)

K = Kontrollgruppe [Engels, 2013], Se = Natriumselenitgruppe, T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. ALT = Alanin-Aminotransferase, AST = Aspartat-Aminotransferase, CK = Creatin-Kinase, CK-Mb = MB-Isoform der Creatin-Kinase, LDH = Laktat-Dehydrogenase. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sechs bis sieben Tieren pro Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe. ** = $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe.

Zu beachten ist allerdings, dass die Blutproben zum Zeitpunkt 5 häufig hämolytisch waren. Diese Beobachtung muss bei der Interpretation der hier vorliegenden Daten in Betracht gezogen werden, da Hämolyse auch einen Anstieg der Parameter Alt, AST, LDH und Troponin auslösen kann.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Supplementation mit Natriumselenit bei einem Teil der untersuchten Parameter einen positiven Effekt auf die I/R-induzierte Zunahme dieser Parameter hatte.

3.2.4 Hämodynamische- und Vitalparameter

3.2.4.1 Hämodynamische Parameter

Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Operation wurden die hämodynamischen Parameter dokumentiert, statistisch ausgewertet und untereinander verglichen, um den Einfluss von Natriumselenit auf diese Parameter zu untersuchen.

KATECHOLAMINBEDARF

Um während der EKZ eine ausreichende Reperfusion aller Organe der Tiere zu gewährleisten, war es notwendig, dass der MAD zu jeder Zeit über 40 mmHg lag. In dem Fall, dass der MAD unter 40 mmHg fiel wurde dem Tier in physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol®, 0,02 mg/ml) verabreicht. Die Menge des verabreichten Norepinephrinhydrochlorids während der unterschiedlichen Phasen der EKZ (Kühlung, Erwärmung und Reperfusion) wurde dokumentiert. Da innerhalb der einzelnen Gruppen sehr große Abweichungen auftraten, wurde ein Score erstellt und die Punkte nach diesem Score vergeben:

Tabelle 21: Punkteverteilung Score Katecholaminbedarf

Katecholaminbedarf	Punkte
0 – 0,5	1
0,6 – 1,0	2
1,1 – 1,5	3
1,6 – 2,0	4
2,1 – 2,5	5
2,6 – 3,0	6
> 3,0	7

Hierbei konnte beobachtet werden, dass es im Verlauf der EKZ in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg des Katecholaminbedarfs gab. Zwischen den Gruppen untereinander gab es keine wesentlichen Unterschiede, jedoch war der Katecholaminbedarf in der Kontrollgruppe (K) zu allen drei Zeitpunkten höher als in der Natriumselenitgruppe (Se). Auch im Gesamtdurchschnitt benötigten die Kontrolltiere während der EKZ mehr Katecholamine als die Natriumselenit-Tiere. Die Unterschiede im Katecholaminbedarf zwischen der Kontroll – und der Natriumselenitgruppe erreichte jedoch zu keinem der drei Zeitpunkte statistische Signifikanz. Der Katecholaminbedarf zu den drei oben genannten Zeitpunkten ist in Abbildung 24 dargestellt. Die Daten können der Tabelle 22 entnommen werden.

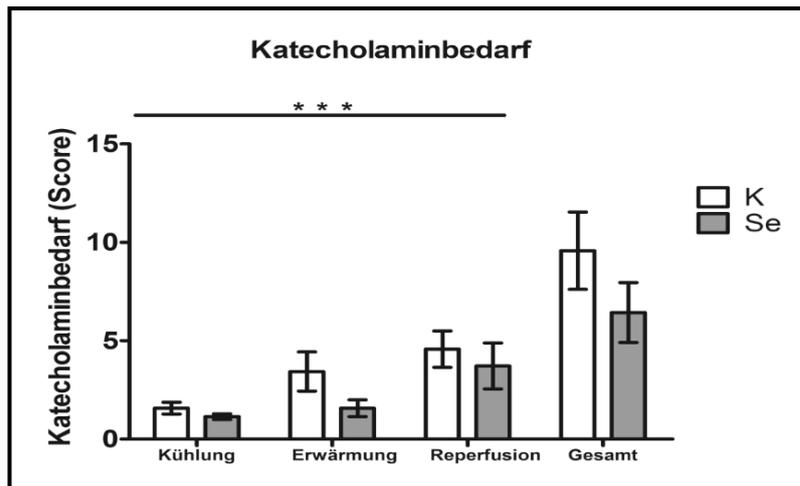


Abb. 24: Katecholaminbedarf der Kontroll- [Engels, 2013] und Natriumselenitgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten während der EKZ. K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Der Katecholaminbedarf ist als Score angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. *** $p < 0,0001$ vs. Kontrollgruppe.

Tabelle 22: Katecholaminbedarf (Score) während der EKZ

	Kühlung	Erwärmung	Reperfusion	Gesamt
K	1,57 (\pm 0,3)	3,43 (\pm 1,0)	4,57 (\pm 0,92)	9,57 (\pm 1,96)
Se	1,14 (\pm 0,14)	1,57 (\pm 0,43)	3,71 (\pm 1,17)	6,43 (\pm 1,53)

K = Kontrolle [Engels, 2013], Se = Natriumselenit. Der Katecholaminbedarf ist als Score angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

VOLUMENBEDARF

Um das Blutvolumen der Tiere während der EKZ zu erhalten, konnte bei Bedarf 6% HAES supplementiert werden. Das zusätzliche Volumen, das die Tiere während der EKZ benötigten, wurde dokumentiert. Bei beiden Gruppen wurde die HLM zu Beginn der EKZ mit 15 ml geprimed. Während der EKZ benötigte im Gegensatz zu den Kontrolltieren kein einziges der Natriumselenit-Tiere zusätzliches Volumen. Hier zeigte sich, dass die Natriumselenit-Tiere (Se) signifikant weniger Volumen benötigten als die Kontrolltiere ($p = 0,0108$). Der Volumenbedarf zum Priming der HLM, während der EKZ und der Gesamtvolumenbedarf beider Gruppen sind in Abbildung 25 dargestellt. Die genauen Werte können Tabelle 23 entnommen werden.

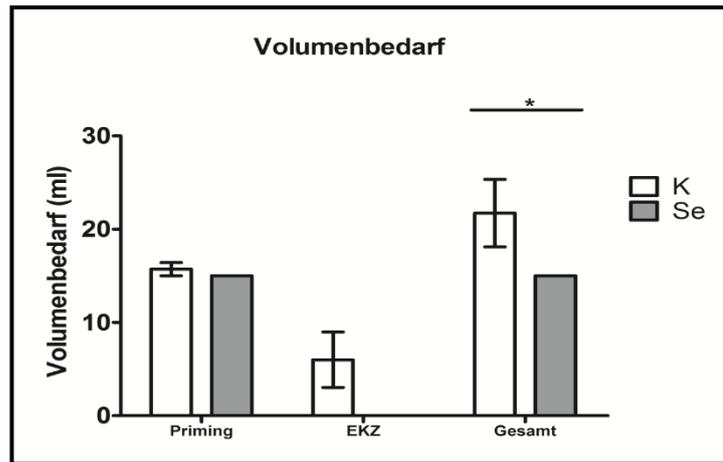


Abb. 25: Volumenbedarf der Kontroll- [Engels, 2013] und Natriumselenitgruppe während der Kühlung, Erwärmung und der Reperfusion im Vergleich. K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Der Volumenbedarf ist in ml angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$.

Tabelle 23: Volumenbedarf (ml) während der EKZ

	Priming	Bypass	Gesamt
K	15,71 (\pm 0,67)	6,00 (\pm 2,78)	21,71 (\pm 3,39)
Se	15,00 (\pm 0,00)	0,00 (\pm 0,00)	15,00 (\pm 0,00)

K = Kontrolle [Engels, 2013], Se = Natriumselenit. Der Volumenbedarf ist in ml angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

3.2.4.2 Zelluläres Blutbild

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Natriumselenitsupplementation einen Effekt auf das zelluläre Blutbild hat. Dafür wurden zu den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4 und T5 Hämoglobin, Hämatokrit sowie die Leukozytenzahl bestimmt und die Werte statistisch ausgewertet.

HÄMOGLOBIN / HÄMATOKRIT

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die EKZ auf den Verlauf von Hämoglobin und Hämatokrit hat, wurden zu den fünf definierten Zeitpunkten T1, T2, T3, T4 und T5 Blutproben entnommen und diese beiden Werte gemessen. Zu beachten ist hierbei, dass es durch das Priming der HLM mit 15 ml 6% HAES zu Beginn der EKZ bereits zu einer Verdünnung des Blutes kommt. Obendrein führte eine gegebenenfalls erforderliche Volumensubstitution während der EKZ zu einer Blutverdünnung. Dies erklärt die Differenz der Werte zwischen den Zeitpunkten T1 und T2. Entsprechend dem Volumenbedarf der beiden Gruppen kam es sowohl bei Hämatokrit als auch Hämoglobin zu einer verstärkten Abnahme der Werte der Kontrolltiere (K) im Vergleich zu den Natriumselenit-Tieren (Se). Die Tiere der Natriumselenitgruppe zeigten zu den Zeitpunkten T1, T2, T4 und T5 signifikant höhere Hämatokritwerte als die Kontrolltiere (s. Abbildung 26 (A)). Auch der Hämoglobinwert der Natriumselenitgruppe war tendenziell höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt T5 war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen signifikant (s. Abbildung 26 (B)).

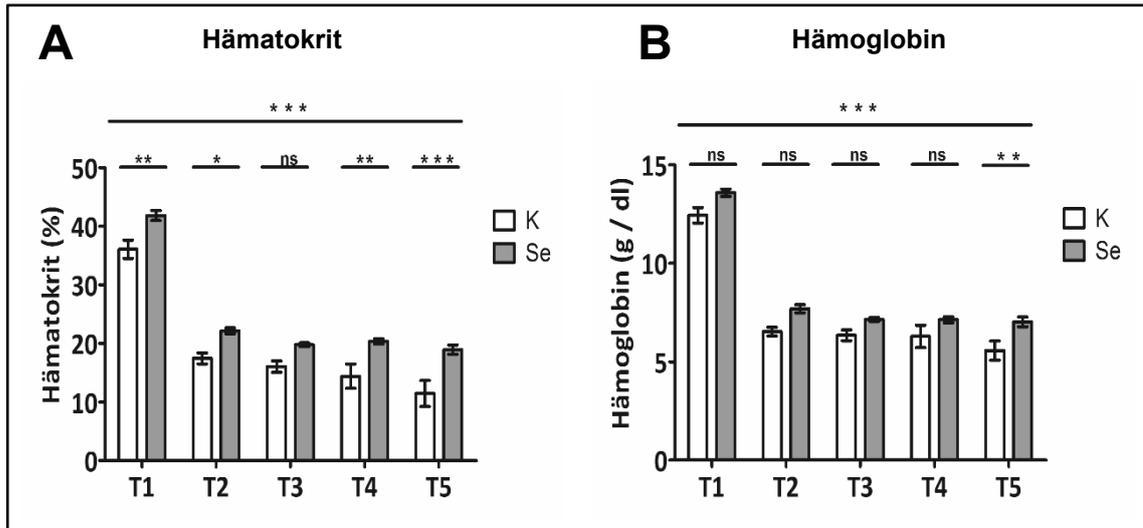


Abb. 26: Verlauf des Hämatokrits- und des Hämoglobingehalts während der EKZ. Hämatokrit- (A) und Hämoglobingehalt (B) der Kontroll- [Engels, 2013] und Natriumselenitgruppe an den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4 und T5. K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 ° C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 ° C Wiedererwärmung und T5 = nach 60 min Reperfusion. Der Hämatokritwert ist angegeben in %. Der Hämoglobingehalt ist angegeben in g / dl. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$.

Die genauen Daten können Tabelle 24 entnommen werden.

Tabelle 24: Hämoglobingehalt und Hämatokrit zu definierten Zeitpunkten der EKZ

Parameter	T1	T2	T3	T4	T5
Hb (g / dl)					
K	12,44 (\pm 0,36)	6,53 (\pm 0,21)	6,34 (\pm 0,26)	6,29 (\pm 0,54)	5,57 (\pm 0,45)
Se	13,59 (\pm 0,19)	7,69 (\pm 0,21)	7,14 (\pm 0,09)	7,13 (\pm 0,15)	7,03 (\pm 0,25)
Hkt (%)					
K	36,06 (\pm 1,48)	17,44 (\pm 0,88)	16,02 (\pm 1,02)	14,32 (\pm 2,11)	11,46 (\pm 2,07)
Se	41,83 (\pm 0,85)	22,14 (\pm 0,48)	19,77 (\pm 0,31)	20,34 (\pm 0,45)	18,93 (\pm 0,78)

Hb = Hämoglobin, Hkt = Hämatokrit. K = Kontrolle [Engels, 2013], Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 ° C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 ° C Wiedererwärmung und T5 = nach 60 min Reperfusion. Der Hämatokritwert ist angegeben in %, der Hämoglobingehalt in g / dl. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hämatokrit- und Hämoglobinwerte der Kontrolltiere im Verlauf der EKZ stärker abgenommen haben als die der Natriumselenit-Tiere.

LEUKOZYTENVERLAUF

Im Verlauf der EKZ mit DHCA kommt es zu einem Anstieg der Leukozytenzahl (Engels *et al.*, 2014). Um herauszufinden, ob die Supplementation mit Natriumselenit einen positiven Einfluss auf die im Rahmen der EKZ auftretende Leukozytose hat, wurden die Leukozytenzahlen zu den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4 und T5 bestimmt. Der physiologische Referenzbereich der Leukozyten für Ratten beträgt zwischen 3 und 15 $\times 10^3/\text{mm}^3$. Entsprechend dieser physiologischen Schwankungen waren die Leukozytenwerte zum Zeitpunkt T1 sehr unterschiedlich. Daher wurde die Leukozytenzahl der Tiere

zum Zeitpunkt T1 auf Startwerte genormt und anschließend als Faktor zum Ausgangswert dargestellt. Da das Priming zu Beginn der HLM zu einer Blutverdünnung führte, wurde die Leukozytenzahl auf den Hämatokrit-Wert bezogen.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich während der EKZ die oben erwähnte Leukozytose: Die Leukozytenzahl stieg in Relation zum Hämatokrit im Verlauf der EKZ signifikant an ($p = 0,0462$). Bei den Tieren der Natriumselenitgruppe konnte kein Anstieg der Leukozytenzahl festgestellt werden. Zum Zeitpunkt T4 war der Anstieg der Leukozyten in der Natriumselenitgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Zu den anderen vier Zeitpunkten waren die Leukozytenzahlen bei den Tieren der Natriumselenitgruppe tendenziell niedriger als in der Kontrollgruppe, die Unterschiede auf Grund der hohen Varianz der Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant (s. Abbildung 27). Die genauen Werte sind in Tabelle 25 aufgeführt.

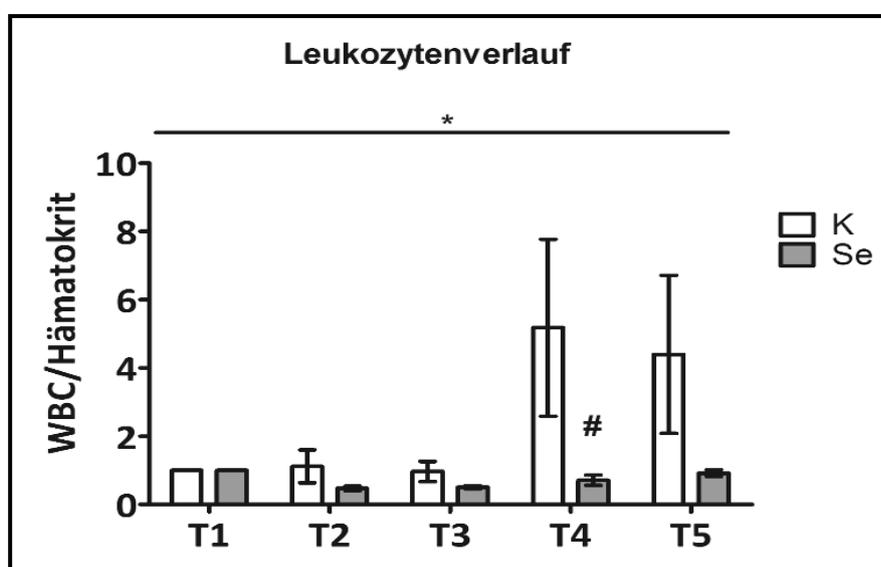


Abb. 27: Verlauf der Leukozytenzahl der Kontroll- [Engels, 2013] und Natriumselenitgruppe an den Zeitpunkten T1, T2 und T5. K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 ° C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 ° C Wiedererwärmung und T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Leukozytenzahl ist als relativer Wert bezogen auf den Hämatokritwert angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

Tabelle 25: Leukozytenverlauf zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	T1	T2	T3	T4	T5
K	1,00 ($\pm 0,00$)	1,11 ($\pm 0,42$)	0,97 ($\pm 0,26$)	5,18 ($\pm 2,24$)	4,4 ($\pm 2,01$)
Se	1,00 ($\pm 0,00$)	0,47 ($\pm 0,06$)	0,5 ($\pm 0,04$)	0,71 ($\pm 0,15$)	0,92 ($\pm 0,09$)

K = Kontrolle [Engels, 2013], Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 ° C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 ° C Wiedererwärmung und T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Leukozytenzahl ist als relativer Wert bezogen auf den Hämatokritwert angegeben. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Natriumselenit der im Rahmen der EKZ auftretende Leukozytose entgegengewirkt und diese somit positiv beeinflusst hat.

3.2.4.3 Vitalparameter, Temperatur, Blutgasanalysen

Zu den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4 und T5 während der Operation wurden Vitalparameter sowie die Körpertemperatur der beiden Gruppen (K und Se) dokumentiert. Des Weiteren wurden zu den oben genannten Zeitpunkten Blutgasanalysen durchgeführt. Die genauen Werte können Tabelle 26 entnommen werden.

Analog zur Änderung der Flussrate an der HLM während Kühlung, Erwärmung und Reperfusion, veränderten sich die Herzfrequenz und die Temperatur im Verlauf des Versuchs. Im Hinblick auf den MAD stellten sich zwischen den beiden Gruppen und den fünf Zeitpunkten keine deutlichen Unterschiede heraus. Über den Verlauf des Versuchs hinweg zeigten sich der pH-Wert des Blutes, die Partialdrücke von O₂ und CO₂ sowie die Bikarbonat-Konzentration stabil oder wurden gegebenenfalls nach oben genanntem Schema korrigiert.

Tabelle 26: Vitalparameter, Temperatur, Blutgasanalysen

	T1	T2	T3	T4	T5
HF (/min)					
K	291,14 (± 4,73)	47,43 (± 12,71)	103,83 (± 18,06)	217,57 (± 20,88)	240,00 (± 32,07)
Se	286,71 (± 6,17)	75,71 (10,28)	83,67 (± 11,51)	242,43 (± 14,64)	276,29 (± 7,85)
Temperatur					
K	35,74 (± 0,42)	17,83 (± 0,55)	20,00 (± 0,00)	35,00 (± 0,00)	36,57 (± 0,27)
Se	36,64 (± 0,26)	18,51 (± 0,24)	20,00 (± 0,00)	35,00 (± 0,00)	36,20 (± 0,13)
MAD(mmHg)					
K	56,00 (± 4,82)	50,57 (± 5,69)	65,00 (± 6,20)	49,14 (± 3,54)	53,86 (± 2,97)
Se	68,43 (± 3,12)	52,29 (± 4,79)	59,43 (± 13,00)	47,71 (± 2,72)	51,00 (± 4,84)
pH					
K	7,27 (± 0,03)	7,2 (± 0,10)	7,29 (± 0,11)	7,30 (± 0,06)	7,38 (± 0,07)
Se	7,28 (± 0,02)	7,42 (± 0,04)	7,44 (± 0,04)	7,31 (± 0,08)	7,16 (± 0,06)
BE (mmol/l)					
K	-5,29 (± 0,88)	-6,06 (± 2,23)	-11,66 (± 1,69)	-9,33 (± 1,99)	-7,16 (± 1,94)
Se	-5,70 (± 1,10)	-3,34 (± 0,88)	-10,44 (± 2,73)	-11,64 (± 3,74)	-7,70 (± 3,33)
pO₂ (mmHg)					
K	294,39 (± 63,61)	746,26 (± 77,85)	463,17 (± 64,26)	319,06 (± 42,72)	322,23 (± 26,15)
Se	337,39 (± 32,78)	697,71 (± 54,82)	558,66 (± 29,46)	380,77 (± 24,87)	309,70 (± 32,65)
pCO₂(mmHg)					
K	38,79 (± 6,70)	54,02 (± 10,16)	25,37 (± 4,72)	32,85 (± 5,20)	31,46 (± 7,21)
Se	45,61 (± 2,63)	32,70 (± 3,10)	20,46 (± 2,50)	33,40 (± 8,94)	56,91 (± 8,56)
CO₂ (Vol. %)					
K	2,73 (± 0,3)	0,25 (± 0,03)	0,51 (± 0,11)	0,70 (± 0,12)	0,79 (± 0,20)
Se	2,60 (± 0,09)	0,20 (± 0,03)	0,25 (± 0,05)	0,60 (± 0,18)	0,46 (± 0,27)
ΔO₂					
K	47,00 (± 1,20)	43,00 (± 3,20)	47,14 (± 2,79)	43,86 (± 3,97)	40,13 (± 3,84)
Se	50,20 (± 0,58)	36,80 (± 2,64)	30,20 (± 4,17)	34,80 (± 2,81)	32,00 (± 2,77)
HCO₃(mmol/l)					
K	20,97 (± 1,00)	21,23 (± 0,96)	13,99 (± 0,76)	16,67 (± 2,36)	17,36 (± 2,29)
Se	20,57 (± 1,15)	20,31 (± 0,62)	12,93 (± 1,03)	13,60 (± 1,12)	20,06 (± 3,02)

Vitalparameter der operierten Kontroll- und Natriumselenitgruppe. K = Kontrolle [Engels, 2013], Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 ° C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 ° C Wiedererwärmung und T5 = nach 60 min Reperfusion. HF = Herzfrequenz, MAD = mittlerer arterieller Druck, pO₂ = Sauerstoff- Partialdruck, HCO₃ = Hydrogencarbonat. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

Zusammenfassend kann daher gesagt werden, dass die Supplementation mit Natriumselenit keine Auswirkungen auf die während des Versuchs erhobenen Vitalparameter und Blutgase hatte.

3.2.5 Proinflammatorische Zytokine

3.2.5.1 Serumspiegel proinflammatorischer Zytokine

EKZ mit DHCA induziert eine Zunahme der Serumspiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5 (Engels *et al.*, 2014). Daher sollte untersucht werden, ob die I/R- induzierte Zunahme der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α durch die Natriumselenitsupplementation beeinflusst wird. Dafür wurden zunächst die IL-6- und TNF α -Serumspiegel der operierten Kontroll- und Natriumselenit-Tiere mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren ELISAs bestimmt und die Ergebnisse der Gruppen zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5 untereinander verglichen.

IL-6 im Serum

Hier zeigte sich ein, über den Operationsverlauf hinweg, signifikanter Anstieg der IL-6-Serumspiegel nach Reperfusion. Zwischen der Kontroll- und der Natriumselenitgruppe war hingegen kein signifikanter Unterschied zu beobachten (s. Abbildung 28 und Tabelle 27).

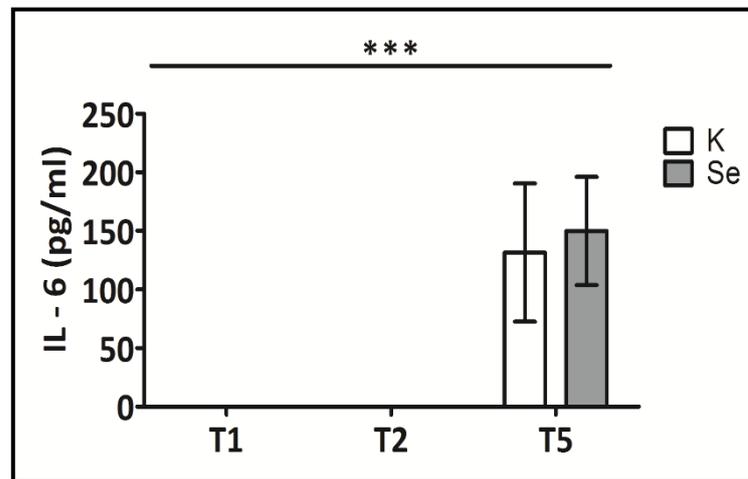


Abb. 28: IL-6-Serumspiegel der Kontroll- [Engels, 2013], und Natriumselenitgruppe an den Zeitpunkten T1, T2 und T5. K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Der IL-6-Gehalt ist angegeben in pg/ml. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. *** = $p < 0,001$.

Tabelle 27: IL-6 Serumspiegel an den Zeitpunkten T1, T2 und T5

	T1	T2	T5
K	0,00 (\pm 0,00)	0,00 (\pm 0,00)	131,46 (\pm 54,54)
Se	0,00 (\pm 0,00)	0,00 (\pm 0,00)	149,82 (\pm 46,07)

K = Kontrolle [Engels, 2013], Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Der IL-6-Gehalt ist angegeben in pg/ml. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der I/R-induzierten Zunahme der IL-6-Serumspiegel durch Natriumselenitsupplementation nicht entgegengewirkt werden konnte.

TNF- α im Serum

Die TNF α -Serumspiegel stiegen im Verlauf der EKZ signifikant an. Im Gegensatz zum Anstieg der IL-6-Serumspiegel, stiegen die TNF α -Serumspiegel bereits nach Ischämie (zum Zeitpunkt T2) an. Die TNF α -Serumspiegel der operierten Natriumselenit-Tiere (Se) waren, verglichen mit den operierten Kontrolltieren (K), tendenziell erhöht. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren allerdings nicht signifikant (s Abbildung 29 und Tabelle 28).

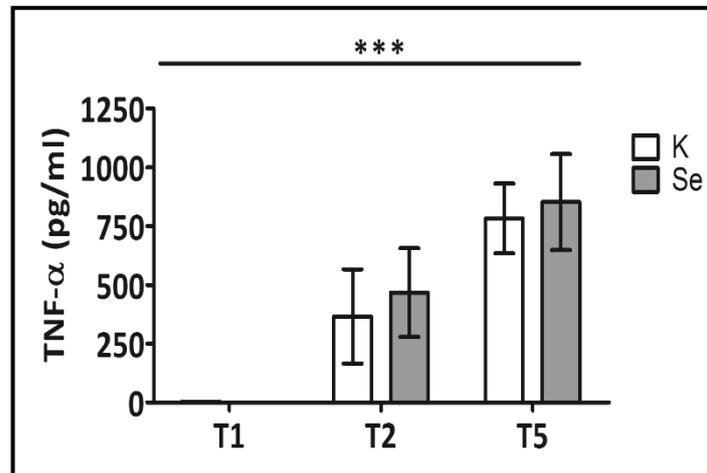


Abb. 29: TNF α -Serumspiegel der Kontroll- [Engels, 2013] und Natriumselenitgruppe an den Zeitpunkten T1, T2 und T5. K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Der TNF α -Gehalt ist angegeben in pg/ml. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. *** = $p < 0,001$ vs. Kontrollgruppe.

Tabelle 28: TNF- α Serumspiegel an den Zeitpunkten T1, T2 und T5

	T1	T2	T5
K	1,01 (\pm 0,81)	366,17 (\pm 185,78)	782,31 (\pm 136,98)
Se	0,00 (\pm 0,00)	467,80 (\pm 188,61)	852,30 (\pm 203,98)

K = Kontrolle [Engels, 2013], Se = Natriumselenit. T1 = vor Anschluss EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Der TNF- α -Gehalt ist angegeben in pg/ml. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

3.2.5.2 Proinflammatorische Zytokine im Gewebe

Cao *et al.* untersuchten IL-6- und TNF α -Spiegel in Herz und Plasma von Ratten vor und nach EKZ. Sie konnten zeigen, dass es im Rahmen der EKZ im Herzen zu einer starken Erhöhung von IL-6 und TNF- α kam (Cao *et al.*, 2013). Daher wurden in einem zweiten Schritt die IL-6- und TNF α -Spiegel aus den Organlysaten von Herz, Lunge, Leber und Nieren der vier Gruppen bestimmt. Auch dies geschah mithilfe eines kommerziell verfügbaren ELISA.

IL-6 im Gewebe

HERZ

Im Herzgewebe zeigte sich, dass der IL-6-Spiegel durch die Operation anstieg. Ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Natriumselenitgruppe sowohl bei den nicht operierten als auch bei den operierten Tieren war jedoch nicht zu beobachten (s. Abbildung 30 (A) und Tabelle 29).

LEBER

Die Fütterung mit Natriumselenit führte bei den nicht behandelten Tieren (NBSe) im Vergleich zur nicht behandelten Kontrollgruppe (NB) zu einem tendenziellen Anstieg der IL-6-Spiegel. Des Weiteren zeigte sich, dass die IL-6-Spiegel bei den operierten Natriumselenit-Tieren (Se) verglichen mit den nicht operierten Selenitieren (NBSe) signifikant anstiegen ($p = 0,0242$). Stellt man die operierten Gruppen gegenüber, so zeigten die operierten Natriumselenit-Tieren (Se) signifikant höhere IL-6-Spiegel als die operierten Kontrolltiere (K) ($p = 0,0262$) (s. Abbildung 30 (B) und Tabelle 29).

LUNGE

In den Lungen resultierte die Natriumselenitsupplementation bei den nicht behandelten Selenitieren (NBSe) in einer geringeren IL-6-Aktivität im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren (NB). Einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen gab es jedoch nicht. Durch die Operation stieg die IL-6-Aktivität in den Lungen sowohl bei den operierten Kontroll- (K) wie auch Natriumselenit-Tieren (Se) an. Zwischen den Tieren der beiden operierten Gruppen bestand kein Unterschied (s. Abbildung 30 (C) und Tabelle 29).

NIERE

In den Nierengeweben zeigten sich weder zwischen den nicht behandelten Tieren (NB vs. NBSe), den operierten Tieren (K vs. Se), noch den Gruppen untereinander Unterschiede. (s. Abbildung 30 (D) und Tabelle 29).

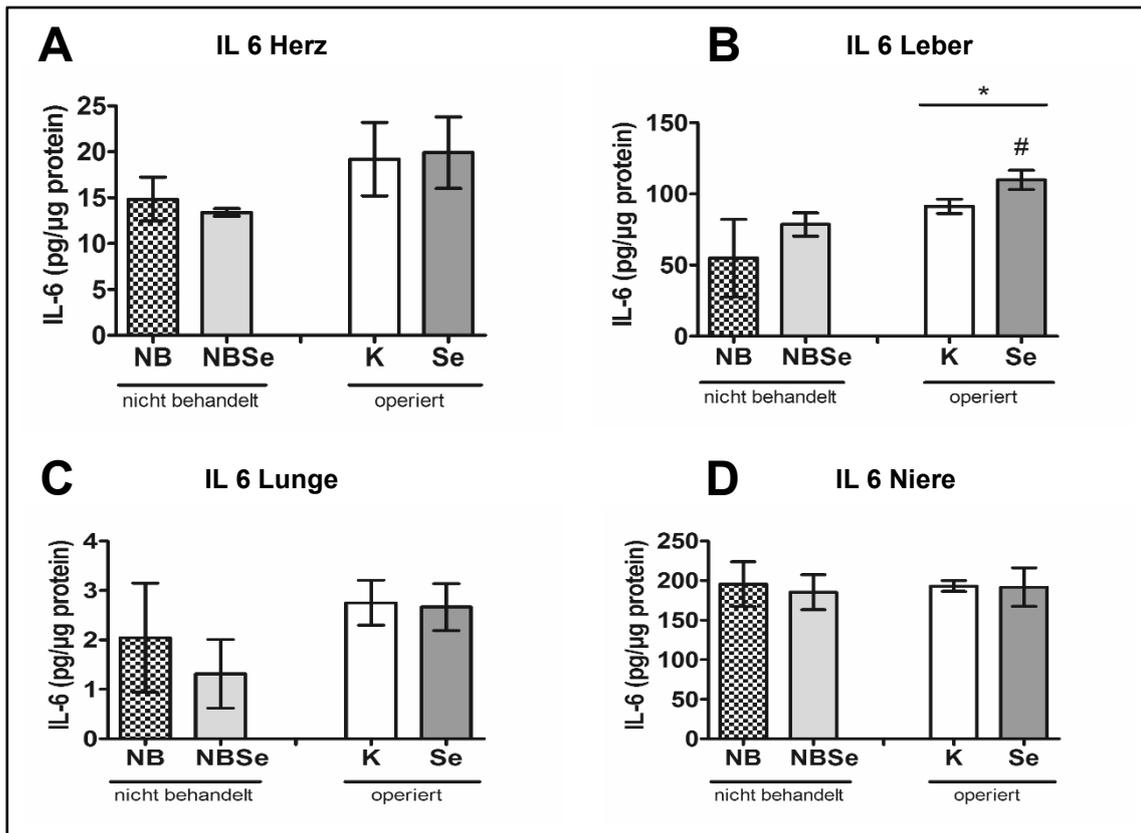


Abb. 30: IL-6-Spiegel im Gewebe der nicht behandelten und behandelten Kontroll- und Natriumselenitgruppe. NB = nicht behandelte Kontrolle, NBSe = nicht behandelt Selen, K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die IL-6-Gewebespiegel sind angegeben in pg/μg Protein. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von vier Tieren in der nicht behandelten Gruppe und sieben Tieren in der behandelten Gruppe. * = $p < 0,05$, # = $p < 0,05$ Se vs. nicht behandelte Selenitiere (NBSe).

Tabelle 29: IL-6 Gewebespiegel

	Herz	Lunge	Leber	Niere
NB	14,85 (± 2,38)	20,4 (± 1,10)	54,89 (± 27,21)	195,53 (± 28,31)
NBSe	13,40 (± 0,41)	1,32 (± 0,69)	78,51 (± 8,18)	185,35 (± 22,09)
K	19,2 (± 4,01)	2,75 (± 0,46)	91,23 (± 5,09)	193,09 (± 6,83)
Se	19,9 (± 3,90)	2,67 (± 0,47)	109,80 (± 6,72)	191,70 (± 24,42)

NB = nicht behandelte Kontrolltiere, NBSe = nicht behandelte Selenitiere, K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die IL-6-Gewebespiegel sind angegeben in pg/μg Protein. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von vier Tieren in der nicht behandelten Gruppe und sieben Tieren in der behandelten Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

TNF α im Gewebe

HERZ

Im Herzgewebe zeigte sich, dass der TNF α -Spiegel im Laufe der Operation tendenziell anstieg ($p = 0,07$). Zwischen den beiden nicht behandelten Gruppen traten keine wesentlichen Unterschiede auf. Bei den operierten Natriumselenit-Tieren (Se) war der TNF α -Spiegel tendenziell geringer als bei den operierten Kontrolltieren (K). Diese Differenz war jedoch nicht signifikant (s. Abbildung 31 (A) und Tabelle 30).

LEBER

Hier konnte gezeigt werden, dass die TNF α -Spiegel bei den nicht behandelten Selenitieren (NBSe) leicht erhöht waren im Vergleich zu denen der nicht behandelten Kontrolltiere (NB), der Unterschied jedoch nicht signifikant war. Bei den operierten Tieren (K und Se) war keine Differenz zwischen den beiden Gruppen zu sehen (s. Abbildung 31 (B) und Tabelle 30).

LUNGE

In den Lungengeweben zeigten sich nach hypothermer Ischämie und normothermer Reperfusion sowohl im Vergleich der beiden Kontrollgruppen untereinander (NB vs. K) als auch zwischen den beiden Natriumselenitgruppen (NBSe vs. Se) ein signifikanter Anstieg der TNF α -Spiegel. Die Werte der beiden nicht behandelten Gruppen unterschieden sich hingegen nicht. Die Tiere der operierten Selenitgruppe zeigten leichte, allerdings nicht signifikant erniedrigte TNF α -Spiegel verglichen mit der operierten Kontrollgruppe (K) (s. Abbildung 31 (C) und Tabelle 30).

NIERE

Auch in den Nieren waren die TNF α -Spiegel der nicht behandelten Selenitiere (NBSe) verglichen mit denen der nicht behandelten Kontrolltiere (NB) leicht erhöht. Innerhalb der operierten Tiergruppen gab es jedoch keine unterschiedlichen TNF α -Spiegel (s. Abbildung 31 (D) und Tabelle 30).

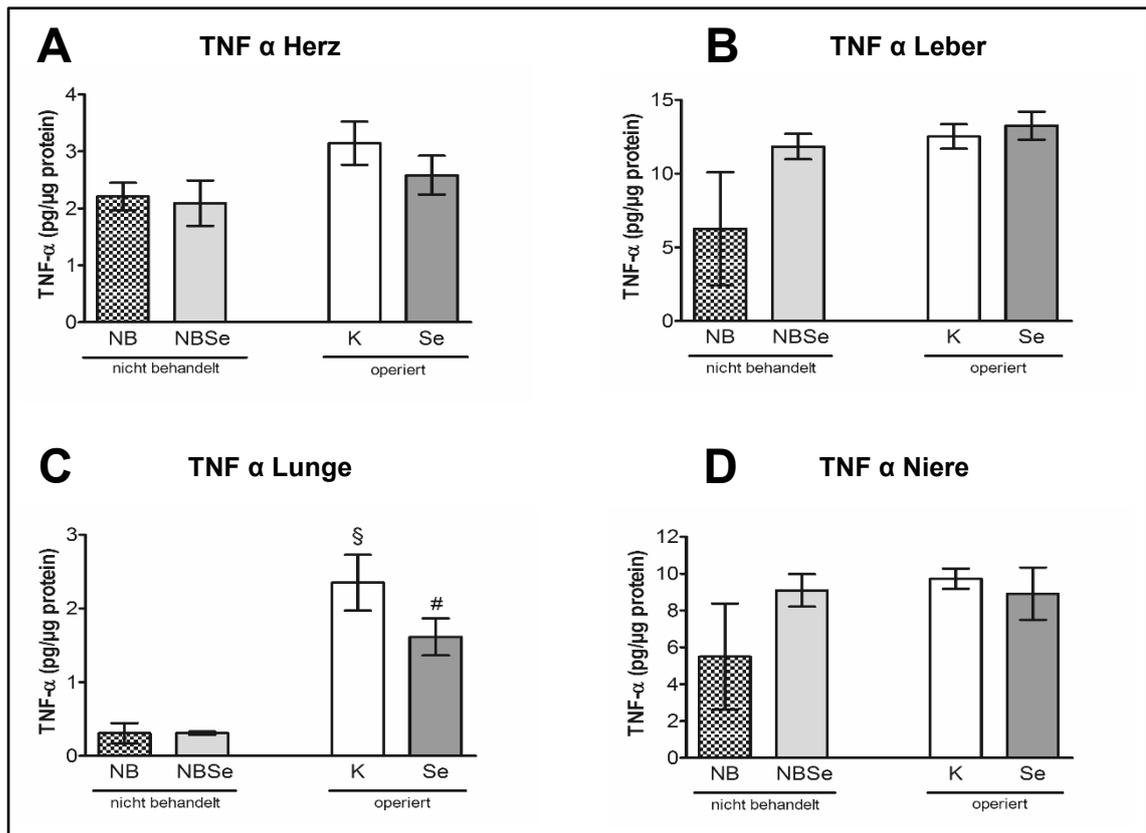


Abb. 31: TNF α -Spiegel im Gewebe der nicht behandelten und behandelten Kontroll – und Natriumselenitgruppe. NB = nicht behandelte Kontrolle, NBSe = nicht behandelte Selen, K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die TNF α -Gewebespiegel sind angegeben in pg/μg Protein. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier Tieren in der nicht behandelten Gruppe und sieben Tieren in der behandelten Gruppe. § = $p < 0,01$ vs. nicht behandelte Kontrollgruppe (NB). # = $p < 0,01$ vs. nicht behandelte Seleniere (NBSe).

Tabelle 30: TNF- α Gewebespiegel zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	Herz	Leber	Lunge	Niere
NB	2,21 (\pm 0,24)	6,26 (\pm 3,84)	0,31 (\pm 0,14)	5,49 (\pm 2,88)
NBSe	2,09 (\pm 0,40)	11,84 (\pm 0,86)	0,31 (\pm 0,02)	9,09 (\pm 0,89)
K	3,14 (\pm 0,38)	12,52 (\pm 0,83)	2,35 (\pm 0,38)	9,72 (\pm 0,55)
Se	2,58 (\pm 0,34)	13,25 (\pm 0,95)	1,61 (\pm 0,25)	8,91 (\pm 1,42)

NB = nicht behandelte Kontrolle, NBSe = nicht behandelte Selen, K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die TNF- α -Aktivität ist angegeben in pg/μg Protein. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier Tieren in der nicht behandelten Gruppe und sieben Tieren in der behandelten Gruppe.

3.2.6 Expression bzw. Phosphorylierung ausgewählter Stressproteine in Organen

Der Einfluss der Natriumselenitsupplementation auf molekulare, mit I/R in Zusammenhang stehende Signalwege hat, wurde mithilfe von Western Blots aus Herz-, Leber-, Lungen- sowie Nierenlysaten von Tieren der operierten Kontrollgruppe (K) sowie der operierten Natriumselenitgruppe (Se) untersucht. Betrachtet wurden hierbei die zuvor beschriebenen Proteine: Die Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2, die Expression der Hitze-Schock-Proteine HO-1 und HSP-70, sowie die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3.

Die Expressions-/Phosphorylierungsmuster der oben genannten Proteine werden im Folgenden für jedes einzelne Organ gesondert erläutert. Nach densitometrischer Auswertung der Western Blots zeigte sich häufig eine hohe Varianz innerhalb der Gruppen, weshalb die meisten Unterschiede nur tendenziell jedoch nicht signifikant waren.

HERZ

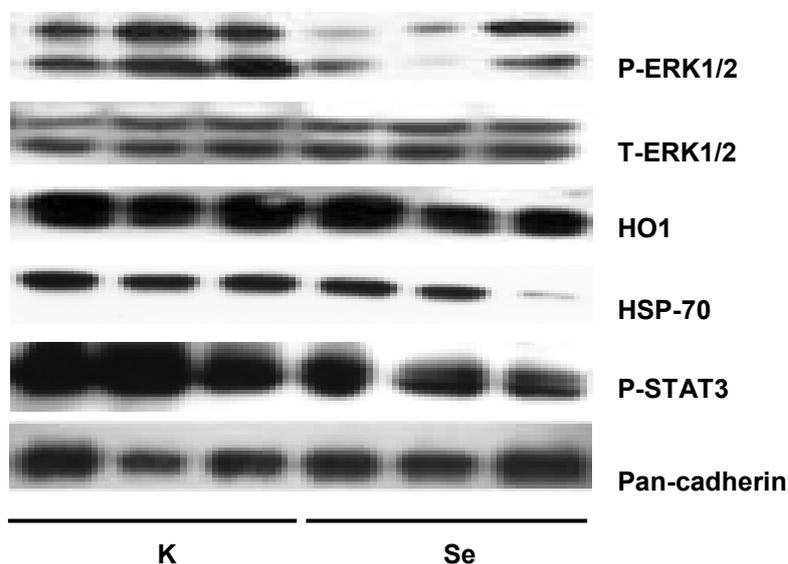


Abb. 32: Western Blots aus Herzlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Kontroll- und Natriumselenitgruppe. T-ERK 1/2 = total ERK 1/2 = phospho + non-phospho ERK1/2. Pan-Cadherin = Ladungskontrolle.

Im Herzen war die Phosphorylierung der MAPK Erk1/2 bei den Tieren der Natriumselenitgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ($p = 0,0175$; s. Abbildung 33 (A)). In der Expression des Hitze-Schock-Proteins HO-1 war kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellbar. Die Expression des Hitze-Schock-Proteins HSP-70 war in der Natriumselenitgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe ($p = 0,004$; s. Abbildung 33 (C)). Des Weiteren war eine tendenziell geringere, jedoch nicht signifikante Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 bei den Natriumselenit-Tieren zu beobachten ($p = 0,004$; s. Abbildung 33 (D)). Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind in Tabelle 31 aufgeführt.

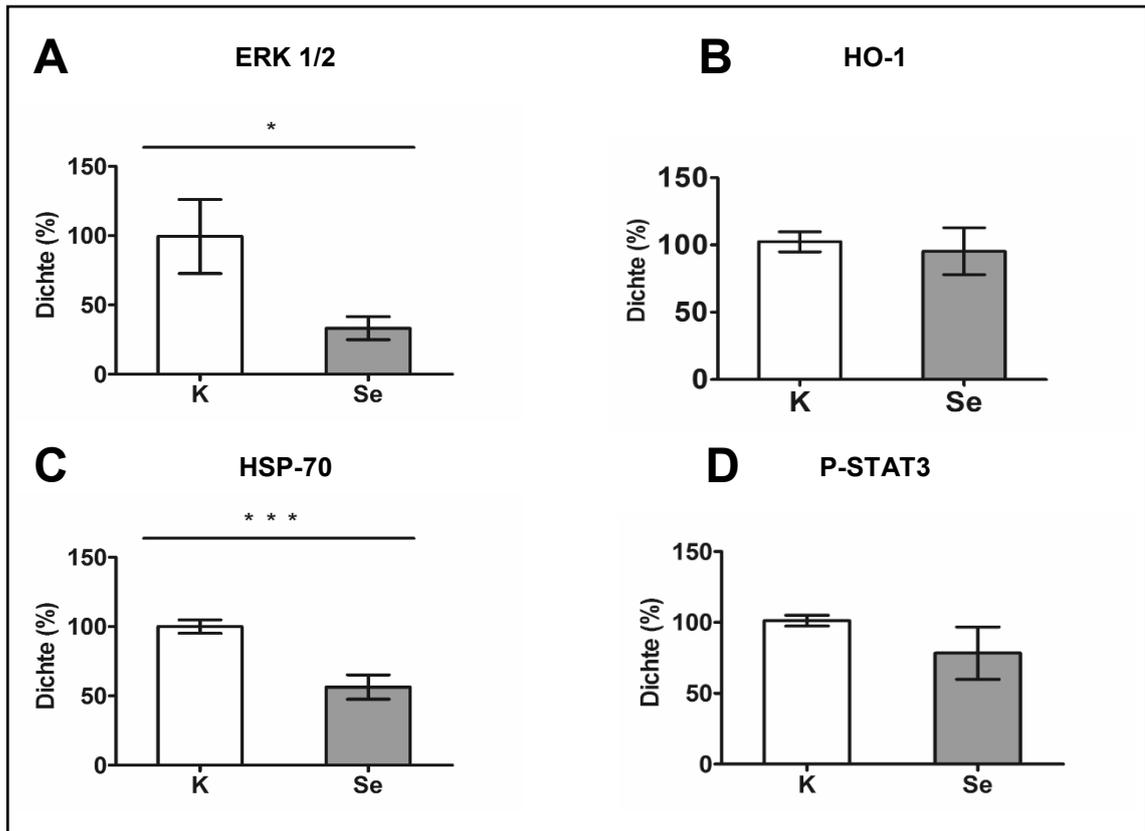


Abb. 33: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Herzlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Kontroll- und Natriumselenitgruppe. K = Kontrollgruppe, Se = Natriumselenitgruppe. ERK 1/2 = Extrazellulärregulierte Kinase, HO -1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren pro Gruppe. = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$ vs. Kontrollgruppe.

Tabelle 31: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Herzlysaten

	ERK 1/2	HO-1	HSP-70	P-STAT3
K	99,41 (\pm 26,69)	102,39 (\pm 7,39)	99,9 (\pm 4,83)	101,21 (\pm 3,79)
Se	33,23 (\pm 8,34)	95,34 (\pm 17,43)	64,43 (\pm 7,74)	78,34 (\pm 18,51)

K = Kontrollgruppe, Se = Natriumselenitgruppe. ERK = Extrazellulärregulierte Kinase, HO -1 = Häm-Oxygenase 1, HSP70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren pro Gruppe.

LEBER

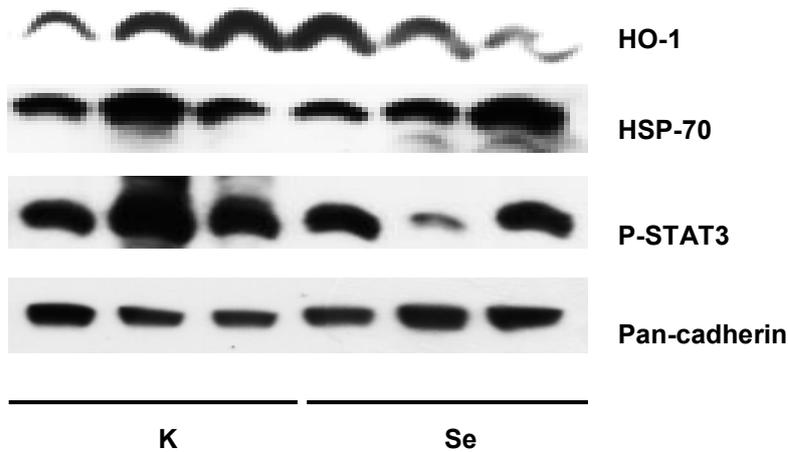


Abb. 34: Western Blots aus Leberlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Kontroll- und Natriumselenitgruppe. T-ERK 1/2 = total ERK 1/2 = phospho + non-phospho ERK1/2. Pan-Cadherin = Ladungskontrolle.

In der Leber konnten bei keinem der Proteine signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Gleichwohl sah man folgende Tendenzen: Die Expression der Hitzeschock-Proteine HO-1 und HSP-70 war in der Leber der Natriumselenit-Tiere tendenziell höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe (s. Abbildung 35 (A) und (B)). Auch eine tendenziell verstärkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 in der Natriumselenitgruppe war zu sehen (s. Abbildung 35 (C)). Eine Phosphorylierung von ERK1/2 war in der Leber nicht nachweisbar. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind in Tabelle 32 dargestellt.

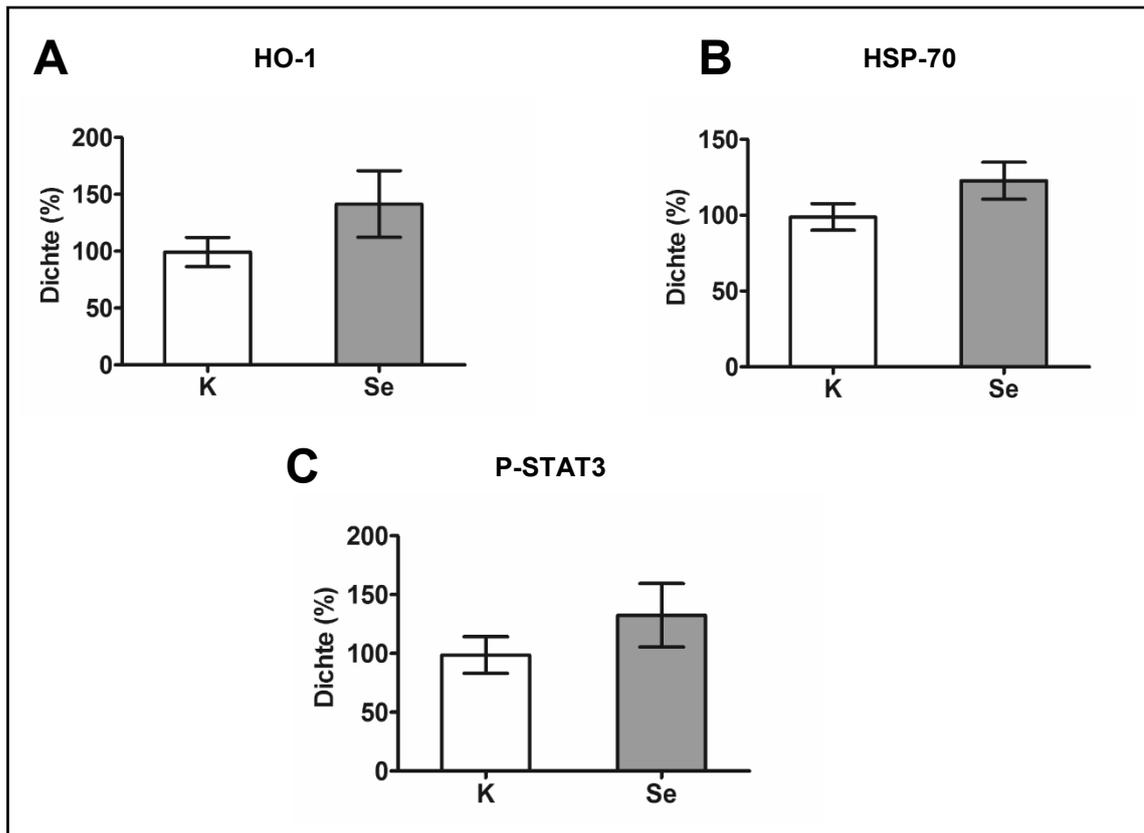


Abb. 35: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Leberlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Kontroll- und Natriumselenitgruppe. K = Kontrollgruppe, Se = Natriumselenitgruppe. ERK1/2 = Extrazellulärregulierte Kinase, HO -1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren pro Gruppe.

Tabelle 32: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Leberlysaten

	HO-1	HSP-70	P-STAT3
K	99,21 (\pm 12,83)	98,86 (\pm 8,66)	98,66 (\pm 15,55)
Se	141,44 (\pm 29,25)	122,77 (\pm 12,21)	132,41 (\pm 27,01)

K = Kontrollgruppe, Se = Natriumselenitgruppe. ERK 1/2 = Extrazellulärregulierte Kinase, HO -1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren pro Gruppe.

LUNGE

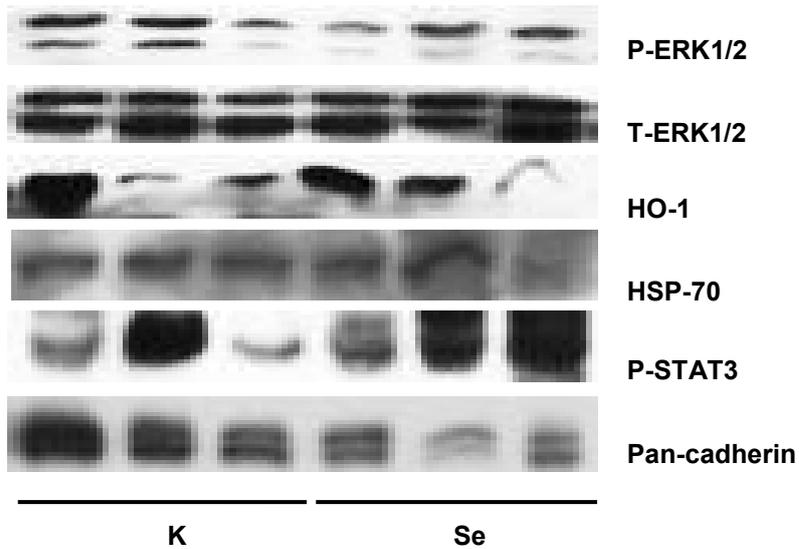


Abb. 36: Western Blots aus Lungenlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Kontroll- und Natriumselenitgruppe. T-ERK 1/2 = total ERK1/2 = phospho + non-phospho ERK1/2. Pan-Cadherin = Ladungskontrolle.

Bei der Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 zeigten sich hier keine Unterschiede zwischen den beiden analysierten Gruppen. Die Expression des Hitze-Schock-Proteins HO1 war zwar in der Natriumselenitgruppe tendenziell erhöht, die Unterschiede erreichten jedoch keine Signifikanz (s. Abbildung 37 (B)). Ebenso zeigte sich eine leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante Expression des Hitze-Schock-Proteins HSP-70 (s. Abbildung 37 (C)). In den Lungen der Natriumselenitgruppe konnte eine verstärkte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 beobachtet werden. Die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant (s. Abbildung 37 (D)).

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung können Tabelle 33 entnommen werden.

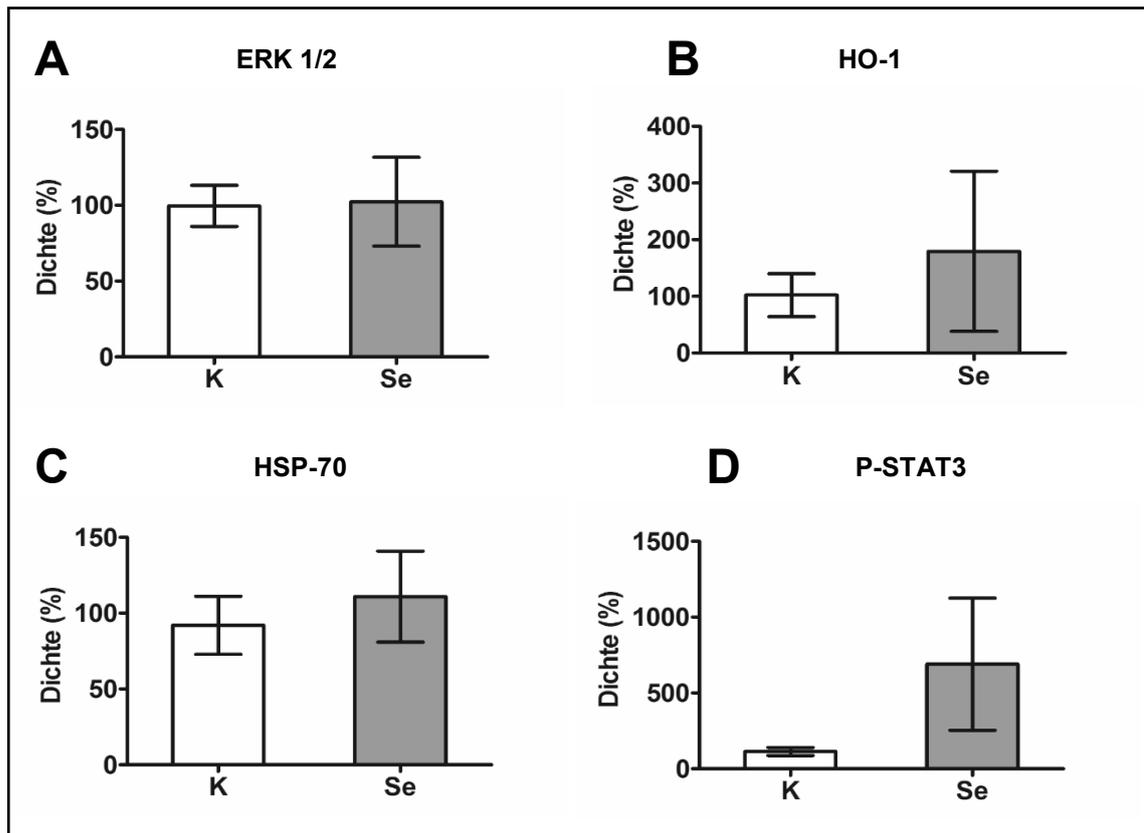


Abb. 37: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Lungenlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Kontroll- und Natriumselenitgruppe. K = Kontrollgruppe, Se = Natriumselenitgruppe. ERK1/2 = Extrazellulärregulierte Kinase, HO -1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren pro Gruppe.

Tabelle 33: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Lungenlysaten

	HO-1	HSP-70	P-STAT3
K	102,00 (\pm 37,97)	92,00 (\pm 19,15)	114,77 (\pm 26,40)
Se	179,50 (\pm 141,36)	110,99 (\pm 29,99)	690,26 (\pm 435,75)

K = Kontrollgruppe, Se = Natriumselenitgruppe. ERK 1/2 = Extrazellulärregulierte Kinase, HO-1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren pro Gruppe.

NIERE

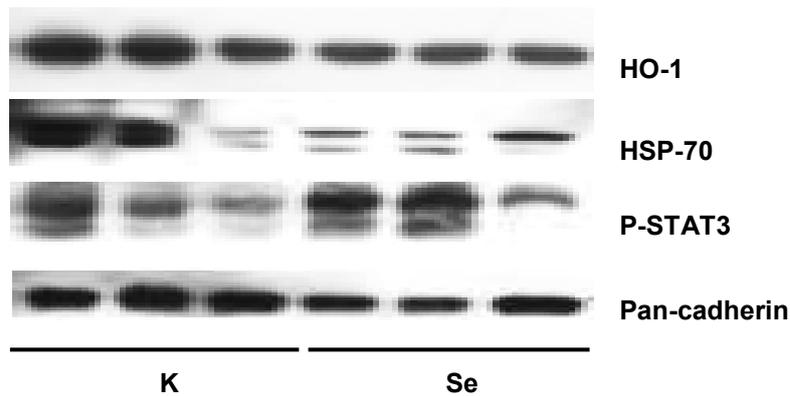


Abb. 38: Western Blots aus Nierenlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Kontroll- und Natriumselenitgruppe. T-ERK 1/2 = total ERK 1/2 = phospho + non-phospho ERK1/2. Pan-Cadherin = Ladungskontrolle.

In der Niere stellten sich bezüglich der Expression von HO-1 und HSP-70 zwischen den beiden untersuchten Gruppen keine deutlichen Unterschiede heraus. Auch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 zeigte zwischen der Kontroll- und der Natriumselenitgruppe keine sichtbaren Unterschiede. Die Western Blots sind in Abbildung 38, die densitometrische Auswertung in Abbildung 39 dargestellt. Die genauen Daten der densitometrischen Auswertung können Tabelle 34 entnommen werden.

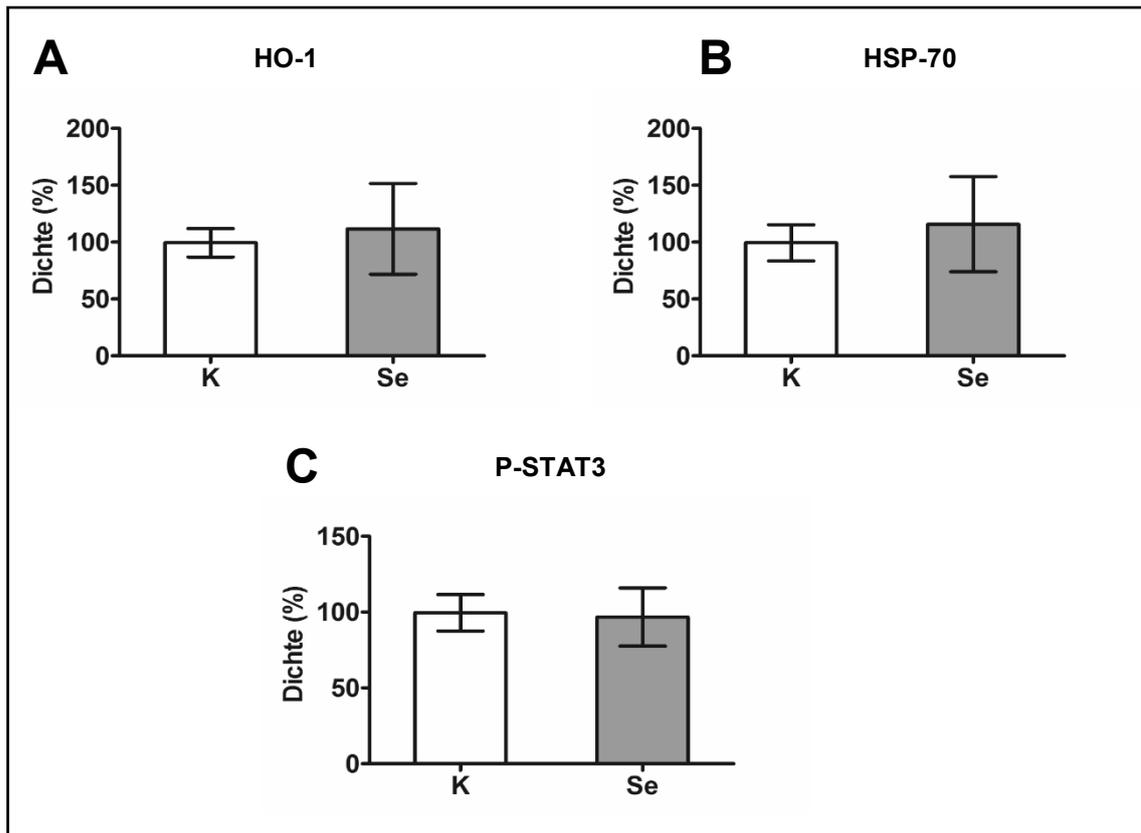


Abb. 39: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Nierenlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Kontroll- und Natriumselenitgruppe. K = Kontrollgruppe, Se = Natriumselenitgruppe. ERK 1/2 = Extrazellulärregulierte Kinase, HO -1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 7 Tieren pro Gruppe.

Tabelle 34: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Nierenlysaten

	HO-1	HSP-70	P-STAT3
K	99,46 (\pm 12,49)	99,40 (\pm 15,93)	99,53 (\pm 12,00)
Se	111,73 (\pm 39,92)	115,76 (\pm 41,84)	96,76 (\pm 19,20)

K = Kontrollgruppe, Se = Natriumselenitgruppe. ERK 1/2 = Extrazellulärregulierte Kinase, HO -1 = Häm-Oxygenase 1, HSP-70 = Hitze-Schock-Protein 70, P-STAT3 = Signal transducer and activator of transcription. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren pro Gruppe.

3.2.7 AKT-Elisa

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine Supplementation mit Natriumselenit einen positiven Einfluss auf die AKT Phosphorylierung hat. Hierzu wurde die AKT-Aktivität in Herz, Leber und Lunge der operierten Kontrolltiere mit der AKT-Aktivität der operierten Natriumselenit-Tiere verglichen.

Im Herzen war zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied in der AKT-Aktivität feststellbar (s. Abbildung 40 (A)). In der Leber führte die Natriumselenitsupplementation zu einer signifikanten Erhöhung der AKT Phosphorylierung ($p = 0,0111$; s. Abbildung 40 (B)). Auch in der Lunge konnte in der Natriumselenitgruppe eine signifikant erhöhte AKT-Aktivität beobachtet werden ($p = 0,0175$; s. Abbildung 40 (C)). Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 35 aufgeführt.

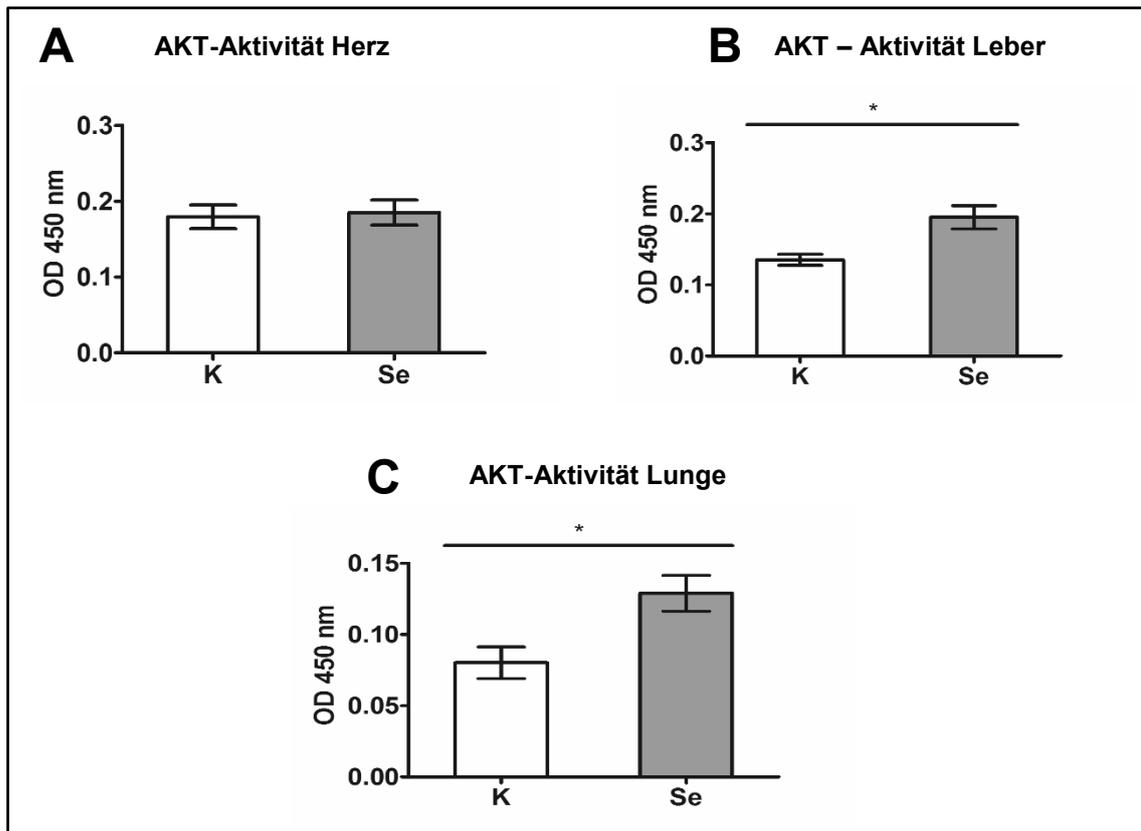


Abb. 40: AKT-Aktivität der Kontroll- und Natriumselenitgruppe. K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die AKT-Aktivität ist angegeben in OD 450 nm. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren in der behandelten Gruppe. * = $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

Tabelle 35: AKT-Aktivität während der EKZ

	Herz	Leber	Lunge
K	0,1793 (\pm 0,0156)	0,1351 (\pm 0,0077)	0,0801 (\pm 0,0111)
Se	0,1849 (\pm 0,0165)	0,1950 (\pm 0,0164)	0,1290 (\pm 0,0126)

K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die AKT-Aktivität ist angegeben in OD 450 nm. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier Tieren in der nicht behandelten Gruppe und sieben Tieren in der behandelten Gruppe.

3.2.8 Caspase 3/7-Assay

Caspasen spielen eine zentrale Rolle beim programmierten Zelltod (Apoptose). Um zu untersuchen, ob Natriumselenit einen positiven Einfluss auf die I/R-induzierte Caspase 3/7-Aktivität hat, wurde diese mithilfe eines kommerziell verfügbaren Aktivitätsassays in den Organlysaten von Herz, Leber, Lunge und Niere bestimmt. Die Ergebnisse können Abbildung 41 entnommen werden und werden im Folgenden organspezifisch beschrieben:

HERZ

Im Herzen kam es durch I/R zu einem signifikanten Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität in der operierten Kontrollgruppe (K) im Vergleich zu der nicht behandelten Kontrollgruppe (NB) ($p = 0,0171$). Die Caspase 3/7-Aktivität der Natriumselenit-Tiere (Se) war im Vergleich zu der Caspase 3/7-Aktivität der Kontrolltiere tendenziell erniedrigt (s. Abbildung 41 (A)).

LEBER

Auch in der Leber kam es bei den operierten Kontrolltieren (K) verglichen mit den nicht behandelten Kontrolltieren (NB) zu einem I/R-induzierten, signifikanten Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität ($p = 0,0061$). Auch die operierten Selenittiere (Se) zeigten im Vergleich zu den nicht behandelten Selenittieren (NBSe) einen durch I/R induzierten, signifikanten Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität. Vergleicht man die operierten Gruppen untereinander (K vs. Se), so zeigte sich eine signifikant erhöhte Caspase 3/7-Aktivität bei den Tieren der Natriumselenitgruppe (Se) ($p = 0,0061$) (s. Abbildung 41 (B)).

LUNGE

In der Lunge zeigte sich nach hypothermer Ischämie und normothermer Reperfusion sowohl im Vergleich der beiden Kontrollgruppen untereinander (NB vs. K) als auch zwischen den beiden Natriumselenitgruppen (NBSe vs. Se) ein signifikanter Anstieg der Caspase 3/7-Aktivität in den operierten Gruppen (NB vs. K: $p = 0,0061$; NBSe vs. Se: $p = 0,0121$). Stellt man die operierten Gruppen gegenüber, so zeigten die operierten Natriumselenit-Tiere (Se) eine tendenziell höhere Caspase 3/7-Aktivität als die operierten Kontrolltiere (K) (s. Abbildung 41 (C)).

NIERE

Hier zeigte sich zwischen den beiden Selenitgruppen (NBSe und Se) eine durch die Operation tendenziell niedrigere Caspase 3/7-Aktivität. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Bei den beiden operierten Tiergruppen (K und Se) war die Caspase 3/7-Aktivität bei den Tieren der Natriumselenitgruppe (Se) leicht, jedoch nicht signifikant erhöht (s. Abbildung 41 (D)).

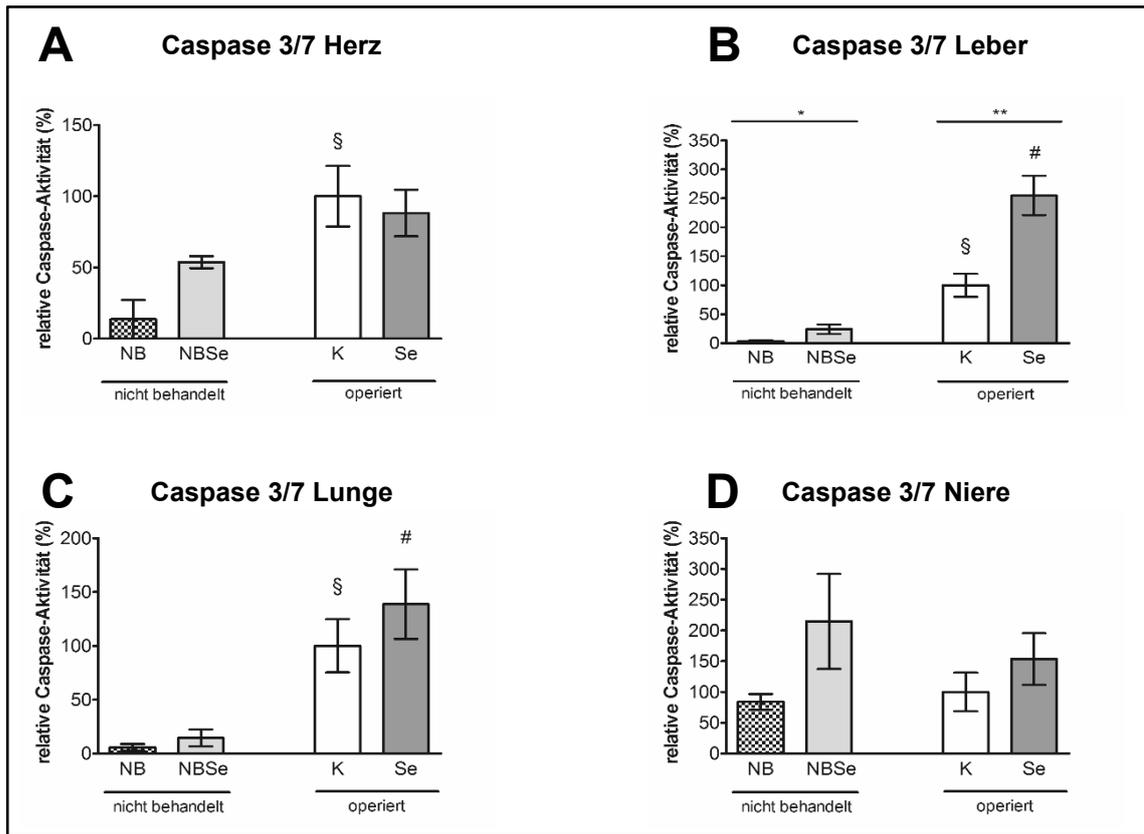


Abb. 41: Caspase 3/7-Aktivität der nicht behandelten und behandelten Kontroll- und Natriumselenitgruppe. NB = nicht behandelte Kontrolle, NBSe = nicht behandelt, Selen, K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die Caspase 3/7-Aktivität ist angegeben in %. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier Tieren in der nicht behandelten Gruppe und sieben Tieren in der behandelten Gruppe. * = $p < 0,05$. ** = $p < 0,01$. § $p < 0,05$ vs. nicht behandelte Kontrollgruppe. # $p < 0,05$ vs. nicht behandelte Natriumselenitgruppe.

Die genauen Daten können Tabelle 36 entnommen werden.

Tabelle 36: Caspase 3/7- Aktivität während der EKZ

	Herz	Leber	Lunge	Niere
NB	13,54 (\pm 13,54)	3,72 (\pm 1,32)	5,69 (\pm 3,18)	84,08 (\pm 12,58)
NBSe	53,64 (\pm 4,26)	24,07 (\pm 8,30)	14,43 (\pm 7,81)	214,67 (\pm 77,29)
K	100,00 (\pm 21,30)	100,00 (\pm 19,85)	99,99 (\pm 24,77)	100,00 (\pm 31,31)
Se	88,17 (\pm 16,39)	254,83 (\pm 33,97)	138,7 (\pm 32,25)	153,50 (\pm 42,10)

NB = nicht behandelte Kontrolle, NBSe = nicht behandelt, Selen, K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die Caspase 3/7-Aktivität ist angegeben in %. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier Tieren in der nicht behandelten Gruppe und sieben Tieren in der behandelten Gruppe.

3.2.9 Poly (Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase-Aktivität

Ebenfalls wurde der Einfluss von Natriumselenit auf die PARP-Aktivität in den Organen Herz, Leber und Niere untersucht. Hierfür wurde die PARP-Aktivität mithilfe eines kommerziell verfügbaren ELISA aus den Organlysaten von Herz, Leber und Niere bestimmt. In Abbildung 42 sind die Ergebnisse für die einzelnen, untersuchten Organe dargestellt und werden im Folgenden organspezifisch beschrieben:

HERZ

Im Herzen führte die Operation in beiden Gruppen zu einer erhöhten PARP-Aktivität bei den operierten Tieren (NB vs. K: $p = 0,0727$; NBSe vs. Se: $p = 0,0424$). Zwischen den beiden operierten Gruppen (K und Se) waren keine Unterschiede zu sehen (s. Abbildung 42 (A)).

LEBER

Hier war die PARP-Aktivität in den nicht behandelten Selenitieren (NBSe) verglichen mit den nicht behandelten Kontrolltieren (NB) tendenziell erhöht. Auch bei den operierten Tieren zeigten die Tiere der Natriumselenitgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere PARP-Aktivität. Keiner dieser Unterschiede erreichte jedoch Signifikanz (s. Abbildung 42 (B)).

NIERE

Zwischen den beiden nicht behandelten Gruppen (NB und NBSe) war keine Differenz der PARP-Aktivität sichtbar. Verglichen mit den nicht behandelten Tieren (NB und NBSe) zeigten die beiden operierten Tiergruppen (K und Se) eine erniedrigte PARP-Aktivität. Der Unterschied zwischen den nicht behandelten Selenitieren und den operierten Selenitieren erreichte Signifikanz (NBSe vs. Se: $p = 0,0242$). Die operierten Selenitiere (Se) wiesen, verglichen mit den operierten Kontrolltieren (K), eine niedrigere PARP-Aktivität auf (s. Abbildung 42 (C)). Die Daten sind in Tabelle 37 aufgeführt.

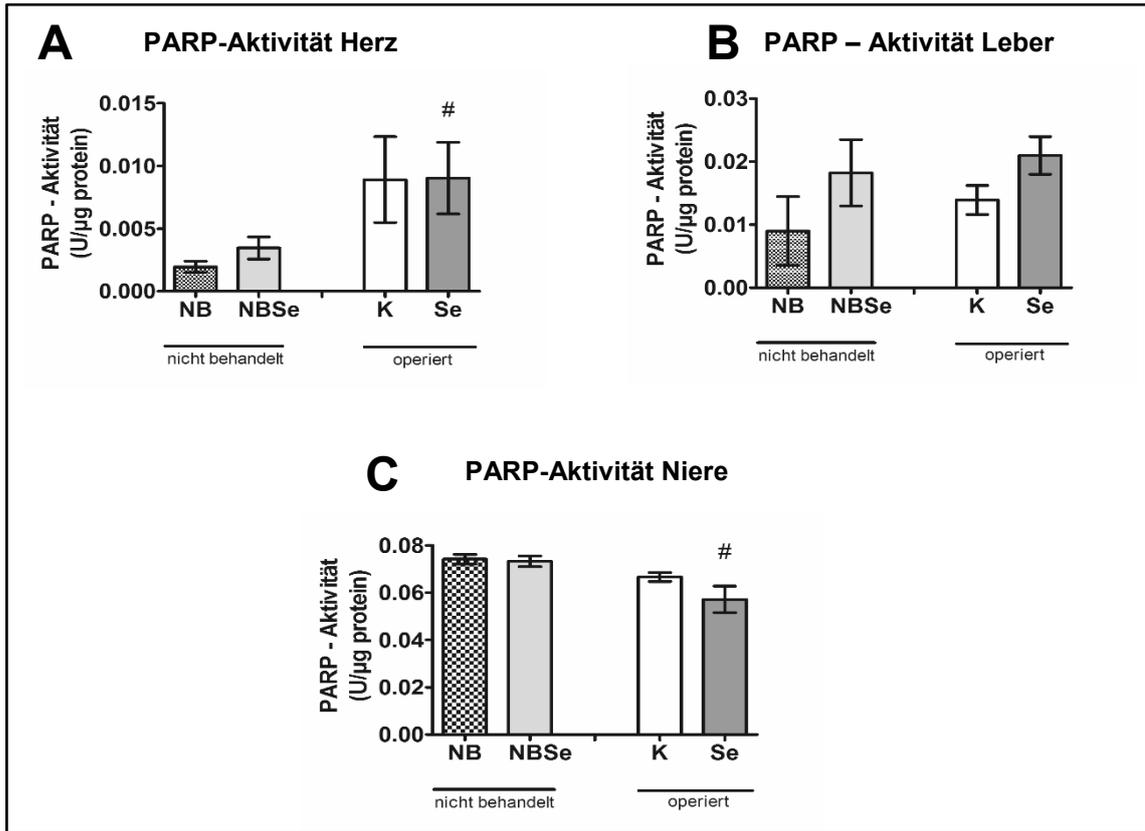


Abb. 42: PARP-Aktivität der nicht behandelten und behandelten Kontroll- und Natriumselenitgruppe. NB = nicht behandelte Kontrolle, NBSe = nicht behandelt, Selen, K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die PARP-Aktivität ist angegeben in U/μg Protein. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von 4 Tieren in der nicht behandelten Gruppe und 7 Tieren in der behandelten Gruppe.

Tabelle 37: PARP-Aktivität während der EKZ

	Herz	Leber	Niere
NB	0,002 (± 0,0004)	0,009 (± 0,0054)	0,0742 (± 0,0020)
NBSe	0,035 (± 0,0009)	0,0182 (± 0,0053)	0,0732 (± 0,0023)
K	0,0089 (± 0,0034)	0,0139 (± 0,0023)	0,0666 (± 0,0019)
Se	0,0090 (± 0,0029)	0,0210 (± 0,0030)	0,0571 (± 0,0056)

NB = nicht behandelte Kontrolle, NBSe = nicht behandelt, Selen, K = Kontrolle, Se = Natriumselenit. Die PARP-Aktivität ist angegeben in U/μg Protein. Die Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von vier Tieren in der nicht behandelten Gruppe und sieben Tieren in der behandelten Gruppe.

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit konnte anhand eines Tiermodells gezeigt werden, dass die präoperative Supplementierung mit Natriumselenit einen positiven Einfluss auf klinische Parameter des durch EKZ und DHCA induzierten I/R-Schadens hat.

Bei herzchirurgischen Eingriffen, die mit EKZ und DHCA durchgeführt werden, kommt es infolge der post-ischämischen Reperfusion nicht selten zu Multiorganschäden [Stoppe *et al.*, 2011]. Durch die EKZ und den DHCA bedingte systemische inflammatorische Prozesse sowie eine übersteigerte Produktion von ROS werden als Ursachen dieses I/R-Schadens postuliert [Prasad *et al.*, 2009]. Allerdings sind die dem I/R Schaden zugrundeliegenden Mechanismen und die darin involvierten Signalwege noch nicht vollständig verstanden, sodass Therapien, die dem I/R Schaden direkt entgegenwirken, noch immer fehlen. Bisherige Therapieansätze zielen darauf ab, die Aktivierung von Immunzellen und proinflammatorischen Signalkaskaden zu unterdrücken und eine übermäßige Bildung von ROS zu verhindern [Steinbrenner *et al.*, 2016]. Daher besteht die Notwendigkeit, neue Therapieansätze zur Vorbeugung und Behandlung des I/R-Schadens zu etablieren.

Bereits seit beinahe 80 Jahren wird an der Etablierung von EKZ-Tiermodellen gearbeitet [Gibbon, 1937]. Zu den in diesen Tiermodellen untersuchten Arten gehören u.a. Hunde, Schafe, Schweine und Kaninchen; damit sind jedoch zahlreiche experimentelle Probleme assoziiert. Lange Fortpflanzungsperioden, hohe Anschaffungs- und Haltungskosten sowie ein hoher Medikamentenbedarf gestalteten die Versuchsdurchführungen oft schwierig. Im Jahr 1966 wurde die erste EKZ an Ratten durchgeführt [Popovic *et al.*, 1966]. Durch die geringe Größe der Tiere verringerten sich die Anschaffungs- und Haltungskosten erheblich. Auch die geringe Fortpflanzungsdauer erwies sich von Vorteil, und die EKZ-Rattenmodelle wurden stetig weiterentwickelt und verbessert [Jungwirth *et al.*, 2006]. Um die molekularen Signalwege zu analysieren und geeignete Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, wird ein Tiermodell benötigt, das nicht nur zur Untersuchung einzelner Organe dient, sondern den Einfluss des I/R-Schadens auf den gesamten Organismus betrachtet. Daher wurde innerhalb unserer Arbeitsgruppe ein Tiermodell etabliert, das im Gegensatz zu dem von Jungwirth *et al.* verwendeten EKZ-Modell [Jungwirth *et al.*, 2006] die Möglichkeit bietet, unmittelbar im Anschluss an die Reperfusionphase sämtliche Organe zu entnehmen und diese zu untersuchen [Engels *et al.*, 2014]. Eine unmittelbare Übertragung dieses EKZ-Modells in den klinischen Alltag ist jedoch kritisch zu betrachten. Bei den hier verwendeten Tieren handelt es sich um junge und gesunde Tiere, die keinerlei Vorerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus oder arteriosklerotische Veränderungen der Gefäße haben und ausschließlich männlich sind. Die Patienten im klinischen Alltag sind jedoch meist alt und multimorbide und sowohl männlichen wie auch weiblichen Geschlechts. Ein weiterer Kritikpunkt dieses Modells ist, dass anstelle der A. femoralis die A. sacralis mediana, die direkt in die Aorta descendens übergeht, verwendet wird. Grund hierfür ist einerseits, dass eine Verwendung der A. femoralis als arterieller Zugangsweg der EKZ zu Ischämien des betroffenen Beines führt. Andererseits kann somit eine Thorakotomie mit unmittelbarer Kanülierung kardialer Gefäßabschnitte umgangen werden, die bei Ratten häufig zu einer postoperativ eingeschränkten Beweglichkeit der Brustmuskulatur führt und somit die ausreichende Aufnahme von Futter behindern kann [Grocott *et al.*, 2001]. Vorteil dieser Vorgehensweise ist außerdem, dass das massive Gewebetrauma, welches zu Entzündungsreaktionen führen kann, verhindert wird. Auch ermöglicht dieses Modell eine Blutflussrate von 160 bis

180/kg1/min-1. Dies entspricht dem physiologischen Herzzeitvolumen einer Ratte sowie im klinischen Alltag verwendeten EKZ-Blutflüssen von 100 bis 150ml/kg/min [Jungwirth *et al.*, 2006].

Das von uns etablierte EKZ-Modell bietet eine klinik-nahe Möglichkeit, sowohl systemische Auswirkungen des I/R-Schadens als auch molekulare Veränderungen in einzelnen inneren Organen unmittelbar im Anschluss an den kardiovaskulären Eingriff zu untersuchen.

4.1 Vorversuche zur Effizienz und Sicherheit einer Supplementierung mit Natriumselenit

Eine exzessive Produktion von ROS ist maßgeblich an der Entstehung des I/R-Schadens beteiligt [Prasad *et al.*, 2009]. ROS können oxidativen Stress verursachen, wobei zelluläre Makromoleküle wie DNA, Lipide und Proteine oxidiert und dadurch funktionell inaktiviert bzw. denaturiert werden; so können z.B. in der DNA einzelne Basen oxidiert und Strangbrüche induziert werden [Sies, 1993]. Diese Mechanismen können zu einer irreversiblen Schädigung der bereits ischämischen Gewebe bis hin zu Multiorganversagen und schlimmstenfalls zum Tod des Patienten führen [Eltzschig *et al.*, 2004]. Aufgrund der durch Selenoproteine und insbesondere Selenoenzyme wie die Glutathionperoxidasen vermittelten anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von Selen, stellt die orale oder intravenöse Gabe von Selenpräparaten eine potenzielle Therapiemöglichkeit zur Verringerung des I/R-Schadens dar [Guo *et al.*, 2012]. Dementsprechend wurde der Einfluss einer Selensupplementation auf den I/R-Schaden bereits in vielen Studien untersucht. Eine Studie von Angstwurm *et al.* an SIRS-Patienten zeigte, dass ein niedriger Selenstatus in engem Zusammenhang mit einer erhöhten Mortalität und Morbidität steht [Angstwurm *et al.*, 2007]. Aus diesem Grund wird angenommen, dass durch die Gabe von Selen oxidativer Stress vermindert und somit die Morbiditäts- und Mortalitätsrate nach kardiovaskulären Eingriffen minimiert werden kann [Liu *et al.*, 2000]. Allerdings wurde neben ihren zytotoxischen Effekten auch eine weitere Funktion der ROS als Mediatoren des sogenannten „Redox-Signaling“ entdeckt, die in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus wissenschaftlichen Interesses gerückt ist. Als Signalmoleküle stimulieren ROS als Reaktion auf Ischämien in der Reperfusionphase die Angiogenese [Maulik & Das, 2002]. Eine Studie von Watanabe *et al.* zeigte nun kürzlich, dass ROS die Bildung von Glutathion-Komplexen (durch Reaktion von redox-sensitiven Cysteinresten in Proteinen mit GSH; *S-Glutathionylation*) förderten, wodurch die Angiogenese in ischämischer Muskulatur unterstützt wurde [Watanabe *et al.*, 2016].

Selen ist ein wichtiges Spurenelement, dessen anti-oxidative und anti-inflammatorische Eigenschaften vor allem durch Selenoenzyme vermittelt werden. In experimentellen wie auch klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Supplementierung mit Selen einen protektiven Effekt auf das nach kardiovaskulären Eingriffen durch I/R geschädigte Myokard hat [Guo *et al.*, 2012]. In den meisten europäischen Ländern beträgt die durchschnittliche Aufnahme von Selen < 50µg pro Tag, zu wenig, um eine Sättigung der Aktivität bzw. Konzentration der Selenoproteine GPx und Selenoprotein P im Blut sicherzustellen [Flynn *et al.*, 2009]. Selenoprotein P dient aufgrund seines hohen Selengehaltes als Plasmatransportprotein von Selen und ist somit maßgeblich an der Verteilung von Selen im Organismus beteiligt [Hill *et al.*, 2003]. Ein Mangel an Selenoprotein P aufgrund einer geringen Selenaufnahme hat somit Auswirkungen auf die Verteilung von Selen im Organismus und führt zu einem *circulus vitiosus*. Studien an Patienten mit einem SIRS/Sepsis-Syndrom zeigten, dass niedrige Selenspiegel mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität korrelieren [Sakr *et al.*, 2007; Angstwurm *et al.*, 2007]. Es wird

jedoch vermutet, dass die Wirkung dieses Therapieansatzes nicht die antioxidativen, zytoprotektiven Effekte von Selen nutzt, die durch die Biosynthese von Selenoproteinen entstehen, sondern vielmehr auf den prooxidativen, zytotoxischen Effekten der Hochdosis-Selentherapie beruht [Forceville X, 2013]. In humanen promyelotischen Leukämiezellen konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe von Natriumselenit zu einer erhöhten Bildung von ROS führte und dies zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs führte [Guan *et al.*, 2009]. Folglich ist es wichtig, die durch die Biosynthese von Selenoproteinen entstehenden antioxidativen und somit zytoprotektiven Effekte von den prooxidativen, zytotoxischen Wirkungen hoher Selendosen abzugrenzen.

Um den Plasma-Selenspiegel auf ein adäquates Level zu bringen und somit den Zellen einen ausreichenden anti-oxidativen Schutz zu bieten, besteht die Möglichkeit einer Supplementierung mit Selen. Die Applikation von Selen kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen: In Akutsituationen z.B.: im Rahmen von kardiovaskulären Notfallmaßnahmen kann durch Gabe von Selenverbindungen mit einer hohen Bioverfügbarkeit versucht werden, dem oxidativen Stress entgegenzuwirken [Byers & Perry, 1992]. Zu diesen Selenverbindungen gehört bspw. das GPx-Mimetikum Ebselen, welches intraperitoneal appliziert werden kann und sich aufgrund seiner guten Bioverfügbarkeit, seiner geringen Toxizität sowie seiner anti-inflammatorischen, anti-oxidativen und zytoprotektiven Eigenschaften hervorragend für eine akute Intervention eignet [Hoshida *et al.*, 1994; Schewe, 1995; Kalayci *et al.*, 2005]. Im Rahmen von elektiven Eingriffen gibt es jedoch auch die Möglichkeit, Selen prophylaktisch über die Nahrung zu supplementieren und durch die somit erhöhte Selenkonzentration die Synthese von Selenoproteinen zu fördern. Aufgrund der anti-oxidativen, anti-inflammatorischen und anti-apoptischen Eigenschaften von Natriumselenit, scheint eine Supplementierung mit Natriumselenit ein geeigneter Therapieansatz zu sein, um dem I/R-Schaden entgegen zu wirken. Hier muss jedoch auch die Dosisabhängigkeit berücksichtigt werden, da Natriumselenit in höheren Konzentrationen als sogenannter „*redox-recycler*“ und damit pro-oxidativ anstatt anti-oxidativ wirken kann.

Um herauszufinden, ob eine Fütterung der Tiere mit Natriumselenit-angereichertem Futter in einer Akkumulation von Selen und folglich in einer vermehrten Biosynthese von Selenoproteinen (hier beurteilt anhand der GPx-Aktivität) in ausgewählten Organen resultiert, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt. In diesen Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Supplementierung mit Natriumselenit einen positiven Einfluss auf die Synthese von Selenoproteinen hatte und deren Aktivität in den untersuchten Organen steigern konnte. Eine Substitution mit Natriumselenit in der Nahrung führte zu einer erhöhten GPx-Aktivität im Gewebe aller vier untersuchten Organe (Herz, Lunge, Leber, Niere). Dies ist konkordant mit Ergebnissen in der Literatur. 1972 zeigte Rotruck bereits, dass die Gabe von Selen die GPx-Aktivität in selendefizienten Ratten erhöhte [Rotruck *et al.*, 1972].

Weiterhin wurden bei den für die Vorversuche ausgewählten Tieren klinisch-chemische Parameter und das Expressions-/Phosphorylierungsmuster ausgesuchter Stressproteine untersucht:

4.1.1 Blutwerte

Klinisch gesehen kann das Ausmaß eines I/R-Schadens auf die Leber über die Enzyme ALT, AST und LDH gemessen werden. Während die ALT vor allem im Zytosol der Hepatozyten zu finden ist und erhöhte ALT-Werte im Plasma/Serum daher als Marker für eine akute Leberschädigung gelten, kommen die AST und die LDH, die auch als Hämolyseparameter verwendet wird, auch im Herz- und Skelettmuskel vor. Eine Erhöhung der Blutwerte dieser Enzyme ist Zeichen einer Permeabilitätsstörung

der Zellmembran und mit nekrotischem Zelltod assoziiert [Lepper & Dufour, 2009]. Die Gabe von mit Natriumselenit angereichertem Futter führte zu einer signifikanten Verringerung der Enzyme ALT und AST im Blut. Im Rahmen der Vorversuche zeigte sich auch eine nach Natriumselenitsupplementation tendenziell niedrigere LDH-Konzentration im Vergleich zu den selenadäquat ernährten Tieren. Des Weiteren konnte in den Natriumselenit-supplementierten Tieren (NBSe) ein Anstieg der Troponin-Plasmaspiegel beobachtet werden. Eine Erhöhung der CK-MB über 0,1ng/ml konnte jedoch in keiner der beiden Gruppen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen auf gewebsspezifische Effekte des Selens hin. Es ist anzunehmen, dass die gemessene Aktivität von ALT, AST und LDH zu einem großen Teil aus der Leber kommt, während das Troponin die Effekte der Selengabe auf das Herz widerspiegelt. Zwar ist offene Selentoxizität bei Ratten erst ab 5 ppm gefunden worden [Jia *et al.*, 2005], jedoch zeigte eine Studie von Raines und Sunde, dass es ab einer Substitution von 2ppm Selen in Form von Selenit zu einem Anstieg der Leberwerte ALT und AST kommt [Raines & Sunde, 2011]. Möglich ist, dass das Herz empfindlicher auf Selenit reagiert als die Leber und bereits ab 1 ppm eine (leichte) Toxizität erkennbar ist. Dies würde den Anstieg von Troponin bei den basalen Selenitieren (NBSe) erklären. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass die Leber im Gegensatz zum Herzen ein Hauptproduzent des sezernierten Selenoproteins Selenoprotein P [Dreher *et al.*, 1997] sowie von zur Exkretion bestimmten Selenmetaboliten wie z.B. Selenozuckern und methylierten Selenverbindungen ist. Damit könnte die Leber in der Lage sein, höhere Dosen Selen zu tolerieren. Nachfolgende Studien sollten daher die Auswirkungen verschiedener Selendosen und verschiedener Selenverbindungen auf die Aktivität von ALT, AST, LDH und Troponin untersuchen.

Eine weitere Folge von I/R stellen Veränderungen am Expressions- und Phosphorylierungsmuster von Stressproteinen dar. Kardiovaskuläre Operationen mit EKZ und DHCA führen zu Stresszuständen im gesamten Organismus. Stressoren wie z.B. Ischämie, Dehnung der Gefäßwände oder die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen führen zur Aktivierung molekularer Signalkaskaden. Von entscheidender Bedeutung für die durch I/R -vermittelten Signalwege sind der MAPK-, der JAK/STAT- sowie der PI3K/Akt-Signalweg. Diesen Signalwegen kommt eine wichtige Rolle im Rahmen physiologischer und auch pathologischer Prozesse wie z.B. Entzündungsreaktionen, Stress, Apoptose, Zelldifferenzierung und -wachstum zu [Zhao *et al.*, 2015]:

4.1.2 MAPK

Die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)-Erk, p38-MAPK und JNK-werden durch viele verschiedene Stressoren wie beispielsweise Ischämie, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormone und oxidativen Stress aktiviert [Toledo-Pereyra *et al.*, 2008]. Die während herzchirurgischer Eingriffe entstehende Ischämie, Freisetzung vasoaktiver Substanzen, vermehrte Produktion von ROS sowie die Dehnung des Myokards führen zur Aktivierung der MAPK-Signalwege. Deren Aktivierung wiederum kann in einem Sistieren des Zellwachstums und letztendlich Zelltod resultieren [Dabrowski *et al.*, 2000]. Anders als JNK und p38 besitzt die ERK anti-apoptotische Eigenschaften und begünstigt Zellwachstum, -differenzierung und -überleben [Xia *et al.*, 1995]. Dabrowski *et al.* beschrieben, dass Stresszustände im Organismus zur Apoptose und einer verminderten Phosphorylierung (Aktivität) von ERK 1/2 führten [Dabrowski *et al.*, 2000]. Eine verminderte Phosphorylierung von ERK führt allerdings nicht direkt zur Apoptose [Tran *et al.*, 2001], sondern vielmehr zu einer vermehrten Phosphorylierung von JNK und p38 [Park *et al.*, 2002]. Valladares *et al.* zeigten, dass durch eine Inhibition der p38 MAPK die durch TNF-

α induzierte Apoptose stark reduziert wird, während eine Inhibierung der ERK die durch TNF- α induzierte Apoptose verstärkt [Valladares *et al.*, 2000]. Folglich kommt es unter physiologischen Bedingungen zu einem Gleichgewicht zwischen der Aktivität von ERK 1/2, die Zellwachstum und -differenzierung fördern, und den Apoptose begünstigenden JNK/p38 MAPK. Dies verdeutlicht, dass die Apoptose nicht durch die Inhibierung oder Aktivierung eines bestimmten MAPK-Signalwegs induziert wird, sondern durch komplexe Verknüpfungen der einzelnen Signalwege untereinander zustande kommt. Khan *et al.* beschrieben, dass die nach EKZ mit DHCA verminderte ERK-Phosphorylierung zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und mikrovaskulären Dysfunktion führt [Khan *et al.*, 2004]. Es wird vermutet, dass die nach kardiovaskulären Eingriffen entstehenden kardialen und pulmonalen Komplikationen als Folge einer vermehrten pulmonalen Gefäßpermeabilität sowie eines myokardialen Reperfusionsschadens durch MAPK-Signalkaskaden vermittelt werden [Khan *et al.*, 2004].

Des Weiteren vermitteln MAPK-Signalkaskaden die durch EKZ und DHCA induzierte Entzündungsreaktion. Teil dieser Entzündungsreaktion ist eine durch MAPK induzierte vermehrte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Hashimoto *et al.* beobachteten, dass die Aktivierung der p38-MAPK eine essentielle Rolle im Rahmen der durch TNF- α und IL-1-Signalkaskaden aktivierte IL-8-Genexpression spielt [Hashimoto *et al.*, 1999]. Craig *et al.* beobachteten an einem Zellmodell mit Ratten-Kardiomyozyten, dass eine vermehrte Aktivierung der p38-MAPK zu einer gesteigerten IL-6-Genexpression führt [Craig *et al.*, 2000]. Eine Studie von Meldrum *et al.* zeigte, dass es über eine Verringerung der kardialen Kontraktilität und eine Apoptoseinduktion in Kardiomyozyten zu einer vermehrten Produktion von TNF- α kommt und dies folglich zur Aggravation der postischämischen kardialen Dysfunktion führt. Auch führt I/R im Myokard zu einer Aktivierung von p38 MAPK sowie NF κ B und infolgedessen zu einer vermehrten TNF- α Produktion [Meldrum *et al.*, 1998]. Im Rahmen von I/R entstandene ROS können eine p38-Aktivierung bewirken und somit zu einer vermehrten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führen [Zhao *et al.*, 2015]. Neben den MAPK-Signalwegen ist auch der JAK/STAT-Signalweg maßgeblich an der durch Zytokine-vermittelten Immunantwort beteiligt. In einem Maus-Modell zeigten Takeda *et al.*, dass eine fehlende STAT3-Expression in Mäusen zu einer vermehrten Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1, IL-6 und INF- γ führt. Ursache hierfür ist die Tatsache, dass eine Aktivierung von STAT 3 für die durch IL-10 vermittelten anti-inflammatorischen Effekte notwendig ist [Berg *et al.*, 1996]. Durch eine verminderte IL-10-Produktion wird die suppressive Wirkung von IL-10 auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine aufgehoben und Makrophagen und Neutrophile produzieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine [Takeda *et al.*, 1999].

ERK

In den Vorversuchen ohne EKZ und DHCA führte die fünfwöchige Natriumselenitsupplementation zu einem deutlichen Anstieg der Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 in den Herzen und Lungen aller Tiere verglichen mit den selenadäquat ernährten Tieren. Stresssituationen wie sie im Rahmen kardiovaskulärer Eingriffe entstehen, können MAPK-Signalkaskaden aktivieren. Einer dieser MAPK Signalwege, der Einfluss auf das kardiovaskuläre System hat, ist der ERK1/2 Signalweg. Stressauslösende Faktoren wie die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, eine vermehrte Schubspannung, Wachstumsfaktoren oder vasoaktive Substanzen führen zu einer Aktivierung von Raf, einer MAPKKK, die die MAPKK MEK1/2 aktiviert, welche wiederum zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung von Erk1/2 führt. ERK1/2 wiederum reguliert die Permeabilität des Gefäßendothels,

die Zytokinproduktion, vasomotorische Funktionen und nimmt Einfluss auf den I/R-Schaden. Khan *et al.* konnten zeigen, dass kardiochirurgische Eingriffe mit EKZ und DHCA zu einer vermehrten ERK-Phosphorylierung im Myokard führen. Als Folgen dieser vermehrten ERK-Phosphorylierung im Myokard werden die nach EKZ häufig auftretenden koronaren, mikrovaskulären Dysfunktionen sowie eine erhöhte pulmonale Gefäßpermeabilität postuliert [Khan *et al.*, 2004]. Eine bereits ohne operativen Eingriff vermehrte Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 in den Herzen und Lungen aller nicht operierten selensupplementierten Tiere könnte somit einen positiven Effekt in Hinsicht einer Präkonditionierung gegen den I/R-Schaden darstellen.

JAK/STAT

Ein weiterer Signalweg, der im Rahmen von I/R eine bedeutende Rolle spielt ist der JAK/STAT-Signalweg. Wie auch bei der Aktivierung der MAPK-Signalkaskaden wird der JAK2/STAT3-Signalweg durch Zytokine (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6) und Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF, CSF) aktiviert und spielt somit eine essentielle Rolle im Rahmen von Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose [Zhao *et al.*, 2015]. Dem beteiligten Transkriptionsfaktor STAT-3 konnten kardioprotektive Effekte zugewiesen werden. In einem Zellmodell an Ratten-Kardiomyozyten konnten Negoro *et al.* nachweisen, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 durch Induktion der Manganhaltigen Superoxid-Dismutase (MnSOD) eine protektive Wirkung auf durch I/R geschädigte Kardiomyozyten entfaltet und diese vor oxidativem Stress schützt [Negoro *et al.*, 2001]. Eine Studie von Kunisada *et al.* zeigte, dass eine Aktivierung von STAT 3 durch Induktion kardialer Schutzfaktoren protektiv auf die durch Doxorubicin-induzierte Kardiomyopathie wirkt [Kunisada *et al.*, 2001]. Im Jahr 2000 zeigten Negoro *et al.* an einem Myokardinfarkt-Modell an Ratten, dass die Gabe eines JAK2-Inhibitors die Lebensfähigkeit der bereits geschädigten Kardiomyozyten verringert. Sie schlussfolgerten, dass der JAK/STAT-Signalweg im Rahmen eines Myokardinfarkts aktiviert wird und eine entscheidende zytoprotektive Rolle einnimmt [Negoro *et al.*, 2000]. Auch führt die Aktivierung von STAT3 während I/R zu einer niedrigeren Apoptoserate. In einer Studie mit STAT3-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Apoptoserate nach I/R in den Kardiomyozyten der STAT3-defizienten Mäuse gegenüber den Kontrolltieren beträchtlich erhöht war [Smith *et al.*, 2004]. Allerdings scheinen STAT3 und STAT5 bei Mensch und Tier spiegelverkehrte Rollen einzunehmen: In einer Studie zur ischämischen Präkonditionierung machten Heusch *et al.* die Beobachtung, dass bei Menschen eine Aktivierung von STAT5 und nicht STAT3 kardioprotektiv wirkt [Heusch *et al.*, 2012]. In Tieren hingegen entfaltet eine STAT3 Aktivierung bei gleichzeitiger STAT5 Inhibierung protektive Effekte im Herzen [Heusch *et al.*, 2011]. Im Rahmen von I/R kommt es zu einer inflammatorischen Reaktion in Herz, Lunge, Leber und Niere. Diese Entzündungsreaktion führt zu einer Phosphorylierung von STAT3 und geht mit einem Anstieg der Leukozytenzahl sowie erhöhten IL-6 Serumspiegeln einher [Engels *et al.*, 2014]. Nach Supplementation mit Natriumselenit konnten in den Herzen und Lungen der nicht-operierten Tiere verglichen mit den Kontrolltieren tendenziell niedrigere IL-6-Serumspiegel beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass Natriumselenit anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt und die Supplementation mit Natriumselenit eine gute Möglichkeit darstellen könnte, der durch I/R induzierten Entzündungsreaktion entgegenzuwirken. Die Gabe von Natriumselenit führte außerdem in Herzen und Lebern der nicht operierten Selen-supplementierten Tiere zu einer verminderten Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT-3, während in den Lungen eine deutlich vermehrte Phosphorylierung zu sehen war. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür ist, im Zusammenhang mit den

beobachteten erhöhten Troponinleveln dieser Tiere, dass das Herz bereits auf relativ niedrige Selendosen empfindlich reagiert und Natriumselenit bereits ab 1ppm kardiotoxisch wirkt. Somit könnte die verminderte STAT3 Phosphorylierung im Herzen im direkten Zusammenhang mit dem beobachteten Troponinanstieg im Blut stehen.

4.1.3 HSP70

Auch Hitzeschockproteine (HSPs) spielen eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit I/R. Durch die *de novo* Synthese von HSPs nach mildem hyperthermischem oder oxidativem Stress kann die Toleranz des Myokards gegenüber I/R erheblich verbessert werden [Sammut *et al.*, 2003]. Eine Studie an einem I/R-Rattenmodell mit kalter Kardioplegie zeigte, dass milder hyperthermischer Stress zu einer vermehrten Expression von HSP32, HSP60 sowie HSP72 führte und mit einer verbesserten ventrikulären Funktion einherging. Darüber hinaus zeigten die Zellen des reperfundierten und hyperthermischem Stress ausgesetzten Myokards eine erheblich bessere mitochondriale Funktion als die Myokardzellen der Sham-Gruppe. Die Erhaltung von strukturell sowie funktionell intakten Mitochondrien ist jedoch essentiell für die energetische mitochondriale Kapazität und die Regulierung des intrinsischen Apoptosewegs distal der Mitochondrien [Sammut *et al.*, 2003]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es durch hyperthermischen Stress zu einer Steigerung der energetischen mitochondrialen Kapazität kommt und somit die Toleranz der Zellen gegenüber I/R erhöht wird [Sammut *et al.*, 2001].

Eine in den Vorversuchen bereits ohne operativen Eingriff vermehrte Expression des Hitzeschock-Proteins HSP70 in den Herzen aller selensupplementierten Tiere könnte somit einen positiven Effekt zur Präkonditionierung gegen den I/R-Schaden darstellen.

4.2 Protektive Wirkung von Natriumselenit auf den I/R-Schaden

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine mehrwöchige präoperative Supplementierung mit Natriumselenit einen protektiven Effekt auf den durch EKZ und DHCA induzierten I/R-Schaden hatte. Dabei wurde beobachtet, dass die Natriumselenitsupplementation klinische Blut-/Serumparameter sowie mit I/R in Verbindung gebrachte molekulare Signalwege organspezifisch beeinflusste.

4.2.1 GPx und Selengehalt

Eine Substitution der Nahrung mit Natriumselenit führte zu einer erhöhten GPx-Aktivität im Gewebe aller vier untersuchten Organe (Herz, Lunge, Leber, Niere). Dies zeigt, dass die Behandlung der Tiere mit Natriumselenit zu einer vermehrten Biosynthese von Selenoproteinen führt, was auf einen verbesserten anti-oxidativen Schutz in den Organen hindeutet. Auch der Gewebeselengehalt von Herz, Lunge, Leber und Niere konnte durch die Gabe von Natriumselenit signifikant erhöht werden. Eine erhöhte Expression an Selenoproteinen sowie ein erhöhter Selengehalt hat Auswirkungen auf das Immunsystem kritisch kranker Patienten [Rayman 2012; Fairweather-Tait *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2012].

4.2.2 Blutwerte

Durch die Gabe von Natriumselenit konnte der nach I/R auftretende Anstieg der Serumspiegel von ALT, AST, LDH und Troponin I verhindert und der damit verbundenen Nekrose der Herz- und Leberzellen entgegengewirkt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Gabe von Natriumselenit einen protektiven

Einfluss auf den durch EKZ und DHCA induzierten systemischen I/R-Schaden hat. Diese positiven Auswirkungen sind höchstwahrscheinlich auf die bekannten anti-oxidativen und zytoprotektiven Eigenschaften von GPx und anderen Selenoenzymen zurückzuführen [Steinbrenner & Sies, 2009] und sind konkordant mit den Ergebnissen anderer Studien: 2004 zeigten Venardos *et al.*, dass eine Selensupplementation der durch I/R induzierten Lipid- und Proteinoxidation in den Herzen von Ratten entgegenwirken und die kardiale Funktion verbessern kann [Venardos *et al.*, 2004]. Synthetische, organische Selenverbindungen mit anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften wie bspw. Diphenylselenid wirken protektiv auf I/R-induzierte Gehirnschäden bei Ratten [Bruning *et al.*, 2012].

4.2.3 Physiologische Parameter während der EKZ

Die Messungen der Vigilanz- und Vitalparameter während der EKZ wurden immer zu den gleichen intraoperativen Zeitpunkten durchgeführt. Somit konnte der Versuchsablauf standardisiert und die Ergebnisse der vorliegenden Studie miteinander verglichen werden. An den fünf definierten Zeitpunkten (T1, T2, T3, T4 und T5) wurden Blutproben entnommen, Blutgasanalysen durchgeführt und folgende Parameter erhoben: Katecholamin- und Volumenbedarf, Hämoglobin und Hämatokrit und mittlerer arterieller Blutdruck (vgl. Kapitel 2.2.4):

KATECHOLAMIN- UND VOLUMENBEDARF

In der vorliegenden Studie konnte beobachtet werden, dass im Verlauf der EKZ in beiden EKZ-Gruppen der Bedarf an Katecholaminen signifikant anstieg. Allerdings war der Katecholaminbedarf in der Kontrollgruppe (K) zu allen drei Zeitpunkten höher als in der Natriumselenitgruppe (Se). Des Weiteren zeigte sich, dass die Natriumselenit-Tiere (Se) während der EKZ, abgesehen von den initialen 15 ml *Priming*-Volumen, signifikant weniger Volumen benötigten als die Kontrolltiere ($p = 0,0108$). Im Blut zirkulierende Katecholamine werden mit einer schlechten Prognose im Rahmen einer Herzinsuffizienz in Verbindung gebracht und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [Manghani *et al.*, 2016]. So wird eine übermäßige Katecholamin-Freisetzung mit der Entstehung myokardialer Hypertrophie, einer Schädigung der Kardiomyozyten sowie einer kontraktilen Dysfunktion in Verbindung gebracht [Communal *et al.*, 1998]. In einem *in vitro* Modell an adulten Ratten-Kardiomyozyten zeigten Communal *et al.*, dass das in der vorliegenden Studie verwendete Norepinephrin über einen TNF α -Caspase-vermittelten Signalweg zur Induktion von Apoptose führt [Communal *et al.*, 1998]. Der durch Norepinephrin induzierte Stress zeigte *in vitro* toxische Effekte auf die Kardiomyozyten und führte infolgedessen zu myokardialer Hypertrophie, Nekrose und durch Apoptose zu Herzmuskelschädigungen [Schroeder *et al.*, 2012]. Der Übergang von kardialer Hypertrophie zur Apoptose der Kardiomyozyten ist ein entscheidender Prozess im Rahmen des Herzversagens und von enormer klinischer Bedeutung [Sharma *et al.*, 2007]. Folglich ist die Tatsache, dass die Selen-Tiere (Se) einen niedrigeren Katecholaminbedarf hatten, von essentieller Bedeutung im Hinblick auf das postoperative Outcome.

HÄMOGLOBIN- UND HÄMATOKRITKONZENTRATION

Die zum Zeitpunkt T1 gemessenen Hb-Werte befanden sich alle innerhalb des physiologischen Referenzbereichs für Ratten von 11 bis 18 g/dl [Wijnbergen, 2005]. Bis zum Beginn des DHCA sank die Hb-Konzentration in beiden Gruppen um ca. die Hälfte ab. Diese Entwicklung war anhand der

Literaturergebnisse zu erwarten [Jungwirth *et al.*, 2006]. Teilweise verantwortlich für diesen Hb-Abfall sind die während der Präparation und Kanülierung der Gefäße entstandenen Blutverluste. Allerdings waren diese Blutverluste zu gering, als dass sie einen Hb-Abfall auf ca. die Hälfte allein erklären könnten. Eine weitere Erklärung für diesen drastischen Hb-Abfall stellt die starke Hämodilution dar, die durch das vor Beginn der EKZ notwendige *Priming* entsteht. Bevor das Tier an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen werden kann, ist es notwendig, das Schlauchsystem zu entlüften. Dies geschieht durch „Auffüllen“ des Kreislaufs mit 15 ml 6%iger Hydroxyethylstärke (HAES), auch „*Priming*“ genannt. Durch die auf diese Weise entstehende Hämodilution wird das EKZ-System gefüllt, die Viskosität des Blutes verringert und die Zirkulation des Blutes im EKZ-Kreislauf verbessert. Sakamoto *et al.* zeigten an einem Schweine-EKZ-Modell, dass Hämodilution während der EKZ den zerebralen Blutfluss erhöht und den Sauerstoffmetabolismus verbessert [Sakamoto *et al.*, 2004]. Auf der anderen Seite hat die Hämodilution auch einen Abfall der Hb-Konzentration zur Folge. Um dies zu vermeiden, konnte bei Bedarf Blut aus dem Reservoir der HLM genommen und bei 1000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert werden. Das auf diese Weise gewonnene Erythrozytenkonzentrat wurde mit 6% HAES und Calciumgluconat versetzt und über das Reservoir in die HLM retransfundierte, um den Hämatokrit auf > 30 % zu heben. In der EKZ-Studie von Sakamoto *et al.* zeigte sich, dass der mittlere arterielle Blutdruck bei höheren Hämatokrit-Werten signifikant erhöht war, wodurch das postoperative Outcome verbessert wird [Sakamoto *et al.*, 2004]. Auch im klinischen Alltag wird seit einigen Jahren intraoperativ mittels autologem Blutrückgewinnungssystem, dem sog. *Cell Saver*, das Blut der Patienten, die kardiovaskulären Eingriffen unterzogen werden, gesammelt, um anschließend wiederaufbereitet und retransfundierte zu werden [Al-Mandhari *et al.*, 2015].

MITTLERER ARTERIELLER DRUCK

Der mittlere arterielle Druck (MAD; mmHg) bezeichnet den Mittelwert der Blutdruckkurve über die Zeit. Zu Versuchsbeginn waren die MADs beider Gruppen annähernd gleich. Der Abfall des MAD zu den Zeitpunkten T2 und T3 im Vergleich zum Zeitpunkt T1 ist auf das Herabsetzen der Blutflussrate von einer physiologischen Blutflussrate von 160 bis 180 ml/min/kg auf 80 bis 90 ml/min/kg zurückzuführen und entspricht somit den im klinischen Alltag verwendeten EKZ-Blutflüssen von 100 bis 150 ml/min/kg [Jungwirth *et al.*, 2006]. Allerdings kann es auch durch eine im Rahmen der EKZ auftretende globale zerebrale Hypoperfusion zu einer systemischen Hypotension kommen [Grocott *et al.*, 2005]. Da jedoch bei einem MAD von unter 40 mmHg eine ausreichende Perfusion der Organe nicht mehr gewährleistet ist, wurde den Tieren bei Bedarf in physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Norepinephrinhydrochlorid (Arterenol®, 0,02 mg/ml) verabreicht. Aufgrund der Tatsache, dass beide Gruppen annähernd vergleichbare MAD-Werte aufweisen, könnte davon ausgegangen werden, dass die Gabe von Natriumselenit keinen Einfluss auf den Blutdruck hat. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Kontrolltiere wie oben beschrieben zu jedem Zeitpunkt der EKZ einen höheren Katecholaminbedarf hatten als die Natriumselenit-Tiere und die verabreichten Katecholamine zu einer Blutdrucksteigerung führen. Somit lässt sich die Vermutung anstellen, dass die präoperative Gabe von Natriumselenit zu einem erhöhten Blutdruck und folglich zu einer besseren Organperfusion führt.

ARTERIELLER SAUERSTOFFPARTIALDRUCK

Der arterielle Sauerstoffpartialdruck, PaO₂ (mmHg), steigt im Verlauf der EKZ in beiden Gruppen signifikant an. Dies ist auf den Membranoxygenator zurückzuführen, der eine ausreichende Versorgung

des Blutes mit Sauerstoff sicherstellt. Gegen Ende der EKZ kommt es jedoch, ebenfalls in beiden Gruppen, zu einem Abfall des PaO₂. Als Ursache dessen wird die sog. *Plasma Leakage* postuliert. Dabei kommt es mit fortschreitender EKZ-Dauer zu einem Übertritt von Blutplasma über die Oxygenatormembran, was letztlich zum Verschluss der mikroporösen Membran und folglich zu einer Einschränkung des Gasaustausches führt [Tamari, 1991].

BASE EXCESS

Mithilfe der Berechnung des Basenüberschusses, engl. *Base Excess*, kann eine Aussage über den Säure-Base-Haushalt des Blutes getroffen werden. Die im Rahmen des DHCA verursachte Hypothermie führt zu einer Reduktion des zerebralen Blutflusses sowie des zerebralen Sauerstoffverbrauchs [Greeley *et al.*, 2005]. Die verminderte Gewebepfusion führt zu einem anaeroben Metabolismus. Dadurch wird vermehrt Glukose in Laktat umgewandelt. Dies hat zur Folge, dass der pH-Wert des Blutes sinkt, der Säure-Base-Haushalt aus dem Gleichgewicht gerät und der BE-Wert folglich in den negativen Bereich abfällt [Shinde *et al.*, 2005]. Dies erklärt den deutlichen BE-Abfall in der vorliegenden Arbeit zu den Zeitpunkten T2 (nach 25 Minuten Kühlung) und T3 (bei 20° Wiedererwärmung). Eine während der EKZ auftretende Azidose durch Hyperlaktatämie ist mit einer längeren EKZ-Dauer, einer niedrigen Sauerstoffversorgung während der EKZ sowie Hyperglykämie assoziiert und führt folglich zu einer erhöhten postoperativen Morbidität und Mortalität [Ranucci *et al.*, 2006]. Einer Studie von Demers *et al.* zufolge, zeigten Patienten mit Laktat-Konzentrationen im Blut von > 4.0 mmol/L ein signifikant höheres Risiko, postoperativ neurologische, hämodynamische, pulmonale, renale, digestive und kardiale Komplikationen zu entwickeln. Auch die Hospitalisierungsdauer dieser Patientengruppe war im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich verlängert [Demers *et al.*, 2000]. Um dies zu vermeiden, konnte der Säure-/Basen-Haushalt in der vorliegenden Arbeit durch verschiedene Gegenregulationsmechanismen korrigiert werden.

SUPPLEMENTATION MIT SELEN WIRKT DER I/R-INDUZIERTEN LEUKOZYTÖSE ENTGEGEN

Die präoperative Supplementation der Tiere mit Natriumselenit führte zu einem signifikant verringerten Volumen- sowie tendenziell verringerten Katecholaminbedarf während der EKZ. Durch eine individuelle hämodynamische Therapie während herzchirurgischer Eingriffe können postoperative Komplikationen verringert und die Dauer des Aufenthalts der Patienten auf der Intensivstation verkürzt werden [Goepfert *et al.*, 2013]. Auch zeigten die Tiere der Natriumselenitgruppe (Se) im Verlauf der EKZ signifikant erhöhte Hämatokritwerte sowie tendenziell erhöhte Hämoglobinwerte. Karkouti *et al.* zeigten, dass ein Zusammenhang zwischen dem Grad der Hämodilution während der EKZ und dem perioperativen Schlaganfallrisiko besteht und somit eine starke Hämodilution im Rahmen der EKZ die postoperative Morbidität und auch Mortalität kardiovaskulärer Eingriffe erhöht [Karkouti *et al.*, 2005]. Die Tatsache, dass Natriumselenit zu einem verminderten Volumen- und Katecholaminbedarf führt und zudem die Hämatokrit- und Hämoglobinwerte erhöht, lässt vermuten, dass die Behandlung mit Natriumselenit einen positiven Einfluss auf die postoperative Morbidität und Mortalität hat.

Mehrere Studien zeigten, dass die EKZ einen massiven Anstieg der Leukozytenzahl (Leukozytose) induziert [Baldwin *et al.*, 1991; Fink *et al.*, 2003; Engels *et al.*, 2015]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Gabe von Natriumselenit zu einer, nach EKZ, signifikant verringerten Leukozytose führte. Ursache hierfür könnte eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen sein,

welche essentiell zur Rekrutierung von Leukozyten sind: Zhang *et al.* zeigten, dass die Gabe von Selen die durch TNF- α induzierte vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen modulieren kann [Zhang *et al.*, 2002]. Die signifikant verringerte Leukozytose nach Gabe von Selen könnte demnach einen positiven Einfluss auf die postoperative Rekonvaleszenz der Patienten haben. Obwohl die nach EKZ auftretende Leukozytose in der Selen-Gruppe reduziert war, führte die Selensupplementation im Verlauf der EKZ unerwarteterweise zu einem tendenziellen Anstieg der Plasmalevel der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α . Literaturergebnisse zeigen, dass die Plasmawerte proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-10 im Verlauf der Reperfusion ansteigen [Boengler *et al.*, 2008]. Ein möglicher Erklärungsansatz für den Anstieg von IL-6 und TNF- α im Verlauf der EKZ ist die Rekrutierung von Leukozyten in geschädigtes Gewebe. Dieser Anstieg führt zu einer Aggravation des I/R-Schadens [Zhang & Chen, 2008] und geht mit einer erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrate einher [Hill *et al.*, 1997]. Daher wurde angenommen, dass die Selensupplementation den Anstieg proinflammatorischer Zytokine unterdrückt. Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Behandlung mit Selen im Gegensatz dazu sogar zu einem leichten Anstieg der Plasmalevel von IL-6 und TNF- α führte, ist die signifikante Erhöhung der GPx-Aktivität in allen vier untersuchten Organen der Tiere in der Selen-Gruppe. Bozinovski *et al.* zeigten in einem *in vivo* Mausmodell, dass es nach Exposition mit LPS vermittelt durch die GPx1 zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine kommt [Bozinovski *et al.*, 2012]. Auch die Untersuchungen der Gewebespiegel von IL-6 und TNF- α zeigten lediglich nicht signifikante und inkonsistente Ergebnisse. Lediglich in Herz, Lunge und Niere zeigte sich eine verminderte Produktion von TNF α . Der Einfluss einer Selensupplementation auf die Plasmalevel proinflammatorischer Zytokine wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So wiesen Stoedter *et al.* im Mausmodell nach, dass eine Selensupplementation in selendefizienten Mäusen nach Injektion von bakteriellen Lipopolysacchariden zu einer verminderten Produktion proinflammatorischer Zytokine führte [Stoedter *et al.*, 2010]. Jedoch ist die Rolle von IL-6 im Rahmen von Entzündungsreaktionen noch nicht abschließend geklärt. Tanak & Kishimoto gehen davon aus, dass IL-6 in der Akutphase nicht-infektiöser Entzündungsreaktionen vermehrt ausgeschüttet wird und durch die Stimulation immunmodulierender Zellen die körpereigene Abwehr unterstützt [Takana & Kishimoto, 2012].

4.2.4 Einfluss von Selen auf I/R-induzierte organspezifische Expressions- und Phosphorylierungsmuster ausgewählter Stressproteine

Die Supplementation mit Natriumselenit konnte die durch I/R induzierten molekularen Signalwege organspezifisch beeinflussen. Allerdings waren die Ergebnisse teilweise inkonsistent und sind, auch bedingt durch die zum Teil sehr hohen Standardabweichungen innerhalb der Gruppen, nicht durchgängig im Sinne einer postulierten protektiven Wirkung der Selen-Supplementation zu interpretieren. Einige mit Zytoprotektion assoziierte molekulare Veränderungen wurden hier insbesondere in Herz, Lunge und Leber beobachtet:

HERZ

Im Herzen zeigte sich bei den Tieren der Natriumselenitgruppe eine signifikant verminderte ERK1/2 Phosphorylierung (und damit Aktivität). In den letzten Jahren wurde eine neue Form des Zelltods entdeckt, die als programmierte Nekrose oder Nekroptose bezeichnet wird. Diese Art des Zelltods wird

durch die Hemmung des Apoptosewegs initiiert. Im Rahmen dieses Signalweges wird durch die aktivierte ERK1/2 die PARP phosphoryliert und somit aktiviert. Eine sehr stark vermehrte Aktivität der PARP führt wiederum zu einem erhöhten NAD⁺ Verbrauch, wodurch es zu einer Hemmung der Glykolyse kommt und schlussendlich zur Initiierung der programmierten Nekrose (Nekroptose) [Cohen-Armon, 2007]. Die in dieser Studie beobachtete verminderte ERK1/2 Aktivität im Herzen der Natriumselenit-Tiere (Se) könnte folglich Ausdruck einer Hemmung der Nekrose über diesen neu entdeckten Nekroptoseweg sein.

Neben der erwähnten verminderten ERK/2 Phosphorylierung im Herzen zeigte sich auch eine tendenziell erniedrigte STAT3 Phosphorylierung (Aktivität). Hierbei ist allerdings zu erwähnen, dass einige Studien zu dem Ergebnis kommen, dass STAT3 kardioprotektive Eigenschaften besitzt. So zeigten Heusch *et al.* bspw. in einem I/R Modell an Schweinen, dass eine vermehrte STAT3 Aktivierung kardioprotektiv wirkt [Heusch *et al.*, 2011]. Zwar fanden Hilfiker-Kleiner *et al.* heraus, dass eine beeinträchtigte STAT3 Aktivierung in Kardiomyozyten von STAT3 *Knockout*-Mäusen nach einer Stunde Ischämie und darauffolgenden 24 Stunden Reperfusion größere Infarktareale im Herzen zur Folge hatte als bei den Wildtypen [Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2004], interessanterweise wurde dieser Effekt jedoch nicht bei einer 30-minütigen Ischämiephase, gefolgt von zwei Stunden Reperfusion, beobachtet [Boengler *et al.*, 2008A]. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass in der hier vorliegenden Arbeit möglicherweise die Dauer der Ischämiephasen einen Einfluss auf die STAT3 Expression hatte.

LUNGE

In den Lungen zeigte sich bei den Tieren der Natriumselenitgruppe (Se) eine vermehrte HO-1 Expression. Haines *et al.* zeigten, dass eine vermehrte Expression von HO-1 einen protektiven Effekt gegenüber durch Hypoxie bedingte Schäden in Lungengewebe ausübt. Somit wirkt eine Überexpression von HO-1 protektiv auf ROS-induzierte Lungenschäden [Haines *et al.*, 2012].

Auch konnte in den Lungen der Natriumselenit-Tiere eine vermehrte HSP-70 Expression nachgewiesen werden. Wong *et al.* zeigten, dass eine Überexpression von HSP-70 im Hinblick auf durch I/R induzierte Lungenschäden zytoprotektiv wirkt [Wong *et al.*, 1998].

Des Weiteren wiesen die Lungen der Seltiere eine vermehrte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 auf. Dies ist kongruent mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen: Zhang *et al.* konnten nachweisen, dass eine durch CO getriggerte vermehrte STAT3 Expression in Endothelzellen eine antiapoptotische Wirkung entfaltet. Dieser Effekt wird über den PI3K Signalweg vermittelt [Zhang *et al.*, 2005]. Farivar *et al.* beobachteten hingegen, dass eine verminderte Phosphorylierung von STAT3 protektive Auswirkungen auf I/R assoziierte Lungenschäden hat [Farivar *et al.*, 2006]. Diese kontroversen Untersuchungen zeigen, dass noch nicht abschließend geklärt ist, welche Auswirkungen eine erhöhte bzw. erniedrigte STAT3 Phosphorylierung auf I/R-induzierte Lungenschäden hat.

LEBER

In der Leber zeigte sich bei den Tieren der Natriumselenitgruppe (Se) eine tendenziell vermehrte HSP-70 Expression. In einer Studie von Oka *et al.* stellte sich heraus, dass eine vermehrte HSP-70 Expression in der Leber nach partieller Hemihepatektomie im Mausmodell zu einer Reduktion der Entzündungsreaktion führt und die Regeneration des Lebergewebes fördert [Oka *et al.*, 2013].

Auch haben erhöhte IL-6-Spiegel im Lebergewebe einen hohen Anteil an der Regeneration der Leber. In einem IL-6 *knockout* Modell an Mäusen zeigte sich, dass erniedrigte IL-6-Spiegel zu einer Beeinträchtigung der Leberregeneration, Lebernekrosen und Leberversagen führen. Bereits eine einmalige präoperative Gabe von IL-6 führte zu einer erhöhten STAT3 Expression und einer vermehrten Hepatozytenproliferation [Cressman *et al.*, 1996]. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich in der Leber der Seltiere verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöhte IL-6-Spiegel wie auch eine tendenziell vermehrte STAT3 Expression. Gemeinsam mit der vermehrten HSP-70 Expression und den erniedrigten ALT- und AST-Serumspiegeln ist dies ein Indiz dafür, dass die präoperative Selensupplementation der durch I/R-induzierten Leberschädigung entgegenwirken kann.

NIERE

Im Rahmen von I/R kommt es aufgrund von Vasokonstriktion, ROS und dem Verlust der Polarität des proximalen Tubulus zu einer Schädigung des Nierengewebes [Bonventre & Weinberg, 2003]. In der hier vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein Einfluss des Natriumselenits auf funktionelle, nierenspezifische Parameter wie z.B. Kreatinin und Harnstoff festgestellt werden. Die Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs während I/R führt u.a. durch eine vermehrte Expression proinflammatorischer Zytokine zu einer Schädigung der Nieren [Yang *et al.*, 2008]. Eine Inhibierung des JAK/STAT-Signalwegs wirkt somit protektiv auf die durch I/R entstandene Nierenschädigung. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit auf molekularer Ebene kein Einfluss von Natriumselenit auf den durch I/R induzierten Schaden festgestellt werden.

4.2.5 Einfluss von Selen auf ausgewählte, an der Regulation des Zelltods beteiligte, Enzyme

PARP

Die Poly (Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase (PARP) ist eine DNA-Polymerase, die im Rahmen der DNA-Replikation, DNA-Reparatur und der Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Als Antwort auf einen exzessiven DNA-Schaden kommt es zu einer Überaktivierung der PARP. Die PARP repariert DNA-Einzelstrangbrüche unter Verwendung von NAD⁺ als Cofaktor. Eine Überaktivierung von PARP führt somit zu einem Minderangebot an NAD⁺. Dies hat zur Folge, dass weniger ATP hergestellt werden kann, was den programmierten Zelltod der Zelle befördert. Ferner ist beschrieben, dass eine starke Aktivierung der PARP bei einem durch ROS induzierten DNA-Schaden Apoptose und Nekrose induziert [Liaudet *et al.*, 2002]. Hatachi und Mitarbeiter zeigten, dass eine Inhibition der PARP die durch I/R bedingte Entzündungsreaktion sowie Gewebeschäden verringern konnte. Durch eine Inhibition der PARP kam es in ihrem Versuchsaufbau zu einer geringeren Produktion von proinflammatorischen Zytokinen [Hatachi *et al.*, 2014]. Auch spielt die PARP eine wichtige Rolle im Rahmen des durch I/R induzierten Leberschadens. So führt eine Überexpression der PARP zu einer Verschlechterung der hepatischen Mikrozirkulation und somit zu einer Verstärkung der hepatozellulären Nekrose [Szijarto *et al.*, 2007]. Auch führt I/R in der Lunge zu Alveolarschäden und Lungenödem. Hatachi *et al.* zeigten, dass durch eine Inhibition der PARP durch den PARP-Inhibitor PJ34 die I/R induzierte Entzündungsreaktion wie auch die Gewebeschädigung vermindert werden konnte [Hatachi *et al.*, 2014]. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die PARP-Aktivität mittels eines kommerziellen Kits in den Gewebelysaten der Versuchstiere bestimmt; dabei konnte lediglich in den Nieren der Seltiere eine Inhibierung der PARP festgestellt werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien. So fanden del Moral *et al.* anhand eines I/R Modells an der Maus heraus,

dass eine PARP-Inhibierung I/R-induzierte renale Gewebeläsionen abschwächt [del Moral *et al.*, 2013]. Weshalb eine Inhibierung der PARP in den anderen untersuchten Organen nicht nachzuweisen war, bedarf weiterer Untersuchungen. Ein Ansatzpunkt könnte die Vergrößerung der Tierzahlen sein, da die Werte der PARP-Aktivität vor allem in Herz und Leber großen Schwankungen unterlag und die beobachteten Unterschiede daher keine Signifikanz erreichten.

AKT

In der vorliegenden Arbeit führte die Selensupplementation zu einer signifikant erhöhten AKT Phosphorylierung (Aktivität) in Leber und Lunge. Die AKT-Proteinkinase B ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, die durch Inhibierung der Apoptose eine essentielle Rolle beim Überleben der Zelle spielt. Eine Untersuchung von Harada *et al.* an einem Leberischämie-Modell bei Ratten zeigte, dass eine vermehrte AKT Aktivierung Apoptose inhibieren und somit hepatischer Leberischämie entgegenwirken kann [Harada *et al.*, 2004]. Auch könnte die in der vorliegenden Arbeit gemessene erhöhte AKT-Aktivität ein Erklärungsansatz für die gemessene Erniedrigung der Serumtransaminasen ALT und AST nach Selengabe sein. Eine Erhöhung der Serumkonzentrationen von ALT und AST, der alkalischen Phosphatase oder ein Anstieg der *international normalized ratio* (INR) nach I/R weist auf Leberschäden hin [Amacher, 1998]. In dieser Studie führte die Gabe von mit Natriumselenit angereichertem Futter zu einer signifikanten Verringerung der Enzyme ALT und AST im Blut. Gemeinsam mit der vermehrten HSP-70 Expression und der erhöhten AKT-Aktivität ist dies ein Indiz dafür, dass die präoperative Selensupplementation der durch I/R-induzierten Leberschädigung entgegenwirken kann.

Eine Studie von Zhang *et al.* an einem I/R-Rattenmodell zeigte, dass die Gabe von Dexmedetomidin zu einer signifikant erhöhten AKT-Aktivierung führte und somit den durch I/R induzierten Lungenschaden deutlich verringern konnte [Zhang *et al.*, 2016]. Auch Zhao *et al.* konnten anhand eines I/R-Rattenmodells nachweisen, dass eine erhöhte AKT-Phosphorylierung zu einer Verringerung I/R-induzierter Lungenschäden führen kann, indem Entzündungsreaktionen abgeschwächt und Apoptosevorgänge inhibiert werden [Zhao *et al.*, 2015]. In Übereinstimmung mit den Literaturergebnissen zeigte die vorliegende Arbeit, dass die nach Selengabe signifikant erhöhte AKT-Aktivität in Leber und Lungen der Tiere protektive Auswirkungen auf die durch I/R-induzierten Leber- und Lungenschäden hat.

CASPASEN

Caspasen sind intrazelluläre Cystein-Proteasen, die an der Initiierung und Ausführung von Apoptose beteiligt sind [Cohen, 1997]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Caspase-Inhibitoren *in vitro* alle Formen der Apoptose inhibieren und eine Überexpression von Caspase in verschiedenen Zellreihen Apoptose induzieren kann [Faucheu, 1995; Enari *et al.*, 1996; Cohen, 1997]. An einem Leberischämie-Modell an Ratten zeigten Cursio *et al.*, dass die nach I/R auftretenden Leberschäden durch die Gabe eines Caspase-Inhibitors verhindert werden konnten. Sie konstatierten daher, dass Caspase-Inhibitoren ein wichtiger therapeutischer Ansatz sein könnten, um den Auswirkungen von I/R auf die Leber entgegenwirken zu können [Cursio *et al.*, 2000]. Eine Untersuchung an Retinae in einem I/R-Rattenmodell zeigte ebenfalls, dass Caspasen eine zentrale Rolle bei der Initiierung von Apoptose spielen und somit Caspasen-Inhibitoren anti-apoptotische Wirkungen besitzen [Lam *et al.*, 1999]. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Gabe von Natriumselenit jedoch lediglich im Herzen eine

verminderte Caspase-Aktivität gemessen werden. In den anderen untersuchten Organen war die Caspase-Aktivität in den Organen der Natriumselenit-Tieren verglichen mit den Kontrolltieren erhöht.

4.3 Limitationen der Studie

Sowohl in den Vorversuchen wie auch in den Versuchen zur Wirkung von Natriumselenit auf den I/R-Schaden waren tendenzielle Unterschiede zwischen den selenadäquat ernährten und den selensupplementierten Tieren zu sehen. Grund dafür, dass diese Unterschiede lediglich tendenziell waren und keine Signifikanz erreichten, waren die teilweise hohen Standardabweichungen bei den Messwerten. Um den Einfluss von Natriumselenit auf diese Parameter besser untersuchen zu können, wären daher in nachfolgenden Studien größere Tiergruppen notwendig. Obwohl die Gabe von Natriumselenit in der vorliegenden Studie generell einen protektiven Einfluss auf den I/R-Schaden zeigte, gibt es zwei wesentliche Limitationen:

Eine dieser Limitationen ist der Zeitpunkt der Organentnahme im Hinblick auf die Untersuchung der molekularen Signalwege. Die Organentnahme erfolgte direkt im Anschluss an die 60-minütige Reperfusionphase. Somit konnte in dieser Studie der Einfluss von Natriumselenit auf die zellulären Signalwege nur direkt am Ende der Reperfusion (und damit auf vergleichsweise schnelle molekulare Veränderungen) bestimmt werden und nicht im peri- bzw. postoperativen Verlauf. Folglich kann anhand dieses Versuchsaufbaus nicht beurteilt werden, welchen Einfluss die Behandlung mit Natriumselenit auf die peri- sowie postoperative Morbidität und Mortalität hat. Ein nächster Ansatz wären daher Langzeitversuche, in denen die Tiere postoperativ für mehrere Tage beobachtet werden, um zu untersuchen, ob die Behandlung mit Natriumselenit auch langfristig protektive Effekte auf den I/R-Schaden ausübt. Somit könnten die Auswirkungen einer Selenbehandlung auf die postoperative Erholung der Patienten nach großen kardiovaskulären Eingriffen untersucht werden.

Eine andere Einschränkung dieser Arbeit ist die Tatsache, dass der in dem oben beschriebenen Tiermodell angewandte DHCA die Maximalvariante des EKZ-Schadens ist. Die Tiere wurden auf 20°C Körpertemperatur herabgekühlt. Dabei kam es zum Sistieren der Herzfunktion und folglich zum Herzstillstand, ohne dass kaliumreiche kardioplegische Lösungen appliziert werden mussten. Dies hat einerseits den Vorteil, dass eine Induktion von Signalkaskaden auf molekularbiologischer Ebene durch die Applikation von Kalium verhindert wird. Andererseits konnte durch die unphysiologisch niedrige Körpertemperatur eine vermehrte Inflammation hervorgerufen werden. Heutzutage werden im klinischen Alltag jedoch lediglich moderate ($\leq 34^{\circ}\text{C}$) oder milde therapeutische Hypothermie ($> 34^{\circ}\text{C}$ aber $\leq 36^{\circ}\text{C}$) angewandt [Greason et al., 2014]. Somit eignet sich das in der vorliegenden Arbeit angewandte Modell zwar sehr gut, um inflammatorische Prozesse während EKZ und DHCA zu induzieren und diese dadurch genauer zu untersuchen. Eine direkte Übertragung auf kardiovaskuläre Eingriffe ist aufgrund des hier angewandten DHCA jedoch kritisch zu hinterfragen.

Eine weitere Limitation der hier vorliegenden Arbeit ist die potenzielle Toxizität von Natriumselenit. In der hier vorliegenden Studie wurde nur eine Natriumselenitdosis (1ppm Se) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (0,3ppm Se) untersucht. Im Rahmen eines Selenmangels ist die Expression bzw. Aktivität einiger Selenoproteine wie z.B. der GPx1 vermindert. Bei Supplementation mit Natriumselenit kommt es mit steigender Selendosis zunächst zum Anstieg der Selenoprotein-Biosynthese, bis zu einer Sättigung. Somit kann die Messung der Expression bzw. Aktivität der GPx1 und einiger anderer Selenoproteine gut zur Detektion eines Selenmangels bzw. zum Nachweis des Erfolgs einer

Selensupplementierung bei einem relativ niedrigen basalen Selenstatus verwendet werden. Diese Werte sind bei hohen Selenkonzentrationen jedoch wenig aussagekräftig, da sie bei einem Überangebot an Selen nicht weiter ansteigen, sondern auf dem Niveau der Sättigung stabil bleiben. In diesem Zusammenhang ist die Verwendung einer deutlich über dem Bedarf zur Sättigung der Selenoproteinexpression liegenden Dosis von 1ppm Se in Form von Natriumselenit für die mehrwöchige Supplementation der Tiere als grenzwertig einzuschätzen. Wie bei den Blutwerten bereits diskutiert, ist offene Selentoxizität bei Ratten erst ab 5 ppm gefunden worden [Jia *et al.*, 2005]. Einer Studie von Raines und Sunde zufolge, kommt es jedoch bereits ab einer Substitution von 2ppm Selen in Form von Selenit zu einer Schädigung des Lebergewebes [Raines & Sunde, 2011]. Nachfolgende Studien sollten daher die Auswirkungen verschiedener Dosen und Verbindungen von Selen auf die Aktivität von ALT, AST, LDH und Troponin untersuchen.

Die im Rahmen der Proteinphosphorylierung und Expression von Stressproteinen beobachteten Unterschiede zwischen den einzelnen Organen können verschiedene Ursachen haben. Ein Erklärungsansatz hierfür ist die organspezifische Toleranz gegenüber Ischämie sowie die Dauer von I/R an den einzelnen Organen. Auch wurden in dem hier verwendeten EKZ-Versuchsaufbau die Organe am Ende der gesamten Ischämie- und Reperfusionzeit entnommen. Dadurch entsteht ein ziemlich einseitiges „Schnappschuss“-Bild der Proteinphosphorylierung und -expression, da der Verlauf der molekularen Signalwege während der EKZ nicht untersucht werden kann. Dies könnte erklären, weshalb die organspezifisch beobachteten Expressions- und Phosphorylierungsmuster der Stressproteine nicht immer mit den, in der Literatur berichteten Ergebnissen, übereinstimmen. Ein Versuchsaufbau, der dies berücksichtigt und die Möglichkeit bietet, die Signalwege zu den verschiedenen Zeitpunkten der EKZ zu untersuchen, wäre jedoch wichtig, da die verschiedenen, hier untersuchten, Stressproteine meist zeitabhängig wirken [Toledo-Pereyra *et al.*, 2008].

Eine weitere Ursache, die einen Einfluss auf die molekularen Signalwege haben und somit die organspezifischen Unterschiede mit erklären könnte, ist die während der Reperfusion beobachtete Hämolyse. Im Rahmen kardiovaskulärer Operationen kommt es häufig zum Auftreten einer relevanten Hämolyse, die auch im Hinblick auf die Analyse der Blutergebnisse eine wichtige Rolle spielt. Ursachen hierfür sind sowohl intrinsische als auch extrinsische Faktoren. Klinische Studien zeigten, dass das verwendete Pumpensystem zur Schädigung der Erythrozyten beiträgt [Oku *et al.*, 1988]. Auch der während des Eingriffs verwendete Kardiotomiesauger steht im Verdacht, wesentlich zur Entstehung der Hämolyse beizutragen. Durch den Kontakt von Blut und Luft sowie den beim Aufsaugen entstehenden Scherstress kommt es zu einer mechanischen Überbeanspruchung der Erythrozyten und somit zu einer Erythrozyten-Schädigung [Indeglia *et al.*, 1968]. Im Rahmen der Hämolyse kommt es zur Freisetzung von Häm und CO. Diese können Einfluss auf die molekularen Signalwege haben und somit einen Teil der beobachteten organspezifischen Unterschiede bedingen [Kaizu *et al.*, 2008].

Schlussfolgerungen

Nach herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kann es zu postoperativen Komplikationen mit teilweise schweren Folgen für die betroffenen Patienten kommen. Ursächlich hierfür sind Ischämie- und Reperfusionsphasen, denen die Organe im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit Kreislaufstillstand ausgesetzt sind. Therapieansätze zur direkten Unterdrückung des I/R-Schadens existieren bisher jedoch nicht.

Ein Ansatzpunkt hierfür ist die Blockade von ROS, um oxidativem Stress entgegenwirken zu können. Allerdings besitzen ROS nicht nur schädigende Wirkungen, sondern stimulieren als Reaktion auf Ischämien in der Reperfusionsphase auch die Angiogenese [Maulik & Das, 2002; Watanabe *et al.*, 2016]. Im Rahmen der REDOX-Signalkaskaden ist jedoch eine kontrollierte Produktion von ROS essentiell, sodass die Verwendung von Antioxidantien durch die Unterbrechung eben dieser Signalkaskaden mehr Schaden als Nutzen bringen kann. Dies könnte ein Erklärungsansatz dafür sein, dass mehrere klinische Studien, die die Wirksamkeit von Antioxidantien für die Prävention von Herzkreislauferkrankungen untersucht haben, keine durchweg positiven Ergebnisse vorweisen konnten [Kris-Etherton *et al.*, 2004]. Wichtig wäre daher der Einsatz hochspezifischer Antioxidantien, die in der Lage sind, einzelne, den Organismus schädigende ROS selektiv zu reduzieren und somit einen therapeutischen Nutzen zu erzielen [Murphy, 2013]. Um oxidativen Stress verringern zu können, muss die Aktivität eines exogenen Antioxidans die lokale antioxidative Abwehr über das basale Niveau erhöhen. Dies ist nicht leicht, da die Aktivität endogener Antioxidantien im Körper durch verschiedene *Feedback*-Mechanismen reguliert wird. Die Gabe eines exogenen Antioxidans kann daher zu einer kompensatorischen Verminderung der Aktivität endogener Antioxidantien führen und somit dazu führen, dass die lokale antioxidative Abwehr *de facto* nicht erhöht wird. Ein weiterer Grund der bisher nur geringen Wirksamkeit von Antioxidantien ist die Tatsache, dass die Verteilung von Antioxidantien im menschlichen Körper einheitlich von statten geht und somit die Gesamtkonzentration an Antioxidantien im Körper zwar hoch, die lokale Konzentration an Antioxidantien jedoch zu gering ist, um die betroffenen Zellen vor oxidativem Stress zu schützen. Ein vielversprechender Ansatz wäre daher beispielsweise der Einsatz von Selenverbindungen als Antioxidantien in Kardioplegie-Lösungen, um dem während CPB und moderater Hypothermie entstehenden oxidativen Stress im Herzen direkt entgegenzuwirken zu können.

Entgegen der bereits diskutierten Limitationen der Gabe von Antioxidantien unterstützen die hier präsentierten Ergebnisse die Hypothese, dass Antioxidantien im Rahmen anorganischer Selenverbindungen einen wirksamen Therapieansatz darstellen, um dem während herzchirurgischer Eingriffe induzierten I/R-Schaden entgegenzuwirken und weisen die Notwendigkeit der Erforschung weiterer, alternativer antioxidativer Therapiemöglichkeiten auf.

Literatur– und Quellenverzeichnis

Al-Mandhari S, Maddali MM, Al-Bahrani MJ. *Cell salvage during coronary artery bypass surgery and allogenic blood exposure.* Asian cardiovascular & thoracic annals. **2015**;23(8):913-6.

Aaronson DS, Horvath CM. *A road map for those who don't know JAK-STAT.* Science. **2002**;296(5573):1653-5.

Abdelahi A, Salehnia M, Allameh AA, Davoodi D. *Sodium selenite improves the in vitro follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxidase activity.* Human reproduction. **2010**;25(4):977-85.

Abdulah R, Katsuya Y, Kobayashi K, Nakazawa M, Nara M, Murakami M, et al. *Effect of sodium selenite supplementation on the levels of prostacyclin I(2) and thromboxane A(2) in human.* Thrombosis research. **2007**;119(3):305-10.

Ahmad A, Khan MM, Ishrat T, Khan MB, Khuwaja G, Raza SS, et al. *Synergistic effect of selenium and melatonin on neuroprotection in cerebral ischemia in rats.* Biological trace element research. **2011**;139(1):81-96.

Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, et al. *Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats.* The Journal of clinical investigation. **1997**;100(7):1813-21.

Al-Amran FG, Manson MZ, Hanley TK, Hainz DL. *Blockade of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor pathway ameliorates myocardial injury in animal models of ischemia and reperfusion.* Pharmacology. **2014**;93(5-6):296-302.

Alissa EM, Bahijri SM, Ferns GA. *The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence.* Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research. **2003**;9(1):RA9-18.

Altekin E, Coker C, Sisman AR, Onvural B, Kuralay F, Kirimli O. *The relationship between trace elements and cardiac markers in acute coronary syndromes.* Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements. **2005**;18(3):235-42.

Amacher DE. *Serum transaminase elevations as indicators of hepatic injury following the administration of drugs.* Regulatory toxicology and pharmacology: RTP. **1998**;27(2):119-30.

Andrews PJ, Avenell A, Noble DW, Campbell MK, Croal BL, Simpson WG, et al. *Randomised trial of glutamine, selenium, or both, to supplement parenteral nutrition for critically ill patients.* Bmj. **2011**;342:d1542.

Angstwurm MW, Schottdorf J, Schopohl J, Gaertner R. *Selenium replacement in patients with severe systemic inflammatory response syndrome improves clinical outcome.* Critical care medicine. **1999**;27(9):1807-13.

Arnér ES, Holmgren A. *Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase.* Eur.J.Biochem. **2000**;267:6102-6109.

- Ayaz M, Celik HA, Aydin HH, Turan B.** *Sodium selenite protects against diabetes-induced alterations in the antioxidant defense system of the liver.* Diabetes/metabolism research and reviews. **2006**;22(4):295-9.
- Balansky RM, Argirova RM.** *Sodium selenite inhibition of the reproduction of some oncogenic RNA-viruses.* Experientia. **1981**;37(11):1194-5.
- Barceloux DG.** *Selenium.* Journal of toxicology Clinical toxicology. **1999**;37(2):145-72.
- Barry SP, Townsend PA, McCormick J, Knight RA, Scarabelli TM, Latchman DS, et al.** *STAT3 deletion sensitizes cells to oxidative stress.* Biochemical and biophysical research communications. **2009**;385(3):324-9.
- Beck, M. A., Levander, O. A., Handy, J.** (2003). *Selenium Deficiency and Viral Infection.* J. Nutr. **2003**; 133, 1463S-1467S
- Beere HM.** *"The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis.* Journal of cell science. **2004**;117(Pt 13):2641-51.
- Behne D, Kyriakopoulos A.** *Mammalian Selenium-Containing Proteins.* Annu. Rev. Nutr. **2001**; 21:453-473.
- Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, Muller W, Menon S, Holland G, et al.** *Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses.* The Journal of clinical investigation. **1996**;98(4):1010-20.
- Berger MM, Soguel L, Shenkin A, Revelly JP, Pinget C, Baines M, et al.** *Influence of early antioxidant supplements on clinical evolution and organ function in critically ill cardiac surgery, major trauma, and subarachnoid hemorrhage patients.* Critical care. **2008**;12(4):R101.
- Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, et al.** *Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin.* Nature. **1985**;316(6028):552-4.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR.** *Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases.* Endocr Rev. **2002**; 23 (1): 38 – 89.
- Bigelow WC.** *Methods for inducing hypothermia and rewarming.* Annals of the New York Academy of Sciences. **1959**;80:522-32.
- Boeken U, Feindt P.** *Ist das SIRS/Sepsis-Syndrom in der Herzchirurgie Folge der extrakorporalen Zirkulation und damit unvermeidlich?* Z Herz-Thorax-Gefäßschir **2008**; 22: 110-118.
- Boengler K, Buechert A, Heinen Y, Roeskes C, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, et al.** *Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice.* Circulation research. **2008 A**;102(1):131-5.
- Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R.** *The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure.* Pharmacology & therapeutics. **2008**;120(2):172-85.
- Bonventre JV, Weinberg JM.** *Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure.* Journal of the American Society of Nephrology : JASN. **2003**;14(8):2199-210.

- A. Bouloumie, J. Bauersachs, W. Linz, et al.** *Endothelial dysfunction coincides with an enhanced nitric oxide synthase expression and superoxide anion production.* Hypertension **1997** ; 30 :934–941
- Bozinovski S, Seow HJ, Crack PJ, Anderson GP, Vlahos R.** *Glutathione peroxidase-1 primes pro-inflammatory cytokine production after LPS challenge in vivo.* PloS one. **2012**;7(3):e33172.
- Brigelius-Flohe R.** *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases.* Free radical biology & medicine. **1999**;27(9-10):951-65.
- Brigelius-Flohe R, Banning A, Schnurr K.** *Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function.* Antioxidants & redox signaling. **2003**;5(2):205-15.
- Brigelius-Flohe R, Maiorino M.** *Glutathione peroxidases.* Biochimica et biophysica acta. **2013**;1830(5):3289-303.
- Brigelius-Flohe R, Flohe L.** *Selenium and Redox Signaling.* Archives of biochemistry and biophysics. **2016**.
- Brouard S, Berberat PO, Tobiasch E, Seldon MP, Bach FH, Soares MP.** *Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide requires the activation of transcription factor NF-kappa B to protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis.* The Journal of biological chemistry. **2002**;277(20):17950-61.
- Brown KM, Arthur JR.** *Selenium, selenoproteins and human health: a review.* Public Health Nutrition **2001**;4(2B):593-599.
- Brune B, Ullrich V.** *Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase.* Molecular pharmacology. **1987**;32(4):497-504.
- Bruning CA, Prigol M, Luchese C, Jesse CR, Duarte MM, Roman SS, et al.** *Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines.* Neurochemical research. **2012**;37(10):2249-58.
- Burk RF, Hill KE, Motley AK.** *Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for selenoprotein P.* The Journal of nutrition. **2003**;133(5 Suppl 1):1517S-20S.
- Byers T, Perry G.** *Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers.* Annual review of nutrition. **1992**;12:139-59.
- Cai Z, Semenza GL.** *Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury.* Circulation. **2004**;109(17):2050-3.
- Cao Y, Tang J, Yang T, Ma H, Yi D, Gu C, et al.** *Cardioprotective effect of ghrelin in cardiopulmonary bypass involves a reduction in inflammatory response.* PloS one. **2013**;8(1):e55021.
- Carden DL, Granger DN.** *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury.* The Journal of pathology. **2000**;190(3):255-66.

Chang G, Zhang P, Ye L, Lu K, Wang Y, Duan Q, et al. *Protective effects of sitagliptin on myocardial injury and cardiac function in an ischemia/reperfusion rat model.* European journal of pharmacology. **2013**;718(1-3):105-13.

Chen M, Cheng A, Candotti F, Zhou YJ, Hymel A, Fasth A, et al. *Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains.* Molecular and cellular biology. **2000**;20(3):947-56.

Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Kaur H, Green CJ, Motterlini R. *Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction.* American journal of physiology Heart and circulatory physiology. **2000**;278(2):H643-51.

Clayton A, Turkes A, Navabi H, Mason MD, Tabi Z. *Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes.* Journal of cell science. **2005**;118(Pt 16):3631-8.

Cohen-Armon M. *PARP-1 activation in the ERK signaling pathway.* Trends in pharmacological sciences. **2007**;28(11):556-60.

Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. *Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway.* Circulation. **1998**;98(13):1329-34.

Craig R, Larkin A, Mingo AM, Thuerauf DJ, Andrews C, Mc Donough PM, Glembotski CC. *p38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system.* J Biol Chem **2000**; 275: 23814-24.

Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, et al. *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice.* Science. **1996**;274(5291):1379-83.

Dabrowski A, Boguslawicz C, Dabrowska M, Tribillo I, Gabryelewicz A. *Reactive oxygen species activate mitogen-activated protein kinases in pancreatic acinar cells.* Pancreas. **2000**;21(4):376-84.

Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery.* Cell. **1997**;91(2):231-41.

Daugaard M, Rohde M, Jaattela M. *The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions.* FEBS letters. **2007**;581(19):3702-10.

Davies EL, Bacelar MM, Marshall MJ, Johnson E, Wardle TD, Andrew SM, et al. *Heat shock proteins form part of a danger signal cascade in response to lipopolysaccharide and GroEL.* Clinical and experimental immunology. **2006**;145(1):183-9.

Demers P, Elkouri S, Martineau R, Couturier A, Cartier R. *Outcome with high blood lactate levels during cardiopulmonary bypass in adult cardiac operation.* The Annals of thoracic surgery. **2000**;70(6):2082-6.

Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, et al. *JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.* Cell. **1994**;76(6):1025-37.

DGE. Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 2000. 1. Aufl., Umschau Braus GmbH, Frankfurt/Main

Dougherty CJ, Kubasiak LA, Frazier DP, Li H, Xiong WC, Bishopric NH, et al. *Mitochondrial signals initiate the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by hypoxia-reoxygenation.* FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. **2004**;18(10):1060-70.

Dreher I, Schmutzler C, Jakob F, Kohrle J. *Expression of selenoproteins in various rat and human tissues and cell lines.* Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements. **1997**;11(2):83-91.

Drew CE, Keen G, Benazon DB. *Profound hypothermia.* Lancet. **1959**;1(7076):745-7.

Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, Rossen RD, et al. *Neutrophil accumulation in ischemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion.* Circulation. **1991**;84(1):400-11.

Eltzschig HK, Collard CD. *Vascular ischaemia and reperfusion injury.* British medical bulletin. **2004**;70:71-86.

Engels M. *Zum Einfluss von Ebselen auf den durch extrakorporale Zirkulation und hypothermen Kreislaufstillstand induzierten Ischämie- und Reperfusionsschaden in einem in vivo Ratten Modell.* Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen. **2013.**

Engels M, Bilgic E, Pinto A, Vasquez E, Wollschlager L, Steinbrenner H, et al. *A cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage.* Journal of inflammation. **2014**;11:26.

Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. *Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target.* Journal of medicinal chemistry. **2010**;53(12):4585-602.

Fang W, Han A, Bi X, Xiong B, Yang W. *Tumor inhibition by sodium selenite is associated with activation of c-Jun NH2-terminal kinase 1 and suppression of beta-catenin signaling.* International journal of cancer. **2010**;127(1):32-42.

Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D, Hesketh JE, et al. *Selenium in human health and disease.* Antioxidants & redox signaling. **2011**;14(7):1337-83.

Farivar AS, Merry HE, Fica-Delgado MJ, McCourtie AS, Mackinnon-Patterson BC, Mulligan MS. *Interleukin-6 regulation of direct lung ischemia reperfusion injury.* The Annals of thoracic surgery. **2006**;82(2):472-8.

Flohe L, Brigelius-Flohe R, Saliou C, Traber MG, Packer L. *Redox regulation of NF-kappa B activation.* Free radical biology & medicine. **1997**;22(6):1115-26.

Florian S, Krehl S, Loewinger M, Kipp A, Banning A, Esworthy S, et al. *Loss of GPx2 increases apoptosis, mitosis, and GPx1 expression in the intestine of mice.* Free radical biology & medicine. **2010**;49(11):1694-702.

Flynn A, Hirvonen T, Mensink GB, Ocke MC, Serra-Majem L, Stos K, Szponar L, Tetens I, Turrini A, Fletcher R, and Wildemann T. *Intake of selected nutrients from foods, from fortification and from supplements in various European countries.* Food Nutr Res 53, **2009**.

Forceville X. *The effect of selenium therapy on mortality in patients with sepsis syndrome: simple selenium supplementation or real (5 H₂O).Na₂SeO₃ pharmacological effect?**. Critical care medicine. **2013**;41(6):1591-2.

Fujita T, Toda K, Karimova A, Yan SF, Naka Y, Yet SF, et al. *Paradoxical rescue from ischemic lung injury by inhaled carbon monoxide driven by derepression of fibrinolysis.* Nature medicine. **2001**;7(5):598-604.

Ganichkin OM, Xu XM, Carlson BA, Mix H, Hatfield DL, Gladyshev VN, et al. *Structure and catalytic mechanism of eukaryotic selenocysteine synthase.* The Journal of biological chemistry. **2008**;283(9):5849-65.

Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. *Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation.* Hepatology. **1998**;27(6):1652-60.

Gega A, Rizzo JA, Johnson MH, Tranquilli M, Farkas EA, Eleftheriades JA. *Straight deep hypothermic arrest: experience in 394 patients supports its effectiveness as a sole means of brain preservation.* The Annals of thoracic surgery. **2007**;84(3):759-66; discussion 66-7.

Gerard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, et al. *Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia.* The Journal of experimental medicine. **1993**;177(2):547-50.

Gibbon JH, Jr *Artificial maintenance of circulation during experimental occlusion of pulmonary artery* Arch Surg **1937**; 34:1105-31

Gibbon JH, Jr. *Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery.* Minnesota medicine. **1954**;37(3):171-85; passim.

Gill R, Murkin JM. *Neuropsychologic dysfunction after cardiac surgery: what is the problem?* Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia. **1996**;10(1):91-8.

Gladyshev VN, Kryukov GV. *Evolution of selenocysteine-containing proteins: significance of identification and functional characterization of selenoproteins.* BioFactors. **2001**;14(1-4):87-92.

Goepfert MS, Richter HP, Zu Eulenburg C, Gruetzmacher J, Rafflenbeul E, Roehrer K, et al. *Individually optimized hemodynamic therapy reduces complications and length of stay in the intensive care unit: a prospective, randomized controlled trial.* Anesthesiology. **2013**;119(4):824-36.

Gon Y, Hashimoto S, Matsumoto K, Nakayama T, Takeshita I, Horie T. *Cooling and rewarming-induced IL-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 MAP kinase-dependent pathway.* Biochemical and biophysical research communications. **1998**;249(1):156-60.

Granger DN. *Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury.* The American journal of physiology. **1988**;255(6 Pt 2):H1269-75.

- Greason KL, Kim S, Suri RM, Wallace AS, Englum BR.** *Hypothermia and operative mortality during on-pump coronary artery bypass grafting.* The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. **2014**;148(6):2712-8.
- Greeley WJ, Kern FH, Ungerleider RM, Boyd JL, 3rd, Quill T, Smith LR, et al.** *The effect of hypothermic cardiopulmonary bypass and total circulatory arrest on cerebral metabolism in neonates, infants, and children.* The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. **1991**;101(5):783-94.
- Griep RB, Stinson EB, Oyer PE, Copeland JG, Shumway NE.** *The superiority of aortic cross-clamping with profound local hypothermia for myocardial protection during aorta-coronary bypass grafting.* The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. **1975**;70(6):995-1009.
- de Groot H.** *[Injury to visceral organs by ischemia and reperfusion. Processes in pathogenetic networks].* Zentralblatt für Chirurgie. **2005**;130(3):202-12.
- Groeneveld AB.** *Septic shock and multiple organ failure: treatment with haemofiltration?* Intensive care medicine. **1990**;16(8):489-90.
- Grocott HP, Mackensen GB, Newman MF, Warner DS.** *Neurological injury during cardiopulmonary bypass in the rat.* Perfusion. **2001**;16(1):75-81.
- Grocott HP, Homi HM, Puskas F.** *Cognitive dysfunction after cardiac surgery: revisiting etiology.* Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia. **2005**;9(2):123-9.
- Gruyter Wd.** *Pschyrembel klinisches Wörterbuch.* **2002**;259 : 814.
- Guan L, Han B, Li Z, Hua F, Huang F, Wei W, et al.** *Sodium selenite induces apoptosis by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells.* Apoptosis : an international journal on programmed cell death. **2009**;14(2):218-25.
- Guo F, Monsefi N, Moritz A, Beiras-Fernandez A.** *Selenium and cardiovascular surgery: an overview.* Current drug safety. **2012**;7(4):321-7.
- Haines DD, Lekli I, Teissier P, Bak I, Tosaki A.** *Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders.* Acta physiologica. **2012**;204(4):487-501.
- Hall RI, Smith MS, Rucker G.** *The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass: pathophysiological, therapeutic, and pharmacological considerations.* Anesthesia and analgesia. **1997**;85(4):766-82.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** *Free radicals in biology and medicine.* Clarendon Press Oxford. **1989**.
- Hansen PR.** *Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion.* Circulation. **1995**;91(6):1872-85.
- Harada N, Hatano E, Koizumi N, Nitta T, Yoshida M, Yamamoto N, et al.** *Akt activation protects rat liver from ischemia/reperfusion injury.* The Journal of surgical research. **2004**;121(2):159-70.

Hartfiel, W., Schulte, W. *Selenmangel in der Bundesrepublik (II)*, Acta Ern. **1988**; 13, 77-82

Hartl FU, Hayer-Hartl M. *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science. **2002**;295(5561):1852-8.

Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Maruoka S, Takeshita I, Hayashi S, et al. *p38 Mitogen-activated protein kinase regulates IL-8 expression in human pulmonary vascular endothelial cells*. The European respiratory journal. **1999**;13(6):1357-64.

Hassanzadeh M, Faridhosseini R, Mahini M, Faridhosseini F, Ranjbar A. *Serum Levels of TNF-, IL-6, and Selenium in Patients with Acute and Chronic Coronary Artery Disease*. Iran J Immunol. **2006** Sep;3(3):142-5.

Hatachi G, Tsuchiya T, Miyazaki T, Matsumoto K, Yamasaki N, Okita N, et al. *The Poly(Adenosine Diphosphate-Ribose) Polymerase Inhibitor PJ34 Reduces Pulmonary Ischemia-Reperfusion Injury in Rats*. Transplantation. **2014**;98(6):618-24.

Hatfield DL, Gladyshev VN. *How selenium has altered our understanding of the genetic code*. Molecular and cellular biology. **2002**;22(11):3565-76.

Hausenloy DJ, Tsang A, Yellon DM. *The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning*. Trends in cardiovascular medicine. **2005**;15(2):69-75.

Haverich A, Hagl C. *Organ protection during hypothermic circulatory arrest*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. **2003**;125(3):460-2.

Heck TG, Scholer CM, de Bittencourt PI. *HSP70 expression: does it a novel fatigue signalling factor from immune system to the brain?* Cell biochemistry and function. **2011**;29(3):215-26.

Heusch G, Musiolik J, Gedik N, Skyschally A. *Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion*. Circulation research. **2011**;109(11):1302-8.

Heusch G, Musiolik J, Kottenberg E, Peters J, Jakob H, Thielmann M. *STAT5 activation and cardioprotection by remote ischemic preconditioning in humans: short communication*. Circulation research. **2012**;110(1):111-5.

Hess PJ Jr. *Systemic inflammatory response to coronary artery bypass graft surgery*. Am J Health Syst Pharm **2005**; 15: 6-9.

Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, Kaminski K, Schaefer A, Schieffer B, et al. *Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury*. Circulation research. **2004**;95(2):187-95.

Hill GE, Whitten CW, Landers DF. *The influence of cardiopulmonary bypass on cytokines and cell-cell communication*. Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia. **1997**;11(3):367-75.

Hill, K.E., Zhou, J., McMahan, W.J., Motley, A.K., Atkins, J.F. Gesteland, R.F., Burk, R.F. *Deletion of SeP alters distribution of selenium in the mouse*. J.Biol.Chem. **2003**; 278, 13640–13646.

Hira CK, Partal K, and Dhillon KS. *Dietary selenium intake by men and women in high and low selenium areas of Punjab.* Public Health Nutr. **2004**; 7: 39–43.

Hoffmann FW, Hashimoto AC, Shafer LA, Dow S, Berry MJ, Hoffmann PR. *Dietary selenium modulates activation and differentiation of CD4+ T cells in mice through a mechanism involving cellular free thiols.* The Journal of nutrition. **2010**;140(6):1155-61.

Horvath CM, Darnell JE. *The state of the STATs: recent developments in the study of signal transduction to the nucleus.* Current opinion in cell biology. **1997**;9(2):233-9.

Hoshida S, Kuzuya T, Nishida M, Yamashita N, Hori M, Kamada T, Tada M. *Ebselen protects against ischemia-reperfusion injury in a canine model of myocardial infarction.* Am J Physiol Heart Circ Physiol **1994**; 267: H2342-2347.

Hou JC. *Inhibitory effect of selenite and other antioxidants on complement-mediated tissue injury in patients with epidemic hemorrhagic fever.* Biological trace element research. **1997**;56(1):125-30.

Houshyar KS, Pyles MN, Rein S, Nietzsche I, Duscher D, Maan ZN, et al. *Continuous hemoadsorption with a cytokine adsorber during sepsis - a review of the literature.* The International journal of artificial organs. **2017**;40(5):205-11.

Huang Z, Rose AH, Hoffmann PR. *The role of selenium in inflammation and immunity: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities.* Antioxidants & redox signaling. **2012**;16(7):705-43.

Husbeck B, Peehl DM, Knox SJ. *Redox modulation of human prostate carcinoma cells by selenite increases radiation-induced cell killing.* Free radical biology & medicine. **2005**;38(1):50-7.

Indeglia RA, Shea MA, Forstrom R, Bernstein EF. *Influence of mechanical factors on erythrocyte sublethal damage.* Transactions-American Society for Artificial Internal Organs. **1968**;14:264-72.

Irving EA, Barone FC, Reith AD, Hadingham SJ, Parsons AA. *Differential activation of MAPK/ERK and p38/SAPK in neurones and glia following focal cerebral ischaemia in the rat.* Brain research Molecular brain research. **2000**;77(1):65-75.

Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. *Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo.* FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. **1990**;4(15):3355-9.

Japha, A. *Experiementa nonnulla de vi selenii in organismum animale.* Dissertation, Halle. **1842**.

Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog.* Archives of pathology. **1960**;70:68-78.

Jia X, Li N, Chen J. *A subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague-Dawley rats.* Life sciences. **2005**;76(17):1989-2003.

- Kaizu T, Ikeda A, Nakao A, Tsung A, Toyokawa H, Ueki S, et al.** *Protection of transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury with carbon monoxide via MEK/ERK1/2 pathway downregulation.* American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. **2008**;294(1):G236-44.
- Kalayci M, Coskun O, Cagavi F, Kanter M, Armutcu F, Gul S, et al.** *Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats.* Neurochemical research. **2005**;30(3):403-10.
- Karaca P, Konuralp C, Enc Y, Suzer A, Sokullu O, Ayoglu U, et al.** *Cardioprotective effect of aprotinin on myocardial ischemia/reperfusion injury during cardiopulmonary bypass.* Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. **2006**;70(11):1432-6.
- Karkouti K, Djaiani G, Borger MA, Beattie WS, Fedorko L, Wijeyesundera D, et al.** *Low hematocrit during cardiopulmonary bypass is associated with increased risk of perioperative stroke in cardiac surgery.* The Annals of thoracic surgery. **2005**;80(4):1381-7.
- Kaukonen KM, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R.** *Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis.* The New England journal of medicine. **2015**;372(17):1629-38.
- Kerrigan CL, Stotland MA.** *Ischemia reperfusion injury: a review.* Microsurgery. **1993**;14(3):165-75.
- Keyse SM, Tyrrell RM.** *Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **1989**;86(1):99-103.
- Khan TA, Bianchi C, Ruel M, Voisine P, Selke FW.** *Mitogen-activated protein kinase pathways and cardiac surgery.* J Thorac Cardiovasc Surg **2004**; 127: 806-11.
- Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M.** *Heme oxygenase and heme degradation.* Biochemical and biophysical research communications. **2005**;338(1):558-67.
- Kindy MS.** *Inhibition of tyrosine phosphorylation prevents delayed neuronal death following cerebral ischemia.* Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. **1993**;13(3):372-7.
- Kipp AP, Strohm D, Brigelius-Flohe R, Schomburg L, Bechthold A, Leschik-Bonnet E, et al.** *Revised reference values for selenium intake.* Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements. **2015**;32:195-9.
- Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD.** *Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass.* The Journal of thoracic and cardiovascular surgery. **1983**;86(6):845-57.
- Kirklin JW, Donald DE, Harshbarger HG, Hetzel PS, Patrick RT, Swan HJ, et al.** *Studies in extracorporeal circulation. I. Applicability of Gibbon-type pump-oxygenator to human intracardiac surgery: 40 cases.* Annals of surgery. **1956**;144(1):2-8.

Kleikers PW, Wingler K, Hermans JJ, Diebold I, Altenhöfer S, Radermacher KA, Janssen B, Görlach A, Schmidt HH. *NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury.* J Mol Med **2012**; 90: 1391-1406.

Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. *The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog.* The Journal of clinical investigation. **1974**;54(6):1496-508.

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, et al. *Characterization of mammalian selenoproteomes.* Science. **2003**;300(5624):1439-43.

Kubes P, Smith R, Grisham MD, Granger DN. *Neutrophil-mediated proteolysis. Differential roles for cathepsin G and elastase.* Inflammation. **1993**;17(3):321-32.

Kyriakis JM, Avruch J. *Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update.* Physiological reviews. **2012**;92(2):689-737.

Kyriakopoulos A, Behne D. *Selenium-Containing Proteins in Mammals and Other Forms of Life.* Reviews of Physiology, Biochemistry, and Pharmacology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg **2002**; Vol 145,pp3-33.

Lazzarino G, Raatikainen P, Nuutinen M, Nissinen J, Tavazzi B, Di Pierro D, et al. *Myocardial release of malondialdehyde and purine compounds during coronary bypass surgery.* Circulation. **1994**;90(1):291-7.

Lech T. *Suicide by sodium tetraoxoselenate(VI) poisoning.* Forensic Sci Int. **2002**; 130: 44–48.

Lee SW, Tsou AP, Chan H, Thomas J, Petrie K, Eugui EM, et al. *Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **1988**;85(4):1204-8.

Lepper PM, Dufour JF. *[Elevated transaminases-what to do if everything was done?].* Praxis. **2009**;98(6):330-4.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC et al. *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.* Crit Care Med. **2003**. 31:1250–1256

Lewis FJ, Taufic M. *Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case.* Surgery. **1953**;33(1):52-9.

Lewis FJ, Varco RL, Taufic M. *Repair of atrial septal defects in man under direct vision with the aid of hypothermia.* Surgery. **1954**;36(3):538-56.

Li C, Jackson RM. *Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury.* American journal of physiology Cell physiology. **2002**;282(2):C227-41.

Liaudet L, Pacher P, Mabley JG, Virag L, Soriano FG, Hasko G, et al. *Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase-1 is a central mechanism of lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation.* American journal of respiratory and critical care medicine. **2002**;165(3):372-7.

Liberek K, Lewandowska A, Zietkiewicz S. *Chaperones in control of protein disaggregation.* The EMBO journal. **2008**;27(2):328-35.

Liu D, Liu S, Huang Y, Liu Y, Zhang Z, Han L. *Effect of selenium on human myocardial glutathione peroxidase gene expression.* Chinese medical journal. **2000**;113(9):771-5.

Liu A, Dirsch O, Fang H, Sun J, Jin H, Dong W, Dahmen U. *HMGB1 in ischemic and non-ischemic liver after selective warm ischemia/reperfusion in rat.* Histochem Cell Biol **2011**; 135: 443-52.

Liu L, Liu C, Hou L, Lv J, Wu F, Yang X, et al. *Protection against ischemia/reperfusion induced renal injury by cotreatment with erythropoietin and sodium selenite.* Molecular medicine reports. **2015**;12(6):7933-40.

Lopez-Neblina F, Toledo-Pereyra LH. *Phosphoregulation of signal transduction pathways in ischemia and reperfusion.* The Journal of surgical research. **2006**;134(2):292-9.

Löscher, W., Ungemach F., Kroker, R. *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.* **2006.** Parey Bei Mvs-Verlag.

Lu J, Berndt C, Holmgren A. *Metabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase.* Biochimica et biophysica acta. **2009**;1790(11):1513-9.

Lum H, Roebuck KA. *Oxidant stress and endothelial cell dysfunction.* American journal of physiology Cell physiology. **2001**;280(4):C719-41.

MacFarquhar JK, Broussard DL, Melstrom P, Hutchinson R, Wolkin A, Martin C, Burk RF, Dunn JR, Green AL, Hammond R, Schaffner W, and Jones TF. *Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement.* Arch Intern Med. **2010**; 170: 256–261.

Mack MJ. *Advances in the treatment of coronary artery disease.* The Annals of thoracic surgery. **2003**;76(6):S2240-5.

Manghani C, Gupta A, Tripathi V, Rani V. *Cardioprotective potential of curcumin against norepinephrine-induced cell death: a microscopic study.* Journal of microscopy. **2016.**

Manzanares W, Dhaliwal R, Jiang X, Murch L, Heyland DK. *Antioxidant micronutrients in the critically ill: a systematic review and meta-analysis.* Critical care. **2012**;16(2):R66.

Maulik N, Das DK. *Redox signaling in vascular angiogenesis.* Free radical biology & medicine. **2002**;33(8):1047-60.

Meldrum DR. *Tumor necrosis factor in the heart.* The American journal of physiology. **1998**;274(3 Pt 2):R577-95.

Menger MD, Lehr HA, Messmer K. *Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury.* Klinische Wochenschrift. **1991**;69(21-23):1050-5.

Menger MD, Steiner D, Messmer K. *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow".* The American journal of physiology. **1992**;263(6 Pt 2):H1892-900.

Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. *Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox".* The American journal of physiology. **1992**;263(6 Pt 2):H1901-6.

Minamino T, Christou H, Hsieh CM, Liu Y, Dhawan V, Abraham NG, et al. *Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **2001**;98(15):8798-803.

Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. *Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process.* International journal of cardiology. **2005**;100(2):179-90.

del Moral RM, Gomez-Morales M, Hernandez-Cortes P, Aguilar D, Caballero T, Aneiros-Fernandez J, et al. *PARP inhibition attenuates histopathological lesion in ischemia/reperfusion renal mouse model after cold prolonged ischemia.* TheScientificWorldJournal. **2013**;2013:486574.

Morse D, Choi AM. *Heme oxygenase-1: the "emerging molecule" has arrived.* American journal of respiratory cell and molecular biology. **2002**;27(1):8-16.

Muller A, Cadenas E, Graf P, Sies H. *A novel biologically active seleno-organic compound--I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen).* Biochemical pharmacology. **1984**;33(20):3235-9.

Muller C, Dunschede F, Koch E, Vollmar AM, Kiemer AK. *Alpha-lipoic acid preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury of the rat liver via the PI3-kinase/Akt pathway.* American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. **2003**;285(4):G769-78.

Murphy ME. *The HSP70 family and cancer.* Carcinogenesis. **2013**;34(6):1181-8.

Navarro-Alarcon M, Lopez-Martinez MC. *Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases.* The Science of the total environment. **2000**;249(1-3):347-71.

Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, et al. *Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase.* Circulation. **2001**;104(9):979-81.

Neve J. *Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases.* Journal of cardiovascular risk. **1996**;3(1):42-7.

Ohta Y and Suzuki KT. *Methylation and demethylation of intermediates selenide and ethylselenol in the metabolism of selenium.* Toxicol Appl Pharmacol **2008**; 226: 169–177.

Oka Y, Akagi Y, Kinugasa T, Ishibashi N, Iwakuma N, Shiratsuchi I, et al. *Heat-shock pre-treatment reduces liver injury and aids liver recovery after partial hepatectomy in mice.* Anticancer research. **2013**;33(7):2887-94.

Oku T, Harasaki H, Smith W, Nose Y. *Hemolysis. A comparative study of four nonpulsatile pumps.* ASAIO transactions / American Society for Artificial Internal Organs. **1988**;34(3):500-4.

Ostadalova I, Vobecky M, Chvojkova Z, Mikova D, Hampl V, Wilhelm J, et al. *Selenium protects the immature rat heart against ischemia/reperfusion injury.* Molecular and cellular biochemistry. **2007**;300(1-2):259-67.

Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. *Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme.* Trends in immunology. **2003**;24(8):449-55.

Pan S, Liu L, Pan H, Ma Y, Wang D, Kang K, et al. *Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion injury in mice.* Molecular nutrition & food research. **2013**;57(7):1218-27.

Park HJ, Kim BC, Kim SJ, Choi KS. *Role of MAP kinases and their cross-talk in TGF-beta1-induced apoptosis in FaO rat hepatoma cell line.* Hepatology. **2002**;35(6):1360-71.

Polderman KH. *Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence.* Intensive care medicine. **2004**;30(4):556-75.

Popovic P, Horecky J, Popovic VP. *Circulation extracorporelle chez le rat blanc en hypothermie.* J Physiol Paris **1966**; 58:594

Prasad A, Stone GW, Holmes DR, Gersh B. *Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the "dark side" of reperfusion.* Circulation. **2009**;120(21):2105-12.

Raines AM, Sunde RA. *Selenium toxicity but not deficient or super-nutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents.* BMC genomics. **2011**;12:26.

Raman M, Chen W, Cobb MH. *Differential regulation and properties of MAPKs.* Oncogene. **2007**;26(22):3100-12.

Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study.* Jama. **1995**;273(2):117-23.

Ranucci M, De Toffol B, Isgro G, Romitti F, Conti D, Vicentini M. *Hyperlactatemia during cardiopulmonary bypass: determinants and impact on postoperative outcome.* Critical care. **2006**;10(6):R167.

Ranzani OT, Prina E, Menendez R, Ceccato A, Cilloniz C, Mendez R, et al. *New Sepsis Definition (Sepsis-3) and Community-acquired Pneumonia Mortality: A Validation and Clinical Decision-making Study.* American journal of respiratory and critical care medicine. **2017**.

Rayman, M. P. *Review: The importance of selenium to human health.* Lancet. **2000**; 356, 233-241

Rayman MP, Stranges S, Griffin BA, Pastor-Barriuso R, Guallar E. *Effect of supplementation with high-selenium yeast on plasma lipids: a randomized trial.* Annals of internal medicine. **2011**;154(10):656-65.

Rayman MP. *Selenium and human health.* Lancet. **2012**;379(9822):1256-68.

Rodrigo R, Prieto JC, Castillo R. *Cardioprotection against ischemia/reperfusion by vitamins C and E plus n-3 fatty acids: molecular mechanisms and potential clinical applications.* Clin Sci (London) **2013**; 124: 1-15.

Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW, Investigators A-I. *A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II).* Journal of the American College of Cardiology. **2005**;45(11):1775-80.

Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. *Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase.* Science. **1973**;179(4073):588-90.

Römpp, H., Falbe, J., Regitz, M., Römpp Lexikon Chemie, Auflage 10, Thieme, Stuttgart. **1996.**

U. Rueckschloss, N. Duerrschmidt, H. Morawietz, *NADPH oxidase in endothelial cells: impact on atherosclerosis,* Antioxid. Redox Signal. **2003**; 5:171–180.

Said RS, Badr AM, Nada AS, El-Demerdash E. *Sodium selenite treatment restores long-lasting ovarian damage induced by irradiation in rats: impact on oxidative stress and apoptosis.* Reproductive toxicology. **2014**;43:85-93.

Sakamoto T, Nollert GD, Zurakowski D, Soul J, Duebener LF, Sperling J, et al. *Hemodilution elevates cerebral blood flow and oxygen metabolism during cardiopulmonary bypass in piglets.* The Annals of thoracic surgery. **2004**;77(5):1656-63; discussion 63.

Sakr Y, Reinhart K, Bloos F, Marx G, Russwurm S, Bauer M, et al. *Time course and relationship between plasma selenium concentrations, systemic inflammatory response, sepsis, and multiorgan failure.* British journal of anaesthesia. **2007**;98(6):775-84.

Sammut IA, Jayakumar J, Latif N, Rothery S, Severs NJ, Smolenski RT, et al. *Heat stress contributes to the enhancement of cardiac mitochondrial complex activity.* The American journal of pathology. **2001**;158(5):1821-31.

Sammut IA, Harrison JC. *Cardiac mitochondrial complex activity is enhanced by heat shock proteins.* Clinical and experimental pharmacology & physiology. **2003**;30(1-2):110-5.

Schewe T. *Molecular actions of ebselen-an antiinflammatory antioxidant.* General pharmacology. **1995**;26(6):1153-69.

Schmid-Schonbein GW. *Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation.* Federation proceedings. **1987**;46(7):2397-401.

Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. *Selenium and Selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic.* Cell.Mol.Life Sci. **2004**:Vol.61:1988-1995.

Schrauzer GN. *James E. Oldfield. Recipient of the Klaus Schwarz Award for 1998.* Biological trace element research. **1998**;65(3):185-6.

Schroeder C, Jordan J. *Norepinephrine transporter function and human cardiovascular disease.* American journal of physiology Heart and circulatory physiology. **2012**;303(11):H1273-82.

- Schwarz K, Foltz CM.** *Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration.* J Am Chem Soc **1957**; 79: 3292-3293.
- Shao LE, Tanaka T, Gribi R, Yu J.** *Thioredoxin-related regulation of NO/NOS activities.* Annals of the New York Academy of Sciences. **2002**;962:140-50.
- Sharma AK, Dhingra S, Khaper N, Singal PK.** *Activation of apoptotic processes during transition from hypertrophy to heart failure in guinea pigs.* American journal of physiology Heart and circulatory physiology. **2007**;293(3):H1384-90.
- Sheehan TM, Gao M.** *Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine.* Clinical chemistry. **1990**;36(12):2124-6.
- Shinde SB, Golam KK, Kumar P, Patil ND.** *Blood lactate levels during cardiopulmonary bypass for valvular heart surgery.* Annals of cardiac anaesthesia. **2005**;8(1):39-44.
- Shu X, Zhang J, Wang Q, Xu Z, Yu T.** *Glutamine decreases intestinal mucosal injury in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion by downregulating HMGB1 and inflammatory cytokine expression.* Experimental and therapeutic medicine. **2016**;12(3):1367-72.
- Siegmund B, Klietz T, Schwartz P. and Piper H. M.** *Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes.* Am J Physiol. **1991**; 260: H426-435.
- Sies H, Cadenas E.** *Oxidative stress: damage to intact cells and organs.* Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences. **1985**;311(1152):617-31.
- Sies H.** *Strategies of antioxidant defense.* European journal of biochemistry / FEBS. **1993**;215(2):213-9.
- Sies H.** *Oxidative stress: oxidants and antioxidants.* Experimental physiology. **1997**;82(2):291-5.
- Sinci V, Gunaydin S, Kalaycioglu S, Soncul H, Gokgoz L, Oz E.** *Effects of selenium enriched reperfusion solutions on isolated guinea pig hearts.* The Keio journal of medicine. **1998**;47(4):219-22.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al.** *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).* Jama. **2016**;315(8):801-10.
- Small-Howard A, Morozova N, Stoytcheva Z, Forry EP, Mansell JB, Harney JW, et al.** *Supramolecular complexes mediate selenocysteine incorporation in vivo.* Molecular and cellular biology. **2006**;26(6):2337-46.
- Smith RM, Suleman N, Lacerda L, Opie LH, Akira S, Chien KR, et al.** *Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning.* Cardiovascular research. **2004**;63(4):611-6.
- Sokoloff L.** *The history of Kashin-Beck disease.* New York state journal of medicine. **1989**;89(6):343-51.
- Soskic V, Groebe K, Schratzenholz A.** *Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing.* Exp Gerontol. **2008**; 43:247-257.

Souci, S. W., Fachmann, W., Kraut, H. *Food Composition and Nutrition Tables*. Wissenschaftliche Verlagsges. 2007; 7. Auflage, Stuttgart

Steinbrenner, H, and H. Sies. *Protection against reactive oxygen species by selenoproteins*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2009**; 1790: 1478–1485.

Steinbrenner H, Bilgic E, Pinto A, Engels M, Wollschlager L, Dohrn L, et al. *Selenium Pretreatment for Mitigation of Ischemia/Reperfusion Injury in Cardiovascular Surgery: Influence on Acute Organ Damage and Inflammatory Response*. *Inflammation*. **2016**;39(4):1363-76.

Stoedter M, Renko K, Hog A, Schomburg L. *Selenium controls the sex-specific immune response and selenoprotein expression during the acute-phase response in mice*. *The Biochemical journal*. **2010**;429(1):43-51.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. *Science*. **1987**;235(4792):1043-6.

Suter PM, Domenighetti G, Schaller MD, Laverriere MC, Ritz R, Perret C. *N-acetylcysteine enhances recovery from acute lung injury in man. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study*. *Chest*. **1994**;105(1):190-4.

Svyatets M, Tolani K, Zhang M, Tulman G, Charchafieh J. *Perioperative management of deep hypothermic circulatory arrest*. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. **2010**;24(4):644-55.

Szijarto A, Batmunkh E, Hahn O, Mihaly Z, Kreiss A, Kiss A, et al. *Effect of PJ-34 PARP-inhibitor on rat liver microcirculation and antioxidant status*. *The Journal of surgical research*. **2007**;142(1):72-80.

Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Terada N, Forster I, et al. *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils*. *Immunity*. **1999**;10(1):39-49.

Tamari Y, Tortolani AJ, Lee-Sensiba KJ. *Bloodless testing for microporous membrane oxygenator failure: a preliminary study*. *The International journal of artificial organs*. **1991**;14(3):154-60.

Tamura T, Yamamoto S, Takahata M, Sakaguchi H, Tanaka H, Stadtman TC, et al. *Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2004**;101(46):16162-7.

Tanaka T, Kishimoto T. *Targeting interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases*. *International journal of biological sciences*. **2012**;8(9):1227-36.

Tanguy S, Boucher F, Besse S, Ducros V, Favier A, de Leiris J. *Trace elements and cardioprotection: increasing endogenous glutathione peroxidase activity by oral selenium supplementation in rats limits reperfusion-induced arrhythmias*. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements*. **1998**;12(1):28-38.

Taylor EW, Nadimpalli RG, Ramanathan CS. *Genomic structures of viral agents in relation to the biosynthesis of selenoproteins.* Biological trace element research. **1997**;56(1):63-91.

Taylor KM. *Brain damage during cardiopulmonary bypass.* The Annals of thoracic surgery. **1998**;65(4 Suppl):S20-6; discussion S7-8.

Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. *Hepatic ischemic preconditioning in mice is associated with activation of NF-kappaB, p38 kinase, and cell cycle entry.* Hepatology. **2002**;36(1):94-102.

Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. *Protein kinases in organ ischemia and reperfusion.* Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research. **2008**;21(4):215-26.

Toyokuni S. *Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology.* Pathology international. **1999**;49(2):91-102.

Tran SE, Holmstrom TH, Ahonen M, Kahari VM, Eriksson JE. *MAPK/ERK overrides the apoptotic signaling from Fas, TNF, and TRAIL receptors.* The Journal of biological chemistry. **2001**;276(19):16484-90.

Tuuminen R, Nykanen AI, Saharinen P, Gautam P, Keranen MA, Arnaudova R, et al. *Donor simvastatin treatment prevents ischemia-reperfusion and acute kidney injury by preserving microvascular barrier function.* American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. **2013**;13(8):2019-34.

Ursini F, Bindoli A. *The role of selenium peroxidase in the protection against oxidative damage of membranes.* Chem. Phys. Lipids 44, 255-276

Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, et al. *Diversity of glutathione peroxidases.* Methods in enzymology. **1995**;252:38-53.

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. *Nutrient Intakes from Food: Mean amounts consumed per individual, one day, 2005–2006.* **2008**

Valladares A, Alvarez AM, Ventura JJ, Roncero C, Benito M, Porras A. *p38 mitogen-activated protein kinase mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes.* Endocrinology. **2000**;141(12):4383-95.

Venardos K, Harrison G, Headrick J, Perkins A. *Selenium supplementation and ischemia-reperfusion injury in rats.* Redox report : communications in free radical research. **2004**;9(6):317-20.

Venardos KM, Perkins A, Headrick J, Kaye DM. *Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review.* Current medicinal chemistry. **2007**;14(14):1539-49.

Wan S, LeClerc JL, Vincent JL. *Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies.* Chest. **1997**;112(3):676-92.

Wang CY, Chau LY. *Heme oxygenase-1 in cardiovascular diseases: molecular mechanisms and clinical perspectives.* Chang Gung medical journal. **2010**;33(1):13-24.

Wang, G. Y. *The difference between whole blood and hair selenium levels of inhabitants in the endemic areas of Keshan disease.* Zhonghua Yu Fang Li Xue Za Zhi. **1979**; 13 (4), 204-6

Wang GS, Geng DQ, Wang YW, Chen XD, Yang TH, Chang CH. *[Protective effect of Na₂SeO₃ against cerebral ischemia-reperfusion injury to the hippocampal neurons in rats].* Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University. **2010**;30(10):2336-9.

Wang X, Wang H, Xu L, Rozanski DJ, Sugawara T, Chan PH, et al. *Significant neuroprotection against ischemic brain injury by inhibition of the MEK1 protein kinase in mice: exploration of potential mechanism associated with apoptosis.* The Journal of pharmacology and experimental therapeutics. **2003**;304(1):172-8.

Watanabe Y, Cohen RA, Matsui R. *Redox Regulation of Ischemic Angiogenesis- Another Aspect of Reactive Oxygen Species.* Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society. **2016**;80(6):1278-84.

Wheeler DS, Wong HR. *Heat shock response and acute lung injury.* Free radical biology & medicine. **2007**;42(1):1-14.

Winjbergen A. *Ratten.* GABRISCH K, ZWART P (Hrsg.): Krankheiten der Heimtiere
Schlütersche Verlagsgesellschaft GmbH & Co KG, Edition 6, Hannover; **2005**:139

Wilks AF, Harpur AG, Kurban RR, Ralph SJ, Zurcher G, Ziemiecki A. *Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase.* Molecular and cellular biology. **1991**;11(4):2057-65.

Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA. *Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response.* Nature medicine. **1996**;2(1):87-90.

Wong HR, Menendez IY, Ryan MA, Denenberg AG, Wispe JR. *Increased expression of heat shock protein-70 protects A549 cells against hyperoxia.* The American journal of physiology. **1998**;275(4 Pt 1):L836-41.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. *Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis.* Science. **1995**;270(5240):1326-31.

Xiang N, Zhao R, Zhong W. *Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells.* Cancer chemotherapy and pharmacology. **2009**;63(2):351-62.

Yang GQ, Wang SZ, Zhou RH, and Sun SZ. *Endemic selenium intoxication of humans in China.* Am J Clin Nutr **1983**; 37: 872-881.

Yang, G. Q., Chen, J. S., Wen, Z. M., Ge, K. Y., Zhu, L. Z., Chen, X. C. *The role of selenium in Keshan disease.* Adv. Nutr. Res. **1984**; 6, 203-231

Yang N, Luo M, Li R, Huang Y, Zhang R, Wu Q, et al. *Blockage of JAK/STAT signaling attenuates renal ischaemia-reperfusion injury in rat.* Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association. **2008**;23(1):91-100.

Yet SF, Perrella MA, Layne MD, Hsieh CM, Maemura K, Kobzik L, et al. *Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice.* The Journal of clinical investigation. **1999**;103(8):R23-9.

Yet SF, Tian R, Layne MD, Wang ZY, Maemura K, Solovyeva M, et al. *Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice.* Circulation research. **2001**;89(2):168-73.

Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, et al. *Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney.* The Journal of biological chemistry. **1997**;272(32):19943-50.

Zapletal C, Heyne S, Breitzkreutz R, Gebhard MM, Golling M. *The influence of selenium substitution on microcirculation and glutathione metabolism after warm liver ischemia/reperfusion in a rat model.* Microvascular research. **2008**;76(2):104-9.

Zhang F, Yu W, Hargrove JL, Greenspan P, Dean RG, Taylor EW, et al. *Inhibition of TNF-alpha induced ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression by selenium.* Atherosclerosis. **2002**;161(2):381-6.

Zhang X, Shan P, Alam J, Fu XY, Lee PJ. *Carbon monoxide differentially modulates STAT1 and STAT3 and inhibits apoptosis via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and p38 kinase-dependent STAT3 pathway during anoxia-reoxygenation injury.* The Journal of biological chemistry. **2005**; 280(10):8714-21.

Zhang M, Chen L. *Status of cytokines in ischemia reperfusion induced heart injury.* Cardiovascular & hematological disorders drug targets. **2008**;8(3):161-72.

Zhang Q, Chen L, Guo K, Zheng L, Liu B, Yu W, et al. *Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and antioxidative capacity in mice.* Biological trace element research. **2013**;154(2):255-61.

Zhang W, Zhang JQ, Meng FM, Xue FS. *Dexmedetomidine protects against lung ischemia-reperfusion injury by the PI3K/Akt/HIF-1alpha signaling pathway.* Journal of anesthesia. **2016**;30(5):826-33.

Zhao YR, Wang D, Liu Y, Shan L, Zhou JL. *The PI3K/Akt, p38MAPK, and JAK2/STAT3 signaling pathways mediate the protection of SO2 against acute lung injury induced by limb ischemia/reperfusion in rats.* The journal of physiological sciences : JPS. **2016**;66(3):229-39.

Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. *Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **1987**;84(5):1404-7.

Zweier JL. *Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury.* The Journal of biological chemistry. **1988**;263(3):1353-7.

Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Abb. 1	Schematischer Überblick über die Pathophysiologie des Reperfusionsschadens.....	5
Abb. 2	Schematischer Überblick der systemischen Reaktion auf die extrakorporale Zirkulation.....	7
Abb. 3	Therapieansätze zur Beeinflussung der systemischen Inflammation.....	8
Abb. 4	Schematischer, vereinfachter Überblick über die MAPK-Signalwege.....	9
Abb. 5	Schematischer, vereinfachter Überblick über den JAK/STAT-Signalweg.....	11
Abb. 6	Schematischer, vereinfachter Überblick des extrinsischen und intrinsischen Apoptosewegs sowie die hemmenden Mechanismen.....	14
Abb. 7	Globale Unterschiede in der Selenaufnahme.....	16
Abb. 8	Schematische Darstellung des Selenmetabolismus.....	18
Abb. 9	Reaktionsschema der durch GPx katalysierten Reaktion zur Neutralisation von Wasserstoffperoxiden sowie anderen organischen Hydroperoxiden.....	21
Abb. 10	Pathophysiologie von Sepsis / SIRS.....	23
Abb. 11	Gesamtübersicht der Versuchsgruppen.....	31
Abb. 12	Schematische Darstellung des HLM-Kreislaufs an der Ratte.....	33
Abb. 13	Schematische Darstellung des Zeit- und Temperaturverlaufs während der Operation.....	34
Abb. 14	Schema der Temperatur- und Blutflussregulierung während der Kühlungsphase der EKZ am Beispiel einer 500g schweren Ratte.....	37
Abb. 15	Schema der Temperatur- und Blutflussregulierung während der Wiedererwärmungsphase der EKZ am Beispiel einer 500g schweren Ratte.....	39
Abb. 16	GPx-Aktivität von Herz, Leber, Lunge und Niere der nicht behandelten Gruppen.....	48
Abb. 17	Einfluss einer Supplementation mit Natriumselenit auf ausgewählte klinisch-chemische Blutparameter.....	49
Abb. 18	Western Blots aus Herzlysaten. Ergebnisse der nicht behandelten Kontroll- und der nicht behandelten Selentiere.....	51
Abb. 19	Western Blots aus Leberlysaten. Ergebnisse der nicht behandelten Kontroll- und der nicht behandelten Selentiere.....	51
Abb. 20	Western Blots aus Lungenlysaten. Ergebnisse der nicht behandelten Kontroll- und der nicht behandelten Selentiere.....	52
Abb. 21	GPx-Aktivität von Herz, Leber, Lunge und Niere.....	53

Abb. 22	Selengehalt von Herz, Leber, Lunge und Niere.....	54
	Einfluss von Natriumselenit auf den Verlauf ausgewählter klinisch-chemischer Blutparameter zu definierten Zeitpunkten der EKZ.....	55
Abb. 23		
Abb. 24	Katecholaminbedarf der Kontroll- und Natriumselenitgruppe zu den verschiedenen Zeitpunkten der EKZ.....	58
Abb. 25	Volumenbedarf der Kontroll- und Natriumselenitgruppe während der Kühlung, Erwärmung und der Reperfusion im Vergleich.....	59
Abb. 26	Verlauf des Hämatokrits- und des Hämoglobingehalts während der EKZ.....	60
Abb. 27	Verlauf der Leukozytenzahl der Kontroll- und Natriumselenitgruppe an den Zeitpunkten T1, T2 und T5.....	61
Abb. 28	IL-6 Serumspiegel der Kontroll- und Natriumselenitgruppe an den Zeitpunkten T1, T2 und T5.....	63
Abb. 29	TNF α -Serumspiegel der Kontroll- und Natriumselenitgruppe an den Zeitpunkten T1, T2 und T5.....	64
Abb. 30	IL-6-Spiegel im Gewebe der nicht behandelten und behandelten Kontroll- und Natriumselenitgruppe.....	66
Abb. 31	TNF α -Spiegel im Gewebe der nicht behandelten und behandelten Kontroll- und Natriumselenitgruppe.....	68
Abb. 32	Western Blots aus Herzlysaten.....	69
Abb. 33	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Herzlysaten.....	70
Abb. 34	Western Blots aus Leberlysaten.....	71
Abb. 35	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Leberlysaten.....	72
Abb. 36	Western Blots aus Lungenlysaten.....	73
Abb. 37	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Lungenlysaten.....	74
Abb. 38	Western Blots aus Nierenlysaten.....	75
Abb. 39	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Nierenlysaten.....	76
Abb. 40	AKT-Aktivität der Kontroll- und Natriumselenitgruppe.....	77
Abb. 41	Caspase 3/7-Aktivität der nicht behandelten und behandelten Kontroll- und Natriumselenitgruppe.....	79
Abb. 42	PARP-Aktivität der nicht behandelten und behandelten Kontroll- und Natriumselenitgruppe.....	81

Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Tab. 1	Reagenzien.....	27
Tab. 2	Puffer und Lösungen.....	27
Tab. 3	Polyacryamidgelle für SDS-Page.....	28
Tab. 4	Assay-Kits.....	28
Tab. 5	Primäre Antikörper.....	28
Tab. 6	Sekundäre Antikörper.....	28
Tab. 7	Verbrauchsmaterialien.....	28
Tab. 8	Geräte.....	29
Tab. 9	Arzneimittel.....	29
Tab. 10	Temperatur- und Blutflussregulierung während der Kühlungsphase der EKZ am Beispiel einer 500g schweren Ratte.....	37
Tab. 11	Temperatur- und Blutflussregulierung während der Wiedererwärmungsphase der EKZ am Beispiel einer 500g schweren Ratte.....	39
Tab. 12	Präparation des Lysepuffers (Stocklösung).....	41
Tab. 13	Standardkurve zur BioRad Proteinkonzentrations-bestimmung.....	41
Tab. 14	GPx Assay.....	42
Tab. 15	SDS-Page Gele.....	44
Tab. 16	GPx-Aktivität der nicht behandelten Tiere.....	48
Tab. 17	Klinisch-chemische Blutparameter der nicht behandelten Tiergruppen.....	50
Tab. 18	GPx-Aktivität der operierten Tiere.....	53
Tab. 19	Selengehalt in den Gewebelysaten der operierten Tiere.....	54
Tab. 20	Klinisch-chemische Blutparameter zu definierten Zeitpunkten der EKZ.....	56
Tab. 21	Punkteverteilung Score Katecholaminbedarf.....	57
Tab. 22	Katecholaminbedarf (Score) während der EKZ.....	58
Tab. 23	Volumenbedarf während der EKZ.....	59
Tab. 24	Hämoglobingehalt und Hämatokrit zu definierten Zeitpunkten der EKZ.....	60
Tab. 25	Leukozytenverlauf zu definierten Zeitpunkten der EKZ.....	61
Tab. 26	Vitalparameter, Temperatur, Blutgasanalysen.....	62
Tab. 27	IL-6 Serumspiegel an den Zeitpunkten T1, T2 und T5.....	63
Tab. 28	TNF α -Serumspiegel an den Zeitpunkten T1, T2 und T5.....	64
Tab. 29	IL-6 Gewebespiegel.....	66
Tab. 30	TNF α -Gewebespiegel.....	68
Tab. 31	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Herzlysaten.....	70

Tab. 32	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Leberlysaten.....	72
Tab. 33	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Lungenlysaten.....	74
Tab. 34	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Nierenlysaten.....	76
Tab. 35	AKT-Aktivität während der EKZ.....	77
Tab. 36	Caspase 3/7-Aktivität während der EKZ.....	79
Tab. 37	PARP-Aktivität während der EKZ.....	81

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Dissertationsschrift beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Udo Boeken danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertationsschrift, für seine immer währende Unterstützung, seine konstruktiven Ratschläge und die Vermittlung wissenschaftlichen Denkens und Arbeitens.

Herrn Prof. Dr. Arthur Lichtenberg danke ich für die Möglichkeit, diese Dissertation an der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchführen zu können.

Herrn PD. Dr. Steinbrenner danke ich für die Einarbeitung in die Methodik der Dissertationsschrift, die Anleitung und intensive Betreuung der Experimente, sowie für seine unermüdliche Hilfe bei der Niederschrift dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. med. vet. Melanie Engels, Dr. rer. nat. Antonio Pinto, Andrea Borchardt, Diane Schmiegelt und Thomas Becher für die labortechnische Einarbeitung, die Unterstützung während der Versuchsdurchführungen und die stets angenehme und nette Zusammenarbeit im Labor.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Helmut Sies für die Bereitstellung der Laborräume und seine fachkundige Unterstützung.

Den Mitarbeitern der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung der Tierexperimente.

Meiner Familie verdanke ich mehr als ich in Worte zu fassen vermag.