

**Zum Einfluss von Ebselen auf den durch extrakorporale Zirkulation
und hypothermen Kreislaufstillstand induzierten Ischämie-
Reperfusionsschaden in einem in-vivo Modell der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Melanie Engels

Aus der
Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität
Gießen
Betreuer: Prof. Dr. med. vet. M. Schneider
und
der Klinik für kardiovaskuläre Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
Betreuer: Prof. Dr. med. U. Boeken

**Zum Einfluss von Ebselen auf den durch extrakorporale Zirkulation
und hypothermen Kreislaufstillstand induzierten Ischämie-
Reperfusionsschaden in einem in-vivo Modell der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Melanie Engels

Tierärztin aus Neuss

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Hr. Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Hr. Prof. Dr. med. vet. Matthias Schneider
Hr. Prof. Dr. med. Udo Boeken

Tag der Disputation: 20.05.2014

Meiner Familie in Liebe

Publikationen zu dieser Arbeit:

Engels M, Bilgic E, Pinto A, Vasquez E, Wollschläger L, Steinbrenner H, Kellermann K, Akhyari P, Lichtenberg A, Boeken U. A cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage. Journal of Inflammation 2014; *submitted* (Referenznummer: MS 1935683601129522)

Steinbrenner H, Bilgic E, Pinto A, **Engels M**, Wollschläger L, Kellermann K, Boeken U, Akhyari P, Lichtenberg A. Pretreatment of ischemia/reperfusion injury through sodium selenite or ebselen: Modification of acute organ damage and inflammatory response. Circulation 2013; *submitted* (Referenznummer: CIRCULATIONAHA/2013/007848)

Kongressbeiträge zu dieser Arbeit:

A cardiopulmonary bypass rat model for the investigation of multi-organ ischemia/reperfusion. **Melanie Engels**, Esra Bilgic, Antonio Pinto, Edwin Vasquez, Lena Wollschläger, Holger Steinbrenner, Kristine Kellermann, Payam Akhyari, Arthur Lichtenberg, Udo Boeken. Jahrestagung der DGTHG Freiburg, 16.-20. Februar 2013, Poster.

Ein EKZ-Ratten-Modell zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens. **Melanie Engels**, Esra Bilgic, Antonio Pinto, Edwin Vasquez, Lena Wollschläger, Holger Steinbrenner, Kristine Kellermann, Payam Akhyari, Arthur Lichtenberg, Udo Boeken. Doktorandenkongress der Medical Research School Düsseldorf, 12. Juli 2013, Poster.

Both ebselen and dietary selenium supplementation ameliorate ischemia/reperfusion injury upon cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest. **Melanie Engels**, Lena Wollschläger, Esra Bilgic, Antonio Pinto, Artur Lichtenberg, Payam Akhyari, Udo Boeken, Holger Steinbrenner. Selenium Congress Berlin, 14.-18. September 2013, Poster.

Treatment of Ischemia/Reperfusion Injury Through Supplementation With Sodium Selenite: Modification of Oxidative Organ Damage and Inflammatory Response. Lena Wollschläger, Esra Bilgic, **Melanie Engels**, Antonio Pinto, Holger Steinbrenner, Payam Akhyari, Arthur Lichtenberg, Udo Boeken. American Heart Association Scientific Sessions Meeting, 16.-20. November 2013, Dallas, Texas, USA; Poster.

Zusammenfassung

Herzchirurgische Eingriffe, die mit extrakorporaler Zirkulation (EKZ) und tiefhypothermem Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) durchgeführt werden, führen häufig infolge der post-ischämischen Reperfusion zu Organschäden im gesamten Organismus [Christenson *et al.*, 1996; Stoppe *et al.*, 2011]. Als Ursachen dieses so genannten Ischämie-Reperfusionsschadens (I/R-Schaden) werden u.a. eine durch die EKZ und den DHCA bedingte exzessive Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [Prasad *et al.*, 2009] sowie systemische inflammatorische Prozesse [Parnham & Sies, 2000] postuliert. Therapien, die den I/R-Schaden direkt supprimieren, fehlen bis heute. Bisherige Therapieansätze beinhalten die Gabe von Antioxidantien, Glukokortikoiden, Aprotinin sowie die Verwendung Heparin-beschichteter EKZ-Systeme und intra- operativer Ultrafiltration. Deshalb ist es wichtig, neue Ansätze für die Prävention und Behandlung des I/R-Schadens zu entwickeln und diese auf ihre klinische Eignung zu testen. Ebselen ist eine synthetische, niedrigmolekulare organische Selenverbindung mit anti-oxidativen, anti-inflammatorischen und zytoprotektiven Eigenschaften. In Untersuchungen an einzelnen Organen konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die prophylaktische Gabe der Selenverbindung Ebselen den Ischämie-Reperfusionsschaden bei Organinfarkten günstig beeinflussen kann. Ziel dieser Arbeit war, ein valides Tiermodell zu entwickeln, um den Einfluss von Ebselen auf den durch EKZ und DHCA induzierten I/R-Schaden im Gesamtorganismus *in vivo* zu untersuchen.

Nach erfolgreicher Etablierung eines Ratten-EKZ-Modells wurden männliche Wistar-Ratten in die drei Gruppen Kontrolle, Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und Ebselen (jeweils n=7) eingeteilt. Den Versuchstieren der Gruppen DMSO und Ebselen wurden die jeweiligen Substrate zu Versuchsbeginn intraperitoneal injiziert. Die Versuchstiere wurden einem kardiopulmonalen Bypass mit tiefhypothermem Kreislaufstillstand und anschließender Reperfusion unterzogen. In den nach Versuchsende entnommenen Organen Herz, Lunge, Leber und Niere wurden I/R-induzierte Signalwege biochemisch mittels Western Blot analysiert.

Entzündungsmarker und klinische Laborparameter aus Blutproben wurden bestimmt und die dokumentierten hämodynamischen und Vitalparameter statistisch ausgewertet. Die Selengehalte der Organe der mit Ebselen behandelten Versuchstiere waren signifikant erhöht. Ebenfalls signifikant erhöht war die Aktivität der Glutathionperoxidase (GPx) in den untersuchten Organen der Versuchstiere der Ebselengruppe. Die mit Ebselen behandelten Versuchstiere zeigten intraoperativ tendenziell einen geringeren Volumenbedarf sowie einen verminderten Verbrauch an Noradrenalin im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die während der Operation induzierte Leukozytose war in der Ebselen- und der DMSO-Gruppe weniger ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Die pro-inflammatorischen Zytokine zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede. Die Interleukin-6 Spiegel (IL-6) im Serum waren in der Ebselen- und der DMSO-Gruppe geringfügig erhöht, wohingegen die Tumornekrosefaktor- α Spiegel (TNF- α) im Serum in der Ebselengruppe leicht erniedrigt waren. Die Plasmaspiegel der laborklinischen Parameter Troponin I, Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Lactatdehydrogenase (LDH) waren im Vergleich zu den Kontrolltieren in der Ebselen- und der DMSO-Gruppe signifikant erniedrigt. Die Western Blots zeigten, dass Ebselen einige der durch I/R induzierten Signalwege organ-spezifisch beeinflusst. Die erhöhte GPx-Aktivität sowie die ebenfalls erhöhten Selengehalte der untersuchten Organe zeigten eine Verteilung des Ebselens im Körper. Anhand der beschriebenen Daten konnte aufgezeigt werden, dass Ebselen den I/R-Schaden im Gesamtorganismus beeinflusst. Das Lösungsmittel DMSO verursachte zum Teil ähnliche Effekte wie das Ebselen. Da DMSO auch als Radikalfänger agiert, zeigen diese Ergebnisse jedoch, dass der Einsatz von Antioxidantien zur Linderung des I/R-Schadens einen vielversprechenden Ansatz darstellt. Da die Effekte des Ebselens nur teilweise spezifisch und unabhängig von DMSO waren, wäre es sinnvoll, andere wasserlösliche organische Selenverbindungen zu testen. Trotzdem zeigen die Ergebnisse die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes, um den durch kardiochirurgische Eingriffe ausgelösten I/R-Schaden zu verringern und die Suche nach alternativen -eventuell noch potenteren Mitteln- zu fördern.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildungen
ALT	Alanin-Aminotransferase
APS	Ammoniumpersulfat
AST	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BGA	Blutgasanalyse
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CAT	Katalase
CK	Creatin-Kinase
CK-MB	MB-Isoform der Creatin-Kinase
CO	Kohlenmonoxid
CO₂	Kohlendioxid
DAN	2,3-Diaminophtalin
DHCA	Deep hypothermic circulatory arrest
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
Eb	Ebselen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
Erk	Extrazellulärregulierte Kinase
et al.	et alia
g	Gramm
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GR	Glutathion-Reduktase
HAES	Hydroxyethylstärke
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HClO₄	Perchlorsäure

HIF	hypoxia-inducible factor
H/K-ATPase	Protonen-/Kalium- Pumpe
Hkt	Hämatokrit
HNO₃	Salpetersäure
HLM	Herz- Lungen- Maschine
HO-1	Häm Oxygenase 1
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP	Heat shock protein
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
I/R	Ischämie-Reperfusion
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
LDH	Laktatdehydrogenase
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MAPK	mitogen-activated-protein-Kinasen
MAPKK	mitogen-activated-protein-Kinasen-Kinasen
MAPKKK	mitogen-activated-protein-Kinasen-Kinasen-Kinasen
MeOH	Methanol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Kochsalz
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaN₃	Natriumazid
NO	Stickstoffmonoxid
O₂	Sauerstoff
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphat buffered saline
PLT	Thrombozyten

PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBC	Rote Blutkörperchen
ROS	Reactive oxygen species
s.	siehe
SBP2	SECIS-bindendes Protein 2
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-Page	sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel elektrophorese
SECIS	Selenocystein-Insertions-Sequenz
SeP	Selenoprotein P
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
s.o.	siehe oben
SOD	Superoxiddismutase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
Tert-BuOOH	tertiäres Butyl Hydroperoxid
TBST	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
TRxR	Thioredoxinreduktase
u.a.	unter anderem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	vascular smooth muscle cells
WBC	weisse Blutkörperchen
w/v	Massen-Volumenprozent
v/v	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden.....	1
1.1.1 Extrakorporale Zirkulation mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine	1
1.1.2 Klinik	5
1.1.3 Signalwege und Inflammation	8
1.2 Selen	16
1.2.1 Selenstoffwechsel.....	16
1.2.2 Selenoproteine.....	18
1.2.3 Bedeutung von Selen für die menschliche Gesundheit.....	21
1.2.4 Ebselen	24
1.3 Ziele der Arbeit/Fragestellungen.....	27
2 Material und Methoden.....	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Versuchstiere	29
2.1.2 Laborzubehör	30
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Modelletablierung	32
2.2.2 Untersuchungen zur protektiven Wirkung von Ebselen auf den I/R-Schaden	43
3 Ergebnisse.....	49
3.1 Modelletablierung	49
3.1.1 Etablierung des Kleintier-EKZ-Modells	49
3.1.2 Blutanalysen.....	50
3.1.3 Pro-inflammatorische Zytokine und Leukozytenverlauf.....	52
3.1.4 I/R-induzierte organspezifische Veränderungen des Expressions-/Phosphorylierungsmusters von Stressproteinen.....	56
3.2 Untersuchungen zur protektiven Wirkung von Ebselen auf den I/R-Schaden	60
3.2.1 Selengehalt der Organe	60
3.2.2 GPx-Aktivität der Organe	61

3.2.3	Hämodynamische- und Vitalparameter.....	62
3.2.4	Pro-inflammatorische Zykine.....	69
3.2.5	Blutanalysen.....	72
3.2.6	I/R-induzierte organspezifische Veränderungen des Expressions-/Phosphorylierungsmusters von Stressproteinen.....	75
4	Diskussion.....	82
4.1	Etablierung des Kleintier-EKZ-Modells.....	82
4.2	Protektive Wirkung von Ebselen auf den I/R-Schaden.....	89
4.3	Limitationen der Studie.....	99
	Literaturverzeichnis.....	VII
	Abbildungsverzeichnis.....	XXX
	Tabellenverzeichnis.....	XXXII
	Danksagung.....	XXXIV
	Eidesstattliche Versicherung.....	XXXV

1 Einleitung

1.1 Ischämie-Reperfusionsschaden

1.1.1 Extrakorporale Zirkulation mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine

Die Anwendung der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit Hilfe der Herz-Lungen-Maschine (HLM) stellt heute ein Standardverfahren in der Herzchirurgie dar. Seit der ersten Anwendung der HLM in den 50er Jahren [*Dennis et al.*, 1951; *Gibbon*, 1954] wurden ständig Verbesserungen vorgenommen, die dazu führten, dass es sich heute um ein sicheres Verfahren handelt. Durch Verwendung der Herz-Lungen-Maschine, mit der die extrakorporale Zirkulation (EKZ) durchgeführt wird, ist es möglich, das Herz und die Lunge aus dem Kreislauf auszuschalten. Die HLM ersetzt vorübergehend die Pumpfunktion des Herzens sowie den Gasaustausch der Lungen. Die EKZ kommt bei nahezu allen Operationen am Herzen sowie an der thorakalen Aorta zum Einsatz. Lediglich koronarchirurgische Eingriffe können auch ohne EKZ durchgeführt werden. Grundsätzlich besteht durch Absenkung der Blut- und damit auch der Körpertemperatur durch die Wärmeaustauscher der EKZ die Möglichkeit, die Ischämietoleranz des Herzens und des gesamten Organismus zu erhöhen. Mögliche Blutdruck- und Perfusionsschwankungen und die damit verbundene lokale oder systemische Hypoxie können aufgrund des bei niedrigeren Temperaturen herabgesetzten Stoffwechsels besser toleriert werden.

Durch jahrelange technische Weiterentwicklung der EKZ konnte die Morbidität signifikant reduziert und die Mortalitätsrate für die meisten der durchgeführten herzchirurgischen Eingriffe deutlich gesenkt werden [*Taylor*, 1998]. Trotz stetiger Verbesserung und sinkender Mortalität kann die Anwendung der EKZ weiterhin zu Komplikationen wie beispielsweise systemischen Inflammationsreaktionen und Multiorganversagen führen [*Boeken & Feindt*, 2008].

EKZ mit tief-hypothermem Kreislaufstillstand

Taufic und Lewis beschrieben 1953 erstmals die erfolgreiche Durchführung eines tief-hypothermen Kreislaufstillstands (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) im Rahmen einer Operation mit Hilfe der EKZ [Taufic & Lewis, 1953]. Mit der Weiterentwicklung der EKZ fand der DHCA zunehmend Anwendung bei herzchirurgischen Eingriffen wie z.B. der Behandlung der Fallot'schen Tetralogie, der Transposition großer Arterien und Behandlung von Defekten des Ventrikelseptums [Ehyai et al., 1984; Oates et al., 1995]. Zu den Vorteilen des DHCA zählen unter anderem eine verkürzte EKZ-Exposition, eine verbesserte Darstellung durch die Schaffung eines blutleeren OP-Feldes sowie ein vermindertes Auftreten postoperativer Ödeme [Jonas, 2002]. Allerdings kommt es durch den Kreislaufstillstand zu einer globalen Ischämie, die auch durch die Hypothermie nicht verhindert werden kann. Als Folge entsteht postoperativ der sogenannte Ischämie-Reperfusions-Schaden (I/R-Schaden).

Ischämie- Reperfusions-Schaden und oxidativer Stress

Die Summe der für eine Zelle toxischen Ereignisse, die während einer Ischämie und einer anschließenden Reperfusion entstehen, wird unter dem Begriff „Ischämie-Reperfusions-Schaden“ (I/R-Schaden) zusammengefasst. Als Ischämie wird eine Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung eines Organs, Organteils oder Gewebes durch mangelnde arterielle Blutzufuhr bezeichnet. Als Folge kommt es zu einer Hypoxie oder, bei längerem Bestehen, zu einer Nekrose [de Gruyter, 2001]. Als Reperfusion bezeichnet man die wieder einsetzende Durchblutung eines Organs oder Gewebes nach vorübergehender Unterbrechung der Blutzufuhr [Lehmann, 2009].

Ein entscheidender Anteil an dem I/R-Schaden wird den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zugeschrieben. Zu diesen zählen u.a. Superoxidradikale (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale (OH.) und Peroxynitrit (ONOOH). Die Bildung von ROS ist eine normale Begleiterscheinung jeder aeroben Stoffwechselaktivität der Zelle und ist wichtig für die Induktion von Signalwegen als Antwort auf intra- und extrazelluläre Änderungen des Zellmilieus [Brömme et al., 2002; El Gollu-Bennour et al., 2011]. Die Menge

der während der Ischämie erzeugten ROS ist relativ gering, wohingegen sie während der Reperfusion durch die wieder einsetzende Sauerstoffversorgung deutlich ansteigt [Dawson *et al.*, 1995]. Erzeugte ROS werden durch verschiedene enzymatische und nicht enzymatische Antioxidantien entgiftet. Zu nennen sind hier u.a. diverse Superoxiddismutasen (SOD), die Glutathionperoxidasen (GPx) und die Katalase (CAT). Wenn die Menge der entstandenen ROS die Entgiftungskapazität eines Organs überschreitet, entsteht oxidativer Stress [Schewe 1994]. ROS können u.a. Lipidperoxidation initiieren, Proteine durch Oxidation inaktivieren und DNA-Strangbrüche hervorrufen [Guo *et al.*, 2012]. All diese Faktoren können zu Gewebeschädigungen führen [Brömme *et al.*, 2002] und im schlimmsten Fall Multiorganversagen und damit den Tod des Patienten verursachen [Carden & Granger, 2000].

Neben ROS werden außerdem eine Aktivierung des Komplementsystems, eine Kalziumüberladung sowie inflammatorische Prozesse [Prasad *et al.* 2009; Eltzschig und Collard, 2004] als Ursachen für den I/R-Schaden postuliert. Die Folgen und Veränderungen, die mit dem I/R-Schaden einhergehen, sind maßgeblich von Grad und Dauer der Ischämie sowie der Empfindlichkeit und dem Zustand des jeweiligen Organs bzw. Gewebes abhängig [Brömme *et al.*, 2002].

Der I/R-Schaden kann in drei Phasen eingeteilt werden:

Während der ersten ischämischen Phase führt die temporäre Unterbrechung der Blutzufuhr zu einem Mangel an Sauerstoff und Nährstoffen [Eltzschig & Collard, 2004]. Außerdem ist die ATP-Bildung durch oxidative Phosphorylierung gestört, was zu Änderungen im Zellstoffwechsel führt. Die verminderte ATP-Verfügbarkeit limitiert die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, welche den Calciumausstrom über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher reguliert [Gourdin *et al.*, 2009]. Dies führt zu einem Calciumüberschuss, der eine strukturelle Störung sowie Apoptose und Nekrose der betroffenen Zellen verursacht. Des Weiteren schaffen Chemokine und Adhäsionsmoleküle einen pro-inflammatorischen Zustand. Außerdem führt der veränderte Zellstoffwechsel zu einer Akkumulierung von Vorstufen oxidativer Phosphorylierung, was wiederum zu

Konformationsänderung oder Zerstörung von Enzymen führen kann [Eltzschig & Collard, 2004].

In der zweiten Phase des I/R-Schadens kommt es durch den wieder einsetzenden Blutfluss zur Reoxygenierung der Organe. Obwohl Sauerstoff existentiell für das Überleben der Zellen ist, kann er auch schädlich sein, da er zu ROS wie H_2O_2 oder O_2^- umgewandelt werden kann. ROS können die Zellen sowohl direkt (z.B. durch Lipidperoxidation oder DNA-Oxydierung) als auch indirekt (z.B. durch Interaktion mit NO oder Fettsäuren) schädigen. Dies führt häufig zur Bildung von noch zytotoxischeren Substanzen wie z.B. Peroxynitrit oder Hydroxylradikalen [Kleikers et al., 2012]. Außerdem können die gebildeten ROS die inflammatorische Antwort durch eine Hochregulation von Adhäsionmolekülen noch verstärken [Eltzschig & Collard, 2004]. Deshalb kann die Reperfusionphase auch als „zweischneidiges Schwert“ angesehen werden: auf der einen Seite benötigt die Zelle den wieder zur Verfügung stehenden Sauerstoff, auf der anderen Seite führt dieser zu einer vermehrten ROS-Bildung. Diese paradoxe Rolle des Sauerstoffs während der Reperfusionphase wird auch als Sauerstoffparadoxon bezeichnet [Kleikers et al., 2012].

Ein weiteres Paradoxon zeigt sich in der dritten Phase des I/R-Schadens, der post-Perfusionsphase. Verglichen mit den schädlichen Wirkungen während der Reperfusion beeinflussen die ROS in dieser Phase verschiedene Prozesse, die optimale Überlebenschancen für Zellen schaffen. So wird beispielsweise die Angiogenese durch ROS über eine Aktivierung der Faktoren VEGF (vascular endothelial growth factor) und HIF (hypoxia-inducible factor) induziert. Die Proliferation und Differenzierung der vaskulären glatten Muskelzellen (vascular smooth muscle cells, VSMC), welche für das vaskuläre *remodeling* benötigt werden, werden ebenfalls durch die ROS beeinflusst [Maulik, 2002]. Niedrige bis moderate ROS-Level können die antioxidative Abwehr verstärken, wohingegen hohe ROS-Level die Zellen durch Entzündungsreaktionen, Apoptose und Nekrose schädigen [Rodrigo et al., 2013].

1.1.2 Klinik

Auswirkungen der EKZ auf den Organismus

Neben den therapeutischen Perspektiven, die die EKZ eröffnet, kann sie einen Ausgangspunkt für systemische und organspezifische Komplikationen darstellen. Der mechanische Transport durch die Rollerpumpen und nicht-endothelialen Oberflächen der HLM führt zu verschiedenen Veränderungen im Organismus. Dazu zählen z.B. Hämolyse der Erythrozyten, Leukozytose als inflammatorische Reaktion, Thrombozytopenie, gesteigerte Permeabilität der Kapillaren, Aktivierung humoraler Systeme (Blutgerinnung, Komplementsystem, Fibrinolyse etc.) und sekundäre Organfunktionsstörungen. Typische Organfunktionsstörungen sind Herzinsuffizienz, renale und pulmonale Dysfunktionen, Gerinnungsalterationen sowie neurologische und kognitive Einschränkungen [Baehner et al., 2012].

Bei Operationen mit Hilfe der EKZ kann ein systemisches Entzündungssyndrom entstehen [Hess, 2005]. In leichten und zeitlich limitierten Fällen spricht man dann vom sogenannten Post-Perfusions-Syndrom, das in 2-10 % der Fälle in ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) übergeht. Das SIRS ist ein Symptomkomplex und stellt die Reaktion auf inflammatorische Prozesse unabhängig ihrer Genese dar. Es kann in unterschiedlichen Schweregraden auftreten und bis zum Multiorganversagen führen [Boeken et al., 2008]. Als Ursachen kommen materialunabhängige Faktoren wie Traumata und Ischämie [Baehner et al., 2012] sowie materialabhängige Faktoren wie der Kontakt des Blutes mit Fremdoberflächen in Frage [Boeken et al., 2008]. An der Pathogenese sind sowohl das spezifische humorale (Antikörper aus B-Lymphozyten) und zelluläre (T-Lymphozyten) Immunsystem, das unspezifische Immunsystem (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, diverse Kaskadensysteme) sowie makro- und mikrohämodynamische Veränderungen beteiligt [Boeken et al., 2008; Warren et al., 2009].

Zusammenfassend können die Abläufe des SIRS folgendermaßen dargestellt werden: durch die EKZ kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems und zu einer Zytokinantwort, was eine Reaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen verursacht. Dies führt zur Einwanderung und

Degranulation von Granulozyten mit einer Freisetzung von Proteasen, Sauerstoffradikalen und Arachidonsäuremetaboliten. Daraus resultiert eine Gewebeschädigung, welche zu Organdysfunktionen führt [Boeken et al., 2008]. Ein schematischer Überblick der potentiellen inflammatorischen Antwort nach extrakorporaler Zirkulation ist in Abbildung 1 dargestellt.

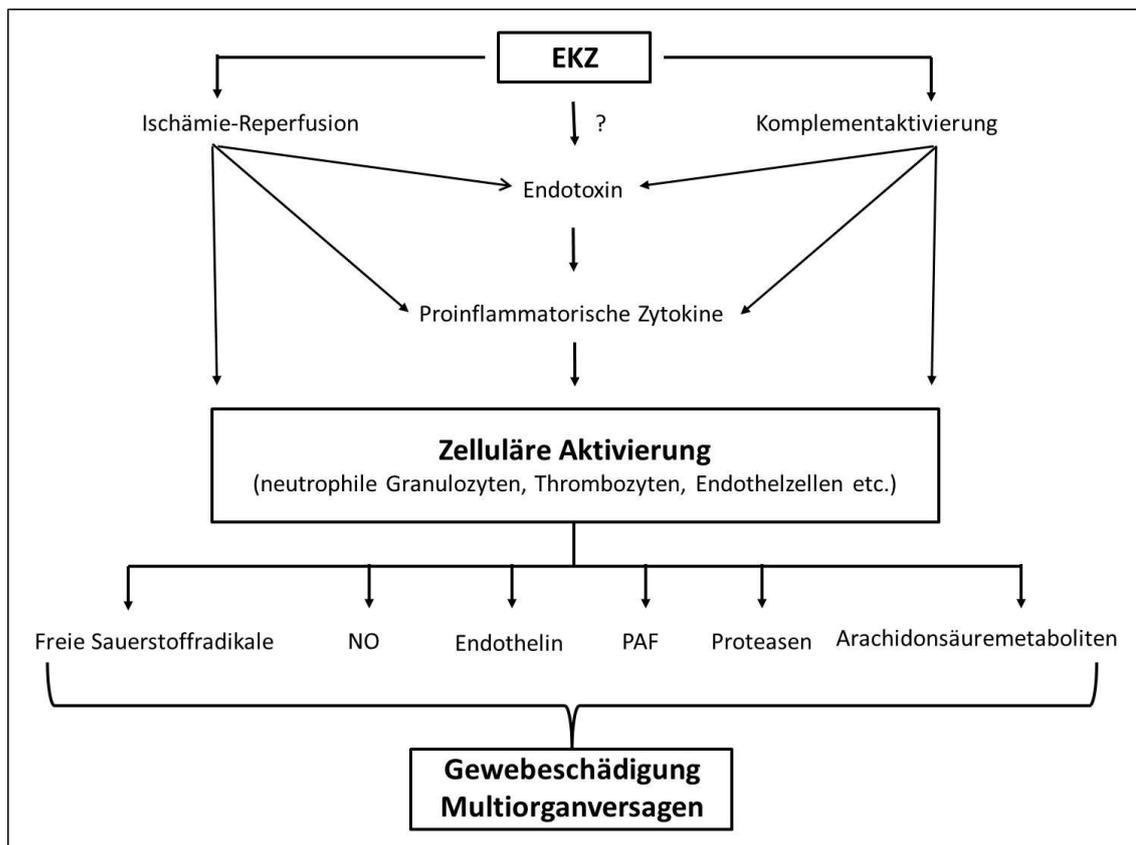


Abb. 1: Schematischer Überblick der inflammatorischen Antwort nach EKZ (modifiziert nach Wan et al., 1997). EKZ = extrakorporale Zirkulation; NO = Stickstoffmonoxid; PAF = Plättchenaktivierender Faktor.

Therapeutische Ansätze

Die immunologische Reaktion auf die extrakorporale Zirkulation kann eine systemische Inflammation auslösen und erfüllt in 2-10% der Fälle die Definitionskriterien eines SIRS [Baehner et al., 2012].

Bei dem SIRS handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen, in welchem verschiedenste Systeme komplex miteinander vernetzt sind. Da die meisten Interaktionen zwischen diesen einzelnen Systemen bis heute nur teilweise oder noch nicht bekannt sind, scheinen pharmakologische Monotherapien wenig vielversprechend. Therapieansätze zur Abschwächung dieser systemischen Reaktionen beinhalten bisher die Gabe von Glukokortikoiden [Jansen, 1991], Aprotinin [Dhir, 2013], die Verwendung Heparin-beschichteter EKZ-Systeme und intraoperativer Ultrafiltration [Sohn et al., 2009; Groeneveld, 1990] sowie die Gabe von Antioxidantien [Manzanares et al., 2011]. Die bisherigen Therapieansätze zur Beeinflussung der systemischen Inflammation zeigt Abbildung 2.

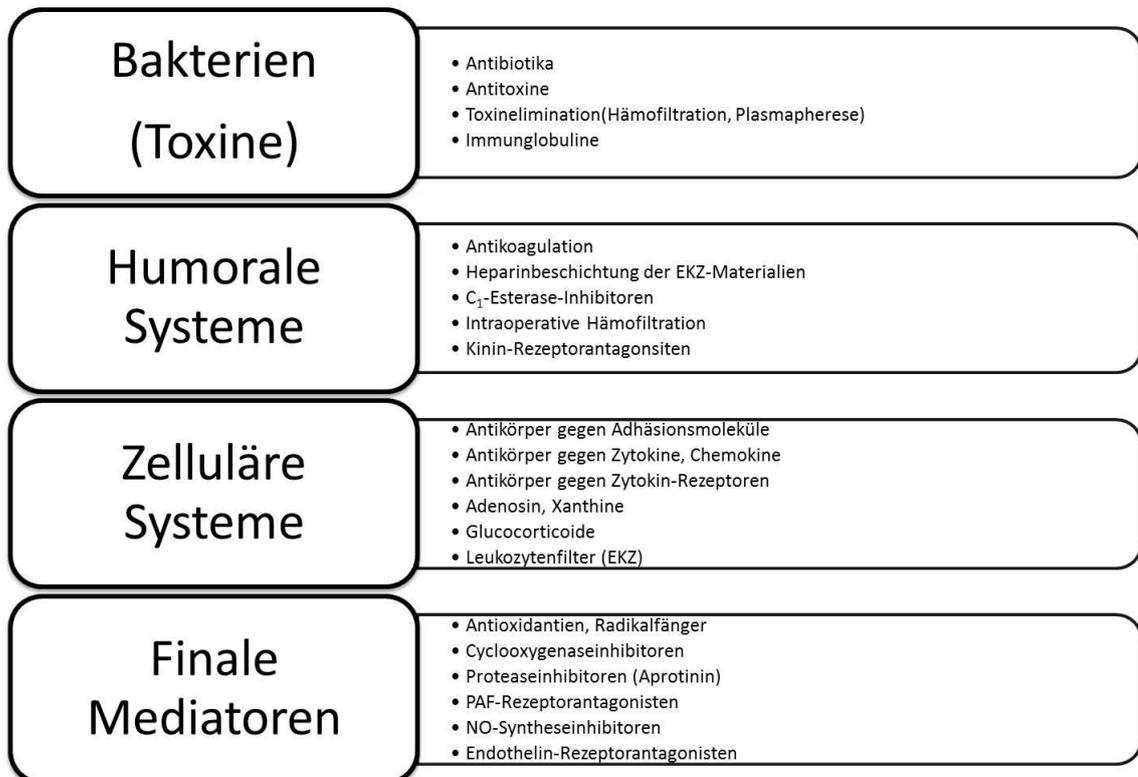


Abb. 2: Therapieansätze zur Beeinflussung der systemischen Inflammation (modifiziert nach Boeken et al., 2008).

1.1.3 Signalwege und Inflammation

Aktivierung und Regulierung der Signalwege während Ischämie und Reperfusion

Die ROS-Produktion während I/R initiiert diverse untereinander vernetzte Signalkaskaden, welche durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen reguliert werden. Diese komplexen Signalkaskaden initiieren letztendlich die Transkription von inflammatorischen und anti-inflammatorischen Genen, die beschädigte Zellen reparieren bzw. zu ihrer Regeneration beitragen. Zu nennen sind an dieser Stelle unter anderem der MAP-Kinase-Signalweg, der JAK/STAT-Signalweg sowie die Expression von Heat-Shock-Proteinen. Die Phosphorylierung von Proteinen erfolgt durch Proteinkinasen. Es sind zwei Klassen von Proteinkinasen bekannt: zum einen die Serin- und Threonin-Kinasen und zum anderen die Tyrosin-Kinasen [Lopez-Neblina & Toledo-Pereyra, 2006]. Gegenspieler der Proteinkinasen sind die Proteinphosphatasen, welche die Proteine dephosphorylieren [Lopez-Neblina & Toledo-Pereyra, 2006]. Proteinkinasen können durch Einflüsse wie metabolische und neurologische Krankheiten, Krebs oder Ischämie und Reperfusion dysreguliert werden. Eine anhaltende Dysregulation kann dabei zum Zelltod führen. Bei der Ischämie-Reperfusion von Organen spielen zwei Familien von Proteinkinasen eine wichtige Rolle: zum einen die Tyrosin-Kinasen und zum anderen die mitogen-activated-protein-Kinasen (MAPK) [Toledo-Pereyra et al., 2008].

MAP-Kinasen

Bei den MAP-Kinasen handelt es sich um Serin-/Threonin-Kinasen mit einem Molekulargewicht von 36-44 kDa. Der MAP-Kinase-Weg bezeichnet eine Reihe mehrstufiger Signaltransduktionswege, die unter anderem an der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, dem Zellwachstum und der Apoptose beteiligt sind. MAP-Kinasen werden von verschiedenen Zelltypen exprimiert. Dazu zählen beispielsweise Kardiomyozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen. Aktiviert werden sie durch Stimuli wie Ischämie, Stress, Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren und vasoaktive Stoffe [Khan et al., 2004]. Die Signalwege

umfassen mindestens drei in Serie geschaltete Kinasen: eine MAPK-Kinase Kinase (MAPKKK), die eine MAPK-Kinase (MAPKK) phosphoryliert und dadurch aktiviert, welche wiederum eine MAP-Kinase (MAPK) aktiviert [Aikawa *et al.*, 1997]. Aktivierte MAP-Kinasen wiederum aktivieren Transkriptionsfaktoren und andere Proteinkinasen [Kyriakis & Avruch, 2012]. Dadurch wird die Transkription verschiedener Gene initiiert, die in biologische Prozesse wie Apoptose, Wachstum, Differenzierung, Zytokinproduktion und Zelldifferenzierung involviert sind [Cheng & Karin, 2001; Keshet & Seger, 2010]. Die Inaktivierung der MAP-Kinasen erfolgt durch die MAPK-Phosphatasen 1/2 und 3 (MKP 1/2, MKP 3).

Es gibt drei Hauptfamilien der MAP-Kinasen: die *extracellular signal-regulated kinases* (Erk), welche über Wachstumshormonrezeptoren aktiviert werden und die stress-aktivierten Kinasen *c-Jun NH₂-terminal protein kinases* (JNK) sowie die p38 Kinasen, die durch zellulären Stress wie ROS, Ischämie, Hitze oder Zytokine aktiviert werden [Armstrong, 2004]. Die Signalwege dieser drei MAP-Kinasen sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

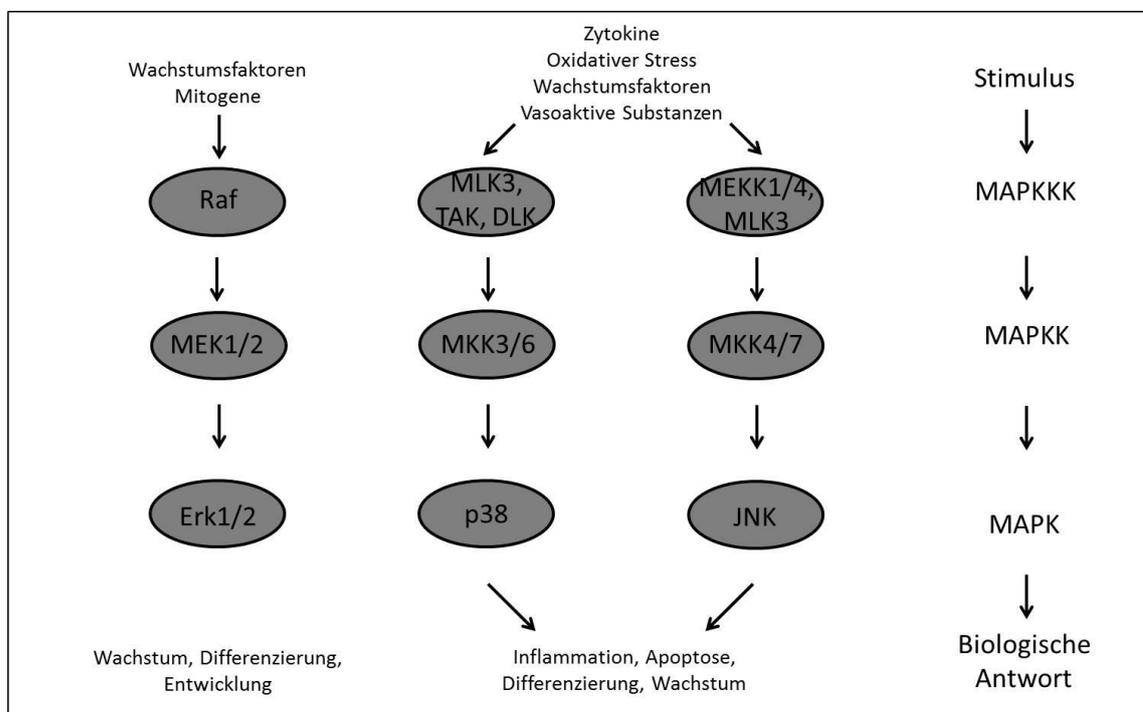


Abb. 3: MAPK-Signalwege. Raf=rapidly accelerated fibrosarcoma; MEK=MAP-Erk-Kinase; MLK= Mixed lineage kinase ; TAK= Transforming growth factor-β-activated kinase; DLK= Dual-Leucine zipper Kinase; MKK= mitogen-activated protein kinase kinase.

Der Erk-Signalweg wurde als erster MAPK-Signalweg bei Säugetieren identifiziert. Die Erk werden durch zwei verschiedene Gene (Erk1 und Erk2) codiert. Für ihre Aktivierung bedarf es einer dualen Tyrosin- und Threonin-Phosphorylierung an den Stellen Thr203-Glu-Tyr205 (Erk1) und Thr185-Glu-Tyr187 (Erk2) [Kyriakis & Avruch, 2012]. Die aktivierte Erk phosphoryliert diverse Substrate sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern [Khan et al., 2004].

Der JNK-Signalweg unterscheidet sich vom Erk-Signalweg dadurch, dass der Transkriptionsfaktor c-jun an der NH₂-Bindungsstelle anstelle der COOH-Bindungsstelle phosphoryliert wird, wie es bei Erk der Fall ist [Hsu & Wen, 2002]. Der JNK-Signalweg wird durch eine Reihe von Stimuli wie z.B. Hitze, Strahlung, Oxidierung sowie durch die Bindung von Liganden an extrazelluläre Rezeptoren wie z.B. Zytokin- oder G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren aktiviert. Als aktivierende Mediatoren sind Zytokine sowie der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) zu nennen [Khan et al., 2004].

Der p38-Signalweg wird ebenfalls durch zellulären Stress sowie durch verschiedene Zytokine wie TNF- α und IL-1 aktiviert. Demzufolge werden JNK und p38 als stress-aktivierte Proteinkinasen bezeichnet. Wie auch bei Erk und JNK wird die p38 durch eine zweifache Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosinresten aktiviert [Khan et al., 2004].

Tyrosinkinasen und JAK/STAT Signalweg

Die Janus Kinasen (JAKs) gehören zu den zytosolischen Tyrosin-Kinasen, sind mit Membranrezeptoren assoziiert und spielen eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion von der Zelloberfläche in den Zellkern. Die JAKs besitzen zwei katalytische Domänen: die JH1 (Kinasen-Domäne), welche für die katalytische Aktivität der JAKs zuständig ist und die JH2 (Pseudokinasen-Domäne), deren Rolle noch nicht gänzlich geklärt ist.

Bis heute wurden vier JAKs in Säugetieren identifiziert: JAK1, JAK2, JAK3 und Tyk2. Zu den Stimuli, die zu einer Aktivierung der JAKs führen, zählen u.a. Zytokine, Interferone und Hormone. Die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor führt zu einer Dimerisation des Rezeptors, mit dem die JAK assoziiert ist. Dies führt wiederum zu einer Transphosphorylierung und Aktivierung von

zwei angrenzenden JAKs. Diese aktivierten JAKs phosphorylieren den Tyrosinrest des zytoplasmatischen Rezeptorendes und erzeugen dadurch eine Bindungsstelle für die SH2-Domänen der STAT- (*Signal transducers and activators of transcription*) Proteine [Imada & Leonard, 2000].

Die STATs sind eine Klasse von Transkriptionsfaktoren. Sie stellen latente Transkriptionsfaktoren dar, die bis zu ihrer Aktivierung im Zytoplasma verbleiben. Bisher sind sieben STATs bei Säugetieren bekannt: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6.

Nach Bindung der STATs an den phosphorylierten Rezeptor werden sie von den JAKs an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Dadurch lösen sie sich vom Rezeptor und bilden Homo- oder Heterodimere. Diese werden dann in den Zellkern transloziert, wo sie an spezifische Sequenzen der Promoterregion der Zielgene binden und damit die Regulation und Transkription von Genen steuern [Darnell, 1997]. Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs führt unter anderem zu einer Stimulation der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmigration und Apoptose. Außerdem stellt sie einen Hauptsignalweg für die Regulation diverser Zytokine und Wachstumsfaktoren dar [Rawlings *et al.*, 2004]. Der JAK/STAT-Signalwegs ist in Abbildung 4 skizziert.

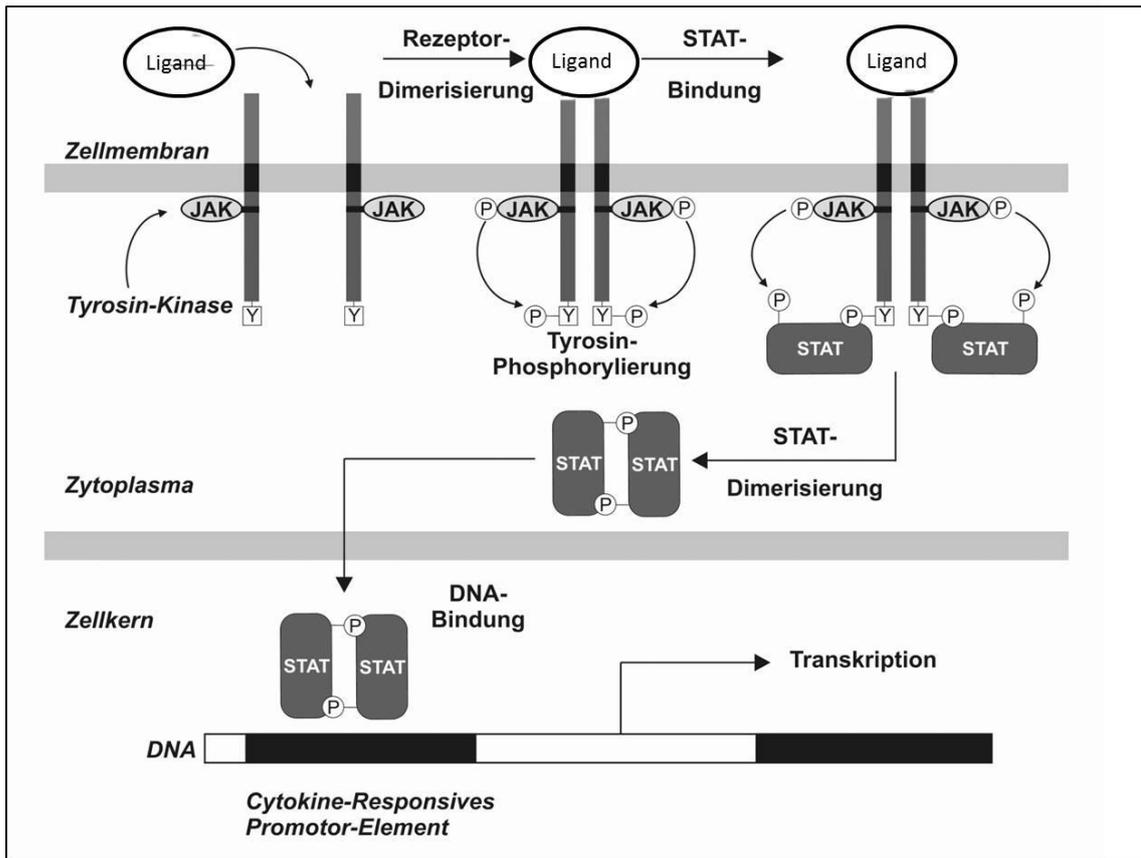


Abb. 4: JAK/STAT-Signalweg.

Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (Heat Shock Proteins, HSPs) sind Stressproteine und wichtige Mediatoren intrazellulärer Signal- und Transportmechanismen. Anhand ihres Molekulargewichtes können die HSPs in verschiedene Klassen eingeteilt werden: hoch-molekulare HSPs (> 100 kDa), HSP-90 (81-99 kDa), HSP-70 (65-80 kDa), HSP-60 (55-64), HSP-40 (35-54) und niedrig-molekulare HSPs (< 34 kDa) [Aridon *et al.*, 2011].

Viele verschiedene Zelltypen wie z.B. Makrophagen, Monozyten oder Neuronen können HSPs sezernieren. Die Freisetzung dieser Proteine kann durch eine Vielzahl von Stimuli wie beispielsweise Hitze, Hypoxie, Trauma, oxidativen Stress oder immunologische Warnsignale ausgelöst werden. Die Freisetzung erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen: zum einen durch Sekretion und zum anderen durch Zelltod. Nach der Freisetzung binden Hitzeschockproteine an

die Oberfläche angrenzender Zellen und initiieren dadurch Signalkaskaden sowie die Beförderung von Transportmolekülen. In manchen Fällen können sie auch in die Blutbahn eintreten und somit an weiter entfernten Orten im Körper aktiv werden. Viele der Effekte der extrazellulären HSPs werden durch Oberflächenrezeptoren vermittelt. Da es diverse Rezeptoren für HSPs gibt, können diese an viele verschiedene Zellen binden und komplexe, multizelluläre Funktionen erfüllen [Calderwood *et al.*, 2007]. HSPs fungieren als intrazelluläre Chaperone für andere Proteine und sind in die Regulierung von Apoptosevorgängen involviert. Sie falten neu synthetisierte Proteine, inhibieren und entfernen denaturierte Proteine und zerlegen Proteine, die irreversibel falsch gefaltet sind [Aridon *et al.*, 2011]. Erhöhte Temperaturen lösen beispielsweise eine massive Synthese von HSPs aus, die durch Hitze denaturierte Proteine entsprechend falten, die Apoptose blockieren und somit die Reparatur der Zelle ermöglichen [Beere, 2004].

HSP-70

Die HSP-70-Familie stellt die am meisten untersuchte HSP-Familie dar. Sie besteht aus mehreren Proteinen mit Molekulargewichten von 66-78 kDa. Es gibt eine konstitutive und eine induzierbare Form des HSP-70. Während die konstitutive Form von einer Vielzahl von Zellen unter normalen Umständen auf Basalniveau exprimiert wird, wird die induzierbare Form spontan unter Stressbedingungen gebildet. Die HSP-70 agiert wie alle HSPs als Chaperon. Dabei schützt sie ungefaltete Proteine vor einer irreversiblen Aggregation und katalysiert die Neufaltung von Proteinen in einer ATP- und Co-Chaperon-abhängigen Reaktion [Nollen & Morimoto, 2002]. HSP-70 hat viele Substrate wie z.B. neu synthetisierte und denaturierte Proteine [Young *et al.*, 2003]. Neben der Funktion als Chaperon ist HSP-70 essentiell für die Reifung, Aktivierung und Inaktivierung verschiedener Signalmoleküle. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Vesikelsekretion und dem Transport von Proteinen [Young *et al.*, 2003]. Im Kontext der I/R konnten unterschiedliche Funktionen von HSP-70 nachgewiesen werden. Intrazelluläres HSP-70 vermittelt anti-inflammatorische und anti-apoptotische Effekte, da es eine Antwort durch pro-inflammatorische Zytokine verhindert und den NF- κ B (*nuclear factor Kappa B*)

Signalweg inhibiert. Das extrazelluläre HSP-70 übernimmt dagegen eher eine pro-inflammatorische Rolle in der myokardialen Immunantwort nach I/R [Heck *et al.*, 2010].

Häm-Oxygenasen (HO)

Häm-Oxygenasen metabolisieren Häm, das sich als Nebenprodukt des Erythrozyten-Stoffwechsels in Geweben anreichert. Metaboliten, die im Zuge dieser Reaktionen entstehen (Biliverdin, CO und Eisen), lösen Signalkaskaden aus, die die anti-oxidative Verteidigung der Zellen unterstützen und gegen oxidativen Stress schützen.

Bisher sind drei Isoformen der HOs bekannt: HO-1, HO-2 und HO-3. HO-1 ist eine induzierbare Form, deren Expression durch eine Reihe von Stressoren wie oxidativen Stress, Ischämie/Reperfusion, Zytokine oder Hypoxie stimuliert wird [Lakkisto *et al.*, 2009]. HO-2 wird kontinuierlich in diversen Geweben, vor allem im ZNS exprimiert. Die HO-1 und HO-2 werden ubiquitär von den meisten Zelltypen exprimiert. Über die HO-3 ist bislang noch wenig bekannt [Haines *et al.*, 2012]. HO-1 wird auch als HSP-32 bezeichnet.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die HO-1 anti-apoptotische, anti-inflammatorische, anti-oxidative und anti-proliferative Eigenschaften besitzt [Otterbein *et al.*, 2003]. Das im Zuge der Häm-Metabolisierung gebildete CO trägt u.a. zur Regulation des Gefäßtonus bei, inhibiert die Plättchenaggregation und die Proliferation glatter Muskelzellen und vermittelt die anti-apoptotischen und anti-inflammatorischen Effekte der HO-1 [Lakkisto *et al.*, 2009]. Biliverdin wird durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin umgewandelt. Sowohl Biliverdin als auch Bilirubin haben anti-oxidative Eigenschaften [Stocker *et al.*, 1987]. Das gebildete Eisen führt zu einer Hochregulation von Eisentransportern, die wiederum die Expression von Ferritin induzieren. Ferritin verhindert die Bildung von ROS, indem es das freie Eisen bindet und trägt dadurch zu den anti-oxidativen Eigenschaften der HO-1 bei [Balla *et al.*, 1992]. Der HO-1 Stoffwechsel ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

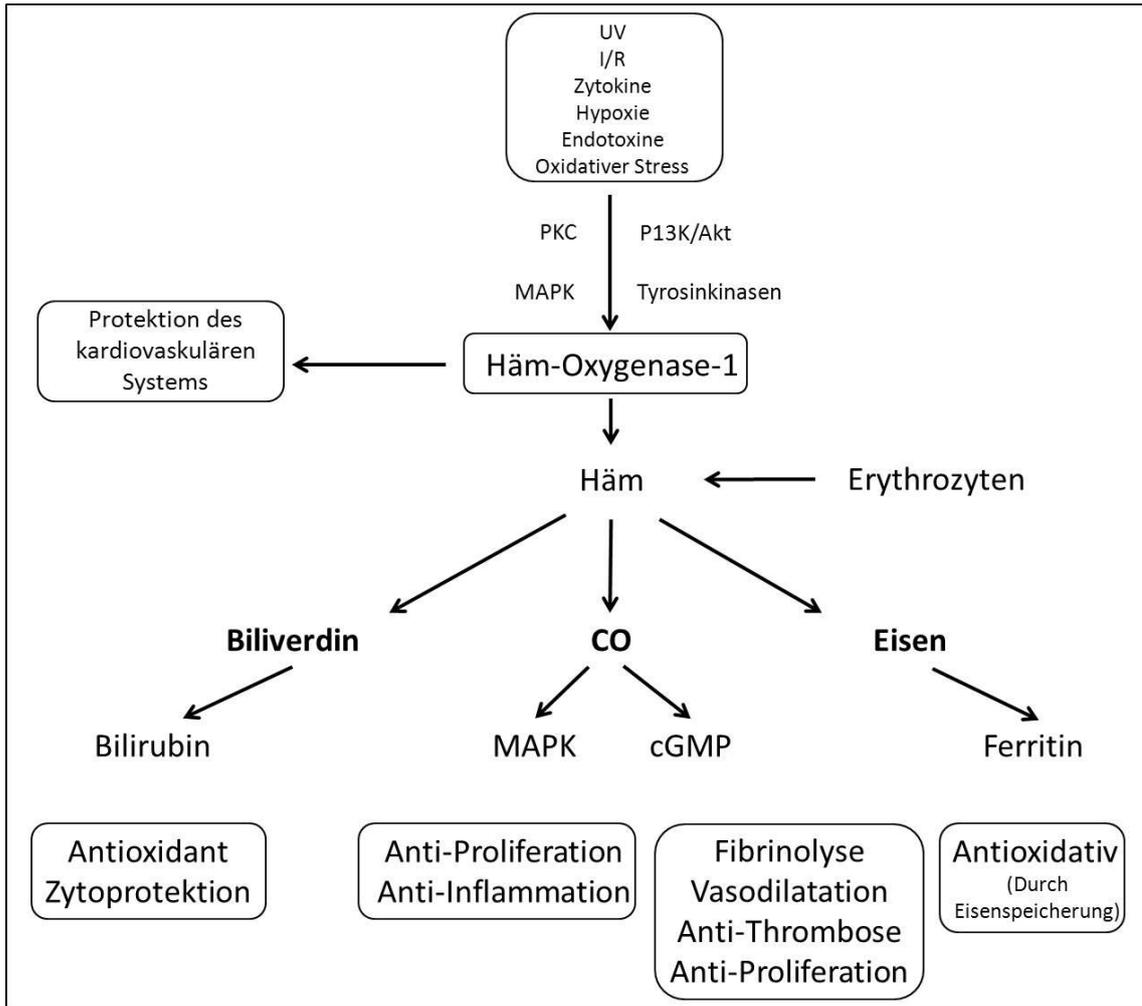


Abb. 5: HO-1 Stoffwechsel. I/R=Ischämie/Reperfusion; PKC=Protein Kinase C; P13K/Akt=I3K/AKT: phosphatidylinositol-3-kinase/AKT; MAPK=mitogen-activated protein kinase; CO=Kohlenmonoxid; cGMP=cyclische Guanosin Monophosphatase. (modifiziert nach Wang & Chau, 2010).

1.2 Selen

1.2.1 Selenstoffwechsel

Das chemische Element Selen wurde 1817 von dem schwedischen Chemiker Jöns Jakob Berzelius erstmals beschrieben. 1957 wurde erkannt, dass Selen ein essentielles Spurenelement für Säugetiere darstellt [Schwarz & Foltz, 1957]. Selen ist ein Halbmetall, das in vielen Eigenschaften dem Schwefel ähnelt.

Menschen nehmen Selen mit der Nahrung auf. Die Aufnahme von Selen unterliegt regionalen Schwankungen, die durch Bodenbeschaffenheit und Niederschläge bestimmt sind [Mehdi et al., 2013]. Selenhaltige Böden sind weit verbreitet in Teilen der USA, Kanada, Südamerika, China und Russland. Dementsprechend ist auch der Selengehalt in Nahrungsmitteln abhängig von dem Boden, auf dem die Tiere bzw. Pflanzen gehalten wurden. Zu den Haupt-Selenlieferanten in der Nahrung zählen Brot, Getreide, Fleisch, Fisch, Eier und Milchprodukte [Fairweather-Tait et al., 2011].

Selen ist in pflanzlichen und tierischen Nahrungsmitteln überwiegend in organisch gebundener Form als Selenomethionin und Selenocystein, sowie seltener in anorganischer Form als Selenit und Selenat zu finden [Whanger, 2002]. Die deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt für Erwachsene derzeit die Aufnahme von 30-70 µg Selen pro Tag. Allerdings ist Selen bereits in moderaten Mengen toxisch: die letale Dosis für Erwachsene beträgt 0,5 bis 1,0 Gramm [Fairweather-Tait et al., 2011]. Die tägliche Selenaufnahme weltweit unterliegt massiven Schwankungen. Die höchsten Aufnahmen wurden in bestimmten Regionen Chinas beobachtet (>4990 µg/Tag) [Yang et al., 1983]. In Europa liegt die tägliche Selenaufnahme durchschnittlich unter 50 µg, was im unteren Level bzw. knapp unter der empfohlenen täglichen Aufnahme liegt. Dagegen ist die tägliche Selenaufnahme in den USA mit 92-133 µg/Tag deutlich höher [Fairweather-Tait et al., 2011].

Der Selenstoffwechsel im menschlichen Organismus ist komplex und in Abbildung 6 schematisch und vereinfacht dargestellt.

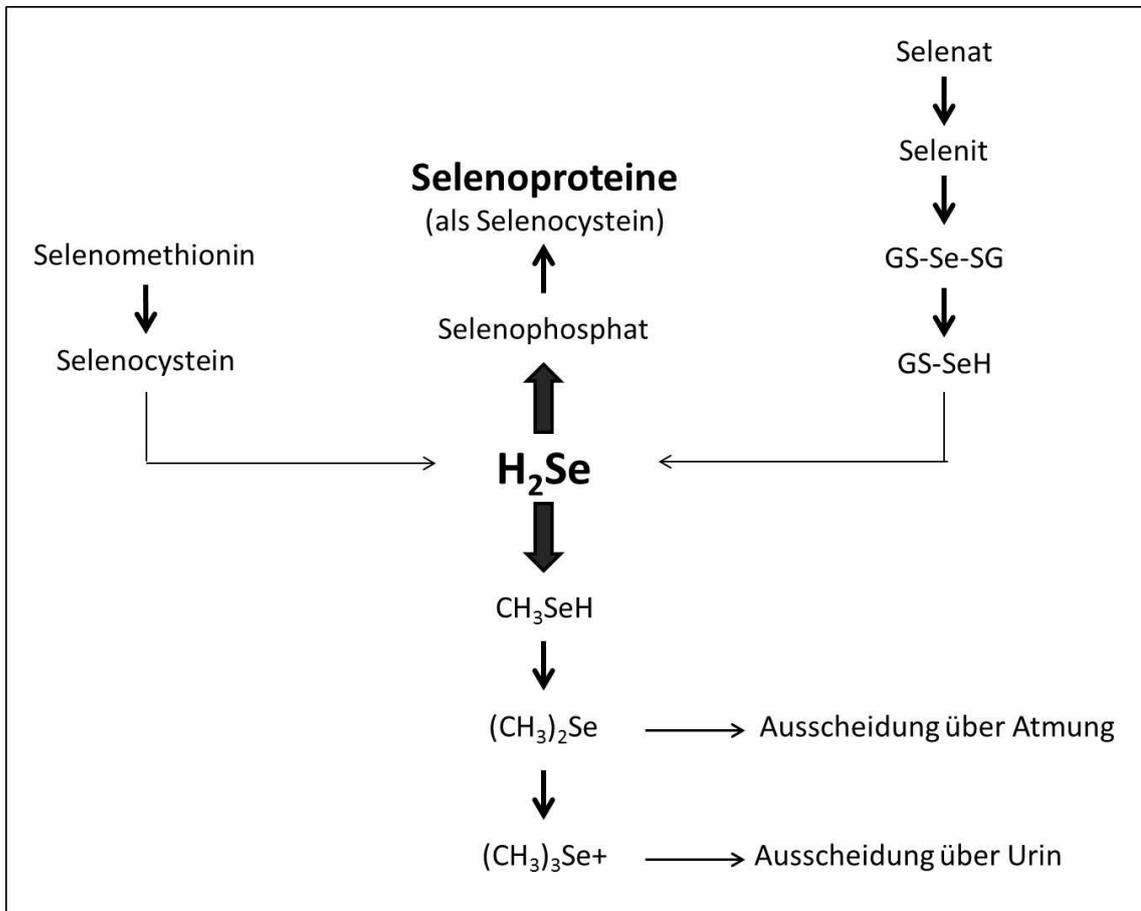


Abb. 6: Selenverbindungen und ihre Stoffwechselwege (modifiziert nach Ip 1998).

Der Einbau von Selen aus der Nahrung in Selenoproteine unterliegt einer Reihe von Umwandlungen, über die noch nicht alle Details bekannt sind. Selenwasserstoff (H_2Se) spielt eine zentrale Rolle im Stoffwechsel sowohl organischer als auch anorganischer Selenverbindungen. Über die Nahrung aufgenommenes Selenomethionin wird durch Transsulfierung zunächst zu Selenocystein umgewandelt. Durch das Enzym Selenocystein β -Lyase wird daraus Selenwasserstoff gebildet [Ohta & Suzuki, 2008].

Die anorganischen Selenverbindungen Selenat und Selenit können auf zwei Wegen zu Selenwasserstoff reduziert werden: entweder direkt durch die Thioredoxin-Reduktase oder sie können mit Glutathion reagieren und Selenodiglutathion (GS-Se-SG) bilden. Selenodiglutathion ist ein Substrat für die Glutathion-Reduktase, welche über Glutathioselenol Selenwasserstoff bildet

[Lu et al., 2009]. Das Zwischenprodukt Selenwasserstoff wird durch die Selenophosphat-Synthase zu Selenophosphat umgewandelt. Selenophosphat stellt den aktivierten Selendonator für die Biosynthese der Selenoproteine dar [Ganichkin et al., 2008]. Für die Synthese von Selenoproteinen wird eine spezifische tRNA^{ser[sec]} benötigt, wobei der Serinrest der tRNA in einen Selenocysteinrest umgewandelt werden muss. Auch das für die Selenoproteinbiosynthese notwendige Selenocystein kann durch die Reaktion von Selenwasserstoff mit der Cystein-Synthase gebildet werden. Selenwasserstoff ist auch ein Zwischenprodukt für die Selenausscheidung. Bei geringerer Selenaufnahme wird es als Selen-Zucker über den Urin ausgeschieden. Bei höherer Selenaufnahme wird es über Methylselenol zu Dimethylselenid überführt und über den Urin ausgeschieden oder als Trimethylselenonium über die Atmung ausgeschieden [Krittaphol et al., 2010].

1.2.2 Selenoproteine

Selenhaltige Proteine können in drei Klassen eingeteilt werden: spezifische und unspezifische Selenoproteine sowie Selen bindende Proteine. Spezifische Selenoproteine enthalten Selen in Form von kovalent gebundenem Selenocystein. Demgegenüber ist in den unspezifischen Selenoproteinen Selenomethionin anstelle von Methionin in die Polypeptidkette eingebaut. Die Selen bindenden Proteine stellen die dritte Gruppe dar, über die bisher noch wenig bekannt ist [Kyriakopoulos & Behne, 2002].

Für die Synthese der Selenoproteine wird Selen in Form von Selenocystein in Proteine eingebaut. Die mRNAs von spezifischen Selenoproteinen enthalten ein oder mehrere UGA-Codons, die normalerweise als Stop-Codons fungieren und zu einem Abbruch der Proteinbiosynthese führen. Dies wird durch eine als Selenocystein-Insertions-Sequenz (SECIS) bezeichnete Haarnadelschleifenstruktur verhindert, durch welche das UGA-Codon als Selenocystein übersetzt werden kann [Tujebajeva et al., 2000]. Die Biosynthese der Selenoproteine beginnt mit der Beladung der Selenocystein-tRNA (tRNA^{Sec}) mit einem Serylrest. Aus der Seryl-tRNA^{Sec} wird durch die Selenocystein-Synthase die

Selenocysteyl-tRNA (Sec-tRNA^{Sec}) unter Verwendung von Selenophosphat synthetisiert. Damit das Selenocystein korrekt an den UGA-Codons eingebaut werden kann, werden fünf zusätzliche Proteine benötigt, von denen der Selenocystein-spezifische Elongationsfaktor eEF^{Sec} und das SECIS-bindende Protein 2 (SBP2) bisher gut charakterisiert sind. SBP2 stellt ein Adapterprotein dar, welches die Bildung eines Insertionskomplexes aus SECIS, eEF^{Sec} und Ribosom vermittelt [Berry *et al.*, 1993].

Bisher wurden 25 humane Selenoproteine identifiziert [Kryukov *et al.*, 2003]. Die bekanntesten dieser Selenoproteine sind die Glutathionperoxidasen und die Thioredoxinreduktasen (TRxR), welche an der Entgiftung von freien Radikalen und Hydroperoxiden beteiligt sind [Rayman, 1997; Dawson *et al.*, 1995]. Andere anti-oxidative Selenoproteine sind die Methionin-Reduktase B, welche die Reduktion von Methioninsulfoxid katalysiert sowie das Selenoprotein P, das Phospholipidhydroperoxide reduziert und die Oxidation und Nitrierung von Plasmaproteinen inhibiert [Takebe *et al.*, 2002; Arteel *et al.*, 1998]. Die Biosynthese und Aktivität dieser anti-oxidativen Selenoproteine ist abhängig von verfügbarem Selen [Dawson *et al.*, 1995].

Eine Studie von Schoenmakers *et al.* zeigte, dass eine Beeinträchtigung der Selenoproteinsynthese zu multi-systemischen Funktionsstörungen führt, was die Rolle der Selenoproteine in diversen biologischen Prozessen betont [Schoenmakers *et al.*, 2010]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Knock-Outs der Gene der GPx 4, der TRxR 1 und der TRxR 2 letal für Mäusefeten sind, was ebenfalls die Bedeutung von Selenoproteinen unterstreicht [Conrad, 2009].

Glutathionperoxidasen

Die Glutathionperoxidasen katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid und anderen Hydroperoxiden. Als Co-Faktor dient dabei reduziertes Glutathion (GSH), das zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird. Das oxidierte Glutathion wird in einer NADPH-abhängigen Reaktion durch die Glutathion-Reduktase (GR) wieder zu GSH reduziert und damit regeneriert (s. Abbildung 7).

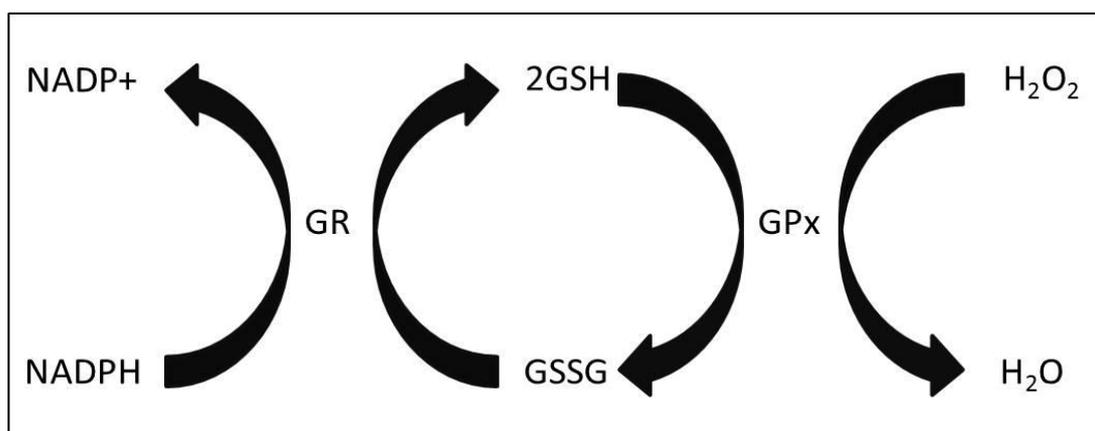


Abb. 7: Reaktionsschema der GPx und der Regeneration des oxidierten Glutathions.

Es sind vier Selen-abhängige Isoformen der Glutathionperoxidase beim Menschen bekannt:

Die zytosolische GPx (GPx 1), die gastrointestinale GPx (GPx 2), die Plasma GPx (GPx 3) und die membranassoziierte Phospholipid-Hydroperoxid GPx (GPx 4). Die GPx 1-3 katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden, wohingegen die GPx 4 Cholesterolphydroperoxide, Lipidhydroperoxide sowie Thyminhydroperoxide reduzieren kann.

Bei Selenmangel wird verfügbares Selen bevorzugt in bestimmte Selenoenzyme eingebaut, was auch als „Hierarchie der Selenoproteine“ bezeichnet wird. Für die Hierarchie innerhalb der Glutathionperoxidasen wird folgende Reihenfolge postuliert: GPx2 > GPx4 > GPx3 = GPx1 [Brigelius-Flohé, 1999]. Die GPx1 bekleidet den niedrigsten Rang dieser Hierarchie. Deshalb ist ihre Expression besonders von einer adäquaten Selenernährung abhängig, um ihre anti-oxidativen Eigenschaften zu gewährleisten [Brigelius-Flohé, 2013].

Thioredoxinreduktasen

Die Thioredoxinreduktasen bilden zusammen mit Thioredoxin und NADPH das Thioredoxinsystem, das eine wichtige Rolle als Radikalfänger spielt [Arner & Holmgren, 2000]. Bisher konnten drei Thioredoxinreduktasen identifiziert werden: Die ubiquitär im Zytosol und Nukleus vorkommende TRxR 1, die in den Mitochondrien vorkommende TRxR 2 und die in den Hoden exprimierte TRxR 3 [Papp et al., 2007].

Die Thioredoxinreduktasen reduzieren eine Vielzahl verschiedener Substrate, darunter Hydroperoxide, Lipidhydroperoxide, Ascorbat, Ubichinon und Thioredoxin [Xia *et al.*, 2003]. Thioredoxinreduktasen katalysieren die NADPH-abhängige Reaktion von oxidiertem Thioredoxin (TRx-S₂) zu reduziertem Thioredoxin (TRx-(SH)₂), welches als Reduktionsäquivalent für weitere enzymatische Reaktionen dient [Shao *et al.*, 2002]. Diese Reaktionen sind in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

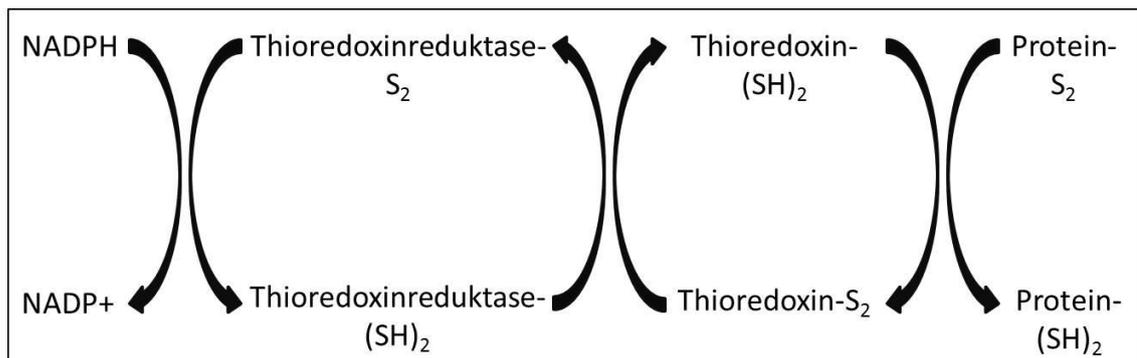


Abb. 8: Reaktionsschema des Thioredoxinsystems (modifiziert nach Shao *et al.*, 2002).

1.2.3 Bedeutung von Selen für die menschliche Gesundheit

Selen ist von fundamentaler Bedeutung für die menschliche Gesundheit. Die Aufnahme von Selen in ausreichender Menge ist für die normale Funktion des Immunsystems, der Schilddrüse, des Herz-Kreislauf-Systems, des ZNS und der Reproduktion sowie für die Tumorprävention von Bedeutung [Rayman, 1997; Brown, 2001; Schomburg *et al.*, 2004].

Um eine gesättigte Expression der Selenoproteine im Plasma sicherzustellen, wird eine tägliche Selenaufnahme von 70 µg/Tag (GPx3) bis 105 µg/Tag (SeP) in der Literatur beschrieben [Steinbrenner *et al.*, 2013]. Ein Selenmangel kann in schwerwiegenden Fällen zu Kardiomyopathien (Keshan-Disease) und Gelenkknorpeldegenerationen (Kashin-Beck-Disease) führen [Yang *et al.*, 2010; Stone, 2009]. Andererseits können Selendosen von mehr als 800 µg pro Tag zu toxischen Erscheinungen wie Hautveränderungen (Rötung, Schwellung, Blasenbildung), Nagel- und Haarveränderungen (brüchig, Farbänderung, Ver-

lust) und Neurotoxizität (z.B. periphere Anästhesie, Konvulsion, Paralyse, motorische Störungen) führen [Mehdi et al., 2013].

Selen und I/R-Schaden

Da Selen einen integralen Bestandteil anti-oxidativer Selenoproteine darstellt, wurde postuliert, dass Selenmangel eine Rolle in der Pathogenese von ischämischen Erkrankungen spielt [Altekin et al., 2005].

In einem Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die Herzen von Selen-defizienten Ratten einen höheren Gehalt an Carbonyl-Proteinen und Lipidperoxiden aufwiesen, welche Anzeichen für oxidativen Stress darstellen. Die Selen-defizienten Tiere waren anfälliger für I/R-Schäden als Tiere der Selen-adäquat ernährten Kontrollgruppe. Die Herzen der Selen-supplementierten Tiere wiesen dagegen niedrigere Carbonyl-Protein- und Lipidperoxid-Level auf, was in einer deutlich verbesserten Regeneration der Herzfunktion nach I/R resultierte [Venardos et al., 2004].

Des Weiteren wurde beschrieben, dass die Aktivität der anti-oxidativen Enzyme GPx und TRxR im Herzen von einer adäquaten Selenversorgung abhängig ist und eine verminderte Aktivität dieser Enzyme mit einer signifikant verminderten kardialen Funktion nach I/R einhergeht [Venardos et al., 2004].

Bei Intensiv-Patienten ist eine Abnahme anti-oxidativer Spurenelemente wie z.B. Selen zu beobachten, die mit dem Auftreten von Multiorganversagen und einer erhöhten Mortalität verbunden ist. In einer Studie von Stoppe et al. wurde gezeigt, dass Herzoperationen mit EKZ zu einer schwerwiegenden, intra-operativen Abnahme des Selen-Blutspiegels führen und diese niedrigen Selenpiegel direkt mit dem Auftreten von postoperativem Multiorganversagen assoziiert sind. Herzchirurgische Eingriffe mit EKZ verursachen durch Ischämie und Reperfusion oxidativen Stress. Da Spurenelemente wie Selen essentiell für die Aufrechterhaltung des oxidativen Gleichgewichtes sind, ist eine adäquate Versorgung mit diesen Spurenelementen von großer Bedeutung, um post-operativem Multiorganversagen vorzubeugen [Stoppe et al., 2011].

Auch bei anderen chirurgischen Eingriffen konnte eine protektive Wirkung von Selen nachgewiesen werden. Zapletal und Mitarbeiter zeigten in einem Tierversuch, dass eine Supplementation mit Selen einen direkten protektiven Effekt auf den I/R-Schaden nach warmer Leberischämie hat, da es als Radikalfänger fungiert und die anti-oxidative Kapazität der Leber bewahrt [Zapletal et al., 2008].

In einer Studie von Ozbal et al. konnte beobachtet werden, dass mit Selen behandelte Ratten nach zerebraler Ischämie signifikant weniger I/R induzierten neuronalen Zelltod im präfrontalen Cortex und Hippocampus zeigten als unbehandelte Ratten [Ozbal et al., 2008].

Eine Verbesserung des I/R-Schadens nach Lungentransplantation bei der Ratte konnte die Arbeitsgruppe von Hamacher [Hamacher et al., 2009] nachweisen. Mit Selen behandelte Ratten zeigten nach Lungentransplantation mit 18-stündiger Ischämie einen signifikant besseren Oxygenierungsindex (PaO₂/FiO₂) sowie eine deutlich geringere Infiltration mit neutrophilen Granulozyten als nicht behandelte Ratten. Die Autoren führten diese Verbesserung der Lungenfunktion hauptsächlich auf anti-inflammatorische Eigenschaften des Selens während der Reperfusion zurück.

Auch im Zusammenhang mit dem SIRS, welches im Rahmen der EKZ auftreten kann, konnten positive Effekte von Selen beobachtet werden. Viele SIRS-Patienten haben deutlich verminderte Selenspiegel, was direkt mit einer vermehrten Mortalität und Morbidität korreliert [Manzanares & Hardy, 2009]. In Studien von Angstwurm und Manzanares [Angstwurm et al., 2007; Manzanares et al., 2011] konnte gezeigt werden, dass eine Supplementierung mit Selen den Schweregrad der Erkrankung sowie das klinische *Outcome* verbessern, infektiöse Komplikationen verhindern und die Mortalität verringern konnte.

Aus den oben beschriebenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Selensupplementation eine effektive Methode darstellt, um die nach der post-ischämischen Reperfusion auftretende oxidative Schädigung zu reduzieren [Guo et al., 2012].

1.2.4 Ebselen

Ebselen ist eine synthetische, niedrigmolekulare, organische Selenverbindung mit anti-oxidativen, anti-inflammatorischen und zytoprotektiven Eigenschaften [Schewe, 1994]. Dank seines energetisch bevorzugten Fünfrings (s. Abbildung 9) zeichnet Ebselen sich durch thermodynamische Stabilität, eine dadurch bedingte geringe Toxizität und eine vergleichsweise lange Halbwertszeit aus.

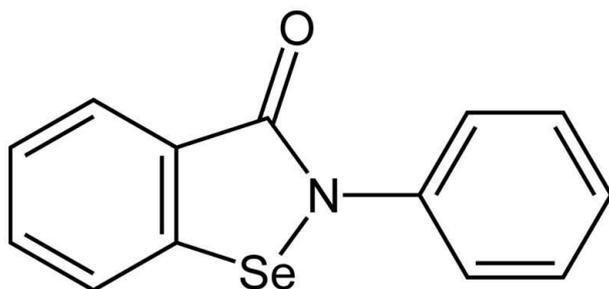


Abb. 9: Strukturformel Ebselen.

Die im Vergleich zu anderen anorganischen Selenverbindungen geringe Toxizität des Ebselens beruht darauf, dass der Selenrest während der Biotransformation nicht freigesetzt wird. Dadurch tritt kein Selenrest in den Selenstoffwechsel des Organismus ein, was bei anderen Selenverbindungen der Fall ist [Parnham & Graf, 1987].

Ebselen ist chemisch hochreaktiv, insbesondere gegen Hydroperoxide und Thiole. Im Blut wird es an Albumin gebunden transportiert [Nikawa *et al.*, 1994]. Die Albuminbindung kann auf andere Proteine, die Thiolgruppen enthalten, übertragen werden, was für die zelluläre Ebselenaufnahme entscheidend ist [Wagner *et al.*, 1994]. In niedrigen Konzentrationen inhibiert Ebselen eine Reihe von Enzymen, die in die Inflammation involviert sind. Zu nennen sind hier die Lipoxygenase, NO Synthase, NADPH Oxidase, Proteinkinase C und H-/K-ATPase [Schewe, 1994; Parnham & Sies, 2000]. Eine weitere anti-inflammatorische Eigenschaft des Ebselens ist die Inaktivierung von Leukotrien B₄ [Hamacher *et al.*, 2009].

Zu den anti-oxidativen Effekten des Ebselens zählen u.a. die Inhibierung der Lipidperoxidation [Muller *et al.*, 1984] und die Inhibierung der Produktion von Superoxidanionen durch Leukozyten [Ichikawa *et al.*, 1987].

Daneben fand man heraus, dass Ebselen als Gluthationperoxidase-Imitator agiert, indem es die Reduktion von Wasserstoffperoxid und anderen Hydroperoxiden katalysiert [Sies, 1994; *Maiorino et al.*, 1988]. Eine Übersicht ausgewählter Wirkungen von Ebselen und GPx ist in Abbildung 10 dargestellt.

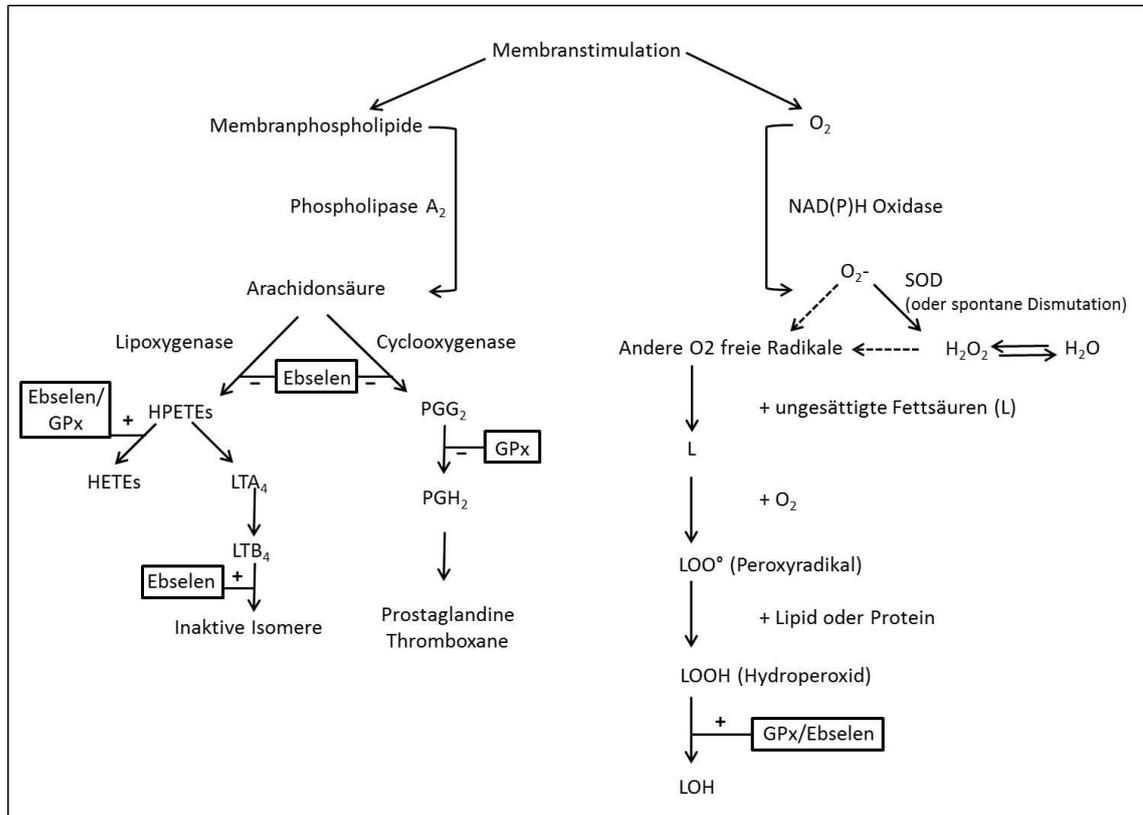


Abb. 10: Anti-inflammatorische und anti-oxidative Wirkungen von Ebselen. Zum Vergleich sind ähnliche Aktivitäten der GPx dargestellt (modifiziert nach Parnham & Graf, 1987). HPETE = Hydroperoxyeicosatetraenoic acid; LT = Leukotriene; HETE = Hydroxyeicosatetraenoic acid; PG = Prostaglandine; SOD = Superoxiddismutase;

Es ist anzunehmen, dass Ebselen durch diese multifunktionelle Wirkungsweise effektiv Schäden durch oxidativen Stress reduzieren kann [*Hoshida et al.*, 1994]. Verglichen mit endogenen, enzymatischen Radikalfängern ist Ebselen eine relativ kleine, lipophile Verbindung. Aufgrund dieser strukturellen Eigenschaften scheint Ebselen von größerem klinischen Nutzen gegen I/R-Schäden zu sein als endogene Enzyme [*Dawson et al.*, 1995].

In früheren Studien konnten positive Ebseleneffekte bereits nachgewiesen werden: eine Studie von Ogawa und Mitarbeitern zeigte, dass mit Ebselen

behandelte Schlaganfallpatienten mit vollständiger Okklusion der mittleren Cerebralarterie geringere Infarktgrößen als nicht behandelte Patienten aufwiesen [Ogawa *et al.*, 1999]. Hoshida *et al.* demonstrierten, dass Ebselen in einem Koronararterien-Okklusions-Reperfusion-Modell sehr effizient den myokardialen I/R-Schaden verringerte, indem es den Glutathion-Redox-Status bewahrte und die neutrophile Infiltration des ischämischen Myokards reduzierte [Hoshida *et al.*, 1994]. Ähnliche Ergebnisse lieferte auch die Studie von Baljinnyam und Mitarbeitern an isolierten Rattenherzen: eine orale Administration von Ebselen 24 Stunden vor I/R lieferte exzellente kardioprotektive Effekte, u.a. durch die Induktion des kardioprotektiven Heat Shock Proteins 70 und durch die Erhaltung des GSH-Niveaus [Baljinnyam *et al.*, 2006].

Aufgrund seiner geringeren Toxizität, der guten Bioverfügbarkeit und der antioxidativen, anti-inflammatorischen und zytoprotektiven Eigenschaften scheint Ebselen ein vielversprechendes Agens darzustellen, um die Toleranz gegenüber dem I/R-Schaden zu steigern.

1.3 Ziele der Arbeit/Fragestellungen

Im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe mit EKZ und DHCA kann es infolge der Reperfusion der ischämischen Organe zu Schäden im gesamten Organismus kommen. Als Ursachen dieses sogenannten Ischämie-Reperfusionsschadens werden u.a. eine durch die EKZ und den DHCA ausgelöste exzessive Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie inflammatorische Prozesse diskutiert. In Untersuchungen an einzelnen Organen konnte von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die prophylaktische Gabe der Selenverbindung Ebselen den Ischämie-Reperfusionsschaden bei Organinfarkten günstig beeinflussen kann. Ebselen ist eine synthetische organische Selenverbindung mit antioxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften, welche die enzymatische Aktivität des Selenoenzyms Glutathionperoxidase nachahmt und Enzyme wie Lipoxygenase, NO Synthase, NADPH Oxidase, Proteinkinase C und H/K-ATPase inhibiert.

Unter Verwendung einer Kleintier-Herz-Lungen-Maschine sollte deshalb mit Hilfe eines validen, neu etablierten Tiermodells der Ratte der protektive Einfluss des Ebselens auf den I/R-Schaden auf molekularer Ebene umfassend analysiert werden. In dem hier verwendeten Modell sind die Organsysteme des gesamten Organismus oxidativem Stress ausgesetzt, so wie dies während kardiochirurgischer Eingriffe (insbesondere Aorten Chirurgie) unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei Patienten in unterschiedlichem Ausmaß der Fall ist. Das besondere Interesse galt dabei den Organen Herz, Lunge, Leber und Niere.

Im Einzelnen sollten in dieser Arbeit die folgenden drei Fragestellungen durch eine Kombination von tier-experimentellen und biochemisch-molekularbiologischen Techniken bearbeitet werden:

- 1.) Ist es möglich, ein valides EKZ-Modell an der Ratte zu etablieren, mit dessen Hilfe der Einfluss von I/R während EKZ mit DHCA auf den Gesamtorganismus untersucht und bekannte pathophysiologische und molekulare Mechanismen nachvollzogen werden können?

- 2.) Gibt es bei den Tieren der Ebselengruppe im Vergleich zu denen der Kontrollgruppe Unterschiede hinsichtlich klinischer, metabolischer und laborchemischer Parameter (z.B. Blutdruck, Katecholaminbedarf, Blutbild, klinisch-chemische Blutparameter)?
- 3.) Hat die Behandlung mit Ebselen einen Einfluss auf Biosynthese und Plasmaspiegel der Immunmediatoren IL-6 und TNF- α ?
- 4.) Ist bei den Tieren der Ebselengruppe die oxidative Gewebsschädigung nach Ischämie und Reperfusion verringert? Dazu wurden mittels Western Blots die Expression und Phosphorylierungsstatus von Kinasen und Stressproteinen analysiert. Zur Kontrolle der Ebselenverteilung im Organismus wurden die Enzymaktivität der Glutathionperoxidase und der Selengehalt der Organe bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt (Aktenzeichen 87-51.04.2010.A334).

Die Operationen wurden an männlichen Wistar-Ratten (Janvier Breeding Center, Le Genest St. Isle, Frankreich) mit einem Gewicht von 500 bis 600 g durchgeführt. Die Ratten wurden zur Akklimatisation zwei Wochen vor Versuchsbeginn in der Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in Gruppen von zwei bis vier Tieren gehalten.

Den Tieren stand Futter (Haltungsfutter Ratte, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und Wasser über Futterraufen und Nippeltränken ad libitum zur Verfügung. Die Unterbringung der Ratten erfolgte in einem klimatisierten Tierstall mit einer durchschnittlichen Temperatur von 22°C, einer durchschnittlichen relativen Luftfeuchtigkeit von 55 %, einem durch eine Zeitschaltuhr geregelten hell-/dunkel-Rhythmus von 12 Stunden und einer Lichtintensität von max. 60 lux im Käfig gemäß den Vorschriften für Albinotiere (GV- SOLAS, 2004).

Der Transport vom Tierstall in den Operationssaal erfolgte in Käfigen mit einer Größe von 55 x 35 x 20 cm. Währenddessen stand den Tieren weiterhin Futter und Wasser über Raufe und Nippeltränke zur Verfügung. Die Tiere wurden dabei keinen negativen äußeren Einflüssen (z.B. Witterung, Lärm) ausgesetzt.

2.1.2 Laborzubehör

Tabelle 1: Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I	300 mM Tris; 10 % (v/v) MeOH
Anodenpuffer II	25 mM Tris; 10 % (v/v) MeOH
Blockierlösung Western Blot	5 % (w/v) Trockenmilchpulver in TBST
GPx-Assay Puffer	100 mM Tris; 5 mM EDTA; 1 mM NaN ₃ ; 0,1 % (v/v) Triton-X 100; pH 7,6
Kathodenpuffer	25 mM Tris; 10 % (v/v) MeOH; 40 mM Glycin
SDS-Page Laufpuffer	50 mM Tris; 500 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Page Probenpuffer	300 mM Tris-HCl pH 6,8; 8 % SDS; 40 % Glycerin; 400 mM Mercaptoethanol; 0,04 % Bromphenolblau
TBS-T	5 mM Tris- HCl pH 7,5; 15 mM NaCl; 0,01 % (v/v) Tween-20

Tabelle 2: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

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

Tabelle 3: Kits und Hilfsmaterialien

Proteinbestimmung nach Lowry: DC Assay Kit	Biorad, München
Proteinmarker PageRuler	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL
M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL
Rat IL-6 ELISA Kit	Diaclone SAS, Besancon cedex, Frankreich
Rat TNF- α ELISA Kit	Diaclone SAS, Besancon cedex, Frankreich
Super Signal West Pico	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL
Super Signal West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL

Tabelle 4: Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
Maus anti-pan-cadherin	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Kaninchen anti-phospho-Erk 1/2	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
Kaninchen anti-total-Erk 1/2	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
Kaninchen anti-phospho-p38	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
Kaninchen anti-total-p38	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
Kaninchen anti-phospho-JNK	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
Kaninchen anti-total-JNK	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
Kaninchen anti-phospho-STAT3	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
Kaninchen anti-HSP-70	Cell Signaling Technology, Beverly, MA
Kaninchen anti-HO1	Cell Signaling Technology, Beverly, MA

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
HRP-coupled anti-mouse IgG	Thermo Scientific Pierce, Rockford, IL
HRP-coupled anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Discofix C3 3-Wege Hahn	Braun, Melsungen
Ethibond 4/0 Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Ethicon Prolene 5/0 Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Gelkassetten (1,5 mm)	Invitrogen, Karlsruhe
Gel Blotting Whatman Paper	Schleier & Schuell, Dassel
High Performance Chemilumineszenz Film	Amersham, Freiburg
Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Polylab Pipettenspitzen	Welabo, Düsseldorf
Vasofix Safety 16G Braunülen	Braun, Melsungen
Vasofix Safety 20G Braunülen	Braun, Melsungen

Tabelle 7: Arzneimittel

Arterenol® 1 mg/ml	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Calciumgluconat 10 %	Braun, Melsungen
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ebselen	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fentanyl 0,5 MG	ROTEXMEDICA GmbH, Trittau
HAES 6 % 130/04	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Heparin-Natrium 25.000 I.E./ 5ml	ROTEXMEDICA GmbH, Trittau
Isofluran	Actavis, Langenfeld
Kodan Tinktur forte	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Lidocain-HCL	Braun, Melsungen
NaBiC 8,4 %	Braun, Melsungen
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen
Suprarenin 1 mg/ml	Sanofi-Aventis, Frankfurt
Tris, 3 M Trometamol-Lösung	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Tabelle 8: Geräte

Analysenwaage AB-204S	Mettler, Tolebo, Schweiz
Barolog A	Dräger, Lübeck
Blutgasanalysegerät ABL 510	Radiometer GmbH, Willich
Capnomac Ultima	Datex, Helsinki, Finnland
Destillierfilteranlage Milli-Q	Millipore, Schwalbach
Druckdom	Medex Medical GmbH, Klein-Winternheim
EKG	Marquette Heilige GmbH, Freiburg
Hämatologiegerät scil Vet abc	Scil animal care company GmbH, Viernheim
Herz-Lungen-Maschine inkl. Zubehör	Dipl.-Ing. Martin Humbs, Valley
Isovapor 19.3 Forene	Dräger, Lübeck
Monitor Eagle 4000	Marquette Heilige GmbH, Freiburg
Perkin Elmer LS 50B Luminescence Spektrometer	Perkin Elmer, Rodgau
Power Wave X Select Microplate-reader	BIO-TEK Instruments Inc, Friedrichshall
Semi-Dry-Blotter	Roth, Karlsruhe
Wärmetauscher	Thermo Haake, Karlsruhe
Ventilator Harvard 683	Harvard Apparatus, Massachusetts, USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industrie, Bohemia, USA
Zentrifuge Universal 32R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

2.2 Methoden

2.2.1 Modelletablierung

Zu Beginn der Studie wurde ein Kleintier-EKZ-Modell an der Ratte etabliert. Dafür wurden zwei Tiergruppen gebildet und miteinander verglichen. Eine Gruppe bestand aus behandelten Kontrolltieren (n=5), die andere Gruppe aus nicht behandelten Tieren (n=6). Die Tiere der Kontrollgruppe wurden nach Intubation, Anästhesierung und Kanülierung einer extrakorporalen Zirkulation (EKZ) mit tief-hypothermem Kreislaufstillstand (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) unterzogen. Im Anschluss an den Versuch wurden die Tiere unter Aufrechterhaltung der Narkose durch Exsanguination euthanasiert. Dagegen wurden die nicht behandelten Tiere lediglich anästhesiert und euthanasiert, sie wurden keiner EKZ unterzogen.

2.2.1.1 Versuchsdurchführung

Das für die Versuchsreihe verwendete EKZ-Modell wurde von Jungwirth et al. etabliert [Jungwirth et al., 2006], die Tierversuche in Anlehnung daran wie folgt durchgeführt:

Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn untersucht und gewogen, das Körpergewicht dokumentiert. Zur Narkoseeinleitung setzte man die Ratte in einen Exsikkator aus Glas, dessen Boden mit isoflurangetränkter Watte ausgelegt war. Zwischen Versuchstier und Watte befand sich eine Lochplatte aus Porzellan. Sobald die gewünschte Anästhesietiefe mit Bewusstseinsverlust eingetreten war, wurde die Ratte herausgenommen und in Rückenlage gelagert. Mit Hilfe eines Trachealspreizers, einer externen Lichtquelle und einer grauen 16 G Venenverweilkanüle erfolgte die endotracheale Intubation. Anschließend wurden die Bereiche um die Inzisionsstellen (A. sacralis mediana, A. femoralis, V. jugularis externa) rasiert und desinfiziert.

Die Ratte wurde in Rückenlage gelagert, an einen Kleintier-Ventilator angeschlossen und mit einem Gemisch aus Sauerstoff und 2,5 % Vol. Isofluran bei einer durchschnittlichen Atemfrequenz von 70 Atemzügen pro Minute und

einem Beatmungsdruck von 10 - 15 mmHg beatmet. Die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO₂, O₂ und Isofluran wurden kontinuierlich über einen Atemgasmonitor überwacht. Zur Messung der peripheren Sauerstoffsättigung war ein Pulsoxymeter-Clip an einer Pfote angebracht. Eine rektal eingeführte Temperatursonde diente der Überwachung des Temperaturverlaufs. Außerdem waren die Versuchstiere an ein Elektrokardiogramm angeschlossen.

Die chirurgische Präparation und Kanülierung der Gefäßzugänge (A. sacralis mediana, A. femoralis, V. jugularis externa) erfolgte folgendermaßen:

Nach Desinfektion mit einem alkoholischen Hautantiseptikum erfolgte eine Hautinzision und die stumpfe Präparation des darunter liegenden subkutanen Gewebes. Durch weitere stumpfe Präparation wurde das zu kanülierende Gefäß isoliert dargestellt und mit Lidocainhydrochlorid benetzt, um Gefäßspasmen vorzubeugen. Kaudal wurde das Gefäß ligiert und kranial eine Ligatur vorgelegt, um den Katheter damit zu fixieren. Nach Inzision der Gefäßwand mit einer mikrochirurgischen Schere wurde ein mit Heparin gespülter Katheter vorsichtig in das Gefäß eingeführt, die vorgelegte Ligatur daraufhin verknotet und der Katheter dadurch fixiert.

Als arterielle Linie der EKZ diente die A. sacralis mediana, während die V. Jugularis als venöse Linie fungierte. Die A. femoralis wurde zur invasiven Blutdruckmessung benötigt. Als Katheter diente für die A. sacralis mediana eine rosafarbene 20 G Venenverweilkanüle, für die A. femoralis ein angespitzter Polyethylenkatheter und für die V. Jugularis ein speziell angefertigter, mehrfach perforierter Katheter (Firma Humbs, Valley). Über den arteriellen Zufluss wurde das Tier zu Beginn mit Heparin (400 IE/ kg KG) voll heparinisiert. Außerdem wurden vor Anschluss an die HLM Fentanyl-Boli über diesen Zugang appliziert (5 µg Fentanyl pro Stunde) und Blut für die Blutgas- und Blutanalysen entnommen.

Der in der A. femoralis platzierte Katheter war über einen Druckdom an einen Monitor angeschlossen. Darüber erfolgte die Messung des systolischen, diastolischen und des mittleren arteriellen Drucks (MAD). Des Weiteren wurde über den Monitor die Temperatur, die periphere Sauerstoffsättigung und das Elektrokardiogramm (EKG) überwacht. Der über die V. Jugularis externa bis in

den rechten Vorhof vorgeschobene Katheter stellte die vollständige Drainage des rechten Vorhofs und damit des gesamten venösen Rückstroms sicher. Zu genau definierten Zeitpunkten wurden Blutproben entnommen und die Vitalparameter sowie die hämodynamischen Parameter dokumentiert:

Tabelle 9: Zeitpunkte der Blutabnahmen

Zeitpunkt	
Vor Anschluss an die EKZ	T1
Nach 25 min Kühlung	T2
Bei 20 °C Wiedererwärmung	T3
Bei 35 °C Wiedererwärmung	T4
Nach 60 min Reperfusion	T5

EKZ = Extrakorporale Zirkulation, min = Minute.

Tabelle 10: Dokumentierte Parameter

Zeitpunkt		
Herzfrequenz	Hb (g/dl)	Isofluran (Vol. %)
MAD	Hkt (%)	O ₂ (L/min)
O ₂ - Sättigung	Erythrozyten (10 ³ /mm ³)	O ₂ (Vol. %)
Rektale Temperatur	Leukozyten (10 ³ /mm ³)	CO ₂ (Vol. %)
	Thrombozyten(10 ³ /mm ³)	Beatmungsfrequenz (/min)
		Beatmungsdruck (mmHg)

MAD = mittlerer arterieller Druck, Hb = Hämoglobin, Hkt = Hämatokrit, O₂ = Sauerstoff, CO₂ = Kohlendioxid.

Aufbau der EKZ

Die verwendete Herz-Lungen-Maschine besteht aus einem venösen Reservoir, einer Rollerpumpe, einem Membranoxygenator und einem Wärmetauscher, die über ein Schlauchsystem miteinander verbunden sind. Der Membranoxygenator besteht aus zwei runden Plexiglasscheiben mit einer dazwischen liegenden Diffusionsmembran. Der Wärmeaustausch erfolgt über ein temperaturgesteuertes Wasserbad, das über Schläuche an den Membranoxygenator angeschlossen ist. Vor Anschluss des Tieres an die HLM muss das System gefüllt und entlüftet werden. Dafür werden 15 ml eines kolloidalen Volumenersatzmittels (6 % Hydroxyäthylstärke, HAES) in das Reservoir gegeben und das System mit einer Flussrate von 10 ml/min gestartet. Dieser Vorgang wird als „Priming“ bezeichnet.

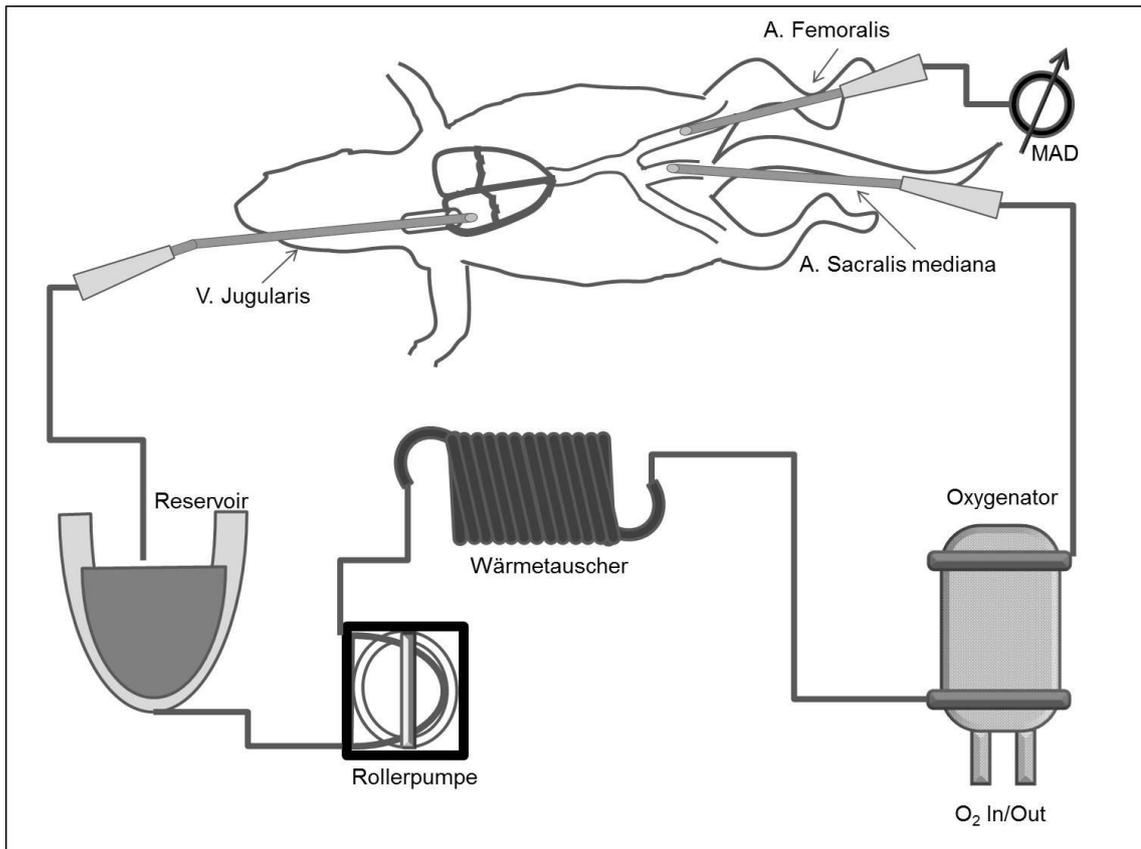


Abb. 11: Schematische Darstellung des Herz-Lungen-Maschinen-Kreislaufs.

Start der EKZ und Kühlung

Die folgende Abbildung gibt eine Übersicht zum Versuchsablauf:

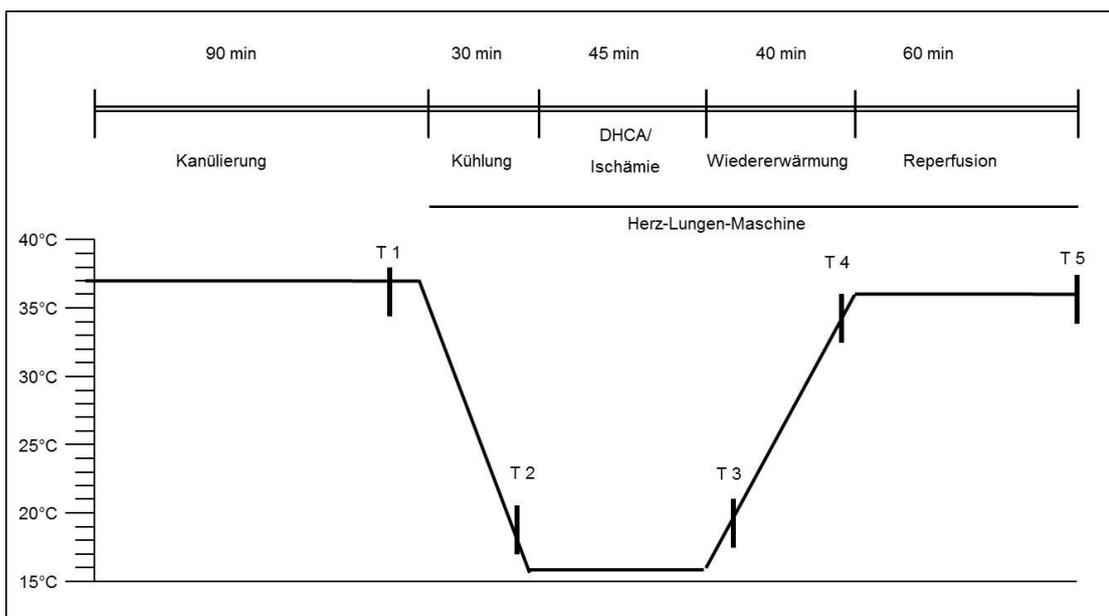


Abb. 12: Schematische Darstellung des experimentellen Zeit- und Temperaturverlaufs.

Neunzig Minuten nach Kanülierung der A. sacralis media wurde das Tier an die HLM angeschlossen und die EKZ gestartet. Dabei floss das venöse Blut aus dem rechten Vorhof über die V. Jugularis in das venöse Reservoir, von wo aus es über die Rollerpumpe durch den Membranoxygenator gepumpt wurde. Dort fand über die Diffusionsmembran der Gasaustausch von Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid und Isofluran statt. Das arterielle Blut wurde über die A. sacralis media wieder zurück in den Körperkreislauf geführt.

Nach stabilem Erreichen der vollen Flussrate an der HLM wurde das Tier innerhalb von 30 Minuten nach einem definierten Schema auf eine rektale Temperatur von 16 °C gekühlt (s. Tabelle 11). Die Kühlung erfolgte zum einen über den Wärmetauscher, zum anderen durch Kühlung der Körperoberfläche durch die externe Auflage von Eis.

Die Blutflussrate betrug zu Beginn 160 bis 180/kg¹/min⁻¹, was dem physiologischen Herzzeitvolumen einer Ratte entspricht [Jungwirth et al., 2006]. Die Flussrate wurde für jedes Tier individuell an das Körpergewicht angepasst und im Verlauf der Kühlung nach einem definierten Schema gedrosselt.

Tabelle 11: Schema für die Kühlung und Regulation der Blutflussrate während der EKZ bei einer 500g schweren Ratte

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

Die Anästhesie wurde während der Abkühlungsphase mit einem Gemisch aus Sauerstoff und 2 Vol. % Isofluran über den Oxygenator aufrecht gehalten. Die Fentanyl-Boli wurden ebenfalls weiterhin über das Reservoir verabreicht (5 µg Fentanyl pro Stunde). Zusätzlich wurde den Tieren als Muskelrelaxanz Cisartracurium (Nimbex® 0,8 mg/h) über das Reservoir verabreicht. Um Atelektasen in den Lungen vorzubeugen, erfolgte während der EKZ die Beatmung mit einer Frequenz von 10 Atemzügen pro Minute und einem Beatmungsdruck von 5 mmHg.

Kreislaufstillstand/Deep hypothermic circulatory arrest

Sobald das Tier nach 30 Minuten eine rektale Körpertemperatur von 16 °C erreicht hatte, wurden die Herz-Lungen-Maschine und die Anästhesie abgestellt. Bei geöffneter venöser Abflusskanüle und geschlossener arterieller Zuflusskanüle wurde das Tier passiv in das venöse Reservoir entblutet. Um einer Agglutination und Thrombenbildung vorzubeugen, wurde der venöse Abfluss in regelmäßigen Abständen geschlossen, der Shortcut zwischen arterieller und venöser Linie geöffnet und das Blut bei einer Flussrate von 10 ml/min zirkuliert. Aufgrund der niedrigen Temperatur kam es auch ohne kardioplegische Substanzen zu einer Asystolie. Der Kreislaufstillstand wurde für 45 Minuten bei einer rektalen Temperatur von 16 °C beibehalten.

Aufwärmphase und Reperfusion

Nach 45-minütigem Kreislaufstillstand wurde das Tier innerhalb von 40 Minuten nach einem definierten Schema auf eine rektale Körpertemperatur von 35,5 °C wiedererwärmt (s. Tabelle 12). Dies erfolgte zum einen über den Wärmetauscher, zum anderen mit Hilfe einer Infrarotlampe. Im Verlauf der Wiedererwärmung wurde der Blutfluss nach einem definierten Schema gesteigert, bis er am Ende der Aufwärmphase wieder physiologische Werte erreichte (160 bis 180 /kg⁻¹/min⁻¹). Die Flussrate wurde auch hier für jedes Tier individuell an das Körpergewicht angepasst.

Tabelle 12: Schema für die Wiedererwärmung und Regulation der Blutflussrate während der EKZ bei einer 500g schweren Ratte

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

Mit der Wiedererwärmung setzte auch die Anästhesie wieder ein. Das Tier wurde, identisch zu der Abkühlungsphase, über den Oxygenator mit 2 Vol. %

Isofluran und 1 L Sauerstoff versorgt. Außerdem wurden über das Reservoir weiterhin Cisartracurium und Fentanyl-Boli verabreicht. Die Beatmung wurde mit einer Frequenz von 10 Atemzügen pro Minute und einem Beatmungsdruck von 5 mmHg wieder aufgenommen. Mit steigender Temperatur setzte die Herzaktivität selbstständig wieder ein. Zuerst zeigten sich im EKG Kammerflattern und -flimmern. Daraufhin ging das Herz meistens -nach einzelnen Ersatzrhythmen mit verbreiterten QRS-Komplexen- in einen Sinusrhythmus über.

Auch während der Aufwärmphase wurden zu definierten Zeitpunkten die Vital- und Beatmungsparameter dokumentiert und Blut für Blutgasanalysen abgenommen (s. Tabelle 9 und 10). Bei einer rektalen Temperatur von 35,5 °C wurde das Tier für weitere 60 Minuten an der Herz-Lungen-Maschine reperfundiert.

Um eine ausreichende Reperfusion der Organe zu gewährleisten, sollte der MAD über 40 mmHg liegen. Fiel der Druck unter diesen Wert, bekam das Tier in physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Norepinephrinhydrochlorid (0,02 mg/ml Arterenol). Um azidotische Verschiebungen auszugleichen bzw. um den pH-Wert des Blutes konstant zu halten, wurde bei Bedarf Natriumbicarbonat, CO₂ oder Trometamol (Tris 36,34 %) appliziert. Bei erhöhtem Volumenbedarf (bei einem „Leerlaufen“ des Reservoirs) wurde das Blutvolumen mit 6 % HAES aufrechterhalten.

Euthanasie und Organentnahme

Im Anschluss an die Reperfusion wurde das Tier in tiefer Isoflurannarkose mit 180 ml isotoner Kochsalzlösung über den arteriellen Zugang gespült und dann durch Exsanguination getötet. Die Organe wurden stets in der gleichen Reihenfolge entnommen: Herz - Lunge - Leber - Niere.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Alle Tiere wurden innerhalb der Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit Frau Cand. Med. Lena Wollschläger operiert.

2.2.1.2 Biochemische Methoden

Western Blot

Western Blot Analysen wurden durchgeführt, um den Phosphorylierungsstatus und die Aktivität und Expression der Proteine STAT3, Erk1/2, HSP-70, HO-1, JNK und p38 zu detektieren. Dafür wurden zunächst SDS-Page-Gele (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) mit 10 % Acrylamid-Gehalt im Trenngel hergestellt und mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet.

Die Gewebeproben wurden mit M-Per Mammalian Protein Extraction Reagent aufgeschlossen. Diesem Puffer wurden Proteaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren zugesetzt. Der Proteingehalt der Gewebelysate wurde mit Hilfe des DC Protein Assays nach Vorschrift von Lowry bei 750 nm Wellenlänge nach Kalibrierung des Photometers gegen einen Leerwert (1 % SDS) gemessen [Lowry *et al.*, 1951]. Zur Erstellung einer Proteinstandardkurve wurde eine Verdünnungsreihe von Rinderserumalbumin hergestellt und deren Proteinkonzentrationen parallel zu den Proben bestimmt.

Für die Protein-Gelelektrophorese wurde das System nach Laemmli verwendet. Dazu wurden 10 bis 20 µl Lysat (40µg Protein) mit vierfachem Laemmli-Puffer versetzt, für fünf Minuten auf 92 °C erhitzt und gemeinsam mit dem Proteinmarker PageRuler auf 10 % SDS-Page-Gele aufgetragen. Danach wurden die Proteine elektro-phoretisch unter konstantem Strom (0,02 A/Gel für das Sammelgel; 0,04 A/Gel für das Trenngel) entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine in einer Semi-Dry-Blotapparatur unter Anlegen von 1,5 mA/cm² für 90 min auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach dem Transfer wurden die Proteinbanden mit Ponceau S gefärbt, um den Transfererfolg zu beurteilen. Die Farbe wurde durch Waschen mit TBST wieder entfernt. Anschließend wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung (5 % Trockenmilch) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Der entsprechende Primärantikörper wurde in Blockierlösung 1:1000 verdünnt. Die Membranen wurden dann bei 4 °C unter ständiger Bewegung über Nacht in dem Primärantikörper inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal je zehn Minuten mit TBST gewaschen und dann mit dem entsprechenden Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde erneut dreimal je zehn Minuten mit TBST gewaschen. Die Detektion erfolgte mittels eines Chemilumineszenz-Systems. Dafür wurde die Membran mit Super Signal West Pico oder Femto Chemilumineszenz-Substraten versehen. Die Membran wurde daraufhin unter Dunkelraumbedingungen mit einem lichtsensitiven Film belegt. Die entwickelten Filme wurden optisch ausgewertet und die Beschreibung der Ergebnisse erfolgte rein deskriptiv anhand der Anzahl der Tiere. Die Aussagekraft dieser Auswertung ist daher begrenzt.

Blutanalysen

Zu den oben definierten Zeitpunkten (T1, T2, T3, T4 und T5) wurde den Tieren aus der *A. sacralis mediana* (T1) bzw. aus dem arteriellen Zweig der HLM (T2-T5) Blut entnommen. Zu allen fünf Zeitpunkten wurde unmittelbar nach der Blutabnahme eine arterielle Blutgasanalyse in dem hauseigenen Blutgasanalysegerät (ABL 510 Radiometer, Willich) durchgeführt. Damit wurden die Partialdrücke von O₂ und CO₂, der Blut pH, die Sauerstoffsättigung (%), der Bicarbonat-Gehalt (mmol/l) sowie der Säure-Basen-Status in Form des Base Excesses (mmol/l) bestimmt. Außerdem wurde ein Blutbild angefertigt (abc Animal Blood Counter, scil animal care, Viernheim), in welchem die absolute Leukozytenzahl (WBC) [$\times 10^3/\text{mm}^3$], die Zahl der Erythrozyten (RBC) [$\times 10^3/\text{mm}^3$], die Zahl der Thrombozyten (PLT) [$\times 10^3/\text{mm}^3$], der Hämatokrit (Hkt) [%] und das Hämoglobin (Hb) [g/dl] bestimmt wurden.

Die Blutproben der Zeitpunkte T1, T2 und T5 wurden zusätzlich auf zwei Eppendorf-Tubes aufgeteilt, wovon eins mit 0,1 ml Heparin gefüllt war. Diese Blutproben wurden für 30 Minuten stehen gelassen, bevor sie bei 4000 x g zentrifugiert (Universal 32R, Hettich) und der Überstand danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Aus den Plasmaproben T1, T2 und T5

wurden von der Firma LABOKLIN (Bad Kissingen) die Plasmaspiegel für folgende Parameter bestimmt:

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

Zur Bestimmung der Troponin I-, CK- und CK-MB-Werte wurden ELISAs nach Anleitung des Herstellers verwendet (Troponin I: Antibody-online, Produktnummer ABIN 579682; CK- und CK-MB: My Biosource, Produktnummer MBS 705376). Die übrigen Parameter wurden spektrophotometrisch nach standardisierter Roche-Hitachi-Methodik (Roche Diagnostics, Mannheim) ermittelt.

ELISA

Aus den Serumproben der Zeitpunkte T1, T2 und T5 wurden der Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) Spiegel bestimmt. Dafür wurden ELISA Kits der Firma DIACLONE nach Anleitung des Herstellers verwendet. Es handelte sich dabei um Sandwich-ELISAs, bei denen ein an die Mikrotiterplatte gebundener, monoklonaler Antikörper als Primärantikörper und ein Biotin-Konjugat als Sekundärantikörper fungierten. HRP-gekoppeltes Streptavidin-Konjugat diente der Umsetzung des Detektionssubstrates. Die Proben wurden mit Hilfe des *Power Wave X Microplate-readers* bei 450 nm Wellenlänge gemessen und die Zytokin-Werte anhand der Standardkurve kalkuliert. Die

Standardkurve reichte von 31,3 bis 1000 pg/ml IL-6 bzw. TNF- α . Die Detektionsgrenze wurde vom Hersteller mit 19 pg/ml (IL-6) bzw. 15 pg/ml (TNF- α) angegeben. Werte unterhalb der Detektionsgrenze wurden auf Null gesetzt.

2.2.1.3 Statistische Auswertung

Die während der Operation zu den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4 und T5 dokumentierten, hämodynamischen und physiologischen Parameter wurden statistisch mit Hilfe des Computer Programms Microsoft Excel ausgewertet. Ebenso erfolgten die Blutanalysen sowie die Analyse der pro-inflammatorischen Zytokine mit dem Computer Programm Microsoft Excel. Alle erhobenen Parameter sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Vergleiche zwischen den einzelnen Zeitpunkten sowie zwischen den Kontrolltieren und den nicht behandelten Tieren wurden in dem Computerprogramm Graphpad Prism mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse ANOVA und dem post-Tukey-Test analysiert. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde definiert, um statistisch signifikante Unterschiede anzugeben.

2.2.2 Untersuchungen zur protektiven Wirkung von Ebselen auf den I/R-Schaden

2.2.2.1 Versuchsdurchführung

Nach der erfolgreichen Etablierung des Kleintier-EKZ-Modells an der Ratte wurden Untersuchungen zur postulierten protektiven Wirkung von Ebselen auf den I/R-Schaden durchgeführt. Dafür wurden die Ratten in drei Gruppen zu je sieben Tieren eingeteilt:

- Ebselen (Eb)
- Lösungsmittelkontrolle (DMSO)
- Kontrolle (K)

Die Tiere aller drei Gruppen wurden wie in 2.2.1.1 beschrieben operiert und einer EKZ mit DHCA unterzogen. Den Tieren der Ebselengruppe wurde nach Kanülierung der Schwanzarterie und der damit verbundenen ersten Blutabnahme intraperitoneal (i.p.) Ebselen (30 mg/kg KG) verabreicht. Den Tieren der DMSO-Gruppe wurde, ebenfalls nach Kanülierung der Schwanzarterie, intraperitoneal DMSO (30 mg/kg KG) verabreicht. Um eine gleichmäßige Verteilung der applizierten Substanzen zu ermöglichen, wurde das Versuchstier 90 Minuten nach der Applikation an die Herz-Lungen-Maschine angeschlossen. Eine Übersicht aller Versuchstiere der gesamten Studie ist Abbildung 13 zu entnehmen.

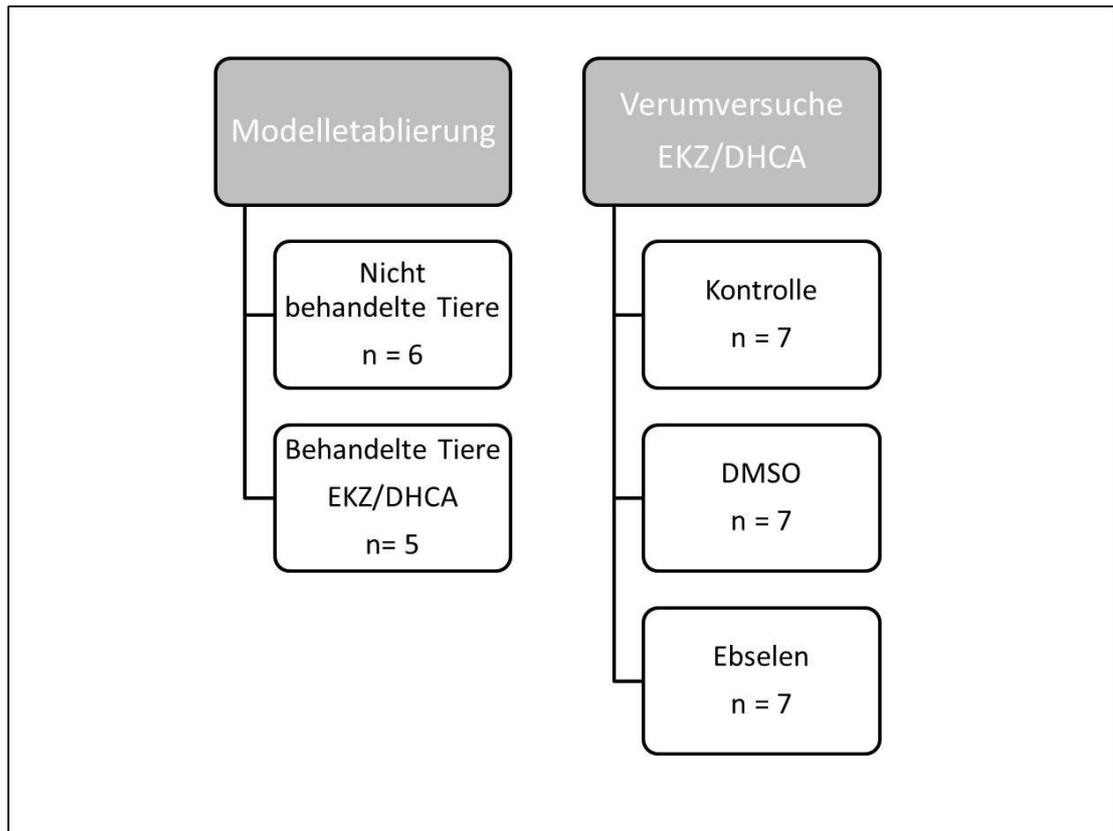


Abb. 13: Schema zur Einteilung der Tiere in die jeweiligen Versuchsgruppen.

2.2.2.2 Biochemische Methoden

Western Blot

Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurden, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, der Phosphorylierungsstatus und die Aktivität und Expression der Proteine STAT3, Erk1/2, HSP-70 und HO-1 analysiert. Die entwickelten Filme wurden eingescannt und die Proteinbanden mit Hilfe der Software *AIDA* densitometrisch (Dichte in %) quantifiziert (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt). Die densitometrischen Daten wurden auf die Ladungskontrollen normalisiert und zwischen den drei Gruppen verglichen.

Blutanalysen

Aus den Blutproben aller Versuchstiere wurden zu den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4 und T5 Blutgasanalysen durchgeführt und Blutbilder angefertigt. Des Weiteren wurden zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5 die Plasmaspiegel folgender Parameter bestimmt:

- Troponin I
- Creatin-Kinase (CK)
- MB-Isoform der Creatin-Kinase (CK-MB)
- Laktat
- Harnstoff
- Aspartat-Amino-Transferase (AST)
- Alanin-Amino-Transferase (ALT)
- Laktat-Dehydrogenase (LDH)
- Creatinin
- Calcium (Ca^{2+})

Die Bestimmung aller Parameter erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben. Alle erhobenen Daten wurden zwischen den drei Versuchsgruppen verglichen.

ELISA

Aus den Serumproben aller Versuchstiere wurden zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5, wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben, der IL-6 und TNF- α Spiegel bestimmt. Die Daten wurden zwischen den drei Versuchsgruppen verglichen.

Bestimmung des Selengehaltes mit 2,3-Diaminonaphtalin

Die Bestimmung des Selengehaltes in Gewebeproben erfolgte fluorimetrisch und wurde leicht modifiziert nach Sheehan und Gao durchgeführt [Sheehan & Gao, 1990]. Dabei wird die aus Se IV und 2,3-Diaminonaphtalin (DAN) gebildete organische Verbindung Piazselenol fluorimetrisch erfasst.

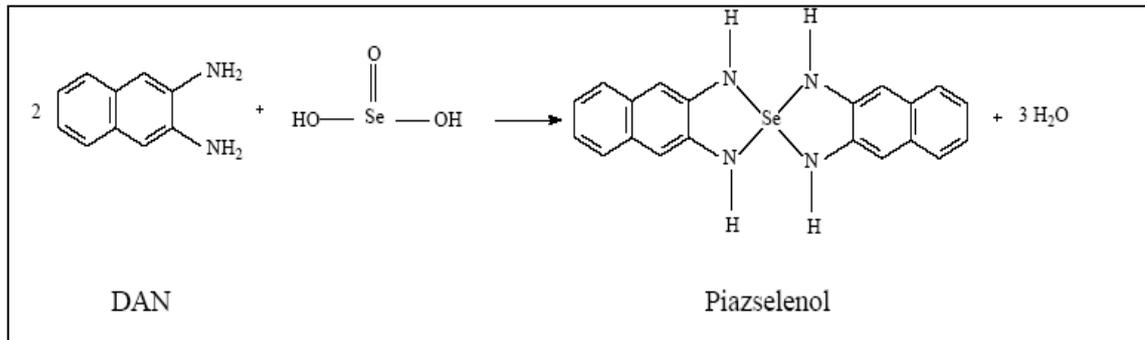


Abb. 14: Bildung von Piazselenol aus Se IV und DAN.

Dafür wurden zunächst 50 mg Organ in jeweils 100 µl Triton-X 0,1 % und M-Per Mammalian Cell Lysis Reagent lysiert. Das Lysat wurde in ein Reagenzglas gegeben, mit 500 µl Säuremischung (bestehend aus HNO₃ 65 %, HClO₄ 70 % in einem Verhältnis von 3:2) versetzt und dann auf 190 °C erhitzt. Nach 90 Minuten wurden die Reaktionsgefäße abgekühlt, 500 µl konzentrierte HCl hinzugegeben und für weitere 30 Minuten auf 150 °C erhitzt. Entstandene Nitroverbindungen wurden dadurch zersetzt. Nach erneutem Abkühlen fügte man den Ansätzen 2 ml EDTA (2,5 mM pH 8,0), 500 µl 2,3-Diaminonaphtalin (DAN, 6,3 mM in 0,2 M HCl) und 3 ml Cyclohexan hinzu, verschraubte die Reagenzgläser und erwärmte sie für 30 Minuten auf 60°C. Danach wurden die Reagenzgläser für 15 Minuten geschüttelt und dann über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag überführte man die Cyclohexanphase in Eppendorf-Tubes. In einer Quarzküvette erfolgte mit Hilfe des *Perkin Elmer LS 50B Luminescence* Spektrometers die Messung der Fluoreszenz des gebildeten Se-DAN. Dazu wurde ein Emissionsspektrum von 490-580 nm Wellenlänge bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm aufgenommen. Aus den Emissionsmaxima bei 520 nm wurde eine Kalibrierkurve aus Selenitstandards (0-10 µM Se) erstellt und anhand dieser der Selengehalt der Probe bestimmt.

GPx- Aktivitätsbestimmung in Gewebelysaten

Um die GPx-Aktivität der einzelnen Gewebe zu bestimmen, wurde ein GPx-Aktivitäts-Assay in Anlehnung an die Vorschrift von Müller et al. durchgeführt [Müller et al., 1984]. Die GPx-Aktivität in Gewebelysaten wurde photometrisch in einem gekoppelten optischen Test bestimmt. Dabei wird der NADPH-Verbrauch bei der, durch das Enzym Glutathion-Reduktase (GR) katalysierten, Regeneration des oxidierten (GSSG) zum reduzierten (GSH) Glutathion gemessen und daraus die enzymatische Aktivität der Glutathion-abhängigen Glutathion-Peroxidase (GPx) kalkuliert [Brigelius-Flohé et al., 2002].

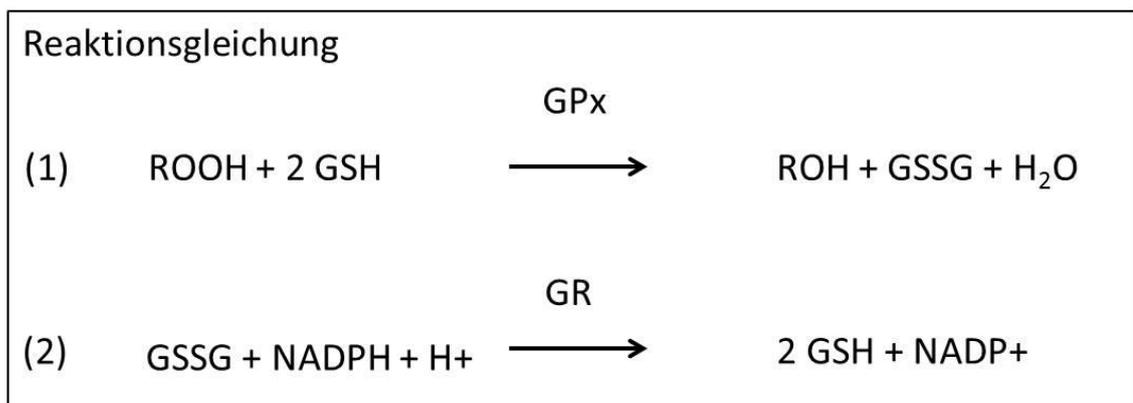


Abb. 15: Reaktionsgleichung des GPx-Assays.

Dafür wurden 830 μl Assay-Puffer, 100 μl GSR/GSH Mischung (bestehend aus 45 mg GSH und 33,2 μl GSR (U/ml) in 5 ml Assay-Puffer), 50 μl NADPH 2,5 μM und (je nach Gewebe) 10-50 μl Gewebelysat in eine Quarzküvette vorgelegt. Durch Zugabe von 10 μl tert-BuOOH (5 mM) startete die Reaktion. Der NADPH-Verbrauch wurde bei 340 nm für vier Minuten mit einem *Perkin Elmer Lambda 25 Spektrophotometer* gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität der GPx [in mU/ml] erfolgte unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten für NADPH bei 340 nm ($\epsilon = 6.2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Ein Nullwert ohne Zugabe von Lysat diente als Basalwert und wurde von den Messergebnissen abgezogen. Unter Einbeziehung der Proteinkonzentration des Gewebelysats wurde daraus die spezifische GPx-Aktivität [in mU/mg Protein] ermittelt.

2.2.2.3 Statistische Auswertung

Die während der Operation zu den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4 und T5 dokumentierten, hämodynamischen und physiologischen Parameter wurden statistisch mit Hilfe des Computer Programms Microsoft Excel ausgewertet. Ebenso erfolgten die Blutanalysen sowie die Analyse der pro-inflammatorischen Zytokine mit dem Computer Programm Microsoft Excel. Alle erhobenen Parameter sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Vergleiche zwischen den Zeitpunkten sowie zwischen den Versuchsgruppen wurden in dem Computerprogramm Graphpad Prism mit Hilfe der zweifachen Varianzanalyse ANOVA und dem post-Bonferroni-Test analysiert. Von der Zeit unabhängige Vergleiche zwischen den drei Gruppen wurden in dem Computerprogramm GraphPad Prism mit Hilfe der einfachen Varianzanalyse ANOVA und dem post-Tukey-Test analysiert. Ein P-Wert $< 0,05$ wurde definiert, um statistisch signifikante Unterschiede anzugeben.

3 Ergebnisse

3.1 Modelletablierung

3.1.1 Etablierung des Kleintier-EKZ-Modells

Der I/R-Schaden im Rahmen von Operationen mit EKZ und DHCA ist hauptsächlich verantwortlich für postoperative Komplikationen nach herzchirurgischen Eingriffen. Um mögliche Interventionsstrategien wie z.B die Gabe von Ebselen zu testen, war es daher wichtig, ein valides Tiermodell zu etablieren.

Zu Beginn der Versuche wurden die Tiere unmittelbar nach der Kanülierung der Gefäße an die HLM angeschlossen. In den Immunoblot-Analysen dieser Tiere fiel eine deutliche Varianz innerhalb der Ebselengruppe auf. Außerdem zeigte die Selenbestimmung in der Leber, dass der Selengehalt zeitabhängig schwankte (s. Abbildung 16).

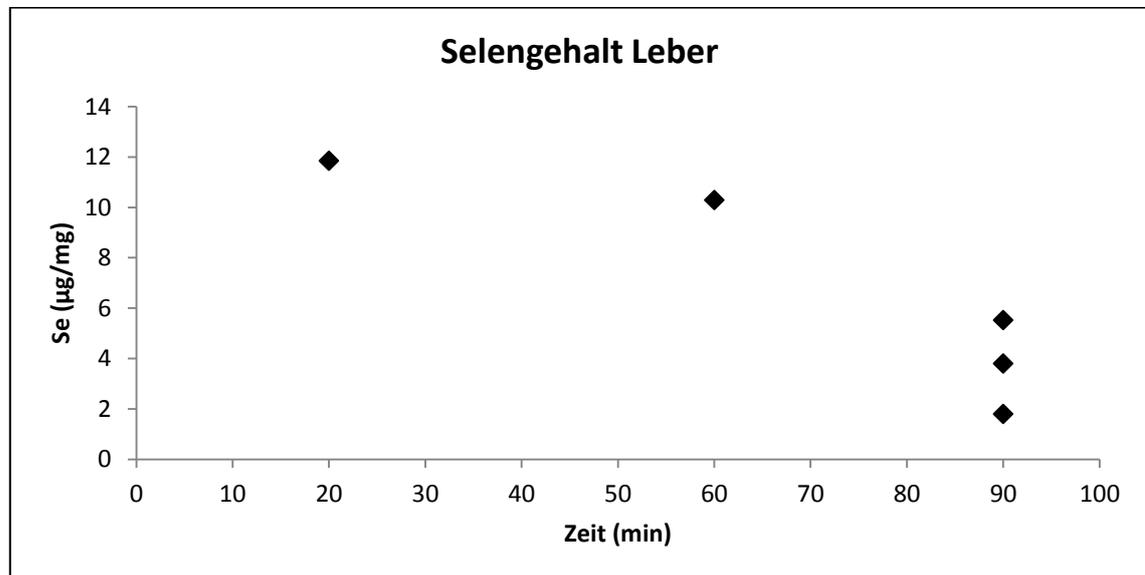


Abb. 16: Zeitabhängiger Verlauf des Selengehalts in der Leber.

Um eine gleichmäßige und vergleichbare Verteilung des Selens sicherzustellen, wurde der Zeitabschnitt zwischen Ebselen-Applikation und HLM-Anschluss auf 90 Minuten festgelegt. In der DMSO- und Kontrollgruppe wurden analog dazu ebenfalls 90 Minuten eingehalten.

3.1.2 Blutanalysen

Um den Einfluss der EKZ auf die klinisch-chemischen Blutparameter zu veranschaulichen, wurde aus den Plasmaproben der Kontrolltiere der Verlauf der Plasmaspiegel während der EKZ ausgewertet (s. Tabelle 13).

Die Troponin I-Plasmaspiegel waren nach der Kühlung signifikant höher als vor Beginn der EKZ. Dagegen waren die Plasmaspiegel der CK-MB im Vergleich zu vor Beginn der EKZ weder nach der Kühlung noch nach der Reperfusion verändert. Die AST-Aktivität war nach der Kühlung tendenziell erniedrigt, jedoch nach der Reperfusion signifikant erhöht. Die ALT-Aktivität zeigte ähnliche Tendenzen, aber die Unterschiede erreichten keine Signifikanz. Des Weiteren war ein Anstieg der LDH-Aktivität nach der Reperfusion zu sehen, welcher jedoch nicht signifikant war. Die Laktat-Plasmaspiegel waren nach der Reperfusion ebenfalls erhöht, allerdings nicht signifikant. Bei den Elektrolyten veränderten sich während der EKZ nur die Kalium-Plasmaspiegel. Diese waren nach der Reperfusion signifikant höher als vor Beginn der EKZ und nach der Kühlung.

Der Kreatinin-Wert war sowohl nach der Kühlung als auch nach der Reperfusion signifikant höher als vor Beginn der EKZ, überstieg jedoch nicht den Referenzbereich. Der Harnstoff-Wert zeigte ähnliche Tendenzen, allerdings waren die Unterschiede nicht signifikant.

Es muss erwähnt werden, dass in den Plasmaproben des Zeitpunktes T5 häufig Hämolyse zu beobachten war. Da Hämolyse einen Anstieg der Parameter AST, ALT, LDH, CK und Kalium verursachen kann, ist diese Tatsache bei der Interpretation der vorliegenden Daten zu berücksichtigen.

Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die meisten der analysierten klinisch-chemischen Blutparameter einem Einfluss der EKZ unterlagen. Die Plasmaspiegel von Troponin I, AST, Kreatinin und Kalium sind in Abbildung 17 exemplarisch dargestellt. Die Ergebnisse aller bestimmten Parameter sind Tabelle 13 zu entnehmen.

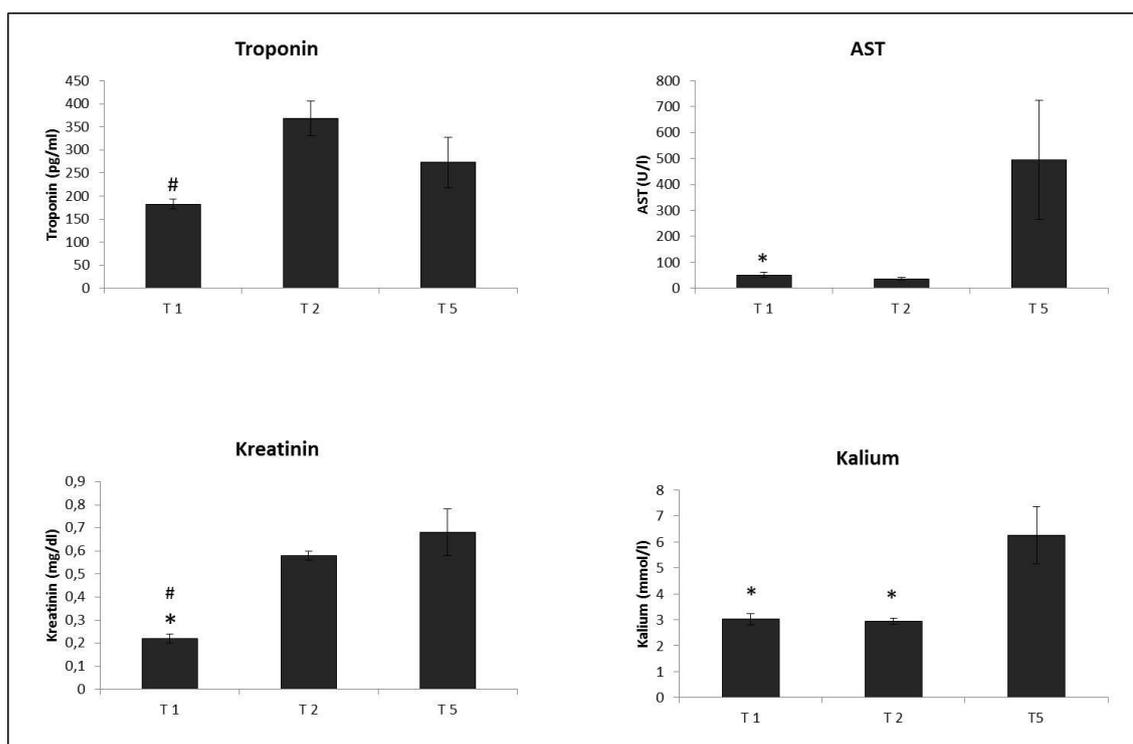


Abb. 17: Einfluss der EKZ auf ausgewählte klinisch-chemische Blutparameter. Plasmaspiegel von Troponin I, AST, Kreatinin und Kalium der Kontrolltiere zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5. T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. AST = Aspartat-Amino-Transferase. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von fünf Tieren. * P < 0,05 vs. T5; # P < 0,05 vs. T2.

Tabelle 13: Klinisch-chemische Blutparameter der Kontrollgruppe zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	T1	T2	T5
Troponin I (pg/ml)	# 182,48 (10,17)	367,80 (37,42)	272,88 (54,63)
CK-MB (ng/ml)	0,12 (0,02)	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)
Laktat (mmol/l)	2,10 (\pm 0,09)	3,75 (\pm 1,04)	25,01 (\pm 9,92)
AST (U/l)	* 51,40 (\pm 9,33)	35,00 (\pm 0,77)	495,80 (\pm 229,67)
ALT (U/l)	31,20 (\pm 2,44)	17,40 (\pm 6,18)	497,60 (\pm 298,88)
Harnstoff (mg/dl)	29,00 (\pm 1,52)	38,50 (\pm 0,77)	34,20 (\pm 7,66)
Kreatinin (mg/dl)	*# 0,22 (\pm 0,02)	0,58 (\pm 0,02)	0,68 (\pm 0,20)
LDH (U/l)	174,60 (\pm 100,47)	155,00 (\pm 58,37)	2348,80 (\pm 1328,98)
Kalium (mmol/l)	* 3,02 (\pm 0,22)	* 2,94 (\pm 0,11)	6,26 (\pm 1,10)
Calcium (mmol/l)	1,67 (\pm 0,10)	1,62 (\pm 0,03)	1,31 (\pm 0,37)

T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. CK-MB = MB-Isoform der Creatin-Kinase, AST = Aspartat-Amino-Transferase, ALT = Alanin-Amino-Transferase, LDH = Lactat-Dehydrogenase. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von fünf Tieren. * P < 0,05 vs T5; # P < 0,05 vs T2.

3.1.3 Pro-inflammatorische Zytokine und Leukozytenverlauf

Im Rahmen der durch die EKZ ausgelösten Inflammation werden erhöhte Spiegel der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α beschrieben (deJong *et al.*, 2012). Deshalb wurden in einem ersten Schritt die Serum-IL-6 und TNF- α Spiegel der nicht behandelten Tiere und der Kontrolltiere mit Hilfe eines kommerziell verfügbaren ELISAs bestimmt. Die Serumspiegel der Kontrolltiere zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5 wurden zum einen untereinander und zum anderen mit den Serumspiegeln der nicht behandelten Tiere verglichen.

IL-6

Die Analyse zeigte signifikante Unterschiede zwischen den IL-6-Werten des Zeitpunkts T5 und den Zeitpunkten T1 und T2 der Kontrolltiere sowie zwischen dem Zeitpunkt T5 der Kontrolltiere und den nicht behandelten Tieren (s. Abbildung 18 und Tabelle 14).

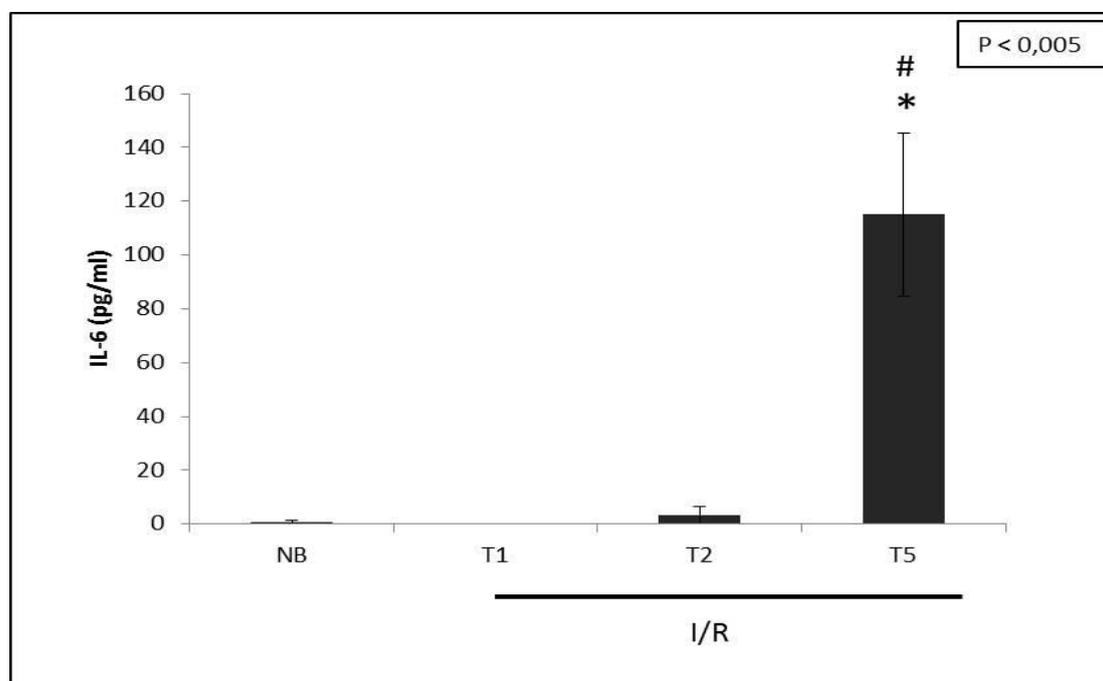


Abb. 18: IL-6 Serumspiegel von nicht behandelten Tieren (NB) und Kontrolltieren (I/R).

T1 = vor Anschluss an die EKZ; T2 = nach 25 min Kühlung; T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier (NB) und fünf (I/R) Tieren. * $P < 0,005$ vs. T1 und T2; # $P < 0,005$ vs. nicht behandelte Tiere.

Tabelle 14: IL-6 Serumspiegel zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	NB	T1	T2	T5
IL-6	0,61 (\pm 0,61)	0,00 (\pm 0,00)	3,37 (\pm 3,37)	*#115,09 (\pm 30,35)

T1 = vor Anschluss an die EKZ; T2 = nach 25 min Kühlung; T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier (NB) und fünf (I/R) Tieren. * P < 0,05 vs. T1 und T2; # P < 0,05 vs. nicht behandelte Tiere.

TNF- α

Die Auswertung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Zeitpunkten T1 und T5 der Kontrolltiere sowie zwischen dem Zeitpunkt T5 der Kontrolltiere und den nicht behandelten Tieren (s. Abbildung 19 und Tabelle 15). Im Unterschied zu den IL-6 Werten waren die TNF- α Serumspiegel bereits nach der Kühlung (T2) erhöht. Aufgrund der großen individuellen Unterschiede war dieser Anstieg nicht signifikant.

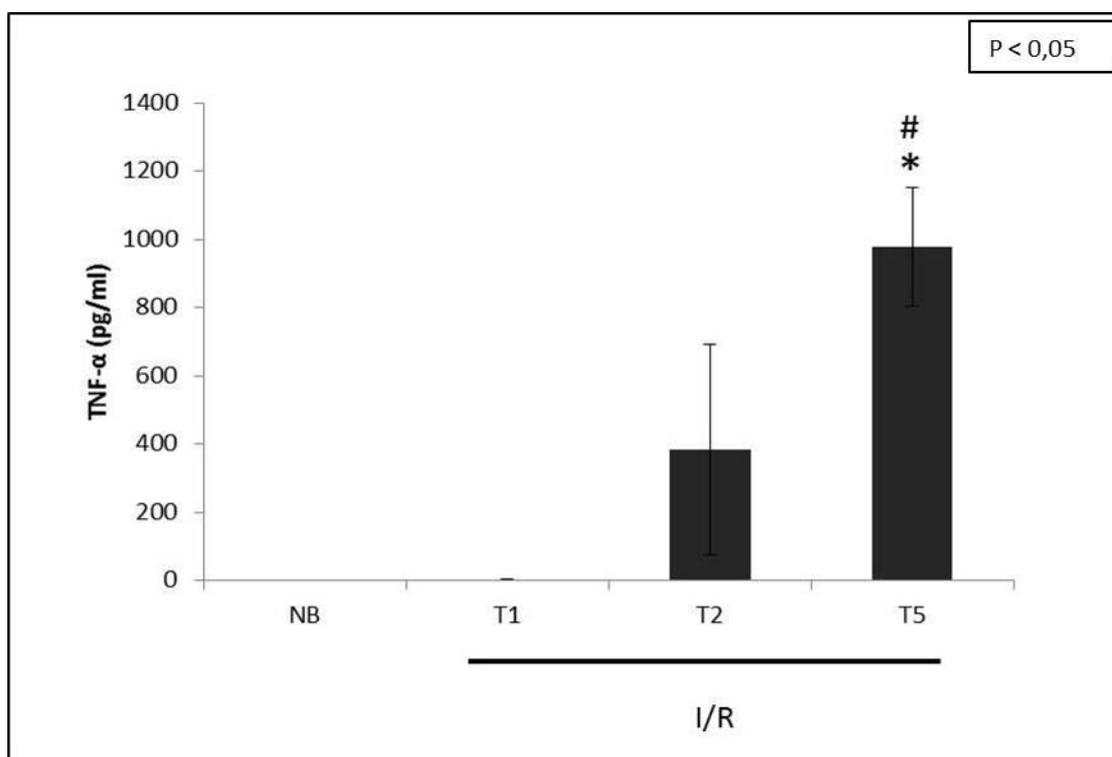


Abb. 19: TNF- α Serumspiegel von nicht behandelten Tieren (NB) und Kontrolltieren (I/R).

T1 = vor Anschluss an die EKZ; T2 = nach 25 min Kühlung; T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier (NB) und fünf (I/R) Tieren. * P < 0,05 vs. T1; # P < 0,05 vs. nicht behandelte Tiere.

Tabelle 15: TNF- α Serumspiegel zu definierten Zeiten der EKZ

	NB	T1	T2	T5
TNF-α	0,0 (0,0)	1,78 (1,35)	383,42 (308,35)	976,70 (173,57)

T1 = vor Anschluss an die EKZ; T2 = nach 25 min Kühlung; T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von vier (NB) und fünf (I/R) Tieren. * P < 0,05 vs. T1; # P < 0,05 vs. nicht behandelte Tiere.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die EKZ mit DHCA ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α induziert wird.

Leukozytenverlauf

Um zu überprüfen, welchen Einfluss die EKZ auf den Leukozytenverlauf hat, wurde die Leukozytenzahl zu den Zeitpunkten T1, T2, T3, T4 und T5 bestimmt. Da es durch das Priming zu einer Blutverdünnung kommt, wurde die Leukozytenzahl in Relation zu dem Hämatokrit ermittelt, um vergleichbare Werte zu erhalten. Da der Referenzbereich der Leukozyten physiologisch zwischen 3 und 15 x 10³/mm³ schwankt und es innerhalb dieses Referenzbereichs individuelle Unterschiede gab, wurde die Leukozytenzahl jedes Tieres auf Startwerte genormt und als Faktor zum Ausgangswert dargestellt.

Während der EKZ war ein tendenzieller, jedoch nicht signifikanter Anstieg der Leukozyten zu beobachten (s. Abbildung 20 und Tabelle 16).

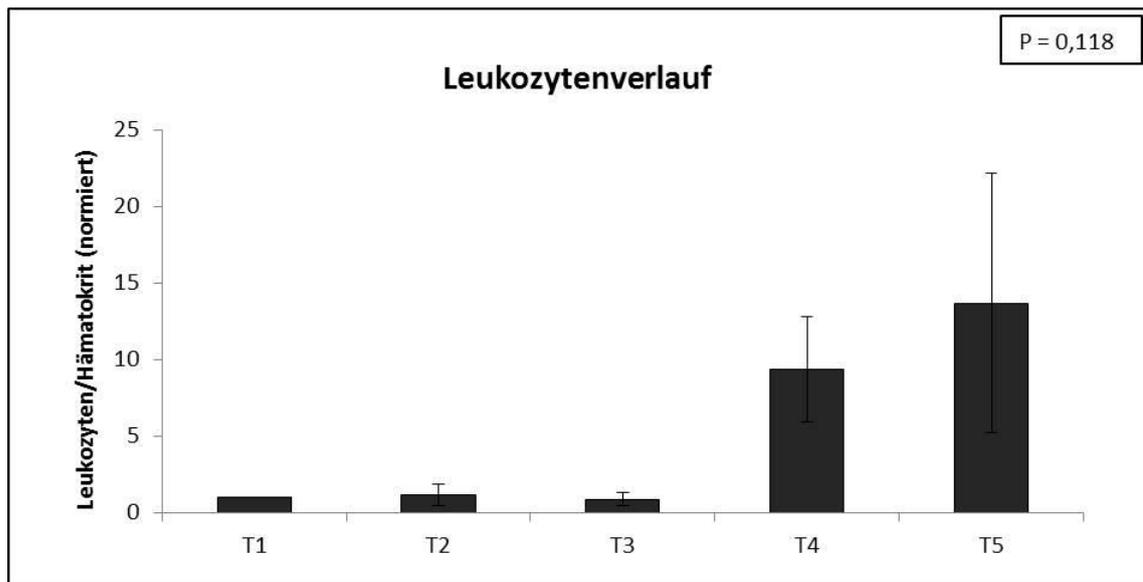


Abb. 20: Verlauf der Leukozytenzahlen zu den Zeitpunkten T1-T5.

T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 °C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 °C Wiedererwärmung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Leukozytenzahl ist als relativer Wert bezogen auf den Hämatokrit angegeben. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von fünf Tieren.

Tabelle 16: Leukozytenzahlen zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	T1	T2	T3	T4	T5
Leukozyten	1,00 (\pm 0,00)	1,21 (\pm 0,68)	0,92 (\pm 0,41)	9,40 (\pm 3,41)	13,70 (\pm 8,48)

T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 °C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 °C Wiedererwärmung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Leukozytenzahl ist als relativer Wert bezogen auf den Hämatokrit angegeben. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von fünf Tieren.

3.1.4 I/R-induzierte organspezifische Veränderungen des Expressions-/Phosphorylierungsmusters von Stressproteinen

Um den Einfluss der I/R im Rahmen der EKZ auf molekulare Signalwege zu untersuchen, wurden Western Blots aus Lysaten von Tieren der Kontrollgruppe (I/R) und den nicht behandelten Tieren (NB) angefertigt. Die Organe Herz, Lunge, Leber und Niere wurden ausgewählt, um den systemischen Effekt der I/R im Rahmen der EKZ zu untersuchen.

Folgende intrazelluläre Schlüsselkomponenten der I/R-Signalwege wurden dafür bestimmt: Oxidativer Stress aktiviert die MAP-Kinasen Erk1/2, p38 und JNK durch Phosphorylierung spezifischer Aminosäuren. Folglich wurden die Phosphorylierung von Erk1/2 an der Stelle Y202/T204, von p38 an der Stelle T180/182 und von JNK an der Stelle T183/Y185 nach hypothermer globaler Ischämie und normothermer Reperfusion analysiert. Des Weiteren wurde die Expression der Heat-Shock-Proteine HSP-70 und HO-1, welche unmittelbar nach Ischämie als zytoprotektive Mechanismen induziert werden, untersucht. Als Mediator der zellulären Immunantwort wurde außerdem die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 an der Stelle Y705 untersucht. Die Phosphorylierung von STAT3 wird unter anderem durch IL-6 induziert [Boengler *et al.*, 2008].

Als Folge der I/R konnten organspezifisch unterschiedliche Phosphorylierungs- und Expressionsmuster ermittelt werden. Die Ergebnisse sind für die einzelnen Organe in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: I/R-induzierte Veränderungen in Proteinexpression und Phosphorylierung in verschiedenen Organen

	Herz	Lunge	Leber	Niere
p-STAT3	(↑)	(↑)	(↑)	(↑)
p-Erk1/2	↑	(↓)	(↓)	↓
p-JNK	(↑)	(↓)	-	(↑)
p-p38	(↓)	↓	↓	-
HSP-70	(↑)	↓	-	(↑)
HO-1	-	(↓)	-	↓

Veränderungen in Proteinexpression und Phosphorylierung in Organen der Kontrolltiere im Vergleich zu denen der nicht behandelten Tiere. ↑ = Zunahme, ↓ = Abnahme, (↑) = Aufwärtstrend, (↓) = Abwärtstrend, - = kein Unterschied/nicht detektierbar.

Die Ergebnisse der Western Blots sind in Abbildung 21 dargestellt.

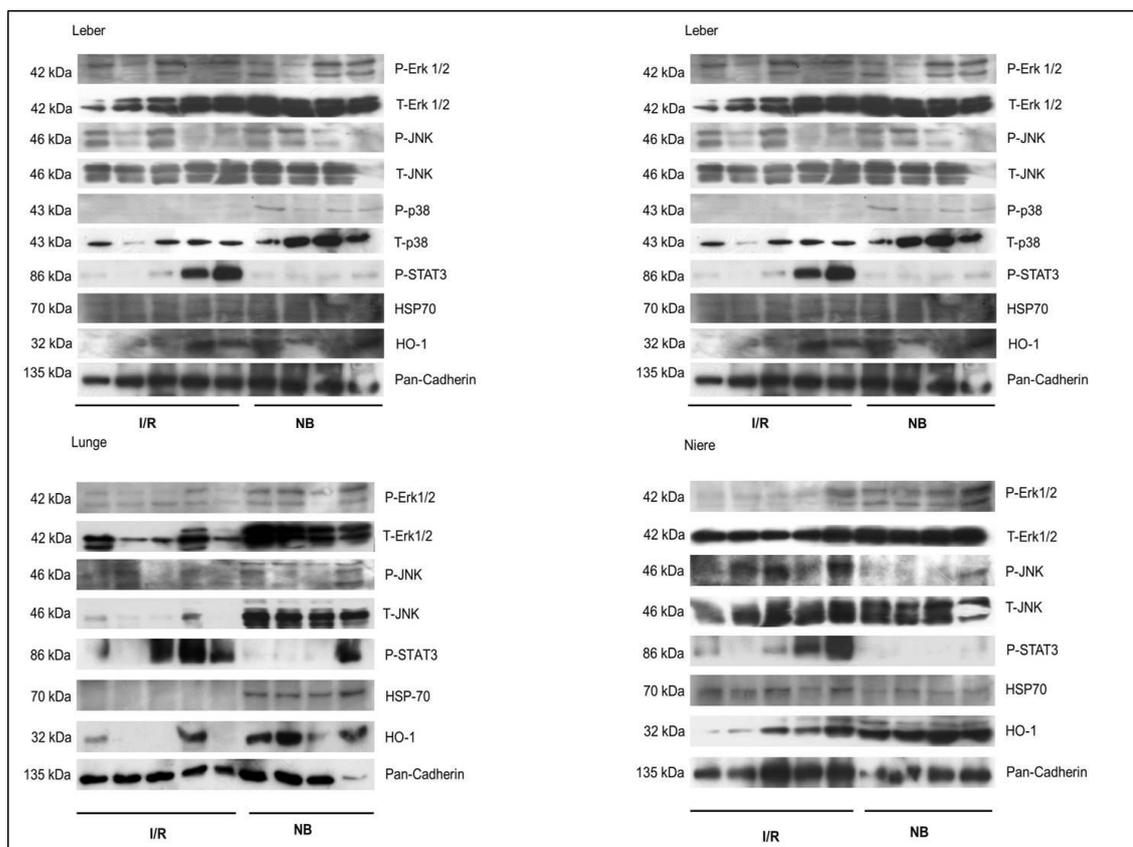


Abb. 21: Western Blots aus Herz-, Lungen-, Leber- und Nierenlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Kontrolltiere (I/R), die einer globalen hypothermen Ischämie und Reperfusion ausgesetzt waren, im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren (NB), die keiner Ischämie und Reperfusion unterzogen wurden.

Herz

Bei vier von fünf Tieren der Kontrollgruppe konnte eine vermehrte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 beobachtet werden. Verglichen mit den nicht behandelten Tieren induzierte die I/R einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 bei fünf von fünf Tieren. Bei der Analyse der MAP-Kinase JNK konnten dagegen weder in der Expression noch in dem Phosphorylierungsstatus Unterschiede beobachtet werden. Dagegen war bei drei von fünf Tieren der Kontrollgruppe eine Abnahme der Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 zu sehen. Ebenfalls drei von fünf Tieren zeigten einen erheblichen Anstieg der HSP-70 Proteinexpression. Die HO-1

Proteinexpression unterschied sich dagegen zwischen den beiden Gruppen nicht.

Lunge

In den Lungen von vier der fünf Tiere der Kontrollgruppe war ebenfalls eine vermehrte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 feststellbar. Des Weiteren induzierte die I/R eine Abnahme der Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk1/2 sowie der Expression der Total-Erk bei allen Tieren der Kontrollgruppe. In ähnlicher Weise war eine Abnahme der Phospho-JNK und Total-JNK zu beobachten. Verglichen mit den nicht behandelten Tieren war die Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 geringer gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe. Eine deutliche Abnahme der Proteinexpression konnte bei HSP-70 bei allen Tieren der Kontrollgruppe beobachtet werden. Außerdem zeigten vier von fünf Tieren der Kontrollgruppe eine verminderte Proteinexpression der HO-1.

Leber

Auch in der Leber war eine verstärkte Phosphorylierung von STAT3 bei drei von fünf Tieren der Kontrollgruppe zu beobachten. Des Weiteren war, analog zu den Ergebnissen der Lunge, eine verminderte Phosphorylierung der Erk1/2 im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren zu sehen.

Bezüglich der JNK waren weder in der Phosphorylierung noch in der Proteinexpression Unterschiede zwischen den beiden Gruppen festzustellen. Eine deutlich verminderte Phosphorylierung war bei der p38-MAPK aller Tiere der Kontrollgruppe zu beobachten. Verglichen mit den nicht behandelten Tieren waren dagegen bei den Hitzeschockproteinen HSP-70 und HO-1 keine Unterschiede in der Proteinexpression zu erkennen.

Niere

Wie bei den übrigen Organen war in der Niere ein Anstieg der p-STAT3 Proteinexpression bei vier von fünf Tieren sichtbar. Ebenfalls vier von fünf Tieren der Kontrollgruppe zeigten eine verminderte Phosphorylierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und p38. Verglichen mit den nicht behandelten Tieren war außerdem eine vermehrte Phosphorylierung der JNK bei allen Tieren der Kontrollgruppe zu beobachten. Die Proteinexpression von HSP-70 war in den Tieren der Kontrollgruppe vergleichsweise leicht erhöht. Die Proteinexpression der HO-1 war dagegen bei drei von fünf Tieren vermindert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass der I/R-Schaden organspezifisch unterschiedlich molekulare Signalwege nach EKZ auslöste, wobei die Effekte im Herzen und der Niere am stärksten waren. Allen Organen gemein war eine vermehrte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3.

3.2 Untersuchungen zur protektiven Wirkung von Ebselen auf den I/R-Schaden

3.2.1 Selengehalt der Organe

Um zu überprüfen, ob das applizierte Ebselen sich gleichmäßig im Körper verteilt hat, wurde der Selengehalt der Organe Herz, Lunge, Leber und Niere der Tiere der Ebselen- und der Kontrollgruppe bestimmt. Den Tieren der Ebselengruppe wurde 90 Minuten vor EKZ-Beginn Ebselen i.p. verabreicht, den Tieren der Kontrollgruppe nicht.

Mit einem Fluoreszenzspektrometer wurde die Fluoreszenz des gebildeten Se-DAN gemessen. Aus den Emissionsmaxima bei 520 nm Wellenlänge wurde nach Erstellen einer Kalibrierkurve aus Selenitstandards der Selengehalt der Proben bestimmt. Die Messungen ergaben, dass der Selengehalt in allen vier Organen signifikant höher war als in den Organen der Tiere der Kontrollgruppe (s. Abbildung 22). Dieses Ergebnis zeigt, dass sich das Ebselen gleichmäßig im Körper verteilt hat.

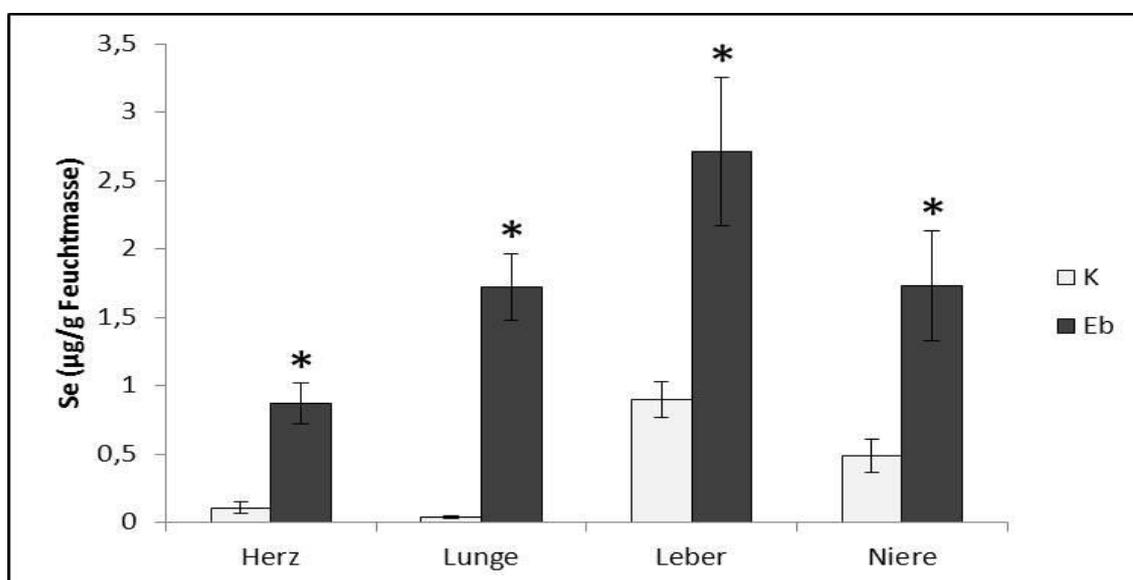


Abb. 22: Selengehalt in Herz, Lunge, Leber und Niere. Selengehalt der Organe der Tiere der Ebselengruppe im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe. K = Kontrollgruppe, Eb = Ebselengruppe, Se = Selen. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. *P < 0,01 vs. Kontrolle.

3.2.2 GPx-Aktivität der Organe

Eine weitere Möglichkeit zu überprüfen, ob das Ebselen sich gleichmäßig im Körper verteilt, stellt der GPx-Assay dar. Venardos und Mitarbeiter zeigten in einem experimentellen Modell, dass die endogene GPx-Aktivität durch eine Selensupplementation zunimmt. Somit kann erwartet werden, dass bei einem erhöhten Selenlevel auch die Aktivität der GPx steigt [Venardos *et al.*, 2004]. Da Ebselen ein GPx-Mimetikum darstellt, ist davon auszugehen, dass die Gesamtaktivität der GPx durch die Gabe von Ebselen ansteigt. Deshalb wurde die GPx-Aktivität der Organe Herz, Lunge, Leber und Niere in den drei Gruppen photospektrometrisch bestimmt. Die Messungen zeigten, dass die GPx-Aktivität in Herz, Leber und Niere der Tiere der Ebselengruppe signifikant höher war als in den Organen der Tiere der DMSO- und Kontrollgruppe. In der Lunge der Ebselentiere war die GPx-Aktivität ebenfalls tendenziell erhöht, allerdings war der Unterschied nicht signifikant (s. Abbildung 23). Wie erwartet zeigte die DMSO-Applikation keinen Effekt auf die GPx-Aktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse kann von einer gleichmäßigen Verteilung des Ebselens ausgegangen werden.

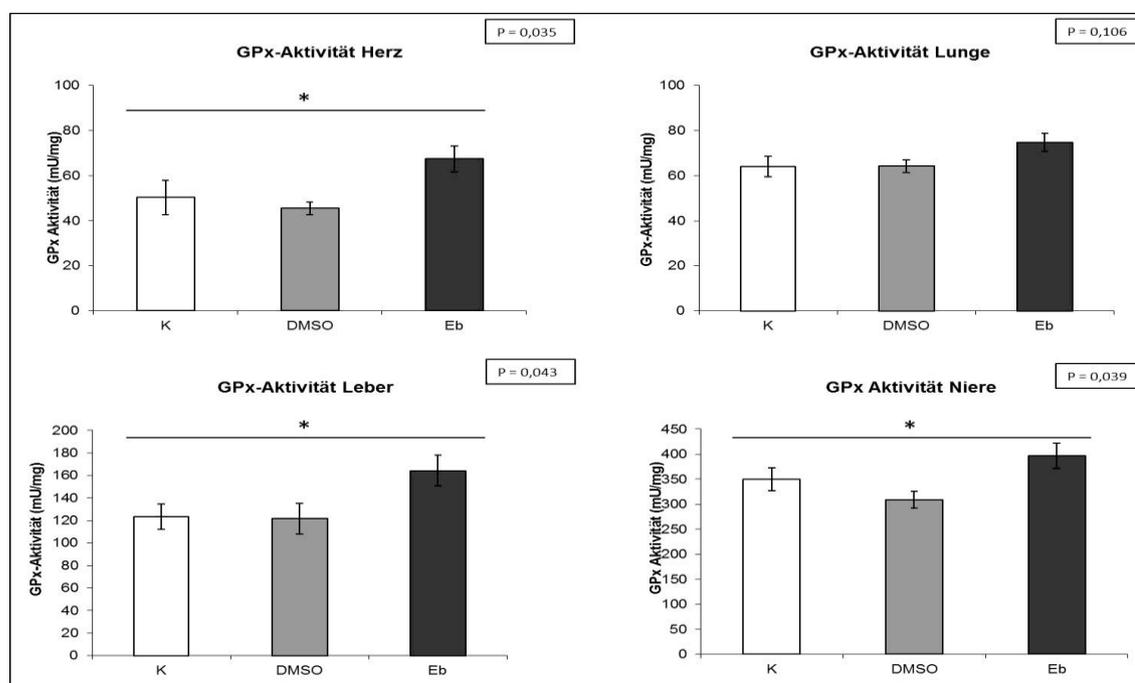


Abb. 23: GPx-Aktivität von Herz, Lunge, Leber und Niere. GPx-Aktivität der Organe der Tiere der Ebselengruppe im Vergleich zu den Organen der Tiere der DMSO- und Kontrollgruppe. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, GPx = Gluthationperoxidase. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. * $P < 0,05$.

3.2.3 Hämodynamische- und Vitalparameter

Kreislaufparameter, Temperatur und Blutgasanalysen

Die während des Versuchs dokumentierten Parameter wurden statistisch ausgewertet, um mögliche Auswirkungen der Ebselen-Behandlung festzustellen (s. Tabelle 18). Bezüglich des MADs konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten und den drei Gruppen festgestellt werden. Änderungen der Herzfrequenz und der Temperatur ergaben sich in allen Gruppen in Übereinstimmung mit der schrittweisen Veränderung der Flussrate während der Kühlung bzw. Erwärmung. Der pH-Wert des Blutes sowie die Partialdrücke von O₂ und CO₂ waren stabil oder wurden korrigiert. Ebselen zeigte folglich keine Auswirkung auf die erhobenen Parameter.

Tabelle 18: Übersicht der bestimmten Parameter zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	T1	T2	T3	T4	T5
MAD					
K	56,00 (±4,82)	50,57 (±5,69)	65,00 (±6,20)	49,14 (±3,54)	53,86 (±2,97)
DMSO	61,00 (±5,50)	60,14 (±5,30)	73,14 (±7,86)	54,71 (±4,08)	51,86 (±4,97)
Eb	59,14 (±9,36)	56,43 (±10,20)	70,71 (±13,62)	59,71 (±7,74)	56,86 (±9,79)
HF					
K	291,14 (±4,73)	47,43 (±12,71)	103,83(±18,06)	217,57(±20,88)	240,00(±32,07)
DMSO	292,86 (±3,95)	46,00 (±14,50)	136,67(±13,97)	256,17(±16,92)	248,00 (±35,46)
Eb	266,57(±12,01)	48,29 (±10,17)	117,17 (±9,40)	254,71 (±8,75)	267,71 (±8,73)
Temperatur					
K	35,74 (±0,42)	17,83 (±0,55)	20,00 (±0,00)	35,00 (±0,00)	36,57 (±0,27)
DMSO	36,31 (±0,33)	18,70 (±0,40)	20,00 (±0,00)	35,00 (±0,00)	36,37 (±0,12)
Eb	36,70 (±0,14)	18,16 (±0,51)	20,00 (±0,00)	35,00 (±0,00)	36,43 (±0,21)
pH					
K	7,27 (±0,03)	7,20 (±0,10)	7,28 (±0,11)	7,29 (±0,06)	7,38 (±0,07)
DMSO	7,28 (±0,03)	7,35 (±0,06)	7,40 (±0,04)	7,44 (±0,07)	7,37 (±0,05)
Eb	7,30 (±0,04)	7,30 (±0,09)	7,36 (±0,05)	7,32 (±0,06)	7,26 (±0,09)
BE					
K	-5,29 (±0,88)	-6,06 (±2,23)	-11,66 (±1,69)	-9,33 (±1,99)	-7,16 (±1,94)
DMSO	-4,97 (±0,66)	-4,64 (±2,06)	-11,80 (±1,84)	-12,36 (±1,85)	-7,16 (±2,29)
Eb	-7,77 (±1,48)	-8,36 (±2,19)	-13,57 (±0,97)	-16,17 (±1,79)	-2,84 (±3,96)
pO₂					
K	47,00 (±1,20)	43,00 (±3,20)	47,14 (±2,79)	43,86 (±3,97)	40,13 (±3,84)
DMSO	48,57 (±0,43)	43,00 (±3,22)	44,00 (±3,70)	40,86 (±4,03)	38,86 (±5,66)
Eb	49,43 (±0,72)	39,14 (±4,63)	39,14(±4,82)	40,29 (±3,91)	38,71 (±4,49)
pCO₂					
K	2,73 (±0,30)	0,25 (±0,03)	0,51 (±0,11)	0,70 (±0,12)	0,79 (±0,20)
DMSO	2,50 (±0,17)	0,22 (±0,04)	0,51 (±0,09)	1,39 (±0,44)	0,71 (±0,23)
Eb	2,41 (±0,14)	0,27 (±0,06)	0,56 (±0,17)	1,24 (±0,51)	1,74 (±0,82)

Vitalparameter der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe zu den Zeitpunkten T1-T5. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 °C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 °C Wiedererwärmung, T5 = nach 60 min Reperfusion. MAD = mittlerer arterieller Druck, HF = Herzfrequenz, BE = Base Excess, pO₂ = Sauerstoff-Partialdruck, pCO₂ = Kohlendioxid-Partialdruck. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von sieben Tieren.

Hämodynamische Parameter und zelluläres Blutbild

Um festzustellen, ob die Ebselen-Behandlung eine Auswirkung auf die hämodynamischen Parameter und das zelluläre Blutbild hat, wurden diese dokumentiert und statistisch ausgewertet.

Katecholaminbedarf

Für eine ausreichende Reperfusion der Organe sollte der MAD über 40 mmHg liegen. Bei einem MAD unter 40 mmHg wurde den Versuchstieren in physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Norepinephrinhydrochlorid (0,02 mg/ml Arterenol) verabreicht.

In allen Gruppen wurde dokumentiert, wie viel Norepinephrinhydrochlorid die Tiere während der Kühlung, der Erwärmung und der Reperfusion benötigten. Da die Streuung innerhalb der einzelnen Gruppen sehr groß war, wurde folgender Score erstellt und vergeben:

Tabelle 19: Schema der Punkteverteilung zur Berechnung des Katecholaminbedarfs

Katecholaminbedarf (ml)	Punkte
0 - 0,5	1
0,6 – 1	2
1,1 - 1,5	3
1,6 – 2	4
2,1 - 2,5	5
2,5 – 3	6
>3	7

Über die Gruppen hinweg gab es einen signifikanten Anstieg über die Zeit. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen gab es dagegen nicht. Eine Wechselwirkung zwischen den Gruppen und dem Zeitverlauf bestand ebenfalls nicht. Der Katecholaminbedarf war während der Erwärmung und der Reperfusion in der Kontrollgruppe höher als in der Ebselen- und DMSO-Gruppe. Über die gesamte Dauer der EKZ betrachtet benötigten die Tiere der Kontrollgruppe mehr Katecholamine als die Tiere der Ebselen- und DMSO-Gruppe. Allerdings erreichten alle genannten Unterschiede keine statistische

Signifikanz. Abbildung 24 zeigt den Katecholaminbedarf zu verschiedenen Zeitpunkten der EKZ.

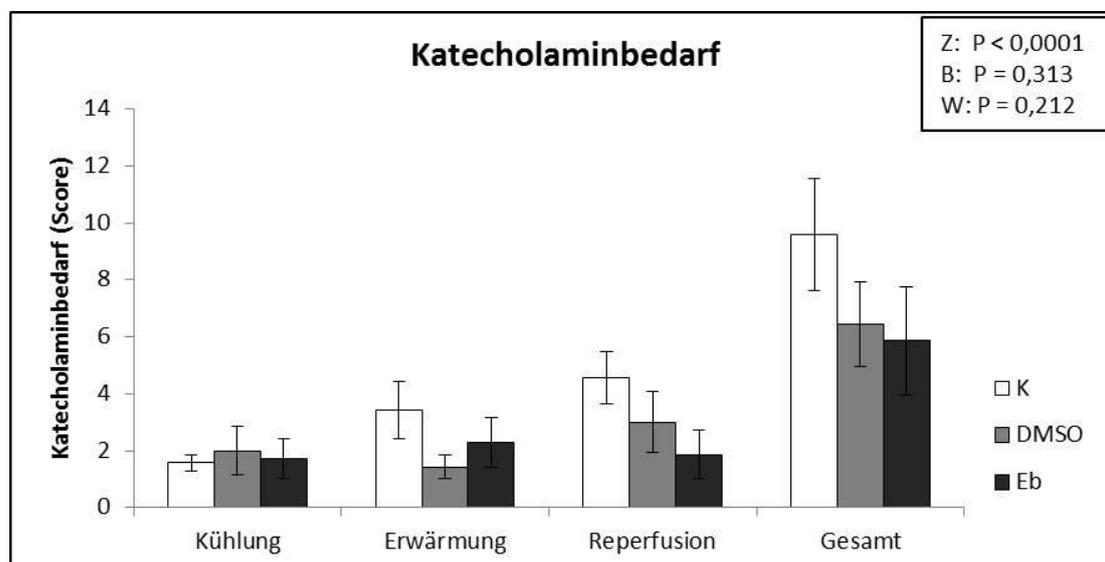


Abb. 24: Katecholaminbedarf zu verschiedenen Zeitpunkten der EKZ. Katecholaminbedarf der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe während der Kühlung, der Erwärmung und der Reperfusion im Vergleich. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe. Der Bedarf ist als Score angegeben. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. Z = Zeit, B = Behandlung, W = Wechselwirkung.

Die genauen Daten sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Katecholaminbedarf (Score) während der EKZ

	Kühlung	Erwärmung	Reperfusion	Gesamt
K	1,57 (\pm 0,30)	3,43 (\pm 1,00)	4,57 (\pm 0,92)	9,57 (\pm 1,96)
DMSO	2,00 (\pm 0,85)	1,43 (\pm 0,43)	3,00 (\pm 1,07)	6,43 (\pm 1,49)
Eb	1,71 (\pm 0,71)	2,29 (\pm 0,89)	1,86 (\pm 0,86)	5,86 (\pm 1,90)

K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren.

Volumenbedarf

Sofern die Tiere während der EKZ einen erhöhten Volumenbedarf zeigten, wurde das Blutvolumen mit 6 % HAES aufrechterhalten. In allen Gruppen wurde dokumentiert, wie viel Volumen die Tiere während der EKZ benötigten. Der Gesamtvolumenbedarf, welcher sich aus dem Primingvolumen und dem während der EKZ benötigten Volumen zusammensetzt, wurde zwischen den drei Gruppen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 und Tabelle 21 dargestellt.

Der Gesamtvolumenbedarf war in der Ebselengruppe tendentiell niedriger als in der DMSO- und Kontrollgruppe. Die genannten Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz.

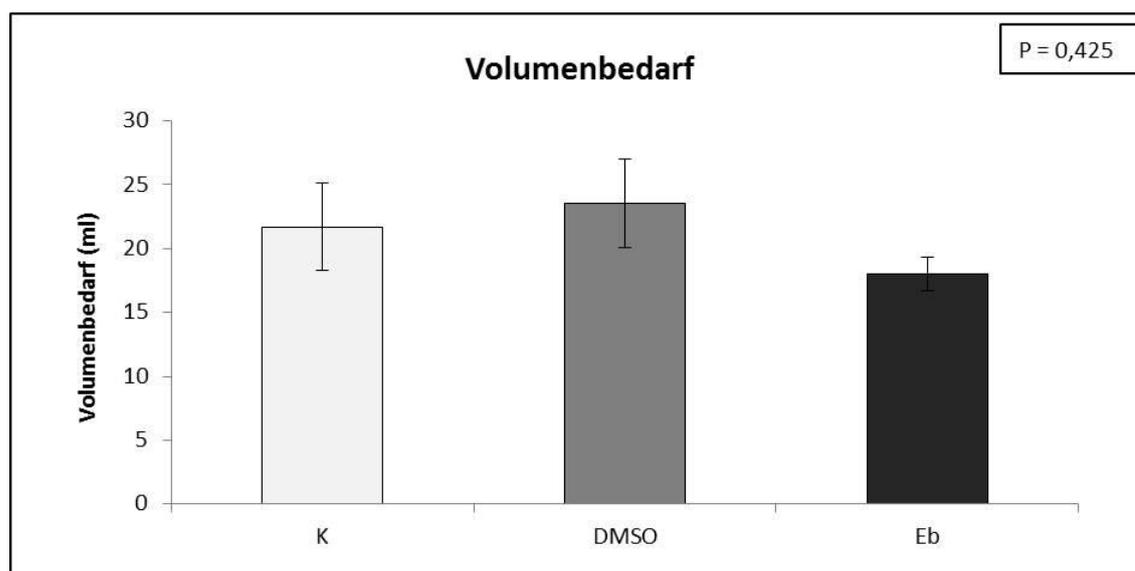


Abb. 25: Volumenbedarf während der EKZ. Volumenbedarf der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe während der EKZ im Vergleich. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe. Der Bedarf ist in ml angegeben. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

Tabelle 21: Volumenbedarf (ml) während der EKZ

	Volumenbedarf (ml)
K	21,71 (\pm 3,39)
DMSO	23,57 (\pm 3,46)
Eb	18,00 (\pm 1,35)

K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren.

Hämoglobin/ Hämatokrit

Durch das Priming der HLM mit HAES vor der EKZ kommt es nach Anschluss an die EKZ zu einer Blutverdünnung und damit zu einer Erniedrigung des Hämatokrits sowie des Hämoglobingehaltes. Zusätzlich erfolgte durch eventuell notwendige Volumensubstitution während der EKZ eine Verdünnung des Blutes. Die resultierende Erniedrigung von Hämatokrit und Hämoglobin war analog zu dem Volumenbedarf in den drei Gruppen verteilt. Über die Gruppen hinweg war eine signifikante Abnahme von Hämatokrit und Hämoglobin über die Zeit zu beobachten. Signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen gab es dagegen nicht. Eine Wechselwirkung zwischen den Gruppen und dem Zeitverlauf war ebenfalls nicht erkennbar. Sowohl Hämatokrit als auch Hämoglobin waren zu allen fünf Zeitpunkten in der Kontrollgruppe tendenziell niedriger als in der DMSO- und Ebselengruppe (s. Abbildung 26).

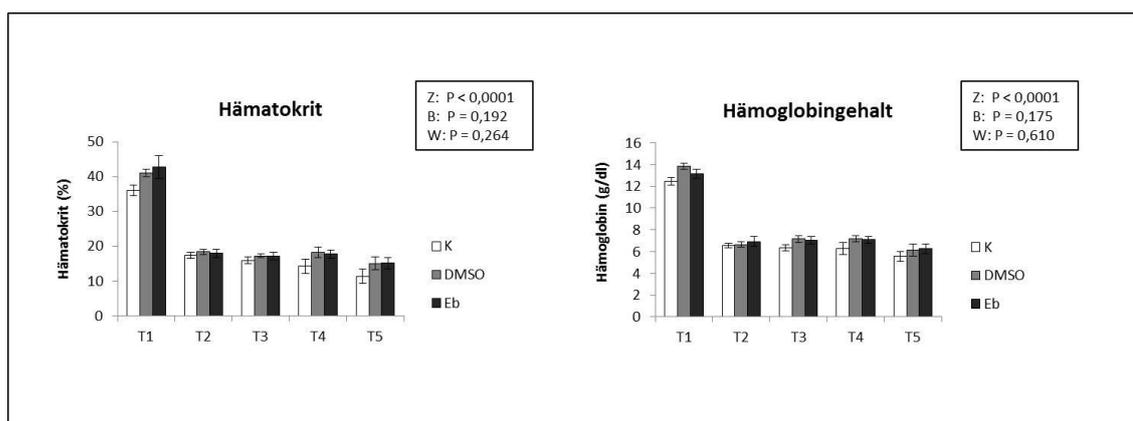


Abb. 26: Verlauf des Hämatokrits und Hämoglobingehalts während der EKZ. Hämatokrit und Hämoglobingehalt der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe zu den Zeitpunkten T1-T5. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 °C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 °C Wiedererwärmung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. Z = Zeit, B = Behandlung, W = Wechselwirkung.

Die genauen Daten enthält Tabelle 22.

Tabelle 22: Hämoglobingehalt und Hämatokrit zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	T1	T2	T3	T4	T5
Hb (g/dl)					
K	12,44 (± 0,36)	6,53 (± 0,21)	6,34 (± 0,26)	6,29 (± 0,54)	5,57 (± 0,45)
DMSO	13,84 (± 0,27)	6,64 (± 0,24)	7,15 (± 0,30)	7,18 (± 0,30)	6,14 (± 0,53)
Eb	13,13 (± 0,43)	6,91 (± 0,45)	7,03 (± 0,33)	7,09 (± 0,32)	6,27 (± 0,45)
Hkt (%)					
K	36,06 (± 1,48)	17,44 (± 0,88)	16,02 (± 1,02)	14,32 (± 2,11)	11,46 (± 2,07)
DMSO	41,14 (± 1,03)	18,49 ± (0,76)	17,30 (± 0,51)	18,29 (± 1,48)	15,09 (± 1,86)
Eb	42,84 (± 3,25)	18,01 (± 1,20)	17,16 (± 1,04)	17,77 (± 1,24)	15,19 (± 1,63)

Hb = Hämoglobin, Hkt = Hämatokrit, K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 °C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 °C Wiedererwärmung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von sieben Tieren. P

Leukozytenverlauf

Zur Überprüfung, ob Ebselen einen Einfluss auf die im Rahmen der EKZ auftretende Leukozytose hat, wurde aus den Blutproben der Zeitpunkte T1, T2, T3, T4 und T5 die Leukozytenzahl bestimmt und unter den Gruppen verglichen. Da es durch das Priming zu einer Blutverdünnung kommt, wurde die Leukozytenzahl in Relation zu dem Hämatokrit ermittelt, um vergleichbare Werte zu erhalten. Da der Referenzbereich der Leukozyten physiologisch zwischen 3 und $15 \times 10^3/\text{mm}^3$ schwankt und es innerhalb dieses Referenzbereichs individuelle Unterschiede gab, wurde die Leukozytenzahl jedes Tieres auf Startwerte genormt und als Faktor zum Ausgangswert dargestellt.

In allen drei Gruppen gab es einen signifikanten Anstieg der Leukozyten über die Zeit (s. Abbildung 27). Dieser Anstieg war bei den Tieren der Ebselen- und DMSO-Gruppe weniger deutlich ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht, ebenso keine Wechselwirkung zwischen den Gruppen und dem Zeitverlauf. Zum Zeitpunkt T4 war der Anstieg der Leukozyten in der Ebselen- und der DMSO-Gruppe signifikant vermindert, zu den restlichen Zeitpunkten waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant.

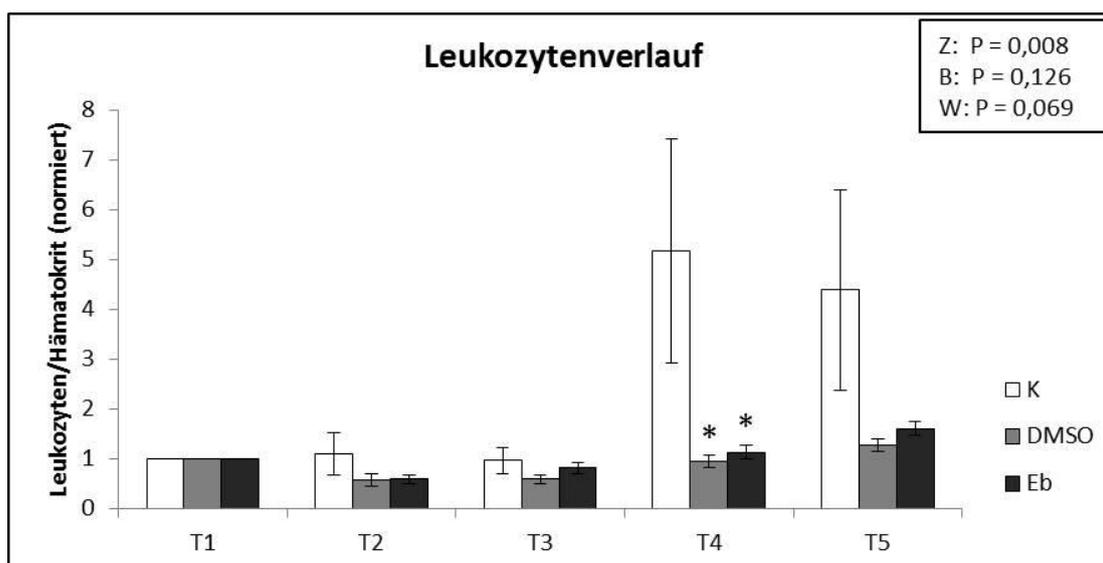


Abb. 27: Verlauf der Leukozytenzahl der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe zu den Zeitpunkten T1-T5 im Vergleich. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 °C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 °C Wiedererwärmung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Leukozytenzahl ist als relativer Wert bezogen auf den Hämatokrit angegeben. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. * $P < 0,05$ vs. Kontrollgruppe. Z = Zeit, B = Behandlung, W = Wechselwirkung.

Die genauen Werte sind in Tabelle 23 abgebildet.

Tabelle 23: Verlauf der Leukozytenzahl zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	T1	T2	T3	T4	T5
K	1,00 (\pm 0,00)	1,11 (\pm 0,42)	0,97 (\pm 0,26)	5,18 (\pm 2,24)	4,40 (\pm 2,01)
DMSO	1,00 (\pm 0,00)	0,59 (\pm 0,12)	0,60 (\pm 0,08)	* 0,96 (\pm 0,12)	1,28 (\pm 0,12)
Eb	1,00 (\pm 0,00)	0,60 (\pm 0,09)	0,83 (\pm 0,11)	* 1,13 (\pm 0,14)	1,61 (\pm 0,14)

K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T3 = bei 20 °C Wiedererwärmung, T4 = bei 35 °C Wiedererwärmung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von sieben Tieren. * $P < 0,05$ vs Kontrollgruppe.

3.2.4 Pro-inflammatorische Zykine

Es sollte untersucht werden, ob Ebselen den Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α im Rahmen der EKZ vermindern kann. Hierfür wurden dieselben kommerziellen ELISA-Kits verwendet wie für die Untersuchungen im Rahmen der Etablierungsversuche. Es wurden die Seren von jeweils sieben Tieren der drei Gruppen Kontrolle, DMSO und Ebselen verwendet.

IL-6

Über die Gruppen hinweg gab es einen signifikanten Anstieg über die Zeit. Zwischen den Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied. Eine Wechselwirkung zwischen den Gruppen und dem Zeitverlauf bestand nicht. Bei den Tieren der Ebselen- und der DMSO-Gruppe war der Anstieg des IL-6 Spiegels zum Zeitpunkt T5 tendenziell höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt T2 war bei den Tieren der Ebselengruppe ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des IL-6 Spiegels zu beobachten, während in der Kontroll- und DMSO-Gruppe kein Anstieg erkennbar war (s. Tabelle 24 und Abbildung 28).

Ein verminderter IL-6 Anstieg durch Ebselen konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 24: IL-6 Serumspiegel der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	T1	T2	T5
K	0,00 (\pm 0,00)	0,00 (\pm 0,00)	131,46 (\pm 54,54)
DMSO	2,59 (\pm 2,59)	0,00 (\pm 0,00)	267,78 (\pm 91,38)
Eb	0,00 (\pm 0,00)	93,95 (\pm 82,34)	215,81 (\pm 60,47)

K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

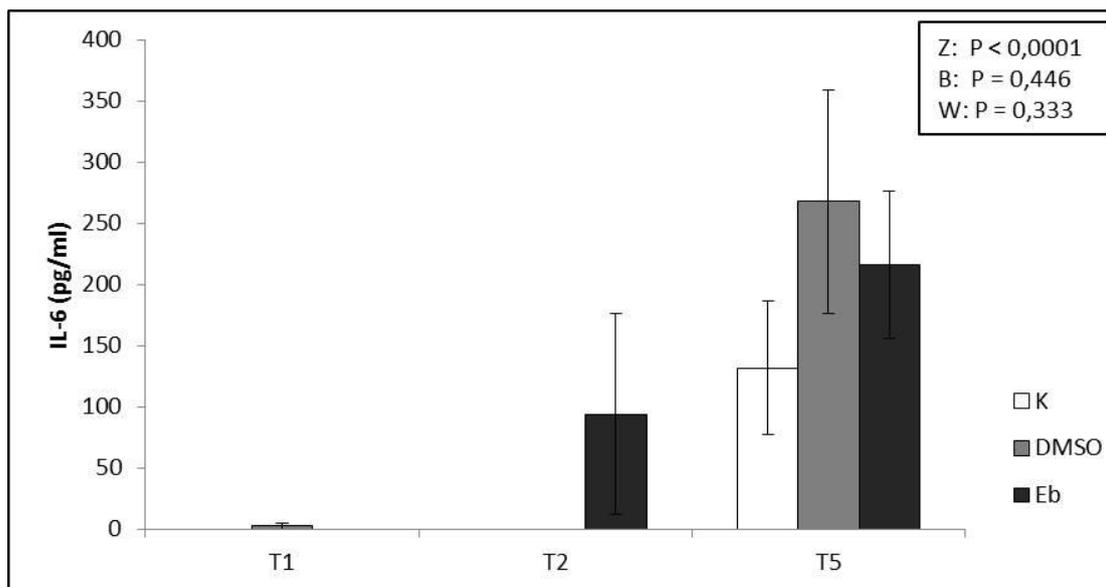


Abb. 28: IL-6 Serumspegel der Kontroll-, DMSO- und Ebselentiere zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. Z = Zeit, B = Behandlung, W = Wechselwirkung.

TNF- α

Wie auch beim IL-6 gab es über die Gruppen hinweg einen signifikanten Anstieg über die Zeit. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht. Des Weiteren gab es keine Wechselwirkung zwischen den Gruppen und dem Zeitverlauf.

Die Tiere der Ebselengruppe wiesen zu den Zeitpunkten T2 und T5 geringere TNF- α Spiegel auf als die Tiere der Kontroll- und DMSO-Gruppe, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant. Die Tiere der DMSO-Gruppe zeigten zu allen drei Zeitpunkten tendenziell die höchsten TNF- α Spiegel. Anhand dieser Ergebnisse kann ein tendenziell verminderter Anstieg des TNF- α Spiegels beschrieben, aber nicht durch Signifikanzen bewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 und Tabelle 25 zusammenfassend dargestellt.

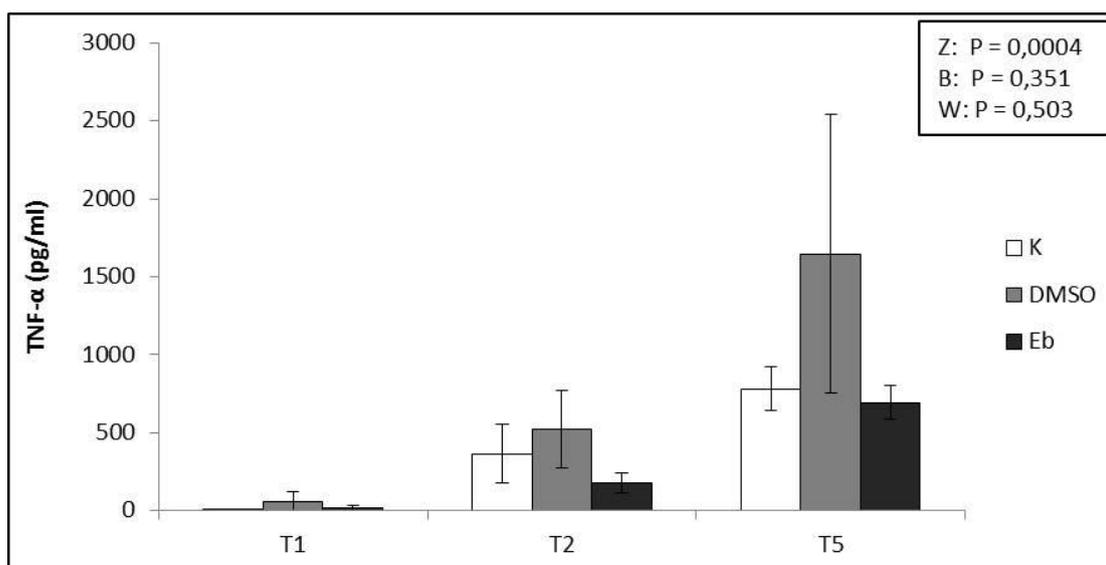


Abb. 29: TNF- α Serumspiegel der Tiere der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. Z = Zeit, B = Behandlung, W = Wechselwirkung.

Tabelle 25: TNF- α Serumspiegel der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	T1	T2	T5
K	1,01 (\pm 0,81)	366,17 (\pm 185,78)	782,31 (\pm 136,98)
DMSO	59,50 (\pm 59,50)	5230,80 (\pm 250,50)	1647,79 (\pm 896,50)
Eb	18,10 (\pm 18,10)	178,70 (\pm 65,00)	694,80 (\pm 109,60)

K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Ebselen-Behandlung keinen nennenswerten Einfluss auf die beiden untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine hatte.

3.2.5 Blutanalysen

Um zu prüfen, ob die Ebselen-Behandlung einen positiven Einfluss auf den Verlauf der klinisch-chemischen Blutparameter während der EKZ hat, wurden die Plasmaspiegel der drei Gruppen verglichen:

Zu den Zeitpunkten T2 und T5 war der Anstieg der Troponin I Plasmaspiegel in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der DMSO- und Ebselengruppe. Die CK-MB Plasmaspiegel waren zu den Zeitpunkten T2 und T5 in der DMSO-Gruppe signifikant höher als in der Ebselen- und Kontrollgruppe. Keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen waren bei den Laktat Plasmaspiegeln zu beobachten. Die AST und ALT Plasmaspiegel waren zum Zeitpunkt T5 in der Kontrollgruppe signifikant höher als in der Ebselen- und DMSO-Gruppe. Harnstoff-, Kreatinin- und Calcium-Werte zeigten keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Ein deutlicher Unterschied war jedoch bei den LDH Plasmaspiegeln zu beobachten, welche zum Zeitpunkt T5 in der Kontrollgruppe signifikant höher waren als in der Ebselengruppe.

Diesen Ergebnissen zufolge hatte Ebselen einen positiven Einfluss auf einen Teil der klinisch-chemischen Blutparameter. Derselbe Effekt war teilweise auch in der DMSO-Gruppe zu beobachten.

Die Plasmaspiegel von Troponin I (A), LDH (B), ALT (C) und AST (D) sind exemplarisch in Abbildung 30 dargestellt, die Daten in Tabelle 26 zusammengefasst.

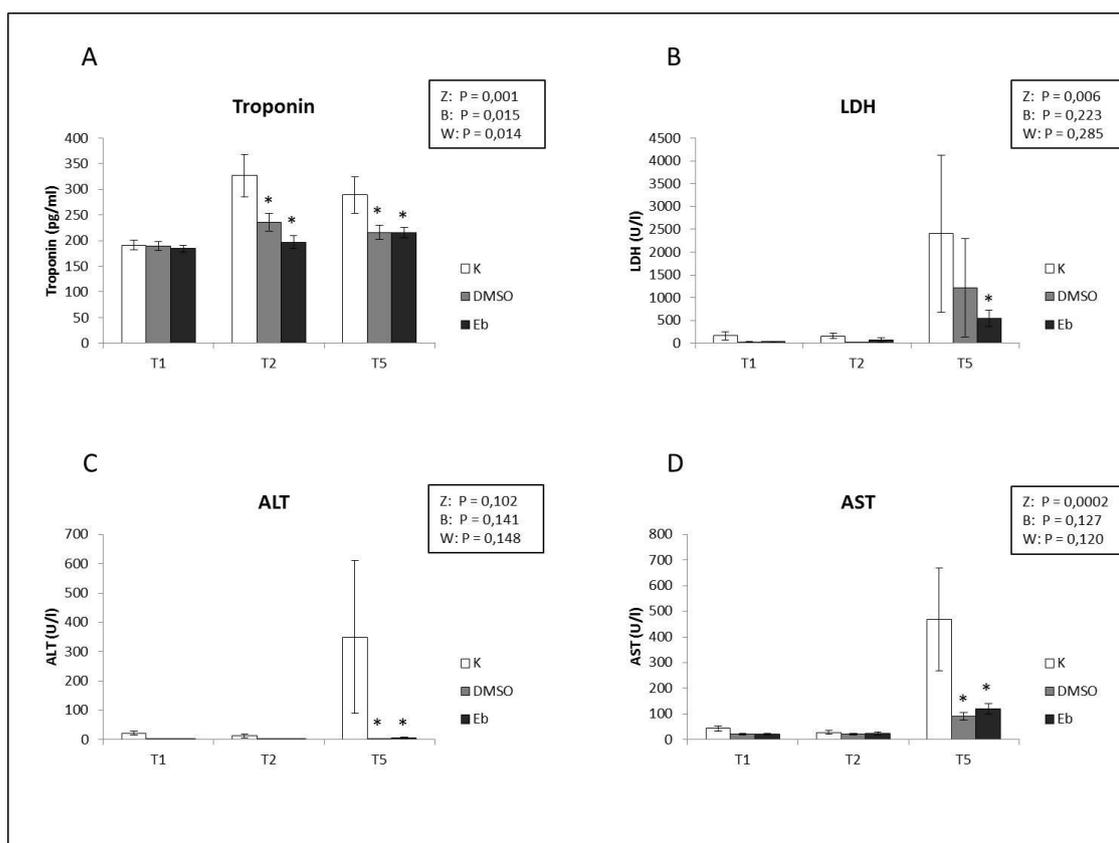


Abb. 30: Einfluss von Ebselen auf den Verlauf ausgewählter klinisch-chemischer Blutparameter zu definierten Zeitpunkten der EKZ. Plasmaspiegel der Parameter Troponin I (A), LDH (B), ALT (C) und AST (D) der Tiere der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe. T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sechs bis sieben Tieren pro Gruppe. * $P < 0,05$ vs. Kontrollgruppe. Z = Zeit, B = Behandlung, W = Wechselwirkung.

Tabelle 26: Klinisch-chemische Blutparameter zu definierten Zeitpunkten der EKZ

	T1	T2	T5
Troponin I			
K	180,36 (± 13,66)	376,46 (± 60,73)	357,51 (± 75,13)
DMSO	189,16 (± 8,16)	* 235,61 (± 17,21)	* 215,58 (± 13,75)
Eb	184,66 (± 6,63)	* 197,16 (± 12,83)	* 214,94 (± 10,32)
CK-MB			
K	0,57 (± 0,33)	0,38 (± 0,28)	0,97 (± 0,81)
DMSO	2,08 (± 0,27)	# 2,07 (± 0,13)	*# 3,30 (± 0,45)
Eb	0,94 (± 0,84)	0,10 (± 0,00)	0,81 (± 0,39)
Laktat			
K	2,42 (± 0,19)	2,47 (± 1,16)	36,42 (± 10,53)
DMSO	2,33 (± 0,37)	4,91 (± 0,99)	38,57 (± 8,85)
Eb	2,94 (± 0,13)	8,36 (± 1,40)	34,14 (± 8,84)
AST			
K	43,20 (± 10,20)	28,10 (± 7,14)	467,87 (± 200,54)
DMSO	20,89 (± 2,99)	20,33 (± 2,57)	* 92,13 (± 14,54)
Eb	21,09 (± 2,03)	23,89 (± 5,14)	* 120,33 (± 21,13)
ALT			
K	21,58 (± 6,58)	13,18 (± 6,20)	350,22 (± 260,92)
DMSO	1,90 (± 0,68)	0,52 (± 0,06)	* 2,08 (± 0,36)
Eb	1,99 (± 0,53)	1,13 (± 0,50)	* 6,62 (± 2,97)
Harnstoff			
K	4,81 (± 0,21)	5,39 (± 0,92)	6,38 (± 1,00)
DMSO	5,53 (± 0,22)	7,09 (± 0,31)	8,43 (± 0,31)
Eb	5,14 (± 0,13)	6,30 (± 0,28)	7,27 (± 0,51)
Kreatinin			
K	19,10 (± 1,49)	51,05 (± 2,00)	64,53 (± 5,57)
DMSO	20,57 (± 2,41)	54,14 (± 3,89)	72,14 (± 4,06)
Eb	22,57 (± 2,57)	57,57 (± 2,83)	66,14 (± 5,21)
LDH			
K	160,68 (± 83,90)	154,50 (± 56,61)	2404,80 (± 1721,63)
DMSO	27,84 (± 9,78)	20,23 (± 3,89)	1221 (± 1077,66)
Eb	30,20 (± 12,38)	70,73 (± 51,42)	* 543,64 (± 180,60)
Calcium			
K	1,69 (± 0,08)	1,35 (± 0,27)	1,64 (± 0,33)
DMSO	1,73 (± 0,04)	1,41 (± 0,05)	1,77 (± 0,16)
Eb	1,81 (± 0,01)	1,63 (± 0,06)	2,04 (± 0,14)

Plasmaspiegel ausgewählter klinisch-chemischer Blutparameter der Kontroll-, DMSO und Ebselengruppe zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5 wieder. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe, T1 = vor Anschluss an die EKZ, T2 = nach 25 min Kühlung, T5 = nach 60 min Reperfusion, CK-MB = MB-Isoform der Creatin-Kinase, AST = Aspartat-Amino-Transferase, ALT = Alanin-Amino-Transferase, LDH = Lactat-Dehydrogenase. Alle Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler von sechs bis sieben Tieren. * P < 0,05 vs. Kontrollgruppe. # P < 0,05 vs. Ebselengruppe.

3.2.6 I/R-induzierte organspezifische Veränderungen des Expressions-/Phosphorylierungsmusters von Stressproteinen

Zur Überprüfung eines potenziellen positiven Einflusses von Ebselen auf die zuvor beschriebenen durch I/R induzierten Signalwege wurden Western Blots aus Lysaten der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe angefertigt (n=7 pro Gruppe). Die Organe Herz, Lunge, Leber und Niere und die Proteine STAT3, Erk1/2, HSP-70 und HO-1 wurden analysiert. Die Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet und auf die Ladungskontrollen normalisiert.

Der Effekt des Ebselens war organspezifisch unterschiedlich und wird im Folgenden für die einzelnen Organe beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: I/R-induzierte Veränderungen in Proteinexpression und Phosphorylierung in verschiedenen Organen unter der Therapie mit Ebselen

	Herz	Lunge	Leber	Niere
p-STAT3	↑	(↓)	↓	↓
p-Erk1/2	↓	↓	-	-
HSP-70	-	↑	(↑)	-
HO-1	↓	(↑)	-	(↑)

Proteinexpression und Phosphorylierung in den Organen der Tiere der Ebselengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe . ↑ = Zunahme, ↓ = Abnahme, (↑) = Aufwärts-Trend, (↓) = Abwärts-Trend, - = kein Unterschied/nicht detektierbar.

Herz

In der Ebselengruppe war die Phosphorylierung der MAPK Erk1/2 im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant vermindert. Auch durch DMSO konnte diese signifikant verminderte Phosphorylierung beobachtet werden. Außerdem war in der Ebselengruppe eine tendenziell vermehrte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 zu sehen, welche in der DMSO-Gruppe tendenziell vermindert waren. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Des Weiteren war die Expression des Hitzeschockproteins HO-1 in der Ebselengruppe tendenziell niedriger als in der DMSO- und Kontrollgruppe, jedoch auch hier nicht signifikant. In der Expression des Hitzeschockproteins HSP-70 waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen

ersichtlich. Die Western Blots sind in Abbildung 31, die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung in Abbildung 32 dargestellt.

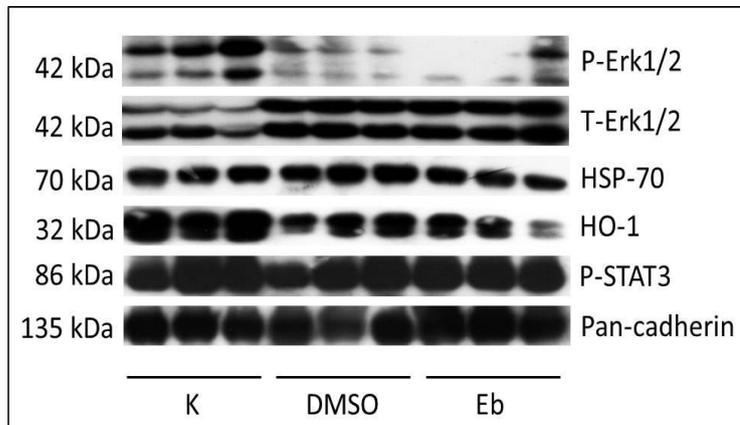


Abb. 31: Western Blots aus Herzlysaten. Ergebnisse der Western Blot Analysen der Tiere der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe.

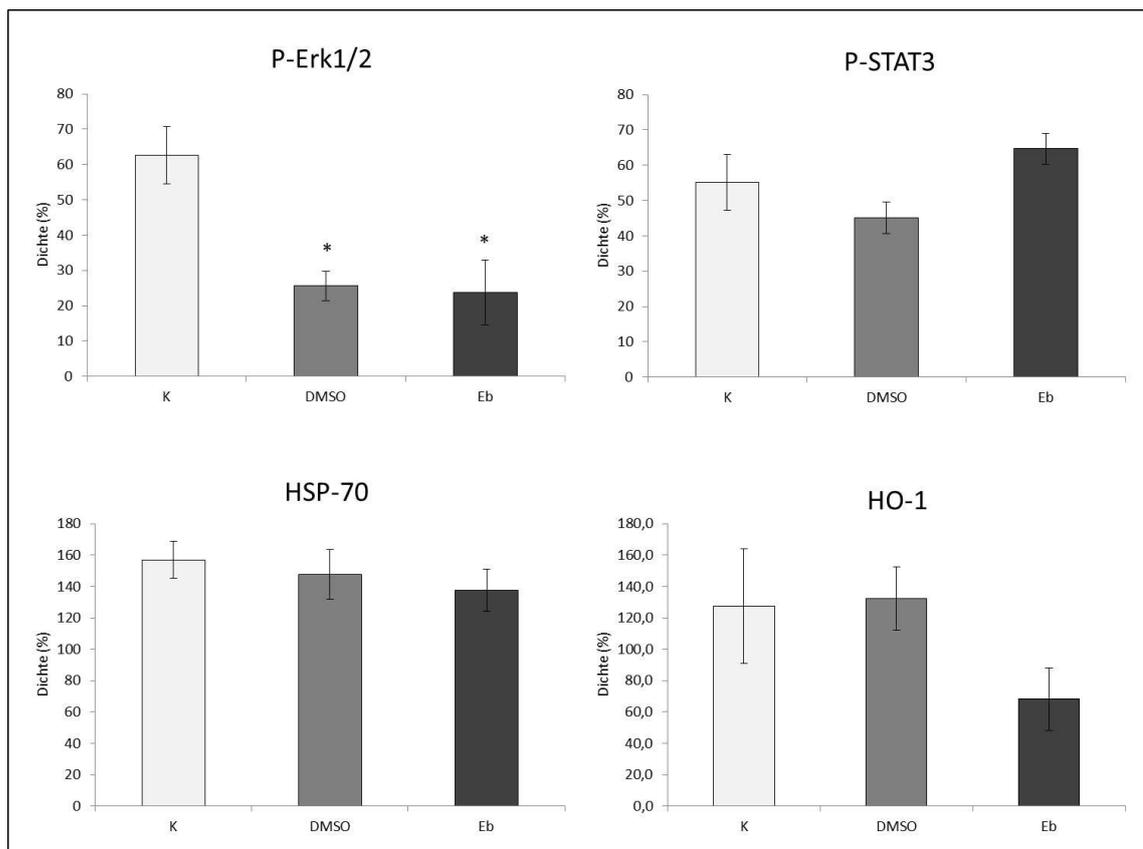


Abb. 32: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Herzlysaten. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe. Die Daten wurden auf die Ladungskontrollen normalisiert. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. * P < 0,05 vs. Kontrollgruppe.

Lunge

Die Phosphorylierung der MAPK Erk1/2 war in der Ebselengruppe im Vergleich zu der DMSO-Gruppe signifikant vermindert, nicht jedoch gegenüber der Kontrollgruppe. Des Weiteren war die Expression des Hitzeschockproteins HSP-70 in der Ebselengruppe tendenziell höher als in der Kontrollgruppe. In der DMSO-Gruppe war die HSP-70 Expression ebenfalls deutlich höher als in der Kontrollgruppe, allerdings waren die Unterschiede in beiden Gruppen nicht signifikant. Die Expression des Hitzeschockproteins HO-1 erhöhte sich in der Ebselen- und in der DMSO-Gruppe leicht, die Unterschiede erreichten keine Signifikanz. Die Phosphorylierung des STAT3 war im Vergleich zu der Kontrollgruppe in der Ebselengruppe leicht vermindert und in der DMSO-Gruppe leicht erhöht. Auch hier waren die Unterschiede nicht signifikant. Die Western Blots sind in Abbildung 33, die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung in Abbildung 34 dargestellt.

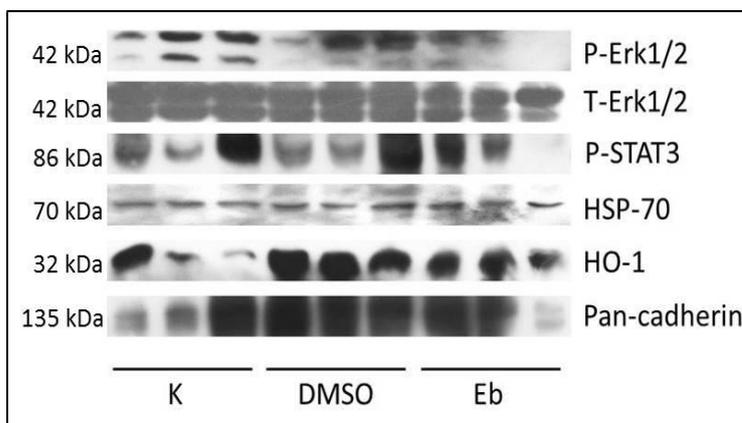


Abb. 33: Western Blots aus Lungenlysaten. Ausgewählte Ergebnisse der Western Blot Analysen der Tiere der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe.

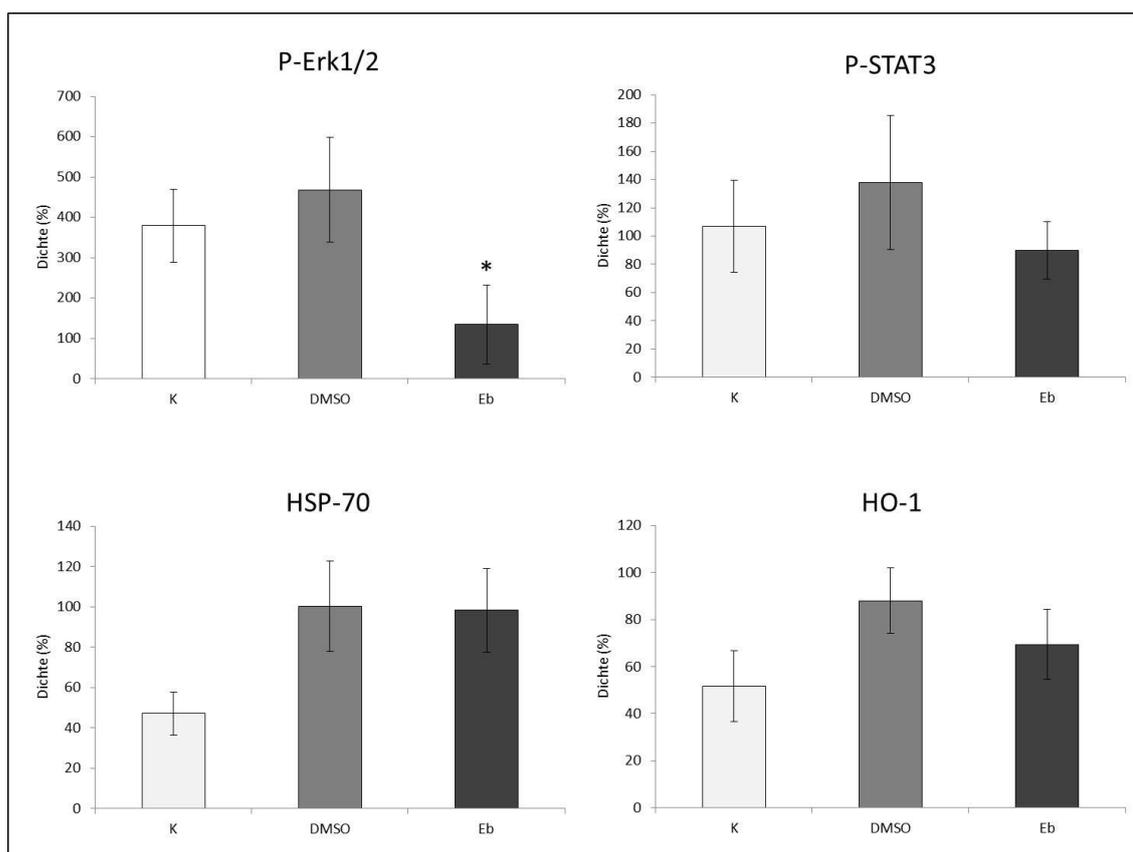


Abb. 34: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Lungenlysaten. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe. Die Daten wurden auf die Ladungskontrollen normalisiert. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. * $P < 0,05$ vs. DMSO-Gruppe.

Leber

In der Leber war die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 in der Ebselengruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. In der DMSO-Gruppe war sie ebenfalls leicht vermindert, jedoch nicht signifikant. Bezüglich der Expression des HSP-70 und der HO-1 entwickelten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Eine Phosphorylierung der MAPK Erk1/2 konnte in der Leber aus versuchstechnischen Gründen nicht detektiert werden, die T-Erk1/2 war in allen Proben gleichmäßig vorhanden. Abbildung 35 zeigt die Western Blots, die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind in Abbildung 36 dargestellt.

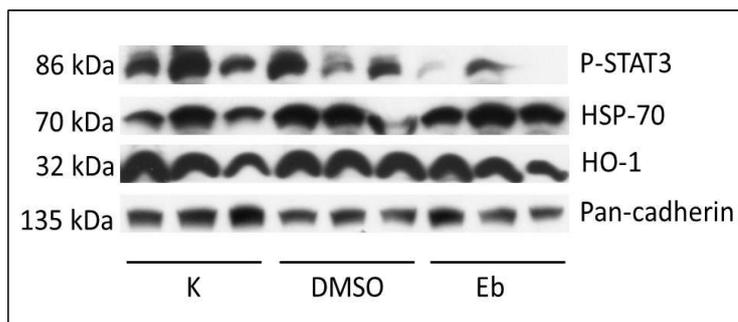


Abb. 35: Western Blots aus Leberlysaten. Ausgewählte Ergebnisse der Western Blot Analysen der Tiere der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe.

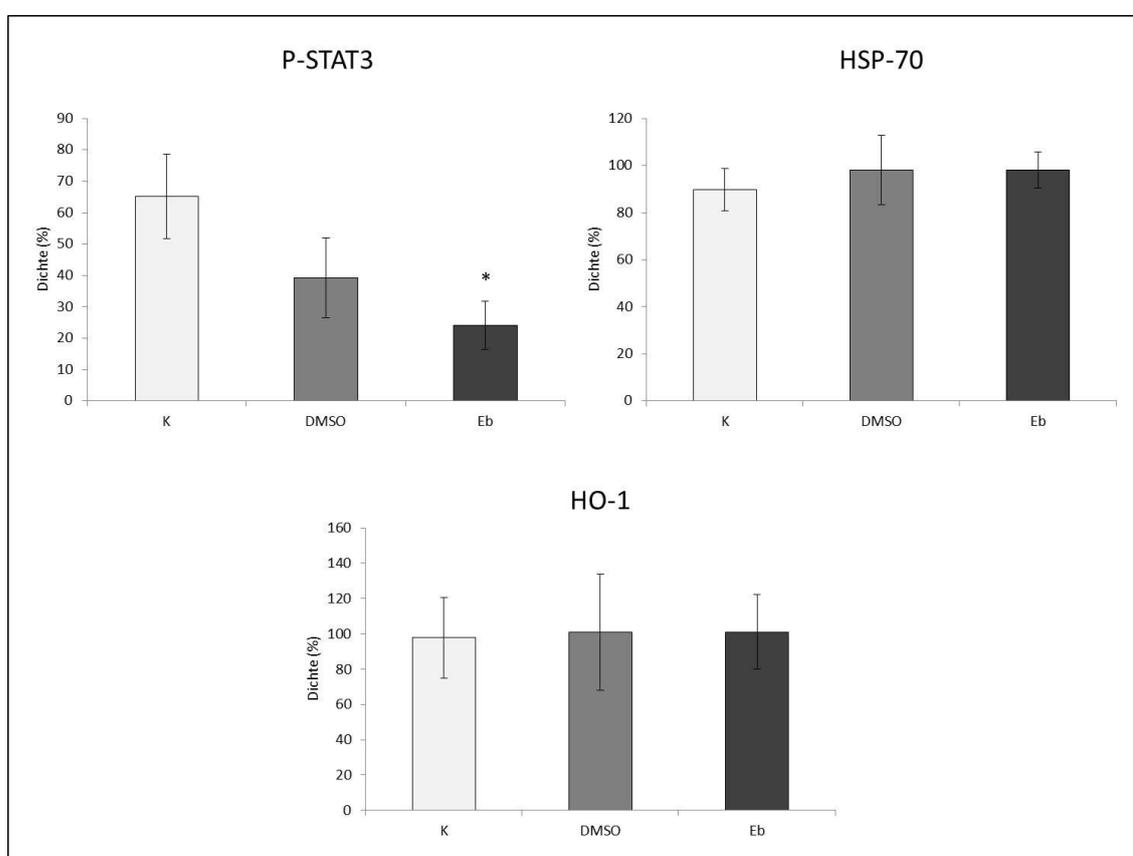


Abb. 36: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Leberlysaten. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe. Die Daten wurden auf die Ladungskontrollen normalisiert. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe. * $P < 0,05$ vs. Kontrollgruppe.

Niere

In der Niere konnten für kein Protein signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen beobachtet werden. Allerdings sah man folgende Tendenzen: Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 war in der Ebselengruppe etwas niedriger als in der Kontrollgruppe. Dieser Effekt war auch in der DMSO-Gruppe zu erkennen. HO-1 wurde bei den Tieren der Ebselengruppe geringfügig mehr exprimiert als bei Tieren der Kontrollgruppe. In der Expression des HSP-70 konnten zwischen den drei Gruppen keine Unterschiede entdeckt werden. Wie auch in der Leber konnte eine Phosphorylierung der MAPK Erk1/2 aus versuchstechnischen Gründen nicht detektiert werden, die T-Erk1/2 war in allen Proben gleichmäßig vorhanden. Die Western Blots sind in Abbildung 37, die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung in Abbildung 38 dargestellt.

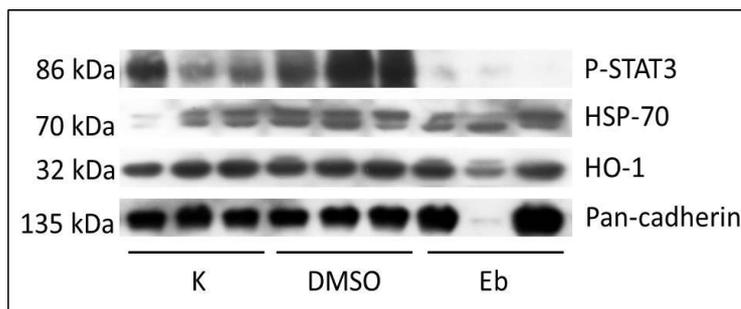


Abb. 37: Western Blots aus Nierenlysaten. Ausgewählte Ergebnisse der Western Blot Analysen der Tiere der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe.

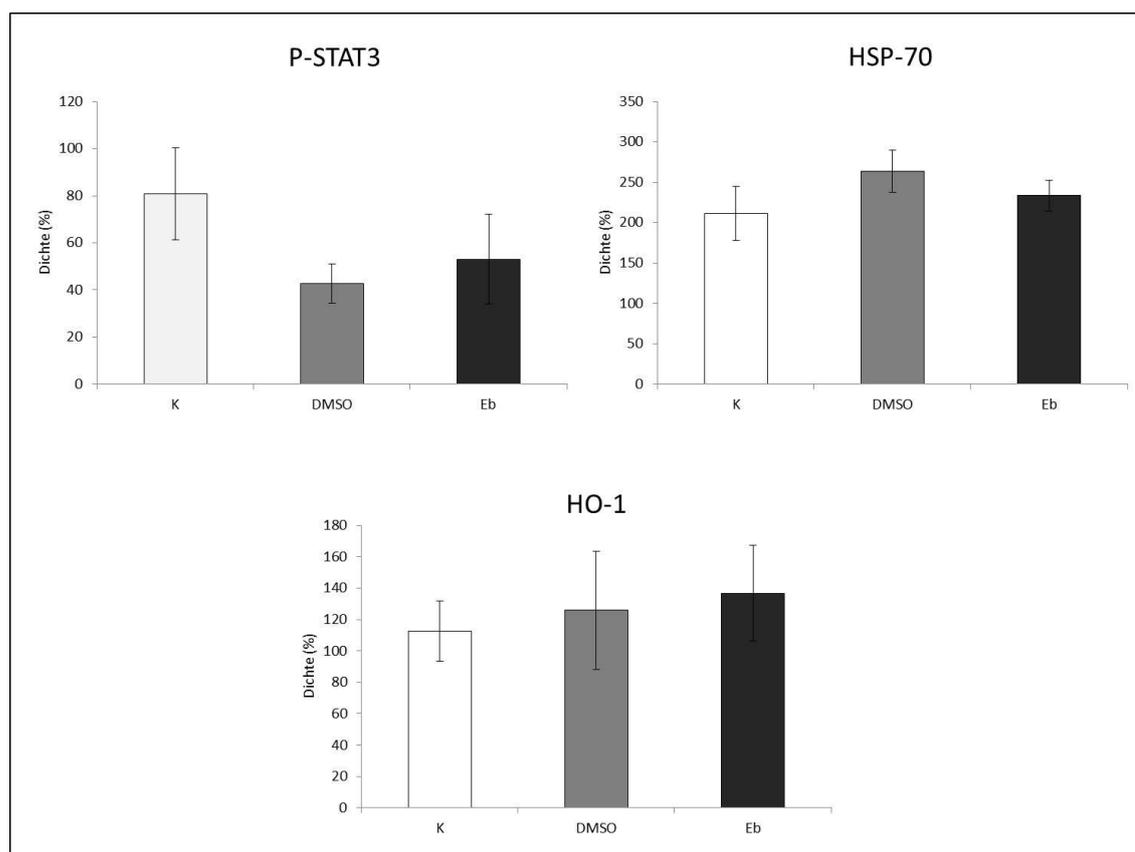


Abb. 38: Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Nierenlysaten. K = Kontrollgruppe, DMSO = DMSO-Gruppe, Eb = Ebselengruppe. Die Daten wurden auf die Ladungskontrollen normalisiert. Alle Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler von jeweils sieben Tieren pro Gruppe.

Das Untersuchungsergebnis zeigt, dass Ebselen die durch I/R induzierten Signalwege organ- und proteinspezifisch beeinflusst. Die beobachteten Veränderungen waren am stärksten im Herzen ausgeprägt, allerdings waren hier die Veränderungen unter DMSO ähnlich.

4 Diskussion

4.1 Etablierung des Kleintier-EKZ-Modells

Der I/R-Schaden trägt maßgeblich zu Morbidität und Mortalität nach herzchirurgischen Eingriffen mit EKZ und DHCA bei. Die darin involvierten Mechanismen und molekularen Signalwege sind allerdings bis heute nicht gänzlich verstanden und der I/R-Schaden ist nach therapeutischen Optionen kaum zugänglich. Ein valides Tiermodell ist dafür geeignet, die beteiligten molekularen Signalwege sowie therapeutische Interventionsmöglichkeiten zu untersuchen. Deshalb wurde in dieser Studie zunächst ein geeignetes Tiermodell etabliert.

Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen EKZ-Tiermodellen [Jungwirth et al., 2005] sollte in dem hier vorgestellten Modell das Hauptaugenmerk auf dem Gesamtorganismus und nicht auf einzelnen Organen liegen. Ein großer Vorteil dieses Tiermodells ist die Möglichkeit, unmittelbar nach der Reperfusion die Organe zu entnehmen und zu untersuchen. Damit lässt sich nachvollziehen, wie sich der I/R-Schaden unmittelbar nach der Operation auf die verschiedenen Organe auswirkt. Beim Menschen ist das in dieser Form nicht möglich, da es eine zu große Belastung für den Patienten darstellen würde, nach der Reperfusion Gewebeproben zu entnehmen. Auch in der Zellkultur kann man die unmittelbaren Auswirkungen der I/R auf den Organismus nicht nachvollziehen, da die Interaktion zwischen den Organen untereinander wie auch die Interaktion mit dem Immunsystem fehlt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Ratten-EKZ-Modell etabliert, mit dessen Hilfe der Einfluss von I/R während EKZ mit DHCA auf den Gesamtorganismus untersucht und bekannte pathophysiologische und molekulare Mechanismen nachvollzogen werden konnten. In Tabelle 28 werden ausgewählte Ergebnisse mit aus der Literatur bekannten Auswirkungen der I/R verglichen.

Tabelle 28: Vergleich der hier beschriebenen und diskutierten Ergebnisse mit Literaturdaten.

I/R-induzierte Veränderungen	Literaturergebnisse
Erhöhung AST, ALT im Blut	<ul style="list-style-type: none"> - Beschrieben in I/R-Modell der Ratte [Liu et al., 2011] - Beschrieben in I/R-Modell des Menschen [Silva et al., 2006]
Erhöhung Troponin I, CK-MB, LDH im Blut	<ul style="list-style-type: none"> - Beschrieben in I/R-Modell in Zellkultur [Wei et al., 2013] - Beschrieben in I/R-Modell der Ratte [Wei et al., 2013] - Beschrieben in I/R-Modell des Menschen [Karaca et al., 2006]
Erhöhung Kreatinin im Blut	<ul style="list-style-type: none"> - Beschrieben in I/R-Modell in Zellkultur [Vesey et al., 2004] - Beschrieben in I/R-Modell der Ratte [Tuuminen et al., 2013] - Beschrieben in I/R-Modell des Menschen [Choi et al., 2011]
Erhöhung IL-6, TNF- α im Blut	<ul style="list-style-type: none"> - Beschrieben in I/R-Modell in Zellkultur [Tan et al., 2013] - Beschrieben in I/R-Modell der Maus [Pan et al., 2013] - Beschrieben in I/R-Modell des Menschen [Kim et al., 2012]
Anstieg der Leukozytenzahlen im Blut	<ul style="list-style-type: none"> - Beschrieben in I/R-Modell des Hundes [Baldwin et al., 1991] - Beschrieben in I/R-Modell des Menschen [Fink et al., 2003]
Erhöhung p-STAT3 Herz	<ul style="list-style-type: none"> - Beschrieben in I/R-Modell isolierter Rattenherzen [Scarabelli et al., 2008] - Beschrieben in I/R-Modell der Ratte [McCormick et al., 2006]
Erhöhung p-STAT3 Lunge	<ul style="list-style-type: none"> - Beschrieben in I/R-Modell der Ratte [Oyaizu et al., 2012]
Erhöhung p-STAT3 Leber	<ul style="list-style-type: none"> - Beschrieben in I/R-Modell in Zellkultur [Lou et al., 2013] - Beschrieben in I/R-Modell der Maus [Clarke et al., 2011]
Erhöhung p-STAT3 Niere	<ul style="list-style-type: none"> - Beschrieben in I/R-Modell in Zellkultur [Arani et al., 2006] - Beschrieben in I/R-Modell der Ratte [Si et al., 2013]

Tabelle 28 vergleicht ausgewählte Ergebnisse dieser Studie mit Literaturdaten.

Die beobachteten Veränderungen der meisten analysierten Blutparameter zeigten, dass sie einem Einfluss der EKZ unterliegen. Erhöhte Plasmawerte der Enzyme AST und ALT stellen einen Marker für Leber-, Skelettmuskel- und Herzmuskelschäden dar. Die signifikante Erhöhung der AST und die tendenzielle Erhöhung der ALT nach I/R deuten auf nekrotischen Zelltod hin. Ein Anstieg der Enzyme AST und ALT konnte auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet werden und war daher zu erwarten [Liu et al., 2011]. Die beobachtete Abnahme während der Kühlung ist höchstwahrscheinlich auf die im Rahmen der EKZ auftretende Hämodilution zurückzuführen.

Obwohl der Anstieg der Nierenretentionsparameter Kreatinin und Harnstoff innerhalb des Referenzbereichs lag, deutet dieser auf eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion hin, welche höchstwahrscheinlich auf eine I/R-induzierte Schädigung des Nierengewebes zurückzuführen ist [Boodhwani et al., 2009]. Troponin I und CK-MB stellen Marker für Herzmuskelschäden dar. Der Anstieg der Plasmaspiegel von Troponin I, CK-MB und LDH wurde in der Literatur auch von anderen Arbeitsgruppen beim Menschen nach EKZ und I/R beschrieben und war demnach zu erwarten [Karaca et al., 2006]. Ein Anstieg des proinflammatorischen Zytokins IL-6 ist laut Literatur mit der Reperfusion assoziiert [Boengler et al., 2008], was anhand der vorliegenden Ergebnisse in dieser Studie bestätigt werden konnte. Außerdem ist der beschriebene IL-6 Anstieg im Einklang mit dem beobachteten Anstieg der Leukozyten während der Reperfusion. Der nach der Reperfusion beobachtete Anstieg von TNF- α konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden und war demnach zu erwarten [Yassin et al., 2002].

Für die Interpretation der Ergebnisse der Blutuntersuchungen ist es wichtig zu erwähnen, dass in den Blutproben der Reperfusion Hämolyse zu beobachten war. Hämolyse kann zu einem Anstieg der LDH, AST, ALT und CK-MB Werte führen und damit die Ergebnisse beeinflussen [Koseoglu et al., 2011]. Des Weiteren soll darauf hingewiesen werden, dass einige der bestimmten Parameter sich während des EKZ-Verlaufs deutlich veränderten, diese Veränderung aufgrund der hohen Standardabweichungen jedoch z.T. nicht signifikant waren.

Als eine weitere Folge der I/R konnten organspezifische Veränderungen des Expressions- und Phosphorylierungsmusters von Stressproteinen beobachtet werden. Die Rolle dieser Stressproteine im Kontext der Ischämie/Reperfusion wird im Folgenden kurz diskutiert. Während herzchirurgischer Eingriffe ist das Myokard Stressoren wie Dehnung, Ischämie, vasoaktiven Substanzen und Schubspannung ausgesetzt. Diese können u.a. MAPK-Kaskaden aktivieren. Die erhöhte Gefäßpermeabilität, vasomotorische Dysfunktionen und Zytokinproduktion, die mit der inflammatorischen Antwort auf Operationen mit EKZ einhergehen, werden zum Teil durch MAPK vermittelt. Die während der Operationen mit EKZ produzierten ROS können ebenfalls die MAPK-Aktivität verändern und damit zum I/R-Schaden beitragen. Signifikante Organfunktionsstörungen können durch eine Störung physiologischer Prozesse, in die MAPK-Signalwege involviert sind, entstehen. Die Regulation der MAPK ist dabei unterschiedlich: während es nach I/R zu einer verminderten Phosphorylierung der Erk1/2 kommt, werden JNK und p38 vermehrt phosphoryliert [Clemont *et al.*, 2002; Khan *et al.*, 2004]. Die Arbeitsgruppe von Khan zeigte, dass die Aktivität der Erk1/2 nach EKZ vermindert ist, und dies u.a. zu der Entstehung einer koronaren, mikrovaskulären Dysfunktion beiträgt [Khan *et al.*, 2004]. Die Aktivität der MAPK-Signalkaskaden könnte außerdem zu dem erhöhten myokardialen Reperfusionsschaden und der erhöhten pulmonalen Gefäßpermeabilität beitragen, die häufig nach herzchirurgischen Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass beobachtet werden [Khan *et al.*, 2004].

Ein typisches Merkmal der inflammatorischen Antwort auf die EKZ stellt die Produktion von Zytokinen dar. Sowohl MAPK-Signalwege als auch JAK/STAT-Signalwege sind in die Regulation der Biosynthese von inflammatorischen Zytokinen involviert. In einem Modell an isolierten, perfundierten Rattenherzen resultierte die Inhibierung der p38-Kinase in einer verminderten myokardialen TNF- α Produktion nach oxidativem Stress [Meldrum *et al.*, 1998]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MAPK an der Regulierung der IL-6 Genexpression beteiligt sind [Craig *et al.*, 2000]. Eine Studie von Hashimoto *et al.* zeigte, dass die durch TNF- α und Interleukin-1 (IL-1) induzierte Interleukin-8 (IL-8) Produktion von der p38-MAPK reguliert wird [Hashimoto *et al.*, 1999]. Der JAK-STAT Signalweg ist auch in die Biosynthese von anti-inflammatorischen

Zytokinen involviert. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von STAT3 durch IL-10 Rezeptorbindung essentiell für die anti-inflammatorischen Effekte von IL-10 ist. Dies konnte in einer Studie von Takeda und Mitarbeitern gezeigt werden. STAT3-defiziente Mäuse produzierten vermehrt pro-inflammatorische Zytokine. Dies beruhte darauf, dass die suppressive Wirkung von IL-10 auf die pro-inflammatorische Zytokinproduktion komplett aufgehoben war [Takeda et al., 1999].

Auch der JAK/STAT-Signalweg spielt eine Rolle in der I/R. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 führt zu einer Protektion von Zellen und ist in der Lage, Herzmuskelzellen vor I/R-Schäden und oxidativem Stress zu schützen [Negoro et al., 2001]. Diese kardioprotektive Rolle von STAT3 konnte auch in einer Studie von Oshima et al. nachgewiesen werden. Diese zeigte, dass transgene Mäuse, die STAT3 überexprimieren, geringere Myokardinfarktgrößen nach I/R aufwiesen als die nicht-transgenen Kontrolltiere [Oshima et al., 2005]. Außerdem wurde beschrieben, dass STAT3-defiziente Mäuse nach I/R deutlich mehr Apoptose in Herzzellen aufwiesen als die Kontrolltiere. Dies zeigt, dass STAT3 in I/R der Apoptose entgegenwirkt [Stephanou, 2004]. STAT3 ist auch bei der ischämischen Präkonditionierung im Gehirn [Kim et al., 2008], Leber [Iniguez et al., 2006] und Herz [Smith et al., 2004] von Bedeutung, da es einen Schutz der Zellen vermittelt. Neben STAT3 konnten auch für STAT5 kardioprotektive Eigenschaften beschrieben werden. In einer Studie, in der Patienten vor Bypass-Eingriffen kurzen Ischämie-Phasen ausgesetzt wurden, konnte eine deutlich vermehrte Phosphorylierung von STAT5 gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Diese vermehrte Phosphorylierung war assoziiert mit einer Protektion des Herzens [Heusch et al., 2012]. Interessanterweise scheint die Funktion von STAT3 und STAT5 bei Menschen und Tieren unterschiedlich zu sein. Eine Aktivierung von STAT5 und nicht von STAT3 ist beim Menschen mit einer Protektion des Herzens assoziiert, wohingegen beim Tier eine STAT3 Aktivierung und STAT5 Inhibierung kardioprotektiv wirken [Heusch et al., 2012].

Neben den MAPK- und JAK/STAT-Signalwegen sind auch Hitzeschockproteine (HSP) im Kontext der I/R von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass die

Synthese von HSPs zu einem Schutz der Zellen vor Ischämie führt, da durch sie die Toleranz gegen myokardiale Schäden erhöht und die post-ischämische Regeneration verbessert wird [Sammur & Harrison, 2003]. HSPs werden als Antwort auf kurze und reversible I/R-Insulte exprimiert und spielen daher eine Rolle in der myokardialen Präkonditionierung [Das & Maulik, 2006]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Patienten mit koronaren Herzerkrankungen erhöhte IgG-Antikörper Spiegel gegen HSP-70 aufwiesen [Vogt *et al.*, 2011]. Der zytoprotektive Effekt der HSP während I/R scheint zumindest teilweise auf einer vermehrten Bereitstellung von Enzymen der Atmungskette durch HSP-10, HSP-60, HSP-72 und dem Schutz gegen oxidativen Stress durch HSP-32 zu beruhen [Sammur & Harrison, 2003].

In der vorliegenden Studie war anhand der Phosphorylierung von STAT3 eine inflammatorische Reaktion in allen Organen der Kontrolltiere zu erkennen. Dies ist im Einklang mit den erhöhten Leukozytenzahlen und dem erhöhten IL-6 Serumspiegel der Kontrolltiere [Boengler *et al.*, 2008]. Eine Reihe I/R-induzierter Veränderungen in Proteinexpression und Phosphorylierung konnten aufgrund von Literatur und vorausgehender Versuche erwartet werden. Allerdings entsprachen die Veränderungen in der vorliegenden Studie nicht immer den Erwartungen. Dafür kommen zwei Hauptgründe in Frage:

Zum einen die Dauer der I/R, die auf die einzelnen Organe eingewirkt hat und zum anderen die organspezifische Toleranz gegenüber kurzzeitigen ischämischen Abschnitten. Da in dem hier beschriebenen EKZ-Modell die Proteinexpression und -phosphorylierung am Ende der gesamten EKZ-Zeit analysiert wurden, kann dies zu einem vereinfachten Bild der Signalwege, die während der EKZ auftreten, führen. Da die verschiedenen Stressproteine oft zeitabhängig agieren [Toledo-Pereyra *et al.*, 2008; Bell *et al.*, 2008], sollten in weiterführenden Studien verschiedene Detektionszeitpunkte während des Experiments berücksichtigt werden. In der Literatur beschriebene abnorm hohe Calciumspiegel als Auslöser von MAP-Kinase-Aktivierung und HSP-Induktion können ausgeschlossen werden, da in den Calcium-Plasmaspiegeln keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den nicht behandelten Tieren zu erkennen waren.

Ein wichtiger Punkt, den es bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen gilt, ist die während der Reperfusion beobachtete Hämolyse. Die Freisetzung von Häm und Kohlenmonoxid (CO) könnte die Signalwege beeinflussen und zu organspezifischen Abweichungen führen [Kaizu *et al.*, 2008].

Neben den hier untersuchten Organen werden in der Literatur auch Schäden des Gehirns und des Magen-Darm-Traktes nach I/R durch EKZ beschrieben [Baehner *et al.*, 2012; Abboud *et al.*, 2008]. So kommt es beispielsweise nach herzchirurgischen Eingriffen mit EKZ mit einer Inzidenz von 1-3% zu einem Schlaganfall. In Vorversuchen dieser Studie wurden deshalb neben Herz, Lunge, Leber und Niere auch das Gehirn und der Magen-Darm-Trakt entnommen und mittels Western Blot Analysen untersucht. Sowohl im Gehirn als auch im Magen-Darm-Trakt waren die individuellen Unterschiede sehr groß, weshalb auf eine weitere Untersuchung dieser Organe verzichtet wurde.

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

Herzchirurgische Eingriffe mit EKZ und DHCA können I/R-Schäden im gesamten Organismus hervorrufen [Christenson *et al.*, 1996; Stoppe *et al.*, 2011]. Ein entscheidender Anteil an der Entstehung des I/R-Schadens wird den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zugeschrieben [Prasad *et al.*, 2009]. ROS können u.a. Lipidperoxidation initiieren, Proteine durch Oxidation inaktivieren und DNA-Strangbrüche hervorrufen [Guo *et al.*, 2012]. Diese Faktoren können zu Gewebeschädigungen führen [Brömme *et al.*, 2002] und im schlimmsten Fall Multiorganversagen und damit den Tod des Patienten verursachen [Carden & Granger, 2000]. Da die ROS maßgeblich an der Entstehung des I/R-Schadens beteiligt sind, stellt der Einsatz von Antioxidantien eine mögliche Interventionsmöglichkeit dar.

Aufgrund der anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften, die durch Selenoproteine vermittelt werden, wurde bereits in vielen Studien eine Selen-Supplementierung durchgeführt. Es wird davon ausgegangen, dass die Selen-Supplementierung den oxidativen Stress minimieren und damit postoperative Komplikationen nach herzchirurgischen Eingriffen vermindern kann [Liu *et al.*, 2000]. Der Selenstatus der meisten Europäer ist zu niedrig, um eine gesättigte Expression der Selenoproteine GPx 3 und Selenoprotein P im Blut zu gewährleisten [Steinbrenner *et al.*, 2013]. Da Selenoprotein P das hauptsächliche Transportprotein für Selen ist, hat dies wiederum Auswirkungen auf die Aktivität dieser Selenoproteine in den Organen. Außerdem zeigten Studien, dass ein niedriger Selenstatus bei SIRS-Patienten direkt mit einer erhöhten Morbidität korreliert [Angstwurm *et al.*, 2007; Manzanares & Hardy, 2009].

Um den Selenstatus zu verbessern, den anti-oxidativen Schutz zu optimieren und damit dem I/R-Schaden vorzubeugen, gibt es zwei Möglichkeiten: Zum einen gibt es die Möglichkeit der Nahrungs-Supplementierung mit Selen, welche mindestens über eine Woche erfolgen muss, um eine gesteigerte Biosynthese der Selenoproteine zu gewährleisten [Zhang *et al.*, 2013]. Zum anderen gibt es die Möglichkeit akut zu intervenieren. Dies kann beispielsweise durch die Gabe von Enzym-Mimetika wie Ebselen oder exogenen

Antioxidantien wie N-Acetylcystein, Vitamin C oder Vitamin E erfolgen [Mugesh et al., 2001; Bolcal et al., 2007; Rodrigo et al., 2013]. Bei Patienten, für die elektive herzchirurgische Eingriffe geplant sind, würde sich zur Prophylaxe gegen den I/R-Schaden eine Nahrungs-Supplementierung anbieten. Bei Notfallpatienten wäre dagegen die Gabe einer akut wirksamen Substanz wie z.B. Ebselen angezeigt. In diesem Zusammenhang ist die hohe Bioverfügbarkeit des Ebselens zu nennen, aufgrund welcher Ebselen besonders gut als Therapeutikum zur akuten Intervention geeignet ist. Des Weiteren ist anzumerken, dass in den zahlreichen Studien zu Ebselen keinerlei Nebenwirkungen beobachtet wurden [Parnham & Sies, 2000]. Ein Nachteil des Ebselens ist seine, auf Hydrophobie beruhende, schlechte Löslichkeit. In wässrigen Lösungen ist Ebselen nicht löslich, weshalb zur Herstellung einer Lösung Lösungsmittel wie DMSO, Ethanol oder Dimethylformamid verwendet werden müssen [Ren et al., 2002].

Ebselen zeigt eine Vielzahl biologischer Wirkungen, die im Kontext des I/R-Schadens von Interesse sind. Zu nennen ist an dieser Stelle unter anderem die ausgeprägte anti-oxidative Aktivität des Ebselens, die auf der Imitation der Glutathionperoxidase beruht. Die GPx ist ein Enzym, das in mehreren Isoformen intra- und extrazellulär vorkommt und Biomembranen sowie andere zelluläre Komponenten vor oxidativer Schädigung schützt, indem es verschiedene Hydroperoxide reduziert. Die GPx-ähnliche Aktivität des Ebselens resultiert hauptsächlich aus der Bildung katalytisch aktiver Selenole [Bhabak & Mugesh, 2007]. Ebselen reagiert in Anwesenheit von Thiolen mit organischen Hydroperoxiden, wodurch diese reduziert werden. Dabei ist es im Vergleich zu den endogenen Enzymen leichter zugänglich und dadurch weniger spezifisch für Thiole. Während die Glutathionperoxidasen hoch spezifisch für Glutathion (GSH) als Substrat sind, kann Ebselen auch andere Thiolverbindungen als Co-Substrat nutzen [Parnham & Sies, 2000]. Die anti-oxidativen Eigenschaften von Ebselen konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen werden [Sies, 1994; Yamagata et al., 2008; Miorelli et al., 2008]. Die in dieser Studie gemessene erhöhte GPx-Aktivität in allen untersuchten Organen zeigt, dass durch die Ebselen-Behandlung die Aktivität der GPx erfolgreich gesteigert

werden konnte. Diese Ergebnisse sind konform mit Resultaten anderer Studien [Sies, 1993].

Neben den anti-oxidativen Eigenschaften des Ebselens wurden auch anti-inflammatorische Eigenschaften beschrieben. Ebselen hemmt die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α , Interferon γ , Leukotriene B₄, D₄, E₄) und stimuliert die Ausschüttung anti-inflammatorischer Substanzen wie z.B. Interleukin-10 [Wendel *et al.*, 1997; Parnham & Graf, 1987].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Ebselen den durch die extrakorporale Zirkulation und den hypothermen Kreislaufstillstand induzierten I/R-Schaden im Gesamtorganismus teilweise beeinflusst. Ebselen konnte beispielsweise den nach I/R auftretenden Anstieg der Serumspiegel von AST, ALT, Troponin I und LDH und die damit verbundene Nekrose der Leber- und Herzzellen verhindern.

In der Literatur wird seit kurzem eine programmierte Form der Nekrose, die sog. *necroptosis* diskutiert, die mit I/R assoziiert ist. Dabei wird, vermittelt über die aktivierte ERK1/2, die Poly-ADP-ribose-Polymerase (PARP) phosphoryliert und dadurch aktiviert. Eine Überaktivität der PARP führt zu NAD-Depletion, dadurch zur Inhibierung der Glykolyse und letztlich zur programmierten Nekrose. In der vorliegenden Studie war im Herzen die Aktivität der p-Erk1/2 durch die Ebselen-Behandlung signifikant vermindert, was die Inhibierung der Nekrose durch den beschriebenen Weg der *necroptosis* erklären könnte (Xu *et al.*, 2010; Cohen-Armon, 2007). Allerdings galt dies im gleichen Maße für die Behandlung mit DMSO, insofern kann nicht gesagt werden, ob es sich bei dem Effekt innerhalb der Ebselengruppe um einen Effekt des Lösungsmittels (DMSO) oder um die Wirkung des Ebselens handelte.

Des Weiteren konnte organspezifisch eine Beeinflussung der durch I/R induzierten Signalwege beobachtet werden. Diese soll im Folgenden für die einzelnen Organe beschrieben werden:

Herz

Die Beeinflussung der durch I/R induzierten Signalwege war besonders ausgeprägt im Herzen. Neben der bereits erwähnten signifikant verminderten Phosphorylierung der Erk1/2 war eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung des STAT3 zu beobachten. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass STAT3 kardioprotektive Eigenschaften besitzt [Soond *et al.*, 2006; Lakkisto *et al.*, 2009]. STAT3 wird u.a. durch IL-6 aktiviert [Kurdi & Booz, 2007]. Die in der Ebselengruppe geringfügig erhöhten IL-6 Serumspiegel könnten einen Grund für die tendenziell erhöhte STAT3 Aktivität im Herzen darstellen. Obwohl IL-6 ein pro-inflammatorisches Zytokin darstellt, wurde in Studien anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass es auch kardioprotektive Eigenschaften besitzt [Kurdi & Booz, 2007]. Die beschriebene Beeinflussung der Signalwege im Herzen und der Serumspiegel von Troponin I und IL-6 geben einen Hinweis darauf, dass durch den Einsatz von Ebselen die unmittelbar nach EKZ auftretende Myokardschädigung positiv beeinflusst werden kann. Allerdings muss erwähnt werden, dass die genannten Effekte des Ebselens teilweise auch bei dem Lösungsmittel DMSO beobachtet wurden.

Die Auswirkungen von I/R auf das Herz wurden bereits in vielen Studien beschrieben [Duicu *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2012]. Da die I/R aber auch Auswirkungen auf andere Organe hat, sollte in der vorliegenden Arbeit der Gesamtorganismus betrachtet werden. Deshalb wurden neben dem Herzen die Organe Lunge, Leber und Niere untersucht. Auch in diesen Organen konnten Effekte von Ebselen beobachtet werden.

Lunge

Im Gegensatz zum Herzen war die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 in Lunge, Leber und Niere tendenziell vermindert. Eine verminderte Phosphorylierung des STAT3 wurde auch in Studien anderer Arbeitsgruppen beobachtet. So konnte die Arbeitsgruppe von Farivar zeigen, dass eine verminderte STAT3 Aktivität die Lungen vor I/R-Schäden schützen kann. Interessanterweise war diese verminderte STAT3 Aktivität durch die Gabe von IL-6 vermittelt, was normalerweise als STAT3 induzierend angesehen wird

[Farivar et al., 2006]. Andere Studien beschrieben dagegen, dass eine durch CO induzierte, vermehrte STAT3 Aktivierung in einem I/R-Modell der Lungen anti-apoptotisch und damit protektiv auf Endothelzellen der Lunge wirkte [Zhang et al., 2005]. Die genaue Rolle von STAT3 auf I/R-vermittelte Lungenschäden scheint bisher nicht gänzlich geklärt zu sein. Neben der verminderten STAT3 Aktivität war eine geringfügig vermehrte HO-1 Expression in der Lunge zu beobachten. Andere Studien haben gezeigt, dass eine vermehrte HO-1 Expression protektiv gegen ROS-induzierte Lungenschäden wirkt und Tiere, die HO-1 überexprimieren, eine erhöhte Resistenz gegen Hypoxie bedingte Schäden aufwiesen [Haines et al., 2012]. Daneben war in den Lungen eine signifikant verminderte Phosphorylierung der Erk1/2 erkennbar. Yamamoto et al. zeigten in einem Lungentransplantationsmodell an Ratten, dass die Aktivierung der Erk1/2 eine wichtige Rolle in der Induzierung des I/R-Schadens spielt [Yamamoto et al., 2011]. Demnach könnte eine verminderte Erk1/2 Aktivität dem I/R-Schaden in der Lunge entgegenwirken.

Außerdem wiesen die Tiere der Ebselengruppe eine tendenziell vermehrte HSP-70 Expression auf. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass Stressproteine wie HSP-70 eine wichtige zytoprotektive Rolle bei Lungenschäden und –entzündungen spielen [Wheeler & Wong, 2007]. Aufgrund dieser Ergebnisse kann der Einfluss von Ebselen auf I/R induzierte Lungenschäden als positiv interpretiert werden, wobei auch hier teilweise ähnliche Effekte in der DMSO-Gruppe beobachtet werden konnten.

Leber

In der Leber war in der Ebselengruppe ein moderater Anstieg des HSP-70 zu beobachten. Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass HSP-70 die inflammatorische Antwort nach partieller Hepatektomie reduzieren und die Leberregeneration fördern kann [Oka et al., 2013]. Des Weiteren fand die Arbeitsgruppe von Cressman heraus, dass IL-6 eine wichtige Rolle in der Leberregeneration spielt. IL-6 *knockout* Mäuse zeigten eine verschlechterte Leberregeneration nach partieller Hepatektomie im Vergleich zum Wildtyp. Eine einmalige, präoperative IL-6-Gabe führte bereits zu einer deutlichen Verbesserung der Regeneration [Cressman et al., 1996]. Allerdings wurde

dieser Effekt u.a. über eine Aktivierung des STAT3 vermittelt, welcher in den Tieren der Ebselengruppe signifikant vermindert war. Die tendenziell erhöhten IL-6 Spiegel der Tiere der Ebselengruppe zusammen mit den erniedrigten AST- und ALT-Serumspiegeln und der vermehrten HSP-70 Expression stellen einen Indikator dafür dar, dass Ebselen die nach I/R auftretende Leberschädigung reduzieren kann.

Niere

In der Niere war die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 in der Ebselengruppe ebenfalls leicht vermindert. Die Arbeitsgruppe von Si fand heraus, dass eine Inhibierung der I/R-induzierten Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges die Nieren gegen I/R-Schaden schützt [Si *et al.*, 2013]. Des Weiteren wurde eine geringfügig erhöhte Expression der HO-1 beobachtet. Eine Studie von Cheng *et al.* ergab, dass die Gabe von Adiponektin bei Mäusen zu einer Steigerung der HO-1 Expression führt. Dies resultierte in einer Verminderung der I/R-induzierten Nierenschäden, was darauf hinweist, dass HO-1 in der Niere zytoprotektiv wirkt [Cheng *et al.*, 2012]. Trotz dieser molekularen, nierenprotektiven Wirkungen konnte kein Einfluss des Ebselens auf funktionelle, nierenspezifische Parameter wie z.B. Kreatinin und Harnstoff festgestellt werden.

Der moderate Anstieg des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 in den Ebselen- und DMSO-behandelten Tieren entspricht nicht den Erwartungen. In der Literatur wird diskutiert, dass ein Anstieg der Zytokine IL-6 und TNF- α während der Reperfusion zu der Pathophysiologie des I/R-Schadens beiträgt [Zhang & Chen, 2008].

Des Weiteren ist in der Literatur beschrieben, dass eine erhöhte Morbidität und Mortalität nach EKZ mit erhöhten systemischen Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-10 korrelierten [Hill *et al.*, 1997]. In einer Arbeit von Gladilin *et al.* wurde gezeigt, dass Ebselen die Plasma IL-6 Spiegel nach Hirnischämie signifikant vermindern konnte [Gladilin *et al.*, 2000]. Dementsprechend war ein verminderter Anstieg der Zytokine durch die Ebselenbehandlung zu erwarten. Dies war aber nicht der Fall: die TNF- α

Spiegel zeigten kaum eine Beeinflussung durch Ebselen. Der beschriebene Anstieg von TNF- α während der Kühlung ist nur auf ein Tier zurückzuführen und daher nicht aussagekräftig genug. Die IL-6 Spiegel stiegen nach Ebselenbehandlung leicht an. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass IL-6 in nicht-infektiösen Entzündungen akut exprimiert wird und in diesem Fall eine wichtige Rolle für die Abwehr des Wirtes spielt, da es verschiedene Abwehrzellen stimuliert [Tanaka & Kishimoto, 2012]. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit den bereits beschriebenen zytoprotektiven Eigenschaften des IL-6 und könnten auch den Anstieg in der Ebselengruppe erklären, da sich Ebselen – wie bereits erwähnt - zur akuten Intervention eignet. Außerdem konnte gezeigt werden, dass GPx1 die Expression pro-inflammatorischer Zytokine nach LPS-Behandlung fördert [Bozinovski et al., 2012]. Da die GPx-Aktivität in den Organen der Ebselen-behandelten Tiere signifikant höher war als in der Kontrollgruppe, könnte dies eine Erklärung für die erhöhten IL-6 Spiegel sein.

Ein weiterer Befund, der eine Abnahme des IL-6 Spiegels erwarten lassen würde, ist die tendenziell verminderte STAT3-Phosphorylierung in drei von vier untersuchten Organen, da die STAT3-Phosphorylierung durch IL-6 stimuliert wird. Da in der vorliegenden Arbeit lediglich die Serumspiegel des IL-6 gemessen wurden, kann man allerdings keine sichere Aussage über die IL-6 Spiegel in den einzelnen Geweben machen. Demnach ist ein Zusammenhang zwischen den IL-6 Serumspiegeln und der STAT3-Phosphorylierung in den Organen nicht zwingend. Da der IL-6 Anstieg in der Ebselengruppe nicht signifikant war und die Werte großen individuellen Schwankungen unterlagen, empfiehlt sich die Untersuchung des Einflusses von Ebselen auf IL-6 mit einer größeren Stichprobenanzahl.

Neben dem Einfluss des Ebselens auf klinisch-chemische Blutparameter und molekulare Signalwege konnte auch ein positiver Einfluss auf die hämodynamischen Parameter festgestellt werden. Es ist bekannt, dass die starke Haemodilution während EKZ die Morbidität und Mortalität nach herzchirurgischen Eingriffen erhöht [Ranucci et al., 2006; Karkouti et al., 2005]. In einer prospektiven, randomisierten Studie fanden Goepfert et al. heraus, dass Patienten, die einer individuell optimierten hämodynamischen Therapie

unterzogen wurden, im Vergleich zu der Kontrollgruppe unter anderem einen verminderten Bedarf an Katecholaminen zeigten. Die Patienten dieser Gruppe zeigten postoperativ weniger Komplikationen und einen kürzeren Aufenthalt auf der Intensivstation als Patienten der Kontrollgruppe [Goepfert *et al.*, 2013]. Dass die Ebselen-Behandlung zu einem leicht verminderten Katecholamin- und Volumenbedarf führte, könnte ebenfalls zu einer Verbesserung der postoperativen Genesung beitragen.

Des Weiteren war der Anstieg der Leukozytenzahl, der häufig nach EKZ beobachtet werden kann [Fink *et al.*, 2003], in der Ebselen- wie auch in der DMSO-Gruppe weniger ausgeprägt als in der Kontrollgruppe, was ebenfalls zu einer verbesserten Genesung beitragen könnte.

Wie auch in den Etablierungsversuchen waren in den Untersuchungen zur protektiven Wirkung von Ebselen auf den I/R-Schaden teilweise Unterschiede zwischen Tieren der Ebselen- und der Kontrollgruppen zu beobachten. Aufgrund hoher Standardabweichungen erreichten diese jedoch z.T. keine Signifikanz. Deshalb wäre es sinnvoll, in weiterführenden Studien den Einfluss von Ebselen auf die entsprechenden Parameter mit einer größeren Stichprobenzahl zu untersuchen.

Neben der Supplementation mit Selen sind in der Literatur auch andere antioxidative Therapieansätze beschrieben. Dazu gehört z.B. die Supplementation mit anderen Spurenelementen wie Kupfer und Zink. Studien konnten zeigen, dass im Verlauf von herzchirurgischen Eingriffen mit EKZ nicht nur der Selengehalt, sondern auch die Plasmawerte von Kupfer und Zink signifikant verringert werden. Diese sind wie Selen essentiell, um das Redox-Gleichgewicht aufrecht zu halten und vor oxidativem Stress zu schützen [McDonald *et al.*, 2012]. Des Weiteren wurde beschrieben, dass die präoperative Gabe von N-Acetylcystein und Magnesium die Entstehung von oxidativem Stress während Eingriffen mit EKZ signifikant vermindern konnte, was mit weniger postoperativen Komplikationen einherging [Kurian & Paddikkala, 2010].

Obwohl Antioxidantien einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten wie z.B. Sepsis [Alhazzani et al., 2013], Krebs [Steinbrenner et al., 2013], Diabetes mellitus [Goldenstein et al., 2013] oder kardiovaskulären Erkrankungen [Rees et al., 2013] darstellen, ist ihr klinischer Nutzen bisher eher gering. Dafür werden in der Literatur verschiedene Gründe diskutiert. Es stellt sich beispielsweise die Frage, ob der oxidative Stress verantwortlich für die Pathogenese bestimmter Erkrankungen ist oder ob er nur eine Konsequenz dieser ist. Außerdem ist es schwer zu beurteilen, ob eine Intervention mit Antioxidantien die oxidative Schädigung im Patienten in einem therapeutisch nützlichen Ausmaß reduziert hat. Um dies besser beurteilen zu können, müsste man die oxidativen Schäden im Patienten direkt messen und zeigen, dass diese Schäden mit der Erkrankung korrelieren bzw. eine Verhinderung dieser Schäden durch Antioxidantien zu einer klinischen Verbesserung führt. Technische Schwierigkeiten bei der Messung der oxidativen Schäden stellen ein Problem dar. Deshalb ist es essentiell, spezifischere Marker für ROS und oxidativen Stress *in vivo* zu entwickeln.

Ein weiterer Aspekt ist die Tatsache, dass Antioxidantien auch die bereits beschriebenen positiven Eigenschaften der ROS blockieren. Da eine kontrollierte ROS-Produktion wichtig für das Redox-Signaling ist und metabolische Prozesse über die Aktivierung von Signalkaskaden beeinflusst, kann die Verwendung von Antioxidantien schaden, indem solche Signalkaskaden unterbrochen werden.

Damit ein Antioxidanz oxidativen Stress vermindern kann, muss seine Aktivität die lokale antioxidative Abwehr auf ein Niveau erhöhen, das über der basalen, endogenen Aktivität liegt. Die Menge vieler natürlich vorkommender Antioxidantien wie Vitamin C oder E im Organismus wird auf diversen Ebenen mit unterschiedlichen Rückkopplungsmechanismen reguliert, um das normale Niveau aufrecht zu erhalten. Deshalb ist es oft schwierig, die Spiegel endogener Antioxidantien deutlich über das basale Niveau zu steigern. Außerdem wirken Antioxidantien als integriertes Abwehrsystem, das Eigenschaften einzelner Stoffe miteinander kombiniert. Daher kann die Zugabe eines exogenen Antioxidanz zu einer kompensatorischen Herunterregulierung endogener Antioxidantien führen, so dass die antioxidative Abwehr in der Summe nicht gesteigert wird.

Eine ausreichend große Menge Antioxidanz, die für die Minimierung der pathologischen oxidativen Schädigung erforderlich ist, zu ihrem intrazellulären Bestimmungsort zu befördern, stellt ebenfalls ein Problem dar. Antioxidantien verteilen sich in der Regel sehr einheitlich im Organismus und innerhalb von Zellen, wohingegen oxidative Schäden oft in bestimmten Zelltypen oder Zellorganellen wie Mitochondrien lokalisiert sind. Dementsprechend kann es vorkommen, dass der Gesamtgehalt an Antioxidantien in einem Gewebe oder in einer Zelle zwar adäquat ist, die lokale Antioxidantienkonzentration aber trotzdem nicht ausreicht, um die betroffenen Organellen zu schützen.

Zur Verbesserung des therapeutischen Nutzens von Antioxidantien wären spezifische Antioxidantien hilfreich, die in der Lage sind, selektiv schädigende ROS innerhalb bestimmter Organe/Zellen/Zellorganellen zu reduzieren um eine klinische Verbesserung zu erzielen [Murphy, 2013].

4.3 Limitationen der Studie

Trotz der hier beschriebenen positiven Wirkungen von Ebselen auf den I/R-Schaden hat die vorliegende Studie folgende Limitationen:

Zu nennen wäre hier zum einen die Applikationsart des Ebselens. Um sicherzustellen, dass Ebselen sich vor Anschluss der Tiere an die HLM gleichmäßig im Körper verteilt, wurde es intraperitoneal (i.p.) verabreicht. Studien zeigten, dass durch eine i.p.-Applikation sehr schnell eine weitaus höhere Medikamentenkonzentration in den Organen der Bauchhöhle erreicht werden konnte als durch intravenöse Applikation [Shimada et al., 2005]. Außerdem können durch eine i.p.-Applikation hohe Medikamentenkonzentrationen in der Portalvene erreicht werden, über die das Medikament im Körper verteilt wird [Speyer et al., 1981]. Anhand der Ergebnisse der Selenbestimmung ist sichtbar, dass die gleichmäßige Verteilung des Ebselens gelungen ist. Allerdings stellt die i.p.-Applikation von Medikamenten ein Problem für die klinische Anwendung dar. In Studien über intraperitoneale Verabreichung von Medikamenten bei Ovarialtumoren wurden aufgrund der i.p.-Applikation Komplikationen wie großflächige intraabdominale Verwachsungen, lokale Infektionen, Abszessbildung oder Obstruktionen beschrieben [Sakuragi et al., 2000]. Da eine i.p.-Applikation mit Risiken wie z.B. einer Gefäßverletzung nach der für die HLM notwendigen Vollheparinisierung einhergeht, wäre das Risiko einer i.p.-Applikation beim Menschen zu groß. In anderen Studien wurde Ebselen oral verabreicht [Ogawa et al., 1999]. Allerdings wurde es über einen längeren Zeitraum gegeben, um sicherzustellen, dass es sich gleichmäßig im Körper verteilt. Da in der hier vorliegenden Arbeit Ebselen als Therapeutikum für die akute Intervention getestet wurde, kam eine orale Verabreichung über mehrere Tage nicht in Frage.

Die Problematik der Applikationsart ergibt sich aus der schlechten Wasserlöslichkeit des Ebselens. Diese macht die Verwendung eines Lösungsmittels wie DMSO notwendig. Ein großer Teil der Effekte von Ebselen konnte auch in der Lösungsmittelgruppe beobachtet werden. DMSO agiert bekanntermaßen als Radikalfänger. Daher zeigen diese Ergebnisse, dass der Einsatz von Antioxidantien zur Linderung des I/R-Schadens generell einen

vielversprechenden Ansatz darstellt. Da die Effekte des Ebselens aber nur teilweise spezifisch und unabhängig vom DMSO waren, sollten andere organische Selenverbindungen in weiterführenden Studien getestet werden. Diese sollten die positiven Eigenschaften des Ebselens teilen, jedoch eine bessere Wasserlöslichkeit aufweisen, um z.B. eine intravenöse Gabe zu ermöglichen.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist der Zeitpunkt der Probennahme zur Untersuchung der Signalwege. Die untersuchten Organe wurden am Ende des Versuches nach 60 Minuten Reperfusion entnommen. Die Ergebnisse spiegeln folglich nur den Effekt von Ebselen wieder, der unmittelbar am Ende der Reperfusion auftritt. Ob das Ebselen sich auch positiv auf die Regeneration auswirkt und die postoperative Morbidität und Mortalität senken kann, ist in dieser Studie nicht beurteilbar. Von daher sind chronische Versuche mit mehrtägigen Überlebenszeiten der Tiere der nächste Schritt um zu untersuchen, ob Ebselen auch langfristig einen positiven Einfluss auf die Regeneration nach I/R hat.

Nicht zuletzt stellt die Anzahl der Tiere eine Limitation dar. Viele der beschriebenen Ergebnisse zeigten potentielle Veränderungen, welche aufgrund der hohen Standardabweichungen jedoch oft nicht signifikant waren. Dies könnte durch eine größere Stichprobenanzahl positiv beeinflusst werden.

Trotz dieser Einschränkungen zeigen die Ergebnisse die Möglichkeit eines therapeutischen Ansatzes mit Antioxidantien, um den durch kardiochirurgische Eingriffe ausgelösten I/R-Schaden zu reduzieren und die Suche nach alternativen, eventuell potenteren Mitteln zu fördern.

Literaturverzeichnis

Abboud B, Daher R, Boujaoude J. *Acute mesenteric ischemia after cardiopulmonary bypass surgery.* World J Gastroenterol 2008; 14: 5361-70.

Aikawa R, Komuro I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y. *Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats.* J Clin Invest 1997; 100: 1813-1821.

Alhazzani W, Jacobi J, Sindi A, Hartog C, Reinhart K, Kokkoris S, Gerlach H, Andrews P, Drabek T, Manzanares W, Cook DJ, Jaeschke RZ. *The effect of selenium therapy on mortality in patients with sepsis syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials.* Crit Care Med 2013; 41: 1555-64.

Altekin E, Coker C, Sisman AR, Onvural B, Kuralay F, Kiriimli O. *The relationship between trace elements and cardiac markers in acute coronary syndromes.* J Trace Elem Med Biol 2005; 18(3): 235-42.

Angstwurm MW, Engelmann L, Zimmermann T, Lehmann C, Spes CH, Abel P, Strauss R, Meier-Hellmann A, Insel R, Radke J, Schüttler J, Gärtner R. *Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis and septic shock.* Crit Care Med 2007; 35: 118-26.

Arany I, Megyesi JK, Nelkin BD, Safirstein RL. *STAT3 attenuates EGFR-mediated ERK activation and cell survival during oxidant stress in mouse proximal tubular cells.* Kidney Int 2006; 70: 669-74.

Aridon P, Geraci F, Turturici G, D'Amelio M, Savettieri G, Sconzo G. *Protective role of heat shock proteins in Parkinson's disease.* Neurodegener Dis 2011; 8: 155-68.

Armstrong SC. *Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury.* Cardiovasc Res 2004; 61: 427-436.

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

Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H. *Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration.* Biol Chem 1998; 379: 1201-1205.

Baehner T, Boehm O, Probst C, Poetzsch B, Hoeft A, Baumgarten G, Knuefermann P. *Kardiopulmonaler Bypass in der Herzchirurgie.* Anaesthesist 2012; 61: 846-856.

Baldwin RT, Kadipasaoglu KA, Radovancevic B, Gordon LL, Furusho N, Matsuwaka R, Conger JL, Parnis SM, Hare WD, Clubb FJ Jr, et al. *The development of a clinically relevant canine model of postperfusion syndrome.* ASAIO Trans 1991; 37: M484-5.

Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercelotti JM. *Ferritin: a cytoprotective antioxidant stratagem of endothelium.* J Biol Chem 1992; 267: 18148-53.

Beere HM. *The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis.* J Cell Sci 2004; 117: 2641-2651.

Bell JR, Eaton P, Shattock MJ. *Role of p38-mitogen-activated protein kinase in ischaemic preconditioning in rat heart.* Clin Exp Pharmacol Physiol 2008; 35: 126-34.

Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR. *Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocystein insertion at UGA codons.* EMSO J 1993; 12: 3315-3322.

Bhabak KP, Mugesh G. *Synthesis, Characterization, and Antioxidant Activity of Some Ebselen Analogues.* Chem Eur J 2007; 13: 4599-4601.

Boeken U, Feindt P. *Ist das SIRS/Sepsis-Syndrom in der Herzchirurgie Folge der extrakorporalen Zirkulation und damit unvermeidlich?* Z Herz-Thorax-Gefäßschir 2008; 22: 110-118.

Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. *The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure.* Pharmacol Ther 2008; 120: 172-85.

Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, Sargin M, Aydin A, Kuralay E, Ozal E, Demirkilic U, Oz BS, Sayal A, Tatar H. *Do N-acetylcystein, beta-glucan, and coenzyme Q10 mollify myocardial ischemia-reperfusion injury?* Heart Surg Forum 2007; 10: E222-7.

Boodhwani M, Rubens FD, Wozny D, Nathan HJ. *Effects on mild hypothermia and rewarming on renal function after coronary artery bypass grafting.* Ann Thorac Surg 2009; 87: 489-95.

Bozinovski S, Seow HJ, Crack PJ, Anderson GP, Vlahos R. *Glutathione peroxidase-1 primes pro-inflammatory cytokine production after LPS challenge in vivo.* PLoS One 2012; 7: e33172.

Brigelius-Flohé R. *Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases.* Free Radic Biol Med 1999; 27: 951-965.

Brigelius-Flohé R, Maiorino M. *Glutathione peroxidases.* Biochim Biophys Acta 2013; 1830: 3289-303.

Brown KM, Arthur JR. *Selenium, selenoproteins and human health: a review.* Public Health Nutr 2001; 4: 593-9.

Brömme HJ, Loertzer H, Akcetin Z. *Der Postischämische Reperfusionsschaden-Biochemische und methodische Grundlagen.* Urologe [A] 2002; 41:159-163.

Calderwood SK, Mambula SM, Gray PJ Jr, Theriault JR. *Extracellular heat shock proteins in cell signaling.* FEBS Lett 2007; 581: 389-3694.

Carden DL, Granger DN. *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury.* J Pathol. 2000; 19: 255-66.

Chang L, Karin M. *Mammalian MAP kinase signalling cascades.* Nature 2001; 410: 37-40.

Cheng CF, Lian WS, Chen SH, Lai PF, Li HF, Cheng WT, Lin H. *Protective effects of adiponectin against renal ischemia-reperfusion injury via prostacyclin-PPAR α -heme-oxygenase-1 signaling pathway.* J Cell Physiol 2012; 227: 239-49.

Choi YS, Shim JK, Kim JC, Kang KS, Seo YH, Ahn KR, Kwak YL. *Effect of remote ischemic preconditioning on renal dysfunction after complex valvular heart surgery: a randomized controlled trial.* J Thorac Cardiovasc Surg 2011; 142: 148-54.

Christenson JT, Aeberhard JM, Badel P, Pepcak F, Maurice J, Simonet F, Velebit V, Schmuziger M. *Adult respiratory distress syndrome after cardiac surgery.* Cardiovasc Surg. 1996; 4: 15–21.

Clarke C, Sakai N, Tevar AD, Schuster R, Edwards MJ, Lentsch AB. *STAT3 does not regulate acute liver injury after ischemia/reperfusion.* J Surg Res 2011; 171: 814-8.

Clemont G, Vergely C, Jazayeri S, Lahet JJ, Goudeau JJ, Lecour S, David M, Rochette L, Girard C. *Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary bypass.* *Anesthesiology* 2002; 96: 80-7.

Cohen-Armon M. *PARP-1 activation in the ERK signaling pathway.* *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 556-60.

Conrad M. *Transgenic mouse models for the vital selenoenzymes cytosolic thioredoxin reductase, mitochondrial thioredoxin reductase and glutathione peroxidase 4.* *Biochem Biophys Acta* 2009; 1790: 1575-85.

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

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

Darnell JE Jr. *STATs and gene regulation.* *Science* 1997; 277: 1630-1635.

Das DK, Maulik N. *Cardiac genomic response following preconditioning stimulus.* *Cardiovasc Res* 2006; 70: 254-63.

Dawson DA, Masayasu H, Graham DI, Macrae IM. *The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischemia in the rat.* *Neuroscience Letters* 1995; 185: 65-69.

de Jong PR, Schadenberg AW, van den Broek T, Beekman JM, van Wijk F, Coffey PJ, Prakken BJ, Jansen NJ. *STAT3 regulates monocyte TNF-alpha*

production in systemic inflammation caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. PLoS One 2012; 7: e35070.

Dennis C, Spreng DS, JR., Nelson GE, Karlson KE, Nelson RM, Thomas JV, Eder WP, Varco RL. *Development of a pump-oxygenator to replace the heart and lungs; an apparatus applicable to human patients, and application to one case. Ann Surg 1951; 134: 709-21.*

Dhir A. *Antifibrinolytics in cardiac surgery. Ann Card Anaesth 2013; 16: 117-25.*

Duicu OM, Angoulvant D, Muntean DM. *Cardioprotection against myocardial reperfusion injury: successes, failures, and perspectives. Can J Physiol Pharmacol 2013; 91: 657-62.*

Ehyai A, Fenichel GM, Bender HW Jr. *Incidence and prognosis of seizures in infants after cardiac surgery with profound hypothermia and circulatory arrest. JAMA 1984; 252: 3165-7.*

El Golli-Bennour E, Bacha H. *HSP70 expression as biomarkers of oxidative stress: mycotoxins' exploration. Toxicology 2011; 287: 1-7.*

Eltzschig HK, Collard CD. *Vascular ischaemia and reperfusion injury. Br Med Bull 2004; 70: 71-86.*

Farivar AS, Merry HE, Fica-Delgado MJ, McCourtie AS, Mackinnon-Patterson BC, Mulligan MS. *Interleukin-6 regulation of direct lung ischemia reperfusion injury. Ann Thorac Surg 2006; 82: 472-8.*

Fink R, Al-Obaidi M, Grewal S, Winter M, Pepper J. *Monocyte activation markers during cardiopulmonary bypass. Perfusion 2003; 18: 83-6.*

Ganichkin OM, Xu XM, Carlson BA, Mix H, Hatfield DL, Gladyshev VN, Wahl MC. *Structure and catalytic mechanism of eukaryotic selenocysteine synthase. J Biol Chem 2008; 283: 5849-65.*

Gibbon JH, JR. *Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery.* Minn Med 1954; 37: 171-85

Gladilin S, Bidmon HJ, Divanach A, Arteel GE, Witte OW, Zilles K, Sies H. *Ebselen Lowers Plasma Interleukin-6 Levels and Glial Heme Oxygenase-1 Expression after Focal Phototrombic Brain Ischemia.* Arch Biochem Biophys 2000; 380: 237-42.

Goepfert MS, Richter HP, Eulenburg CZ, Gruetzmacher J, Rafflenbeul E, Roehrer K, Sandersleben AV, Diedrichs S, Reichenspurner H, Goetz AE, Reuter DA. *Individually Optimized Hemodynamic Therapy Reduces Complications and Length of Stay in the Intensive Care Unit: A Prospective, Randomized Controlled Trial.* Anaesthesiology 2013; doi:10.1097/ALN.0b013e31829bd770.

Goldenstein H, Levy NS, Lipener YT, Levy AP. Patient selection and vitamin E treatment in diabetes mellitus. Expert Rev Cardiovasc Ther 2013; 11: 319-26.

Gourdin MJ, Bree B, De Kock M. *The impact of ischaemia-reperfusion on the blood vessel.* Eur J Anaesthesiol 2009; 26: 537-47.

Groeneveld AB. *Septic shock and multiple organ failure: treatment with haemofiltration?* Intensive Care Med 1990; 16: 489-90.

Guo F, Monsefi N, Moritz A, Beiras-Fernandez A. *Selenium and Cardiovascular Surgery: An Overview.* Current Drug Safety 2012; 7: 000-000.

Haines DD, Lekli I, Teissier P, Bak I, Tosaki A. *Role of haeme oxygenase-1 in resolution of oxidative stress-related pathologies: focus on cardiovascular, lung, neurological and kidney disorders.* Acta Physiol (Oxf.) 2012; 204: 487-501.

Hamacher J, Stammberger U, Weber E, Lucas R, Wendel A. *Ebselen Improves Ischemia-Reperfusion Injury After Rat Lung Transplantation.* Lung 2009; 187: 98-103.

Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Maruoka S, Takeshita I, Hayashi S, Koura T, Kujime K, Horie T. *p38 Mitogen-activated protein kinase regulates IL-8 expression in human pulmonary vascular endothelial cells.* Eur Respir J 1999; 13: 1357-64.

Heck TG, Schöler CM, de Bittencourt PI. *HSP70 expression: does it a novel fatigue signaling factor from immune system to the brain?* Cell Biochem Funct 2011; 29: 215-26.

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

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

Hill GE, Whitten CW, Landers DF. *The influence of cardiopulmonary bypass on cell-cell communication.* J Cardiothorac Vasc Anesth 1997; 11: 367-75.

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

Hsu HY, Wen MH. *Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 expression.* J Biol Chem 2002; 277: 22131-9.

Ichikawa S, Omura K, Katayama T, Okamura N, Ohtsuka T, Ishibashi S, Masayasu H. *Inhibition of superoxide anion production in guinea pig polymorphonuclear leukocytes by a seleno-organic compound, ebselen.* J. Pharmacobio-Dyn 1987; 10: 595-597.

Imada K, Leonard WJ. *The Jak-STAT pathway.* Mol Immunol 2000; 37: 1-11.

Iniguez K, Berasain C, Martinez-Anso E, Bustos M, Fortes P, Pennica D, Avilla MA, Prieto J. *Cardiotrophin-1 defends the liver against ischemia-reperfusion injury and mediates the protective effect of ischemic preconditioning.* J Exp Med 2006; 203: 2809-2815.

Ip C. *Lessons from Basic Research in Selenium and Cancer Prevention.* J Nutr 1998; 128: 1845-54.

Jansen NJ, van Oeweren W, van Vliet M, Stoutenbeek CP, Eysman L, Wildevuur CR. *The role of different types of corticosteroids on the inflammatory mediators in cardiopulmonary bypass.* Eur J Cardiothorac Surg 1991; 5: 211-17.

Jiménez JJ, Iribarren JL, Brouard M, Hernández D, Palmero S, Jiménez A, Lorente L, Machado P, Borreguero JM, Raya JM, Martín B, Pérez R, Martínez R, Mora ML. *Safety and effectiveness of two treatment regimes with tranexamic acid to minimize inflammatory response in elective cardiopulmonary bypass patients: a randomized double-blind, dose-dependent phase IV clinical trial.* Journal of cardiothoracic surgery 2011; 6: 138.

Jonas RA. *Deep hypothermic circulatory arrest: currents status and indications.* Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu 2002; 5: 76-88.

Jungwirth B, Mackensen GB, Blobner M, Neff F, Reichart B, et al.; *Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: description of a new model.* The Journal of thoracic and cardiovascular surgery 2006; 131: 805–812.

Kaizu T, Ikeda A, Nakao A, Tsung A, Toyokawa H, Ueki S, Geller DA, Murase N. *Protection of transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury with carbon monoxide via MEK/ERK1/2 pathway downregulation.*

Karaca P, Konuralp C, Enc Y, Süzer A, Sokullu O, Ayoglu U, Cicek S. *Cardioprotective effect of aprotinin on myocardial ischemia/reperfusion injury during cardiopulmonary bypass.* Circ J 2009; 70: 1432-6.

Karkouti K, Beattie WS, Wijeyesundera DN, Rao V, Chan C, Dattilo KM, Djaiani G, Ivanov J, Karski J, David TE. *Hemodilution during cardiopulmonary bypass is an independent risk factor for acute renal failure in adult cardiac surgery.* J Thorac Cardiovasc Surg 2005; 129: 391-400.

Keshet Y, Seger R. *The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions.* Methods Mol Biol 2010; 661: 3-38.

Khan TA, Bianchi C, Ruel M, Voisine P, Selke FW. *Mitogen-activated protein kinase pathways and cardiac surgery.* J Thorac Cardiovasc Surg 2004; 127: 806-11.

Kim EJ, Raval AP, Perez-Pinzon MA. *Preconditioning mediated by sublethal oxygen-glucose deprivation-induced cyclooxygenase-2 expression via the signal transducer and activator of transcription 3 phosphorylation.* J Cereb Blood Flow Metab 2008; 28: 1329-1340.

Kim JC, Shim JK, Lee S, Yoo YC, Yang YS, Kwak YL. *Effect of combined remote ischemic preconditioning and postconditioning on pulmonary function in valvular heart surgery.* Chest 2012; 142: 467-75.

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

Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. *Effects of hemolysis on routine biochemistry parameters.* Biochem Med (Zagreb) 2011; 21: 79-85.

Krittaphol W, McDowell A, Thomson CD, Mikov M, Fawcett JP. *Biotransformation of L-selenomethionine and selenite in rat gut contents.* Biol Trace Elem Res 2010; 139: 188-96.

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN. *Characterization of mammalian selenoproteomes.* Science 2003; 300: 1439-43.

Kurdi M, Booz GW. *Can the Protective Actions of JAK-STAT in the Heart be Exploited Therapeutically? Parsing the Regulation of Interleukin-6-Type Cytokine Signaling.* J Cardiovasc Pharmacol 2007; 50: 126-41.

Kurian GA, Paddikkala J. *N-acetylcysteine and magnesium improve biochemical abnormalities associated with myocardial ischaemic reperfusion in South Indian patients undergoing coronary artery bypass grafting: a comparative analysis.* Singapore Med J 2010; 51: 381-8.

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

Kyriakopoulos A, Behne D. *Selenium-containing proteins in mammals and other forms of life.* Rev Physiol Biochem Pharmacol 2002; 145: 1-46.

Lakkisto P, Csonka C, Fodor G, Bencsik P, Voipio-Pulkki LM, Ferdinandy P, Pulkki K. *The heme oxygenase inducer hemin protects against cardiac dysfunction and ventricular fibrillation in ischaemic/reperfused rat hearts: role of connexin 43.* Scand J Clin Lab Invest 2009; 69: 209-218.

Lehmann Ch. *Biochemie und Pathophysiologie von Ischämie und Reperfusion.* Dtsch Med Wochenschr 2009; 134: 409-410.

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

Liu D, Liu S, Huang Y, Liu Y, Zhang Z, Han L. *Effect of selenium on human myocardial glutathione peroxidase gene expression.* Chin Med J 2000; 113: 771-5.

Lopez-Neblina FL, Toledo-Pereyra LH. *Phosphoregulation of Signal Transduction Pathways in Ischemia and Reperfusion.* J Surg Res 2006; 134: 292-299.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Darr AL, Randall RJ. *Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.* Journal of Biological Chemistry 1951; 193: 265-275.

Lou LX, Uemura T, Mani H, Yang C, Li W, Kadry Z, Zhang SS. *Endogenous signal transducer and activator of transcription 3 is required for the protection of hepatocytes against warm ischemia/reperfusion injury.* Liver Transplant 2013.

Lu J, Berndt C, Holmgren A. *Metabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase.* Biochem Biophys Acta 2009; 1790: 1513-9.

McDonald CI, Fung YL, Fraser JF. *Antioxidant trace element reduction in an in vitro cardiopulmonary bypass circuit.* ASAIO J 2012; 58: 217-22.

Maiorino M, Roveri A, Coassin M, Ursini F. *Kinetic mechanism and substrate specificity of glutathione peroxidase activity of ebselen (PZ51).* Biochem Pharmacol 1988; 37: 2267-71.

Manzanares W, Hardy G. *Selenium supplementation in critically ill patients: pharmacological issues and current evidence.* Nutr Hosp 2009; 24: 429-36.

Manzanares W, Biestro A, Torres MH, Galusso F, Facchin G, Hardy G. *High-dose selenium reduces ventilator-associated pneumonia and illness severity in critically ill patients with systemic inflammation.* Intensive Care Med 2011; 37: 1120-7.

Maulik N. *Redox regulation of vascular angiogenesis.* Antioxid Redox Signal 2002; 4: 783-4.

McCormick J, Barry SP, Sivarajah A, Stefanutti G, Townsend PA, Lawrence KM, Eaton S, Knight RA, Thiemermann C, Latchman DS, Stephanou A. *Free radical scavenging inhibits STAT phosphorylation following in vivo ischemia/reperfusion injury.* FASEB J 2006; 20: 2115-7.

Mehdi Y, Hornick JL, Istasse L, Dufrasne I. *Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions.* Molecules 2013; 18: 3292-311.

Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JC Jr. *Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism.* Surgery 1998; 124: 291-6.

Miorelli ST, Rosa SM, Moura DJ, Rocha JC, Lobo LA, Henriques JA, Saffi J. *Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells.* Mutagenesis 2008; 23: 93-99.

Mugesh G, du Mont WW, Sies H. *Chemistry of Biologically Important Synthetic Organoselenium Compounds.* Chem Rev 2001; 101: 2125-2179.

Müller A, Cadenas E, Graf P, Sies H. *A novel biologically active seleno-organic compound-I.* Biochemical Pharmacology 1984; 33: 3235-3239.

Murphy MP. *Antioxidants as therapies: can we improve on nature?* Free Radic Biol Med 2013.

Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. *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: 979-981.

Nikawa T, Schuch G, Wagner G, Sies H. *Interaction of albumin-bound ebselen with rat liver glutathione S-transferase and microsomal proteins.* Biochemistry and molecular biology international 1994; 32: 291-298.

Nollen EA, Morimoto RI. *Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins.* J Cell Sci 2002; 115: 2809-2816.

Oates RK, Simpson JM, Turnbull JA, Cartmill TB. *The relationship between intelligence and duration of circulatory arrest with deep hypothermia.* J Thorac Cardiovasc Surg 1995; 110: 786-92.

Ogawa A, Yoshimoto T, Kikuchi H, Sano K, Saito I, Yamaguchi T, Yasuhara H. *Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial.* Cerebrovasc Dis 1999; 9: 112-118.

Ohta Y, Suzuki KT. *Methylation and demethylation of intermediates selenide and methylselenol in the metabolism of selenium.* Toxicol Appl Pharmacol 2008; 226: 169-77.

Oka Y, Akagi Y, Kinugasa T, Ishibashi N, Iwakuma N, Shiratsuchi I, Shirouzo K. *Heat-shock Pre-treatment Reduces Liver Injury and Aids Liver Recovery After Partial Hepatectomy in Mice.* Anticancer Res 2013; 33: 2887-94.

Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, Tanaka K, Kishimoto T, Kawase I, Azuma J. *STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart.* Cardiovasc Res 2005; 65: 428-35.

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

- Oyaizu T, Fung SY, Shiozaki A, Guan Z, Zhang Q, dos Santos CC, Han B, Mura M, Keshavjee S, Liu M.** *Src tyrosine kinase inhibition prevents pulmonary ischemia-reperfusion-induced acute lung injury.* Intensive Care Med 2012; 38: 894-905.
- Ozbal S, Erbil G, Koçdor H, Tuğyan K, Pekçetin C, Ozoğul C.** *The effects of selenium against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.* Neurosci Lett 2008; 438: 265-9.
- Pan S, Liu L, Pan H, Ma Y, Wang D, Kang K, Wang J, Sun B, Sun X, Jiang H.** *Protective effects of hydroxytyrosol on liver ischemia/reperfusion in mice.* Mol Nutr Food Res 2013; 57: 1218-27.
- Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK.** *From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health.* Antioxid Redox Signal 2007; 9: 775-806.
- Parnham M, Graf E.** *Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions.* Biochem Pharmacol 1987; 36: 3095-102.
- Parnham M, Sies H.** *Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia.* Exp. Opin. Invest. Drugs 2000; 9(3): 607-619.
- Prasad A, Stone GW, Holmes DR, Gersh B.** *Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the "dark side" of reperfusion.* Circulation 2009; 120: 2105–2112.
- Ranucci M, Biagioli B, Scoletta S, Grillone G, Cazzaniga A, Cattabriga I, Isgro G, Giomarelli P.** *Lowest hematocrit on cardiopulmonary bypass impairs the outcome in coronary surgery: An Italian Multicenter Study from the National Cardioanaesthesia Database.* Tex Heart Inst J 2006; 33:300-5.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. *The JAK/STAT signalling pathway.* J Cell Sci 2004; 117: 1281-3.

Rayman MP. *Dietary selenium: time to act.* BMJ 1997; 314: 387-388.

Rees K, Hartley L, Day C, Flowers N, Clarke A, Stranges S. Selenium supplementation for the primary prevention of cardiovascular diseases. Cochrane Database Syst Rev 2013; doi: 10.1002/14651858.CD009671.pub2.

Ren X, Xue Y, Liu J, Zhang J, Luo G, Guo C, Mu Y, Shen J. *A novel cyclodextrin-derived tellurium compound with glutathionperoxidase activity.* Chembiochem 2002; 3: 356-63.

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

Sakuragi N, Nakajima A, Nomura E, Noro N, Yamada H, Yamamoto R, Fujimoto S. *Complications relating to intraperitoneal administration of cisplatin or carboplatin for ovarian carcinoma.* Gynecol Oncol 2000; 79: 420-3.

Sammut IA, Harrison JC. *Cardiac mitochondrial complex activity is enhanced by heat shock proteins.* Clin Exp Pharmacol Physiol 2003; 30: 110-5.

Scarabelli TM, Townsend PA, Chen Scarabelli C, Yuan Z, McCauley RB, Di Rezzo J, Patel D, Putt J, Allebban Z, Abboud J, Chilukuri K, Gardin J, Saravolatz L, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. *Amino acid supplementation differentially modulates STAT1 and STAT3 activation in the myocardium exposed to ischemia/reperfusion injury.* Am J Cardiol 2008; 101: 63E-68E.

Schewe T. *Molecular Actions of Ebselen-an Antiinflammatory Antioxidant.* Gen Pharmac 1995; 26: 1153-1169.

Schmidt MR, Sloth AD, Johnsen J, Bøtker HE. *Remote ischemic conditioning: the cardiologist's perspective.* J Cardiovasc Med (Hagerstown) 2012; 13: 667-74.

Schwarz K, Foltz CM. *Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration.* J Am Chem Soc 1957; 79: 3292-3293.

Shao LE, Tanaka T, Gribi R, Yu J. *Thioredoxin-related regulation of NO/NOS activities.* Ann N Y Acad Sci 2002; 962: 140-50.

Sheehan TM, Gao M. *Simplified fluorometric assay of total selenium in plasma and urine.* Clin Chem 1990; 36(12): 2124-6.

Shimada T, Nomura M, Yokogawa K, Endo Y, Sasaki T, Miyamoto K, Yonemura Y. *Pharmacokinetic advantage of intraperitoneal injection of docetaxel in the treatment for peritoneal dissemination of cancer in mice.* J Pharm Pharmacol 2005; 57: 177-81.

Si Y, Bao H, Han L, Shi H, Zhang Y, Xu L, Liu C, Wang J, Yang X, Vohra A, Ma D. *Dexmedetomidine protects against renal ischemia and reperfusion injury by inhibiting the JAK/STAT signaling activation.* J Transl Med 2013; 11: 141.

Sies H. *Ebselen: A Glutathione Peroxidase Mimic.* Meth. Enzymol. 1994; 234: 476-482

Sies H. *Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic.* Free Radical Biol Med 1993; 14: 313-23.

Silva MA, Murphy N, Richards DA, Wigmore SJ, Bramhall SR, Buckels JA, Adams DA, Mirza DF. *Interstitial lactic acidosis in the graft during organ harvest, cold storage, and reperfusion of human liver allografts predicts subsequent ischemia reperfusion injury.* Transplantation 2006; 82: 227-33.

Smith RM, Suleman N, Lacerda L, Opie LH, Akira S, Chien KR, Sack MN. *Genetic depletion of cardiac myocyte STAT3 abolishes classical preconditioning.* Cardiovasc Res 2004; 63: 611-6.

Sohn N, Marcoux J, Mycyk T, Krahn J, Meng Q. *The impact of different biocompatible coated cardiopulmonary bypass circuits on inflammatory response and oxidative stress.* Perfusion 2009; 24: 231-7.

Soond SM, Latchman D, Stephanou A. *STAT signaling in the heart and cardioprotection.* Expert Rev Mol Med 2006; 8: 1-16.

Speyer JL, Sugarbaker PH, Collins JM, Dedrick RL, Klecker RW Jr, Myers CE. *Portal levels and hepatic clearance of 5-fluorouracil after intraperitoneal administration in humans.* Cancer Res 1981; 41: 1916-22.

Steinbrenner H. *Selenoprotein P: Untersuchungen zur Regulation der Sekretion und zur Schutzfunktion gegen oxidativen Stress.* Habilitationsschrift 2007; S. 1.

Steinbrenner H, Speckmann B, Sies H. *Toward Understanding Success and Failures in the Use of Selenium for Cancer Prevention.* Antioxid Redox Signal 2013.

Stephanou A. *Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury.* J Cell Mol Med 2004; 8: 519-25.

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

Stone R. *Diseases. A medical mystery in middle China.* Science 2009; 324: 1378-1381.

Stoppe C, Schälte G, Rossaint R, Cobum M, Graf B, Spillner J, Marx G, Rex S. *The intraoperative decrease of selenium is associated with the postoperative development of multiorgan dysfunction in cardiac surgical patients.* Crit Care Med, 2011; 39: 1879-85.

Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, Hayashi T, Nakamura H, Yodoi J, Nagasawa S, Takahashi K. *A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P.* J Biol Chem 2002; 277: 41254-41258.

Takeda K, Clausen BE, Kaisho T, Tsujimura T, Tereda N, Förster I, Akira S. *Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils.* Immunity 1999; 10: 39-49.

Tan J, Liu D, Lv X, Wang L, Zhao C, Che Y, Xie Q, Cui X. *MAPK mediates inflammatory response and cell death in rat pulmonary microvascular endothelial cells in an ischemia-reperfusion model of lung transplantation.* J Heart Lung Transplant 2013; 32: 823-31.

Tanaka T, Kishimoto T. *Regulating interleukin-6: all the way to treat autoimmune and inflammatory diseases.* Int J Biol Sci 2012; 8: 1227-36.

Taufic M, Lewis FJ. *Production and repair of experimental interventricular septum defects under direct vision with the aid of hypothermia.* Surg Forum 1953; 4: 67-72.

Taylor KM. *Brain damage during cardiopulmonary bypass.* Ann Thorac Surg 1998; 65: S20-6.

Toledo-Pereyra LH, Lopez-Neblina F, Toledo AH. *Protein Kinases in Organ Ischemia and Reperfusion.* J Invest Surg 2008; 21: 215-226.

Tujebajeva RM, Copeland PR, Xu XM, Carlson BA, Harney JW, Driscoll DM, Hatfield DL, Berry MJ. *Decoding apparatus for eukaryotic selenocystein insertion.* EMBO Rep 2000; 1: 158-63.

Tuuminen R, Nykänen AI, Saharinen P, Gautam P, Keränen MA, Arnaudova R, Rouvinen E, Helin H, Tammi R, Rilla K, Krebs R, Lemström KB. *Donor Simvastatin Treatment Prevents Ischemia-Reperfusion and Acute Kidney Injury by Preserving Microvascular Barrier Function.* Am J Transplant 2013;

Venardos K, Harrison G, Headrick J, Perkins A. *Effects of dietary selenium on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activity and recovery from cardiac ischemia-reperfusion.* J Trace Elem Med Biol, 2004; 18: 81-8.

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

Vesey DA, Cheung C, Pat B, Endre Z, Gobé G, Johnson DW. *Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury.* Nephrol Dial Transplant 2004; 19: 348-55.

Vogt S, Portig I, Iqrsusi M, Ruppert V, Weber P, Ramzan R. *Heat shock protein expression and change of cytochrome c oxidase activity: presence of two phylogenetic old systems to protect tissue in ischemia and reperfusion.* J Bioenerg Biomembr 2011; 43: 425-435.

Wagner G, Schuch G, Akerboom TP, Sies H. *Transport of ebselen in plasma and its transfer to binding sites in the hepatocyte.* Biochem Pharmacol 1994; 48: 1137-44.

Walter de Gruyter. Pschyrembel klinisches Wörterbuch. 2002; 259: 814.

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

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

Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C, Rogers PL, Jawad N, Vincent C, Darzi AW, Athanasiou T. *The inflammatory response to cardiopulmonary bypass: part 1-mechanisms of pathogenesis.* J Cardiothorac Vasc Anesth 2009; 23: 223-31.

Wei Q, Yin Y, Xi M, Zhou D, Zhu Y, Guan Y, Guo C, Wang Y, Duan J, Wen A. *Antioxidant properties of magnesium lithospermate B contribute to the cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro.* J Tradit Chin Med 2013; 33: 85-91.

Wendel A, Kuesters S, Tiegs G. *Ebselen-an in vivo immune response modifier.* Biomed Environ Sci 1997; 10: 253-9.

Whanger PD. *Selenocompounds in plants and animals and their biological significance.* J Am Coll Nutr 2002; 21: 223-32.

Wheeler DS, Wong HR. *Heat shock response and acute lung injury.* Free Radic Biol Med 2007, 42: 1-14.

Xia L, Nordman T, Olsson JM, Damdimopoulos A, Bjorkhem-Bergman L, Eriksson LC, Arner ES, Spyrou G, Bjornstedt M. *The mammalian cytosolic selenoenzyme thioredoxin reductase reduces ubiquinone. A novel mechanism for defense against oxidative stress.*

Xu X, Chua CC, Zhang M, Geng D, Liu CF, Hamdy RC, Chua BH. *The role of PARP activation in glutamate-induced necroptosis in HT-22 cells.* Brain Res 2010; 1343: 206-12.

Yamagat K, Ichinose S, Miyashita A, Tagami M. *Protective effects of ebselen, a seleno-organic antioxidant on neurodegeneration induced by hypoxia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rat.* Neuroscience 2008; 153: 428-35.

Yamamoto S, Yamane M, Yoshida O, Okazaki M, Waki N, Toyooka S, Oto T, Miyoshi S. *Activations of mitogen-activated protein kinases and regulation of their downstream molecules after rat lung transplantation from donors after cardiac death.* Transplant Proc 2011; 43: 3628-33.

Yang GQ, Wang SZ, Zhou RH, Sun SZ. *Endemic selenium intoxication intoxication of humans in china.* Am J Clin Nutr 1983; 37: 872-81.

Yang J, Wang T, Wu C, Liu C. *Selenium level surveillance for the year 2007 of Kesahn disease in endemic areas and analysis on surveillance results between 2003 and 2007.* Biol Trace Elem Res 2010; 138: 53-59.

Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. *Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction.* World J Surg 2002; 26: 115-21.

Young JC, Barral JM, Hartl FU. *More than folding: localized functions of cytosolic chaperones.* Trends Biochem Csi 2003; 28: 541-547.

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

Zhang M, Chen L. *Status of cytokines in ischemia reperfusion induced heart injury.* Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets 2008; 8: 161-72.

Zhang Q, Chen L, Guo K, Zheng L, Liu B, Yu W, Guo C, Liu Z, Chen Y, Tang Z. *Effects of different selenium levels on gene expression of a subset of selenoproteins and antioxidative capacity in mice.* Biol Trace Elem Res 2013; 154: 255-61.

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

Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Abb. 1	Schematischer Überblick der inflammatorischen Antwort nach EKZ	6
Abb. 2	Therapieansätze zur Beeinflussung der systemischen Inflammation	7
Abb. 3	MAPK-Signalwege	9
Abb. 4	JAK/STAT-Signalweg	12
Abb. 5	HO-1 Stoffwechsel	15
Abb. 6	Selenverbindungen und ihre Stoffwechselwege	17
Abb. 7	Reaktionsschema der GPx und der Regeneration des oxidierten Glutathions	20
Abb. 8	Reaktionsschema des Thioredoxinsystems	21
Abb. 9	Strukturformel Ebselen	24
Abb. 10	Anti-inflammatorische und anti-oxidative Wirkungen von Ebselen	25
Abb. 11	Schematische Darstellung des Herz-Lungen-Maschinen-Kreislaufs	35
Abb. 12	Schematische Darstellung des experimentellen Zeit- und Temperaturverlaufs	35
Abb. 13	Schema zur Einteilung der Tiere in die jeweiligen Versuchsgruppen	44
Abb. 14	Bildung von Piazselenol aus Se IV und DAN	46
Abb. 15	Reaktionsgleichung des GPx-Assays	47
Abb. 16	Zeitabhängiger Verlauf des Selengehalts in der Leber	49
Abb. 17	Einfluss der EKZ auf ausgewählte klinisch-chemische Blutparameter	51
Abb. 18	IL-6 Serumspiegel von nicht behandelten Tieren und Kontrolltieren	52
Abb. 19	TNF- α Serumspiegel von nicht behandelten Tieren und Kontrolltieren	53
Abb. 20	Verlauf der Leukozytenzahlen zu den Zeitpunkten T1-T5	55

Abb. 21	Western Blots aus Herz-, Lungen-, Leber- und Nierenlysaten	57
Abb. 22	Selengehalt in Herz, Lunge, Leber und Niere	60
Abb. 23	GPx-Aktivität von Herz, Lunge, Leber und Niere	61
Abb. 24	Katecholaminbedarf zu verschiedenen Zeitpunkten der EKZ	64
Abb. 25	Volumenbedarf während der EKZ	65
Abb. 26	Verlauf des Hämatokrits und Hämoglobingehalts während der EKZ	66
Abb. 27	Verlauf der Leukozytenzahl der Kontroll-, DMSO- und Ebselengruppe zu den Zeitpunkten T1-T5 im Vergleich	68
Abb. 28	IL-6 Serumspiegel der Kontroll-, DMSO- und Ebselentiere zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5	70
Abb. 29	TNF- α Serumspiegel der Kontroll-, DMSO- und Ebselentiere zu den Zeitpunkten T1, T2 und T5	71
Abb. 30	Einfluss von Ebselen auf den Verlauf ausgewählter klinisch-chemischer Blutparameter zu definierten Zeitpunkten der EKZ	73
Abb. 31	Western Blots aus Herzslysaten	76
Abb. 32	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Herzslysaten	76
Abb. 33	Western Blots aus Lungenlysaten	77
Abb. 34	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Lungenlysaten	78
Abb. 35	Western Blots aus Leberlysaten	79
Abb. 36	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Leberlysaten	79
Abb. 37	Western Blots aus Nierenlysaten	80
Abb. 38	Densitometrische Auswertung der Western Blots aus Nierenlysaten	81

Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
Tab. 1	Puffer und Lösungen	30
Tab. 2	Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	30
Tab. 3	Kits und Hilfsmaterialien	30
Tab. 4	Primärantikörper	30
Tab. 5	Sekundärantikörper	31
Tab. 6	Verbrauchsmaterialien	31
Tab. 7	Arzneimittel	31
Tab. 8	Geräte	31
Tab. 9	Zeitpunkte der Blutabnahmen	34
Tab. 10	Dokumentierte Parameter	34
Tab. 11	Schema für die Kühlung und Regulation der Blutflussrate während der EKZ bei einer 500g schweren Ratte	36
Tab. 12	Schema für die Wiedererwärmung und Regulation der Blutflussrate während der EKZ bei einer 500g schweren Ratte	37
Tab. 13	Klinisch-chemische Blutparameter der Kontrollgruppe zu definierten Zeitpunkten der EKZ	51
Tab. 14	IL-6 Serumspiegel zu definierten Zeitpunkten der EKZ	53
Tab. 15	TNF- α Serumspiegel zu definierten Zeitpunkten der EKZ	54
Tab. 16	Leukozytenzahlen zu definierten Zeitpunkten der EKZ	55
Tab. 17	I/R-induzierte Veränderungen in Proteinexpression und Phosphorylierung in verschiedenen Organen	56
Tab. 18	Übersicht der bestimmten Parameter zu definierten Zeitpunkten der EKZ	62
Tab. 19	Schema der Punkteverteilung zur Berechnung des Katecholaminbedarfs	63
Tab. 20	Katecholaminbedarf während der EKZ	64
Tab. 21	Volumenbedarf während der EKZ	66
Tab. 22	Hämoglobingehalt und Hämatokrit zu definierten Zeitpunkten der EKZ	67

Tab. 23	Verlauf der Leukozytenzahl zu definierten Zeitpunkten der EKZ	68
Tab. 24	IL-6 Serumspiegel der Kontroll-, DMSO- und Ebselen- gruppe zu definierten Zeitpunkten der EKZ	69
Tab. 25	TNF- α Serumspiegel der Kontroll-, DMSO- und Ebselen- gruppe zu definierten Zeitpunkten der EKZ	71
Tab. 26	Klinisch-chemische Blutparameter zu definierten Zeit- punkten der EKZ	74
Tab. 27	I/R-induzierte Veränderungen in Proteinexpression und Phosphorylierung in verschiedenen Organen unter der Therapie mit Ebselen	75
Tab. 28	Vergleich der hier beschriebenen und diskutierten Ergebnisse mit Literaturdaten.	83

Danksagung

An dieser Stelle spreche ich allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aus.

Prof. Dr. med. Udo Boeken danke ich für die Übernahme meiner Doktorarbeit, für seine Unterstützung und konstruktiven Ratschläge sowie für seinen Rückhalt und sein immer offenes Ohr. Prof. Dr. med. Artur Lichtenberg danke ich für die Möglichkeit in seiner Klinik zu promovieren.

Herrn Prof. Dr. med. vet. Matthias Schneider danke ich für das Interesse an meiner Doktorarbeit sowie deren Betreuung und Begutachtung.

Ebenso danke ich Frau Dr. Esra Bilgic für die Betreuung zu Beginn meiner Arbeit, für ihre Unterstützung und für die Hilfe bei allen organisatorischen Fragen.

Bei Herrn PD Dr. Holger Steinbrenner bedanke ich mich für die große Unterstützung und Motivation, die stets professionelle Beratung und Kritik und für die Möglichkeit, in seinem Labor die Versuche durchführen und mit seiner Hilfe die Ergebnisse auswerten zu dürfen.

Weiterhin spreche ich allen Personen meinen Dank aus, die am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität an der Entstehung meiner Doktorarbeit mitgewirkt haben. Ganz besonders danke ich Lena Wollschläger, Andrea Borchardt, Diane Schmiegelt, Antonio Pinto und Thomas Becher für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und die stets gute und nette Zusammenarbeit im Labor. Außerdem danke ich Herrn Prof. Helmut Sies für seine fachliche Unterstützung und die Diskussionen zum Thema Ebselen. Prof. Wilhelm Stahl danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Vor allem aber bedanke ich mich von ganzem Herzen bei meiner Familie und meinem Freund Sebastian, die die gesamte Zeit meines Studiums und dieser Dissertation für mich da waren.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Melanie Engels

Neuss, 23. Mai 2014