

Aus der Klinik für Herzchirurgie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg

Einfluss der extrazellulären Superoxiddismutase und des  
Kalziumsensitizers Levosimendan auf die kardiovaskuläre Ischämie und  
Reperfusion bei extrakorporaler Zirkulation in einem Rattenmodell

Dissertation

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

vorgelegt von

Moritz Benjamin Immohr

2019

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

gez.:

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

Erstgutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari

Zweitgutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Timo Brandenburger

*„Grau is’ im Leben alle Theorie,  
aber entscheidend is’ auf’m Platz“*

Alfred „Adi“ Preißler  
(1921 – 2003)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Pinto, A., **Immohr, MB.**, Jahn, A., Jenke, A. Boeken, U., Lichtenberg, A. Akhyari, P., *The extracellular isoform of superoxide dismutase has a significant impact on cardiovascular ischaemia and reperfusion injury during cardiopulmonary bypass.* Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(6): p. 1035-1044.

**Immohr, MB.**, Jenke, A., Jahn, A., Döhrn, L., Kornfeld, M., Pinto, A., Lichtenberg, A., Boeken, U., Akhyari, P., *Exploring the Pleiotropic Effects of Levosimendan - Impact on Systemic Inflammatory Parameters and Molecular Salvage Pathways by Modulation of Cytokine Levels and Tissue Apoptosis Rate.* J Heart Cardiol 2017;**3**(1):1-9

# Zusammenfassung

Kardiochirurgische Operationen mit extrakorporaler Zirkulation (EKZ) verursachen Ischämie- und Reperfusionsschäden (I/R-Schäden). Superoxid gilt als Hauptursache für die Entstehung solcher I/R-Schäden und wird enzymatisch durch Superoxiddismutasen abgebaut. Die extrazelluläre Isoform der Superoxiddismutase (SOD3) ist im kardiovaskulären System vorherrschend. Epidemiologische und experimentelle Studien zeigen eine Assoziation von Mutationen der SOD3 mit einem erhöhten Risiko für ischämische Herzerkrankungen. Der Kalziumsensitizer Levosimendan wird in der Therapie der Herzinsuffizienz und des infarktbedingten kardiogenen Schocks eingesetzt. Klinische Studien konnten bisher jedoch keinen sicheren Nachweis der Wirksamkeit erbringen. Um zu untersuchen, ob die SOD3 einen protektiven Einfluss auf herzchirurgische Eingriffe hat, wurden Ratten in einem Modell mit EKZ und tiefem hypothermen Kreislaufstillstand untersucht. Ratten, die durch einen Aminosäureaustausch (SOD3-E124D; n = 9) eine geringe SOD3-Aktivität aufwiesen wurden mit SOD3-kompetenten Kontrollen (n = 8) verglichen. Durch Western Blots wurde die Aktivierung kardioprotektiver molekularbiologischer Kaskaden (p44-42 MAPK, STAT3, AKT), die Spaltung von PARP-1 sowie der Proteingehalt der verschiedenen SOD Isoformen (SOD1-3) untersucht. In zusätzlichen Versuchen wurde gesunden Ratten präventiv Levosimendan (12 µg/kg KG; n = 4; Vergleichsgruppe: Vehikellösung, n = 5) verabreicht. Anschließend wurden Western Blots durchgeführt (PARP-1, p38 MAPK, AKT, STAT3). Die Herzfrequenz bei SOD3-E124D-Tieren war zur Euthanasie im Durchschnitt 46 /min geringer sowie der mittlere Blutdruck um 8 mmHg gegenüber der Kontrolle erniedrigt (nicht signifikant). Verminderte SOD3-Aktivität führte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer signifikant erniedrigten Aktivierung protektiver Zellsignalwege und einer signifikanten Steigerung der I/R-assoziierten Apoptose. Die präventive Behandlung mit Levosimendan führte zeitweise zu einer Verbesserung der Hämodynamik. Gleichzeitig konnten therapeutische Puffer und Katecholamine eingespart werden. Die Spaltung des Apoptosemarkers PARP-1 war durch Levosimendan verringert. Verglichen mit Vehikelkontrollen wurde die p38 MAPK verstärkt aktiviert. Zusammenfassend lässt sich sowohl durch SOD3 als auch durch Levosimendan ein protektiver Einfluss auf I/R-Schäden bei EKZ feststellen. Die Entwicklung von SOD3- und Levosimendan-basierten Interventionsstrategien könnte neue Therapieoptionen für Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen ermöglichen.

## Abstract

Cardiac surgery with the need of extracorporeal circulation (ECC) causes ischemia and reperfusion injury (IRI). Superoxide, which is detoxified by superoxide dismutases, is known as a main cause of IRI. The extracellular superoxide dismutase (SOD3) is the most common isoform in the cardiovascular system. Current studies suggest that there might be an association between mutations of SOD3 and ischemic heart diseases. Levosimendan is a pharmacological calcium sensitizer and used in the therapy of heart failure and the management of acute myocardial infarction with cardiogenic shock. However clinical studies are ambiguous about its clinical benefit. In order to investigate the role of SOD3 and levosimendan in the context of ECC and IRI, rats underwent a model of ECC and deep hypothermic circulatory arrest. Rats with impaired plasma activity of SOD3 caused by an amino acid shift (SOD3-E124D; n = 9) were compared to SOD3-competent controls (n = 8). Western Blot analyses were performed in order to investigate changes in the activation of cellular rescue pathways (p44-42 MAPK, STAT3, AKT), cleavage of PARP-1 as well as the expression of the different superoxide dismutase isoforms (SOD1-3). In additional experiments, healthy rats were treated with levosimendan or vehicle solution before the ECC (12 µg/kg KG levosimendan; n = 4; control: vehicle solution, n = 5). Subsequently, western blot analyses were performed (PARP-1, p38 MAPK, AKT, STAT3). At euthanasia, mean heart rate and mean arterial pressure of SOD3-E124D rats was decreased by 46 bpm and 8 mmHg respectively (not significant). Impaired SOD3 activity significantly decreased the activation of protective cell signalling cascades *in vivo* as well as *in vitro* and increased IRI-derived tissue apoptosis. Preventive application of levosimendan improved hemodynamic parameters during rewarming of the animals and reduced the needed amounts of pharmacological buffer solutions and catecholamines. Cleavage of PARP-1 was also decreased by levosimendan. The activation of p38 MAPK was increased in levosimendan treated rats compared to vehicle controls. Summarizing, both SOD3 as well as levosimendan seem to have positive impact on IRI caused by ECC in cardiac surgery. Further investigation and invention of new therapy strategies focusing on SOD3 and levosimendan may allow to improve our current therapies for patients with cardiovascular diseases and major cardiac surgery.

# Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arteria	<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>ADH</b>	Antidiuretisches Hormon	<b>eNOS</b>	endotheliale NO-Synthase
<b>AKT</b>	Proteinkinase B	<b>ENU</b>	N-Ethyl-N-Nitroseharnstoff
<b>APS</b>	Ammoniumperoxidisulfat	<b>Gauge</b>	1 Gauge = 7,35 mm
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>H<sup>+</sup></b>	atomarer Wasserstoff
<b>BGA</b>	Blutgasanalyse	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>COPD</b>	chronisch obstruktive Lungenerkrankung	<b>HBSS</b>	Hanks' Balanced Salt Solution
<b>Cu</b>	atomares Kupfer	<b>HEPES</b>	2-Ethansulfonsäure
<b>Da</b>	Dalton (1 Da = 1,661 * 10 <sup>-27</sup> kg)	<b>HES</b>	Hydroxyethylstärke
<b>DALY</b>	disability-adjusted life years	<b>HLM</b>	Herz-Lungen-Maschine
<b>dest.</b>	destilliert	<b>i.E.</b>	internationale Einheiten
<b>DHCA</b>	tiefer hypothermer Kreislaufstillstand	<b>i.m.</b>	intramuskulär
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>i.v.</b>	intravenös
<b>E124D</b>	Aminosäureaustausch Glutamat gegen Aspartat an Stelle 124	<b>I/R</b>	Ischämie/Reperfusion
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>ICD-10</b>	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD), Stand 2013
<b>EKZ</b>	extrakorporale Zirkulation		

<b>IGEPA</b>	Octylphenoxy	<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>LCA</b>	poly(ethyleneoxy)ethanol	<b>R213G</b>	Aminosäureaustausch Arginin gegen Glycin an Stelle 213
<b>IL-6</b>	Interleukin-6	<b>RAAS</b>	Renin-Angiotensin- Aldosteron-System
<b>inf.</b>	inferior	<b>RIPA</b>	Radioimmunoprecipitation assay buffer
<b>ITS</b>	Insulin/Transferrin/Selenium	<b>RNS</b>	reaktive Stickstoffspezies
<b>KG</b>	Körpergewicht	<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein	<b>SDS</b>	Natriumlaurylsulfat
<b>M-PER</b>	Mammalian Protein Extraction Reagent	<b>Sham</b>	Placebooperation
<b>MAD</b>	mittlerer arterieller Blutdruck	<b>SIRS</b>	systemisches Inflammationssyndrom
<b>MAPK</b>	Mitogen-activated Protein Kinase	<b>SOD</b>	Superoxiddismutase
<b>mmHg</b>	Millimeter Quecksilbersäule (1 mmHg = 133,322 Pa)	<b>SOD1</b>	Superoxiddismutase 1
<b>MODS</b>	Multiorganversagen	<b>SOD2</b>	Superoxiddismutase 2
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid	<b>SOD3</b>	Superoxiddismutase 3
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff	<b>STAT3</b>	Signal Transducers and Activators of Transcription 3
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superoxid	<b>TBST</b>	Tris-buffered Saline und Tween 20
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxynitrit	<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>PARP</b>	Poly (ADP-ribose) Polymerase		
<b>PTCA</b>	perkutane transluminale koronare Angioplastie		

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor alpha
<b>USP</b>	United States Pharmacopeia
<b>V.</b>	Vena
<b>VSMC</b>	vaskuläre Glattmuskelzellen
<b>Zn</b>	atomares Zink

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die extrazelluläre Superoxiddismutase .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen .....	1
1.1.2	Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen .....	1
1.1.3	Herzchirurgie .....	2
1.1.4	Die Herz-Lungen-Maschine.....	3
1.1.5	Klinische Relevanz genetischer Disposition: SOD3.....	4
1.1.6	Ischämie- und Reperfusionsschäden .....	5
1.1.7	Superoxid .....	6
1.1.8	Die extrazelluläre Superoxiddismutase.....	8
1.1.9	SOD3-E124D-Mutation .....	9
1.1.10	Ziele der Arbeit .....	11
<b>1.2</b>	<b>Der Kalziumsensitizer Levosimendan .....</b>	<b>12</b>
1.2.1	Anmerkung .....	12
1.2.2	Levosimendan .....	13
1.2.3	Ziele der Arbeit .....	14
<b>2</b>	<b>Methodik.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Die extrazelluläre Superoxiddismutase .....</b>	<b>15</b>
2.1.1	Materialien .....	15
2.1.1.1	Versuchstiere .....	15
2.1.1.2	Ausschlusskriterien.....	16
2.1.1.3	Tierversuche .....	16
2.1.1.4	<i>in vivo</i> -Versuche .....	18
2.1.1.5	<i>in vitro</i> -Versuche .....	20
2.1.1.6	Antikörper.....	21
2.1.1.7	Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.1.8	Software.....	23

2.1.1.9	Geräte.....	24
2.1.2	Methoden .....	25
2.1.2.1	<i>in-vivo</i> Ratten-EKZ mit DHCA .....	25
2.1.2.2	SOD3-Plasmaaktivität .....	27
2.1.2.3	Messung der Plasmahämolyse .....	30
2.1.2.4	Western Blot-Analyse der Organproben .....	30
2.1.2.5	Angiotensin II-ELISA.....	35
2.1.2.6	Isolation adulter Kardiomyozyten.....	35
2.1.2.7	Assays adulter Kardiomyozyten .....	38
2.1.2.8	Western Blot adulter Kardiomyozyten .....	40
2.1.2.9	Statistische Auswertung.....	40
<b>2.2</b>	<b>Der Kalziumsensitizer Levosimendan .....</b>	<b>41</b>
2.2.1	Materialien .....	41
2.2.1.1	Versuchstiere .....	41
2.2.1.2	Ausschlusskriterien.....	41
2.2.1.3	Ergänzungen .....	41
2.2.2	Methoden .....	42
2.2.2.1	<i>in-vivo</i> Ratten-EKZ mit DHCA .....	42
2.2.2.2	Western Blot .....	43
2.2.2.3	Statistische Auswertung.....	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Die extrazelluläre Superoxiddismutase .....</b>	<b>44</b>
3.1.1	Vitalparameter.....	44
3.1.2	Intraoperative Blutgasanalyse .....	49
3.1.3	Medikamentenapplikation.....	56
3.1.4	SOD3-Aktivität .....	57
3.1.5	Plasmahämolyse.....	59
3.1.6	Proteinanalyse von Organproben mittels Western Blot .....	60
3.1.7	Angiotensin-II ELISA.....	72

3.1.8	Assays adulter Kardiomyozyten .....	73
3.1.9	Proteinanalyse adulter Kardiomyozyten mittels Western Blot .....	75
<b>3.2</b>	<b>Der Kalziumsensitizer Levosimendan .....</b>	<b>80</b>
3.2.1	Vitalparameter.....	81
3.2.2	Intraoperative Blutgasanalyse .....	83
3.2.3	Medikamentenapplikation.....	89
3.2.4	Proteinarbeiten .....	91
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>94</b>
4.1	Die extrazelluläre Superoxiddismutase .....	94
4.2	Der Kalziumsensitizer Levosimendan .....	105
4.3	Schlussfolgerungen.....	109
<b>5</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>123</b>
<b>6.1</b>	<b>EKZ Protokoll.....</b>	<b>123</b>
6.1.1	Vitalparameter, BGA und Blutbild .....	123
6.1.2	Medikamentengabe .....	123
6.1.3	Protokollzeiten .....	124
6.1.4	Notizen.....	124

# **1 Einleitung**

## **1.1 Die extrazelluläre Superoxiddismutase**

### **1.1.1 Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen**

Das kardiovaskuläre System ist aufgrund seiner permanenten Beanspruchung gefährdet zu erkranken. Ätiologisch lassen sich bestimmte Risikofaktoren feststellen, deren Vorliegen die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen begünstigen. Die wichtigsten Risikofaktoren sind Diabetes, Rauchen, arterielle Hypertonie, Adipositas, ungesunde Ernährung, erhöhte Blutfette, Alkoholkonsum und Bewegungsmangel [1]. Darüber hinaus spielen auch psychosoziale Aspekte eine Rolle in der Genese und im Verlauf von Herz-Kreislauf-Erkrankungen [1]. Es konnte gezeigt werden, dass diese Risikofaktoren, wenn auch in regional unterschiedlicher Ausprägung, in allen Bevölkerungsgruppen sowie auf allen Kontinenten vorkommen und somit für das ubiquitäre Auftreten von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ursächlich gemacht werden können [1]. Interventionen zur Senkung der Risikofaktoren können die Entstehung und den Verlauf von Erkrankungen beeinflussen und stellen damit ein wichtiges präventives Behandlungskonzept dar [2]. Bei familiärer Häufung und frühzeitigem Krankheitsbeginn können Screening-Untersuchungen von Angehörigen helfen, das Erkrankungsrisiko zu senken [2].

### **1.1.2 Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen**

Aufgrund der weiten Verbreitung der Risikofaktoren in der Bevölkerung sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen weltweit verbreitet und stellen ein großes Gesundheitsproblem dar. Im Jahr 2012 starben insgesamt weltweit schätzungsweise 56 Millionen Menschen, 38 Millionen (68 %) davon an nichtübertragbaren Krankheiten [3]. Kardiovaskuläre Erkrankungen waren weltweit für 17,5 Millionen Todesfälle (31 % aller Todesfälle) verantwortlich und damit die häufigste Todesursache [3]. Bis 2030 wird ein Anstieg der Todesfälle durch nichtübertragbare Krankheiten auf jährlich weltweit 52 Millionen Fälle prognostiziert, sodass auch die Anzahl der Herz-Kreislauf-Erkrankungen und der

dadurch verursachten Todesfälle weiter steigen dürften [3]. In Deutschland waren 2015 unter den zehn häufigsten Todesursachen insgesamt fünf Erkrankungen, die dem kardiovaskulären System zuzuordnen sind [4]. Die drei häufigsten Todesursachen nach ICD-10, nämlich chronische ischämische Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt und Herzinsuffizienz, waren 2013 für insgesamt 172.637 Todesfälle in Deutschland verantwortlich [4]. Dies entsprach 18,6 % aller Todesfälle und 1602 Todesfälle mehr als noch zwei Jahre zuvor [4, 5]. Ein weiterer wichtiger Aspekt ergibt sich aus der Krankheitslast kardiovaskulärer Erkrankungen. 2010 betrug die krankheitsbereinigten Lebensjahre (*disability-adjusted life years, DALY*) von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen in Deutschland fast 4,6 Millionen Jahre und stellten damit die größte Krankheitslast aller Erkrankungen dar [6]. Bezogen auf die durchschnittliche Lebenserwartung der Bevölkerung teilen sich diese auf in vier Millionen durch frühzeitigen Tod verlorene Lebensjahre und fast 600.000 mit körperlicher Beeinträchtigung verbrachte Lebensjahre [7]. Eine adäquate Prophylaxe, Therapie und Rehabilitation von Herzerkrankungen stellt daher eine wichtige medizinische Herausforderung an die Gesellschaft dar.

### **1.1.3 Herzchirurgie**

Die Zahl der Herzoperationen in Deutschland ist von 45.824 im Jahr 1990 auf 184.789 im Jahr 2016 gestiegen [4]. In 2013 wurden in deutschen herzchirurgischen Abteilungen 96.327 Operationen ohne sowie 84.040 Operationen mit Zuhilfenahme einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) durchgeführt [5, 8]. Dies entspricht durchschnittlich 1.064 HLM-gestützte Operationen pro Zentrum [5, 8]. Zwischen 1990 und 2016 hat sich die Anzahl der Herzoperationen mit HLM pro eine Millionen Einwohner mehr als vervierfacht [4]. Im Jahr 2014 wurden in 78 herzchirurgischen Zentren in Deutschland 83.787 Operationen mit HLM durchgeführt, dies entspricht 1.074 Operationen pro Zentrum [8]. An diesen Daten lässt sich ablesen, dass täglich bei mehr als 200 kardiovaskulären Operationen in Deutschland die Verwendung von extrakorporaler Zirkulation notwendig ist. Nach wie vor erfolgt ein erheblicher Teil der kardiochirurgischen Eingriffe unter den Bedingungen kardioplegischen Herzstillstandes. Hierbei wird der Stoffwechsel des Myokards entscheidend reduziert um den

schädlichen Einfluss von Ischämie und anschließender schlagartiger Reperfusion (I/R) zum minimieren. Auch nach Eingriffen unter kardioplegischem Herzstillstand kann jedoch ein gewisser Level an I/R-Schäden im Herzmuskel beobachtet werden. Darüber hinaus kann auch an anderen Organen, beispielsweise in den Nieren, gelegentlich im Anschluss an einen Eingriff mit extrakorporaler Zirkulation eine Funktionseinschränkung beobachtet werden, für die I/R-Schäden ursächlich im Zusammenhang stehen könnten. Somit sind I/R-Schäden nach wie vor im klinischen Alltag präsent und prognostisch ein relevanter Faktor in der Versorgung kardiovaskulärer Erkrankungen.

### **1.1.4 Die Herz-Lungen-Maschine**

Komplizierte herzchirurgische Interventionen erfordern häufig eine vorübergehende Unterbrechung der Herztätigkeit. So verursacht die permanente Pumptätigkeit des Herzens dauerhafte Bewegung und könnte das operative Risiko bei Koronareingriffen steigern, bei konventionellen Klappeneingriffen ist die Eröffnung von Herzkammern notwendig, was wiederum nur bei Blutleere möglich ist. Aufgrund der benötigten Operationsdauer lassen sich diese Eingriffe nur durch eine extrakorporale Übernahme der Herztätigkeit durchführen. Hierfür werden HLMs verwendet. Prinzipiell besteht jede HLM aus einem venösen Zufluss, der das venöse Blut des Körpers im Bereich des rechten Vorhofes oder bei minimalinvasiven Ansätzen beispielsweise in der Leiste aufnimmt. Anschließend wird das Blut an einem Membranoxygenator, welcher die Lungenfunktion übernimmt, mit Sauerstoff angereichert und Kohlenstoffdioxid entfernt. Über einen arteriellen Katheter wird das Blut in ein großes arterielles Gefäß, beispielsweise die Aorta ascendens oder die A. femoralis, zurückgeführt. Rollerpumpen übernehmen hierbei die Pumpfunktion der Ventrikel. Zudem ist es möglich, über zusätzliche Reservoirs Einfluss auf das zirkulierende Blutvolumen sowie den Blutdruck zu nehmen. Die HLM ersetzt somit den kompletten Lungenkreislauf und sorgt für einen kontinuierlichen Fluss im Körperkreislauf. Auf diese Weise kann das Herz für die operative Versorgung mittels einer kardioplegischen Lösung isoliert perfundiert und damit stillgelegt werden. Um eine Thrombusbildung zu verhindern, muss zeitgleich eine effiziente Antikoagulation gewährleistet werden.

Durch systemische perioperative Kühlung lässt sich der Metabolismus des Gehirns und damit auch die Komplikationsrate von herzchirurgischen Operationen deutlich senken [9]. Bei einer Kühlung der Körpertemperatur auf 15 °C, wie es beim tiefen hypothermen Kreislaufstillstand vorkommt, beträgt der zerebrale Metabolismus nur noch 16 % des normothermen Wertes und toleriert einen Kreislaufstillstand für 31 Minuten [10]. DHCA ist daher eine sichere und weitverbreitete Technik in der kardiovaskulären Aorten Chirurgie zur Verhinderung von ischämischen Hirnschädigungen [11]. Auch in der Kinderchirurgie ist die systemische Hypothermie ein Standardverfahren zur Senkung des systemischen Sauerstoffverbrauchs und damit zum verbesserten Organschutz [12].

Neben den klassischen HLM-Systemen, welche für die operative Versorgung verwendet werden, existieren darüberhinaus weitere extrakorporale Systeme, die vorübergehend die Herztätigkeit unterstützen oder gar ersetzen können. Systeme mit extrakorporaler Membranoxygenierung (ECMO) werden sowohl in der Therapie der Herzinsuffizienz als auch im therapierefraktären kardiogenen Schock, beim akuten Lungenversagen sowie der in der Therapie von schwerer Unterkühlung eingesetzt [13-15].

### **1.1.5 Klinische Relevanz genetischer Disposition: SOD3**

Der menschliche Körper ist ständig endogenen und exogenen Einflüssen ausgesetzt. Einige dieser Einflüsse können den Körper schädigen und ihn anfälliger für Erkrankungen machen. Einer dieser schädigenden Faktoren ist oxidativer Stress. Zum Schutz vor oxidativem Stress existieren im Körper verschiedene protektive Mechanismen. Hierzu gehört der enzymatische Abbau von Sauerstoffradikalen. Zu den an diesem Abbau beteiligten Enzymen gehört das Protein SOD3 [16]. Zwei bis drei Prozent der Bevölkerung sind Träger einer Mutation im SOD3-kodierenden Gen [16-18]. Bei dieser Mutation ist an einer einzelnen Stelle des Enzyms eine Aminosäure durch eine andere ausgetauscht (R213G) [16]. Träger dieser Mutation haben einen zehnfach erhöhten Plasmalevel der SOD3 [17]. Es konnte eine Vergesellschaftung dieser Mutation mit einem 1,5-fach erhöhten Risiko für ischämische Herzkrankheiten nachgewiesen werden [18]. So steigt sowohl das Erkrankungsrisiko für die koronare

Herzkrankheit als auch für Herzinfarkte [19]. Darüber hinaus steigt das Risiko für Lungenerkrankungen wie COPD [20]. Zudem konnten bei heterozygoten Trägern dieser Mutation nicht die sonst üblichen protektiven Enzymeffekte auf den Blutdruck und die Gefäßfunktionen nachgewiesen werden [21].

### **1.1.6 Ischämie- und Reperfusionsschäden**

Myokardiale Ischämie, wie sie im Rahmen von ischämischen Herzerkrankungen wie dem Myokardinfarkt auftritt, lässt sich auch bei Operationen mit HLM und Kardioplegie beobachten. Neben den rein ischämisch bedingten Gewebeschädigungen kommt es jedoch zusätzlich zu weiteren schädlichen Prozessen. Der Kontakt des Blutes mit künstlichen Oberflächen, verursacht durch extrakorporale Zirkulation, führt zu einer Aktivierung von pro-inflammatorischen und pro-apoptotischen Signalkaskaden [22]. Bereits 1960 wurden erstmals Herzschädigungen durch die schlagartige Reperfusion des Gewebes im Anschluss an ein ischämisches Ereignis beschrieben [23]. Als eine der wichtigsten Ursachen dieser Reperfusionsschäden konnte Superoxid, ein freies Sauerstoffradikal, nachgewiesen werden [24]. In diesem Zusammenhang wurden einwandernde Makrophagen als ROS-Produzenten identifiziert [25]. Diese Sauerstoffradikale entstehen durch die Xanthinoxidase und verursachen gemeinsam mit mitochondrialen Prozessen, intrazellulärer Kalziumüberladung, pH-Wertverschiebungen sowie Inflammation die Reperfusionsschäden [24-26]. Diese oxidativen Schäden erweitern somit die vorangegangene ischämische Schädigung [27]. Zudem wird eine Leukozytose induziert, welche gemeinsam mit einem Anstieg von IL-6 und TNF- $\alpha$  auf inflammatorische Prozesse durch Reperfusionsschäden hinweist [28]. Durch extrakorporale Zirkulation kann sich daher im Verlauf ein systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) entwickeln [29]. SIRS kann wiederum zu Multiorganversagen (MODS) führen [30]. In diesem Kontext kann extrakorporale Zirkulation eine Aktivierung des Gerinnungssystems, des fibrinolytischen Systems, des Komplementsystems sowie eine Ausschüttung von Zytokinen und Blutbildveränderungen verursachen [31-33].

## 1.1.7 Superoxid

ROS bilden eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese von einer Vielzahl an kardiovaskulären Erkrankungen. So gilt Superoxid, ein einfach negativ geladenes Sauerstoffradikal ( $O_2^-$ ), als ein entscheidender Auslöser von I/R-Schädigung [24]. Während der physiologischen Zellatmung und Metabolisierung von Stoffwechselprodukten, produzieren verschiedenste Oxidasen im Körper Superoxid, welches anschließend spontan oder enzymatisch abgebaut wird [34]. Enzyme aus der Klasse der Superoxiddismutasen verstoffwechseln Superoxid zu Wasserstoffperoxid, welches anschließend weiter zu Wasser reagiert (Abb.1) [35].

Abbildung 1: Superoxidstoffwechsel

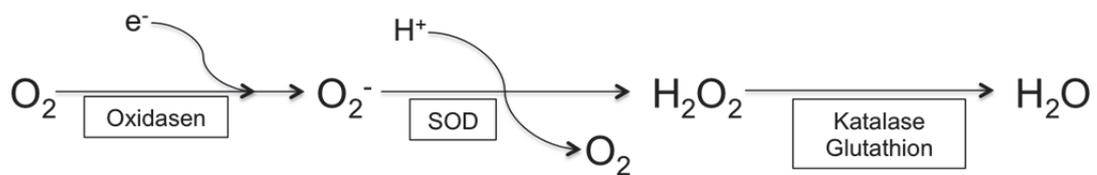


Abb. 1 Sauerstoff ( $O_2$ ) wird zu Superoxid ( $O_2^-$ ) reduziert. Superoxiddismutasen (SOD) entgiften dieses zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches anschließend zu Wasser ( $H_2O$ ) abgebaut wird.

Reichert sich Superoxid im Gewebe an, reagiert es sehr schnell mit Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit, einer reaktiven Stickstoffspezies (Abb. 2) [36].

Abbildung 2: Stickstoffmonoxidstoffwechsel

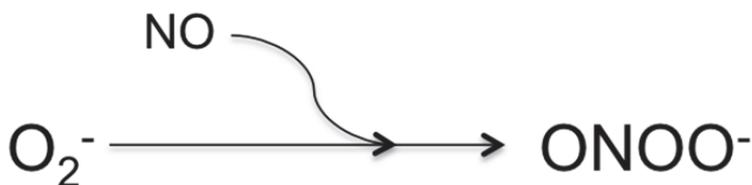
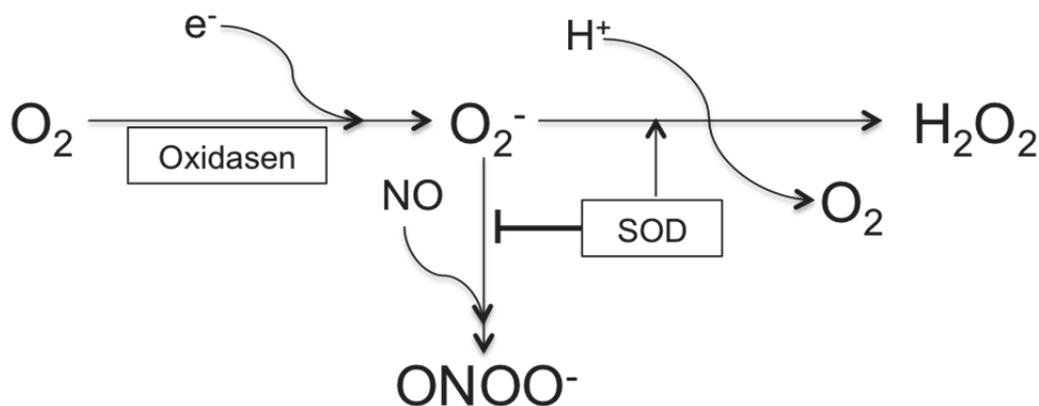


Abb. 2 Superoxid ( $O_2^-$ ) reagiert mit Stickstoffmonoxid ( $NO$ ) zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ).

NO gilt als vasoprotektive Verbindung und wirkt vasodilatatorisch in vaskulären Glattmuskelzellen [37]. Peroxynitrit hingegen verstärkt die, durch Sauerstoffradikale vermittelte, Gewebeschädigung zusätzlich [37]. Sowohl die schädigende Wirkung des Superoxids selbst als auch die Senkung der NO-Bioverfügbarkeit und der Anstieg der Konzentration an Peroxynitrit im Gewebe stehen demnach in direkter Beziehung zu den SOD (Abb. 3). Stickstoffmonoxid reagiert mit Superoxid sechsfach schneller als mit den einzelnen Isoformen der SOD [38]. Eine ausreichende Enzymaktivität der SOD ist daher wichtig, um die NO-Bioverfügbarkeit im Gewebe zu erhalten und die übermäßige Bildung von Peroxynitrit zu verhindern.

**Abbildung 3: Chemische Beziehungen der Superoxiddismutase**



**Abb. 3** Die Superoxiddismutasen (SOD) bauen Superoxid ( $O_2^-$ ) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) ab. Dadurch sinkt die Konzentration von schädlichem Superoxid im Gewebe. Die Superoxiddismutasen hemmen demnach indirekt die Reaktion von Superoxid und Stickstoffmonoxid ( $NO$ ) zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ), da es der Reaktion eines ihrer Edukte entzieht und schützen damit die Diffusion von  $NO$  in Gefäßwänden.

Die Enzymklasse der humanen SOD umfasst drei Isoformen, welche allesamt im kardiovaskulären System vorkommen [35, 39, 40]. Hierbei lassen sich zwei intrazelluläre und eine extrazelluläre Isoform identifizieren, die zwar durch unterschiedliche Gene kodiert werden, jedoch dieselbe Reaktion katalysieren [37]. Die SOD1 ist die häufigste intrazelluläre Isoform und wird in fast jedem Gewebe in hohen Konzentrationen exprimiert [37]. Primär ist die SOD1 im Zytosol lokalisiert, in geringerem Umfang kommt sie allerdings auch im mitochondrialen Intermembranraum, dem Nukleus sowie in Lysosomen und Peroxysomen vor [41-43]. Das Enzym besitzt

ein Molekulargewicht von 32 kDa und ist ein Homodimer [41]. Im katalytischen Zentrum der SOD1 befinden sich Kupfer- und Zinkionen als Kofaktoren [44]. Auch die SOD2 ist eine intrazelluläre Isoform der SOD [45]. Die SOD2 ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und übernimmt eine wichtige Schutzfunktion gegenüber dem Superoxid der mitochondrialen Atmungskette [37]. Strukturell lässt sich die SOD2 als Homotetramer mit einem Molekulargewicht von 96 kDa charakterisieren [45]. Als katalytischer Kofaktor fungiert Mangan [46].

### **1.1.8 Die extrazelluläre Superoxiddismutase**

Die SOD3 ist die einzige extrazelluläre Isoform der SOD [47, 48]. Sie kommt in Körperflüssigkeiten wie Plasma, Lymphe, Synovialis und Liquor vor [49]. Die höchste Konzentration findet sich in Blutgefäßen, Lungen, Nieren und dem Uterus [49]. Im kardiovaskulären System ist sie die prädominante Isoform und macht in einigen Gefäßen bis zu 70 % der Gesamtaktivität aller SOD Isoformen aus [50]. Die SOD3 ist ein 135 kDa schweres sekretorisches Glykoprotein in Form eines Homotetramers [47, 48]. Dieser besteht aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Dimeren [51]. Im katalytischen Zentrum befinden sich Kupfer- und Zinkionen [47, 48]. SOD3 besitzt eine hohe Affinität zu Heparin und ähnlichen sulfatierten Glykosaminoglykanen [49]. Ursächlich hierfür ist eine positiv geladene Heparin-Bindungsdomäne am carboxyterminalen Ende des Enzyms [49]. Durch diese Domäne kann die SOD3 an Zelloberflächen, Basalmembranen und der extrazellulären Matrix binden [37]. Dementsprechend befindet sich der Großteil der SOD3 in der extrazellulären Matrix und an Zelloberflächen [37]. Chromatographisch lässt sich die humane SOD3 in drei Fraktionen trennen: eine ohne Affinität zu Heparin (Fraktion A), eine mit leichter Affinität (Fraktion B) und eine Fraktion mit starker Affinität gegenüber Heparin (Fraktion C) [37]. Die SOD3 der Ratte besitzt die selbe Heparin-Bindungsdomäne wie Menschen, es fehlt jedoch die Fraktion C, weshalb das Enzym nur als Dimer und nicht als Tetramer vorkommt [49].

SOD3 wird in großen Mengen von vaskulären Glattmuskelzellen (VSMC) exprimiert [52]. Da Endothelzellen scheinbar keine SOD3-Produktion zeigen, stellt dies auch die Hauptquelle in der Gefäßwand dar [52]. Die SOD3-Expression durch VSMC kann

durch Mediatoren wie Histamin, Endothelin-1, Angiotensin-II, Antidiuretisches Hormon und Oxytocin beeinflusst werden [53]. SOD3 hilft, arterieller Hypertonie entgegenzuwirken und wird daher bei hohen Angiotensin-II-Konzentrationen ausgeschüttet [54]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass zentrale SOD3-Rezeptoren in Beziehung zu Angiotensin-II und arterieller Hypertonie stehen könnten [55]. Eine Überexpression der SOD3 konnte zudem in Endothelzellen gegen die Oxidierung von LDL schützen und somit Arteriosklerose entgegenwirken [56]. In transgenen Mäusen konnte eine Überexpression der SOD3 die Infarktgröße nach koronarer Okklusion verringern und die Regenerationsfähigkeit des Herzmuskels verbessern [57]. Die Aktivierung von pro-proliferativen und anti-apoptischen Signalwegen wie p44-42 MAPK und AKT konnten in diesem Zusammenhang mit der SOD3 in Verbindung gebracht werden [58]. Im Mausmodell konnte auch eine protektive Wirkung der SOD3 bei I/R-Schädigung gezeigt werden [59].

Es konnte somit gezeigt werden, dass die SOD3 potenziell einen positiven Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen nehmen kann.

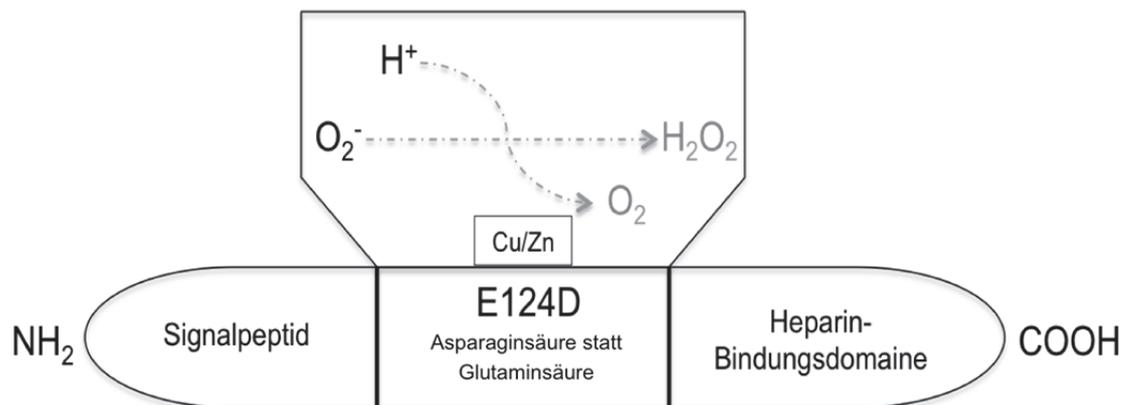
### **1.1.9 SOD3-E124D-Mutation**

Valide systemische Effekte der SOD3 in Bezug auf I/R-Schädigungen lassen sich in der Grundlagenforschung nur durch spezialisierte Tiermodelle erforschen. Hierbei sind mutierte Spezies nötig, bei denen die SOD3 in ihrer Aktivität verändert vorliegt. In diesem Zusammenhang werden in der Forschung häufig *knock-out*-Modelle eingesetzt. In solchen Tierstämmen wird das entsprechende Enzym aufgrund einer genetischen Mutation nicht exprimiert, sodass es nicht im Organismus vorkommt. Alternativ sind auch Modelle mit einer Überexpression des Enzyms verbreitet. In beiden Fällen lassen sich jedoch zusätzliche Kompensationsmechanismen durch die veränderte Enzymexpression nicht ausschließen. Zudem werden potenzielle allosterische Enzymeffekte beeinflusst und treten somit als Störgröße in der Studie auf.

Im Gegensatz dazu existiert ein neuartiger Rattenstamm (PhysGen Program, Medical College of Wisconsin), bei dem durch chemische Mutagenese, ausgelöst durch N-Ethyl-N-Nitroseharnstoff, eine Punktmutation im SOD3-kodierenden Genom vorliegt. Diese Punktmutation ist auf den Austausch einer einzelnen Aminosäure im reaktiven Zentrum

der SOD3 beschränkt. Hierbei ist an Stelle 124 eine Glutaminsäure durch eine Asparaginsäure ausgetauscht (daher der Name der Mutation: SOD3-E124D). So wird das Enzym weiterhin regulär exprimiert, ist jedoch in seiner Aktivität eingeschränkt (Abb. 4). Die beschriebene Mutation wurde auf dem genetischen Hintergrund des Dahl/SS-Stammes gezüchtet, welcher auch als SOD3-kompetente Kontrollgruppe dient.

**Abbildung 4: SOD3-E124D Mutation**



**Abb. 4** Durch eine Punktmutation kommt es zu einem Austausch einer Glutaminsäure durch eine Asparaginsäure im katalytischen Zentrum der SOD3. Dadurch wird die Aktivität des Enzyms vermindert.

Das SOD3-E124D-Modell ähnelt aufgrund seiner Punktmutation zudem einer natürlich vorkommenden Mutation der SOD3, die auch durch den Austausch einer einzigen Aminosäure in der Aminosäurefrequenz des Enzyms gekennzeichnet ist [16]. In Ratten mit verminderter SOD3-Aktivität durch eine SOD3-E124D-Mutation konnte eine verminderte Schutzwirkung gegenüber der Entwicklung von pulmonaler Hypertonie nachgewiesen werden [60].

Die SOD3-E124D-Mutation ermöglicht es somit, den Einfluss der SOD3 auf die I/R-Schädigung in einem klinischen Modell zu untersuchen.

## 1.1.10 Ziele der Arbeit

Kardiovaskuläre Erkrankungen sowie deren Versorgung, sei sie operativ oder auch interventionell, sind mit I/R-Phänomenen und entsprechenden I/R-Schäden assoziiert und verschlechtern somit die postoperative Genesung [23]. I/R-Schäden begünstigen die Entstehung eines SIRS und können ursächlich für letales Multiorganversagen sein [29, 30]. Die SOD3 baut schädliche reaktive Sauerstoffspezies ab und übernimmt verschiedene Schutzfunktionen im Organismus [49]. Die SOD3-E124D-Mutation stellt in diesem Kontext ein kliniknahes Tiermodell dar, mit dem der Einfluss der SOD3 näher untersucht werden kann. Die Mutation führt zu einer Aktivitätsminderung des Enzyms und ähnelt damit einem natürlichen Polymorphismus, welcher für bis zu drei Prozent der Bevölkerung beschrieben wird [16-18].

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob die SOD3 eine protektive Wirkung gegenüber I/R-Schädigungen besitzt, die im spezifischen Kontext der extrakorporalen Zirkulation auftreten. Hierfür werden SOD3-E124D-Ratten in einem aufwendigen Modell der extrakorporalen Zirkulation und DHCA ausgesetzt, um I/R-Schäden zu induzieren. Anschließend werden die Ergebnisse mit denen von SOD3-kompetenten Kontrollen verglichen, bei denen die SOD3-Aktivität unverändert ist. Durch intraoperative Überwachung der Vitalparameter sowie der Blutwerte soll die Frage geklärt werden, ob verminderte SOD3-Aktivität das *Outcome* hinsichtlich klinisch relevanter Parameter nach extrakorporaler Zirkulation verschlechtert. Insbesondere soll geklärt werden, ob eine verminderte Aktivität der SOD3 zu einer verminderten Aktivierung von kardioprotektiven Signalwegen im Herzen und der Aorta führt. Der Fokus soll dabei auf den Signalkaskaden der p44-42 MAP Kinase, dem STAT3-Signalweg sowie der AKT liegen. Darüber hinaus werden die Spaltung von PARP-1, der eNOS-Proteingehalt und der Proteingehalt der verschiedenen Isoformen der Superoxiddismutase untersucht. Es soll dadurch auch Aufschluss auf mögliche endogene Kompensationsmechanismen bei verminderter SOD3-Aktivität gegeben werden. Durch die zusätzliche Messung von 3-Nitrotyrosine soll die induzierte Schädigung durch RNS sowie das Zusammenspiel von SOD3, der eNOS, Superoxid und RNS näher erforscht werden. Außerdem wird die Plasmakonzentration von Angiotensin-II, welches mit der SOD3 in Beziehung gebracht wird, untersucht werden [54, 55].

In einem zweiten Schritt soll anhand von Zellkultumodellen der spezifische Einfluss von SOD3 auf Kardiomyozyten untersucht werden. In diesem Rahmen werden adulte Kardiomyozyten aus Rattenherzen isoliert, kultiviert und anschließend in Hinblick auf die Aktivierung von Signalwegen hin untersucht. Zudem soll die intrazelluläre Konzentration an ROS und Stickstoffmonoxid in den Kardiomyozyten erforscht werden.

So soll die Hypothese, dass die SOD3 einen potenziellen therapeutischen Interaktionspunkt in der Prävention von kardiovaskulären Operationskomplikationen durch extrakorporale Zirkulation darstellen kann, geklärt werden. Der Einfluss der SOD3 auf I/R-Schäden wurde bisher in keinem Modell mit extrakorporaler Zirkulation untersucht. Insbesondere wurde die SOD3-E124D-Mutation als besonders kliniknahes Kleintiermodell in diesem Kontext zuvor nicht in der Literatur beschrieben.

## **1.2 Der Kalziumsensitizer Levosimendan**

### **1.2.1 Anmerkung**

Nach Abschluss der Arbeiten des beschriebenen Projektes zum Einfluss der extrazellulären Superoxiddismutase, ergab sich die Möglichkeit, an weiteren Projekten der betreuenden Arbeitsgruppe mitzuarbeiten. Aus einem dieser Projekte wurde ein wesentlicher Teil experimenteller Arbeiten gänzlich dem Autor zur Durchführung, Auswertung und Interpretation überlassen, woraus der folgende Teil der Dissertationsarbeit hervorgegangen ist. Hierbei handelt es sich daher um eine Erweiterung der Dissertation über die zuvor beschriebene Thematik hinaus, der Hauptfokus der Promotionsarbeit Arbeit liegt jedoch auf den vielfältigen Effekten der SOD3. Da Teile des nun folgenden Projekts in Kooperation entstanden sind, sind nur die Experimente und Ergebnisse aufgeführt, die eigenständig vom Autor durchgeführt wurden. Die vollständigen Ergebnisse des Projekts finden sich in der entsprechenden Publikation Immohr *et al.* [61]. Auf unnötige Dopplungen in der Einleitung sowie in der Beschreibung von Materialien und Methodik wurde verzichtet. An den entsprechenden Stellen werden daher nur die Unterschiede zum SOD3-Projekt herausgestellt.

## 1.2.2 Levosimendan

Kardiovaskuläre Erkrankungen, aber auch ihre herzchirurgische Behandlung, induzieren I/R-Schädigung und Inflammation und besitzen daher ein Risiko für die Entwicklung eines SIRS und dem damit vergesellschafteten MODS [30, 62]. Trotz modernster Therapien entwickeln bis zu 7 % aller Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt im Verlauf einen kardiogenen Schock [63]. Die Gesamtmortalität dieser Patienten beträgt bis zu 65 % [63]. Dementsprechend ist die stetige evidenzbasierte Verbesserung der Therapie dieser Patienten von erheblicher Bedeutung.

Neben interventionellen Therapiebausteinen werden üblicherweise auch Katecholamine zur Verbesserung der kardiovaskulären Leistung im kardiogenen Schock eingesetzt [64]. Der Einsatz von Katecholaminen erhöht jedoch den Sauerstoffbedarf des Herzmuskels zusätzlich und kann somit die Hypoxie im myokardialen Gewebe weiter verstärken [65]. Darüber hinaus konnten Sancho-Bru *et al.* [66] zeigen, dass Noradrenalin auch potenziell pro-inflammatorische Eigenschaften besitzt. Die aktuellen deutschen und österreichischen S3-Leitlinien zur Behandlung des infarktbedingten kardiogenen Schocks sowie der Herzinsuffizienz empfehlen daher eine Behandlung mit dem Kalziumsensitizer Levosimendan (Simdax®) [67]. Levosimendan entfaltet im Körper drei verschiedenen Hauptwirkungen: Durch die Bindung an kardiales Troponin C steigert es die Kontraktilität des Herzmuskels und wirkt somit positiv inotrop [68, 69]. Gleichzeitig öffnet es Kaliumkanäle in VSMC und wirkt dadurch vasodilatatorisch [70], wodurch eine erhöhte Gewebepfusion resultieren kann. Zusätzlich wurden, vermittelt durch die Öffnung von ATP-abhängigen Kaliumkanälen, anti-apoptotische Effekte von Levosimendan auf Kardiomyozyten beschrieben [71].

Trotz des regelmäßigen klinischen Einsatzes von Levosimendan ist die genaue Wirksamkeit dieser Substanz in seiner klinischen Anwendung bisher nicht gänzlich geklärt. Eine Meta-Analyse von vierzehn verschiedenen Studien konnte durch die Behandlung mit Levosimendan eine Verminderung der Mortalität, der Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation sowie des Auftretens von postoperativen Nierenversagen feststellen [72]. Außerdem konnte Levosimendan die Mortalität in Patienten, die während ihrer Behandlung eine ECMO-Therapie benötigten, signifikant vermindern [73]. Andere Studien konnten für den Einsatz von Levosimendan eine Verringerung der Mortalität von Patienten mit postoperativem MODS feststellen, jedoch keine

Unterschiede im Zusammenhang mit der Behandlung eines akuten Myokardinfarkt, dem Auftreten von akutem Nierenversagen, der Notwendigkeit mechanischer Beatmung und der Liegezeit auf der Intensivstation sowie des gesamten Krankenhausaufenthaltes [74]. Darüber hinaus konnte eine weitere große Übersichtsarbeit über 88 Studien und eine Meta-Analyse von 49 verschiedenen Studien keinen Zusammenhang zwischen einer Verminderung der Mortalität und der Behandlung mit Levosimendan feststellen [75].

Aufgrund der Widersprüche in den einzelnen klinischen Studien und zur Verbesserung des Verständnisses der Wirkungsweise und Wirksamkeit von Levosimendan sind weitere klinische wie auch experimentelle Studien nötig, um eine bestmögliche Therapie erzielen zu können. Experimentelle Studien konnten eine Verringerung der Infarktgröße, des kardialen *Remodelling*, der infarktbedingten Inflammation sowie der Ödembildung durch eine orale Levosimendantherapie in einem Infarktmodell nachweisen [76, 77]. In einem EKZ-Modell mit DHCA in Ratten konnte eine Überlegenheit von Levosimendan gegenüber Adrenalin im Zusammenhang mit der Inotropie und Lusitropie während der Wiedererwärmung gezeigt werden [78]. Außerdem zeigten Ratten in diesem Modell durch Levosimendan eine verbesserte kardiale Funktion in der Reperusionsphase [79]. Detaillierte Forschungsergebnisse über die molekularbiologischen Veränderungen und Wirkungsweisen einer präventiven Levosimendantherapie im Zusammenhang mit EKZ und I/R-Schädigung, systemischer Inflammation und MODS sind jedoch noch immer nicht abschließend geklärt. Eine Verbesserung dieses Verständnisses ist jedoch nötig, um eine individuelle patientenzentrierte Levosimendantherapie zu ermöglichen.

### **1.2.3 Ziele der Arbeit**

Der Kalziumsensitizer Levosimendan ist ein etabliertes Medikament in der Therapie der Herzinsuffizienz [67]. Trotz intensiver Grundlagenforschung und klinischer Studien ist die Wirksamkeit einer Therapie mit Levosimendan insbesondere im Kontext von I/R-Schäden weiterhin nicht abschließend geklärt [72-75].

In diesem Abschnitt der Arbeit soll die präventive Levosimendantherapie vor EKZ untersucht werden. Es wird postuliert, dass eine präventive intravenöse Gabe von Levosimendan vor Anschluss an die EKZ zu einer Aktivierung von protektiven

kardiovaskulären Zellsignalwegen führt und durch Veränderungen im Proteingehalt im Herzen einen anti-apoptotischen Effekt induziert. Die molekularbiologische Untersuchung präventiver Levosimendanapplikation vor EKZ in einem kliniknahen Rattenmodell wurde zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben [61].

## **2 Methodik**

### **2.1 Die extrazelluläre Superoxiddismutase**

#### **2.1.1 Materialien**

##### **2.1.1.1 Versuchstiere**

Um die im Rahmen dieser Dissertation beschriebenen Experimente durchzuführen, wurde tierisches Probenmaterial benötigt. Die Versuchstiere entstammen der *Zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben* (ZETT) des Universitätsklinikums Düsseldorf und wurden unter Lizenz von Transposagen Biopharmaceuticals Inc. (Leixington, KY, USA) gezüchtet. Die Versuche wurden nach geltender Tierschutz-Versuchstierverordnung durchgeführt und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) mit dem Aktenzeichen: 84-02.04.2013A365 genehmigt. Vor Beginn der experimentellen Arbeiten wurde vom Promovenden ein tierversuchskundlicher Kurs an der ZETT des Universitätsklinikums Düsseldorf absolviert. Die *in vivo*-Versuche wurden an insgesamt vier verschiedenen Versuchstiergruppen durchgeführt. Die *in vitro*-Versuche wurden mit Proben von zwei verschiedenen Tierstämmen durchgeführt (Tabelle 1). Die verwendeten Versuchstiere erhielten Wasser und Futter *ad libitum*. Aufgrund des Zuchthintergrundes der Tiere wurde in Übereinstimmung mit Vorgaben des LANUV allen Tieren ein salzarmes Spezialfutter (Diät AIN-76a) verabreicht, um das kardiovaskuläre und renale System der Tiere nicht zusätzlich zu belasten.

**Tabelle 1: Versuchsgruppen**

<b>Versuchsgruppe</b>	<b>Gruppengröße</b>
<b><i>in vivo</i>-Versuche</b>	
Sham SOD3-kompetente Kontrolle	n = 7
Sham SOD3-E124D	n = 7
EKZ SOD3-kompetente Kontrolle	n = 8
EKZ SOD3-E124D	n = 9
<b><i>in vitro</i>-Versuche</b>	
Iso SOD3-kompetente Kontrolle	n = 12
Iso SOD3-E124D	n = 12

**Tabelle 1** Einteilung der Versuchstiere in die Versuchsgruppen. Insgesamt wurden n = 55 Tiere verwendet. Von den Versuchstieren der *in vitro*-Versuche wurden je Gruppe n = 9 für Kardiomyozyten Assays und n = 3 für Western Blot-Analysen verwendet.

### **2.1.1.2 Ausschlusskriterien**

Im Vorfeld der *in vivo*-Versuche wurden konkrete Ein- und Ausschlusskriterien formuliert. Dadurch wurde sichergestellt, dass das Ausmaß der induzierten I/R-Schäden im Modell in allen eingeschlossenen Tieren vergleichbar ist. Tiere mit niedrigen Hämoglobinwerten ( $Hb < 5 \text{ mg/dl}$ , n = 4) wurden nicht in die Auswertung mit einbezogen. Gleiches gilt für Tiere mit niedrigem Blutdruck (MAD < 40 mmHg für mehr als 10 min, n = 1) sowie Tiere die während der Wiedererwärmungsphase nicht in den Sinusrhythmus konvertierten (n = 4). Darüber hinaus musste ein weiteres Tier aufgrund technischer Probleme der verwendeten Messgeräte ausgeschlossen werden. Auf diese Weise wurden nur Tiere mit vergleichbaren Versuchsverläufen eingeschlossen, jedoch einzelne Versuchsgruppen verkleinert.

### **2.1.1.3 Tierversuche**

Materialien, die für die Durchführung der Tierversuche benötigt wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2: Materialien für die Tierversuche**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Referenz</b>
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG	25/12211273/0511
Arterenol 1 mg/ml	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH	PZN 3249510
BD Microlance™ 3, 20 G	Becton Dickinson and Company	301300
Combi-Stopper	B. Braun Melsungen AG	4495101 PZN 03200685
Dietrich Bulldog Clamp	Fine Science Tools GmbH	18039-45
Discofix® C 3SC	B. Braun Melsungen AG	16496C PZN 3672473
Disposable scalpel No.10 pfm	Feather Safety Razor Co. LTD.	02.001.30.010
Dumont #5	Fine Science Tools GmbH	11251-30
Dumont #5/45	Fine Science Tools GmbH	11251-35
Electrode Gel	Henry Schein Inc.	900-0847
Fentanyl-Rotexmedica	Rotexmedica GmbH	PZN 5882246
Forene® 100 % (V/V)Isofluran	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG	B506 Zul.-Nr. 2594.00.00
Halsted-Mosquito	Fine Science Tools GmbH	13008-12
Hardened Fine Iris Scissors	Fine Science Tools GmbH	14090-09
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Ratiopharm GmbH	PZN 03029843
HILITE® 2400 LT, Rheoparine® coated, Hollow Fiber Oxygenator	MEDOS Medizintechnik AG	ME 6205 CL01
Injekt® 10 ml Luer Solo	B. Braun Melsungen AG	4606108V
Injekt® 2 ml Luer Solo	B. Braun Melsungen AG	4606027V
Injekt® 20 ml Luer Solo	B. Braun Melsungen AG	4606205V
Injekt® 5 ml Luer Solo	B. Braun Melsungen AG	4606051V
Isotonische Kochsalzlösung 100 ml	Fresenius Kabi AG	PZN 6178526
Kohlenstoffdioxid	Linde AG	276 311-14241771
Leukoplast® wasserfest 2,5 cm x 5 m	BSN medical GmbH	02322-00
Leukoplast® wasserfest 5 cm x 5 m	BSN medical GmbH	02324-00
Lidocain-HCl 2 %	B. Braun Melsungen AG	577/12606326/0410
Magnesiocard i.v. 3 mmol	Verla-Pharm Arzneimittel GmbH & Co	PZN 01984085
Mini-Spike	B. Braun Melsungen AG	4550242
Miniature Vannas	Fine Science Tools GmbH	15396-00
NaCl 0,9% Fresenius	Fresenius Kabi AG	7152-5
Nacoren® Pentobarbital-Natrium	Merial GmbH	Zul.-Nr. 60889866.00.00
Natriumhydrogencarbonat 8,4 %	B. Braun Melsungen AG	201/12210870/0811
Nimbex	GlaxoSmithKline plc.	PZN 1-21326
Omnifix®-F Tuberkulin/Tuberculin 1 ml Luer Solo	B. Braun Melsungen AG	9161406V PZN 0569881
Peha® Wattestäbchen	Paul Hartmann AG	470 015/1
Präpariertupfer steril, mittel	Fuhrmann GmbH	50183
Prolene USP 4-0	Ethicon, Inc.	EH7581H
Schlinggazetupfer	Fuhrmann GmbH	40709
Standard Pattern	Fine Science Tools GmbH	14001-12

Sterican® Gr. 20, 27 G Suprarenin	B. Braun Melsungen AG Sanofi-Aventis Deutschland GmbH	4657705 PZN 06053210
Tissue Forceps	Fine Science Tools GmbH	11023-10
Tris 36,34%	B. Braun Melsungen AG	275 0254
Vasofix® Safety 17 G	B. Braun Melsungen AG	4268156S-01
Vasofix® Safety 20 G	B. Braun Melsungen AG	4268113S-01
Vicryl USP 0	Ethicon, Inc.	V1217E
Vicryl USP 2-0	Ethicon, Inc.	V443H
Volulyte 6 % HES 130/0,4	Fresenius Kabi AG	PZN -2796285
Wullstein	Fine Science Tools GmbH	17018-11

**Tabelle 2** Verwendete Materialien für die Durchführung der Tierversuche.

### 2.1.1.4 *in vivo*-Versuche

Materialien, die für die Experimente und Auswertungen der *in vivo*-Versuche verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3: Materialien für die *in vivo*-Versuche**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Referenz</b>
10X Tris-Glycine SDS Buffer	Thermo Fisher Scientific, Inc.	28362
2-Propanol Ensure®	Merck KGaA	603-117-00-0
4-20 % Precise™ Tris-Glycine Gels (10 Well)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	0025249
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH + Co. KG	8076.3
Ammonium persulfate	Sigma-Aldrich Co. LLC.	A3678-25G
AnalaR Normapur Methanol	VWR Chemicals International S.A.S	20847.3120
Angiotensin II ELISA kit	Enzo Life Sciences, Inc.	ADI-900-204
Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich Co. LLC.	B9643-1L
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich Co. LLC.	B6916-500ML
Bromphenol Blue	Sigma-Aldrich Co. LLC.	B0126-25G
Cassettes 1,5 mm	Thermo Fisher Scientific, Inc.	NC2015
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Deutschland Holding GmbH	04 693 124 001
Copper(II) sulfate solution	Sigma-Aldrich Co. LLC.	C2284-25ML
Demi-Wasser	Otto Fischer GmbH & Co.KG	PZN 04914151
Empty Gel Cassettes Combs, mini, 1,0 mm, 10 Well	Thermo Fisher Scientific, Inc.	NC3010
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH + Co. KG	E706.1
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG	3733.2
Hydoxylamine-O-sulfonic acid	Sigma-Aldrich Co. LLC.	213136-25G
Hypoxanthine	Sigma-Aldrich Co. LLC.	H9636-5G
M-PER® Mammilian Protein Extraction Reagent	Thermo Fisher Scientific, Inc.	78501

Microplatte, 96 Well, PP	Greiner Bio-One GmbH	655201
N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride	Sigma-Aldrich Co. LLC.	33461-5G
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	HN00.3
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc.	26619
PhosSTOP EASYpack Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Deutschland Holding GmbH	04 936 837 001
Pierce Western Blot Transfer Buffer, 10X Methanol-free	Thermo Fisher Scientific, Inc.	35040
Pierce® Reversible Protein Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc.	24585
Pierce™ 2-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Inc.	35602BID
Potassium cyanide	Sigma-Aldrich Co. LLC.	60178-25G
Potassium phosphate monobasic	Sigma-Aldrich Co. LLC.	P9791-100G
PVDF Western Blotting Membranes	Roche Deutschland Holding GmbH	03 010 040 001
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Inc.	21059
Rotilabo®-Blottingpapiere	Carl Roth GmbH + Co. KG	045491873
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG	A515.1
Salzsäure rauchend 37 %	Carl Roth GmbH + Co. KG	2607.1
SDS Pellets	Carl Roth GmbH + Co. KG	CN30.4
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich Co. LLC.	70166-500G
Sodium tetraborate	Sigma-Aldrich Co. LLC.	221732-100G
Sulfanilic acid	Sigma-Aldrich Co. LLC.	86090-100G
SuperSignal® Enhanced Molecular Weight Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Inc.	84786
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Inc.	34095
TEMED	Bio-Rad Laboratories, Inc.	161-0801
Triplex® III	Merck KGaA	1.08418.1000
Trizema® base	Sigma-Aldrich Co. LLC.	1001630396
Tween® 20 Detergent	Merck Millipore, Merck KGaA	655205
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Quantum	Biozym Scientific GmbH	541015
Xanthine Oxidase from bovine milk	Sigma-Aldrich Co. LLC.	X1875-5UN

**Tabelle 3** Verwendete Materialien für die Durchführung der *in vivo*-Versuche.

### 2.1.1.5 *in vitro*-Versuche

Materialien, die zusätzlich für die Experimente und Auswertungen der *in vitro*-Versuche verwendet wurden, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Materialien *in vitro*-Versuche**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Referenz</b>
6-Well Plate with Lid	Starlab International GmbH	CC7672-7506
96 Well Screenstar Platte schwarz, TC	Greiner Bio-One GmbH	655866
BD Falcon™ Cell Strainer 100 µm Nylon	Becton Dickinson and Company	352360
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	A6003-25G
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA	1.02382.1000
CellROX® Deep Red Reagent	Thermo Fisher Scientific, Inc.	C10422
Creatine anhydrous	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	C0780-50G
D-(+)-Glucose	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	G7021-1KG
DAF-FM diacetate	Molecular Probes Inc.	D-23844
Deoxycholic acid sodium salt (DOC)	Carl Roth GmbH + Co. KG	3484.1
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	41639-100ML
DPBS (1X)	Thermo Fisher Scientific, Inc.	14190-094
Hank's Balanced Salt Solution	Thermo Fisher Scientific, Inc.	14175-095
HEPES, minimum 99,5 % titration	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	H3375-100G
IGEPAL CA 630	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	I30201-50ML
ITS Liquid Media Supplement (100X)	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	I3146-5ML
Kaliumchlorid	Merck KGaA	1.04936.1000
Kollagenase II	Thermo Fisher Scientific, Inc.	17101015
L-Carnitine hydrochloride	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	C0283-5G
Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	L2020-1MG
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA	1.05886.1000
Medium 199	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	M2154
Minisart Single use syringe filter 0,2 µm	Sartorius AG	17597
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG	HN00.3
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck KGaA	1.06346.1000
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH +Co	7477 20
Protease from Streptomyces griseus	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	P5147-1G
Sodium hydroxide	Merck KGaA	1.06498.0500
Sodium Pyruvate	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	S8636
Stericup® 500 ml Millipore Express® Plus 0,22 µm PES	Merck Millipore, Merck KGaA	SCGPU05RE
Superoxide Dismutase from human erythrocytes	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	S9636
Taurine	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	T8691-25G
TC-Schale 100, Suspension	Sarstedt AG & Co. KG	83.3902.500
Zellschaber 16 cm	Sarstedt AG & Co. KG	83.1832
µ-Plate 24 well ibiTreat	Ibidi GmbH	82406

**Tabelle 4** Zusätzliche Materialien für die Durchführung der *in vitro*-Versuche.

## 2.1.1.6 Antikörper

Die im Projekt verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt.

**Tabelle 5: Antikörper**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Referenz</b>
Akt (pan) (C67E7) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.	4691S
Anti-3-Nitrotyrosine antibody [7A12AF6]	Abcam plc.	Ab110282
Anti-Mn-SOD	Merck Millipore, Merck KGaA	06-984
Anti-mouse IgG (whole molecule)	Sigma-Aldrigh Co. LLC.	A9044
Cu/Zn SOD pAb	Enzo Life Sciences, Inc.	ADI-SOD-100D
EC SOD, pAb	Enzo Life Sciences, Inc.	ADI-SOD-106D
eNOS Antibody	Cell Signaling Technology, Inc.	9572
Goat anti-Rabbit IgG (H+L)-HRPO, MinX none	Dianova GmbH	111-035-003
p44/42 MAPK (Erk1/2) (137F5) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.	4695
PARP (46D11) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.	9532
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.	4060
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (20G11) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.	4376
Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP® Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.	9145
Stat3 (79D7) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Inc.	4904
β-Actin Antibody	Cell Signaling Technology, Inc.	4967

**Tabelle 5** Übersicht über die verwendeten Antikörper.

### 2.1.1.7 Verbrauchsmaterialien

Die im Projekt verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Referenz</b>
Cellstar® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH	188271
Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	227261
Costar® 10 ml Stripette®	Corning Incorporated	4488
Costar® 25 ml Stripette®	Corning Incorporated	4489
Costar® 5 ml Stripette®	Corning Incorporated	4487
CryoTube™ Vials	Thermo Fisher Scientific, Inc.	368632
epT.I.P.S.® Standard/Bulk 100 – 5000 µl	Eppendorf AG	022492080
Röhre 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG	62.559.001
Rotilabo®-Probenbeutel, LDPE, 70 x 100 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG	0638.1
TabTop Microcentrifuge Tubes 1,5 ml	Sorenson™ BioScience, Inc.	16130
TipOne 100 µl XL, Graduated, Filter Tip (Sterile)	Starlab International GmbH	S1122-1830
TipOne 10 µl Graduated, Filter Tip (Sterile)	Starlab International GmbH	S1121-3810
TipOne 200 µl Graduated, Filter Tip (Sterile)	Starlab International GmbH	S1120-8810

**Tabelle 6** Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

### 2.1.1.8 Software

Die für die Auswertung verwendete Computersoftware ist in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Software**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Referenz</b>
Adobe Photoshop CC	Adobe Systems Software Ireland, Ltd.	Version 19.0
Endnote X7	Thomson Reuters Corporation	Version X7.7.1 (Bld 11961)
GraphPad Prism Mac	GraphPad Software, Inc.	Version 6.0.c
ImageJ 1.x	National Institutes of Health, USA	Version 1.48v
LabWorks Analysis Software	BioImaging Systems UVP, LLC.	Version 3.0
MasterPlex® ReaderFit	Hitachi Software Engineering America, Ltd.	Version P122009-29
Microsoft® Excel® for Mac 2011	Microsoft Corporation	Version 14.0.0 (100825)
Microsoft® Word for Mac 2011	Microsoft Corporation	Version 14.0.0 (100825)
Tecan i-control	Tecan Trading AG	Version 1.10

**Tabelle 7** Übersicht über die verwendete Computersoftware.

### 2.1.1.9 Geräte

Zum pipettieren wurden Standardpipetten der Firma Eppendorf AG verwendet. Weitere verwendete Geräte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabelle 8: Geräte**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>	<b>Referenz</b>
Blood Gas Analyzer	Radiometer Medical ApS	Düsseldorf	ABL700
Homogenisator	Quigley-Rochester, Inc.	Düsseldorf	Braun-Sonic 125
Eagle 4000 patient monitor	Marquette Hellige GmbH	Düsseldorf	EGL4NICN-20=SH
Electrophoresis Power Supply	Consort bvba	Düsseldorf	EV245
Hämatologiegerät	Scil animal care company GmbH	Düsseldorf	Vet abc™
Infinite M Plate Reader	Tecan Trading AG	Düsseldorf	M1000Pro
CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Düsseldorf	HERACell 240i
Kleintier-HLM-System	Dipl.-Ing. Martin Humbs	Düsseldorf	Modell 2000
Laborschüttler	Janke & Kunkel GmbH & Co. KG IKA-Labortechnik	Düsseldorf	VIBRAX-VXR
Novex™ Semi-Dry Blotter	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Düsseldorf	SD1000
Reagenzglasschüttler	Janke & Kunkel GmbH & CO. KG IKA-Labortechnik	Düsseldorf	Vibrofix VF1
Rollenmischer	Phoenix Instrument GmbH	Düsseldorf	RS-TR05
Small Animal Model 683 Ventilator	Harvard Apparatus, Harvard Biosciences, Inc.	Düsseldorf	PY2 55-0000
Stablampe	Schott AG	Düsseldorf	KL 150 B
T/Pump® Heat Therapy Pump	Gaymar Industries, Inc.	Düsseldorf	TP702
Thermomixer	Eppendorf AG	Düsseldorf	5436
Isofluran VET.MED. Vapor	Drägerwerk AG & Co. KGaA	Düsseldorf	Vapor 19.3
XCell SureLock™ Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Düsseldorf	EI0001
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Düsseldorf	Universal 16
Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG	Düsseldorf	Universal 32 R

**Tabelle 8** Übersicht über die verwendeten Geräte.

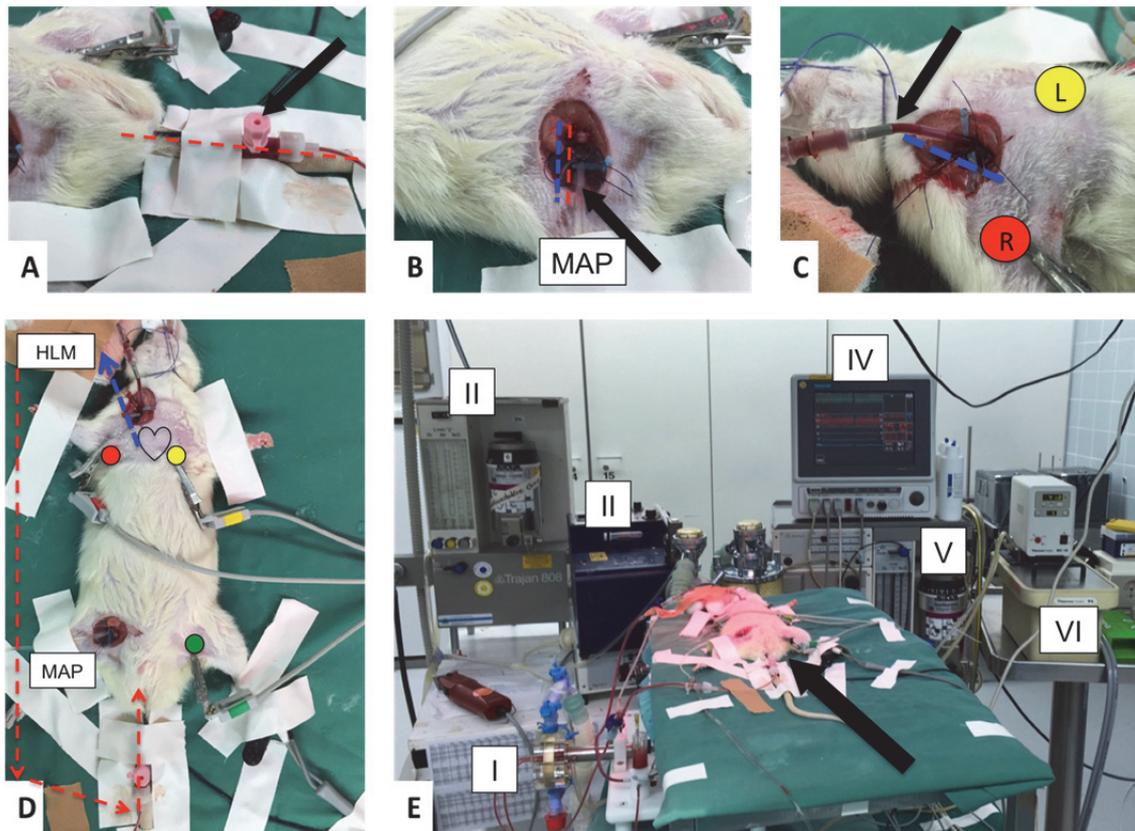
## 2.1.2 Methoden

### 2.1.2.1 *in-vivo* Ratten-EKZ mit DHCA

Um die I/R-Schäden an Rattenherzen und -aorten zu untersuchen, wurden Ratten einer Operation mit extrakorporaler Zirkulation und DHCA unterzogen (Abb. 5). Hierfür wurde ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Modell verwendet [28, 61, 80-82]. Alle hier dargestellten Versuche fanden unter der Mitwirkung des Promovenden statt, wobei diesem in der Initialphase assistierende Aufgaben übertragen wurden, später jedoch auch die durchführende Position zugesprochen wurde. Für die Versuche wurden zwischen 400 und 500 g schwere männliche Ratten verwendet. Zunächst wurde mit Isofluran die Narkose eingeleitet und die Tiere mit einem Venenverweilkatheter der Größe 17 Gauge intubiert. Der Katheter wurde an die Beatmungsanlage angeschlossen. Die Beatmung lief auf einer Frequenz von 70 /min mit einem Beatmungsdruck von 15 mmHg, einem Fluss von 1,8 l/min Sauerstoff sowie 3 % Isofluran zur Anästhesie. Danach wurde das Tier rasiert und die Elektroden der Elektrokardiographie sowie Pulsoxymetrie und Temperatursensor angeschlossen, um ein adäquates *Monitoring* sicherzustellen. Als Analgesie erhielt das Tier 5 µg/kg KG Fentanyl i.m. Im weiteren Verlauf bekam das Tier jeweils 5 µg/kg KG Fentanyl pro Stunde über die HLM verabreicht.

Um die Kleintier-HLM an die Ratte anzuschließen, wurden zunächst ihre Gefäße kanüliert. Mit einem Skalpell wurde ein ungefähr ein Zentimeter langer, medianer Schnitt im Bereich der dorsalen Schwanzwurzel gesetzt. Mit einer Schere sowie einer Pinzette wurde nun das subkutane Gewebe stumpf präpariert und die A. sacralis mediana dargestellt. Das Gefäß wurde circa einen Millimeter breit eröffnet und ein 20 Gauge Venenverweilkatheter eingeführt. Anschließend wurde der Katheter fixiert. Es folgte die erste arterielle Blutentnahme. Im Anschluss wurden dem Tier zur Gerinnungshemmung 200 i.E. Heparin injiziert. Im Folgenden wurde die linke A. femoralis auf Höhe der A. epigastrica inf. präpariert und mit einem Blutdruckkatheter kanüliert. Abschließend erfolgte die Präparation und Kanülierung der V. jugularis interna sinistra mit einem speziellen Jugulariskatheter.

**Abbildung 5: Extrakorporale Zirkulation im Rattenmodell**



**Abb. 5** Durchführung der extrakorporalen Zirkulation im Rattenmodell: **A** Arteriell Ende: (→) arterieller Katheter der Herz-Lungen-Maschine, (--) Verlauf A. sacralis mediana, **B** Blutdruckkatheter: (→) Katheter der invasive Blutdruckmessung, (--) A./V. femoralis, **C** Venöses Ende: (→) venöser Katheter der Herz-Lungen-Maschine, (--) Verlauf V. jugularis interna, (o) EKG-Elektroden, **D** Tier während der extrakorporalen Zirkulation: (--) Blutfluss der extrakorporalen Zirkulation, (o) EKG-Elektroden, **E** OP-Setting: (→) Versuchstier, (I) Herz-Lungenmaschine, (II) Vapor, (III) Beatmungsgerät, (IV) Überwachungsmonitor, (V) Vapor der HLM, (VI) temperaturreguliertes Wasserbad.

Danach erfolgte der Anschluss an die extrakorporale Zirkulation. Hierzu wurde die HLM mit 8 ml HES-Lösung *geprimt*. Anschließend wurde zunächst das venöse, dann das arterielle Ende angeschlossen. Zeitgleich zum Anschluss an die HLM wurde die Sauerstoff- und Isofluranzufuhr über die Lungenbeatmung eingestellt. Die Beatmungsfrequenz wurde auf 28 /min gedrosselt. Über den Membranoxygenator wurden 1,4 l O<sub>2</sub>/min sowie 2 % Isofluran verabreicht. Das Tier erhielt zur Muskelrelaxation Cisatracurium über die HLM. Die Abkühlung des Versuchstieres erfolgte standardisiert. Dabei wurde die Flussrate der HLM schrittweise

temperaturabhängig und gewichtsadaptiert reduziert. Bei 25 °C Körpertemperatur wurde erneut arterielles Blut abgenommen. Mit dem Erreichen der Zieltemperatur von 16 °C wurde für 45 min der Fluss über die HLM unterbrochen. Anschließend begann die Wiederaufnahme der Perfusion über die HLM bei gleichzeitiger Wiedererwärmung nach Schema auf 37 °C innerhalb von 40 Minuten. Es erfolgten weitere Blutabnahmen bei 20 °C und 35 °C Körpertemperatur sowie nötigenfalls eine Blutgasanalyse zur Sicherstellung des Säure-Base-Haushalts. Bis zum Ende der Wiedererwärmungsphase musste das Tier einen geregelten Rhythmus im EKG zeigen. Nötigenfalls konnte durch die Applikation von Magnesium die Konversion aus dem Kammerflimmern unterstützt werden. Die I/R-Schädigung war damit induziert.

Es folgte eine 60-minütige Reperfusionphase mit engmaschiger Kontrolle der Vitalparameter und gegebenenfalls medikamentöser Interventionen, ehe die Euthanasie erfolgte, um die Organe zur weiteren Analyse zu entnehmen. Hierfür wurde dem Tier eine letale Dosis Fentanyl verabreicht und dieses anschließend über den Schwanzkatheter mit 4 °C kalter isotonischer Kochsalzlösung gespült. Nun wurden Thorax und Abdomen eröffnet und der Reihe nach Herz, thorakale Aorta, Lunge, Leber und die Nieren entnommen. Die Organe wurden zu Teilen in Mikroreaktionsgefäßen direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in histologischem Einbettmedium konserviert. Alle Proben wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Auf diese Weise wurden Organproben mit I/R-Schäden für die weitere Analyse gewonnen.

### **2.1.2.2 SOD3-Plasmaaktivität**

Um die durch die SOD3-E124D-Mutation erwarteten Unterschiede in der Enzymfunktion der SOD3 zu belegen, wurde die Plasmaaktivität bestimmt. Untersucht wurden hierbei Plasmaproben des Zeitpunktes T1 (vor EKZ), T2 (bei 25 °C Abkühlung) und T5 (Euthanasie). Um die Aktivität der SOD3 zu messen, wurden zunächst reaktive Sauerstoffspezies in den Plasmaproben erzeugt, welche dann in einer späteren Inkubationsphase teilweise entgiftet wurden. Zurückgebliebene Radikale wurden mit Hilfe einer Farbreaktion angefärbt [83].

Zuerst wurden die Plasmaproben für zwei Minuten bei 15.000 G zentrifugiert. Anschließend wurden je Probe 100 µl Plasma in jeweils drei verschiedene

Mikroreaktionsgefäße gegeben. Da die Plasmaproben neben der zu untersuchenden SOD3 auch andere Enzyme enthalten, die Einfluss auf reaktive Sauerstoffspezies nehmen können, mussten diese Enzyme zunächst spezifisch inaktiviert werden. Dies erfolgte thermisch. Es wurde jeweils ein Mikroreaktionsgefäß bei Raumtemperatur, eines bei 60 °C und eines bei 95 °C für jeweils 10 Minuten inkubiert. Die Inkubation bei Raumtemperatur diente als Kontrollgruppe. In dieser Gruppe wurden keinerlei Plasmaenzyme inaktiviert. Um die Hintergrundaktivität durch Katalasen zu unterdrücken, wurden diese bei 60 °C inaktiviert. Da die Superoxiddismutase jedoch erst ab Temperaturen oberhalb von 75 °C in ihrer Aktivität eingeschränkt wird, ist diese lediglich in der 95 °C-Gruppe inaktiviert worden [84]. Die Differenz der 60 °C- und der 95 °C-Gruppe ergab demnach die Gesamtaktivität der Superoxiddismutasen in der jeweiligen Plasmaprobe. Da die SOD3 als einzige Isoform extrazellulär und damit im Plasma vorkommt, ist diese errechnete Gesamtaktivität mit der spezifischen Aktivität der SOD3 gleichzusetzen.

Anschließend an die thermische Inaktivierungsphase wurde jedem Mikroreaktionsgefäß 200 µl Lösung A, 500 µl Puffer Z sowie 200 µl Lösung C hinzugefügt (Tabelle 9 – 12). Es erfolgte eine weitere Inkubationsphase für 30 Minuten bei 37 °C. Währenddessen wurde für jedes Mikroreaktionsgefäß ein Zentrifugenröhrchen vorbereitet und mit 2 ml Lösung C versetzt. Der Inhalt der Mikroreaktionsgefäße wurde nun vollständig in die korrespondierenden Zentrifugenröhrchen überführt. Hierbei bildete sich ein Farbumschlag. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 250 µl Probenlösung in eine Multiwellplatte überführt. Es erfolgte eine Absorptionsmessung im *Plate Reader* bei einer Wellenlänge von 550 nm.

**Tabelle 9: Pufferlösung Z**

<b>Puffer Z</b>	
Aqua dest.	1000 ml
100 µM NaEDTA	37 mg
20,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,83 g
15,6 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	3,14 g
<b>über Nacht rühren, pH = 7,8 einstellen und bei 4 °C lagern</b>	

**Tabelle 9** Zusammensetzung des Probenpuffers.

**Tabelle 10: Substratlösung A**

<b>Lösung A</b>	
Puffer Z	500 ml
3,54 mM Hydroxylaminsulfonsäure	200 mg
0,4 mM Hypoxanthin	27,6 mg

**Tabelle 10** Zusammensetzung der Substratlösung.

**Tabelle 11: Enzymlösung B**

<b>Lösung B</b>	
Puffer Z	50 ml
Xanthin Oxidase	1,25 mU/ml

**Tabelle 11** Zusammensetzung der Enzymlösung.

**Table 12: Färbelösung C**

<b>Lösung C</b>	
Aqua dest.	1000 ml
Sulfanylsäure	300 mg
N-1 Naphtylethylendiamin	5 mg

**Tabelle 12** Zusammensetzung der Färbelösung.

Je stärker der Farbumschlag einer Probe, desto größer war in dieser die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies. Dem theoretischen Modell folgend wurde nun zunächst kontrolliert, ob die gemessene Absorption in der Kontrollgruppe ohne thermische Inaktivierung der Plasmaenzyme (Raumtemperatur) geringer war als diese der Gruppen mit thermischer Inaktivierung. Anschließend wurden die Absorptionswerte der thermisch inaktivierten Gruppen wie beschrieben subtrahiert. Auf diese Weise konnte die relative Aktivität der SOD3 in den Plasmaproben bestimmt werden, um die genotypisch bedingte Veränderung der SOD3-Aktivität im Tiermodell auch phänotypisch zu belegen.

### **2.1.2.3 Messung der Plasmahämolyse**

Um die zunehmende Hämolyse im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation quantitativ zu untersuchen, wurde die Absorption von freiem Hämoglobin zum Zeitpunktes T1 (vor EKZ) und T5 (Euthanasie) im Plasma gemessen. In einer Multiwellplatte wurden je 20 µl Plasma pipettiert. Anschließend erfolgte eine Messung der Absorption für die Wellenlängen 414 nm, 541 nm und 576 nm im *Plate Reader* [85]. Auf diese Weise konnte das freie Hämoglobin im Plasma quantitativ bestimmt werden.

### **2.1.2.4 Western Blot-Analyse der Organproben**

Um Proteinanalysen der Organlysate durchzuführen, wurden Western Blots angefertigt [86]. Um den Proteingehalt der Organproben zu analysieren, wurden diese zunächst lysiert. Mit einem Mörser wurden die gefrorenen Organe pulverisiert ohne diese anzutauen. Anschließend wurden jeweils 50 mg Organpulver in 750 µl M-PER Puffer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) lysiert. Dem Puffer wurden zuvor Protease- und Phosphataseinhibitoren zugesetzt. Anschließend wurden die Lysate durch ein Ultraschallgerät für 15 s bei 70 Hz homogenisiert. Abschließend wurden die Organlysate 15 Minuten lang bei 15.000 G zentrifugiert. Aus den Überständen wurden durch zwei verschiedene Assays die Proteinmenge der Organlysate bestimmt. Für die Herzproben und Kardiomyozytenlysate wurde der Bradford Assay (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) verwendet [87]. Die Aortenproben wurden mit dem BCA Assay (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) auf ihren Proteingehalt untersucht [88]. Es wurde für beide Assays das Standardprotokoll des Herstellers verwendet.

Für die Gelelektrophorese wurden zunächst 10 % Tris-Glycin-Gele gegossen (Tabelle 13). Hierfür wurden zunächst die Zutaten des Trenngels gemischt und in die Gelkassette gegossen. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das zuvor angesetzte Sammelgel der Kassette hinzugefügt und ein Gelkamm eingesetzt. Nach erneuter Polymerisation wurden die Kassetten bei 4 °C feucht gelagert.

**Tabelle 13: 10 % Tris-Glycin-Gel**

<b>Trenngel</b>		<b>Sammelgel</b>	
Aqua dest.	4,8 ml	Aqua dest.	3,5 ml
Tris Base 1,5 M pH 8,8	2,5 ml	Rotiphorese Gel 40	720 µl
Rotiphorese Gel 40	2,5 ml	Tris Base 0,5 M pH 6,8	650 µl
20 % SDS in Aqua dest.	50 µl	20 % SDS in Aqua dest.	25 µl
10 % APS in Aqua dest.	100 µl	10 % APS in Aqua dest.	50 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl

**Tabelle 13** Zutaten zum Gießen eines 10 % Tris-Glycin-Gels für die Gelelektrophorese im Rahmen von Western Blots.

Anschließend wurden die Organlysate für die Gelelektrophorese vorbereitet. Für die Herzproben wurden jeweils 30 µg, für die Aortenproben 20 µg und für die Kardiomyozytenproben 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die entsprechenden Volumina der Organlysate wurden mit einem Viertel ihres Volumens an Laemmli-Puffer (4X) ergänzt (Tabelle 14). Die Proben wurden daraufhin kurzzeitig gerührt, ehe sie für eine halbe Minute mit maximal 20.000 G zentrifugiert wurden. Abschließend wurden die Proben fünf Minuten lang bei 95 °C erwärmt. Proben, die mit dem 3-Nitrotyrosine-Antikörper inkubiert werden, wurden mit Laemmli-Puffer (4X) ohne Mercaptoethanol behandelt und abschließend nicht gekocht.

**Tabelle 14: Laemmli-Puffer (4X)**

<b>Laemmli-Puffer (4x)</b>	
1,5M Tris	18,2 ml
20 % SDS in Aqua dest.	9 ml
Glycerol	36,8 ml
Mercaptoethanol	27 ml
Aqua dest.	9 ml
Bromphenolblau	40 mg

**Tabelle 14** Zutaten zur Herstellung von Laemmli-Puffer (4X). Für den 3-Nitrotyrosine Antikörper wurde Laemmli-Puffer (4X) ohne Mercaptoethanol verwendet. Die restlichen Zutaten blieben unverändert.

Um die unterschiedlichen Proteine in den Proben nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Gelkassetten wurden in die Gelkammer eingespannt und diese mit *1X Tris-Glycine SDS Buffer* (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) gefüllt. Zusätzlich wurde als Marker eine

Mischung aus 5  $\mu$ l *Page Ruler Plus* und 2  $\mu$ l *Super Signal Protein Ladder* (jeweils Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) in die Taschen pipettiert. Die Gelelektrophorese lief auf einer maximalen Spannung von 200 V und einer maximalen Stromstärke von 20 mA pro Gel. Nachdem die Proben das Sammelgel verlassen hatten, wurde die maximale Stromstärke auf 70 mA pro Gel angehoben. Nach Vollendung der Gelelektrophorese waren alle Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Um die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran zu überführen, wurde eine *SDS-Page* nach der *Semi-Dry Methode* durchgeführt. Das Gel und die zuvor kurz in Methanol aktivierte PVDF-Membran wurden zwischen *Whatman Paper* gelegt und in Transferpuffer getränkt. Der Transfer lief über 90 Minuten auf einer maximalen Spannung von 13 V und einer maximalen Stromstärke von 400 mA. Die Proteine wurden somit aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen.

Damit densitometrisch spezifische Proteinbanden untersucht werden konnten, erfolgte eine Antikörperbehandlung. Zunächst wurde die PVDF-Membran für 60 Minuten in 5 % Magermilch-TBST blockiert (Tabelle 15). Anschließend erfolgte über Nacht bei 4 °C die Inkubation im Erstantikörper (Tabelle 16-18). Am nächsten Morgen wurden die Membranen drei Mal für 15 Minuten bei Raumtemperatur in TBST gewaschen und anschließend im Zweitantikörper inkubiert (Tabelle 16-18). Hierauf folgte ein erneuter Waschdurchgang. Die Membranen wurden nun mit 500  $\mu$ l Chemolumineszenz-Substrat versetzt und ihre Signale von einer Kamera detektiert. Somit konnten densitometrisch spezifische Proteinbanden untersucht werden.

**Tabelle 15: 10X TBST Puffer**

<b>10X TBST Puffer</b>	
Tris Base	60,5 g
NaCl	87,6 g
Aqua dest.	800 ml
<b>mit 37 % HCl auf pH = 7,5 einstellen</b>	
Tween 20	10 ml
<b>auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen</b>	

**Tabelle 15** Herstellung von 10X TBST-Puffer als Stocklösung. Zu Verwendungszwecken wurde dieser im Verhältnis 1:10 in destilliertem Wasser zu 1X TBST-Puffer verdünnt.

Um eine Ladungskontrolle durchzuführen, wurde die Membran einem *Stripping* unterzogen [89]. Die Membran wurde mit 1000 µl *Stripping Buffer* (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) versetzt und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte für 60 Minuten ein erneuter Blockierschritt in 5 % Magermilch-TBST ehe die Inkubation im Erstantikörper durchgeführt wurde.

**Tabelle 16: Western Blot Antikörper Herzgewebe**

<b>Erstantikörper</b>	<b>Konz.</b>	<b>Zweitantikörper</b>	<b>Konz.</b>	<b>Inkubation</b>
p-p44-42 MAPK CS #4376	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
p4-42 MAPK CS #4695	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
pSTAT3 CS #9145	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
tSTAT3 CS #4904	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
pAKT CS #4060	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
AKT (pan) CS #4691S	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
β-Actin CS #4957	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
eNOS CS #9572	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min
PARP CS #9532	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
Anti-3-Nitrotyrosine ab110282	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Sigma A9044	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
SOD1 Enzo #ADI-SOD-100D	1:2000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
SOD2 Millipore #06-984	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch TBST	60 min
SOD3 Enzo #ADI-SOD-106-D	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min

**Tabelle 16** Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten beim Western Blot von Herzproben.

**Tabelle 17: Western Blot Antikörper Aortengewebe**

<b>Erstantikörper</b>	<b>Konz.</b>	<b>Zweitantikörper</b>	<b>Konz.</b>	<b>Inkubation</b>
p-p44-41 MAPK CS #4376	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
p44-42 MAPK CS #4695	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
pSTAT3 CS #9145	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
tSTAT3 CS #4904	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
pAKT CS #4060	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
AKT (pan) CS #4691S	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
β-Actin CS #4957	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	120 min
eNOS CS #9572	1:300 in 1 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min
SOD1 Enzo #ADI-SOD-100D	1:2000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
SOD2 Millipore #06-984	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	60 min
SOD3 Enzo #ADI-SOD-106-D	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	180 min

**Tabelle 17** Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten beim Western Blot von Aortenproben.

**Tabelle 18: Western Blot Antikörper Kardiomyozyten**

<b>Erstantikörper</b>	<b>Konz.</b>	<b>Zweitantikörper</b>	<b>Konz.</b>	<b>Inkubation</b>
p-p44-42 MAPK CS #4376	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min
p4-42 MAPK CS #4695	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min
pSTAT3 CS #9145	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min
tSTAT3 CS #4904	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min
β-Actin CS #4957	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min
SOD1 Enzo #ADI-SOD-100D	1:2000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	120 min
SOD2 Millipore #06-984	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:10000 in 5 % Milch- TBST	120 min
SOD3 Enzo #ADI-SOD-106-D	1:300 in 1 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min
3-Nitrotyrosine	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Sigma A9044	1:5000 in 5 % Milch-TBST	120 min

**Tabelle 18** Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten beim Western Blot von Kardiomyozyten.

### 2.1.2.5 Angiotensin II-ELISA

Um die Plasmakonzentration von Angiotensin II zu messen, wurde ein ELISA durchgeführt (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA). Es wurden die Plasmaproben der Zeitpunkte T1 (vor EKZ), T2 (25 °C Abkühlung) und T5 (Euthanasie) untersucht. Der ELISA wurde nach dem empfohlenen Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Standardkurve wurde mit der Software Readerfit (Hitachi Solutions America, Ltd., Greenville, SC, USA) berechnet.

### 2.1.2.6 Isolation adulter Kardiomyozyten

Für die Untersuchung adulter Rattenkardiomyozyten wurden Zellen mithilfe einer selbst gebauten Langendorff-Anlage isoliert und eine Primärkultur angelegt. Für die Versuche wurden Tiere mit einem Mindestgewicht von 250 g verwendet. Für die Zellisolation und Kultivierung wurde ein modifiziertes Protokoll nach Vorlage von Louch *et al* [90]

verwendet. Das Zellkulturmedium, die *1X Control Solution* sowie die *Enzyme Solution* wurden in ihrer Zusammensetzung verändert (Tabelle 19-21).

**Tabelle 19: Zellkulturmedium**

<b>CCT-M199 Zellkulturmedium</b>	
M199	500 ml
Creatine	0,3275 g
Carnitine	0,198 g
Taurine	0,313 g
HEPES	1,19 g
Penicillin/Streptomycin	5 ml
Sodium Pyruvat (100X)	5 ml
ITS (100X)	5 ml

**steril filtern und bei 4 °C lagern**

**Tabelle 19** Zusammensetzung des Zellkulturmediums für die primäre Kultur adulter Kardiomyozyten.

**Tabelle 20: 1X Control Solution**

<b>1000 ml Control Solution (1X)</b>	
Glucose	4,0 g
Control Solution (10X Stock)	100 ml
Aqua dest.	900 ml

**pH = 7,4 einstellen, steril filtern und bei 4 °C lagern**

**Tabelle 20** Zusammensetzung der 1X Control Solution für die Isolation adulter Kardiomyozyten.

**Tabelle 21: Enzyme Solution**

<b>150 ml Enzyme Solution</b>	
Collagenase Type II	75 mg
Protease	9 mg
100 mM Calcium Stock	20 µl
Control Solution-BSA	150 ml

**steril filtern**

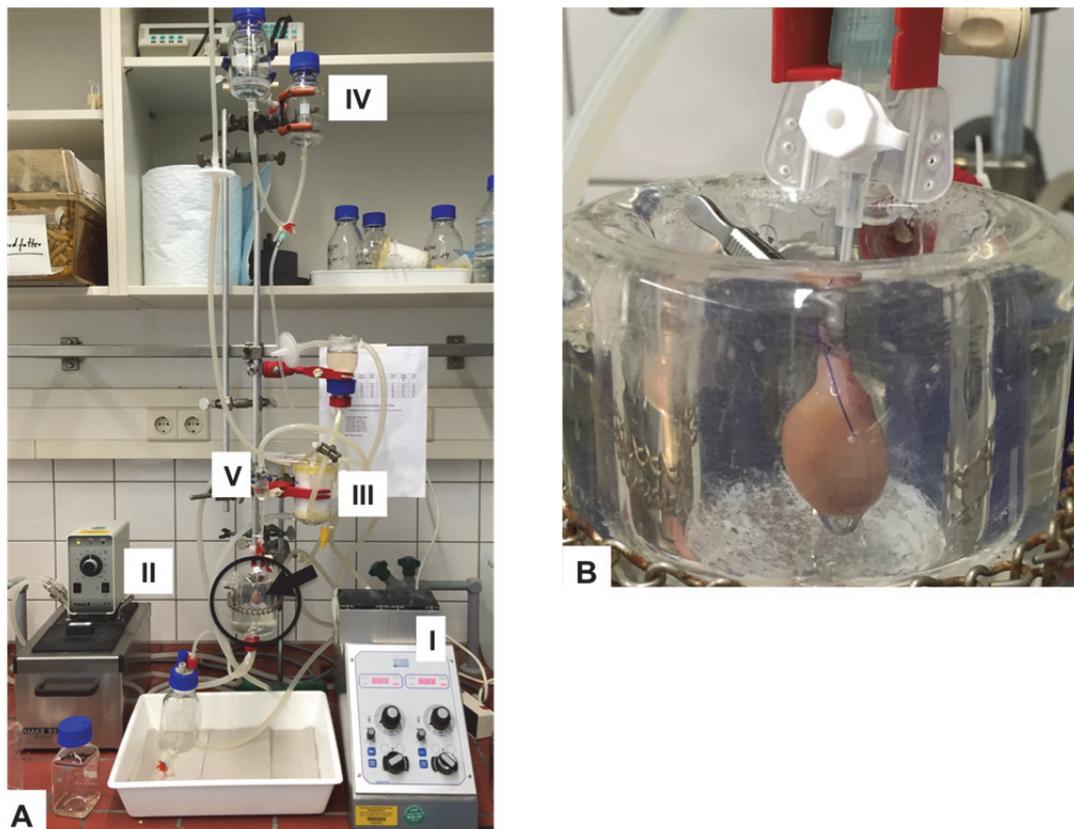
**Tabelle 21** Zusammensetzung der Enzymlösung für die Perfusion der Rattenherzen.

Um die Zellhaftung zu verbessern, wurden die Zellkulturplatten mit Laminin, in einer Konzentration von 20 µg/ml gelöst in DPBS, beschichtet.

Die Explantation wurde ebenfalls modifiziert. Nachdem die Tiere mit 750 µl/kg KG Pentobarbital anästhesiert wurden und keine Schmerzreflexe mehr auszulösen waren,

wurde zunächst mit einer zwei cm langen, medianen Laparatomie die Abdominalhöhle eröffnet und die Gefäße des Retroperitoneums dargestellt. Nun wurde dem Tier über die Vena cava inferior 300 i.E./kg KG Heparin verabreicht. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurden im Folgenden zunächst die großen Abdominalgefäße durchtrennt, umgehend der Thorax eröffnet und das Herz präpariert. Die Aorta wurde auf Höhe des Pars descendens entnommen, die verbliebenen Gefäße herznah abgesetzt. Nun wurde das Herz in eine Petrischale mit eisgekühlter *Control Solution-BSA* überführt. Die Aorta wurde auf einem 17 Gauge Venenverweilkatheter aufgefädelt und proximal der Gefäßabgänge mit einem chirurgischen Faden der Stärke USP 4.0 fixiert. Am weiteren Vorgehen wurden keine Änderungen vorgenommen. So wurden adulte Rattenkardiomyozyten isoliert und kultiviert, um sie in *in vitro*-Experimenten weiterführend zu untersuchen (Abb. 6).

**Abbildung 6: Zellisolation mit Langendorff-Anlage**



**Abb. 6** Zellisolation: **A** Langendorff-Anlage: (O) Perfusionsskammer, (➔) Herz, (I) Rollerpumpe, (II) temperaturreguliertes Wasserbad, (III) Membranoxygenator, (IV) Perfusionslösungen, (V) Blasenfang; **B** Nahaufnahme Herzperfusion.

### 2.1.2.7 Assays adulter Kardiomyozyten

Zur näheren Untersuchung der kultivierten Kardiomyozyten wurden zwei verschiedene Assays angewendet. Um die intrazellulär entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies in der adulten Primärkultur aus Kardiomyozyten zu bestimmen, wurde mit am Vortag isolierten und kultivierten Kardiomyozyten ein *CellROX-Assay* (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Stimulantien im Medium gelöst, die Wells der 96-Well-Zellkulturplatten abgesaugt und mit je 100 µl der auf 37 °C vorgewärmten Mischung aus Stimulanz und Medium bedeckt (Tabelle 22). Es erfolgte eine vierstündige Inkubation im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid.

**Tabelle 22: Stimulanzen der Kardiomyozyten-Assays**

<b>Gruppe</b>	<b>Stimulanz</b>	<b>Lösungsmittel</b>
Kontrolle		
DMSO		20 µl DMSO
Menadione	100 µM Menadione	20 µl DMSO
SOD1	100 U/ml SOD1	20 µl DMSO

**Tabelle 22** Die Zellen wurden für jeweils vier Stunden mit den entsprechenden Stimulanzen inkubiert, ehe mit dem CellROX Assay (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) die entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies sowie mit dem DAF-FM Assay (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) der Level an Stickstoffmonoxid in den Zellen bestimmt wurde.

Währenddessen wurden 15 ml HBSS mit 30 µl *CellROX Deep Red Reagent* versetzt und im Wasserbad vorgewärmt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Wells abgesaugt und mit je 100 µl der HBSS-*CellROX*-Lösung bedeckt. Es erfolgte eine erneute Inkubation von 20 Minuten im Zellkulturinkubator. Anschließend wurden die Wells abgesaugt und zunächst mit HBSS gespült, ehe sie mit 100 µl HBSS bedeckt wurden. Es erfolgte die Messung im auf 37 °C vorgewärmten *Plate Reader*. Hierbei wurde für 30 Minuten im Abstand von je zwei Minuten eine Kinetik gemessen. Die Anregung der Zellen erfolgte mit einer Wellenlänge von 655 nm, die Emission wurde bei 644 nm detektiert.

Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration an Stickstoffmonoxid in den kultivierten Kardiomyozyten wurde ein *DAF-FM Assay* (Molecular Probes Inc.,

Eugene, OR, USA) durchgeführt. Dieses erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie das *CellROX-Assay*. Jedes Well wurde nun jedoch mit je 100 µl HBSS-*DAF-FM*-Lösung (20 µl *DAF-FM Diacetate* in 15 ml HBSS) inkubiert. Die kinetische Messung im *Plate Reader* erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm. Aufgrund des Wellenlängenunterschiedes gegenüber dem CellROX Assay wurden beide Assays im Rahmen eines sogenannten *Multiplexings* gleichzeitig durchgeführt.

Um die Messwerte eines Wells auf den Proteingehalt normieren zu können, wurden die Zellen lysiert. Hierfür wurde zu jedem Well 100 µl RIPA-Puffer dazugegeben (Tabelle 23). Die Zellkulturplatten wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurde eine Proteinbestimmung mittels *Bradford Assay* (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) durchgeführt.

**Tabelle 23: RIPA-Puffer**

<b>RIPA-Puffer</b>	
Natriumchlorid	1,752 g
IGEPAL CA 630	2 ml
DOC	1 g
20 % Natriumlaurylsulfat in Aqua dest.	1 ml
1,5 M Tris Base pH = 8,0	6,67 ml
<b>Mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen</b>	

**Tabelle 23** Zusammensetzung des RIPA-Puffers für die Lyse kultivierter Kardiomyozyten im Rahmen der Proteinbestimmung mittels Bradford Assay.

Zur Auswertung wurde der Bereich des linearen Anstiegs der Emissionswerte bestimmt. Für diesen Zeitabschnitt wurde nun der erfolgte Gesamtanstieg ermittelt und für die einzelnen Versuchsgruppen die Mittelwerte bestimmt. Diese wurden auf die jeweilige durchschnittliche Proteinmenge der Wells einer Versuchsgruppe normiert. Somit konnte intrazellulär der Level an reaktiven Sauerstoffspezies sowie an Stickstoffmonoxid in primären Rattenkardiomyozyten gemessen werden, um die Zellen somit näher zu untersuchen.

### **2.1.2.8 Western Blot adulter Kardiomyozyten**

Damit Western Blots mit Kardiomyozyten durchgeführt werden können, müssen diese zunächst isoliert werden. Die Isolation der Kardiomyozyten erfolgte äquivalent zu den Zellassays. Anschließend wurden die Zellen jedoch nicht kultiviert. Es wurden 1,5 Millionen Zellen in 1 ml Medium resuspendiert und als Suspension in Mikroreaktionsgefäße gegeben. Die Deckel dieser Röhrchen wurden zuvor perforiert, um eine Ventilation zu ermöglichen. Anschließend wurden die Röhrchen im Zellinkubator für vier Stunden hypoxisch bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 1 % O<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrollgruppe wurden Zellen in Suspension für vier Stunden normoxisch bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 21 % O<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die Zellröhrchen für 5 Minuten bei 250 G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpalett in 250 µl M-PER Puffer (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) mit Protease- und Phosphataseinhibitoren lysiert. Das Zelllysat wurde nun per Ultraschall mit einer Frequenz von 70 Hz homogenisiert und für 15 Minuten bei 15.000 G zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Die anschließende Proteinbestimmung sowie die Durchführung des Western Blots erfolgten nach dem oben beschriebenen Protokoll (2.1.2.4 Western Blot-Analyse der Organproben).

### **2.1.2.9 Statistische Auswertung**

Um die Aussagekraft der einzelnen Experimente statistisch zu belegen, erfolgte eine computerunterstützte Auswertung der Messergebnisse. Sofern nicht im jeweiligen Methodenkapitel gesondert beschrieben, wurden die gesammelten Rohdaten in das Programm Prism 6 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) übertragen. Mithilfe von Prism 6 wurden jeweils die Mittelwerte, der Standardfehler sowie die Standardabweichung der einzelnen Messgruppen berechnet. Die Grafiken und Daten in dieser Arbeit geben Mittelwerte und Standardfehler an beziehungsweise zeigen *Boxplots* vom Minimum zum Maximum. Im Text werden Mittelwerte mit Standardabweichung genannt. Zur Überprüfung statistisch signifikanter Gruppenunterschiede wurden die Daten durch Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Statistische Signifikanz wurde ab p-Wert < 0,05 angenommen.

## 2.2 Der Kalziumsensitizer Levosimendan

### 2.2.1 Materialien

#### 2.2.1.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden entsprechend der geltenden Tierschutz-Versuchstierverordnung durchgeführt und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) mit dem Aktenzeichen: 84-02.04.2013A436 genehmigt. Die verwendeten Versuchstiere wurden von *Janvier Labs* (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen und in der zentralen Tierforschungseinrichtung des Universitätsklinikum Düsseldorf unter Standard-Laborbedingungen gehalten und mit Wasser und Futter *ad libitum* versorgt [61].

**Tabelle 24: Versuchsgruppen**

Versuchsgruppe	Gruppengröße
Vehikelkontrolle	n = 5
Levosimendan	n = 4

**Tabelle 24** Übersicht über die beiden Versuchsgruppen und die entsprechenden Gruppengrößen.

#### 2.2.1.2 Ausschlusskriterien

Für diese Versuche wurden erneut die im Kapitel 2.1.1.2 formulierten Kriterien angewandt. Insgesamt wurden drei Tiere aus kardialen Ursachen und jeweils eins aufgrund von Problemen mit der Kühlung respektive Anästhesie nicht in die Auswertung eingeschlossen [61].

#### 2.2.1.3 Ergänzungen

Für die Durchführung der Versuche und Analysen wurden dieselben Materialien wie bereits in den Kapiteln 2.1.1.3 bis 2.1.1.9 beschrieben verwendet. Zusätzlich benötigte Materialien sind in Tabelle 25 aufgeführt [61].

**Tabelle 25: Ergänzungen Materialien**

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Referenz</b>
Levosimendan (Simdax®) p38 MAPK Antibody	Orion Pharma GmbH Cell Signaling Technology, Inc.	PZN 9923605 9212
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody	Cell Signaling Technology, Inc.	9211
Povidone	Sigma-Aldrich Co. LLC.	P2472-50G
Sodium citrate	Sigma-Aldrich Co. LLC.	1618859-1G

**Tabelle 25** Zusätzliche Materialien im Levosimendanprojekt. Die darüberhinaus verwendeten Materialien und Geräte sind in den Kapiteln 2.1.1.3 bis 2.1.1.9 beschrieben.

## **2.2.2 Methoden**

### **2.2.2.1 *in-vivo* Ratten-EKZ mit DHCA**

Zur Indizierung der I/R-Schädigung wurde das im Kapitel 2.1.2.1 beschriebene und in der Arbeitsgruppe etablierte EKZ-Modell mit DHCA angewendet [28, 61, 80-82]. Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 400 und 500 g verwendet. Nachdem die entsprechenden Gefäße wie beschrieben kanüliert waren, wurde entweder 12 µg/kg KG Levosimendan (Levosimendan) in 500 µl 0,9 % NaCl oder die äquivalente Menge Vehikellösung (Vehikelkontrolle) mit einem Jugularvenenperfusor über den Zeitraum von 5 Minuten kontinuierlich appliziert. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit von Levosimendan wurde dieses zuvor gelöst (Tabelle 26). Die Medikamentenlösung orientiert sich am entsprechenden Patent des klinisch verwendeten Medikamentes Simdax® (US Patent 6730673). Anschließend wurden die Tiere an die HLM angeschlossen und die EKZ gestartet. Während der Versuche wurden zu sechs Zeitpunkten Blutuntersuchungen durchgeführt ( $t_A$ : Kanülierung,  $t_B$ : EKZ-Beginn,  $t_C$ : 25 °C Kühlung,  $t_D$ : 20 °C Wiedererwärmung,  $t_E$ : 35 °C Wiedererwärmung,  $t_F$ : Euthanasie) [61].

**Tabelle 26: Zusammensetzung der Levosimendan- und Vehikellösung**

Levosimendan		Vehikel	
Levosimendan	1,25 mg		
Povidone	10 mg	Povidone	10 mg
Citrat	2 mg	Citrat	2 mg
Ethanol	1 ml	Ethanol	1 ml
<b>12 µg/kg KG Levosimendan in 500 µl NaCl 0,9 % verdünnen</b>			

**Tabelle 26** Bestandteil der applizierten Medikamentenlösung (Levosimendan) respektive des Vehikels (Vehikelkontrolle).

### 2.2.2.2 Western Blot

Um mögliche Einflüsse der Levosimendantherapie auf den Proteingehalt im Herzgewebe zu untersuchen, wurden Western Blots durchgeführt. Methodisch wurde dabei analog zu Kapitel 2.1.2.4 verfahren. Tabelle 27 gibt einen Überblick über die verwendeten Antikörperkonzentrationen und –inkubationszeiten [61].

**Tabelle 27: Western Blot Antikörper**

Erstantikörper	Konz.	Zweitantikörper	Konz.	Inkubation
pSTAT3 CS #9145	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
tSTAT3 CS #4904	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
pAKT CS #4060	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
AKT (pan) CS #4691S	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
PARP CS #9532	1:1000 in 5 % BSA- TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
p-p38 MAPK CS #9211	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min
p38 MAPK CS #9212	1:500 in 5 % BSA-TBST	Dianova #111-035-003	1:5000 in 5 % Milch-TBST	60 min

**Tabelle 27** Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten beim Western Blot.

### 2.2.2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung orientiert sich an der bereits beschriebenen Methodik (Abschnitt 2.1.2.9). Um die statistische Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen, wurde zusätzlich die Effektstärke nach Cohen berechnet sowie eine Poweranalyse durchgeführt [61].

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die extrazelluläre Superoxiddismutase

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden zu großen Teilen in der zugehörigen Publikation von Pinto *et al.* [82] veröffentlicht. Zur Erleichterung des Leseflusses wurde darauf verzichtet nach jedem Ergebnis einzeln auf die Publikation zu verweisen. Stattdessen sind die entsprechenden Ergebnisse abschnittsweise als Zitat gekennzeichnet.

#### 3.1.1 Vitalparameter

Während des gesamten Versuches wurden die Vitalparameter Herzfrequenz, arterieller Blutdruck, Körpertemperatur sowie die periphere Sauerstoffsättigung mit einem Monitor überwacht. Die gemessenen Vitalparameter wurden protokolliert (6.1 EKZ Protokoll). Zum Beginn der Operation ( $t_1$ ) betrug die Herzfrequenz im Mittel  $HF = 273 \pm 28$  /min in der SOD3-kompetenten Kontrollgruppe und  $HF = 266 \pm 44$  /min in der SOD3-E124D-Gruppe (Abb. 7). Mit Beginn der EKZ und während der Kühlung fiel die Herzfrequenz in beiden Gruppen bis zum Beginn des DHCA ab. Bei verminderter SOD3-Aktivität geschah dieser Abfall jedoch insgesamt vergleichsweise schneller ( $t_3$ : SOD3-kompetente Kontrolle  $HF = 254 \pm 35$  /min;  $t_3$ : SOD3-E124D  $HF = 199 \pm 67$  /min) (Abb. 7). Nach Beendigung des hypothermen Kreislaufstillstands stieg die Herzfrequenz während der Wiedererwärmung wie geplant in beiden Gruppen an. Die SOD3-kompetente Kontrollgruppe erreichte hierbei eine mittlere Frequenz von bis zu  $HF = 201 \pm 61$  /min und damit rund 74 % ihres ursprünglichen physiologischen Ausgangswertes vor Versuchsbeginn. Bei vorliegendem Defizit in der SOD3-Aktivität

wurde jedoch lediglich eine mittlere maximale Frequenz von  $HF = 177 \pm 75$  /min und damit 67 % des Ausgangswertes erreicht (Abb. 7). Während der Reperfusionphase blieb die Herzfrequenz in der Kontrollgruppe annähernd konstant. Sie war bei Euthanasie mit  $HF = 177 \pm 43$  /min um  $HF = 46$  /min (35 %) höher als in der Gruppe mit verminderter Enzymaktivität und lag damit bei 65 % ihres ursprünglichen Wertes (Abb. 7). In der SOD3-inkompetenten Gruppe fiel die Herzfrequenz mit zunehmender Reperfusiondauer ab. Zum Zeitpunkt der Euthanasie betrug die mittlere Herzfrequenz nur noch  $HF = 131 \pm 74$  /min. Dies entsprach 49 % des Wertes zum Operationsbeginn [82].

Abbildung 7: Verlauf der Herzfrequenz während des Versuchs

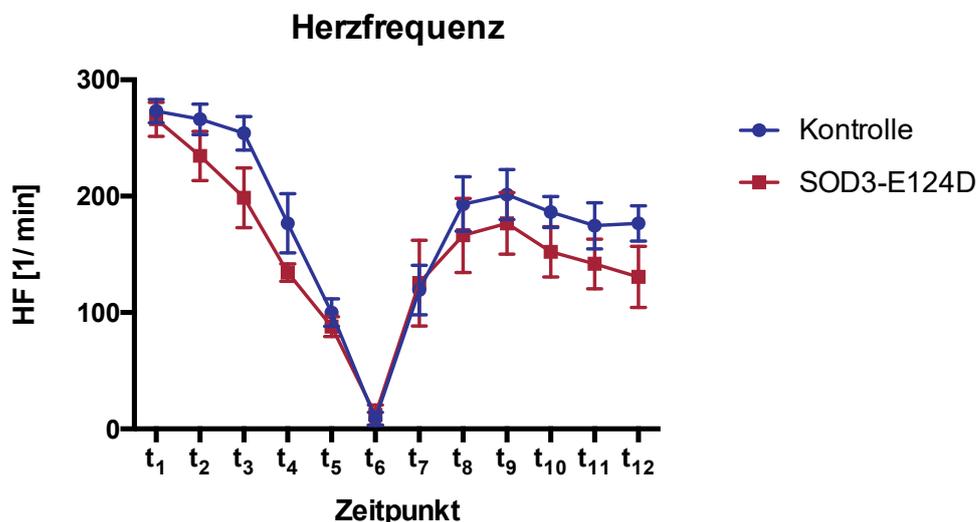
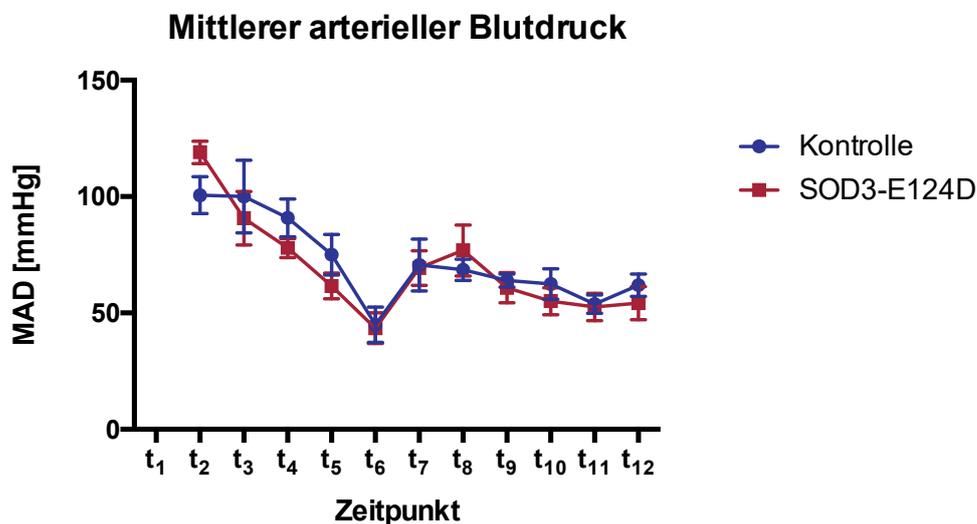


Abb. 7 Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle,  $n = 8$ ; SOD3-E124D,  $n = 9$ ) die Herzfrequenz mit einem Monitor überwacht (t<sub>1</sub>: vor Kanülierung, t<sub>2</sub>: Kanülierung, t<sub>3</sub>: EKZ-Beginn, t<sub>4</sub>: 15 min Kühlung, t<sub>5</sub>: 25 min Kühlung, t<sub>6</sub>: Kreislaufstillstand, t<sub>7</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>8</sub>: 27,5 °C Wiedererwärmung, t<sub>9</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>10</sub>: 15 min Reperfusion, t<sub>11</sub>: 45 min Reperfusion, t<sub>12</sub>: vor Euthanasie) [82].

Der MAD ähnelte in seinem Verlauf dem Bild der Herzfrequenz; auch er fiel während des Versuches in beiden Gruppen ab (Abb. 8). Verminderte SOD3-Aktivität resultierte jedoch zu OP-Beginn zunächst in einem im Durchschnitt um  $MAD = 18$  mmHg (18 %) erhöhten arteriellen Mitteldruck (t<sub>2</sub>, Abb. 8). Dieser Druck fiel jedoch schneller ab als in der SOD3-kompetenten Kontrollgruppe (t<sub>4</sub>: SOD3-kompetente Kontrolle  $MAD = 91 \pm$

21 mmHg;  $t_4$ : SOD3-E124D MAD =  $78 \pm 11$  mmHg). Im weiteren Verlauf zeigten sich bedingt durch medikamentöse Interventionen (insbesondere Vasopressorengabe) nur geringe Gruppenunterschiede im mittleren arteriellen Blutdruck (Abb. 8). Vor Euthanasie betrug der durchschnittliche MAD in SOD3-kompetenten Tieren MAD =  $62 \pm 13$  mmHg und damit 61 % des Ausgangswertes. In Tieren mit verminderter SOD3-Aktivität betrug der durchschnittliche MAD zum gleichen Zeitpunkt MAD =  $54 \pm 21$  mmHg, dies entspricht 45 % des Wertes zu Versuchsbeginn. Obwohl sich insgesamt weder in der Herzfrequenz noch im MAD signifikante Gruppenunterschiede zeigen konnten, erschien eine verminderte SOD3-Aktivität mit einer tendenziellen Verschlechterung des kardialen Outcomes nach EKZ vergesellschaftet zu sein. So lagen zum Zeitpunkt der Euthanasie sowohl Herzfrequenz als auch MAD in der SOD3-E124D-Gruppe unterhalb der SOD3-kompetenten Kontrollen. Insbesondere im Vergleich mit den ursprünglichen Ausgangsparametern vor Versuchsbeginn zeigte sich in Tieren mit verminderter SOD3-Aktivität ein negativer Trend. Dieser schien sich mit zunehmender Dauer der Reperfusionzeit zu verstärken [82].

Abbildung 8: Verlauf des Blutdruck während des Versuchs

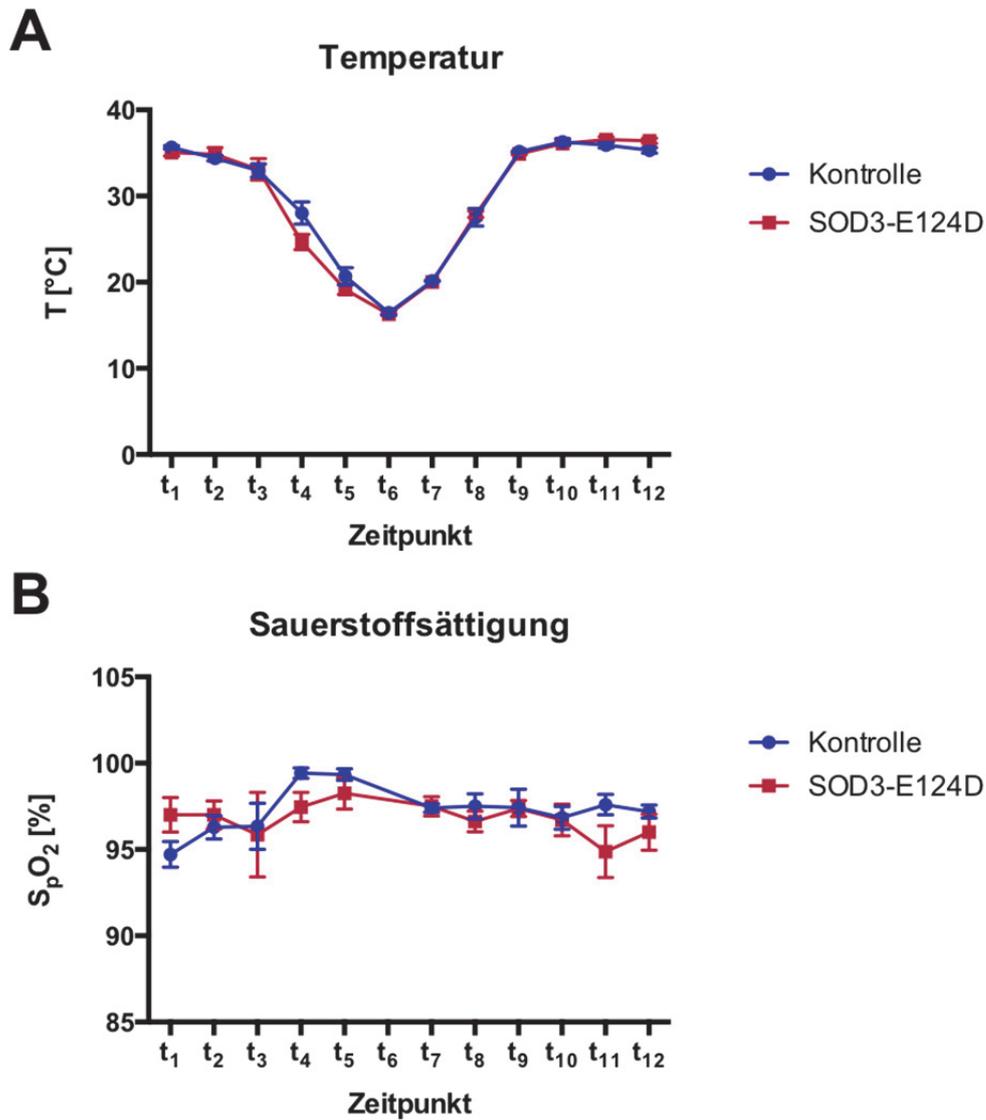


**Abb. 8** Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D, n = 9) der mittlere arterielle Blutdruck mit einem Monitor überwacht (t<sub>1</sub>: vor Kanülierung, t<sub>2</sub>: Kanülierung, t<sub>3</sub>: EKZ Beginn, t<sub>4</sub>: 15 min Kühlung, t<sub>5</sub>: 25 min Kühlung, t<sub>6</sub>: Kreislaufstillstand, t<sub>7</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>8</sub>: 27,5 °C Wiedererwärmung, t<sub>9</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>10</sub>: 15 min Reperfusion, t<sub>11</sub>: 45 min Reperfusion, t<sub>12</sub>: vor Euthanasie) [82].

Die rektal gemessene Körpertemperatur lag vor EKZ in beiden Gruppen im Normbereich und fiel wie geplant bis zum DHCA auf  $T = 16 \text{ }^\circ\text{C}$  ab (Abb. 9A). Anschließend erreichten beide Gruppen wieder die reguläre Körpertemperatur von  $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Körpertemperatur im Versuchsverlauf. Die periphere Sauerstoffsättigung blieb pulsoxymetrisch gemessen am linken Hinterlauf zu jedem Messzeitpunkt über  $S_p\text{O}_2 = 90 \text{ } \%$  (Abb. 9B). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Während des gesamten Versuchs konnten die Vitalparameter überwacht werden. Unterschiede zwischen den Gruppen ließen sich zum Versuchsbeginn im Bezug auf Herzfrequenz und Blutdruck feststellen. Im weiteren Versuchsverlauf zeigten sich erneut Unterschiede in diesen beiden Parametern. Die Körpertemperatur, welche durch den Versuchsalgorithmus vorgegeben war, zeigte keinerlei, möglicherweise interferierende, Unterschiede im Gruppenvergleich. Gleiches gilt für die periphere Sauerstoffsättigung.

Abbildung 9: Verlauf der Temperatur und der Sauerstoffsättigung während des Versuchs

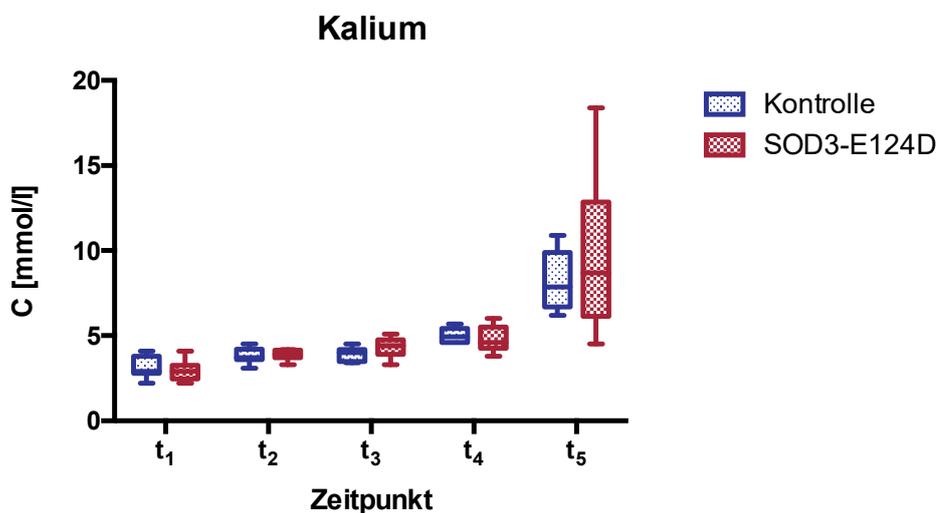


**Abb. 9** Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D, n = 9) die rektale Körpertemperatur (A) und die periphere Sauerstoffsättigung (B) mit einem Monitor überwacht (t<sub>1</sub>: vor Kanülierung, t<sub>2</sub>: Kanülierung, t<sub>3</sub>: EKZ Beginn, t<sub>4</sub>: 15 min Kühlung, t<sub>5</sub>: 25 min Kühlung, t<sub>6</sub>: Kreislaufstillstand, t<sub>7</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>8</sub>: 27,5 °C Wiedererwärmung, t<sub>9</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>10</sub>: 15 min Reperfusion, t<sub>11</sub>: 45 min Reperfusion, t<sub>12</sub>: vor Euthanasie).

### 3.1.2 Intraoperative Blutgasanalyse

Zur Überwachung der Laborwerte wurden zu fünf Zeitpunkten Blutgasanalysen durchgeführt und Blutproben zur späteren Analyse abgenommen. Die Messungen erfolgten zu den Zeitpunkten  $t_1$  (Kanülierung),  $t_2$  (25 °C Abkühlung),  $t_3$  (20 °C Wiedererwärmung),  $t_4$  (35 °C Wiedererwärmung) und  $t_5$  (Euthanasie). Als Marker für ischämische Zell- und Gewebeschädigung wurden Kalium- und Laktatkonzentration im Plasma bestimmt. Zum Zeitpunkt  $t_1$  war die mittlere Kaliumkonzentration im Plasma beider Versuchsgruppen normwertig und betrug  $C_{\text{Kalium}} = 3,07 \pm 0,65$  mmol/l (SOD3-kompetente Kontrolle) respektive  $C_{\text{Kalium}} = 2,91 \pm 0,59$  mmol/l (SOD3-E124) (Abb. 10). Während der Reperfusionphase stieg die Kaliumkonzentration in beiden Gruppen stark an und betrug zum Zeitpunkt  $t_5$  im Mittel  $C_{\text{Kalium}} = 8,2 \pm 1,69$  mmol/l (SOD3-kompetente Kontrolle) sowie  $C_{\text{Kalium}} = 9,70 \pm 4,57$  mmol/l (+ 18 %) (SOD3-E124D) (Abb. 10). Die Kaliumkonzentration lag damit in beiden Gruppen deutlich über dem physiologischen Normwerten. Verglichen mit den Ausgangswerten zeigte sich eine Steigerung der Kaliumkonzentration um 167 % (SOD3-kompetente Kontrolle,  $p = 0,0003$ ) respektive 233 % (SOD3-E124D,  $p < 0,0001$ ) [82].

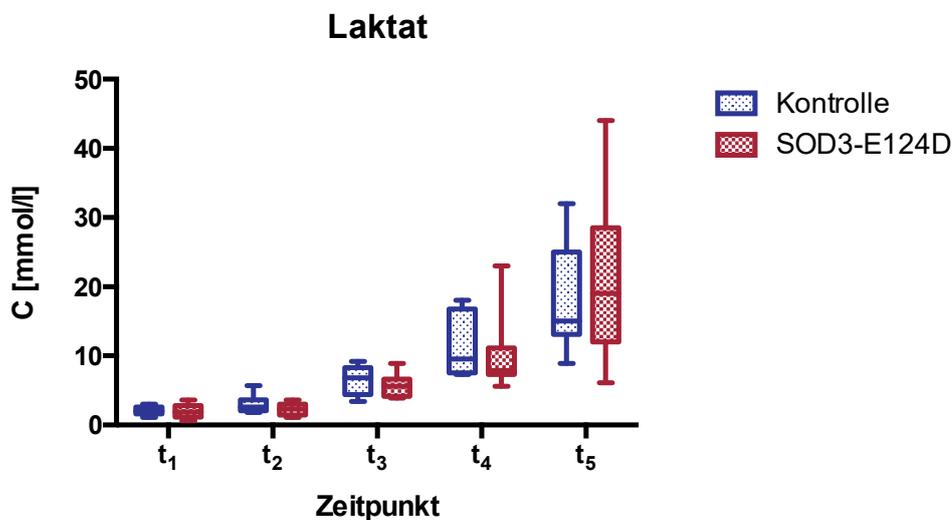
Abbildung 10: Verlauf der Kaliumkonzentration im Plasma



**Abb. 10** Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle,  $n = 8$ ; SOD3-E124D,  $n = 9$ ) die Plasmakonzentration von Kalium durch Blutgasanalysen überwacht ( $t_1$ : Kanülierung,  $t_2$ : 25 °C Kühlung,  $t_3$ : 20 °C Wiedererwärmung,  $t_4$ : 35 °C Wiedererwärmung,  $t_5$ : vor Euthanasie) [82].

Die Laktatkonzentration im Plasma war zum Zeitpunkt  $t_1$  mit  $C_{\text{Laktat}} = 2,04 \pm 0,66$  mmol/l (SOD3-kompetente Kontrolle) und  $C_{\text{Laktat}} = 1,96 \pm 0,98$  mmol/l (SOD3-E124D) in beiden Gruppen physiologisch und annähernd identisch (Abb.11). Während der Reperfusionphase kam es in beiden Gruppen zu einem Anstieg der Laktatkonzentration. Dieser Anstieg erfolgte zunächst verstärkt in den SOD3-kompetenten Kontrollen ( $t_4$ : SOD3-kompetente Kontrolle:  $C_{\text{Laktat}} = 11,61 \pm 4,62$  mmol/l;  $t_4$ : SOD3-E124D:  $C_{\text{Laktat}} = 10,13 \pm 5,18$  mmol/l). Zum Zeitpunkt  $t_5$  zeigte sich in der SOD3-E124D Gruppe abschließend eine Laktatkonzentration von durchschnittlich  $C_{\text{Laktat}} = 20,9 \pm 11,62$  mmol/l und damit 15 % mehr als der Vergleichswert der SOD3-kompetenten Kontrollgruppe (Abb. 11). Die Laktatkonzentration lag damit zum Zeitpunkt der Euthanasie in beiden Gruppen in erheblichem Maße außerhalb ihres physiologischen Normbereiches und hatte sich im Verlauf des Experimentes mehr als verachtfacht [82].

**Abbildung 11: Verlauf der Laktatkonzentration im Plasma**



**Abb. 11** Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle,  $n = 8$ ; SOD3-E124D,  $n = 9$ ) die Plasmakonzentration von Laktat durch Blutgasanalysen überwacht ( $t_1$ : Kanülierung,  $t_2$ : 25 °C Kühlung,  $t_3$ : 20 °C Wiedererwärmung,  $t_4$ : 35 °C Wiedererwärmung,  $t_5$ : vor Euthanasie) [82].

Die durchschnittliche arterielle Sauerstoffsättigung betrug in beiden Gruppen zu jedem Zeitpunkt mindestens  $S_aO_2 = 97\%$  (Abb. 12). Es zeigten sich über den gesamten Versuchsverlauf keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Abbildung 12: Verlauf der arteriellen Sauerstoffsättigung während des Versuchs

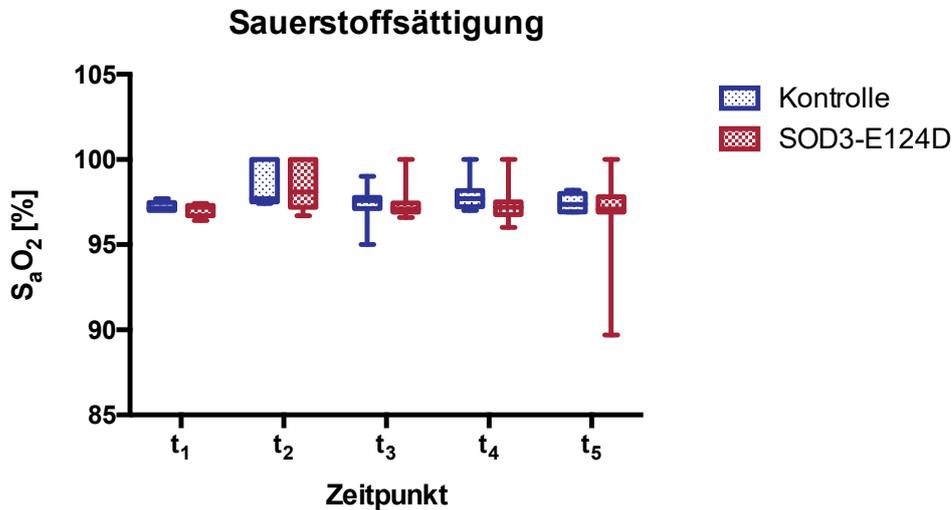
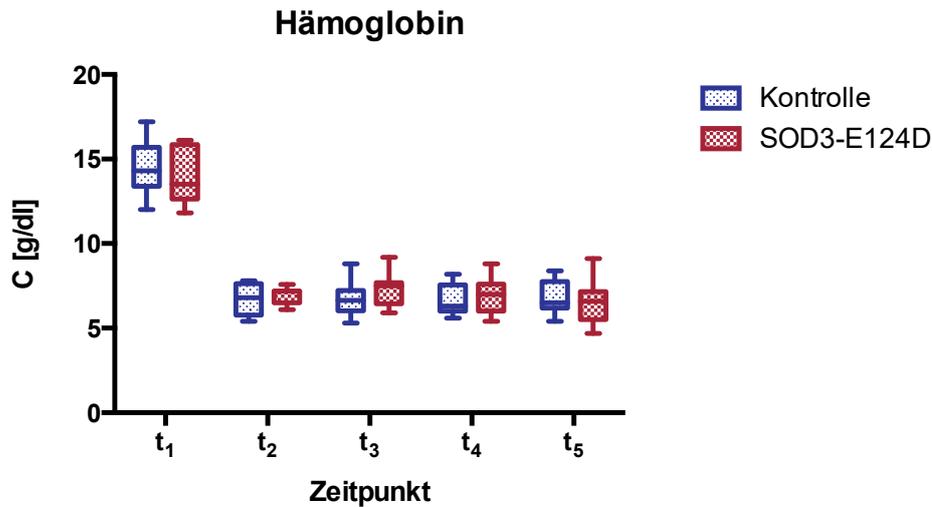


Abb. 12 Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle,  $n = 8$ ; SOD3-E124D,  $n = 9$ ) die arterielle Sauerstoffsättigung durch Blutgasanalysen überwacht (t<sub>1</sub>: Kanülierung, t<sub>2</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>3</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>4</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>5</sub>: vor Euthanasie).

Die Hämoglobinkonzentration war in beiden Gruppen zu jedem Zeitpunkt ungefähr gleichwertig (Abb. 13). Aufgrund der Hämodilution durch das Priming der HLM mit HES fiel der Hämoglobinwert zwischen den Zeitpunkten t<sub>1</sub> und t<sub>2</sub> in beiden Gruppen von  $C_{Hb} = 14,51 \pm 1,68$  g/dl auf  $C_{Hb} = 6,73 \pm 1,18$  g/dl (SOD3-kompetente Kontrolle) respektive von  $C_{Hb} = 14,02 \pm 1,65$  g/dl auf  $C_{Hb} = 6,94 \pm 0,50$  g/dl (SOD3-E124D) (Abb. 13). Im weiteren Verlauf blieb die Hämoglobinkonzentration nahezu konstant. Zur Euthanasie betrug die durchschnittliche Hämoglobinkonzentration in der SOD3-kompetenten Kontrollgruppe  $C_{Hb} = 6,78 \pm 1,0$  g/dl sowie  $C_{Hb} = 6,58 \pm 1,28$  g/dl in der SOD3-E124D Gruppe. Es zeigte sich demnach in beiden Versuchsgruppen im Verlauf eine Abnahme der Hämoglobinkonzentration bedingt durch das Priming der HLM und die damit verbundene Hämodilution um 53 %. Zu keinem Zeitpunkt zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.

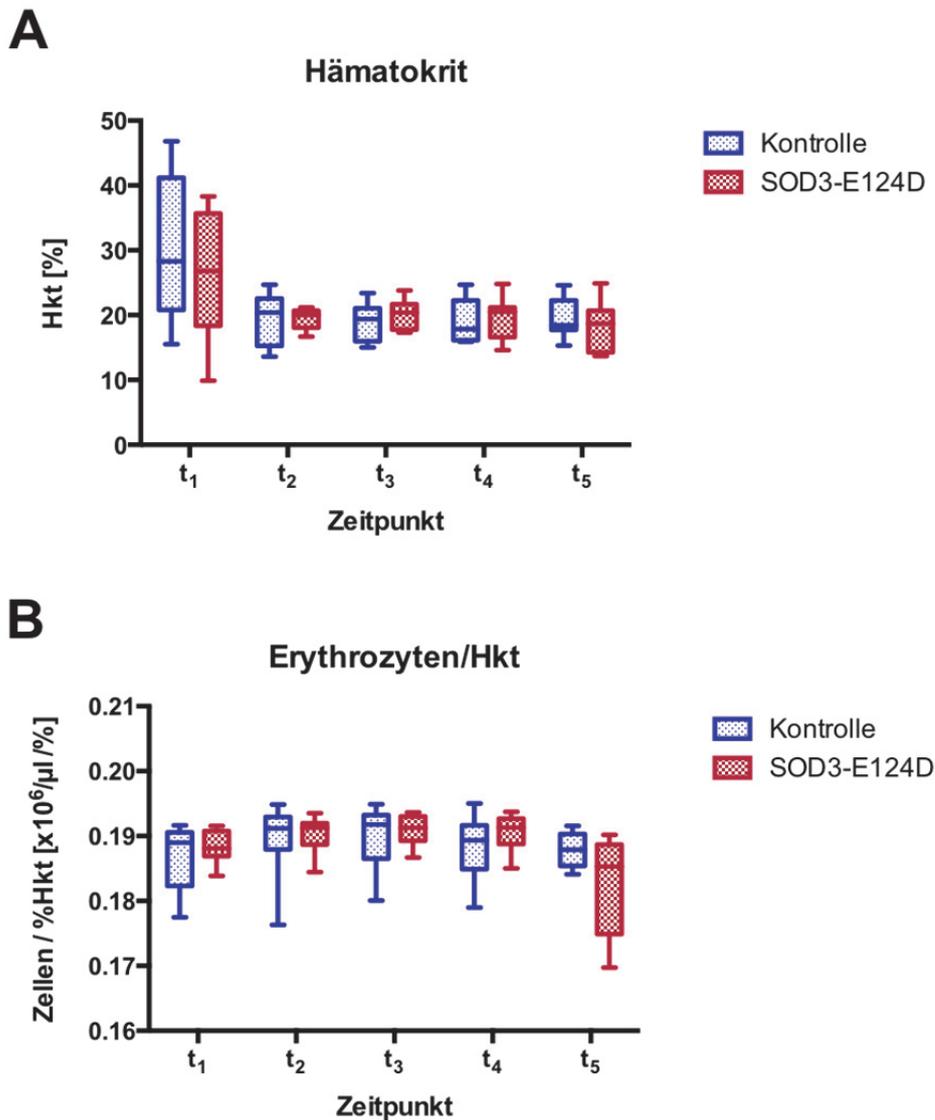
Abbildung 13: Verlauf der Hämoglobinkonzentration während des Versuchs



**Abb. 13** Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D, n = 9) der Hämoglobinwert durch Blutgasanalysen überwacht (t<sub>1</sub>: Kanülierung, t<sub>2</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>3</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>4</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>5</sub>: vor Euthanasie). Durch Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution.

Der Hämatokritwert verhielt sich aufgrund der Hämodilution äquivalent zur Hämoglobinkonzentration und fiel mit Beginn der EKZ in beiden Gruppen von ca. Hkt = 30 % auf ungefähr Hkt = 20 % ab (Abb. 14A). Im weiteren Verlauf blieb der Hämatokrit konstant und betrug zur Euthanasie in beiden Gruppen ungefähr Hkt = 19 %. Es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt statistische signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. Um die durch die Hämodilution bedingten Fehler in der Vergleichbarkeit der Zeitpunkte auszuschließen, wurden die Werte der zellulären Blutbestandteile auf den Hämatokritwert bezogen.

Abbildung 14: Verlauf des Hämatokrits und der Erythrozytenzahl im peripheren Blut

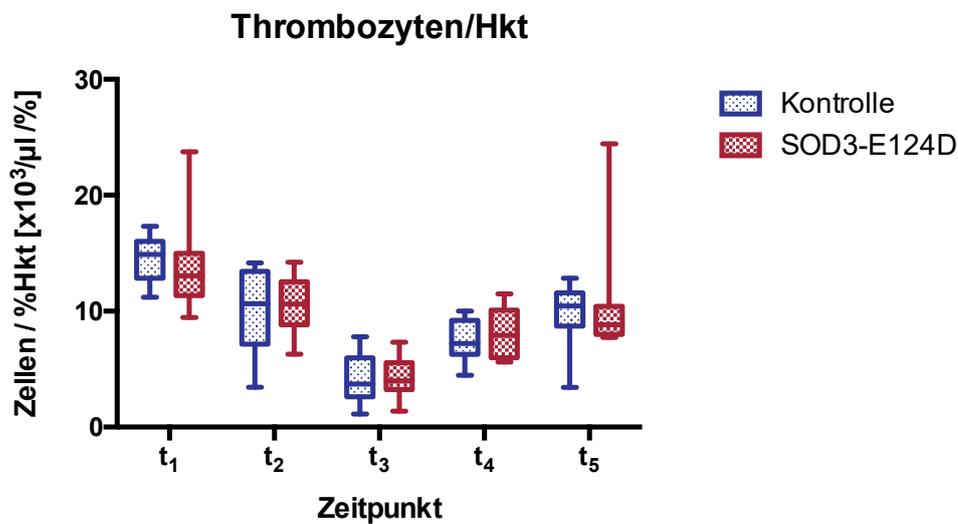


**Abb. 14** Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle; Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D, n = 9) der Hämatokrit (A) und die Erythrozytenzahl (B) durch Laboruntersuchungen überwacht (t<sub>1</sub>: Kanülierung, t<sub>2</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>3</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>4</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>5</sub>: vor Euthanasie). Durch Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Zeitpunkten zu gewährleisten, wurden die Werte der korpuskulären Blutbestandteile auf den Hämatokrit normiert.

Die Thrombozytenzahlen unterschieden sich zwischen den Gruppen nicht. Während der EKZ kam es jedoch zu einem Abfall auf Thrombozyten/Hkt =  $4,20 \times 10^3/\mu\text{l} / \%$  Hkt (Abb. 15). Dieser wurde während der anschließenden Wiedererwärmung und

Reperfusionphase teilweise kompensiert. Dieser Anstieg erfolgte in beiden Gruppen ähnlich. Zum Zeitpunkt  $t_5$  wurden Thrombozyten/Hkt =  $9,797 \pm 2,902 \times 10^3/\mu\text{l} /\% \text{Hkt}$  (SOD3-kompetente Kontrolle) respektive Thrombozyten/Hkt =  $10,804 \pm 5,593 \times 10^3/\mu\text{l} /\% \text{Hkt}$  Thrombozyten (SOD3-E124D) im Blut gemessen (Abb. 15). Dies entsprach 68 % (SOD3-kompetente Kontrolle) respektive 77 % (SOD3-E124D) des Ausgangswertes vor EKZ.

**Abbildung 15: Verlauf der Thrombozytenzahl im peripheren Blut**

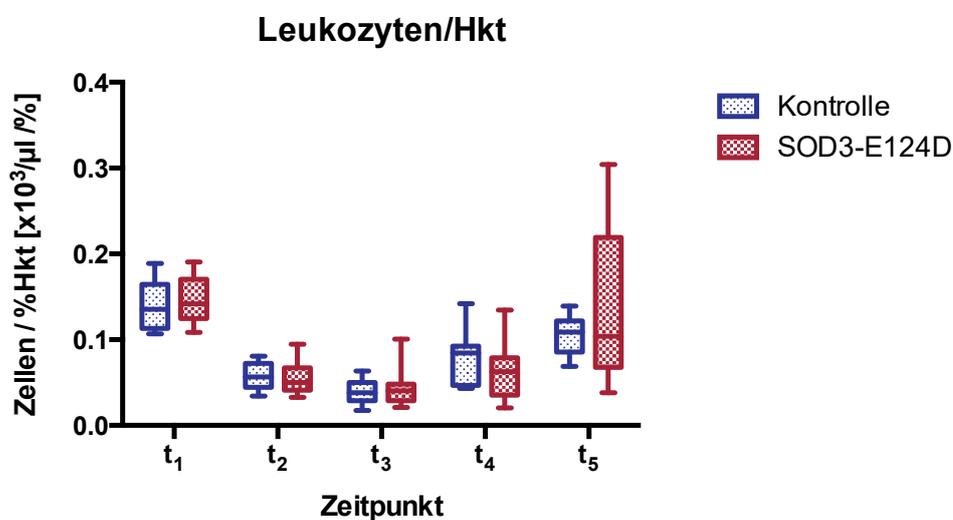


**Abb. 15** Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D, n = 9) die Thrombozytenzahl durch Laboruntersuchungen überwacht ( $t_1$ : Kanülierung,  $t_2$ : 25 °C Kühlung,  $t_3$ : 20 °C Wiedererwärmung,  $t_4$ : 35 °C Wiedererwärmung,  $t_5$ : vor Euthanasie). Durch Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Zeitpunkten zu gewährleisten, wurden die Werte der korpuskulären Blutbestandteile auf den Hämatokrit normiert.

Auch die Leukozytenzahl fiel zunächst deutlich auf 30 % des Ausgangswertes in beiden Gruppen ab (Abb. 16). Es zeigten sich bis zum Zeitpunkt  $t_3$  keine Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen ( $t_3$ : SOD3-kompetente Kontrolle: Leukozyten/Hkt =  $0,039 \pm 0,014 \times 10^3/\mu\text{l} /\% \text{Hkt}$ ;  $t_3$ : SOD3-E124D: Leukozyten/Hkt =  $0,043 \pm 0,024 \times 10^3/\mu\text{l} /\% \text{Hkt}$ ). Mit zunehmender Dauer der Reperfusionphase stieg die Zahl der Leukozyten deutlich an. Zum Zeitpunkt der Euthanasie ergab sich eine durchschnittliche Anzahl an

Leukozyten/Hkt =  $0,105 \pm 0,023 \times 10^3/\mu\text{l} /\% \text{ Hkt}$  im Blutbild der SOD3-kompetenten Kontrollen. Dies entspricht 74 % des Ausgangswertes. Im Blutbild der SOD3-defizienten Tieren stieg die Anzahl an Leukozyten stärker an. Zum Zeitpunkt  $t_5$  zeigten sich im Mittel Leukozyten/Hkt =  $0,135 \pm 0,098 \times 10^3/\mu\text{l} /\% \text{ Hkt}$  und damit 92 % des Ausgangswertes. Damit war die Leukozytenzahl in den Tieren mit verminderter SOD3-Aktivität um 29 % gegenüber den SOD3-kompetenten Kontrollen erhöht (Abb. 16). Dieser Effekt war jedoch zu keinem der Zeitpunkte statistisch signifikant.

Abbildung 16: Verlauf der Leukozytenzahl im peripheren Blut



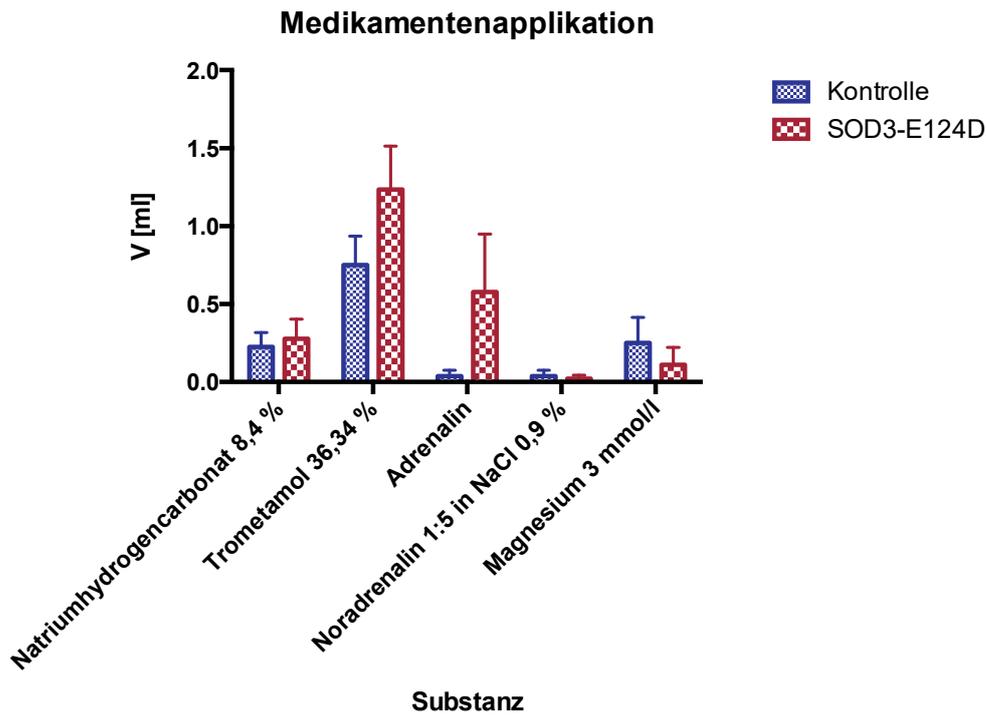
**Abb. 16** Während der gesamten Operation wurden von beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D, n = 9) die Leukozytenzahl durch Laboruntersuchungen überwacht (t<sub>1</sub>: Kanülierung, t<sub>2</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>3</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>4</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>5</sub>: vor Euthanasie). Durch Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Zeitpunkten zu gewährleisten, wurden die Werte der korpuskulären Blutbestandteile auf den Hämatokrit normiert.

In den übrigen gemessenen Plasmawerten (Natrium, Kalzium, Chlorid, Hydrogencarbonat, pH, Anionen *Gap*, Base Excess, pO<sub>2</sub> und pCO<sub>2</sub>) ließen sich keine Unterschiede feststellen.

### 3.1.3 Medikamentenapplikation

Während des Versuches wurden den Tieren, entsprechend der jeweiligen Ergebnisse der Blutgasanalysen und Vitalparameter, Medikamente verabreicht. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden Natriumhydrogencarbonat und Trometamol eingesetzt. Adrenalin wurde im Falle einer Asystolie verabreicht. Noradrenalin wurde als Vasopressor eingesetzt, um den mittleren arteriellen Blutdruck auf mindestens MAD = 40 mmHg zu halten. Kam es im Versuchsablauf während der Wiedererwärmung bei bestehendem Kammerflimmern bis zu einer Temperatur von 30 °C nicht zu einer spontanen Konversion in den Sinusrhythmus, wurde Magnesium appliziert (Abb. 17). Beide Versuchsgruppen erhielten im Durchschnitt ungefähr dasselbe Volumen an Natriumhydrogencarbonat (SOD3-kompetente Kontrolle:  $V_{\text{NaBic}} = 0,223 \pm 0,26$  ml; SOD3-E124D:  $V_{\text{NaBic}} = 0,28 \pm 0,38$  ml) und Noradrenalin (1:5 in NaCl) (SOD3-kompetente Kontrolle:  $V_{\text{NA}} = 0,04 \pm 0,11$  ml; SOD3-E124D:  $V_{\text{NA}} = 0,02 \pm 0,07$  ml) verabreicht. SOD3-kompetente Kontrollen benötigten jedoch im Mittel 64 % weniger Trometamol (SOD3-kompetente Kontrolle:  $V_{\text{Tris}} = 0,75 \pm 0,53$  ml; SOD3-E124D:  $V_{\text{Tris}} = 1,23 \pm 0,84$  ml) als Tiere mit verminderter SOD3-Aktivität. Nur ein Tier der SOD3-kompetenten Kontrollgruppe benötigte während der EKZ Adrenalin (12,5 %). Im Gegensatz dazu entwickelten vier Tiere mit verminderter SOD3-Aktivität (44,4 %) im Versuchsverlauf Adrenalinbedarf. Diese führte zu einem, gegenüber den SOD3-kompetenten Kontrollen, im Gruppenmittel 15-fach erhöhten Bedarf an Adrenalin während der EKZ (SOD3-kompetente Kontrolle:  $V_{\text{A}} = 0,04 \pm 0,11$  ml; SOD3-E124D:  $V_{\text{A}} = 0,58 \pm 1,11$  ml). Gleichzeitig zeigte sich bei den SOD3-kompetenten Kontrollen ein erhöhter Bedarf an Magnesium während der Wiedererwärmung der Versuchstiere (SOD3-kompetente Kontrolle:  $V_{\text{Mg}} = 0,25 \pm 0,46$  ml; SOD3-E124D:  $V_{\text{Mg}} = 0,11 \pm 0,33$  ml). Keiner dieser Unterschiede erreichte jedoch statistische Signifikanz (Abb. 17).

Abbildung 17: Applizierte Medikamente während des Versuchs



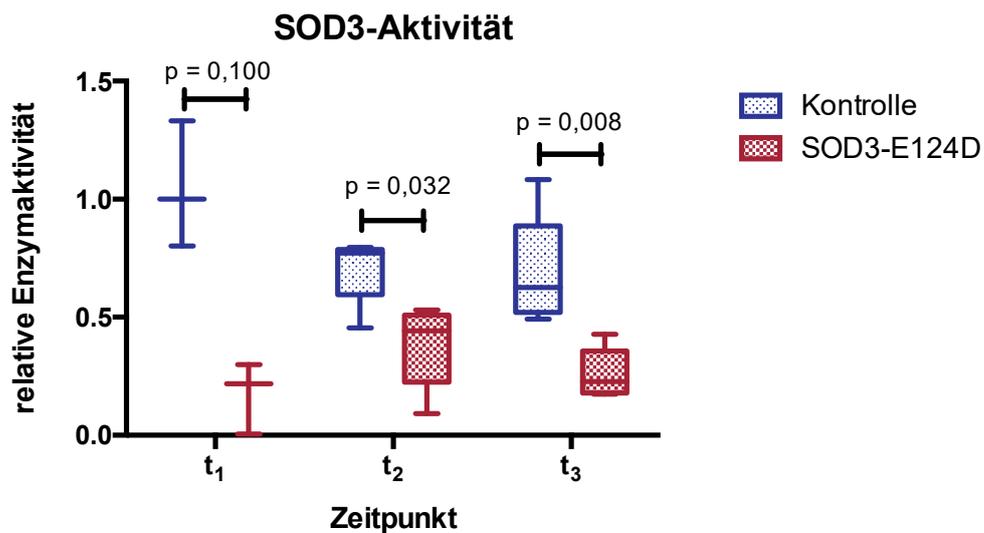
**Abb. 17** Während der gesamten Operation wurden beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D, n = 9) in Abhängigkeit der Vitalparameter und Blutgasanalysen Medikamente verabreicht. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden Natriumhydrogencarbonat und Trometamol eingesetzt. Im Falle einer plötzlichen Asystolie wurde Adrenalin verabreicht. Mithilfe von Noradrenalin wurde der mittlere arterielle Blutdruck auf mindestens MAD = 40 mmHg gehalten. Kam es während der Wiedererwärmung bei anhaltendem Kammerflimmern bis zu einer Körpertemperatur von  $T = 30\text{ °C}$  nicht zu einer spontanen Konversion in den Sinusrhythmus wurde Magnesium appliziert.

### 3.1.4 SOD3-Aktivität

Um die Verminderung der SOD3-Aktivität des Tiermodells zu belegen, wurde die relative Plasmaaktivität der SOD3 gemessen. Die Messung erfolgte zu den Zeitpunkten  $t_1$  (Kanülierung),  $t_2$  (25 °C Abkühlung) und  $t_3$  (vor Euthanasie). Dabei wurden die Messwerte auf den Zeitpunkt  $t_1$  der SOD3-kompetenten Kontrollen normiert. SOD3-E124D-Ratten besaßen eine zu jedem Messzeitpunkt deutlich verringerte relative Plasmaaktivität der SOD3 (Abb. 18). Vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation war die relative Plasmaaktivität gegenüber der Wildtypgruppe um rund 83 % erniedrigt ( $t_1$ : SOD3-kompetente Kontrolle: rel. Aktivität = 1,000;  $t_1$ : SOD3-E124D:

rel. Aktivität = 0,174). Zum Zeitpunkt  $t_2$  war die relative Aktivität in etwa halbiert ( $p = 0,032$ ). Zur Euthanasie betrug die relative Plasmaaktivität der SOD3 in der SOD3-kompetenten Kontrolle im Mittel eine rel. Aktivität = 0,688 und in der SOD3-E124D-Gruppe eine rel. Aktivität = 0,260. Dies entspricht 38 % des Vergleichswertes zu diesem Zeitpunkt ( $p = 0,008$ ) (Abb. 18). Durch den Anschluss der mit HES geprägten HLM kam es zwischen den Zeitpunkten  $t_1$  und  $t_2$  zu einer Hämodilution. Diese erschwert den direkten Vergleich des Zeitpunktes  $t_1$  mit den Zeitpunkten  $t_2$  und  $t_3$ , da mögliche Verdünnungseffekte des Enzyms in seiner Plasmakonzentration sehr wahrscheinlich sind. Unabhängig von diesem potenziellen Störfaktor konnte die signifikante Verminderung der SOD3-Aktivität in den SOD3-E124D-Ratten zu jedem Zeitpunkt während der HLM-Behandlung belegt werden [82].

Abbildung 18: SOD3 Plasmaaktivität

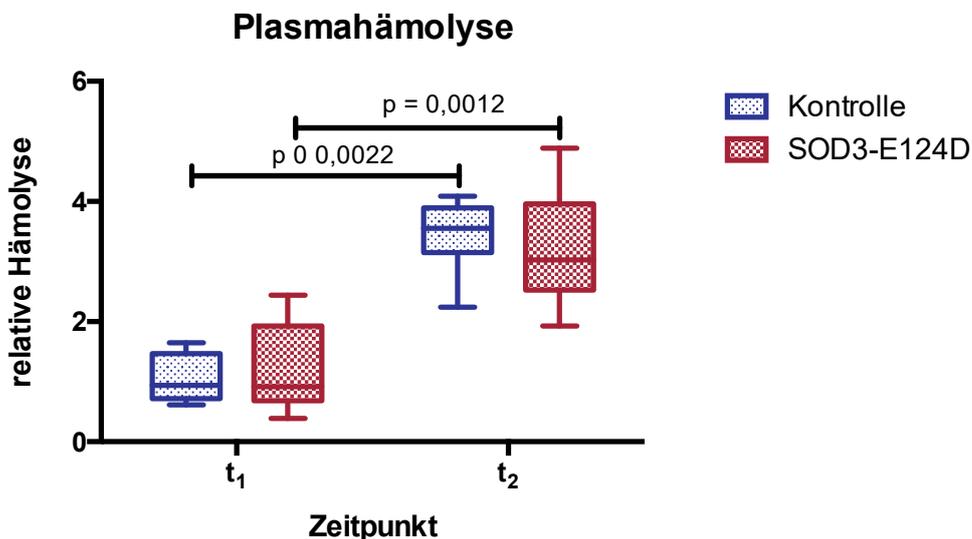


**Abb. 18** Die relative Plasmaaktivität der SOD3 wurde in beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle; SOD3-E124D) zu verschiedenen Zeitpunkten ( $t_1$ : Kanülierung,  $n = 3$ ;  $t_2$ : 25 °C Kühlung,  $n = 5$ ;  $t_3$ : vor Euthanasie,  $n = 5$ ) gemessen. Durch Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution [82].

### 3.1.5 Plasmahämolyse

Im Rahmen von kardiovaskulären Eingriffen mit extrakorporaler Zirkulation kommt es häufig zu Hämolyseprozessen [91]. Um den Schweregrad der induzierten Schädigung zu überprüfen, wurde photometrisch der relative Anstieg des Plasmahämolysegrades gemessen. Es erfolgten vergleichende Messungen zum Zeitpunkt Kanülierung ( $t_1$ ) und unmittelbar vor Euthanasie ( $t_2$ ). In beiden Versuchsgruppen war vor Beginn der EKZ keine Hämolyse im Plasma nachzuweisen (Abb. 19). Bis zum Zeitpunkt der Euthanasie fand in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg des Hämolysegrades statt. Die relative Plasmahämolyse stieg bei den SOD3-kompetenten Kontrollen von 1,0 auf 3,45 (+ 245 %,  $p = 0,0022$ ). In der SOD3-E124D-Gruppe ließ sich ein Anstieg von 1,23 auf 3,17 feststellen (+ 157 %,  $p = 0,0012$ ). Es ließen sich dabei keine signifikanten Intergruppenunterschiede nachweisen (Abb. 19). Das verwendete Modell der extrakorporalen Zirkulation mit 45 min DHCA führt in Ratten demnach fotometrisch zu ausgeprägter Hämolyse. Aufgrund der Beeinflussung durch die Hämodilution zwischen den beiden Messzeitpunkten könnte dieser Effekt insgesamt sogar noch höher ausfallen.

Abbildung 19: Plasmahämolyse



**Abb. 19** Die Absorption des Plasmas bei einer Wellenlänge von 414 nm wurde in beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle,  $n = 6$ ; SOD3-E124D,  $n = 7$ ) zu verschiedenen Zeitpunkten ( $t_1$ : Kanülierung,  $t_2$ : vor Euthanasie) gemessen. Durch Hämolyse freigesetztes Hämoglobin im Plasma erhöht die gemessene Absorption.

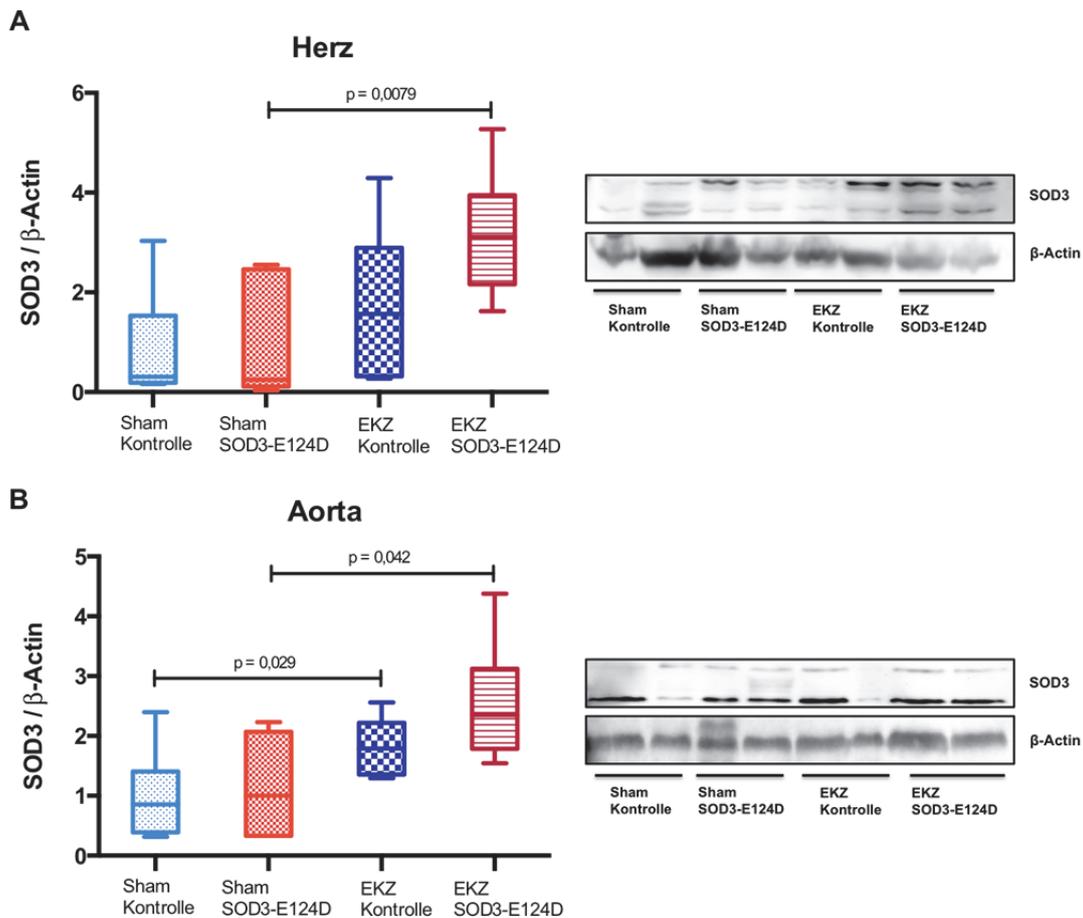
### 3.1.6 Proteinanalyse von Organproben mittels Western Blot

Zur Untersuchung der relativen Aktivierung und des relativen Gehaltes verschiedener kardiovaskulär wirksamer Proteine wurden Western Blots durchgeführt. Es wurden Organlysate von Herzen und Aorten verwendet.

Der relative Proteingehalt der SOD3 war sowohl in Aorten als auch in Herzproben in beiden EKZ-Gruppen gegenüber den Sham-Tieren erhöht (Abb. 20). Der basale mittlere relative SOD3-Proteingehalt im Herzgewebe von SOD3-kompetenten Tieren wurde als rel. Proteingehalt = 1,000 definiert. Er war damit 10 % niedriger als in SOD3-E124D-Proben (rel. Proteingehalt = 1,104) (Abb. 20A). Durch EKZ kam es zu einer Steigerung des mittleren relativen SOD3-Proteingehaltes um 75 % auf rel. Proteingehalt = 1,752 in SOD3-kompetenten Kontrollen respektive um 185 % auf rel. Proteingehalt = 3,143 ( $p = 0,0079$ ) in Tieren mit verminderter SOD3-Aktivität. Der relative Proteingehalt der SOD3 in EKZ-SOD3-E124D-Proben ist demnach im Mittel um 89 % gegenüber der Kontrolle erhöht (Abb. 20A) [82].

Auch in der Aorta war der SOD3-Proteingehalt in Shamproben mit verminderter SOD3-Aktivität gegenüber den Kontrollen um 16 % erhöht (SOD3-E124D: rel. Proteingehalt = 1,160) (Abb. 20B). Durch EKZ wurde der relative SOD3-Proteingehalt in beiden Gruppen statistisch signifikant gesteigert. Der mittlere relative Proteingehalt betrug in SOD3-kompetenten Kontrollen nach EKZ rel. Proteingehalt = 1,832 (+ 83 %,  $p = 0,029$ ). In SOD3-defizienten Proben zeigte sich ein mittlerer relativer Proteingehalt der SOD3 nach EKZ von rel. Proteingehalt = 2,493 (+ 149 %,  $p = 0,042$ ). Der relative SOD3-Proteingehalt war in der SOD3-E124D-Gruppe somit um 36 % größer als bei den SOD3-kompetenten Kontrollen. Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant (Abb. 20B) [82].

Abbildung 20: Western Blot SOD3



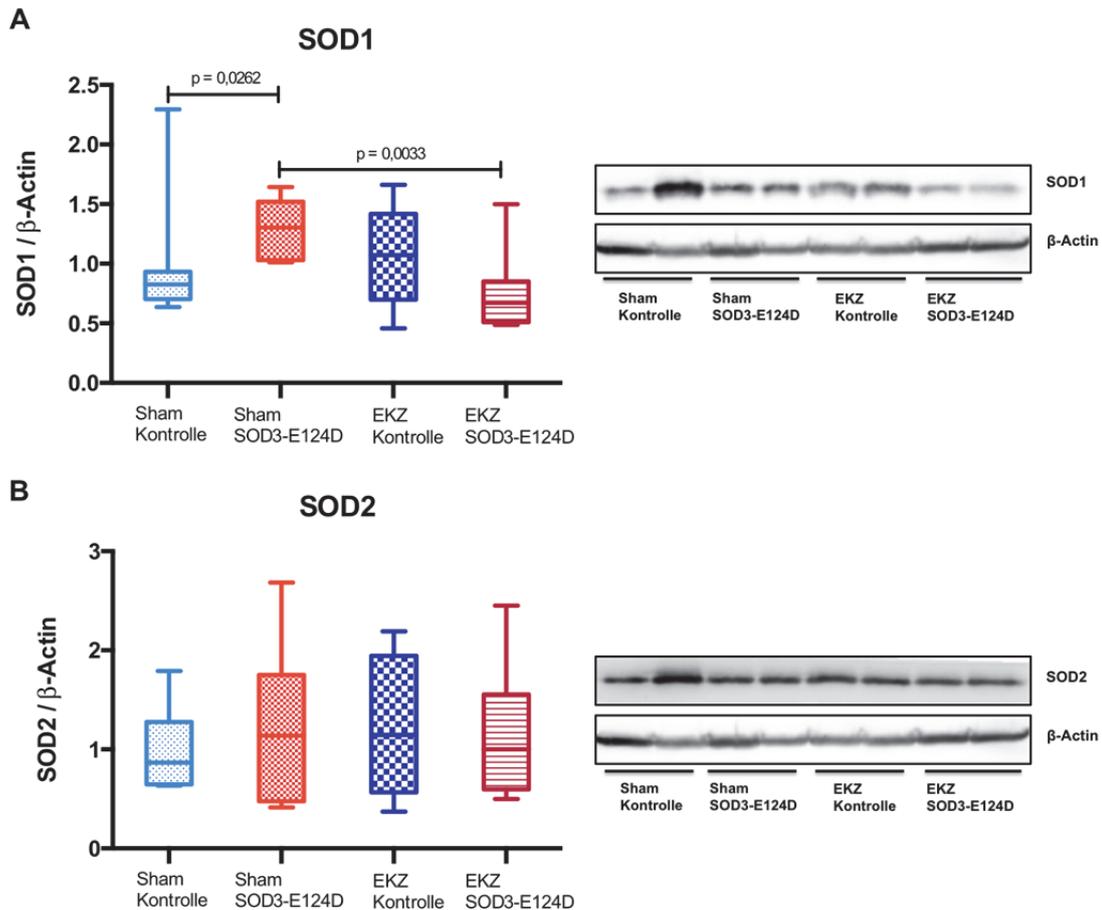
**Abb. 20** Western Blot des relativen SOD3-Proteingehaltes im Herzen (A) und der Aorta (B). Vergleich von Organproben ohne den Einfluss extrakorporaler Zirkulation (Sham) mit Proben nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) für die verschiedenen Genotypen (SOD3-kompetente Kontrolle: Sham Kontrolle,  $n = 7$  (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Proteingehalt = 1,000), EKZ Kontrolle,  $n = 8$ ; SOD3-E124D: Sham SOD3-E124D,  $n = 5$ , EKZ SOD3-E124D,  $n = 9$ ). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (SOD3: 40 kDa, 35 kDa;  $\beta$ -Actin: 45 kDa).

Um Aufschluss über den Proteingehalt und gegebenenfalls bestehende Kompensationsmechanismen der verschiedenen Isoformen der Superoxiddismutase zu gewinnen, wurden diesbezüglich weitere Herzproben mithilfe von Western Blots analysiert (Abb. 21). Unter basalen Bedingungen war der Proteingehalt der zytosolischen Isoform SOD1 in der Gruppe mit verminderter SOD3-Aktivität gegenüber den SOD3-kompetenten Kontrollen signifikant gesteigert ( $p = 0,0262$ ). Der durchschnittliche relative SOD1-Proteingehalt in Shamproben der Kontrollgruppe

wurde als rel. Proteingehalt = 1,000 definiert. In SOD3-E124D-Herzen betrug der relative Proteingehalt der SOD1 rel. Proteingehalt = 1,322 (+ 32 %). Nach EKZ wurde in SOD3-kompetenten Kontrollen ein relativer SOD1-Proteingehalt von durchschnittlich rel. Proteingehalt = 1,062 gemessen. Es zeigte sich keine Veränderung im Muster. In SOD3-defizienten Proben wurde ein relativer SOD1-Proteingehalt von rel. Proteingehalt = 0,737 gemessen. Dieser war 31 % geringer als in SOD3-kompetenten Kontrollen und entsprach 56 % des relativen Proteingehaltes in den Shamproben ( $p = 0,557$ ) (Abb. 21A).

Auch der relative Proteingehalt der SOD2 war in Shamproben von SOD3-defizienten Tieren gegenüber Kontrollen erhöht (SOD3-E124D: rel. Proteingehalt = 1,205, + 12,5 %) (Abb. 21B). Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant. Durch den Einfluss der EKZ kam es zu keiner statistisch signifikanten Steigerung im Proteingehalt der mitochondrialen SOD-Isoform SOD2. Der relative Proteingehalt betrug in SOD3-kompetenten Kontrollen nach EKZ rel. Proteingehalt = 1,241 (+ 24 %) und in SOD3-E124D-Proben im Mittel rel. Proteingehalt = 1,133 (- 6 %) (Abb. 21B).

Abbildung 21: Western Blot Herz SOD1 und SOD2

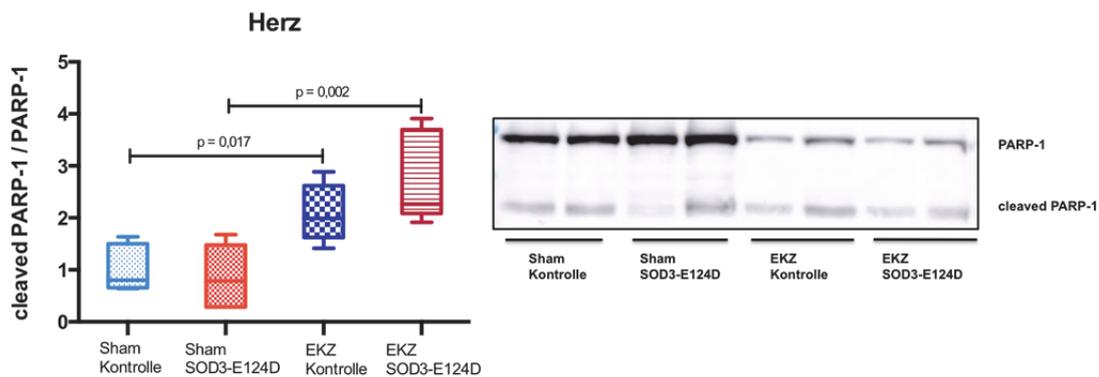


**Abb. 21** Western Blot des relativen Proteingehaltes der SOD1 (A) und der SOD2 (B) im Herzen. Vergleich von Organproben ohne den Einfluss extrakorporaler Zirkulation (Sham) mit Proben nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) für die verschiedenen Genotypen (SOD3-kompetente Kontrolle: Sham Kontrolle, n = 7 (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Proteingehalt = 1,000), EKZ Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D: Sham SOD3-E124D, n = 7, EKZ SOD3-E124D, n = 9). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden ((A) SOD1: 19 kDa; β-Actin: 45 kDa, (B) SOD2: 24 kDa; β-Actin: 45 kDa).

Zur Analyse der relativen Apoptoserate wurden Western Blots des Proteins PARP-1 und seines Spaltproduktes *cleaved* PARP-1 angefertigt (Abb. 22). Die relative Spaltung von PARP-1 in Shamproben wurde als rel. Spaltung = 1,000 definiert (SOD3-kompetente Kontrolle). In Tieren mit verminderter SOD3-Aktivität betrug sie rel. Spaltung = 0,871 (SOD3-E124D). Dieser Unterschied (- 13 %) war jedoch nicht statistisch signifikant. Infolge der EKZ kam es in beiden Gruppen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der relativen Spaltung von PARP-1. In SOD3-kompetenten

Kontrollen wurde eine nahezu verdoppelte Menge an gespaltenem Protein PARP-1 beobachtet (rel. Spaltung = 2,094;  $p = 0,017$ ). SOD3-defiziente Proben zeigten einen Anstieg der relativen Spaltung um 208 % auf rel. Spaltung = 2,687 ( $p = 0,002$ ). Während sich die relative Spaltung in der Kontrollgruppe verdoppelt, kommt es bei verminderter SOD3-Aktivität gar zu einer Verdreifachung der relativen PARP-1 Spaltung durch EKZ (Abb. 22) [82].

**Abbildung 22: Western Blot PARP-1**



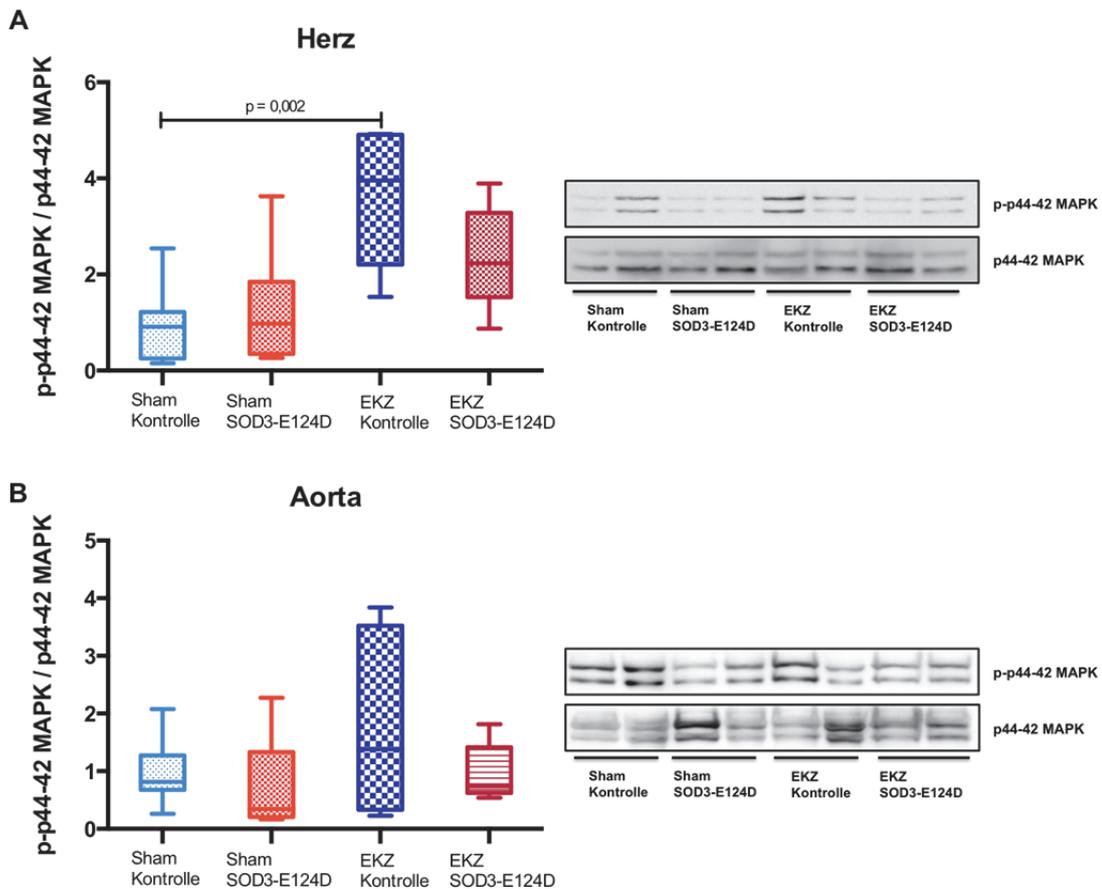
**Abb. 22** Western Blot relative PARP-1 Spaltung im Herzen. Vergleich von Organproben ohne den Einfluss extrakorporaler Zirkulation (Sham) mit Proben nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) für die verschiedenen Genotypen (SOD3-kompetente Kontrolle: Sham Kontrolle,  $n = 7$  (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Spaltung = 1,000), EKZ Kontrolle,  $n = 6$ ; SOD3-E124D: Sham SOD3-E124D,  $n = 7$ , EKZ SOD3-E124D,  $n = 6$ ). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (PARP-1: 116 kDa; cleaved PARP-1: 89 kDa) [82].

Bei der Untersuchung des p44-42 MAPK Signalweges zeigte sich in den Gruppen mit EKZ gegenüber denen ohne EKZ (Sham) eine vermehrte relative Aktivierung (Abb. 23). Diese fiel bei den SOD3-kompetenten Kontrollen gegenüber den SOD3-E124D-Ratten deutlich verstärkt aus. Allgemein zeigte sich im Herz ein stärkerer Anstieg der relativen Aktivierung als in der Aorta (Abb. 23). Zwischen den beiden Shamgruppen zeigten sich keine Unterschiede im Aktivierungszustand der p44-42 MAPK. Nach EKZ stieg die mittlere relative Aktivierung der p44-42 MAPK im Herzgewebe gegenüber der Sham SOD3-kompetenten Kontrolle (Referenz, per Definition: rel. Aktivierung = 1,000) sowie der Sham SOD3-E124D (rel. Aktivierung = 1,327) auf das 3,575-fache (rel. Aktivierung EKZ SOD3-kompetente

Tiere) bzw. das 2,292-fache (EKZ SOD3-E124D-Tiere) (Abb. 23A). Während der relative Aktivierungszustand der p44-42 MAPK in SOD3-kompetenten Kontrollen induziert durch I/R-Schädigung um 258 % signifikant ( $p = 0,002$ ) gesteigert werden konnte, führte die verminderte SOD3-Aktivität lediglich zu einem Trend, jedoch zu keiner signifikanten Steigerung in der relativen Enzymaktivierung der p44-42 MAPK (+ 73 %,  $p = 0,0545$ ) (Abb. 23A). Zwischen beiden EKZ-Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,0743$ ), jedoch eine deutliche Tendenz zu einer verstärkten relativen Aktivierung in der SOD3-kompetenten Kontrolle [82].

In Aorten zeigte sich tendenziell eine ähnliche Dynamik. Während SOD3-kompetente Kontrollen die relative Aktivierung der p44-42 MAPK bei I/R-Schädigung um 79 % steigerten ( $p = 0,451$ ), zeigte sich bei den SOD3-defizienten Tieren nur ein Anstieg um 40,4 % ( $p = 0,081$ ) (Abb. 23B) [82].

Abbildung 23: Western Blot p44-42 MAPK

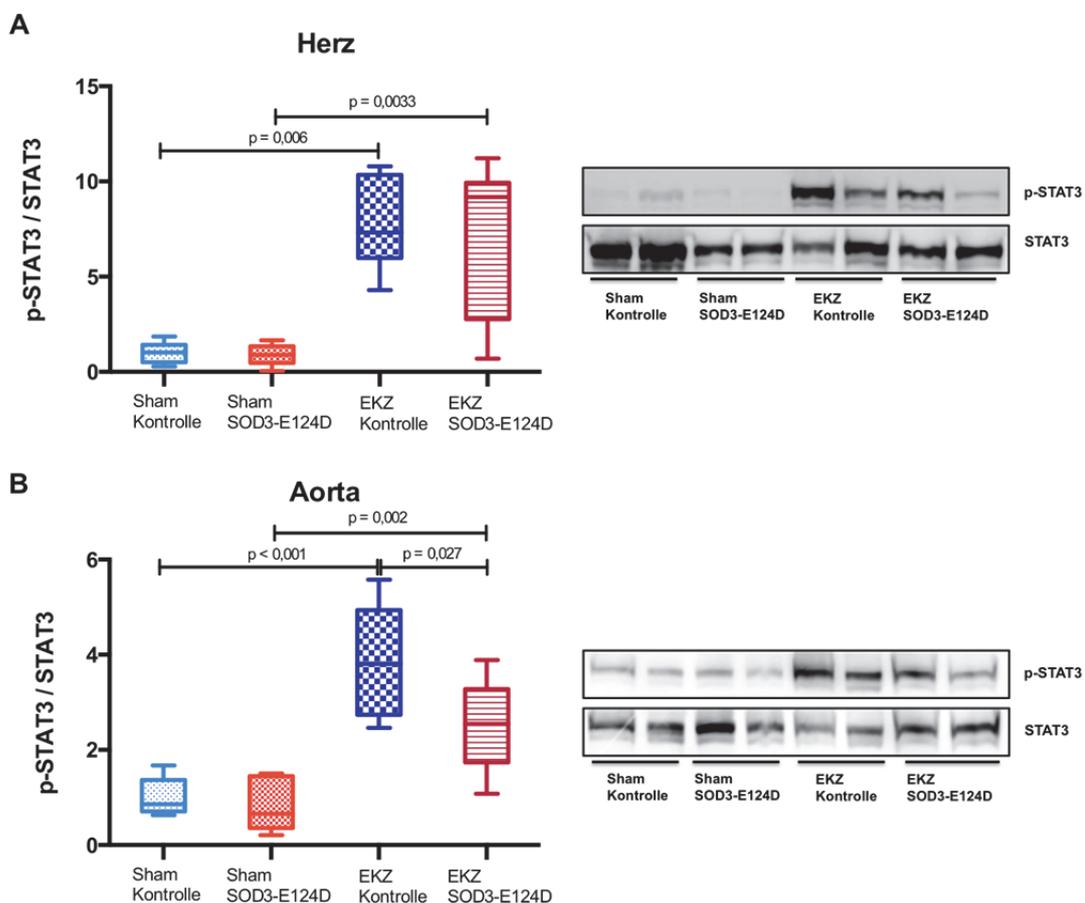


**Abb. 23** Western Blot der relativen Aktivierung von p44-42 MAPK im Herzen (A) und der Aorta (B). Vergleich von Organproben ohne den Einfluss extrakorporaler Zirkulation (Sham) mit Proben nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) für die verschiedenen Genotypen (SOD3-kompetente Kontrolle: Sham Kontrolle, n = 7 (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Aktivierung = 1,000), EKZ Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D: Sham SOD3-E124D, n = 7, EKZ SOD3-E124D, n = 9). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (p-p44-42 MAPK: 44 kDa, 42 kDa; p44-42 MAPK: 42 kDa) [82].

Auch STAT3 zeigte basal keine Unterschiede und wurde unter EKZ verstärkt aktiviert (Abb. 24). Erneut ließ sich ein stärkerer Anstieg der relativen Aktivierung in der SOD3-kompetenten Kontrollgruppe gegenüber den SOD3-E124D-Ratten nachweisen (Abb. 22). Im Herzen zeigte sich ein Anstieg der mittleren relativen Aktivierung um 667 % ( $p = 0,006$ ) von SOD3-kompetenten Tieren sowie um 633 % ( $p = 0,0033$ ) bei den SOD3-E124D (Abb. 24A). Damit wurde STAT3 im Herzen von SOD3-kompetenten Kontrollen um 11 % stärker aktiviert als in der SOD3-E124D-Gruppe [82].

In der Aorta stieg die mittlere relative Aktivierung in der SOD3-kompetenten Kontrolle um 287 % auf rel. Aktivierung = 3,871 ( $p < 0,001$ ) (Abb. 24B). Verminderte SOD3-Aktivität führte zu einem geringeren Anstieg um nur 205 % auf rel. Aktivierung = 2,476 ( $p = 0,002$ ). Damit zeigte sich bei der Untersuchung von Aortengewebe nach EKZ und I/R eine um 56 % signifikant höhere relative Phosphorylierung (Aktivierung) von STAT3 bei SOD3-kompetenten gegenüber den SOD3-defizienten Tieren ( $p = 0,027$ ; Abb. 24B) [82].

Abbildung 24: Western Blot STAT3

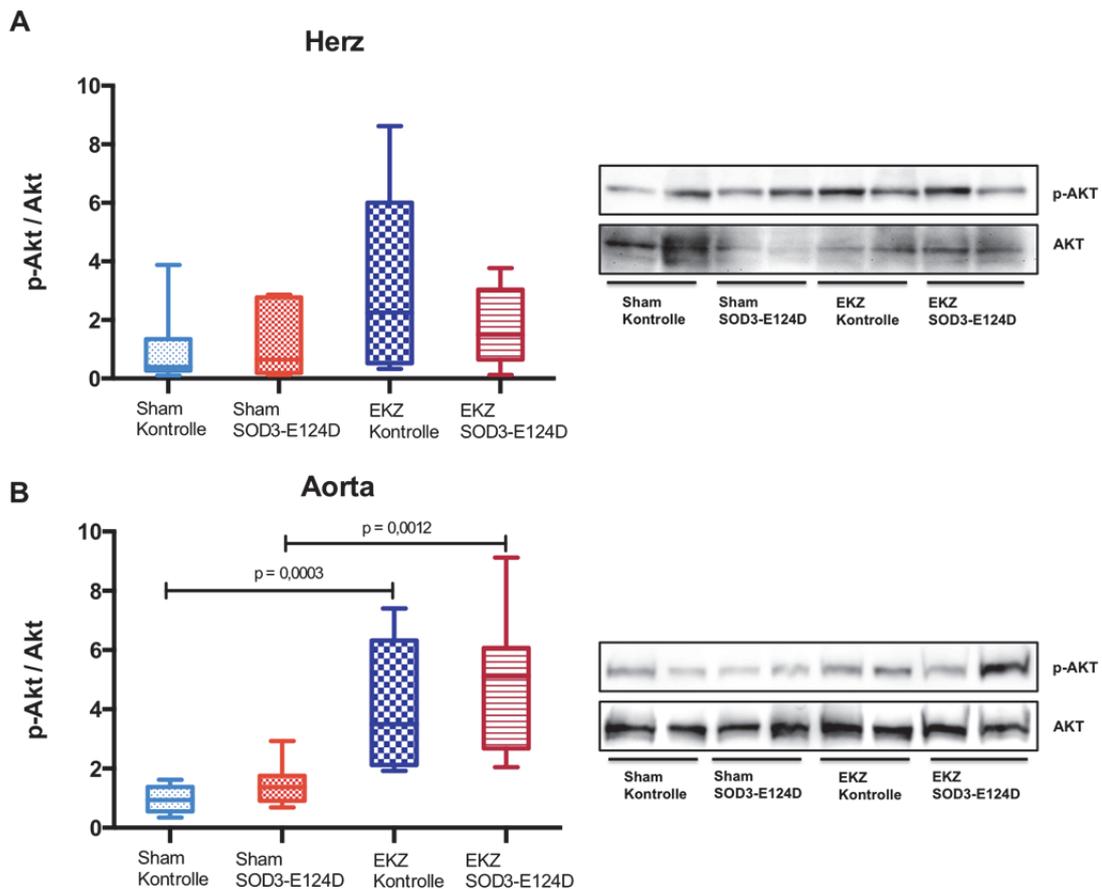


**Abb. 24** Western Blot der relativen Aktivierung von STAT3 im Herzen (A) und der Aorta (B). Vergleich von Organproben ohne den Einfluss extrakorporaler Zirkulation (Sham) mit Proben nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) für die verschiedenen Genotypen (SOD3-kompetente Kontrolle: Sham Kontrolle,  $n = 7$  (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Aktivierung = 1,000), EKZ Kontrolle,  $n = 8$ ; SOD3-E124D: Sham SOD3-E124D,  $n = 7$ , EKZ SOD3-E124D,  $n = 9$ ). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden ((p-STAT3: 86 kDa, 79 kDa; STAT3: 86 kDa 79 kDa) [82].

Die relative Aktivierung der AKT im Herzen war in Shamproben mit verringerter SOD3-Aktivität mit rel. Aktivierung = 1,342 gegenüber SOD3-kompetenten Kontrollen erhöht (Abb. 25A). Durch EKZ kam es in keiner der beiden Gruppen zu einer signifikanten Steigerung der relativen AKT-Aktivierung. Es zeigte sich jedoch eine Tendenz zu einer verstärkten Aktivierung der AKT in der SOD3-kompetenten Kontrollgruppe. Diese Tiere konnten die relative Aktivierung im Durchschnitt um 227 % auf rel. Aktivierung = 3,267 steigern. In SOD3-E124D-Tieren konnte nur eine Steigerung auf rel. Aktivierung = 1,791 (+ 33 %) nachgewiesen werden. Nach EKZ war damit die relative Aktivierung der AKT in SOD3-kompetenten Kontrollen gegenüber SOD3-defizienten Tieren 1,8-fach erhöht (Abb. 25A).

In Aorten von Sham-Tieren betrug die relative Aktivierung der AKT per Definition rel. Aktivierung = 1,000 (SOD3-kompetente Kontrollen), in der SOD3-E124D-Gruppe betrug sie rel. Aktivierung = 1,501 (SOD3-E124D) (Abb. 25B). Es zeigte sich auch hier keine statistische Signifikanz in der erhöhten relativen Aktivierung der AKT in Tieren mit verringerter SOD3-Aktivität. Durch EKZ kam es in beiden Gruppen zu einer statistisch signifikanten Steigerungen des relativen Aktivierungszustandes der AKT. SOD3-kompetente Kontrollen steigerten die relative Aktivierung um 301 % auf rel. Aktivierung = 4,013 ( $p = 0,0003$ ). Bei verringerter SOD3-Aktivität ließ sich eine Steigerung um 215 % auf rel. Aktivität = 4,733 ( $p = 0,0012$ ) beobachten. Damit war die relative Phosphorylierung der AKT in Aorten von Tieren mit verminderter SOD3-Aktivität nach EKZ im Mittel um 18 % größer als in SOD3-kompetenten Kontrollen (Abb. 25B). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Abbildung 25: Western Blot AKT



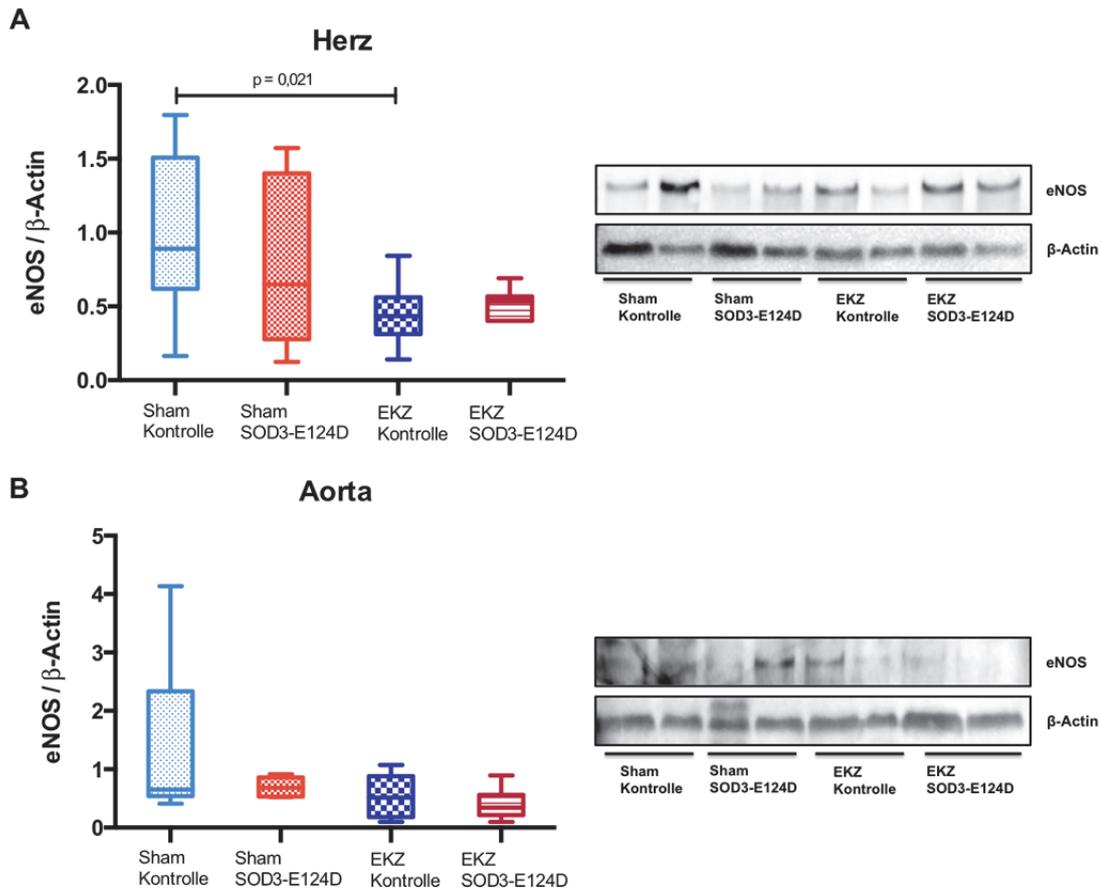
**Abb. 25** Western Blot der relativen Aktivierung von AKT im Herzen (A) und der Aorta (B). Vergleich von Organproben ohne den Einfluss extrakorporaler Zirkulation (Sham) mit Proben nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) für die verschiedenen Genotypen (SOD3-kompetente Kontrolle: Sham Kontrolle,  $n = 7$  (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Aktivierung = 1,000), EKZ Kontrolle,  $n = 8$ ; SOD3-E124D: Sham SOD3-E124D,  $n = 7$ , EKZ SOD3-E124D,  $n = 9$ ). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (p-AKT: 60 kDa; AKT 60 kDa).

Zum besseren Verständnis des Stoffwechsels von Stickstoffmonoxid wurde der Proteingehalt der eNOS in Herz und Aorta untersucht (Abb. 26). Beim Vergleich der Shamproben war der relative Proteingehalt der eNOS im Herzen der SOD3-E124D gegenüber der SOD3-kompetente Kontrolle erniedrigt (rel. Proteingehalt = 0,80; Abb. 26A). Nach EKZ ließ sich eine Verringerung des relativen Proteingehaltes der eNOS in beiden Gruppen feststellen. Diese war jedoch nur in der SOD3-kompetenten Kontrolle statistisch signifikant ( $p = 0,021$ ). Nach EKZ war der relative Proteingehalt der eNOS im Herzen in beiden Gruppen annähernd gleichwertig (rel. Proteingehalt

Kontrollgruppe = 0,448 (- 55 %); rel. Proteingehalt SOD3-E124D = 0,503 (- 37 %; Abb 26A) [82].

In der Aorta zeigte sich nur in der Kontrollgruppe eine klare Regulation der eNOS durch EKZ. Diese erreichte jedoch in der weiteren Auswertung keine statistische Signifikanz. Bei verminderter SOD3-Aktivität betrug der durchschnittliche relative eNOS-Proteingehalt in Shamproben rel. Proteingehalt = 0,693 und damit 30 % weniger als in der Kontrolle (Abb. 26B). Nach EKZ wurde ein verringerter relativer eNOS-Proteingehalt bei beiden Gruppen beobachtet (rel. Proteingehalt = 0,548 in SOD3-kompetenten Tieren, entspricht - 45 %; rel. Proteingehalt = 0,405 in SOD3-E124D, - 42 %). Die Regulation der eNOS erfolgte in der Aorta demnach in beiden Gruppen ähnlich (Abb. 26B) [82].

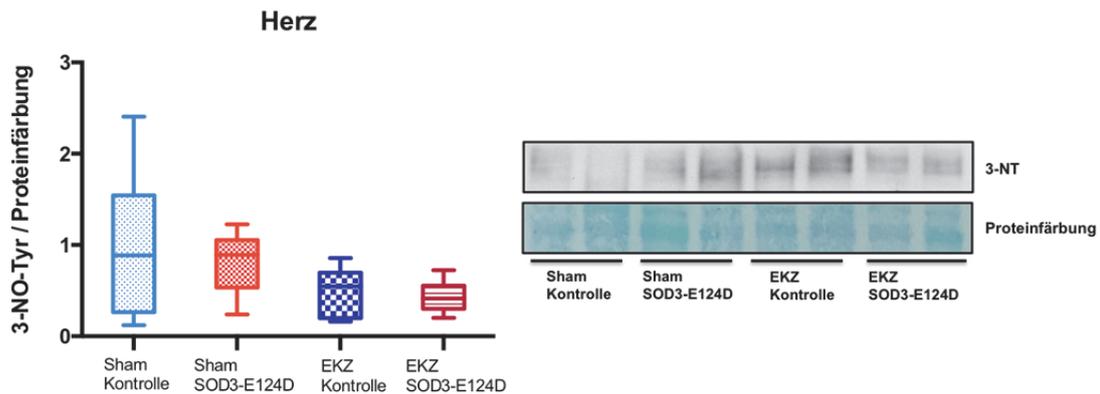
Abbildung 26: Western Blot eNOS



**Abb. 26** Western Blot des relativen eNOS-Proteingehaltes im Herzen (A) und der Aorta (B. Vergleich von Organproben ohne den Einfluss extrakorporaler Zirkulation (Sham) mit Proben nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) für die verschiedenen Genotypen (SOD3-kompetente Kontrolle: Sham Kontrolle,  $n = 7$  (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Proteingehalt = 1,000), EKZ Kontrolle,  $n = 8$ ; SOD3-E124D: Sham SOD3-E124D,  $n = 5$ , EKZ SOD3-E124D,  $n = 9$ ). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (eNOS: 140 kDa;  $\beta$ -Actin: 45 kDa) [82].

Weiterhin wurde die Bildung von 3-Nitrotyrosine im Herzen als Indikator für Peroxynitrit bestimmt (Abb. 27). Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede sowie Regulationseffekte. Vor EKZ betrug die relative Konzentration an 3-Nitrotyrosine in SOD3-kompetenten Kontrollen durchschnittlich  $C_{3\text{-NT}} = 1,000$  (per Definition) und in SOD3-E124D Herzen  $C_{3\text{-NT}} = 0,80$ . In EKZ-Proben wurde in beiden Gruppen ungefähr die gleiche relative mittlere Konzentration an 3-Nitrotyrosine gemessen (SOD3-kompetente Kontrolle:  $C_{3\text{-NT}} = 0,490$ ; SOD3-E124D:  $C_{3\text{-NT}} = 0,430$ ) (Abb. 27).

Abbildung 27: Western Blot 3-Nitrotyrosine



**Abb. 27** Western Blot der relativen Konzentration an 3-Nitrotyrosine im Myokard. Vergleich von Organproben ohne den Einfluss extrakorporaler Zirkulation (Sham) mit Proben nach extrakorporaler Zirkulation (EKZ) für die verschiedenen Genotypen (SOD3-kompetente Kontrolle: Sham Kontrolle, n = 7 (Referenz, Mittelwert per Definition:  $C_{3\text{-NT}} = 1,000$ ), EKZ Kontrolle, n = 8; SOD3-E124D: Sham SOD3-E124D, n = 5, EKZ SOD3-E124D, n = 9). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (3-NT: 130 kDa; Proteinfärbung: 50 kDa).

### 3.1.7 Angiotensin-II ELISA

Um einen möglichen Zusammenhang des RAAS mit dem p44-42 MAPK-Signalweg und der SOD3 zu untersuchen, wurde die Konzentration von Angiotensin-II im Plasma mittels ELISA bestimmt (Abb. 28). Die Messung wurde zu drei Zeitpunkten vorgenommen ( $t_1$ : Kanülierung;  $t_2$ : 25 °C Kühlung;  $t_3$ : vor Euthanasie). Zum Versuchsbeginn betrug die Konzentration von Angiotensin-II in SOD3-kompetenten Kontrollen im Mittel  $C_{\text{AT II}} = 192,257$  pg/ml. In Tieren mit verminderter SOD3-Aktivität war die Angiotensin-II-Konzentration hingegen um 131 % auf  $C_{\text{AT II}} = 444,9$  pg/ml erhöht. Während es mit Beginn der EKZ zum Zeitpunkt  $t_2$  in der Kontrollgruppe zu einem Anstieg der ursprünglichen Konzentration um 152 % auf  $C_{\text{AT II}} = 484,868$  pg/ml kam, zeigte sich bei vorliegender SOD3-Defizienz nur ein Anstieg um 14 % auf  $C_{\text{AT II}} = 508,345$  pg/ml. Bis zum Zeitpunkt der Euthanasie kam es zu einem weiteren Anstieg der Konzentration an Angiotensin-II in beiden Gruppen ( $t_3$ : SOD3-kompetente Kontrolle:  $C_{\text{AT II}} = 1203,78$  pg/ml;  $t_3$ : SOD3-E124D:  $C_{\text{AT II}} = 941,49$  pg/ml). Während im Versuchsverlauf in der SOD3-kompetenten Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der Angiotensin-II-Konzentration um 526 %

( $p = 0,0095$ ) verzeichnet wurde, kam es in der SOD3-E124D-Gruppe nur zu einem Anstieg um 112 % (Abb. 28). Dieser Effekt war statistisch nicht signifikant.

Abbildung 28: Angiotensin II Konzentration

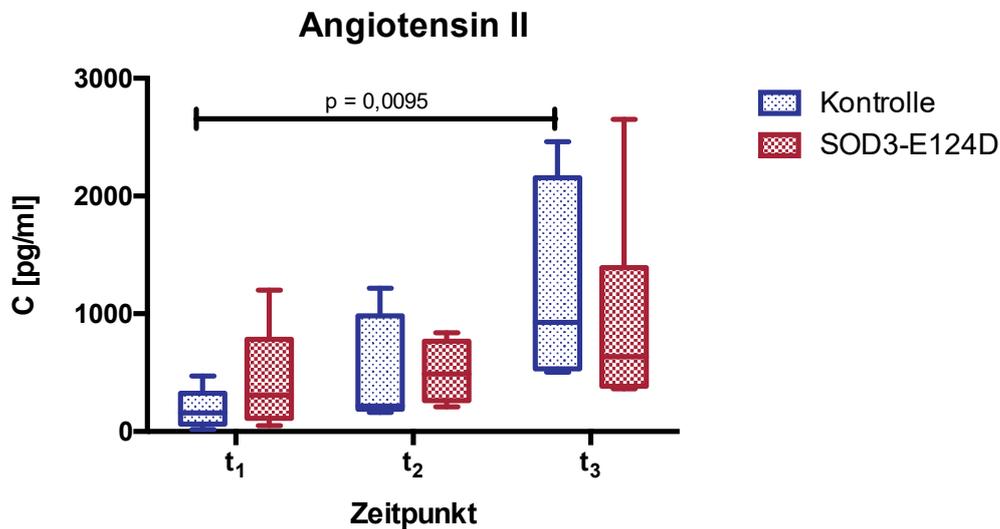


Abb. 28 Durch einen ELISA wurde die Konzentration an Angiotensin II im Plasma in beiden Gruppen (SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle,  $n = 6$ ; SOD3-E124D,  $n = 7$ ) zu verschiedenen Zeitpunkten ( $t_1$ : Kannülierung;  $t_2$ : 25 °C Kühlung;  $t_3$ : vor Euthanasie) gemessen. Durch Anschluss an die Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution.

### 3.1.8 Assays adulter Kardiomyozyten

Mit dem *CellROX-Assay* wurde die relative intrazelluläre Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in kultivierten adulten Kardiomyozyten bestimmt (Abb. 29). In der nativen Untersuchungsgruppe zeigte sich eine signifikant verminderte ( $p = 0,0286$ ) relative mittlere intrazelluläre ROS-Konzentration in den SOD3-E124D-Kardiomyozyten ( $C_{ROS} = 0,769$ ) gegenüber den Zellen der SOD3-kompetenten Kontrollen (Referenz, per Definition:  $C_{ROS} = 1,000$ ). Auch die Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO zeigte ähnliche Ergebnisse. Die mit Menadione, einer Substanz die den oxidativen Stress in den Zellen erhöht, versetzten Zellpopulationen zeigten, wie erwartet, in beiden Gruppen einen insgesamt erhöhten relativen Level an reaktiven Sauerstoffspezies (SOD3-kompetente Kontrolle:  $C_{ROS} = 1,308$ ; SOD3-E124D:  $C_{ROS} = 0,954$ ). Es zeigte sich erneut ein Trend im Unterschied zwischen den

verschiedenen Genotypen der Zellen. Nach Zugabe von SOD1, einer intrazellulärer Superoxiddismutase, stellte sich intrazellulär eine verminderte relative Konzentration von ROS dar (SOD3-kompetente Kontrolle:  $C_{ROS} = 0,531$ ; SOD3-E124D:  $C_{ROS} = 0,521$ ) (Abb. 29).

Abbildung 29: CellROX-Assay

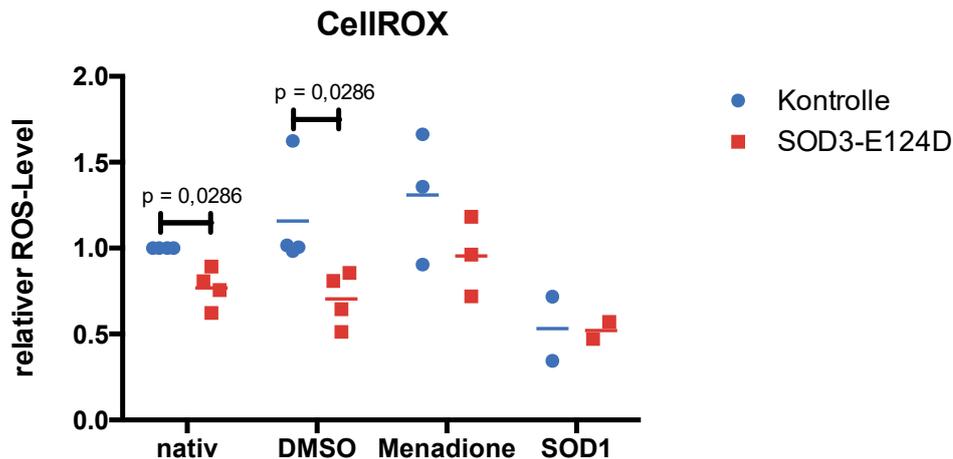


Abb. 29 Mit dem CellROX-Assay wurde der relative intrazelluläre Level an reaktiven Sauerstoffspezies in Kardiomyozyten bestimmt (ISO-SOD3-kompetente Kontrolle; ISO SOD3-E124D: SOD3-E124D). Die Kulturen wurden während der Inkubation mit Menadione (n = 3) oder SOD1 (n = 2) stimuliert. Zur Kontrolle wurden Kulturen im Lösungsmittel der Stimulanzen (DMSO, n = 4) und ohne Zusätze (nativ, n = 4 (Referenz, Mittelwert per Definition:  $C_{ROS} = 1,000$ )) inkubiert.

Um zusätzlich den intrazellulären Level an Stickstoffmonoxid zu messen, wurden darüber hinaus spezielle Untersuchungen, sog. *DAF-FM-Assays* durchgeführt (Abb. 30). Für die Auswertung wurden die Werte der mittleren NO-Level in SOD3-kompetenten Kardiomyozyten in der Nativuntersuchung als Referenz festgelegt ( $C_{NO} = 1,000$ ). In SOD3-E124D-Kardiomyozyten wurden relative Werte von  $C_{NO} = 0,885$  und damit statistisch signifikant erniedrigte Werte beobachtet ( $p = 0,0286$ ). Die DMSO-Gruppe zeigte ein ähnliches Bild. Inkubation mit Menadione sowie SOD1 führten hingegen zu einem Abfall an NO in SOD3-kompetenten Kardiomyozyten (Menadione:  $C_{NO} = 0,760$ ; SOD1:  $C_{NO} = 0,849$ ), jedoch nicht in Kardiomyozyten mit

verminderter SOD3-Aktivität (Menadione:  $C_{NO} = 0,872$ ; SOD1:  $C_{NO} = 0,922$ ) (Abb. 30).

Abbildung 30: DAF-FM Assay

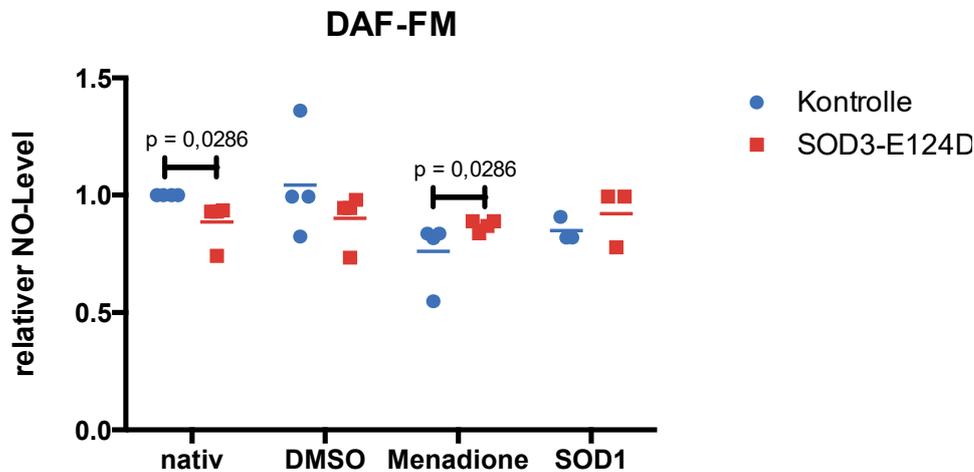


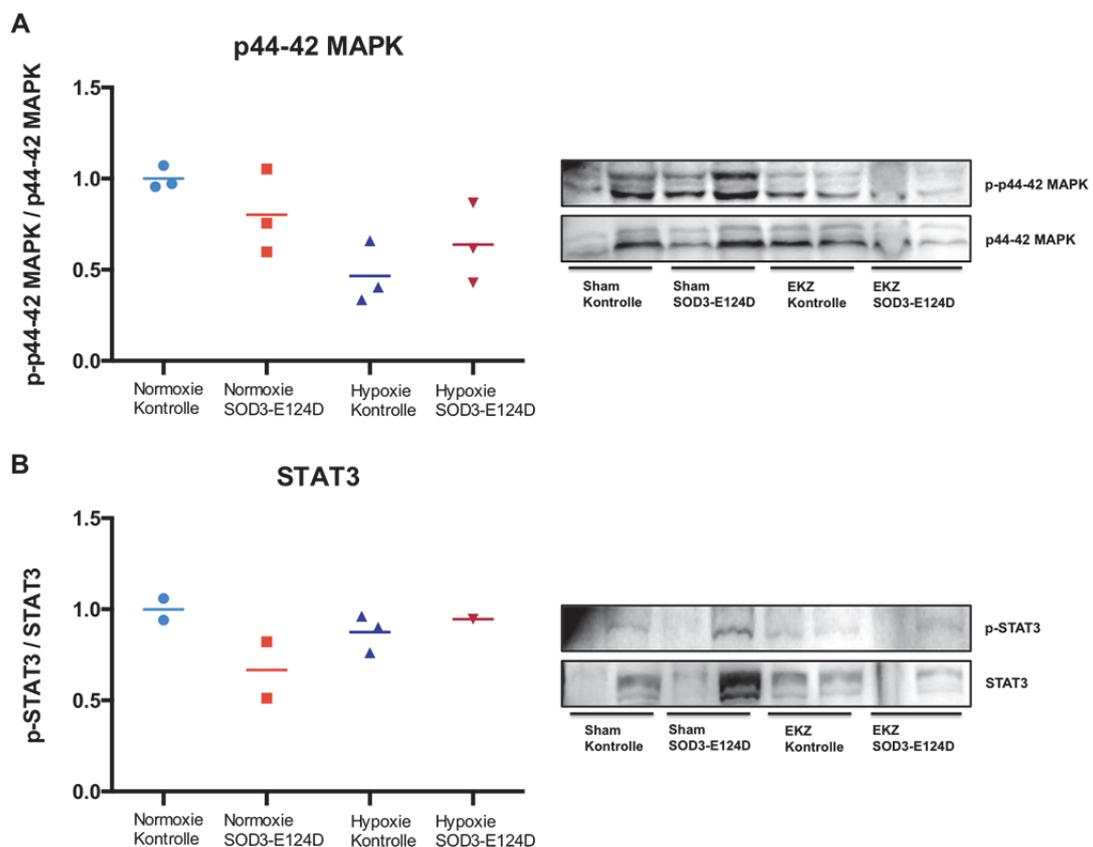
Abb. 30 Mit dem DAF-FM-Assay wurde der relative intrazelluläre Level an Stickstoffmonoxid in Kardiomyozyten bestimmt (ISO-SOD3-kompetente Kontrolle: Kontrolle; ISO SOD3-E124D: SOD3-E124D). Die Kulturen wurden während der Inkubation mit Menadione (n = 4) oder SOD1 (n = 3) stimuliert. Zur Kontrolle wurden Kulturen im Lösungsmittel der Stimulanzen (DMSO, n = 4) und ohne Zusätze (nativ, n = 4 (Referenz, Mittelwert per Definition:  $C_{NO} = 1,000$ )) inkubiert.

### 3.1.9 Proteinanalyse adulter Kardiomyozyten mittels Western Blot

Um den direkten Einfluss der EKZ auf den Herzmuskel zu untersuchen und systemische Nebeneffekte auszuschließen, wurden zusätzliche Western Blots mit zuvor isolierten adulten Kardiomyozyten durchgeführt. Tendenziell zeigte sich unter normoxischen Inkubationsbedingungen eine geringere Aktivierung der p44-42 MAPK (Abb. 31A) sowie von STAT3 (Abb. 31B) in den SOD3-E124D-Zellen gegenüber den SOD3-kompetenten Kontrollen. Die relative Aktivierung der p44-42 MAPK in der SOD3-kompetenten Kontrolle wurde als rel. Aktivierung = 1,000 definiert. Bei SOD3-Aktivitätsverlust war sie um 20 % (rel. Aktivierung = 0,802) vermindert. Die relative Phosphorylierung des STAT3 war in der SOD3-E124D-Gruppe bei Normoxie um 33 % (rel. Aktivierung = 0,667) gegenüber der SOD3-kompetenten Kontrolle vermindert.

Unter hypoxischen Bedingungen zeigte sich eine Abnahme in der relativen Aktivierung der p44-42 MAPK in SOD3-kompetenten Kontrollen (rel. Aktivierung = 0,466; - 53 %). Dieser Regulationseffekt fiel für SOD3-E124D-Kardiomyozyten geringer aus (rel. Aktivierung = 0,638; - 4 %) (Abb. 31A). Während die relative mittlere STAT3-Phosphorylierung in der SOD3-kompetenten Kontrolle nach Hypoxie um 12 % abnahm (rel. Aktivierung = 0,875), stieg die relative mittlere STAT3-Phosphorylierung in SOD3-E124D-Kardiomyozyten um 42 % (rel. Aktivierung = 0,946) (Abb. 31B).

**Abbildung 31: Western Blot Kardiomyozyten p44-42 MAPK und STAT3**

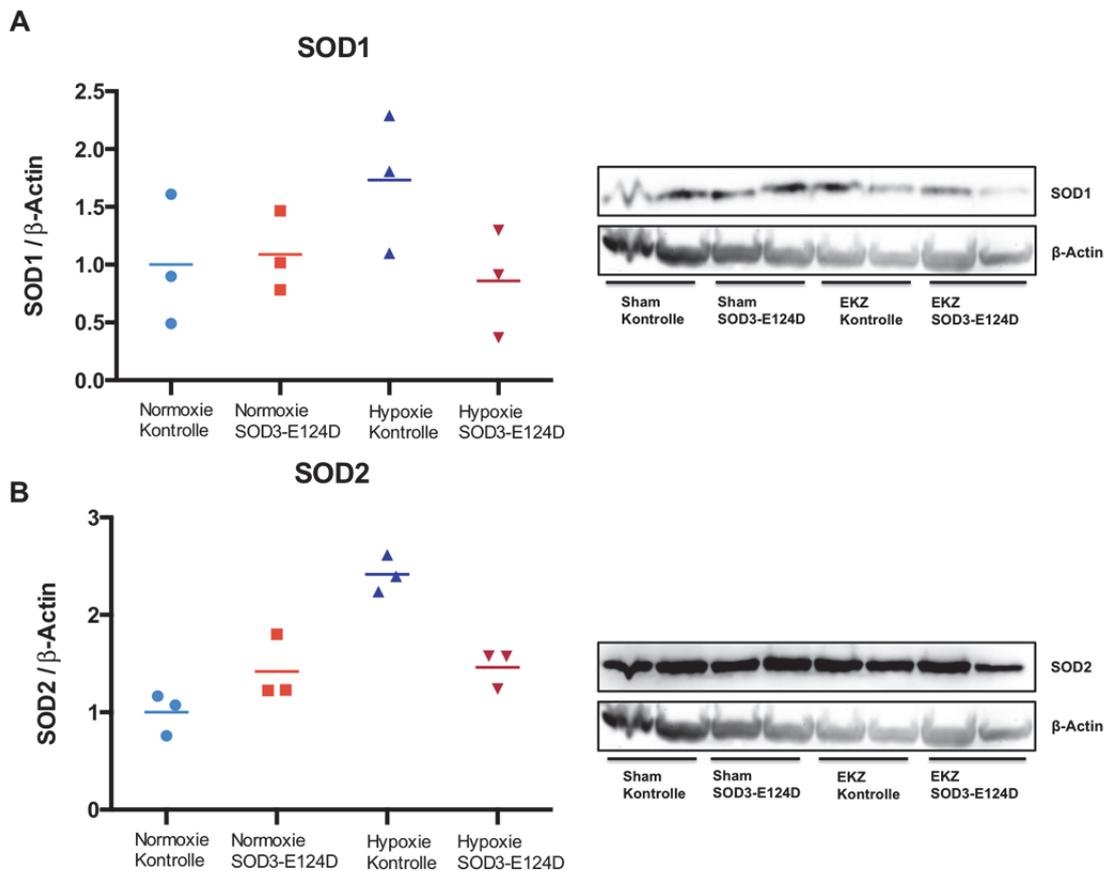


**Abb. 31** Western Blot der relativen Aktivierung der p44-42 MAPK (A) und des STAT3 (B) in adulten Kardiomyozyten. Vergleich von Zellkulturproben ohne den Einfluss von Hypoxie (Normoxie) mit Proben nach vierstündiger Hypoxie mit 1 % Sauerstoff (Hypoxie) für die verschiedenen Genotypen (ISO-SOD3-kompetente Kontrolle: Normoxie Kontrolle, n = 3 (STAT3 n = 2) (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Aktivierung = 1,000), Hypoxie Kontrolle, n = 3; ISO-SOD3-E124D: Normoxie SOD3-E124D, n = 3 (STAT3 n = 2), Hypoxie SOD3-E124D, n = 3 (STAT3 n = 1)). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden ((A) p-p44-42 MAPK: 44 kDa, 42 kDa; p44-42 MAPK: 44 kDa, 42 kDa, (B) p-STAT3: 86 kDa, 79 kDa; STAT3: 86 kDa, 79 kDa).

Um mögliche Kompensationseffekte im Proteingehalt der verschiedenen SOD-Isoformen auch auf zellulärer Ebene direkt in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden weitere Western Blots angefertigt (Abb. 32-33). Unter normoxischen Bedingungen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede im mittleren relativen Proteingehalt der SOD1 zwischen SOD3-kompetenten (Referenz, per Definition: rel. Proteingehalt = 1,000) und SOD3-defizienten (rel. Proteingehalt = 1,089) Kardiomyozyten (Abb. 32A). Hypoxie steigerte den mittleren relativen Proteingehalt der zytoplasmischen SOD1-Isoform in der Kontrollgruppe um 73 % (rel. Proteingehalt = 1,732). In Kardiomyozyten mit verminderter SOD3-Aktivität verringerte sich der mittlere relative Proteingehalt hingegen um 21 % (rel. Proteingehalt = 0,858) (Abb. 32A) [82].

Unter normoxischen Bedingungen war der mittlere relative SOD2-Proteingehalt in SOD3-E124D-Kardiomyozyten verglichen mit SOD3-kompetenten Kontrollen um 42 % erhöht (Abb. 32B). Hypoxie führte in Zellen mit verminderter SOD3-Aktivität zu keiner weiteren Steigerung des relativen mittleren Proteingehaltes (Normoxie SOD3-E124D: rel. Proteingehalt = 1,418; Hypoxie SOD3-E124D: rel. Proteingehalt = 1,462). SOD3-kompetente Kontrollen steigerten jedoch den Proteingehalt der SOD2 unter Hypoxie auf 241 % ihres normoxischen Vergleichswertes sowie 165 % des hypoxischen Vergleichswertes der SOD3-inkompetenten Zellen (Abb. 34B) [82].

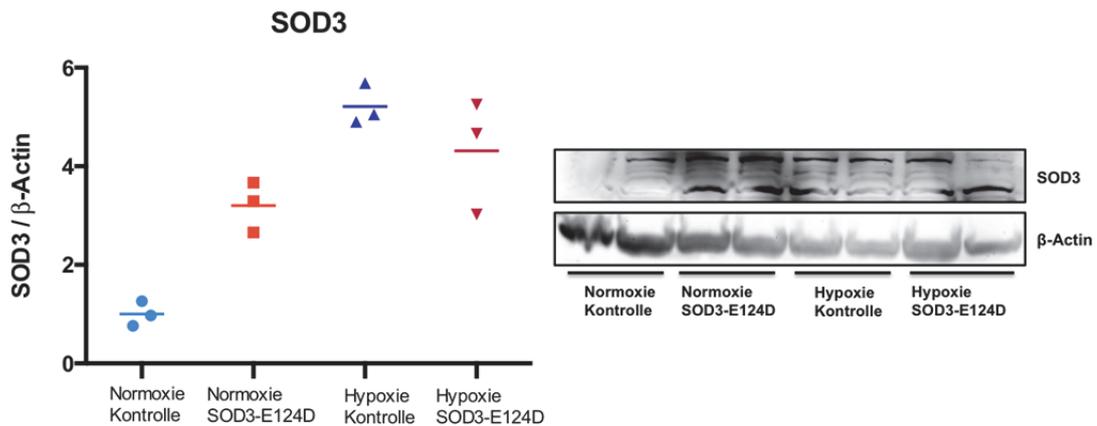
Abbildung 32: Western Blot Kardiomyozyten SOD1 und SOD2



**Abb. 32** Western Blot des relativen Proteingehaltes von SOD1 (A) und SOD2 (B) in adulten Kardiomyozyten. Vergleich von Zellkulturproben ohne den Einfluss von Hypoxie (Normoxie) mit Proben nach vierstündiger Hypoxie mit 1 % Sauerstoff (Hypoxie) für die verschiedenen Genotypen (ISO-SOD3-kompetente Kontrolle: Normoxie Kontrolle, n = 3 (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Proteingehalt = 1,000), Hypoxie Kontrolle, n = 3; ISO-SOD3-E124D: Normoxie SOD3-E124D, n = 3, Hypoxie SOD3-E124D, n = 3). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden ((A) SOD1: 19 kDa;  $\beta$ -Actin: 45 kDa, (B) SOD2: 24 kDa;  $\beta$ -Actin: 45 kDa) [82].

Der mittlere relative Proteingehalt der SOD3 war bei SOD3-E124D-Mutanten deutlich höher als bei SOD3-kompetenten Kontrollen (Faktor: 3,204). Hypoxie konnte diesen relativen Proteingehalt in beiden Gruppen weiter steigern (Hypoxie SOD3-kompetente Kontrolle: rel. Proteingehalt = 5,213; Hypoxie SOD3-E124D: rel. Proteingehalt = 4,311). Erneut zeigte sich eine deutlich stärkere Steigerung des relativen Proteingehaltes in den SOD3-kompetenten Kardiomyozyten (Abb. 33) [82].

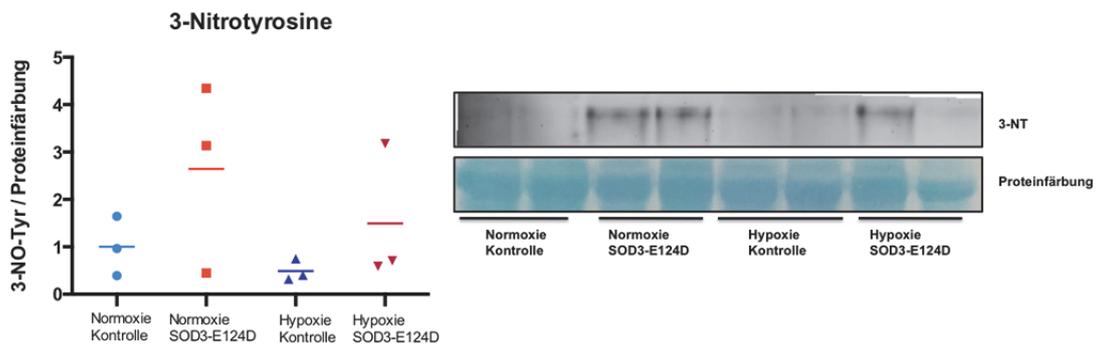
Abbildung 33: Western Blot Kardiomyozyten SOD3



**Abb. 33** Western Blot des relativen Proteingehaltes von SOD3 in adulten Kardiomyozyten. Vergleich von Zellkulturproben ohne den Einfluss von Hypoxie (Normoxie) mit Proben nach vierstündiger Hypoxie mit 1 % Sauerstoff (Hypoxie) für die verschiedenen Genotypen (ISO SOD3-kompetente Kontrolle: Normoxie Kontrolle, n = 3 (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Proteingehalt = 1,000), Hypoxie Kontrolle, n = 3; ISO SOD3-E124D: Normoxie SOD3-E124D, n = 3, Hypoxie SOD3-E124D, n = 3). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (SOD3: 40 kDa, 35 kDa;  $\beta$ -Actin: 45 kDa) [82].

Nitrosativer Stress, gekennzeichnet durch die Bildung von 3-Nitrotyrosine, war bei vorliegendem SOD3-Defekt in Kardiomyozyten deutlich erhöht (Abb. 34). Der relative mittlere Level an 3-Nitrotyrosinein der SOD3-kompetenten Kontrolle bei Normoxie wurde als Referenz als  $C_{3\text{-NT}} = 1,000$  definiert. Der Vergleichswert bei eingeschränkter SOD3-Aktivität betrug  $C_{3\text{-NT}} = 2,642$  (Normoxie SOD3-E124D). Nach Hypoxie fiel in beiden Versuchsgruppen die relative Konzentration an 3-Nitrotyrosine ab (Hypoxie SOD3-kompetente Kontrolle:  $C_{3\text{-NT}} = 0,490$ ; Hypoxie SOD3-E124D:  $C_{3\text{-NT}} = 1,492$ ). Die relative 3-Nitrotyrosinekonzentration nach Hypoxie betrug damit in Kardiomyozyten mit verminderter SOD3-Aktivität 304 % der Konzentration in SOD3-kompetenten Herzmuskelzellen (Abb. 34) [82].

**Abbildung 34: Western Blot Kardiomyozyten 3-Nitrotyrosine**



**Abb. 34** Western Blot der relativen Konzentration an 3-Nitrotyrosine in adulten Kardiomyozyten. Vergleich von Zellkulturproben ohne den Einfluss von Hypoxie (Normoxie) mit Proben nach vierstündiger Hypoxie mit 1 % Sauerstoff (Hypoxie) für die verschiedenen Genotypen (ISO SOD3-kompetente Kontrolle: Normoxie Kontrolle, n = 3 (Referenz, Mittelwert per Definition:  $C_{3-NT} = 1,000$ ), Hypoxie Kontrolle, n = 3; ISO SOD3-E124D: Normoxie SOD3-E124D, n = 3, Hypoxie SOD3-E124D, n = 3). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (3-NT: 130 kDa; Proteinfärbung: 50 kDa) [82].

Durch die Western Blot-Analysen konnten direkte Effekte der SOD3 auf regulatorische Prozesse in Herzmuskelzellen im Rahmen von I/R-Schädigung nachgewiesen werden. Diese deckten sich mit den molekularbiologischen Organeffekten aus dem kardiovaskulären System (s. 3.1.6).

## 3.2 Der Kalziumsensitizer Levosimendan

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden zu großen Teilen in der zugehörigen Publikation von Immohr *et al.* [61] veröffentlicht. Zur Erleichterung des Leseflusses wurde darauf verzichtet nach jedem Ergebnis einzeln auf die Publikation zu verweisen. Stattdessen sind die entsprechenden Ergebnisse abschnittsweise als Zitat gekennzeichnet.

### 3.2.1 Vitalparameter

Wie beschrieben wurden während des gesamten Experiments die Vitalparameter der Tiere überwacht und zu definierten Zeitpunkten protokolliert. Zum Startzeitpunkt ( $t_1$ ) betrug die Herzfrequenz der Vehikelkontrollen durchschnittlich  $HF = 292 \pm 11$  /min und unterschied sich damit nicht maßgeblich von der Levosimendangruppe ( $HF = 266 \pm 24$  /min) (Abb. 35). Nach Anschluss an die HLM und Einsetzen der Kühlung fiel die Herzfrequenz in beiden Gruppen bis zum Beginn des DHCA vergleichbar ab ( $t_6$ : Vehikelkontrolle:  $HF = 37 \pm 6$  /min; Levosimendan:  $HF = 40 \pm 0$  /min). Nach Beendigung des Kreislaufstillstandes und Wiederaufnahme der Perfusion über die EKZ erholte sich die Herzfrequenz in Tieren mit präventiver Levosimendantherapie zunächst schneller ( $t_7$ : Vehikelkontrolle:  $HF = 60 \pm 14$  /min; Levosimendan:  $HF = 170 \pm 60$  /min, + 183 %, Cohen's d = 2,10, Power = 73,8 %). In der Reperfusion zeigte sich jedoch eine Verschlechterung der Herzfrequenz der mit Levosimendan behandelten Tieren gegenüber den Kontrollen. Zum Zeitpunkt der Euthanasie ( $t_{12}$ ) betrug die durchschnittliche Herzfrequenz für Kontrolltiere  $HF = 274 \pm 23$  /min und für Levosimendan  $HF = 193 \pm 98$  /min (Cohen's d = 1,28, Power = 35,8 %) (Abb. 35) [61].

Zu Beginn ( $t_2 - t_5$ ) war der MAD in der Levosimendangruppe gegenüber den Kontrollen erhöht ( $t_2$ : Kontrolle:  $MAD = 69 \pm 9$  mmHg, Levosimendan:  $MAD = 91 \pm 4$  mmHg) (Abb. 36). Nach dem Kreislaufstillstand zeigten sich, bedingt durch medikamentöses Druckmanagement, keine Unterschiede im Blutdruck ( $t_{12}$ : Kontrolle:  $MAD = 44 \pm 16$  mmHg, Levosimendan:  $MAD = 41 \pm 2$  mmHg) (Abb. 36), während sich in beiden Gruppen eine Hypotension einstellte [61].

Abbildung 35: Verlauf der Herzfrequenz während des Versuchs

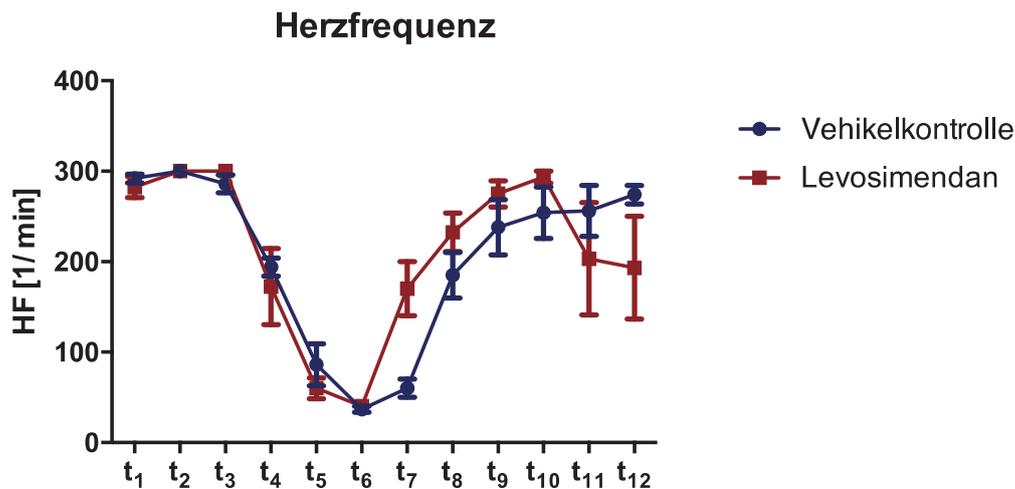


Abb. 35 Während der gesamten Versuchszeit wurde die Herzfrequenz beider Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) mit einem Monitor überwacht (t<sub>1</sub>: vor Kanülierung, t<sub>2</sub>: Kannülierung, t<sub>3</sub>: EKZ Beginn, t<sub>4</sub>: 15 min Kühlung, t<sub>5</sub>: 25 min Kühlung, t<sub>6</sub>: Kreislaufstillstand, t<sub>7</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>8</sub>: 27,5 °C Wiedererwärmung, t<sub>9</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>10</sub>: 15 min Reperfusion, t<sub>11</sub>: 45 min Reperfusion, t<sub>12</sub>: vor Euthanasie) [61].

Abbildung 36: Verlauf des Blutdrucks während des Versuchs

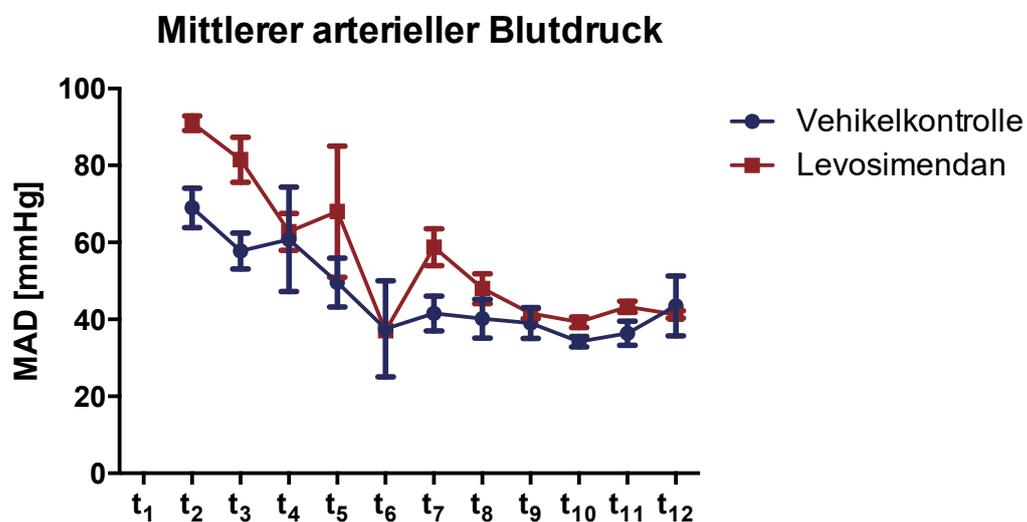


Abb. 36 Während der gesamten Versuchszeit wurde der mittlere arterielle Blutdruck beider Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) mit einem Monitor überwacht (t<sub>1</sub>: vor Kanülierung, t<sub>2</sub>: Kannülierung, t<sub>3</sub>: EKZ Beginn, t<sub>4</sub>: 15 min Kühlung, t<sub>5</sub>: 25 min Kühlung, t<sub>6</sub>: Kreislaufstillstand, t<sub>7</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>8</sub>: 27,5 °C Wiedererwärmung, t<sub>9</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>10</sub>: 15 min Reperfusion, t<sub>11</sub>: 45 min Reperfusion, t<sub>12</sub>: vor Euthanasie) [61].

Die Körpertemperatur entsprach dem Versuchsprotokoll und unterschied sich zwischen den beiden Gruppen nicht (Abb. 37).

Abbildung 37: Verlauf der Körpertemperatur während des Versuchs

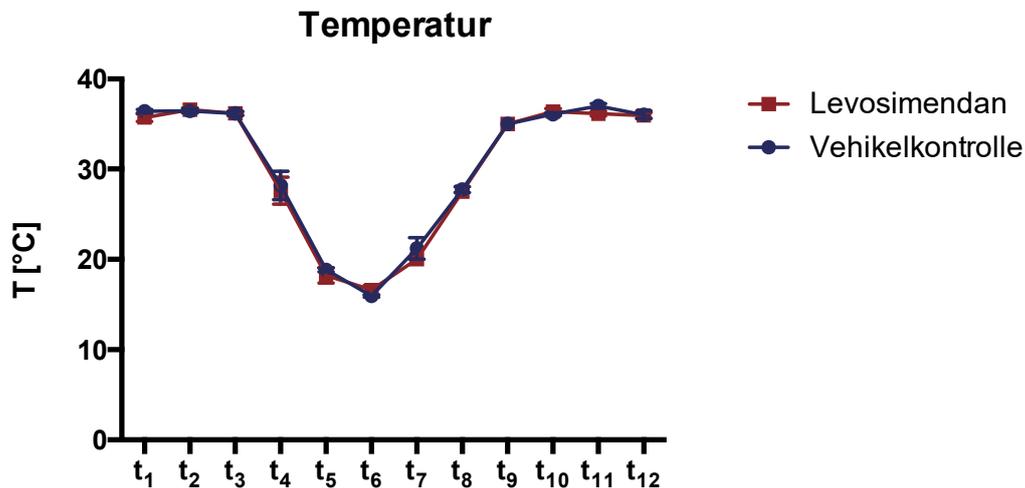


Abb. 37 Während der gesamten Versuchszeit wurde rektal die Körpertemperatur beider Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) mit einem Monitor überwacht (t<sub>1</sub>: vor Kanülierung, t<sub>2</sub>: Kanülierung, t<sub>3</sub>: EKZ Beginn, t<sub>4</sub>: 15 min Kühlung, t<sub>5</sub>: 25 min Kühlung, t<sub>6</sub>: Kreislaufstillstand, t<sub>7</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>8</sub>: 27,5 °C Wiedererwärmung, t<sub>9</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>10</sub>: 15 min Reperfusion, t<sub>11</sub>: 45 min Reperfusion, t<sub>12</sub>: vor Euthanasie).

### 3.2.2 Intraoperative Blutgasanalyse

Zu sechs definierten Zeitpunkten (t<sub>A</sub>: Kanülierung, t<sub>B</sub>: EKZ-Beginn, t<sub>C</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>D</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>E</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>F</sub>: Euthanasie) wurden Blutgasanalysen und Zellzählungen von Blutproben durchgeführt. Zu Beginn der Kanülierung zeigten sich keine Unterschiede in der Plasmakonzentration von Kalium zwischen der Vehikelkontrolle ( $C_{\text{Kalium}} = 5,13 \pm 0,67$  mmol/l) und der Levosimendangruppe ( $C_{\text{Kalium}} = 5,0 \pm 0,2$  mmol/l) (Abb. 38). Während der Reperfusion zeigte sich ein Anstieg der Kaliumkonzentration in beiden Gruppen. Zum Zeitpunkt t<sub>F</sub> (Euthanasie) betrug die durchschnittliche Konzentration  $C_{\text{Kalium}} = 10,28 \pm 0,89$  mmol/l (Vehikelkontrolle) respektive  $C_{\text{Kalium}} = 12,6 \pm 3,24$  mmol/l (Levosimendan). Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ( $p = 0,254$ ) [61].

Abbildung 38: Verlauf der Kaliumkonzentration im Plasma

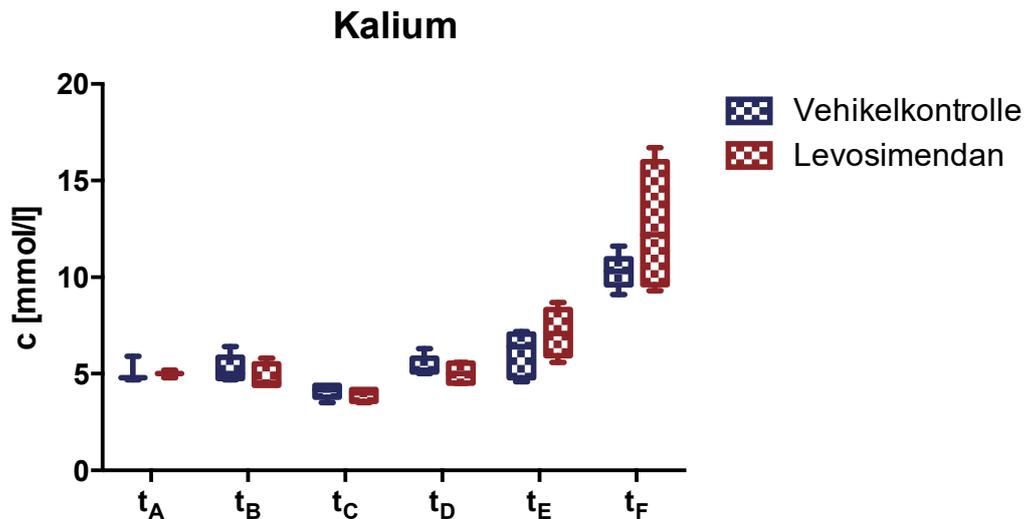


Abb. 38 Zu sechs Zeitpunkten wurde die Kaliumkonzentration im Plasma beider Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) mit einem BGA-Gerät gemessen (t<sub>A</sub>: Kanülierung, t<sub>B</sub>: EKZ-Beginn, t<sub>C</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>D</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>E</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>F</sub>: Euthanasie) [61].

Die Laktatkonzentration im Plasma war in beiden Gruppen bis zum DHCA annähernd konstant (t<sub>A</sub>: Vehikelkontrolle: C<sub>Laktat</sub> = 2,10 ± 0,95 mmol/l, Levosimendan: C<sub>Laktat</sub> = 2,40 ± 0,76 mmol/l; t<sub>C</sub>: Vehikelkontrolle: C<sub>Laktat</sub> = 3,48 ± 1,02 mmol/l, Levosimendan: C<sub>Laktat</sub> = 4,53 ± 2,53 mmol/l) (Abb. 39). Mit Beginn der Wiedererwärmung stieg die Laktatkonzentration in beiden Versuchsgruppen stark an. Bei Euthanasie zeigten Tiere nach präventiver Levosimendanapplikation eine nicht-signifikant erhöhte (p = 0,214) Laktatkonzentration (Vehikelkontrolle: C<sub>Laktat</sub> = 35,0 ± 8,86 mmol/l, Levosimendan: C<sub>Laktat</sub> = 45,25 ± 14,13 mmol/l) (Abb. 39) [61].

Auch die Sauerstoffsättigung wurde durch regelmäßige Blutgasanalysen kontrolliert. Es konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt werden. Alle Tiere zeigten durchgehend gute Sättigungswerte (Abb. 40).

Abbildung 39: Verlauf der Laktatkonzentration im Plasma

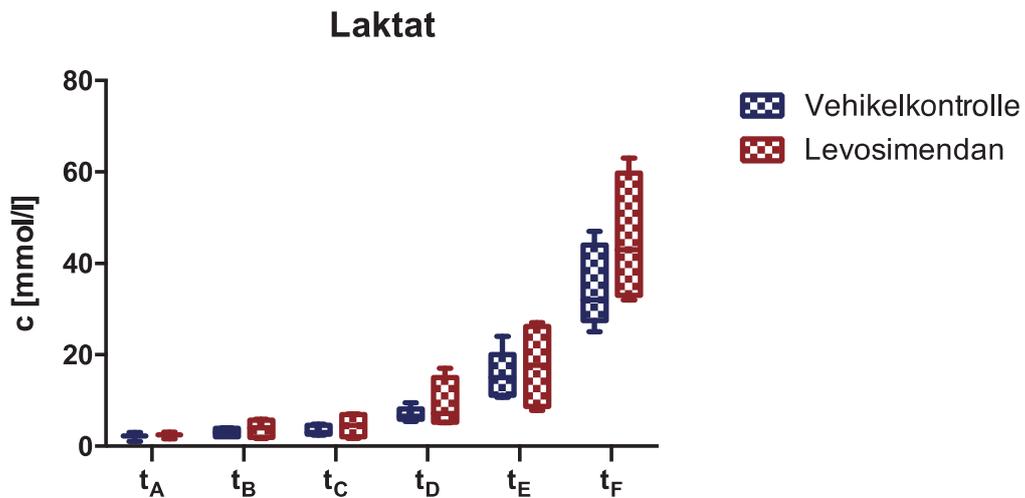


Abb. 39 Zu sechs Zeitpunkten wurde die Laktatkonzentration im Plasma beider Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) mit einem BGA-Gerät gemessen (t<sub>A</sub>: Kanülierung, t<sub>B</sub>: EKZ-Beginn, t<sub>C</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>D</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>E</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>F</sub>: Euthanasie) [61].

Abbildung 40: Verlauf der Sauerstoffsättigung während des Versuchs

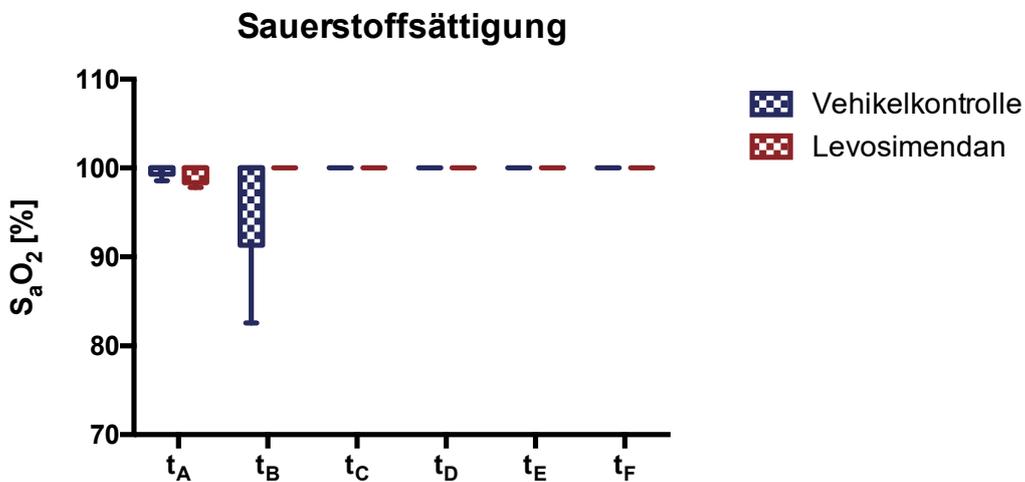
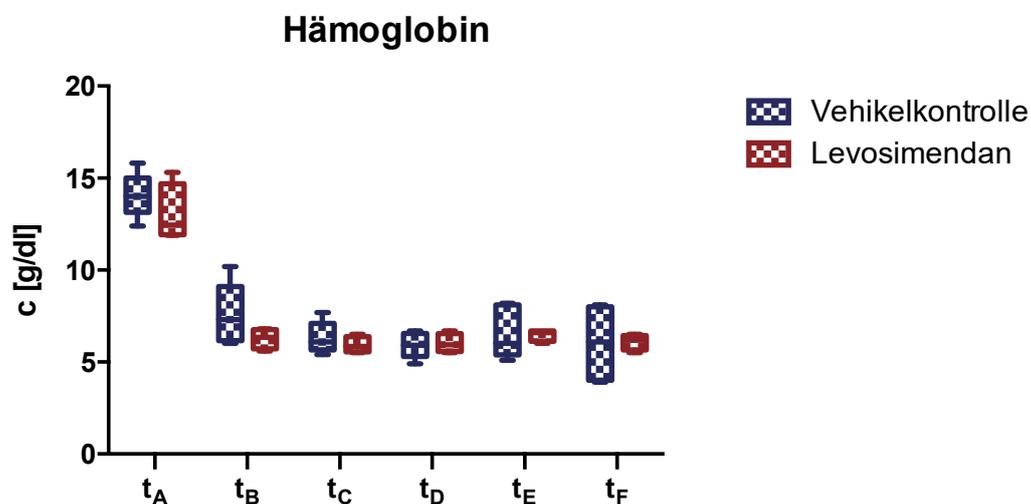


Abb. 40 Zu sechs Zeitpunkten wurde die Sauerstoffsättigung des Blutes beider Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) mit einem BGA-Gerät gemessen (t<sub>A</sub>: Kanülierung, t<sub>B</sub>: EKZ-Beginn, t<sub>C</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>D</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>E</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>F</sub>: Euthanasie).

Auch die Analyse der Hämoglobinwerte ergab keine Gruppenunterschiede. Aufgrund des *Primings* der HLM zwischen den Zeitpunkten  $t_A$  und  $t_B$  kam es zu einer ausgeprägten Hämodilution und damit zum Abfall der Hämoglobinkonzentration von von  $C_{Hb} = 14,06 \pm 1,08$  g/dl auf  $C_{Hb} = 7,56 \pm 1,50$  g/dl (Vehikelkontrolle) respektive von  $C_{Hb} = 13,03 \pm 1,58$  g/dl auf  $C_{Hb} = 6,28 \pm 0,54$  g/dl (Levosimendan) (Abb. 41). Im weiteren Verlauf zeigte sich keine weitere Dynamik der Werte. Zur Euthanasie betrug die Hämoglobinkonzentration  $C_{Hb} = 6,02 \pm 1,79$  g/dl (Vehikelkontrolle) sowie  $C_{Hb} = 6,10 \pm 0,43$  g/dl (Levosimendan) (Abb. 41).

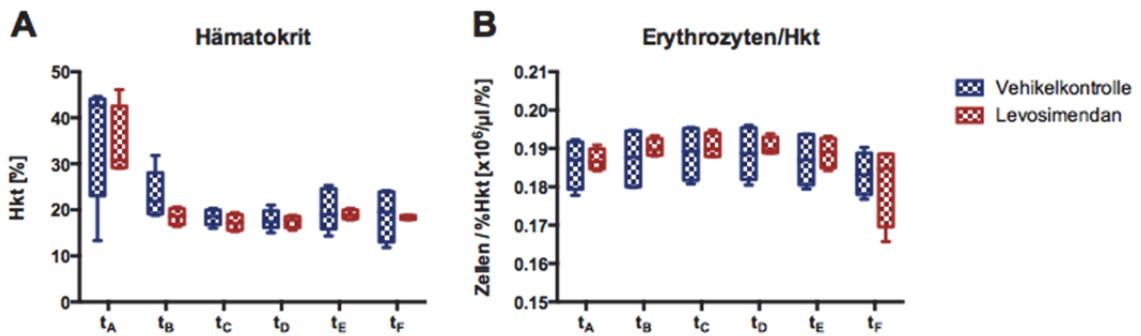
Abbildung 41: Verlauf der Hämoglobinkonzentration während des Versuchs



**Abb. 41** Zu sechs Zeitpunkten wurde die Hämoglobinkonzentration im Blut beider Gruppen (Vehikelkontrolle,  $n = 5$ ; Levosimendan,  $n = 4$ ) mit einem BGA-Gerät gemessen ( $t_A$ : Kanülierung,  $t_B$ : EKZ-Beginn,  $t_C$ : 25 °C Kühlung,  $t_D$ : 20 °C Wiedererwärmung,  $t_E$ : 35 °C Wiedererwärmung,  $t_F$ : Euthanasie). Durch das *Priming* der Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution.

Auch die Werte für den Hämatokrit (Abb. 42A) und die Erythrozytenzahl (Abb. 42B) zeigten keine Gruppenunterschiede. Analog zur Hämoglobinkonzentration ließ sich auch ein Abfall des Hämatokritwertes bedingt durch die Hämodilution mit Anschluss an die HLM feststellen (Abb. 42B).

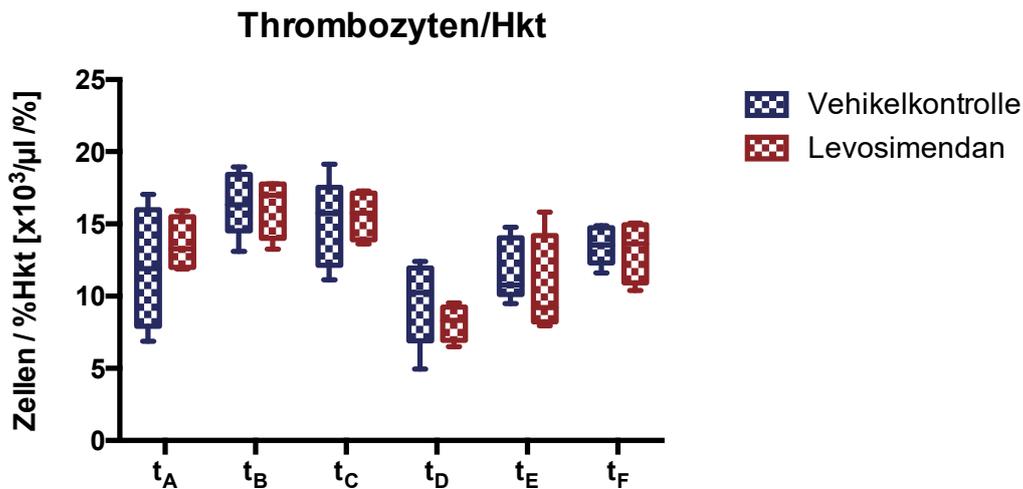
Abbildung 42: Verlauf des Hämatokrit und der Erythrozytenzahl im peripheren Blut



**Abb. 42** Zu sechs Zeitpunkten wurde der Hämatokrit (A) und die Erythrozytenzahl (B) im Blut beider Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) durch Laboruntersuchungen gemessen (t<sub>A</sub>: Kanülierung, t<sub>B</sub>: EKZ-Beginn, t<sub>C</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>D</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>E</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>F</sub>: Euthanasie). Durch das *Priming* der Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Zeitpunkten zu gewährleisten, wurden die Werte der korpuskulären Blutbestandteile auf den Hämatokrit normiert.

Die Thrombozyten fielen zwischen der Kanülierung und dem DHCA in beiden Gruppen in ähnlichem Ausmaß ab (t<sub>A</sub>: Vehikelkontrolle: Thrombozyten/Hkt =  $11,93 \pm 3,65 \times 10^3/\mu\text{l} / \% \text{Hkt}$ , Levosimendan: Thrombozyten/Hkt =  $13,59 \pm 1,86 \times 10^3/\mu\text{l} / \% \text{Hkt}$ ; t<sub>D</sub>: Vehikelkontrolle: Thrombozyten/Hkt =  $9,59 \pm 2,61 \times 10^3/\mu\text{l} / \% \text{Hkt}$ , Levosimendan: Thrombozyten/Hkt =  $8,17 \pm 1,24 \times 10^3/\mu\text{l} / \% \text{Hkt}$ ) (Abb. 43). Bis zur Euthanasie stieg dieser Wert jedoch in beiden Gruppen wieder an (t<sub>F</sub>: Vehikelkontrolle: Thrombozyten/Hkt =  $13,52 \pm 1,18 \times 10^3/\mu\text{l} / \% \text{Hkt}$ , Levosimendan: Thrombozyten/Hkt =  $13,18 \pm 2,15 \times 10^3/\mu\text{l} / \% \text{Hkt}$ ) (Abb. 43).

Abbildung 43: Verlauf der Thrombozytenzahl im peripheren Blut



**Abb. 43** Zu sechs Zeitpunkten wurde die Thrombozytenzahl im Blut beider Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) durch Laboruntersuchungen gemessen (t<sub>A</sub>: Kanülierung, t<sub>B</sub>: EKZ-Beginn, t<sub>C</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>D</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>E</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>F</sub>: Euthanasie). Durch das *Priming* der Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Zeitpunkten zu gewährleisten, wurden die Werte der korpuskulären Blutbestandteile auf den Hämatokrit normiert.

Auch die Zahl zirkulierender Leukozyten im Blut fiel zum DHCA in beiden Gruppen ab (t<sub>A</sub>: Vehikelkontrolle: Leukozyten/Hkt =  $0,29 \pm 0,08 \times 10^3/\mu\text{l} \text{ /\% Hkt}$ , Levosimendan: Leukozyten/Hkt =  $0,21 \pm 0,04 \times 10^3/\mu\text{l} \text{ /\% Hkt}$ ; t<sub>B</sub>: Vehikelkontrolle: Leukozyten/Hkt =  $0,11 \pm 0,04 \times 10^3/\mu\text{l} \text{ /\% Hkt}$ , Levosimendan: Leukozyten/Hkt =  $0,06 \pm 0,03 \times 10^3/\mu\text{l} \text{ /\% Hkt}$ ) (Abb. 44). Anschließend kam es in beiden Gruppen zu einem erneuten Anstieg der Leukozyten im Blut (t<sub>F</sub>: Vehikelkontrolle: Leukozyten/Hkt =  $0,31 \pm 0,02 \times 10^3/\mu\text{l} \text{ /\% Hkt}$ , Levosimendan: Leukozyten/Hkt =  $0,26 \pm 0,12 \times 10^3/\mu\text{l} \text{ /\% Hkt}$ ). In der Levosimendangruppe zeigte sich eine, verglichen mit Vehikelkontrollen, tendenziell erniedrigten Anzahl an Leukozyten in Blut (t<sub>A</sub>: -27 %, t<sub>B</sub>: -11 %, t<sub>C</sub>: -41 %, t<sub>D</sub>: -44 %, t<sub>E</sub>: -24 %, t<sub>F</sub>: -30 %) (Abb. 44).

Abbildung 44: Verlauf der Leukozytenzahl im peripheren Blut

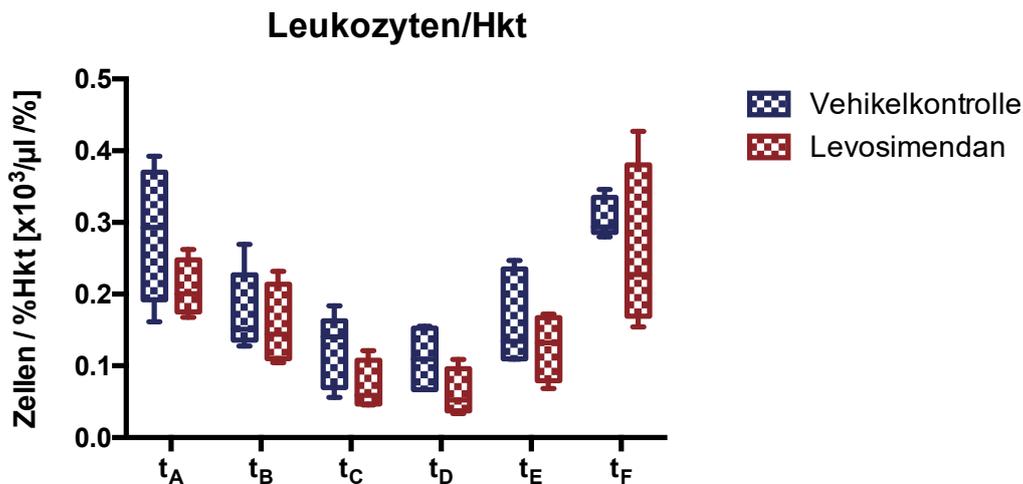
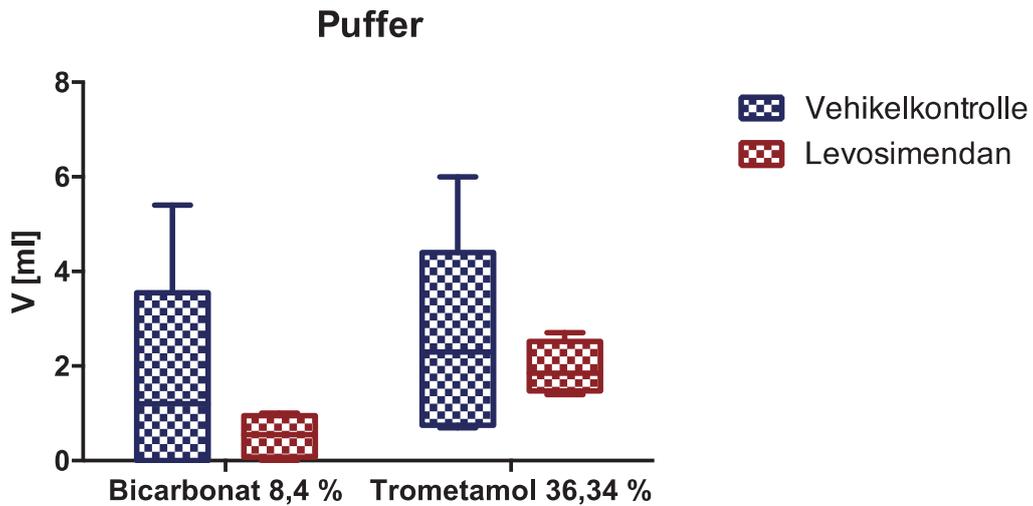


Abb. 44 Zu sechs Zeitpunkten wurde die Leukozytenzahl im Blut beider Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) durch Laboruntersuchungen gemessen (t<sub>A</sub>: Kanülierung, t<sub>B</sub>: EKZ-Beginn, t<sub>C</sub>: 25 °C Kühlung, t<sub>D</sub>: 20 °C Wiedererwärmung, t<sub>E</sub>: 35 °C Wiedererwärmung, t<sub>F</sub>: Euthanasie). Durch das *Priming* der Herz-Lungen-Maschine kam es mit Beginn der extrakorporalen Zirkulation zu einer Hämodilution. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Zeitpunkten zu gewährleisten, wurden die Werte der korpuskulären Blutbestandteile auf den Hämatokrit normiert.

### 3.2.3 Medikamentenapplikation

Zum Ausgleich von pH-Wertverschiebungen wurden Puffersubstanzen verabreicht. Vehikelkontrollen benötigten im Schnitt  $V_{\text{NaBic}} = 1,66 \pm 2,22$  ml Natriumbicarbonat sowie  $V_{\text{Tris}} = 2,52 \pm 2,15$  ml Trometamol (insgesamt  $V_{\text{Puffer}} = 4,18$  ml) (Abb. 45). Tiere, die vor Beginn der EKZ mit Levosimendan behandelt wurden, benötigten hingegen durchschnittlich lediglich  $V_{\text{NaBic}} = 0,53 \pm 0,46$  ml Natriumbicarbonat und  $V_{\text{Tris}} = 1,92 \pm 0,56$  ml Trometamol (insgesamt  $V_{\text{Puffer}} = 2,48$  ml) zum Erhalt der pH-Homöostase (Natriumbicarbonat: Cohen's d = 0,67, Power = 13,4 %; Trometamol: Cohen's d = 0,34, Power = 7,1 %) (Abb. 45) [61].

Abbildung 45: Applizierte medikamentöse Puffer



**Abb. 45** Während der gesamten Operation wurden beiden Gruppen (Vehikelkontrolle,  $n = 5$ ; Levosimendan,  $n = 4$ ) Medikamente verabreicht. Zur Einstellung des pH-Wertes wurden Natriumbicarbonat (Bicarbonat 8,4 %) und Trometamol 36,34 % eingesetzt [61].

Zur Unterstützung der kardiovaskulären Funktion wurden Katecholamine eingesetzt. Gemäß der formulierten Ausschlusskriterien wurde Noradrenalin eingesetzt, um den MAD auf mindestens 40 mmHg zu stabilisieren. Vehikelkontrollen benötigten im Mittel  $V_{NA} = 0,3 \pm 0,26$  ml Noradrenalin (Abb. 46). Durch präventive Levosimendanapplikation konnte eine Reduktion des benötigten Noradrenalins um 83 % ( $V_{NA} = 0,05 \pm 0,06$  ml) erzielt werden (Cohen's  $d = 1,23$ , Power = 33,6 %) (Abb. 46). Gleichzeitig benötigten die Tiere in der Levosimendangruppe 30 % weniger Adrenalin (Vehikelkontrolle:  $V_A = 0,32 \pm 0,46$  ml, Levosimendan:  $V_A = 0,23 \pm 0,39$  ml; Cohen's  $d = 0,22$ , Power = 5,9 %) (Abb. 46) [61].

Abbildung 46: Applizierte Katecholamine

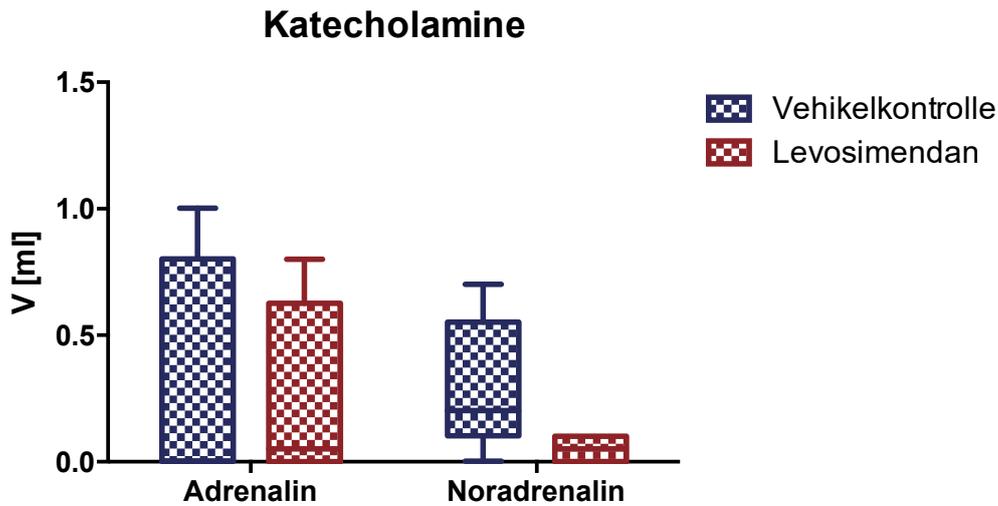
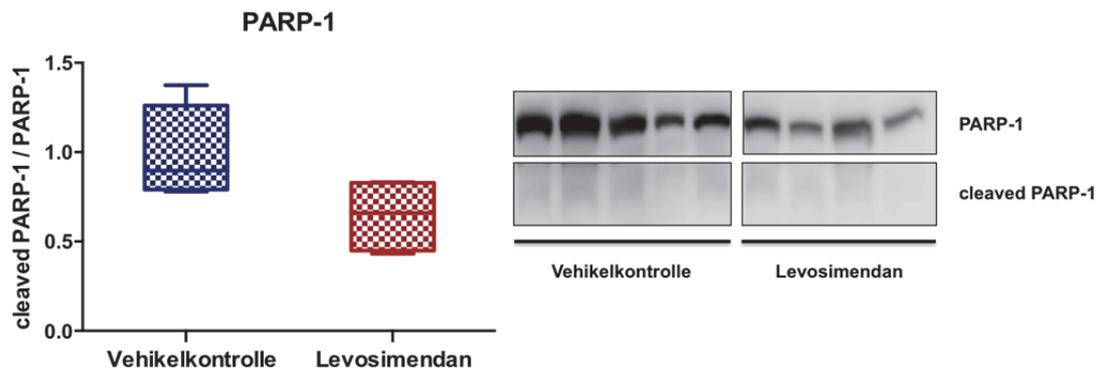


Abb. 46 Während der gesamten Operation wurden beiden Gruppen (Vehikelkontrolle, n = 5; Levosimendan, n = 4) Medikamente verabreicht. Zur Unterstützung der kardiovaskulären Funktion wurden Katecholamine (Adrenalin, Noradrenalin) eingesetzt [61].

### 3.2.4 Proteinarbeiten

Zur Untersuchung möglicher Veränderungen des Proteingehaltes und der Proteinphosphorylierung im Zusammenhang mit Levosimendan wurden interessante Zielproteine mittels Western Blots von Herzgewebeproben semiquantitativ untersucht. Um Veränderungen im Apoptoseverhalten zu untersuchen, wurden Western Blots des Proteins PARP-1 und dessen Spaltprodukt *cleaved* PARP-1, welches im Rahmen des Apoptoseprozesses vermehrt gebildet wird, durchgeführt. Das mittlere relative Verhältnis von *cleaved* PARP-1/PARP1 in Vehikelkontrollen wurde als Referenz als rel. Spaltung = 1,000 definiert. Nach Levosimendangabe wurde eine Reduktion der relativen Spaltung um durchschnittlich 35 % auf rel. Spaltung = 0,645 (p = 0,191, Cohen's d = 1,5, Power = 46,3 %) festgestellt (Abb. 47).

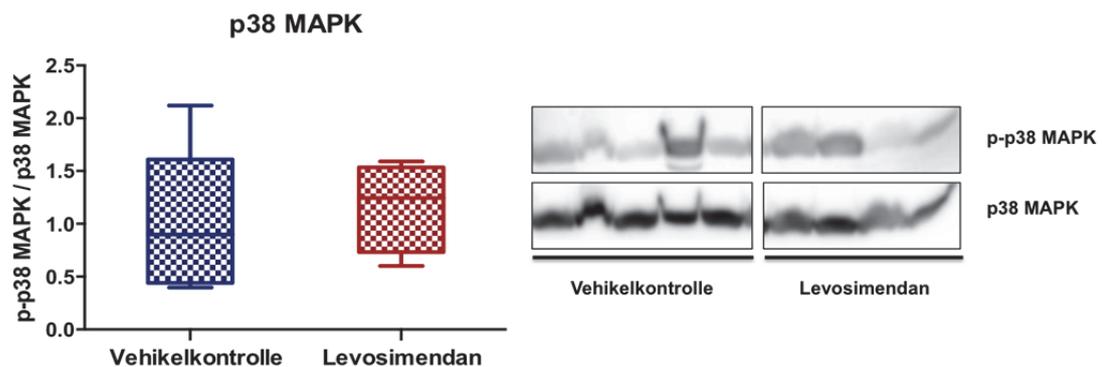
**Abbildung 47: Western Blot PARP-1**



**Abb. 47** Untersuchung der relativen PARP-1-Spaltung im Herzen mittels Western Blot. (Vehikelkontrolle, n = 5 (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Spaltung = 1,000); Levosimendan, n = 4). Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (PARP-1: 116 kDa; cleaved PARP-1: 89 kDa) [61].

Die relative durchschnittliche Aktivierung der p38 MAPK konnte durch die Gabe von Levosimendan gesteigert werden (Abb. 48). Im Vergleich zu Vehikelkontrollen zeigte sich ein Anstieg der relativen p38 MAPK Aktivierung (Phosphorylierung) durch Levosimendan um 17 % ( $p = 0,413$ , Cohen's d = 0,29, Power = 6,5 %) (Abb. 48) [61].

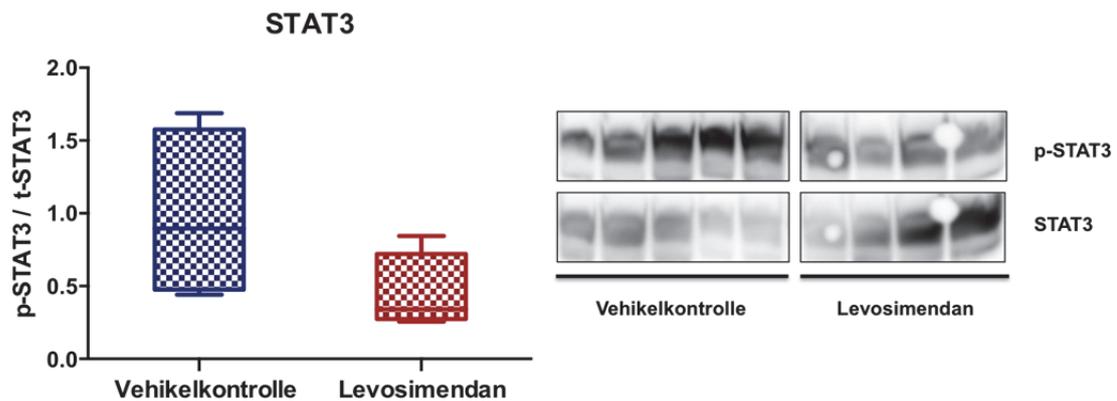
**Abbildung 48: Western Blot p38 MAPK**



**Abb. 48** Western Blot relative Aktivierung der p38 MAPK im Herzen. (Vehikelkontrolle, n = 5 (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Aktivierung = 1,000); Levosimendan, n = 4) . Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (p-p38 MAPK: 43 kDa; p38 MAPK: 43 kDa) [61].

Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Levosimendangruppe gegenüber den Vehikelkontrollen eine Abnahme der Aktivierung des STAT3 um 55 % ( $p = 0,06$ , Cohen's  $d = 1,21$ , Power = 32,7 %) (Abb. 49) [61].

Abbildung 49: Western Blot STAT3



**Abb.49** Western Blot relative Aktivierung der STAT3 im Herzen. (Vehikelkontrolle,  $n = 5$  (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Aktivierung = 1,000); Levosimendan,  $n = 4$ ) . Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (p-STAT3: 86 kDa, 79 kDa; STAT3: 86 kDa, 79 kDa) [61].

Die relative Aktivierung der AKT im Herzen wurde durch die präventive Therapie mit Levosimendan nicht beeinflusst (Vehikelkontrolle: Referenz, per Definition: rel. Aktivierung = 1,000, Levosimendan: rel. Aktivierung = 1,074) (Abb. 50) [61].

Abbildung 50: Western Blot AKT

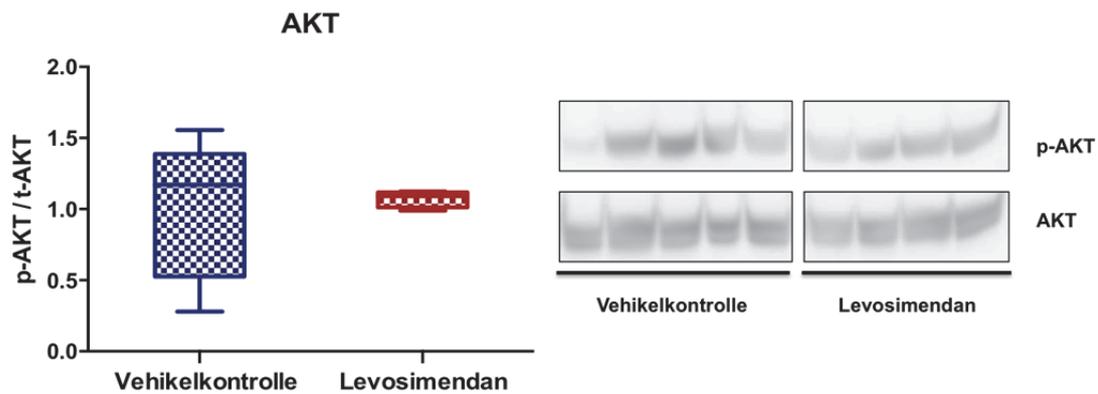


Abb. 50 Western Blot relative Aktivierung der AKT im Herzen. (Vehikelkontrolle, n = 5 (Referenz, Mittelwert per Definition: rel Aktivierung = 1,000); Levosimendan, n = 4) . Links semiquantitative, Densitometrie-basierte Auswertung; rechts: Aufnahmen der entsprechenden Banden (p-AKT: 60 kDa; AKT: 60 kDa) [61].

## 4 Diskussion

### 4.1 Die extrazelluläre Superoxiddismutase

Der erste Teil dieser Arbeit behandelt den Einfluss der extrazellulären Superoxiddismutase auf I/R-Schäden im Zusammenhang mit EKZ. Hierfür wurde ein Rattenstamm mit verminderter Enzymaktivität bei erhaltener Expression sowie ein speziell zugeschnittenes Kleintiermodell mit EKZ und globalem hypothermen Kreislaufstillstand verwendet. Unter diesen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass eine Verminderung der Enzymaktivität der SOD3 die I/R-Schädigung verstärkt.

#### SOD-Aktivität beeinflusst das klinische *Outcome* nach I/R

Während der EKZ wurden die Vitalparameter des Tieres aufgezeichnet. Zu Beginn des Versuches war die Herzfrequenz in beiden Gruppen nahezu identisch. Es zeigte sich während der Kühlung jedoch ein schnelleres Absinken der Herzfrequenz im Zusammenhang mit verminderter SOD3-Aktivität. Gleichzeitig kam es in der Reperfusion zu einer deutlichen Verminderung der Herzfrequenz im Vergleich mit

SOD3-kompetenten Kontrollen [82]. Bedenkt man die wesentlich höhere physiologische Herzfrequenz der Tiere, ergibt sich demnach elektrokardiografisch ein Nachteil der Tiere mit verminderter Enzymaktivität hinsichtlich der post-ischämischen Kreislaufstabilität. Dieser Trend bestätigte sich auch hinsichtlich des arteriellen Blutdrucks. Während der MAD vor Beginn der EKZ in der SOD3-E124D-Gruppe im Vergleich zur SOD3-kompetenten Kontrolle im Durchschnitt erhöht war, kam es im weiteren Versuchsverlauf zu einem deutlichen Abfall des MAD. Zum Zeitpunkt der Euthanasie betrug der MAD in der Kontrolle 61 % des ursprünglichen Ausgangswertes. Verminderte SOD3-Aktivität resultierte gar in einem MAD von lediglich 45 % des Ausgangswertes vor EKZ [82]. Herzfrequenz und Blutdruck sind entscheidende Kreislaufparameter. So stellt erniedrigter systolischer Blutdruck einen Risikofaktor für erhöhte Mortalität und Morbidität bei Patienten mit Herzversagen dar [92, 93]. Zudem konnten Makita *et al.* [94] in einer klinischen Studie zeigen, dass auch Bradykardie ein Risiko für Herzkreislauferkrankungen darstellt und die Mortalität erhöht. Die aufgezeigten Ergebnisse deuten auf eine Verstärkung dieser Effekte durch verminderte SOD3-Aktivität im Organismus hin.

Hinsichtlich der Körpertemperatur, welche durch den Versuchsaufbau vorgegeben wurde, ergaben sich modellbedingt keine Besonderheiten; die dargestellten Ergebnisse sind vielmehr als eine Validierung des Modells zu betrachten. Auch die pulsoxymetrisch gemessene periphere Sauerstoffsättigung zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Darüber hinaus haben außerdem die Konzentration an Hämoglobin, der Hämatokrit sowie die Anzahl an Erythrozyten im Blut einen Einfluss auf die induzierte Gewebhypoxie. Durch das *Priming* der HLM kam es zu Beginn der EKZ zu einer relevanten Hämudilution. Dementsprechend fielen die Hämoglobinkonzentration und der Hämatokrit zwischen den Zeitpunkten t1 (vor EKZ) und t2 (25 °C Kühlung) in beiden Gruppen jeweils ab. Es zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Ein Einfluss auf das Ausmaß der Hypoxie in den beiden Gruppen aufgrund unterschiedlicher Hämoglobinkonzentrationen, Hämatokritwerte und Erythrozytenzahlen erscheint demnach unwahrscheinlich.

Auch die Thrombozyten zeigten normiert auf den Hämatokritwert keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Es kam jedoch im Versuchsverlauf zunächst zu einem

Abfall der Thrombozytenzahl im Verlauf der Kühlung. Mit Beginn der Wiedererwärmung zeigte sich anschließend auch ein Wiederanstieg der Thrombozyten im Blut. Diese Dynamik konnte auch von de Vrij *et al.* [95] in Untersuchungen von verschiedenen Nagetieren nachgewiesen werden. Hier kann am ehesten eine Verlagerung oder auch relative Konzentration der Plättchen in peripheren Organen bzw. kleinkalibrigen Gefäßen als eine mögliche Ursache für diese Beobachtung angenommen werden, wie sie auch von de Vrij *et al.* [95] postuliert wird.

Während der Kühlung kam es ebenfalls zu einem Abfall der Leukozyten im Blutbild beider Gruppen. Im Laufe der Reperfusion ergab sich ein Wiederanstieg der Leukozyten. Zur Euthanasie zeigte sich eine um fast ein Drittel höhere Leukozytenzahl in den SOD3-defizienten Tieren. Diese relative Leukozytose kann als Anzeichen erhöhter Inflammation durch verminderte SOD3-Aktivität gedeutet werden und wird im Zusammenhang mit I/R-Schädigung beschrieben [28]. Diese Inflammation ist typisch für I/R-Schädigung und kann in ein SIRS sowie MODS übergehen [62].

Die Überwachung der Laborwerte durch Blutgasanalysen offenbarte während der Reperfusion einen deutlichen Anstieg der Kaliumkonzentration im Serum. Die Kaliumkonzentration lag bei Euthanasie in beiden Gruppen deutlich oberhalb des physiologischen Normbereichs. Zusätzlich zeigte sich eine im Mittel erhöhte Kaliumkonzentration in der Gruppe mit verminderter SOD3-Aktivität [82]. Ebenso stieg die Laktatkonzentration im Serum der beiden Versuchsgruppen. Abschließend besaßen Tiere mit SOD3-Defizienz eine höhere Serumkonzentration als die SOD3-kompetenten Kontrollgruppe [82]. Kalium und Laktat gelten als Marker für Zellschädigung und Hypoxie. Der deutliche Anstieg dieser Marker ist für Kleintier-EKZ-Modelle typisch und deckt sich mit Ergebnissen in der Literatur [28, 96, 97]. Dadurch konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit EKZ und I/R in beiden Gruppen eine starke Gewebeschädigung induziert wurde. Der Umfang dieser I/R-Schäden war in der SOD3-E124D-Gruppe zusätzlich erhöht und die klinische Prognose daher verschlechtert. Obal *et al.* [57] konnten in transgenen Mäusen mit SOD3-Überexpression eine Verminderung der Infarktgröße und verbesserte Regeneration des infarzierten Gebietes nach koronarer Okklusion nachweisen. Da die SOD3-kompetente Kontrollgruppe im Vergleich zu den SOD3-E124D-Tieren auch eine relative

Überexpression der SOD3 besitzt, werden die in dieser Gruppe gemessenen geringeren Parameter der Zellschädigung durch die Ergebnisse von Obal *et al.* [57] unterstützt.

Die Tiere erhielten während des Versuchs Medikamente nach Bedarf, um möglichst physiologische Blutwerte zu erhalten. Die höheren Laktatkonzentrationen in Tieren mit verminderter SOD3-Aktivität erforderten auch ein erhöhtes Volumen von medikamentösen Puffern zur Korrektur des pH-Wertes und Therapie der Laktatazidose. Diese metabolische Azidose ist eine Folge von I/R-Schäden und unterstreicht die stärkere klinische Ausprägung der Schädigung in der SOD3-E124D-Gruppe [26]. Des Weiteren weist auch der erhöhte Katecholaminbedarf der Tiere mit verminderter SOD3-Aktivität auf ein schlechteres kardiovaskuläres *Outcome* hin (Abb. 17) [98].

Durch die Messung der SOD-Aktivität im Plasma konnte eine deutlich geringere Enzymaktivität bei vorliegender SOD3-E124D-Mutation nachgewiesen und das verwendete Tiermodell bestätigt werden. Der Grad der Plasmahämolyse stieg während der extrakorporalen Zirkulation wie erwartet an [91]. Da sich gleichzeitig keine Gruppenunterschiede feststellen ließen, ist davon auszugehen, dass die Hämolyse der Plasmaprobe keinen Einfluss auf die weiteren vergleichenden photometrischen Messungen der Proben genommen hat.

### **Einfluss eingeschränkter SOD3-Aktivität und I/R auf die Regulation der SOD-Isoformen**

Um zu untersuchen, ob die geringere Enzymaktivität der SOD3 Einfluss auf den Proteingehalt der verschiedenen SOD-Isoformen nimmt, wurde auf Proteinebene mittels Western Blot an Proben von Herz- und Aortengewebe sowie kultivierten adulten Kardiomyozyten der semiquantitativen Untersuchung der SOD-Isotypen nachgegangen. Hierbei zeigte sich sowohl im Herzen als auch in der Aorta, und ebenso in Kardiomyozyten unter Normoxie initial eine erhöhter relativer Proteingehalt der SOD3, was darauf hin deutet, dass verminderte Enzymaktivität der SOD3 zu einem kompensatorisch erhöhten Proteingehalt des Enzymproteins führt. Dies könnte eine Reaktion auf die erhöhten Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies im Gewebe darstellen. Eine ähnliche Regulation konnte im Zusammenhang mit ischämischer Kardiomyopathie gezeigt werden [99]. In kardiovaskulären Organproben kommt es

infolge der EKZ und I/R reaktiv sogar zu einer weiteren, signifikanten Steigerung der Enzymgehaltes bei vorliegendem Aktivitätsmangel. So zeigte sich nach der EKZ und I/R ein stark erhöhter SOD3-Proteingehalt im Herzen und ein deutlich erhöhter Proteingehalt in Aorten von den hier eingesetzten SOD3-Mutanten gegenüber vergleichbaren Proben aus SOD3-kompetenten Kontrollen [82]. In der Zellkultur hingegen ließ sich dieser Effekt nicht im Rahmen der reinen Hypoxie-Behandlung reproduzieren. Nach hypoxischer Inkubation konnten nur SOD3-kompetente Kontrollen den relative Enzymgehalt steigern. Es zeigte sich in beiden Gruppen ein ähnlicher relativer Proteingehalt [82]. Diese Diskrepanz zu den *in vivo*-Ergebnissen könnte darauf zurückgeführt werden, dass die zusätzliche Steigerung des Proteingehaltes in SOD3-E124D-Tieren entweder postischämisch einsetzt oder durch andere Zellarten als Kardiomyozyten übernommen werden. Diese Annahme wird durch Stralin *et al.* [52] gestützt, die zeigen konnten, dass SOD3 vornehmlich von vaskulären Glattmuskelzellen produziert wird. Ferner darf nicht übersehen werden, dass das komplexe *in vivo*-Modell eine echte, globale I/R verursacht, während das hier verwendete *in vitro*-Modell lediglich eine Hypoxie herbeiführt, sodass davon auszugehen ist, dass sich die Antwortmuster grundsätzlich unterscheiden könnten.

Der relative SOD1-Proteingehalt im Herzen von SOD3-defizienten Tieren war initial gegenüber den SOD3-kompetenten Kontrollen signifikant erhöht. Die I/R-Schädigung durch EKZ führte in SOD3-kompetenten Kontrollen zu keiner Änderung des Proteingehaltes. In SOD3-E124D-Hezen ließ sich hingegen eine Abnahme des relativen SOD1-Proteingehaltes gegenüber den Shamproben nachweisen [82]. *In vitro* führte eine Hypoxie zu einer deutlichen Steigerung des relativen SOD1-Proteingehalt in SOD-kompetenten Kontrollen, in Kardiomyozyten mit verminderter SOD3-Aktivität zeigte sich hingegen erneut eine Abnahme des SOD1-Proteingehaltes gegenüber dem Ausgangswert [82]. Die Abnahme des relativen SOD1-Proteingehaltes infolge von I/R-Schädigung und Hypoxie deutet auf eine tiefgreifende Fehlregulation in der SOD3-E124D-Gruppe hin. In der Literatur lassen sich hierzu nur sehr wenige Ergebnisse Dritter finden. Brahmajothi und Campbell [100] berichten von einer heterogenen Expression der SOD-Isoformen im Herzen und vermuten, dass keine gegenseitige Modulation stattfindet. Dies widerspricht der Hypothese einer kompensatorischen Steigerung des Proteingehaltes, die durch unsere Versuche in dem speziellen Modell des partiellen Funktionsverlustes (SOD3-E124D) gewonnen wurden.

Im Proteingehalt der mitochondrialen SOD2 zeigten sich im Herzgewebe keine Gruppenunterschiede und ebenso keine wesentlichen Regulationsmechanismen. In Kardiomyozyten konnte jedoch ein basal erhöhter relativer SOD2-Proteingehalt in Zellen mit verminderter SOD3-Aktivität nachgewiesen werden. Während in SOD3-kompetenten Kontrollen induziert durch Hypoxie ein Anstieg des relativen Proteingehaltes der SOD2 gemessen wurde, zeigte sich kein Anstieg des Proteingehaltes in SOD3-E124D-Kardiomyozyten. Die *in vitro*-Ergebnisse decken sich demnach mit denen des SOD1-Proteingehaltes [82]. Negoro *et al.* [101] vermuten, dass eine Aktivierung von STAT3 zu einer vermehrten Expression von SOD2 führt. Da die verminderte SOD3-Aktivität auch zu einer Verminderten STAT3-Aktivierung führt, könnte dies ursächlich für die fehlende Steigerung des SOD2-Proteingehaltes sein.

### **Einfluss der SOD3-E124D-Mutation auf intrazelluläre ROS**

Um mögliche zelluläre Veränderungen im Umgang mit ROS durch die SOD3-E124D-Mutation näher zu untersuchen, wurden *in vitro*-Assays an adulten Kardiomyozyten durchgeführt. Mithilfe des *CellROX*-Assays konnte die intrazelluläre Konzentration an ROS gemessen werden. Da es sich bei der SOD3 um eine extrazelluläre Isoform handelt, sollten vor allem der Proteingehalt der SOD1 und SOD2 Einfluss auf das Messergebnis nehmen. Verglichen mit SOD3-kompetenten Kontrollen zeigte sich intrazellulär eine signifikant geringere ROS-Konzentration in Kardiomyozyten mit verminderter SOD3-Aktivität. Dies könnte gegebenenfalls durch kompensatorisch verstärkt exprimierte intrazelluläre SOD-Isoformen verursacht werden. Diese Hypothese deckt sich mit dem Proteingehalt der SOD1 und SOD2 in *in vivo*-Shamproben, nicht jedoch mit dem Proteingehalt der *in vitro*-Proben. Leider lassen sich in der Literatur bisher keine vergleichbaren Untersuchungen finden, um diese These angemessen diskutieren zu können.

### **Verminderte SOD3-Aktivität steigert kardiale Apoptose bei I/R**

Die Spaltung von PARP-1 gilt als Apoptosemarker. So konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Zeitintervall von Ischämie, dem Ausmaß von Gewebeschäden und der relativen Spaltung von PARP-1 im kardiovaskulären System

von Kaninchen gibt [102]. In dem hier verwendeten *in vivo*-Modell führte die EKZ und I/R Behandlung wie erwartet in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose mit einem stärkeren Trend bei intrinsisch verminderter SOD3-Aktivität [82]. Ramlawi *et al.* [103] konnten ebenfalls zeigen, dass die Spaltung von PARP-1 sowie weitere Apoptosemarker nach EKZ in humanem Herzgewebe erhöht waren. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass die Spaltung von PARP-1 in humanen Herzbiopsien nach I/R-Schädigung in Proben mit kalter kristalloider Kardioplegie geringer war als in Proben ohne Kardioplegie [104]. Diese beiden Studien konnten demnach auf ähnliche Weise zeigen, dass EKZ und I/R-Schäden im Herzen mit der Spaltung von PARP-1 assoziiert sind und es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Schädigung und der relativen Spaltung von PARP-1 gibt. Sie unterstützen daher gemeinsam mit den Ergebnissen dieser Studie die Hypothese, dass die Enzymaktivität der SOD3 einen entscheidenden protektiven Einflussfaktor im Kontext von I/R-Schädigung darstellt. Während im konkreten SOD3-E124D Modell die Enzymaktivität unter basalen Bedingungen als ausreichend erscheint, um die Homöostase der Zellen in beiden Gruppen zu gewährleisten, scheint es durch EKZ einen Nachteil für die Gruppe mit verminderter SOD3-Aktivität zu geben.

### **SOD3 beeinflusst intrazelluläre Signalwege**

Weitere Proteinarbeiten wurden mit dem Ziel der näheren Aufklärung der potentiell regulierten intrazellulären Signalwege durchgeführt. Die p44-42 MAPK ist Teil des *Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway* und gilt als wichtiger protektiver und anti-apoptotischer Zellsignalweg im Zusammenhang mit kardiovaskulären I/R-Schäden [105]. In Shamproben von Herzen und Aorten zeigte sich – wie erwartet - kein Unterschied im relativen Aktivierungszustand der p44-42 MAPK zwischen den beiden Gruppen. In SOD3-kompetenten Kontrollen zeigte sich nach EKZ im Herzen ein Anstieg der relativen Aktivierung um ein Vielfaches sowie eine annähernde Verdopplung der relativen Aktivierung in der Aorta. In Proben mit verminderter SOD3-Aktivität ließ sich hingegen ein deutlich schwächerer Anstieg der Aktivierung nachweisen [82]. *In vitro* ließ sich basal eine erhöhte Aktivierung der p44-42 MAPK in SOD3-kompetenten Kardiomyozyten zeigen. Durch Hypoxie kam es jedoch zu einer Abnahme der relativen Aktivierung in dieser Gruppe, sodass sich hier ein konträres Bild

zu den *in vivo*-Experimenten ergibt. Obal *et al.* [57] konnten einen positiven Einfluss der SOD3 auf die p44-42 MAPK-Signalkaskade im Mausmodell nachweisen. Zusätzlich ist in der Literatur ein Zusammenhang zwischen der SOD3 und der Aktivierung der p44-42 MAPK beschrieben [58]. Dies unterstützt die *in vivo*-Ergebnisse sowie die Normoxieversuche in der Zellkultur. Verminderung der SOD3-Aktivität führt demnach zu einer Verminderung der Aktivierung der p44-42 MAPK und somit zu einer schlechteren Toleranz gegenüber I/R-Schäden. Die Ergebnisse der Hypoxieversuche sind jedoch ohne Weiteres nicht hinreichend zu deuten. Hier bedarf es weiterer Untersuchungen, die dann allerdings unter Berücksichtigung der zuvor genannten Limitationen der *in vitro*-Bedingungen weitere Faktoren einschließen sollten (Hypoxie vs. Ischämie, Monokultur von Kardiomyozyten vs. komplexe Interaktionen und praktische Aktivierungswege unterschiedlicher Zellarten, etc.).

STAT3 gehört zum *Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE)-pathway* und gilt im Zusammenhang von I/R-Schädigung ebenfalls als protektiver Zellsignalweg [106]. Durch EKZ kam es im Herzen zu einem Anstieg der relativen Aktivierung des STAT3. In SOD3-kompetenten Kontrollen zeigte sich jedoch ein höheres relatives Aktivierungsniveau als in SOD3-E124D-Organen. Auch in der Aorta und in der basalen Zellkultur mit adulten Kardiomyozyten ließ sich ein ähnliches Ergebnis reproduzieren [82]. Verminderte SOD3-Aktivität könnte demnach zu einer Verminderung der relativen STAT3-Aktivierung und zu einer Vergrößerung der Gewebeschädigung durch EKZ und I/R führen. Dies stellt einen möglichen Wirkmechanismus der verminderten SOD3-Aktivität jenseits der eigentlichen direkten Wirkweise des Abbaus von Superoxid dar.

Die AKT (Proteinkinase B) ist essenziell für das physiologische Herzwachstum und kann über die Regulation von Wachstumsfaktoren anti-apoptotisch und protektiv wirken und vor Gewebeschäden durch I/R und Hypoxie schützen [107, 108]. Während es im Herzen nach EKZ nur in SOD3-kompetenten Kontrollen zu einer deutlichen Steigerung der relativen Aktivität der AKT kam, ließ sich in Aorten in beiden Gruppen eine signifikante Steigerung nachweisen. Im Herzgewebe von SOD3-kompetenten Kontrollen wurde eine 1,8-fach größere postischämische Aktivierung der AKT nachgewiesen, in Aorten jedoch eine geringere Aktivierung. Laatikainen *et al.* [58] wiesen eine verstärkte Aktivierung der AKT im Zusammenhang mit erhöhter SOD3-

Aktivität nach. Dies unterstützt die Ergebnisse dieser Arbeit, die an Myokardproben gewonnen wurden, und stärkt die Hypothese, dass sich die SOD3 ebenfalls positiv auf die Aktivierung der AKT und demnach protektiv auf das kardiovaskuläre System nach I/R-Schädigung auswirkt.

### **Einfluss der SOD3-E124D-Mutation auf den Stickstoffstoffwechsel**

Die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid steht im kardiovaskulären System in direktem Zusammenhang mit der SOD3. Diese schützt nicht nur die Diffusion von NO im Gefäßmuskel, indem sie Superoxid abbaut und damit die Reaktion mit NO zu Peroxynitrit verhindert, sondern ist darüberhinaus mit der eNOS kolokalisiert [100]. Die eNOS gilt als wichtigste NO-Synthase im kardiovaskulären Gewebe. Im Herzen nahm der relative Proteingehalt der eNOS in beiden Gruppen infolge der EKZ und I/R ab. In SOD3-kompetenten Kontrollen wurde eine stärkere Abnahme des Proteingehaltes als in SOD3-E124D-Tieren beobachtet. Vor EKZ war der relative Proteingehalt der eNOS in der Aorta von Tieren mit verminderter SOD3-Aktivität im Durchschnitt ein Drittel niedriger als in SOD3-kompetenten Kontrollen. Durch EKZ und I/R kam es in beiden Gruppen zu einer Abnahme ähnlichen Umfangs [82]. Die beobachtete Abnahme des relativen eNOS-Proteingehalt könnte sowohl durch Auswaschungen aufgrund der künstlichen Perfusion als auch kompensatorisch, um der Bildung von Peroxynitrit entgegenzuwirken, bedingt sein. Interessanterweise erschien der basale eNOS-Proteingehalt bei verminderter SOD3-Aktivität leicht verringert, dies könnte mit der häufig beobachteten Hypertension in diesem Phänotyp zusammenhängen [109].

Zur näheren Untersuchung des nitrosativen Stresses durch die mögliche Bildung von Peroxynitrit wurde die Konzentration an 3-Nitrotyrosine im Herzgewebe sowie in isolierten adulten Kardiomyozyten analysiert. Im Herzen ließen sich keine signifikanten Unterschiede oder Regulationsmechanismen der Konzentration an 3-Nitrotyrosine nachweisen. In Shamproben zeigte sich jedoch zunächst tendenziell eine höhere Konzentration an 3-Nitrotyrosine in SOD3-kompetenten Kontrollen. Auch in Kardiomyozyten ließen sich bedingt durch große Streuung und die sehr kleine Gruppengröße keine signifikanten Effekte im Stickstoffmonoxidhaushalt nachweisen. Sowohl nach Normoxie als auch nach Hypoxie führte verminderte SOD3-Aktivität jedoch zu einer tendenziell erhöhten Konzentration an 3-Nitrotyrosine [82]. Dies deutet

auf eine fehlende Schutzwirkung der NO-Diffusion durch die SOD3, wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde, hin [57].

Um einen näheren Einblick in den intrazellulären NO-Haushalt zu bekommen, wurde mit adulten Kardiomyozyten ein *DAF-FM-Assay* durchgeführt. Auf diese Weise konnte die intrazelluläre Konzentration an NO gemessen werden. SOD3-defiziente Kardiomyozyten besaßen eine signifikant erniedrigte intrazelluläre NO-Konzentration. Dies könnte mit dem tendenziell geringeren basalen eNOS-Proteingehalt zusammenhängen, der auch im Herzen und der Aorta gefunden wurde, weist aber auch auf eine erheblich relevante Dysregulation des kardiovaskulären System infolge des partiellen SOD3-Funktionsverlustes hin. Nach der Inkubation mit Menadione sowie mit SOD1 war die intrazelluläre NO-Konzentration in dieser Gruppe jedoch gegenüber der SOD3-kompetenten Kontrolle erhöht. Da das Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Messung zu haben schien, bleibt die Ursache für diese Ergebnisse unklar. Leider finden sich hierfür bisher auch in der Literatur keine Erklärungen. Um abschließend zu klären, wie die SOD3-E124D-Mutation Einfluss auf die NO-Homöostase nimmt, sind demnach in Zukunft weitere experimentelle Arbeiten nötig.

Lob *et al.* [55] konnten zeigen, dass die SOD3 ein wichtiger Modulator des arteriellen Blutdrucks ist und diesen antagonistisch zu Angiotensin-II senken kann. In unserer Arbeit war der Blutdruck vor Beginn der EKZ in der Gruppe mit verminderter SOD3-Aktivität gegenüber den Kontrollen erhöht [82]. Gleichzeitig konnte zu OP-Beginn im Plasma eine gegenüber den SOD3-kompetenten Kontrollen erhöhte Konzentration an Angiotensin-II nachgewiesen werden. Unter der Annahme, dass der Effekt der SOD3 auf den Blutdruck durch direkte enzymatische Aktivität des aktiven Proteinzentrums verursacht wird, deckt sich dies mit dem von Lob *et al.* [55] beschriebenen Ergebnis. Sollte der Effekt jedoch allosterisch bedingt sein, widerspräche dies der Literatur, da der SOD3-Proteingehalt zu diesem Zeitpunkt erhöht war. Allerdings kann man allein aufgrund der hier beobachteten Zusammenhänge zwischen SOD3 und der Bioverfügbarkeit von NO sowie der Angiotensin II-Konzentration von weiteren Möglichkeiten der Interaktion von SOD3 mit der Blutdruckregulation ausgehen. Während der provozierten experimentellen Bedingungen im Versuchsverlauf kam es in der Gruppe der SOD3-kompetenten Kontrollen zu einem signifikanten, mehr als fünffachen Anstieg der Angiotensin-II Konzentration im Plasma. In der SOD3-E124D-

Gruppe ließ sich hingegen kein signifikanter Anstieg nachweisen. Da ein ausreichend hoher Blutdruck für die postoperative Kreislaufstabilität obligatorisch ist, ist dieser fehlende Anstieg unter Stressbedingungen potenziell als nachteilig gegenüber den Kontrollen zu bewerten. Klinisch zeigten sich auch ein geringerer MAD während der Reperfusion, der jedoch keinen signifikant erhöhten Bedarf an Noradrenalin zur Folge hatte. Einschränkungen in der SOD3-Homöostase könnten sich daher sowohl basal (arterielle Hypertonie) als auch nach EKZ (arterielle Hypotonie) belastend auf die Kreislaufstabilität auswirken.

### **Einschränkungen und Ausblick**

Trotz der geringen Zahl an Versuchstieren war es möglich, bei einigen Untersuchungen bereits statistisch signifikante Gruppenunterschiede festzustellen. Viele Ergebnisse zeigten jedoch nur einen statistischen Trend und erfordern weitere Untersuchungen mit größeren Gruppengrößen, um statistisch belastbare Aussagen formulieren zu können. Darüber hinaus unterscheidet sich die molekularbiologische Struktur des SOD3-Enzyms der Ratte von der humanen Form. Dem SOD3-Protein der Ratte fehlt eine chromatografische Fraktion, wodurch die Heparinaffinität gesenkt wird und das Enzym im Plasma nicht als Homotetramer, sondern als Homodimer vorliegt. Dies könnte die Ergebnisse in noch unbekanntem Ausmaß beeinflussen. Carlsson *et al.* [110] konnte jedoch zeigen, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure im SOD3-Enzym der Ratte dieses zu einem Homotetramer mit hoher Heparinaffinität verändern kann. Zudem haben epidemiologischen Studien auch menschliche Mutationen mit verringerter Heparinaffinität beschrieben [16].

Weitere Studien mit einer therapeutischen Applikation von SOD3 bzw. SOD3-Mimetika verdienen hier eine Erwähnung. Rekombinante humane Superoxiddismutase (h-SOD) konnte die ventrikuläre Funktion nach akutem Myokardinfarkt und PTCA nicht verbessern [111]. Hierbei handelte es sich jedoch um ein anderes Anwendungsgebiet. Zudem wurden Dosis und Applikationszeit der Studie nicht ausreichend variiert. Außerdem handelte es sich bei der h-SOD nicht um ein spezifisches SOD3-Mimetikum. Pharmakologische Entwicklung mit dem Fokus auf der SOD3 könnten hier neue Ergebnisse hervorbringen. Eine neue rekombinante humane SOD3-Variante (rh-SOD3) konnte bereits deutliche Verbesserungen in der

Plasmahalbwertszeit zeigen [112]. Eine ähnliche rekombinante humane SOD3-Form (rhEC-SOD) konnte nach inhalativer Applikation als Aerosol Mäuse vor Lungenschäden durch Hypoxie schützen und die Mortalität senken [113].

Das verwendete Kleintiermodell der extrakorporalen Zirkulation zur Indizierung von I/R-Schäden ist gut etabliert. Der verwendete hypotherme Kreislaufstillstand findet heute jedoch nur noch in der Aorten- und der Kinderherzchirurgie routinemäßige Anwendung. Um das Verständnis der SOD3 noch weiter zu untersuchen, könnte daher ein Modell ohne Hypothermie hilfreich sein und sollte vor dem Hintergrund der zuvor genannten Erkenntnisse für weitere zukünftige wissenschaftliche Untersuchungen herangezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass die SOD3 signifikanten Einfluss auf die Aktivierung von kardioprotektiven Signalwegen nimmt. Eine Verminderung in der Enzymaktivität führt zu einer Verstärkung der I/R-Schädigungen durch extrakorporale Zirkulation und damit des Risikos für systemische Inflammation und multiplem Organversagen. SOD3 hat sowohl einen direkten Einfluss auf die Organe des kardiovaskulären Systems als auch auf Kardiomyozyten und stellt somit einen potenziellen Schutzfaktor im Rahmen globaler I/R dar. Die weitere Erforschung und Entwicklung SOD3-basierter Behandlungsstrategien könnte eine vielversprechende Therapieoption für Patienten mit umfangreichen kardiochirurgischen Eingriffen darstellen. In weiteren Projekten müssen nun zunächst die chronischen Folgen der verminderten SOD3-Aktivität untersucht werden, um anschließend die festgestellten positiven Effekte der SOD3 auch bei systemischer Gabe eines Mimetikums im Behandlungskonzept nachzuweisen.

## **4.2 Der Kalziumsensitizer Levosimendan**

Der zweite Teil der Dissertation befasst sich mit dem Einfluss des Kalziumsensitizers Levosimendan (Simdax®) auf I/R-Schäden durch EKZ. Mithilfe eines Kleintiermodells mit EKZ und DHCA konnten globale I/R-Schäden und systemische Inflammation induziert werden, um den Einfluss einer präventiven Levosimendangabe vor Anschluss an die EKZ zu simulieren. Verglichen mit Vehikelkontrollen konnte gezeigt werden, dass Levosimendan zu einer verbesserten Herzleistung nach Beendigung des

Herzstillstands führt, kardioprotektive Zellsignalwege in verstärktem Maße aktiviert und anti-apoptotisch wirkt [61]. Trotz des routinemäßigen Einsatzes von Levosimendan im klinischen Alltag konnten klinische Studien bisher nicht sicher die Wirksamkeit belegen [72-75]. Diese Studie hat das Ziel, das Verständnis der Wirkungsweise von Levosimendan in einem *in vivo*-Modell auf molekularbiologischer Ebene zu verbessern, um in Zukunft patientengerechtere Therapieschemata ermöglichen zu können [61].

### **Levosimendan beeinflusst das klinische *Outcome* nach I/R**

Ratten, die vor Anschluss an die HLM und Aufnahme der EKZ 12 µg/kg KG Levosimendan erhielten, erreichten während der Wiedererwärmung schneller eine suffiziente Herzfrequenz. Eine normofrequente Herzfrequenz ist gemeinsam mit physiologischen Blutdruckwerten entscheidend für die hämodynamische Stabilität. Der Blutdruck wurde aufgrund von medikamentösen Interventionen in beiden Gruppen stabil gehalten. Levosimendan verringerte jedoch die benötigte Menge an Medikamenten, insbesondere an Katecholaminen, was gemeinsam mit der verbesserten Herzfrequenz für eine Verbesserung der Hämodynamik durch die Applikation von Levosimendan spricht [61]. Dieses Ergebnis steht jedoch im Widerspruch zu beschriebenen vasodilatatorischen Effekten von Levosimendan [70]. Rungatscher *et al.* [78] konnten hingegen ebenfalls eine Überlegenheit von Levosimendan in der Hämodynamik gegenüber einer reinen Katecholamintherapie zeigen. Auch in einer klinischen Studie konnte die Herzleistung von Kindern durch die Gabe von Levosimendan verbessert werden [114].

Im Verlauf kam es in beiden Gruppen zu einem starken Anstieg der Kalium- und Laktatkonzentration. Diese Effekte sind durch die Schwere der induzierten I/R-Schädigung des Modells begründet und wurden bereits in der Literatur beschrieben [28, 96, 97], ebenso wie sie im Abschnitt 1 dieser Arbeit in einem anderen Projekt mit demselben Modell beobachtet wurden. Levosimendan erhöhte jedoch sowohl die Konzentration an Kalium als auch an Laktat zum Ende des Versuches gegenüber Vehikelkontrollen [61]. Dies könnte durch die vermehrte Arbeit des Herzmuskels bedingt sein, die zu der beschriebenen Verbesserung der hämodynamischen Parameter führte. Möglich wäre auch eine bessere Mikrozirkulation, wodurch die postischämische Freisetzung von Laktat und Kalium aus peripheren Organen begünstigt wird.

Während sich im Hinblick auf die Körpertemperatur, die arterielle Sauerstoffsättigung sowie den Hämoglobinwert und die Anzahl an Erythrozyten keine Unterschiede zeigten, ließ sich eine Dynamik in den Messwerten der Thrombozyten und Leukozyten erkennen. Im Zusammenhang mit der Hypothermie zeigte sich in beiden Gruppen eine vorübergehende Abnahme der Thrombozytenzahlen. Es ließen sich jedoch keine Einflüsse von Levosimendan auf die zirkulierenden Thrombozyten im Blut erkennen. Die beschriebene Dynamik ähnelte hierbei den beschriebenen Ergebnissen des SOD3-Projekts (s. Abschnitt 1) [82, 95]. Auch die Anzahl an frei zirkulierenden Leukozyten im Blut verhielt sich analog zum SOD3-Projekt und fiel in beiden Gruppen während der Kühlung ab und stieg anschließend wieder an [82]. Auffällig war jedoch eine verminderte Anzahl an Leukozyten in der Levosimendangruppe. Diese Unterschiede waren zu jedem Zeitpunkt zu verzeichnen. In wie weit ein direkter Zusammenhang zur Applikation von Levosimendan besteht, bleibt daher unklar. In der Literatur ist eine Abnahme der Anzahl an Leukozyten im Blut durch Levosimendan in einer klinischen Studie beschrieben worden [115]. Darüber hinaus konnten Hasslacher *et al.* [116] zeigen, dass Levosimendan die Freisetzung von ROS durch Leukozyten in Patienten mit akutem Herzversagen und septischen Schock vermindert und somit positiv immunmodulatorisch wirkt. Diese Studien unterstützen die hier erhobenen Ergebnisse sowie die These, dass Levosimendan protektive Funktionen im kardiovaskulären System begünstigt.

### **Levosimendan beeinflusst Apoptose und intrazelluläre Signalwege**

Um einen Einblick in die molekularbiologischen Effekte von Levosimendan zu gewinnen, wurden Proteinanalysen an Myokardgewebe experimentell behandelter Tiere durchgeführt. Western Blots des Apoptosemarkers PARP-1 und seines Spaltproduktes *cleaved*-PARP-1 zeigten eine Verminderung der induzierten Apoptose durch die Behandlung mit Levosimendan verglichen zu Vehikelkontrollen [61, 102]. Auch Malmberg *et al.* [117] haben anti-apoptotische Effekte von Levosimendan nach myokardialer Ischemie beschrieben.

In der Literatur sind positive Effekte von Levosimendan auf die Aktivierung der p38 MAPK-, AKT- und p44-42 MAPK-Signalwege in Kardiomyozyten beschrieben [118]. Eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase gilt als zellulärer Schutzmechanismus

gegenüber I/R-Schäden [119]. Verglichen mit der Vehikelkontrolle konnte durch Levosimendan-Gabe nach EKZ und I/R eine vermehrte Aktivierung der p38 MAPK festgestellt werden [61]. Auch Grossini *et al.* [120] konnten einen solchen positiven Effekt von Levosimendan in einem *in vitro*-Versuch nachweisen und zudem einen Zusammenhang zum NO-Stoffwechsel aufzeigen. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Versuchen von Markou *et al.* [118] ließ sich in unserem Versuchsaufbau nach EKZ und I/R keine Steigerung in der Phosphorylierung der als protektiv geltenden AKT durch Levosimendan nachweisen [61, 107, 108]. Die Aktivierung des STAT3, welcher Teil des protektiven *SAFE*-Signalwegs ist, erschien in unserer Studie gar vermindert [61, 106, 121]. Leider finden sich in diesem Zusammenhang in der Literatur noch keine Ergebnisse vergleichbarer Studien, um dieses Resultat näher einzuordnen. In der Zusammenschau der molekularbiologischen Ergebnisse scheint jedoch ein insgesamt positiver Einfluss von Levosimendan auf Zellsignalebene möglich. Insbesondere die Ergebnisse der Spaltung von PARP-1 deuten auf einen protektiven und anti-apoptotischen Effekt durch die präventive Applikation von Levosimendan vor EKZ hin.

### **Einschränkungen und Ausblick**

Die Ergebnisse dieses Projektes sind in ihrer Aussagekraft in einem ähnlichem Umfang wie das SOD3-Projekt begrenzt [61, 82]. Insbesondere die geringe Anzahl an Versuchstieren, die für die Experimente zur Verfügung standen, erschweren die Übertragung der Ergebnisse in die klinische Anwendung. Darüber hinaus stellt die Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen an Levosimendan und Variationen des Applikationszeitpunktes einen wichtigen Ansatzpunkt für weitere Versuche in der Zukunft dar [61].

Zusammenfassend lassen sich durch die Therapie mit Levosimendan die Hämodynamik verbessern und gleichzeitig Medikamente reduzieren. Insbesondere der Einsatz von Katecholaminen, welche den Sauerstoffbedarf des Herzmuskels weiter steigern und pro-inflammatorisch wirken können, können so eingespart werden [61, 65, 66]. Außerdem zeigte sich eine Verringerung der Apoptoserate durch die Levosimendanbehandlung sowie eine veränderte Aktivierung von molekularbiologischen Signalwegen. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass sich eine präventive Applikation von Levosimendan vor EKZ positiv auf Patienten auswirkt [61].

## 4.3 Schlussfolgerungen

### Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war zunächst die nähere Untersuchung des Einflusses der extrazellulären Superoxiddismutase auf I/R-Schäden im Kontext von EKZ und globaler Ischämie. Hierfür wurde ein Rattenmodell mit verminderter Enzymaktivität verwendet und mit SOD3-kompetenten Kontrollen verglichen. Durch EKZ und einen 45-minütigen tiefen hypothermen Kreislaufstillstand mit globaler Ischämie und anschließender Reperfusion wurden I/R-Schäden induziert. Die in diesem Rahmen aufgetretenen Effekte wurden zuvor weltweit noch nicht wissenschaftlich publiziert.

Während der intraoperativen Überwachung zeigten sich in der Interventionsgruppe mit verminderter SOD3-Aktivität eine verminderte Herzfrequenz und leicht vermindertes Blutdruck während der Reperfusion. Gleichzeitig lagen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, erhöhte Plasmakonzentrationen von Kalium und Laktat vor. Diese Ergebnisse sprechen für einen klinisch schlechteren Umgang mit I/R-Schäden bei verminderter SOD3-Aktivität und damit verbundenen größeren Gewebeschädigungen und resultierender Kreislaufinstabilität.

Auf dem Proteinlevel konnte gezeigt werden, dass unter Basalbedingungen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bestehen. Eine Verminderung der SOD3-Aktivität führt bei EKZ jedoch zu einem kompensatorischen Anstieg des Enzymgehaltes. Dieser Anstieg reicht jedoch nicht aus, um die Gewebeschädigung zu verhindern. Die verringerte Enzymaktivität führt zu einer signifikant verminderten Aktivierung protektiver intrazellulärer Signalwege. Diese Signalkaskaden gelten als anti-apoptotisch und pro-proliferativ und schützen das Gewebe des kardiovaskulären Systems im chronischen Verlauf vor den Folgen von I/R. In der Zellkultur adulter Kardiomyozyten konnte zudem gezeigt werden, dass der Level an nitrosativem Stress durch die Bildung von Peroxynitrit gegenüber der SOD3-kompetenten Kontrollgruppe erhöht ist. Dies führt zu einer zusätzlichen toxischen Zellschädigung sowie durch das resultierende Defizit an Stickstoffmonoxid im Gefäßmuskel zu einer Vasokonstriktion und damit Verschlechterung der systemischen Durchblutung.

Im zweiten Teil der Dissertation wurde der Einfluss des Kalziumsensitizers Levosimendan auf kardiale I/R-Schäden in einem Kleintiermodell mit EKZ und

45 Minuten DHCA untersucht [61]. Vor Initiation der EKZ wurden entweder 12 µl/kg KG Levosimendan oder ein Vehikel intravenös appliziert [61]. Die in diesem Rahmen aufgetretenen Effekte wurden bisher nicht wissenschaftlich publiziert. Die Applikation von Levosimendan konnte dabei das *Outcome* sowohl auf klinischer Ebenen als auch insbesondere molekularbiologisch verbessern [61]. Dadurch erweitert sich das Verständnis der Wirkungsweise von Levosimendan und ermöglicht so eine gezieltere Therapie.

### **Fazit**

Täglich sind weltweit tausende Patienten auf eine Behandlung mit HLM und EKZ angewiesen. Aufgrund von I/R-Schäden besteht auch bei erfolgreicher Behandlung der Grunderkrankung die Gefahr eines systemischen inflammatorischen Reaktion und der Entwicklung eines häufig letal verlaufenden MODS. Therapien, die die Entstehung einer solchen Reaktion verhindern können, sind daher nötig, um die Ergebnisse kardiovaskulärer Eingriffe zu verbessern. Es konnte ein entscheidender positiver Einfluss der SOD3 auf I/R-Schädigung durch EKZ gezeigt werden. Sowohl klinisch als auch molekularbiologisch zeigte sich ein verschlechtertes *Outcome*, verursacht durch die verminderte Enzymaktivität. Der Einsatz neuer SOD3-basierten Therapiekonzepte könnte daher die Komplikationsrate durch systemische Inflammationsreaktionen nach Operationen mit HLM verringern. Dies erfährt besondere Bedeutung, da eine häufige humane Genvariante (SOD-R213G) die natürliche Schutzwirkung der SOD3 verringert und mit einem erhöhten Risiko für ischämische Herzkrankheiten vergesellschaftet zu sein scheint. Insbesondere diese Patienten könnten von einer speziellen SOD3-Therapie profitieren. Auch die Anwendung einer individuellen präventiven Levosimendangabe kann dabei eine Möglichkeit einer solchen Verbesserung darstellen.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Yusuf, S., et al., *Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study*. The Lancet, 2004. **364**(9438): p. 937-952.
2. De Backer, G., *European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice Third Joint Task Force of European and other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of eight societies and by invited experts)*. European Heart Journal, 2003. **24**(17): p. 1601-1610.
3. *Global status report on noncommunicable diseases 2014*, O. Chestnov, Editor. 2014, World Health Organization (WHO): Geneva. p. 1-298.
4. *Deutscher Herzbericht 2017*, R. Klawiki, K. Schmidt, and M. Heinemann, Editors. 2017, Deutsche Herzstiftung e.V.: Frankfurt am Main. p. 1-260.
5. *Deutscher Herzbericht 2014*, R. Klawiki, M. Heinemann, and K. Schmidt, Editors. 2014, Deutsche Herzstiftung e.V.: Frankfurt am Main. p. 1-237.
6. Plass, D., et al., *Trends in disease burden in Germany: results, implications and limitations of the Global Burden of Disease study*. Dtsch Arztebl Int, 2014. **111**(38): p. 629-38.
7. Jonsson, P.A., et al., *Minute quantities of misfolded mutant superoxide dismutase-1 cause amyotrophic lateral sclerosis*. Brain, 2004. **127**(Pt 1): p. 73-88.
8. Beckmann, A., et al., *Cardiac Surgery in Germany during 2014: A Report on Behalf of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery*. Thorac Cardiovasc Surg, 2015.
9. McCullough, J.N., et al., *Cerebral metabolic suppression during hypothermic circulatory arrest in humans*. Ann Thorac Surg, 1999. **67**(6): p. 1895-9; discussion 1919-21.
10. Ehrlich, M.P., et al., *Effect of hypothermia on cerebral blood flow and metabolism in the pig*. Ann Thorac Surg, 2002. **73**(1): p. 191-7.

11. Ziganshin, B.A., et al., *Straight deep hypothermic circulatory arrest for cerebral protection during aortic arch surgery: Safe and effective*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2014. **148**(3): p. 888-98; discussion 898-900.
12. Shen, I., C. Giacomuzzi, and R.M. Ungerleider, *Current strategies for optimizing the use of cardiopulmonary bypass in neonates and infants*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(2): p. S729-34.
13. Khorsandi, M., et al., *Extra-corporeal membrane oxygenation for refractory cardiogenic shock after adult cardiac surgery: a systematic review and meta-analysis*. J Cardiothorac Surg, 2017. **12**(1): p. 55.
14. Lango, R., et al., *Revised protocol of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) therapy in severe ARDS. Recommendations of the Veno-venous ECMO Expert Panel appointed in February 2016 by the national consultant on anesthesiology and intensive care*. Anaesthesiol Intensive Ther, 2017. **49**(2): p. 88-99.
15. Kosinski, S., et al., *Clinical course and prognostic factors of patients in severe accidental hypothermia with circulatory instability rewarmed with veno-arterial ECMO - an observational case series study*. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2017. **25**(1): p. 46.
16. Folz, R.J., L. Peno-Green, and J.D. Crapo, *Identification of a homozygous missense mutation (Arg to Gly) in the critical binding region of the human EC-SOD gene (SOD3) and its association with dramatically increased serum enzyme levels*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(12): p. 2251-4.
17. Sandstrom, J., et al., *10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain*. J Biol Chem, 1994. **269**(29): p. 19163-6.
18. Juul, K., et al., *Genetically reduced antioxidative protection and increased ischemic heart disease risk: The Copenhagen City Heart Study*. Circulation, 2004. **109**(1): p. 59-65.

19. Grammer, T.B., et al., *SOD3 R231G polymorphism associated with coronary artery disease and myocardial infarction. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health (LURIC) study*. Free Radic Res, 2009. **43**(7): p. 677-84.
20. Ganguly, K., et al., *Superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3) variants and lung function*. Physiol Genomics, 2009. **37**(3): p. 260-7.
21. Chu, Y., et al., *Vascular effects of the human extracellular superoxide dismutase R213G variant*. Circulation, 2005. **112**(7): p. 1047-53.
22. Kirklin, J.K., et al., *Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1983. **86**(6): p. 845-57.
23. Jennings, R.B., et al., *Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog*. Arch Pathol, 1960. **70**: p. 68-78.
24. Zweier, J.L., *Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury*. J Biol Chem, 1988. **263**(3): p. 1353-7.
25. Vinten-Johansen, J., *Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 481-97.
26. Yellon, D.M. and D.J. Hausenloy, *Myocardial reperfusion injury*. N Engl J Med, 2007. **357**(11): p. 1121-35.
27. Hearse, D.J., S.M. Humphrey, and E.B. Chain, *Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release*. J Mol Cell Cardiol, 1973. **5**(4): p. 395-407.
28. Engels, M., et al., *A cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage*. J Inflamm (Lond), 2014. **11**: p. 26.
29. Zahler, S., et al., *Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 722-30.
30. Boeken, U., et al., *Increased preoperative C-reactive protein (CRP)-values without signs of an infection and complicated course after cardiopulmonary bypass (CPB)-operations*. Eur J Cardiothorac Surg, 1998. **13**(5): p. 541-5.

31. Hunt, B.J., et al., *Activation of coagulation and fibrinolysis during cardiothoracic operations*. Ann Thorac Surg, 1998. **65**(3): p. 712-8.
32. Wachtfogel, Y.T., et al., *Formation of C1s-C1-inhibitor, kallikrein-C1-inhibitor, and plasmin-alpha 2-plasmin-inhibitor complexes during cardiopulmonary bypass*. Blood, 1989. **73**(2): p. 468-71.
33. Rinder, C.S., et al., *Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion*. Blood, 1992. **79**(5): p. 1201-5.
34. Fattman, C., L. Schaefer, and T. Oury, *Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **35**(3): p. 236-256.
35. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
36. Beckman, J.S., et al., *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(4): p. 1620-4.
37. Faraci, F.M. and S.P. Didion, *Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(8): p. 1367-73.
38. Beckman, J.S. and W.H. Koppenol, *Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1424-37.
39. Marklund, S., *Purification and characterization of a manganese containing superoxide dismutase from bovine heart mitochondria*. Int J Biochem, 1978. **9**(5): p. 299-306.
40. Marklund, S.L., *Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(24): p. 7634-8.
41. Chang, L.Y., et al., *Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes*. J Cell Biol, 1988. **107**(6 Pt 1): p. 2169-79.
42. Crapo, J.D., et al., *Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 10405-9.

43. Okado-Matsumoto, A. and I. Fridovich, *Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38388-93.
44. Mohammadi, K., et al., *Plasma extracellular superoxide dismutase concentration, allelic variations in the SOD3 gene and risk of myocardial infarction and all-cause mortality in people with type 1 and type 2 diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2015. **14**: p. 845.
45. Weisiger, R.A. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. Organelle specificity*. J Biol Chem, 1973. **248**(10): p. 3582-92.
46. Hsu, J.L., et al., *Catalytic properties of human manganese superoxide dismutase*. J Biol Chem, 1996. **271**(30): p. 17687-91.
47. Marklund, S.L., *Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species*. Biochem J, 1984. **222**(3): p. 649-55.
48. Marklund, S.L., *Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines*. J Clin Invest, 1984. **74**(4): p. 1398-403.
49. Marklund, S.L., *Extracellular superoxide dismutase*. Methods Enzymol, 2002. **349**: p. 74-80.
50. Oury, T.D., B.J. Day, and J.D. Crapo, *Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(7): p. 957-65.
51. Oury, T.D., et al., *Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase*. Biochem J, 1996. **317** ( Pt 1): p. 51-7.
52. Stralin, P., et al., *The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(11): p. 2032-6.
53. Stralin, P. and S.L. Marklund, *Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(4): p. H1621-9.

54. Qin, Z., et al., *Role of Menkes ATPase in angiotensin II-induced hypertension: a key modulator for extracellular superoxide dismutase function*. Hypertension, 2008. **52**(5): p. 945-51.
55. Lob, H.E., et al., *Role of vascular extracellular superoxide dismutase in hypertension*. Hypertension, 2011. **58**(2): p. 232-9.
56. Takatsu, H., et al., *Overexpression of EC-SOD suppresses endothelial-cell-mediated LDL oxidation*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **285**(1): p. 84-91.
57. Obal, D., et al., *Cardiomyocyte-restricted overexpression of extracellular superoxide dismutase increases nitric oxide bioavailability and reduces infarct size after ischemia/reperfusion*. Basic Res Cardiol, 2012. **107**(6): p. 305.
58. Laatikainen, L.E., et al., *SOD3 decreases ischemic injury derived apoptosis through phosphorylation of Erk1/2, Akt, and FoxO3a*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e24456.
59. Schneider, M.P., et al., *Protective role of extracellular superoxide dismutase in renal ischemia/reperfusion injury*. Kidney Int, 2010. **78**(4): p. 374-81.
60. Xu, D., et al., *Exacerbated pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in animals with loss of function of extracellular superoxide dismutase*. Hypertension, 2011. **58**(2): p. 303-9.
61. Immohr, M.B., et al., *Exploring the Pleiotropic Effects of Levosimendan – Impact on Systemic Inflammatory Parameters and Molecular Salvage Pathways by Modulation of Cytokine Levels and Tissue Apoptosis Rate*. Journal of Heart and Cardiology, 2017. **3**(1): p. 1-9.
62. Kunes, P., et al., *The inflammatory response in cardiac surgery. An up-to-date overview with the emphasis on the role of heat shock proteins (HSPs) 60 and 70*. Acta Medica (Hradec Kralove), 2007. **50**(2): p. 93-9.
63. Goldberg, R.J., et al., *Thirty-year trends (1975 to 2005) in the magnitude of, management of, and hospital death rates associated with cardiogenic shock in patients with acute myocardial infarction: a population-based perspective*. Circulation, 2009. **119**(9): p. 1211-9.

64. Thiele, H., et al., *Management of cardiogenic shock*. Eur Heart J, 2015. **36**(20): p. 1223-30.
65. DeWitt, E.S., et al., *Effects of commonly used inotropes on myocardial function and oxygen consumption under constant ventricular loading conditions*. J Appl Physiol (1985), 2016. **121**(1): p. 7-14.
66. Sancho-Bru, P., et al., *Norepinephrine induces calcium spikes and proinflammatory actions in human hepatic stellate cells*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006. **291**(5): p. G877-84.
67. Werdan, K., et al., *Cardiogenic shock due to myocardial infarction: diagnosis, monitoring and treatment: a German-Austrian S3 Guideline*. Dtsch Arztebl Int, 2012. **109**(19): p. 343-51.
68. Pollesello, P., et al., *Binding of a new Ca<sup>2+</sup> sensitizer, levosimendan, to recombinant human cardiac troponin C. A molecular modelling, fluorescence probe, and proton nuclear magnetic resonance study*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 28584-90.
69. Sorsa, T., P. Pollesello, and R.J. Solaro, *The contractile apparatus as a target for drugs against heart failure: interaction of levosimendan, a calcium sensitizer, with cardiac troponin c*. Mol Cell Biochem, 2004. **266**(1-2): p. 87-107.
70. Pathak, A., et al., *Pharmacology of levosimendan: inotropic, vasodilatory and cardioprotective effects*. J Clin Pharm Ther, 2013. **38**(5): p. 341-9.
71. Maytin, M. and W.S. Colucci, *Cardioprotection: a new paradigm in the management of acute heart failure syndromes*. Am J Cardiol, 2005. **96**(6A): p. 26G-31G.
72. Lim, J.Y., et al., *Levosimendan Reduces Mortality in Adults with Left Ventricular Dysfunction Undergoing Cardiac Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis*. J Card Surg, 2015. **30**(7): p. 547-54.
73. Distelmaier, K., et al., *Beneficial effects of levosimendan on survival in patients undergoing extracorporeal membrane oxygenation after cardiovascular surgery*. Br J Anaesth, 2016. **117**(1): p. 52-8.

74. Qiao, L., et al., *Heart calcium sensitizer on morbidity and mortality of high-risk surgical patients with MODS: systematic review and meta-analysis*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(10): p. 17712-20.
75. Koster, G., et al., *Effects of levosimendan for low cardiac output syndrome in critically ill patients: systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis*. Intensive Care Med, 2015. **41**(2): p. 203-21.
76. Tarkia, M., et al., *Effect of levosimendan therapy on myocardial infarct size and left ventricular function after acute coronary occlusion*. Heart, 2016. **102**(6): p. 465-71.
77. Kiraz, H.A., et al., *The effect of levosimendan on myocardial ischemia-reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats*. Libyan J Med, 2015. **10**: p. 29269.
78. Rungatscher, A., et al., *Levosimendan is superior to epinephrine in improving myocardial function after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012. **143**(1): p. 209-14.
79. Rungatscher, A., et al., *Role of calcium desensitization in the treatment of myocardial dysfunction after deep hypothermic circulatory arrest*. Crit Care, 2013. **17**(5): p. R245.
80. Steinbrenner, H., 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): p. 1363-76.
81. Pinto, A., et al., *Modulation of Immunologic Response by Preventive Everolimus Application in a Rat CPB Model*. Inflammation, 2016. **39**(5): p. 1771-82.
82. Pinto, A., et al., *The extracellular isoform of superoxide dismutase has a significant impact on cardiovascular ischaemia and reperfusion injury during cardiopulmonary bypass*. Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(6): p. 1035-1044.
83. Oyanagui, Y., *Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity*. Anal Biochem, 1984. **142**(2): p. 290-6.

84. Zhidkova, T.V., et al., *Determination of superoxide dismutase and SOD-mimetic activities by a chemical system: Co<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/lucigenin*. Anal Bioanal Chem, 2011. **401**(1): p. 381-6.
85. Wong, C.H., et al., *Plasma free hemoglobin: a novel diagnostic test for assessment of the depth of burn injury*. Plast Reconstr Surg, 2006. **117**(4): p. 1206-13.
86. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. Anal Biochem, 1981. **112**(2): p. 195-203.
87. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
88. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
89. Kaufmann, S.H. and U. Kellner, *Erasure of western blots after autoradiographic or chemiluminescent detection*. Methods Mol Biol, 1998. **80**: p. 223-35.
90. Louch, W.E., K.A. Sheehan, and B.M. Wolska, *Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer*. J Mol Cell Cardiol, 2011. **51**(3): p. 288-98.
91. Kameneva, M.V., et al., *Decrease in red blood cell deformability caused by hypothermia, hemodilution, and mechanical stress: factors related to cardiopulmonary bypass*. ASAIO J, 1999. **45**(4): p. 307-10.
92. Rosman, Y., et al., *The association between admission systolic blood pressure of heart failure patients with preserved systolic function and mortality outcomes*. Eur J Intern Med, 2015. **26**(10): p. 807-12.
93. Siirila-Waris, K., et al., *Characteristics, outcomes, and predictors of 1-year mortality in patients hospitalized for acute heart failure*. Eur Heart J, 2006. **27**(24): p. 3011-7.

94. Makita, S., et al., *Bradycardia is associated with future cardiovascular diseases and death in men from the general population*. *Atherosclerosis*, 2014. **236**(1): p. 116-20.
95. de Vrij, E.L., et al., *Platelet dynamics during natural and pharmacologically induced torpor and forced hypothermia*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e93218.
96. Pinto, A., et al., *Modulation of Immunologic Response by Preventive Everolimus Application in a Rat CPB Model*. *Inflammation*, 2016.
97. Neumayer, C., et al., *Combined enzymatic and antioxidative treatment reduces ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle*. *J Surg Res*, 2006. **133**(2): p. 150-8.
98. Ryan, T.A., et al., *Predictors of outcome in cardiac surgical patients with prolonged intensive care stay*. *Chest*, 1997. **112**(4): p. 1035-42.
99. Sharma, S., et al., *Induction of antioxidant gene expression in a mouse model of ischemic cardiomyopathy is dependent on reactive oxygen species*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40**(12): p. 2223-31.
100. Brahmajothi, M.V. and D.L. Campbell, *Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart : implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects*. *Circ Res*, 1999. **85**(7): p. 575-87.
101. Negoro, S., 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): p. 979-81.
102. McCully, J.D., et al., *Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. **286**(5): p. H1923-35.
103. Ramlawi, B., et al., *Indices of apoptosis activation after blood cardioplegia and cardiopulmonary bypass*. *Circulation*, 2006. **114**(1 Suppl): p. I257-63.

104. Usta, E., et al., *Human cardiac tissue in a microperfusion chamber simulating extracorporeal circulation--ischemia and apoptosis studies*. J Cardiothorac Surg, 2010. **5**: p. 3.
105. Hausenloy, D.J. and D.M. Yellon, *New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 448-60.
106. Lecour, S., et al., *Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase)*. Circulation, 2005. **112**(25): p. 3911-8.
107. DeBosch, B., et al., *Akt1 is required for physiological cardiac growth*. Circulation, 2006. **113**(17): p. 2097-104.
108. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
109. Osorio-Fuentealba, C., et al., *Hypoxia stimulates via separate pathways ERK phosphorylation and NF-kappaB activation in skeletal muscle cells in primary culture*. J Appl Physiol (1985), 2009. **106**(4): p. 1301-10.
110. Carlsson, L.M., S.L. Marklund, and T. Edlund, *The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single amino acid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(11): p. 5219-22.
111. Flaherty, J.T., et al., *Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 1982-91.
112. Kim, S., et al., *Enhancement of potency and stability of human extracellular superoxide dismutase*. BMB Rep, 2015. **48**(2): p. 91-6.
113. Yen, C.C., et al., *Aerosolized human extracellular superoxide dismutase prevents hyperoxia-induced lung injury*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26870.

114. Joshi, R.K., et al., *Successful use of levosimendan as a primary inotrope in pediatric cardiac surgery: An observational study in 110 patients*. *Ann Pediatr Cardiol*, 2016. **9**(1): p. 9-15.
115. Tasal, A., et al., *Utility of the neutrophil to lymphocyte ratio for predicting in-hospital mortality after levosimendan infusion in patients with acute decompensated heart failure*. *J Cardiol*, 2014. **63**(6): p. 418-23.
116. Hasslacher, J., et al., *Levosimendan inhibits release of reactive oxygen species in polymorphonuclear leukocytes in vitro and in patients with acute heart failure and septic shock: a prospective observational study*. *Crit Care*, 2011. **15**(4): p. R166.
117. Malmberg, M., et al., *Intracoronary Levosimendan during Ischemia Prevents Myocardial Apoptosis*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 17.
118. Markou, T., et al., *Multiple signalling pathways underlie the protective effect of levosimendan in cardiac myocytes*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **667**(1-3): p. 298-305.
119. Weinbrenner, C., et al., *Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 1997. **29**(9): p. 2383-91.
120. Grossini, E., et al., *Levosimendan induces NO production through p38 MAPK, ERK and Akt in porcine coronary endothelial cells: role for mitochondrial K(ATP) channel*. *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(2): p. 250-61.
121. Stephanou, A., *Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury*. *J Cell Mol Med*, 2004. **8**(4): p. 519-25.



### 6.1.3 Protokollzeiten

		Datum:	
<b>Protokoll-Zeiten</b>			
<b>Datum:</b>			
Anwesend:			
Kanülierung:			
Protokollführung:			
Narkoseüberwachung:			
Blutgasanalysen:			
Anschluss an HLM: <input type="text"/>			
<b>Versuchstier:</b>			
Gewicht:			
Geburtsdatum:			
	<b>Uhrzeit [h]</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Dauer</b>
Narkose-Einleitung		-	
Präparierungs-Beginn			
Präparierungs-Ende			
Kanülierungs-Beginn			
Kanülierungs-Ende			
1. Blutabnahme			●
EKZ-Beginn			
EKZ-Kühlung-Beginn			30 min
2. Blutabnahme bei 25°C			
EKZ-Kühlung-Ende			
EKZ-Kreislaufstillstand-Beginn			20 min
EKZ-Kreislaufstillstand-Ende			
EKZ-Aufwärmung-Beginn			40 min
3. Blutabnahme bei 20°C			
4. Blutabnahme bei 35°C			●
EKZ-Aufwärmung-Ende			
Beginn Perfusion			60 min
Ende Perfusion			
5. Blutabnahme vor Eutha			
Euthanasie			

### 6.1.4 Notizen

<b>HLM</b>	
Kanülierung:	
Anschluss an HLM:	
Lauf der HLM:	
Asystolie:	
Sinusrythmus:	
Organexplantation:	

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank all jenen entgegenbringen, die meine Promotion maßgeblich unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari dessen ständige Betreuung diese Arbeit erst ermöglicht hat. Durch unzählige Treffen, Telefonate und E-Mails wurde ich nicht nur stets gefördert, sondern ganz entscheidend auch in meiner beruflichen Entwicklung beeinflusst. Der gemeinsame Austausch und die Unterstützung haben maßgeblich dazu beigetragen mein Interesse für die Herzmedizin und insbesondere die Herzchirurgie zu wecken.

Mein Dank gilt darüber hinaus Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg und der gesamten Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie für die konstruktive Kritik und die hilfreichen Anregungen zu meinem Forschungsprojekt.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. rer. nat. Antonio Pinto und Herrn Dr. rer. nat. Alexander Jenke für die Betreuung im Labor und die Einarbeitung in die Methodik.

Ich danke dem gesamten Team der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie, besonders der AG EKZ, für die wunderbare Zeit im Labor. Insbesondere möchte ich Gisela Müller danken, die immer eine helfende Hand für mich übrig hat.

Schließlich möchte ich meiner Familie für ihre durchgehende Unterstützung danken. Ich danke meinen Eltern Claudia und Bernd, dass sie immer hinter mir stehen und mich in allen meinen Entscheidungen ermutigen. Danken möchte ich auch meinen Geschwistern, von deren Erfahrung ich immer profitiere. Insbesondere möchte ich Sophia dafür danken, dass sie die ganze Arbeit durchgelesen und korrigiert hat. Ohne ihre Hilfe würde wohl höchstens jedes zweite Komma an der richtigen Stelle sitzen.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Freundin Nicole, die nicht nur meine Arbeit korrigieren musste, sondern mich auch seit Jahren täglich erträgt. Als mein persönlicher Rückhalt und hilft sie mir bei allen Herausforderungen. Danke, dass ich immer auf Dich und deine Unterstützung zählen kann.

Moritz Benjamin Immohr

Düsseldorf, 14. Juli 19