

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, herzchirurgische Intensivmedizin
und Thoraxchirurgie der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Thorsten Wahlers

Untersuchungen zum Einfluss von DNase I auf die Gefäßfunktion und Inflammation in einem Ratten- EKZ-Modell mit tiefer Hypothermie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Vasilena Chobanova
aus Varna, Bulgarien

promoviert am 21. März 2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachterin: Professorin Dr. rer. nat. A.-N. Paunel-Görgülü

2. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. K. A. Höpke

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.¹

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Priv.-Doz. Dr. Adnana Paunel-Görgülü

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Operationen an den Versuchstieren wurden gemeinsam durch Frau Priv.-Doz. Carolin Weber und Mitarbeiter der Klinik für Herzchirurgie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ohne meine Mitarbeit durchgeführt. Die Gefäßfunktionsmessungen sowie die laborchemischen Plasmauntersuchungen wurden von mir nach entsprechender Anleitung durch Priv.-Doz. Dr. Adnana Paunel-Görgülü selbstständig in Räumlichkeiten jeweils der Experimentellen Medizin sowie des Labors für kardiale Zelltherapie der Universitätsklinik Köln durchgeführt. Technische Unterstützung dabei sowie bei der Vorbereitung der für die Gefäßfunktionsmessungen verwendeten Substanzen habe ich von den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Sabine Schmitt und Frau Natalia Mierau, Dipl.-Biol., Mitarbeiter des Labors für kardiale Zelltherapie der Universitätsklinik Köln, bekommen.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 24.08.2022

Unterschrift:*V.Chobanova*.....

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich im Laufe des Medizinstudiums unterstützt haben. Diese Doktorarbeit ist für mich der Endmeilenstein des Studiums und ich bin sehr froh, diesen Weg gegangen zu sein.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Doktormutter Priv.-Doz. Dr. Adnana Paunel-Görgülü. Liebe Adnana, du bist ein hervorragender Mentor! Dein Antrieb sowie die Geschwindigkeit, mit welcher du Probleme löst, Projekte vollziehst und Fragen beantwortest sind unvergleichbar und dienen einem als starke Motivation. Ich danke dir vielmals für die großartige Unterstützung, die du mir im Laufe der Zeit geleistet hast, ich habe von dir viel gelernt und durch die Arbeit mit dir großen Spaß an der experimentellen Forschung gehabt!

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Labors für kardiale Zelltherapie Natalia Mierau und Sabine Schmitt bedanken, die mir mit ihrer praktischen Hilfe bei diesem Projekt geholfen haben. Zusätzlich danke ich Priv.-Doz. Carolin Weber, welche mit großer Vorsicht und Motivation den chirurgischen Teil dieses Projektes durchführt hat.

Ich danke meiner Familie sowie meinem engsten Freundeskreis dafür, dass sie ununterbrochen an meiner Seite gestanden haben und das weiterhin nun zu Beginn meiner Arbeitszeit tun. Ohne euch hätte Vieles nicht funktioniert und ich bin sehr froh, euch in meinem Leben zu haben.

An meine Familie

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. ZUSAMMENFASSUNG	8
2. EINLEITUNG	11
2.1. Grundlagen der extrakorporalen Zirkulation	11
2.2. Die inflammatorische Reaktion infolge der EKZ	12
2.2.1. Ursachen und Folgen der Inflammation	12
2.2.2. Komponente der inflammatorischen Reaktion	13
2.2.3. Produktion und Bedeutung von Neutrophil Extracellular Traps im Rahmen von EKZ-Eingriffen	14
2.2.4. Bedeutung des Gefäßendothels im Kontext der inflammatorischen Kaskade bei EKZ-Eingriffen	16
2.2.4.1. Aufbau der Gefäßwand und Funktion des Endothels	16
2.2.4.2. Endothelabhängige Vasorelaxation	17
2.2.4.3. Physiologie der Vasokonstriktion	18
2.2.4.4. Aktivierung und Schädigung des Gefäßendothels durch die EKZ	18
2.3. Das Enzym Desoxyribonuclease I als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt gegen die EKZ-induzierte Inflammation	19
2.4. Tiermodelle zur Untersuchung von EKZ-Wirkungen auf den Organismus	20
2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1. Material	22
3.1.1. Chemikalien für die Endothelfunktionsmessung	22
3.1.2. Materialien für die Plasmauntersuchungen	23
3.1.3. Geräte	24
3.2. Methoden	24
3.2.1. Studiengenehmigung	24
3.2.2. Tiere und Gruppeneinteilung	24
3.2.3. Ablauf des chirurgischen Teils mit EKZ	25

3.2.4.	Vorbereitung der Aorten auf die Gefäßfunktionsuntersuchung	26
3.2.5.	Endothelfunktionsmessung	27
3.2.5.1.	Aufbau der Anlage	27
3.2.5.2.	Ablauf der Gefäßfunktionsmessung	29
3.2.6.	Plasmauntersuchungen	31
3.2.6.1.	Quantifizierung der zellfreien DNA (cfDNA)	31
3.2.6.2.	Bestimmung der DNase – Aktivität	31
3.2.6.3.	Quantifizierung von sICAM-1 und Zytokine im Plasma	32
3.2.7.	Datenauswertung	32
4.	ERGEBNISSE	34
4.1.	Einfluss von DNase I auf die Gefäßfunktion	34
4.2.	Auswirkung von DNase I auf die DNase - Aktivität und auf die cfDNA-Konzentration	37
4.3.	Einfluss von DNase I auf die Entzündungsreaktion	40
5.	DISKUSSION	43
6.	LITERATURVERZEICHNIS	49
7.	ANHANG	56
7.1.	Abbildungsverzeichnis	56
7.2.	Tabellenverzeichnis	57
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	58

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ATP-ase	Adenosintriphosphatase
CBP	Cardiopulmonary bypass (Herz-Lungen-Bypass)
cfDNA	Cell free DNA (Zellfreie DNA)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DHCA	Deep Hypothermic Circulatory Arrest (Tiefer Hypothermischer Kreislaufstillstand)
DNase	Desoxyribonuclease
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
GC	Guanylatcyclase
HLM	Herz-Lungen-Maschine
i.v.	intravenös
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1 (Intazelluläres Adhäsionsmolekül 1)
IFN	Interferon γ
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KCl	Kaliumchlorid
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
L-NNA	L-NG-Nitroarginine/NG-nitro-L-Arginine
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NO	Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PMNs	Polymorphonukleäre Zellen
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive Sauerstoffspezies)
sICAM-1	Soluble Intercellular Adhesion Molecule 1 (Lösliches Intazelluläres Adhäsionsmolekül 1)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SNAP	S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamine
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
tPA	Tissue plasminogen activator (Gewebsspezifischer Plasminogenaktivator)
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

1. Zusammenfassung

Die Verwendung einer extrakorporalen Zirkulation (EKZ) im Rahmen von herzchirurgischen Operationen ermöglicht eine Mehrzahl dieser Eingriffe. Die Herz-Lungen-Maschine (HLM) stellt eine dafür etablierte Methode dar. Trotzdem ist die EKZ eine große Herausforderung für den menschlichen Körper. Das chirurgische Trauma, die Aktivierung des Gerinnungssystems, der Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) sowie die Endotoxinämie führen zu einer massiven systemischen inflammatorischen Immunabwehrreaktion (*Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS*), was häufig Organ- und Gewebsschaden, insbesondere auch Endothelschaden verursacht und hohe postoperative Morbidität- und Mortalitätsrate zu Folge hat.

Im Rahmen des SIRS nach EKZ kommt es zu einem Konzentrationsanstieg von zellfreier DNA (cfDNA), einschließlich Neutrophil Extracellular Traps (NETs) sowie von proinflammatorischen Zytokinen. Die NETs bestehen aus einem Chromatingerüst und haben die primäre Aufgabe Pathogene im Blut einzufangen und zu eliminieren. Eine Überproduktion von NETs führt durch NETs-assoziierte Bestandteile wie Histone und Myeloperoxidase zu Gewebsschaden, insbesondere auch zu Endothelschaden. Das körpereigene Enzym Desoxyribonuclease I (*DNase I*) degradiert cfDNA/NETs. *DNase I* zeigte in mehreren Studien eine Reduktion des I/R-Schadens sowie der Inflammation.

In dieser Doktorarbeit wurde die Auswirkung von exogener *DNase I* auf die Plasmakonzentration von cfDNA/NETs, auf die inflammatorische Reaktion sowie auf den Endothelschaden im Rahmen der EKZ anhand eines Ratten-EKZ-Modells mit Deep Hypothermic Cardiac Arrest (DHCA) untersucht.

Die Versuchstiere wurden an eine EKZ für Kleintiere angeschlossen, in drei Gruppen unterteilt und erhielten jeweils eine, zwei oder keine intravenöse *DNase I* Gabe. Durch tiefe Hypothermie wurde ein Herzstillstand verursacht, es erfolgte nach bestimmter Ischämiezeit und Wiedererwärmung eine Reperfusion der Tiere. Am Ende des Versuches wurden die Aorten der Tiere entnommen und die Vasoreaktivität *ex vivo* untersucht.

Die Verabreichung von *DNase I* führte zu einer signifikanten Reduktion der Plasmakonzentration der cfDNA/NETs, des proinflammatorischen Zytokins IL-6 sowie des Endothelschadenmarkers lösliches intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (sICAM-1). Zusätzlich konnte bei den mit *DNase I* behandelten Aorten eine signifikant verbesserte Vasoreaktivität gemessen werden. Dabei zeigte sich eine positive Korrelation zwischen den cfDNA/NETs-Mengen im Plasma und der Vasorelaxation. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass cfDNA/NETs, welche im Rahmen der pathophysiologischen Entzündungskaskade bei EKZ-Eingriffen vermehrt freigesetzt werden, zu einer Hochregulation der Zytokinproduktion führen und eine Endothelschädigung und somit verschlechterte Gefäßreaktion verursachen.

Die i.v. Gabe von *DNase I* verbessert signifikant die Gefäßfunktion, mindert die Entzündung und stellt somit eine mögliche Therapieoption bei Eingriffen mit EKZ dar.

The cardiopulmonary bypass (CPB) has played an important role over the centuries in the history of cardiac surgery, making a big part of the surgical procedures today possible. The life-support-machine is one of the most established methods as an example for CPB. However, the surgical trauma, the activation of the coagulation system, the ischaemia/reperfusion (I/R) injury as well as the endotoxemia during CPB lead to a massive activation of the body defence mechanisms, resulting in a systemic inflammatory response syndrome (SIRS). SIRS is related to many complications including organ and tissue damage, especially endothelial damage, ongoing with increased postoperative morbidity and mortality.

During CPB the concentrations of cell-free DNA, including Neutrophil Extracellular Traps (cfDNA/NETs) as well as of inflammatory cytokines in plasma strongly increase. The main defence task of NETs is to capture pathogens in their chromatin backbone and to eliminate them. However, there is a growing body of evidence, that an uncontrolled overproduction of NETs is associated with organ and tissue damage and especially endothelial damage via NETs components like histones and myeloperoxidase. The endogenous enzyme *DNase I* can degrade cfDNA/NETs. Many experimental studies showed that *DNase I* also reduces the I/R injury as well as the inflammatory response.

The focus of this work was to study the effect of exogenously applied *DNase I* on the cfDNA/NETs plasma concentration as well as on inflammation and the endothelial damage during CPB, based on a rat CPB model with Deep Hypothermic Cardiac Arrest (DHCA).

Animals were divided into three groups and received one, two or none i.v. *DNase I* doses during a CPB procedure. They were connected to a custom-made life-support-machine for small animals. Then, cardiac arrest was induced through deep hypothermia. After a predefined time, during which the bodies were exposed to ischaemia, the animals were rewarmed, followed by reperfusion. Finally, animals were euthanized, the aortas were removed and their vasoreactivity was studied *ex vivo*.

DNase I significantly reduced the levels of cfDNA/NETs, of the proinflammatory cytokine IL-6 and the endothelial damage marker soluble intracellular adhesion molecule 1 (sICAM-1). Additionally, the aortas from animals, which received *DNase I*, showed a significantly improved endothelial-dependent vasoreactivity. Positive correlation between cfDNA/NETs levels and vasoreactivity was also observed. In summary, cfDNA/NETs, which are released during CPB as part of the inflammatory cascade, induce increased production of proinflammatory cytokines, endothelial damage and impairment of vascular function.

Application of *DNase I* during CPB significantly improves vasoreactivity and limits inflammation, thus representing a potential therapeutic option for surgical interventions with CPB.

2. Einleitung

2.1. Grundlagen der extrakorporalen Zirkulation

Eine Vielzahl von herzchirurgischen Eingriffen verlangt das Operieren am nicht schlagenden Herzen. Einige Beispiele dafür sind Herzklappenrekonstruktionen, koronar-venöse Bypass-Operationen, Korrektur von angeborenen Herzfehlern sowie Herztransplantationen. Diese Eingriffe werden durch eine extrakorporale Zirkulation (EKZ) ermöglicht. Dabei werden das Herz und die Lunge vom Körperkreislauf ausgeschaltet und ihre Funktion wird für eine gewisse Zeit von der Herz-Lungen-Maschine (HLM) übernommen¹.

Die HLM wurde im 20. Jahrhundert entwickelt und durchlief bis heute mehrere Modifikationen und Verbesserungen². Deutschlandweit machen die Eingriffe mit EKZ einen Großteil aller herzchirurgischen Eingriffe aus: 2019 wurden über 70 000 Eingriffe mit EKZ durchgeführt bei einer Anzahl von knapp 100 000 kardiochirurgischen Eingriffen für das gesamte Jahr³.

Um den Patientenkreislauf durch die EKZ zu ersetzen, wird durch Kanülieren meistens der rechte Vorhof an die HLM angeschlossen. Das Blut wird drainiert, mithilfe eines Pumpensystems transportiert, mit Sauerstoff angereichert, decarboxyliert und über einen Anschluss an die Aorta ascendens wieder dem Körper zugeführt⁴.

Weitere wichtige Bestandteile der HLM sind die Filter zum Aussortieren von kleinen Fett-, Luft- und Stoffpartikeln, die vom Operationsgebiet stammen, sowie der Wärmeaustauscher, durch welchen eine kontrollierte Hypothermie induziert werden kann¹. Ziel dessen ist eine Organprotektion. Durch Senken der Körperkerntemperatur werden der Sauerstoffverbrauch und die Stoffwechselaktivität reduziert, wodurch die Ischämietoleranzgrenze des Organismus erhöht wird⁵. Ein zusätzlicher myokardialer Ischämieschutz und ein Kreislaufstillstand werden durch die kardioplegische Lösung pharmakologisch induziert⁶.

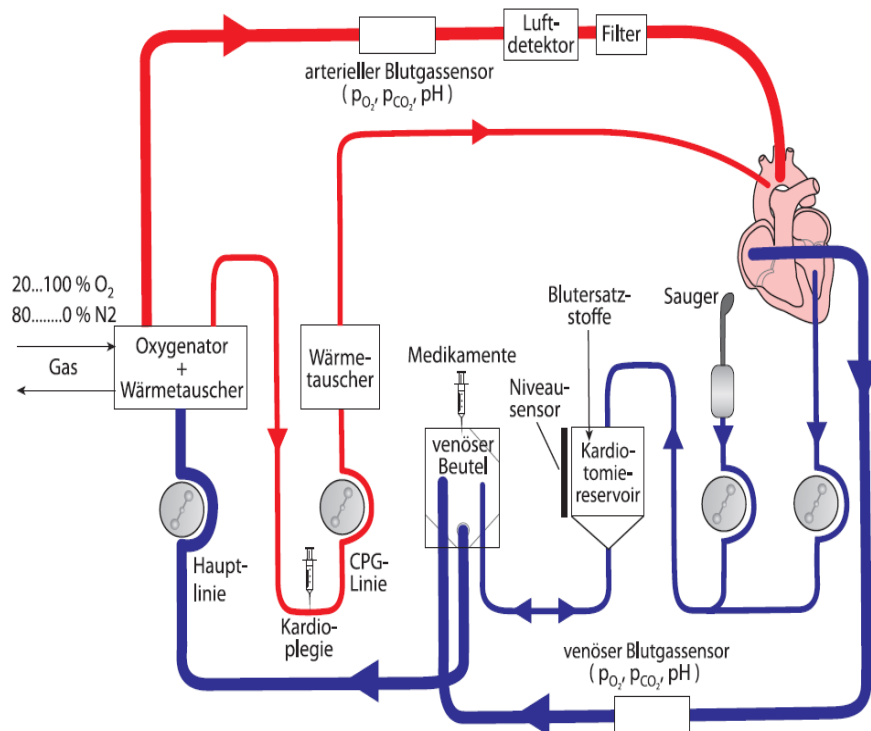


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der extrakorporalen Zirkulation¹

2.2. Die inflammatorische Reaktion infolge der EKZ

2.2.1. Ursachen und Folgen der Inflammation

Die kardialen Operationen mit EKZ sind ein unnatürlicher Prozess für den menschlichen Körper und verursachen eine inflammatorische Reaktion⁷. Die Trigger dieser Reaktion sind das chirurgische Trauma⁸, der Ischämie/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden)⁹, die Endotoxinämie¹⁰ sowie die Aktivierung des Gerinnungssystems durch den Kontakt des Blutes mit Fremdoberfläche im Rahmen der EKZ¹¹.

Letztendlich werden die homöostatischen Regulationsmechanismen des Körpers durcheinandergebracht, was ein *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)* zur Folge hat¹¹. Dieser wird bei einer Vielzahl von Patienten beobachtet, wobei sich die genauen Zahlen in der Literatur maßgeblich unterscheiden: Squicciarro *et al.* zeigten zum Beispiel eine SIRS-Prävalenz von 28% in den ersten 24 Stunden nach dem EKZ-Eingriff¹², während in einer anderen Studie an der Charité Universitätskrankenhaus Berlin 77% der Patienten ein SIRS am ersten postoperativen Tag nach EKZ entwickelten¹³.

Eine balancierte, selbstlimitierende Immunantwort nach EKZ hat das Ziel, den Organismus bei dem Überwinden der postoperativen Phase zu unterstützen. Dabei wird das Immunsystem vorbereitet perioperative Infektionen zu bekämpfen und die Wundheilung wird stimuliert. Auf der anderen Seite kann eine unkontrollierte Immunantwort nach EKZ im Sinne eines SIRS

eine Multiorgandysfunktion verursachen. Diese kann sich mit pulmologischen, kardiovaskulären, neurologischen, renalen oder hämatologischen Komplikationen äußern¹⁴. Letztlich hat das durch die EKZ induzierte SIRS unvorhersehbare Folgen für den Organismus und geht mit einem signifikanten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einher^{7,15}.

2.2.2. Komponente der inflammatorischen Reaktion

Bei der inflammatorischen Reaktion infolge einer EKZ spielen verschiedene humorale und zelluläre Mechanismen eine Rolle. Unter anderem werden das intrinsische und das extrinsische Gerinnungssystem aktiviert, was in einer erhöhten Thrombogenität resultiert¹⁶. Das dabei entstehende Thrombin aktiviert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemotaxinen, welche eine erhöhte Adhäsion der neutrophilen Granulozyten (polymorphonukleäre Zellen, PMNs) verursachen, Makrophagen anziehen sowie die Vasopermeabilität erhöhen¹⁷. Infolge der EKZ wird auch die Fibrinolyse aktiviert, was als ein Anstieg der D-Dimere und der t-PA messbar ist. Die D-Dimer-Erhöhung ist assoziiert mit erhöhtem intraoperativem Blutverlust sowie postoperativen Blutungen⁷.

Das Komplementsystem ist auch an der inflammatorischen Reaktion beteiligt. Dabei wird durch die EKZ hauptsächlich der alternative Weg des Komplementsystems aktiviert. Dies führt auch zu einer erhöhten kapillären Permeabilität, zu einer Veränderung des vasomotorischen Tonus und zu einer Schädigung der Endothelzellen, der kardialen Myozyten und zu einer Aktivierung von PMNs und Thrombozyten. Insgesamt ist die Komplementaktivierung nach EKZ mit einer Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und einer erhöhten Morbidität verbunden¹¹.

Aufgrund der Komplexität der inflammatorischen Immunantwort nach EKZ kommt es zu einer Veränderung des Plasmaspiegels einer Vielzahl von Zytokinen, was ein Ausdruck einer intraoperativen Immunsuppression sowie einer folgenden Immunaktivierung und Akute-Phase-Reaktion ist¹⁸. In zahlreichen Studien wurden die Plasmakonzentrationsveränderungen verschiedener Zytokine nach EKZ untersucht. Als ein Bruchteil davon können die Interleukine 1- β , 2, 4, 6, 8, 12 und 18 sowie Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und Interferon γ (IFN- γ) genannt werden¹⁹⁻²¹.

Die inflammatorische Reaktion nach einer kardialen Operation mit EKZ kann in zwei Phasen unterteilt werden. Während der ersten Phase handelt es sich um eine primär unspezifische Immunantwort. Im Rahmen davon kommt es unter anderem zu einem Anstieg von den Zytokinen Interleukin 6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) sowie von dem überwiegend antiinflammatorischen Interleukin 10 (IL-10), welcher einer SIRS-Entwicklung entgegenwirken soll. Zusätzlich kommt es nach einem initialen Abfall von Interferon γ (IFN- γ) und in wenigen Tagen nach dem Eingriff zu IFN- γ -Anstieg, was als Ausdruck eines aktivierten spezifischen Immunsystems zu verstehen ist und somit zu der zweiten Phase der inflammatorischen Reaktion nach EKZ-Eingriffen gehört²².

IL-6 ist eins der ersten proinflammatorischen Zytokine, das bei EKZ-Eingriffen vermehrt freigesetzt wird. IL-6 ist ein wichtiger Mediator der Akute-Phase-Reaktion und wird als Entzündungsmarker verwendet. Nicht nur korreliert seine Plasmakonzentrationserhöhung mit der Dauer des Eingriffes²³, auch besteht ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad einer SIRS und dem Ausmaß der IL-6-Konzentrationserhöhung²⁴.

TNF- α ist als proinflammatorisches Zytokin auch ein Mediator des septischen Schockes. Eine erhöhte endogene TNF- α Produktion korreliert mit der Entwicklung eines Multiorganversagens und mit einer erhöhten Mortalität²⁵.

IL-10 zählt zu den antiinflammatorischen Zytokinen. Es reduziert die Adhäsion der PMNs zu aktivierten Endothelzellen²⁶ und weist protektive Eigenschaften bei I/R-Schaden auf²⁷. Höhere IL-10-Levels im Plasma von Patienten nach Eingriffen mit EKZ sind mit einer reduzierten inflammatorischen Immunantwort assoziiert²⁸.

Letztlich beeinflusst die komplexe Interaktion zwischen pro- und antiinflammatorischen Molekülen die klinische Präsentation einer SIRS. Das Gleichgewicht dieser Faktoren ist mitentscheidend für das klinische Ergebnis nach kardialen Operationen mit EKZ¹⁴.

2.2.3. Produktion und Bedeutung von Neutrophil Extracellular Traps im Rahmen von EKZ-Eingriffen

Im Rahmen der EKZ kommt es zu einer Aktivierung der PMNs. Diese sezernieren dann eine Vielzahl von proinflammatorischen Faktoren in das umliegende Gewebe sowie direkt in die Blutbahn. Dazu gehören die Neutrophile Elastase, Myeloperoxidase (MPO), Lysosome, ROS, Hydrogen-Peroxidase sowie zytotoxische Substanzen. Zu der Aktivierung der PMNs während der EKZ tragen Komplementfaktoren, Thrombin, Heparin, Endotoxin, TNF- α sowie die direkte Interaktion mit aktivierten Endothelzellen bei¹¹.

Aktivierte PMNs setzen auch Neutrophil Extracellular Traps (NETs) extrazellulär frei. Im Jahr 2004 beschrieben Brinkmann *et al.* die NETs zum ersten Mal. Diese bestehen aus Chromatin und granulären sowie zytoplasmatischen Proteinen, die zusammen eine netzartige Struktur bilden²⁹. Ihre Funktionen sind das Hemmen der Ausbreitung von pathogenen Mikroorganismen durch Trapping sowie dank ihren antimikrobiellen Eigenschaften die Zerstörung von Pathogenen³⁰.

Der Prozess, bei dem die NETs entstehen, wird als NETose bezeichnet und kann durch einen mehrere Stunden dauernden, von der Apoptose und der Nekrose zu unterscheidenden, Zelltodweg erfolgen³¹. Ein weiterer Mechanismus für die NETs-Entstehung ist ihre rapide Freisetzung durch PMNs, welche danach als anukleäre Zellen Abwehrfunktionen ausüben³². Zu den Auslösern der NETose zählen verschiedene Bakterien, die von ihnen produzierten Toxine, Pilze, bestimmte Zytokine, Plättchen aktivierender Faktor³³ und aktivierte Endothelzellen³⁴.

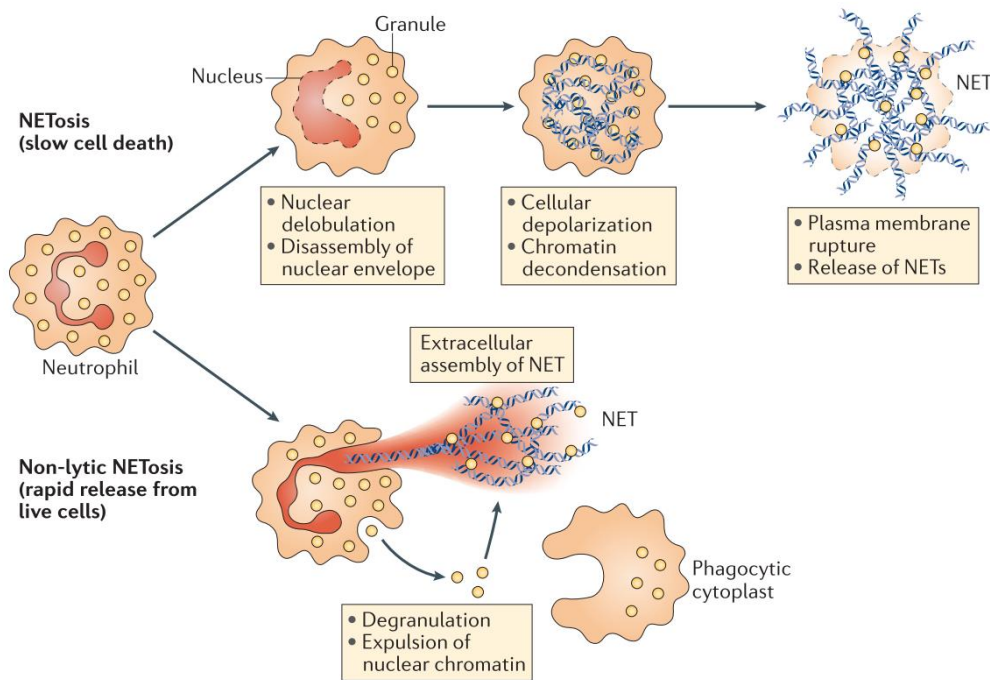


Abbildung 2: Mechanismen der NETs-Produktion³⁵

Obwohl die NETs eine wichtige Rolle als Teil des Immunsystems spielen, kann ihre Überproduktion oder inadäquate Degradierung zu Organschaden führen³⁶. Im Blut septischer Patienten konnte eine auf den Kosten von Endothel- und Gewebsschaden entstehende NETs-Produktion beobachtet werden³⁷. Außerdem besitzen die NETs prothrombotische Eigenschaften, indem sie ein Gerüst für das Anheften von Thrombozyten anbieten³⁸.

Seit der Entdeckung der NETs werden zahlreiche Methoden für ihre in vivo und in vitro Detektion sowie Quantifizierung entwickelt. Darunter zählt die Immunfärbung von verschiedenen aus den NETs stammenden Proteinen, Histonen und Komplexen wie MPO und Neutrophile Elastase. Mittels Durchflusszytometrie können auch bestimmte NETs-Bestandteile nachgewiesen werden. Eine weitere Methode ist die Quantifizierung von zellfreier DNA (cfDNA) als Bestandteil der NETs mittels DNA-Fluoreszenzassay PicoGreen³⁹.

In den letzten Jahren hat die Bestimmung der Konzentration von cfDNA im Plasma an Bedeutung gewonnen. Eine Akkumulation von cfDNA im Plasma kann durch Zelltod im Rahmen von Apoptose und Nekrose sowie durch eine ineffektive Entfernung der toten Zellen entstehen. Eine weitere Quelle von cfDNA im Plasma sind die NETs⁴⁰.

Eine cfDNA-Plasmakonzentrationserhöhung wird bei einer Vielzahl von pathologischen Prozessen beobachtet. Zunehmend werden erhöhte Plasma-cfDNA-Konzentrationen als ein prognostischer Biomarker für schlechtes Outcome gesehen⁴¹. Beispielsweise wird die cfDNA-Konzentrationserhöhung als prädiktiver Marker einer erhöhten Mortalität bei intensivpflichtigen Patienten mit schwerer Sepsis beschrieben⁴².

In klinischen Studien haben sich signifikant erhöhte cfDNA/NETs - Mengen bei Patienten gezeigt, die nach großen Traumen Sepsis entwickelt haben, verglichen mit nicht septischen Traumapatienten⁴³. Die cfDNA-Erhöhung bei septischen Patienten beruht wahrscheinlich auf einer exzessiven NETose. Bei Traumapatienten ist die cfDNA-Erhöhung durch eine erhöhte Freisetzung durch geschädigte und nekrotische Zellen bedingt⁴⁴.

Eine Erhöhung der cfDNA-Konzentration im Plasma findet sich auch bei Patienten nach kardialen Operationen mit EKZ. Diese erhöhte cfDNA-Konzentrationen sind zusätzlich positiv korreliert mit einer perioperativen Nierendysfunktion⁴⁵. Die cfDNA-Konzentrationen bei Operationen mit EKZ in Abhängigkeit von der Dauer der Eingriffe wurde auch untersucht, wobei sich signifikant höhere cfDNA-Plasmakonzentrationen nach den längeren Operationen gezeigt haben. Es ist auch anzunehmen, dass cfDNA als früher Biomarker der inflammatorischen Reaktion nach EKZ im Sinne einer exzessiven NETs-Produktion auch den Endothelschaden mitverursacht⁴⁶.

2.2.4. Bedeutung des Gefäßendothels im Kontext der inflammatorischen Kaskade bei EKZ-Eingriffen

2.2.4.1. Aufbau der Gefäßwand und Funktion des Endothels

Die Gefäßwand setzt sich aus drei Schichten zusammen – Tunica Intima, Tunica Media und Tunica Adventitia. Die Intima besteht aus einer Reihe von Endothelzellen und der subendothelialen fibroelastischen Bindegewebsschicht, welche für die Elastizität und Stabilität der Endothelzellen sorgt. In der Tunica Media befinden sich glatte Muskelzellen und elastische Fasern⁴⁷. Die Myozyten sind mittels Gap junctions miteinander funktionell verbunden, mithilfe welcher die Synchronisation der Membranpotenziale zwischen den Nachbarzellen erfolgen kann. Das Bindegewebe der Adventitia kleidet die Gefäße als letzte und äußerste Schicht aus und besteht aus Fibroblasten, Adipozyten und Extrazellulärmatrix⁴⁸.

Das Gefäßendothel kleidet die Innenräume der Gefäße aus und besteht aus einer Reihe von auf einer Basallamina sitzenden Endothelzellen. Die apikale Seite der Endothelzellen ist mit einer Glykokalix ausgestattet, die durch ihre Negativladung das selektive Binden an Molekülen ermöglicht⁴⁷.

Das Endothel ist nicht nur eine starre Barriere zwischen dem intra- und extravasalen Raum, sondern erfüllt mehrere Funktionen im Sinne eines dynamischen Organs. Zum einen reguliert das Endothel den Austritt von Plasmamolekülen, Hormonen und Zellen. Zum anderen wird durch die Glykokalix das Anheften von negativ geladenen Partikeln wie Erythrozyten und Thrombozyten an die Endothelzellen verhindert⁴⁹. Gleichzeitig aber wird die Leukozytenmigration bei entsprechenden Stimuli durch Endothelzellexpression von Selektinen und Adhäsionsmolekülen ermöglicht und reguliert. Eine weitere Funktion des Endothels ist das Gewährleisten des Gleichgewichts zwischen Pro- und Antikoagulation. Dies

kann zum Beispiel durch Regulation der Expression von Bindungsstellen für pro- und antikoagulatorischen Faktoren oder aber durch die Produktion solcher in den Endothelzellen erfolgen. In diesem Rahmen kann die Produktion von Tissue Faktor in den Endothelzellen als Beispiel für prokoagulatorische Regulation und aber die Stimulation von der Protein C/Protein S Kaskade als antikoagulatorischer Mechanismus genannt werden⁵⁰. Das Endothel reguliert auch den Vasotonus der Gefäße. Dies erfolgt durch Produktion und Freisetzung von Mediatoren wie Prostazyklin, Endothelin, Thromboxan A und Stickstoffmonoxid (NO)¹⁴.

2.2.4.2. Endothelabhängige Vasorelaxation

Die NO-Produktion durch das Endothel erfolgt mittels zelleigener Enzyme. Eins davon ist die endotheliale NO-Synthase (eNOS). Diese befindet sich in der Zellmembran der Endothelzellen und stellt NO aus L-Arginin und L-Citrullin her⁵¹. Für diese Reaktion sind bestimmte Co-Faktoren notwendig, wie zum Beispiel Tetrahydrobiopterin und NADPH. Die eNOS kann durch Scherbeanspruchung, Acetylcholin, Serotonin, Thrombin und Bradykinin aktiviert werden (Abbildung 3)⁵².

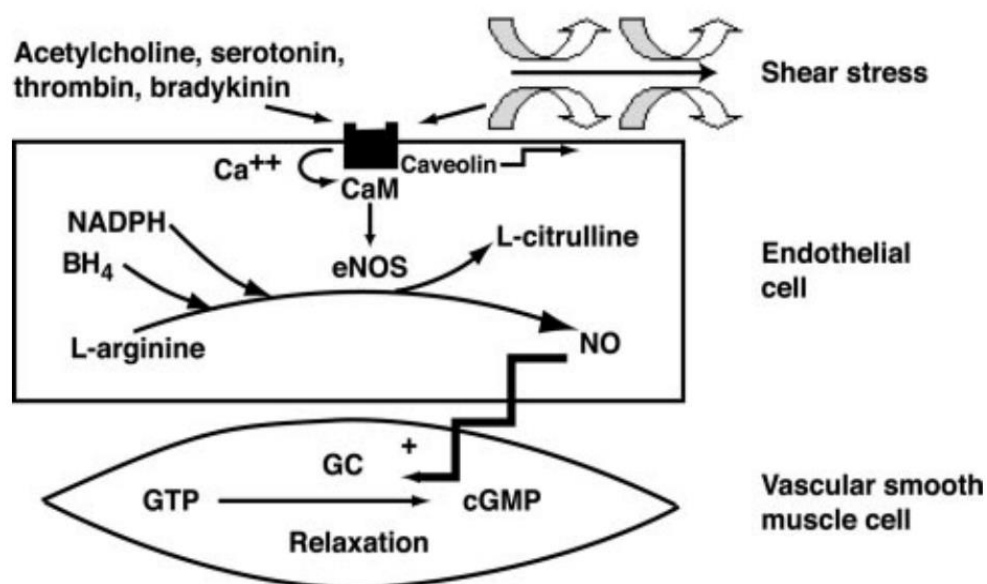


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion von eNOS⁵³

Der durch das Endothel produzierte NO stimuliert die lösliche Guanylatcyclase (GC) in den glatten Muskelzellen der Gefäßwand, was zu einer Erhöhung des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP) in den Muskelzellen führt. Die cGMP-abhängige Dephosphorylierung der Myosinleichtkettenkinase führt zu der endothelabhängigen Vasodilatation^{54, 55, 56}.

2.2.4.3. Physiologie der Vasokonstriktion

Die Vasokonstriktion entsteht als Folge der Kontraktion der glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Bei der elektromechanischen Kopplung handelt es sich um eine Kontraktion der glatten Muskelzellen, die entweder durch ein Aktionspotenzial oder durch eine Depolarisation erfolgt. Die Depolarisation kommt durch veränderte Kaliumleitfähigkeit zustande und führt zu einer Öffnung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen. Somit kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums. Bei der pharmakomechanischen Kopplung erfolgt durch Neurotransmitter, Hormone oder Pharmaka eine depolarisationsabhängige Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Der Kalziumanstieg führt dazu, dass Kalzium an Calmodulin bindet, was die Myosin-leichte-Ketten-Kinase aktiviert. Durch die Phosphorylierung der leichten Kette kommt es zu einer Aktivierung der ATP-ase im Myosin. Es kommt zu einem Verlust der Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin und zu einem Gleiten des Myosinkopfes entlang der Aktins. Der Myosinkopf bindet erneut an einer weiteren Stelle des Aktins. Somit ist eine Kontraktion erfolgt⁵⁷.

2.2.4.4. Aktivierung und Schädigung des Gefäßendothels durch die EKZ

Bei kardialen Operationen mit EKZ konnten in verschiedenen Studien die Endothelzellaktivierung sowie ein direkter Endothelzellschaden nachgewiesen werden^{58,59}. Die systemische Aktivierung der Endothelzellen infolge der EKZ spielt für die mögliche inadäquate, überschießende Immunabwehrreaktion eine bedeutende Rolle⁶⁰.

Ein Teil dieser Immunantwort ist die Interaktion zwischen Endothelzellen und PMNs. Nach Stimulation durch proinflammatorische Faktoren wie z.B. TNF- α und IL-1 produzieren die Endothelzellen PMN-anziehende Chemokine⁶¹. Die Endothelzellen werden auch durch proinflammatorische Zytokine stimuliert, zelluläre Adhäsionsmoleküle wie ICAM, VCAM und PECAM auf ihre Oberfläche zu exprimieren. Dazu kommt es auch aufgrund des I/R-Schadens, im Rahmen dessen es zu einem intrazellulären Anstieg von metabolischen Zwischenstufen wie Adenosinmonophosphat und ROS kommt, zusätzlich zu der erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Zytokinen. Dies führt wiederum auch zu einer Leukozytenrekrutierung⁶¹.

Die EKZ ist assoziiert mit erhöhten Konzentrationen von diesen löslichen Adhäsionsmolekülen. Sie ermöglichen die Adhäsion der Leukozyten an den Endothelzellen und deren transendotheliale Migration ins extravasale Gewebe. Dort setzen die PMNs ROS, proteolytische Enzyme und Leukotriene frei⁶². Dies führt zu einer Endothelschädigung und somit zu einer gestörten Permeabilität und Ödembildung. Die Schädigung des Endothels resultiert auch in einer erhöhten Expression von Tissue Faktor, welche die extrinsische Gerinnungskaskade aktiviert und zu einer disseminierten intravasalen Koagulation führen kann¹⁴.

Nach der Reperfusion kommt es durch die Hypoxämie und die zytotoxischen Faktoren zu Zellschwellung und Zellschaden. Dies kann auch das Gleichgewicht zwischen Pro- und Antikoagulation verändern, sodass eine Thrombogenitätsneigung entsteht⁶¹.

Letztlich tragen die Interaktion der Endothelzellen mit den PMNs sowie die Entstehung von ROS im Rahmen des I/R-Schadens erheblich zu der Endotheldysfunktion bei⁶³.

Nicht nur sind aktivierte Endothelzellen für die Transmigration der PMNs verantwortlich, sondern induzieren auch eine Produktion von NETs, die ihrerseits einen Endothelschaden bewirken. Das Zusammenspiel zwischen aktivierten Endothelzellen, PMNs und NETs im Rahmen der Inflammation ist möglicherweise für eine Eskalation der inflammatorischen Immunantwort verantwortlich³⁴. Die dosisabhängige zytotoxische Wirkung, welche die NETs auf Endothel- und Epithelzellen ausüben, wird durch Histone und MPO als Bestandteile der NETs bewirkt⁶⁴. Eine Vorstudie unserer Arbeitsgruppe konnte eine positive Korrelation zwischen Endothelschädigung und hohen cfDNA/NETs-Mengen im Plasma bei >100 Minuten dauernden kardialen Operationen mit EKZ nachweisen⁴⁶.

Im Rahmen der Inflammation wird das Enzym induzierbare NO-Synthase (iNOS) durch proinflammatorische Zytokine und Endotoxine aktiviert. Dies führt zu einer Freisetzung von NO durch die Endothelzellen und zu einer Erhöhung der Vasopermeabilität und der Vasodilatation. Somit hat die Aktivierung der iNOS eine direkte Rolle in der Entstehung einer SIRS und der nach der EKZ folgenden Organdysfunktion⁶².

Zusammenfassend sind die durch die EKZ induzierte Schädigung der Endothelzellen und die Störung der Endothelfunktion für die Dysfunktion einer Mehrzahl von Organsystemen im postoperativen Verlauf mitverantwortlich⁶¹.

Zur Evaluierung der Endothelfunktion wird in vielen experimentellen Studien die Messung der endothelabhängigen Vasorelaxation als Methode der Wahl verwendet⁵². Die Erhöhung von Biomarker der Endothelzellaktivierung im Blut nach EKZ-Eingriffen wird als Zeichen einer Endotheldysfunktion und eines Endothelschadens interpretiert⁶⁵. Einer der Biomarker der Endothelzellaktivierung ist die lösliche Form des Intrazellulären Adhäsionsmoleküls 1 (sICAM-1), welche von aktivierten Endothelzellen freigesetzt wird⁶⁶.

2.3. Das Enzym Desoxyribonuclease I als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt gegen die EKZ-induzierte Inflammation

Desoxyribonuclease I (*DNase I*) ist ein Enzym, das bei Menschen vor allem im Pankreas produziert wird⁶⁷ und doppelsträngige DNA degradiert⁶⁸. Diese Funktion wird zunutze gemacht in der Therapie der zystischen Fibrose, wo die rekombinante humane *DNase I* (Dornase alfa, Pulmozyme) angewendet wird⁶⁹.

Die NETs bestehen, wie oben beschrieben, aus einem Chromatingerüst²⁹. Im Jahr 2012 konnten Meng *et al.* nicht nur erhöhte cfDNA/NETs – Plasmakonzentrationen, sondern auch

eine Erhöhung der DNase - Konzentration im Plasma von septischen Patienten nachweisen. Außerdem wurde eine konzentrationsabhängige Degradation der cfDNA/NETs durch rekombinante humane DNase I dargestellt. Es wurde eine Reduktion der möglichen pathologischen Auswirkungen der cfDNA/NETs durch DNase I vermutet und somit ein weiterer Einsatz von DNase I als therapeutische Option im klinischen Bereich diskutiert⁴³.

Weitere positive Wirkungen von DNase I konnten in Tiermodellen beobachtet werden. In einem myokardialen I/R-Mausmodell hat sich eine Exazerbation des kardialen I/R-Schadens durch hauptsächlich von NETs stammendem extrazellulären Chromatin gezeigt. In diesem Modell konnte durch DNase I eine Reduktion der neutrophilen Infiltration des ischämischen Gewebes und somit eine kardioprotektive und antiinflammatorische Wirkung der DNase I gezeigt werden⁷⁰. Eine Verbesserung der ventrikulären Funktion von Mäusen nach Myokardinfarkt durch Anwendung von DNase I konnte ebenso beobachtet werden⁷¹. In einem weiteren intestinalen I/R-Rattenmodell konnte eine Reduktion der cfDNA/NETs durch DNase I festgestellt und somit eine protektive Wirkung des Enzyms postuliert werden⁷².

2.4. Tiermodelle zur Untersuchung von EKZ-Wirkungen auf den Organismus

Zum Zweck der Forschung von konkreten pathophysiologischen Folgen von EKZ wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt. Diese sind für die Entwicklung von Strategien zur Reduktion der inflammatorischen Immunantwort nach EKZ essenziell und haben einen großen Vorteil gegenüber klinischen Studien mit Patienten. Dieser äußert sich darin, dass die Tiere genetisch identisch sind, mögliche Bias reduziert werden können und somit die einzige Variable der Untersuchung die zu untersuchende Intervention ist⁷³.

Mithilfe der Modelle sollen die Vorgänge beim Menschen während der EKZ am Tier reproduziert werden. Sie unterscheiden sich in der zu untersuchenden Tierart, in den Zugängen für das Anschließen des Tiers an die EKZ, in der Dauer der Perfusion sowie in der erzielten Temperatur. In einem Modell zur Untersuchung von mikrozirkulatorischem Schaden des gastrointestinalen Traktes wurden Ratten über die Arteria carotis und Vena jugularis über die EKZ für 60 Minuten perfundiert, wobei eine Temperatur von ca. 36,5 – 38 °C aufrechterhalten wurde⁷⁴. In einem anderen EKZ-Modell wurden die Ratten 90 Minuten lang der EKZ ausgesetzt und wurden 2,5 oder 4,5 Stunden nach EKZ-Ende euthanasiert, damit die Gefäßreaktivität untersucht werden kann⁷⁵. Es bestehen auch EKZ-Schweine-Modelle mit Anwenden von Kardioplegie und Reperfusion der Tiere nach dem EKZ-Schluss⁷⁶ sowie EKZ-Schweine-Modelle mit Hypothermie (25°C) und Abklemmen der Aorta⁷⁷.

Zum Zweck der Forschung von konkreten pathophysiologischen und molekularen Veränderungen, die zu einem EKZ-induzierten SIRS führen, sowie von möglichen therapeutischen Ansätzen gegen die inflammatorische Antwort haben Engels *et al.* ein EKZ -

Rattenmodell mit tiefer Hypothermie entwickelt. Hierbei werden den kardialen EKZ-Eingriffen bei Menschen klinisch möglichst ähnliche Bedingungen geschaffen. In dem Modell werden die Tiere an eine HLM angeschlossen. Es wird eine tiefe Hypothermie induziert und die EKZ gestoppt. Somit verharren die Tiere in einem Kreislaufstillstand in tiefer Hypothermie und werden einer Ischämiezeit ausgesetzt. Nach einem Wiedererwärmen und erneutem Starten der EKZ folgt eine bestimmte Reperfusionzeit. Eine kardioplegische Lösung wird nicht angewendet, um mögliche inflammatorische und pathophysiologische Kaskaden durch diese auszuschließen. Im Mittelpunkt des Modells steht das Untersuchen der inflammatorischen Ereignisse infolge des I/R-Schadens. Im Blut und in Organgeweben von Tieren, die diesem Modell mit Deep Hypothermic Cardiac Arrest (DHCA) ausgesetzt wurden, konnten verschiedene, einer inflammatorischen EKZ-Reaktion entsprechende Parameter nachgewiesen werden⁷⁸.

2.5. Fragestellungen und Ziel der Arbeit

In Zusammenschau der bisher dargestellten Information lässt sich die *DNase I* als ein erfolgsversprechender Hebel gegen eine überschießende cfDNA/NETs-Plasmaerhöhung und die damit verbundenen Schäden für den Organismus vermuten⁴³. Endothelzellen stellen einen wichtigen Punkt der inflammatorischen Reaktion nach EKZ-Eingriffen und den damit einhergehenden Komplikationen dar⁶¹. Aufgrund der cf-DNA/NETs-Plasmaerhöhung bei EKZ-Eingriffen⁴⁵ und der NETs-induzierten Endothelschädigung und Inflammationsverstärkung³⁴ wird in dieser Studie die Frage nach der Verbesserung der Endothelfunktion durch *DNase I* in Mittelpunkt gestellt. Um maximal aussagekräftige Schlussfolgerungen ziehen zu können, wurde das Rattenmodell mit DHCA als Versuchsmodell verwendet, da anhand dessen dem menschlichen Organismus möglichst ähnliche pathophysiologische Prozesse nach einem EKZ-Eingriff induziert werden können⁷⁸.

Die Arbeitshypothese dieser Studie besagt, dass *DNase I* die Endothelfunktion nach Eingriffen mit EKZ verbessert und die cfDNA/NETs-Plasmakonzentration sowie die inflammatorische Reaktion reduziert.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Wirkung des Enzyms *DNase I* auf die Gefäßfunktion nach operativen Eingriffen mit EKZ anhand eines Ratten-Modells mit tiefer Hypothermie.

Zusätzlich wird der Einfluss von *DNase I* auf die cfDNA/NETs-Plasmakonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten des Aussetzens der Tiere auf die EKZ mit tiefer Hypothermie untersucht.

Letztens wird erforscht, ob die *DNase I* eine Änderung des Ausmaßes der inflammatorischen Reaktion im Rahmen des oben genannten Modells bewirken kann.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien für die Endothelfunktionsmessung

Die für die Endothelfunktionsmessung benutzten Chemikalien werden im Folgenden aufgezählt. Die einzelnen Reagenzien beinhaltet Tabelle 1. Zusätzlich zu den Konzentrationen der Stocklösungen werden auch die in 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) gelösten Konzentrationen der Reagenzien (entsprechend der Konzentration im Organbad) angegeben. Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers. Die Puffer-Lösung und die Kaliumlösung zum Vorkontrahieren der Gefäßringe wurden mit destilliertem Wasser vorbereitet und steril filtriert, jede Woche neu angesetzt und bei 4 °C für maximal eine Woche gelagert. Die benutzten Konzentrationsreihen wurden unmittelbar vor jedem Versuch neu gelöst. Die restlichen Reagenzien wurden in der angegebenen Konzentration tiefgefroren gelagert.

Reagenz	Konzentration im Organbad	Hersteller	Konzentration der Stocklösungen
Kaliumchlorid (KCl)	60 [mM]		
Acetylcholin (Acetylcholine chloride)	1 [nM]-10 [µM]	Sigma- Aldrich	50 [mM] in aqua dest
Phenylephrin (Phenylephrine hydrochloride)	0,1 [µM]	Sigma- Aldrich	50 [mM] in DMSO
Indomethacin	10 [mM]	Sigma- Aldrich	40 [mM] in DMSO
SNAP (S-Nitroso-N-Acetyl-D,L- Penicillamine)	0.1 [nM]-10 [µM]	Cayman Chemical	10 [mM] in DMSO
L-NNA (L-NG-Nitroarginine/NG- nitro-L-Arginine)	100 [µM]	Cayman Chemical	5 [nM] in PBS
L-Arginin	1 [mM]	Sigma- Aldrich	0,33 [M]

Tabelle 1

Krebs-Henseleit-Puffer	
Reagenz	Konzentration [mM]
NaCl	118
KCl	5
MgSO ₄	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
Glukose	11,1
NaHCO ₃	24,9
CaCl ₂	2,5
Glucose	11
Tabelle 2	

3.1.2. Materialien für die Plasmauntersuchungen

Für die unten beschriebenen Plasmauntersuchungen wurden die in Tabelle 3 aufgeführten Materialien benutzt.

Messung	Material	Hersteller
Zellfreie DNA	Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany
DNase - Aktivität	PicoGreen dsDNA	Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany
	Ds-DNA-Standard von Kalb Thymus	Sigma Aldrich
ICAM-1	Simplex Kit (Rat ICAM-1 Procarta Plex Simplex)	Thermo Fisher
Zytokine	Immunoassay (ProcartaPlex 4 Plex)	Thermo Fisher
Tabelle 3		

3.1.3. Geräte

Tabelle 4 zeigt eine Auflistung der für die Messungen benutzten Geräte.

Gerät	Hersteller	Ort
Organ and Tissue Bath	Hugo Sachs Elektronik	Experimentelle Medizin, Universitätsklinik Köln
Kraftaufnehmer	Hugo Sachs Elektronik	Experimentelle Medizin, Universitätsklinik Köln
Feintrieb Typ 850N, Range 0-20 mm	Hugo Sachs Elektronik	Experimentelle Medizin, Universitätsklinik Köln
ABL 700	Radiometer Copenhagen	Experimentelle Medizin, Universitätsklinik Köln
Mikroplatten Reader Victor 3	Perkin Elmer	Experimentelles Labor der Klinik für Herzchirurgie, herzchirurgische Intensivmedizin und Thoraxchirurgie, Universitätsklinik Köln
Luminex 200 System	Thermo Fisher	Max-Planck-Institut für Stoffwechselforschung, Köln

Tabelle 4

3.2. Methoden

3.2.1. Studiengenehmigung

Die Studie wurde von dem Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein Westfalen genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2014.A103) und nach deutschen und europäischen Leitlinien für experimentelle Tierforschung durchgeführt. Die Studie wurde in Kooperation mit Univ.-Prof. Dr. med. Payam Akhyari von der Klinik für Herzchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Untersuchungen in Köln fanden unter der Supervision der Leiterin des Labors für kardiale Zelltherapie der Klinik für Herzchirurgie, herzchirurgische Intensivmedizin und Thoraxchirurgie Priv.-Doz. Dr. Adnana Paunel-Görgülü statt.

3.2.2. Tiere und Gruppeneinteilung

Für die Untersuchungen wurden 24 männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht zwischen 510 und 525 Gramm von dem Janvier Breeding Center (Frankreich) geliefert. Die Tiere wurden gleichmäßig und zufällig in drei Gruppen in Abhängigkeit von der Anzahl der späteren *DNase I*-Gaben (Pulmozyme®, Roche, 5 mg/kg Körpergewicht) im weiteren Verlauf des Versuches unterteilt. Die erste Gruppe war die Kontrollgruppe, die keine *DNase I* bekam. Die zweite Gruppe („1 x *DNase I*“) bekam eine einmalige Dose *DNase I* zu Beginn des Versuches.

Die dritte Gruppe („2 x *DNase I*“) bekam je eine Dose *DNase I* am Anfang, wie auch eine zweite im weiteren Verlauf des Versuches.

3.2.3. Ablauf des chirurgischen Teils mit EKZ

Die chirurgischen Eingriffe fanden in Düsseldorf statt und wurden in Zusammenarbeit von Teammitgliedern der beiden oben erwähnten herzchirurgischen Kliniken durchgeführt. Pro Tag fand ein Versuch mit einem Tier statt.

Als Erstes wurden die Ratten intubiert und mittels inhalativem Isofluran (2,5%) in Narkose gesetzt. Durch Kanülieren der Vena jugularis und der Schwanzarterie wurden die Tiere an eine HLM für Kleintiere (Dipl. Ing. M. Humbs, Valley, Germany) angeschlossen, wodurch die Oxygenierung, der Transport und der Wärmeaustausch des Blutes gewährleistet wurden.

Es wurde ein Ratten-EKZ-Modell mit DHCA angewendet. Ziel dessen ist das Reproduzieren der pathophysiologischen Kaskaden, die bei kardialen Operationen mit EKZ für die systemische, inflammatorische Immunabwehrreaktion des Organismus verantwortlich sind. Zudem findet das Modell Einsatz, um therapeutische Ansätze gegen die mit der EKZ verbundenen Organschaden und Reperfusionsschaden zu untersuchen⁷⁸.

Eine Übersicht des zeitlichen Ablaufes der chirurgischen Prozedur sowie der *DNase I*-Gaben zeigt Abbildung 4. Circa 50 Minuten nach dem Kanülieren erfolgte der erste i.v. Bolus von *DNase I* bei Gruppen „1 x *DNase I*“ und „2 x *DNase I*“ bzw. die gleiche Menge von i.v. NaCl (0,9%) bei der Kontrollgruppe. Dann wurden die Tiere 30 Minuten lang auf eine Temperatur von 17°C heruntergekühlt. Die EKZ wurde gestoppt und die Ratten verblieben für 45 Minuten im DHCA. Als Nächstes wurde die EKZ wieder gestartet, die Tiere wurden 40 Minuten lang auf 35°C erwärmt. Nach Erreichen dieser Temperatur erfolgte der zweite i.v. *DNase I* Bolus bei Gruppe „2 x *DNase I*“ bzw. das gleiche Volumen von i.v. NaCl (0,9 %) bei den anderen zwei Gruppen. Es folgte eine Reperfusion für 60 Minuten. Die Tiere wurden dann euthanasiert und ihre Organe, inklusive Aorta, entnommen.

Plasmaproben wurden vor Beginn der EKZ sowie vor und nach der Reperfusion entnommen.

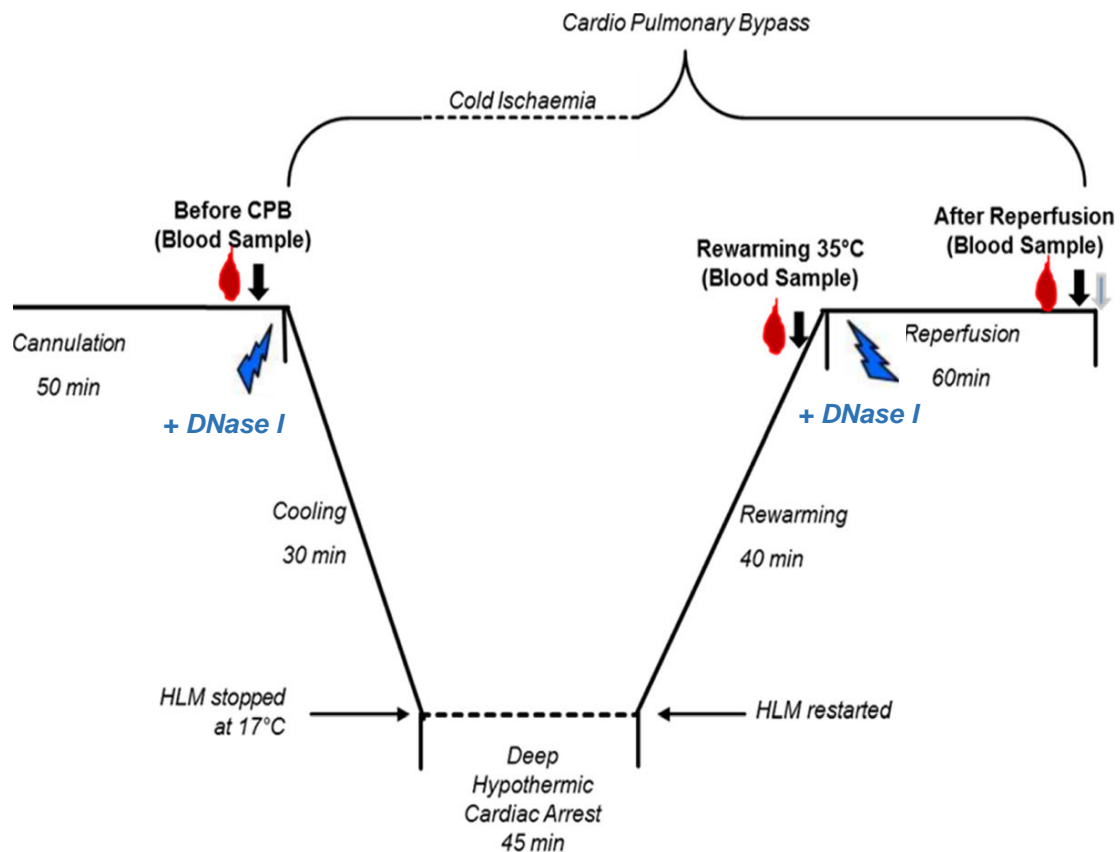


Abbildung 4: Übersicht des chirurgischen Ablaufs mit Deep hypothermic circulatory arrest. Das Bild wurde für die hier beschriebene Studie modifiziert⁷⁹

3.2.4. Vorbereitung der Aorten auf die Gefäßfunktionsuntersuchung

Nach dem Euthanasieren der Tiere wurden ihre Aorten am Arcus aortae abgetrennt, in ca. 1,5 cm Länge entnommen und von Binde- und Fettgewebe freipräpariert (Abbildung 5). Die Gefäße wurden dann unmittelbar in KHP, gekühlt auf Eis bei einer Temperatur von 4°C in das Labor für Experimentelle Medizin, Universitätsklinik Köln für die weitere Untersuchung transportiert. Die Gefäße wurden dann in vier ca. 4 mm breite Ringe geschnitten, wie in Abbildung 6 gezeigt. Das kraniale sowie das kaudale Ende der Gefäßabschnitte wurden für die Messung nicht verwendet, damit eine Verfälschung der Ergebnisse durch eventuelle Veränderungen der Gefäßstruktur durch mechanisches Reizen vermieden werden. Die Endothelfunktionsmessungen fanden verblindet statt.



Abbildung 5: Rattenaorta in Krebs-Henseleit-Puffer. Das Fett- und Bindegewebe wurden bereits entfernt.



Abbildung 6: Gefäßringe. Rattenaorta.

3.2.5. Endothelfunktionsmessung

3.2.5.1. Aufbau der Anlage

Die Endothelfunktionsmessung wurde an einem Organ and Tissue Bath (Hugo Sachs Elektronik) durchgeführt. Dieses erlaubt eine isometrische Messung der Kontraktionskraft von Gefäßen. Abbildung 7 zeigt einen Überblick des Aufbaus der Messanlage.

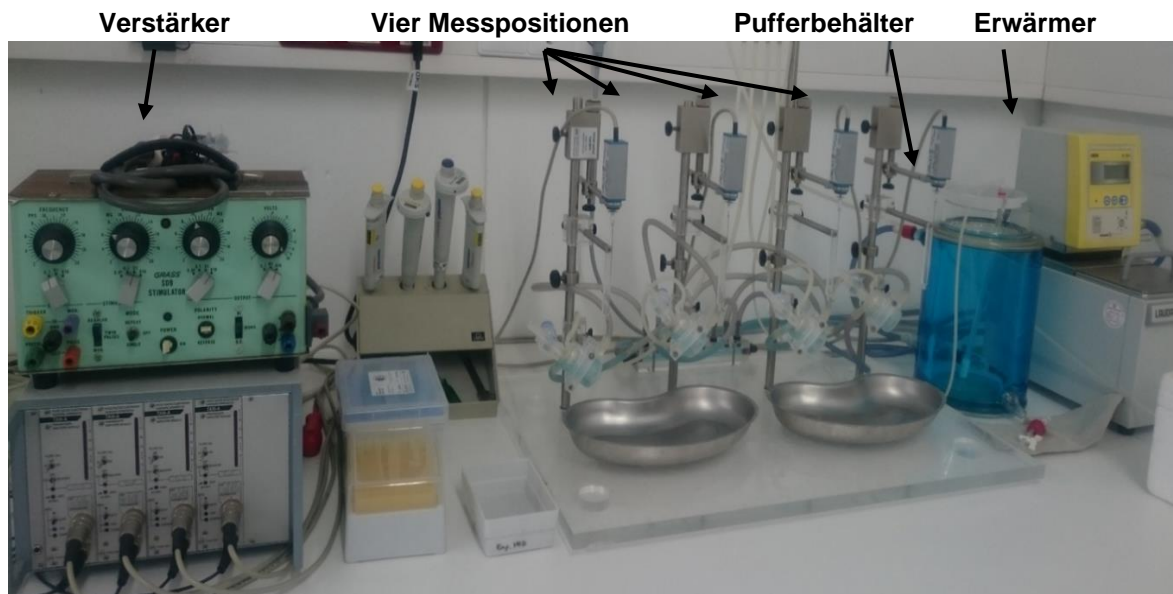


Abbildung 7: Überblick der Anlage zur Endothelfunktionsmessung

Diese besteht aus vier separaten doppelwandigen Organbäder, die mit jeweils 10 ml KHP gefüllt werden. Die Organbäder sind über ein Schlauchsystem mit dem Erwärmer und dem Gasbehälter verbunden, sodass die beinhaltete Flüssigkeit konstant auf 37°C gehalten und

mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast wird. Somit kann in den Organbädern ein physiologisches Milieu mit einem pH von 7,4 hergestellt werden.

Die Aortenringe werden auf zwei aufeinanderliegenden rostfreien Stäbchen gelegt. Das untere Stäbchen ist unbeweglich, wohingegen das Obere mit einem vertikalen Kraftaufnehmer verbunden ist. Durch feines Drehen an einem mit dem Kraftaufnehmer verbundenen Feintrieb wird das bewegliche Stäbchen vom anderen Stäbchen entfernt. Eine schematische Darstellung der Vorrichtungen zeigt Abbildung 8. Der Gefäßring wird gedehnt und somit wird eine Gefäßanspannung aufgebaut (Abbildung 9).

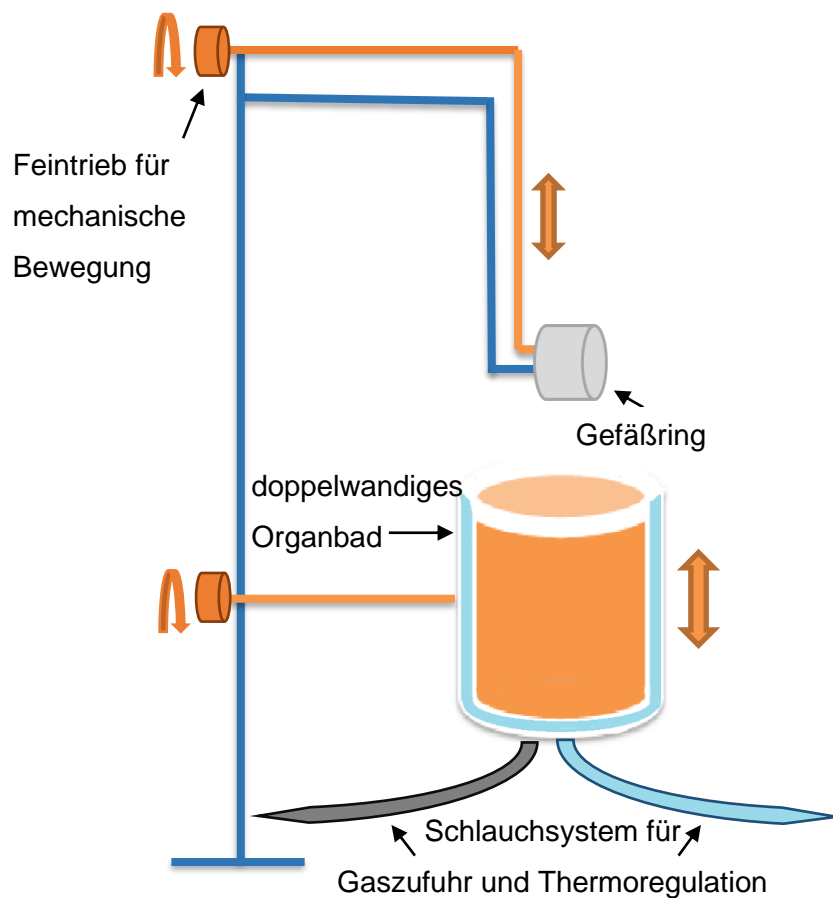


Abbildung 8: Schematische Darstellung einer einzelnen Messvorrichtung



Abbildung 9: Gespannter Aortenring zwischen den zwei rostfreien Stäbchen

Die an der Vorrichtung angehängten Aortenringe werden in die Organbäder eingetaucht. Eine Kontraktion des Gefäßringes kann von dem Kraftaufnehmer wahrgenommen und durch einen Verstärker (Transducer) in elektrisches Signal umgewandelt werden. Dieser wird dann auf den mit dem Organ and Tissue Bath verbundenem Computer in digitaler, graphischer Form in Form eines Diagramms aufgezeichnet. Die X-Achse bezeichnet die Zeit [Min] und die Y-Achse die vom System gemessene Kraft [cN]. Demensprechend ist ein Ausschlag im Diagramm als eine Kontraktion des Gefäßringes zu verstehen (Abbildung 10).

3.2.5.2. Ablauf der Gefäßfunktionsmessung

Vor dem Beginn jedes Versuches wurden die Organbäder mit KHP gespült. Zum Gewährleisten der Gleichmäßigkeit und Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen wurde zu Beginn jeder eine Blutgasanalyse (ABL 700, Radiometer Copenhagen) des Puffers zur Kontrolle der Elektrolytkonzentrationen und des pHs durchgeführt.

Unmittelbar nach dem Schneiden der Gefäßringe wurden diese an die Messvorrichtungen angehängt und ohne Spannung in die mit Puffer gefüllten Organbäder eingetaucht. Die Versuche wurden als Doppelmessung durchgeführt, indem an Gefäßringen I und II die endothelabhängige und an Gefäßringen III und IV die endothelunabhängige Vasoreaktion gemessen wurde. Dementsprechend wurde direkt nach dem Eintauchen in Organbädern I und II L-Arginin [1 mM] und in Organbäder III und IV L-NNA [100 μ M] hinzugegeben. L-Arginin ist das Substrat für die eNOS⁸⁰. Das Enzym wurde in Organbädern III und IV wiederum mit L- NNA inhibiert.

Nach einer Akklimatisierungszeit von ca. 30 Minuten begann die Einstellung eines Basaltonus der Gefäße. Durch Manipulieren an dem oben beschriebenen Feintrieb konnte eine Vergrößerung der Entfernung zwischen den zwei Stäbchen und damit eine vorsichtige Dehnung des Gefäßrings bewirkt werden. Die Kontraktionskraft der Gefäßringe auf diese Dehnung wurde vom System registriert und in metrische Daten in cN angegeben. Als optimaler Basaltonus wurde 1 cN eingestellt.

Als nächster Schritt wurden wiederholte Kontraktionen der Gefäße mit Kaliumchlorid (KCl) durchgeführt. Dieses sogenannte Kaliumtraining bestand aus abwechselnden Gaben von KCl [60 mM], gefolgt von einem Washout mit KHP. Die KCl-Gabe führte zu einer Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration und dadurch zu einer Vasokonstriktion der Gefäßringe⁸¹. Durch den Washout mit Puffer wurde die extrazelluläre Kaliumkonzentration wieder gesenkt, was zu einer Dilatation der Gefäße in ihren Ausgangszustand führte. Das Training wurde so oft wiederholt, bis es zu vergleichbaren Ausschlägen kam. Ziel dieses Kaliumtrainings war die Vasoreaktivität der Gefäßringe zu überprüfen und die glatten Muskelzellen in der Gefäßwand zu sensibilisieren und damit einen Plateauwert der maximalen Gefäßkontraktion zu erreichen. Als Nächstes wurde in allen vier Organbädern Indomethacin hinzugegeben. Dieser hemmt potent die Produktion von Prostaglandin E₂⁸². Bei Gewebsschädigung wird die Prostaglandinbiosynthese aktiviert. Dies führt zu einer Erhöhung unter anderem der Prostaglandin E₂ - Synthese, was dann eine Relaxation der glatten Muskelzellen bewirkt⁸³. Mit der Indomethacin-Gabe wurde also dem durch das Schneiden der Gefäße in Ringe verursachten Gewebsschaden und der damit verbundenen Vasodilatation der Gefäße entgegengewirkt.

In Organbäder I und II (Messung der endothelabhängigen Vasodilatation) wurde dann erneut L-Arginin und in Organbädern III und IV (Messung der endothelunabhängigen Vasodilatation) wurde L-NNA hinzugegeben. Durch seine sympathomimetische Wirkung als α_1 -Adrenozeptoragonist wurde durch Zugabe von Phenylephrin [0,1 μ M] eine submaximale Vorkontraktion erreicht. Diese wurde als Vergleichswert für die Vasoreaktionen auf die im weiteren Verlauf hinzugegebenen Substanzen genommen.

Der nächste Schritt war die Gabe einer Konzentrationsreihe [1 nm - 10 μ M] von Acetylcholin in allen vier Organbädern. Die fünf verschiedenen aufsteigenden Konzentrationen wurden mit einem Abstand von ca. 3 Minuten nacheinander hinzugegeben, damit eine konzentrationsabhängige Reaktion auf Acetylcholin gemessen werden kann. Durch Binden an Rezeptoren der Endothelwand verursacht Acetylcholin eine Aktivierung der eNOS und somit eine endothelabhängige Vasodilatation der Gefäßringe in Organbädern I und II⁵³. Die Gefäßringe III und IV zeigen keine Reaktion auf Acetylcholin, da die eNOS bereits mit L- NNA inhibiert wurde.

Als letzte Substanz wurde nun in Organbädern III und IV eine Konzentrationsreihe von SNAP mit fünf aufsteigenden Konzentrationen [0,1 nM – 10 µM] hinzugegeben. Nach der Gabe von SNAP in die Organbäder, wird von dieser NO abgespalten, das frei diffundieren kann⁸⁴. Dies bewirkt eine Dilatation der Gefäße, die nun bei gehemmter eNOS als endothelunabhängig zu verstehen ist.

3.2.6. Plasmauntersuchungen

Wie in Abbildung 4 dargestellt wurden während der chirurgischen Prozedur zu drei Zeitpunkten Plasmaproben entnommen – vor dem Beginn der extrakorporalen Zirkulation (T1), nach der vollständigen Wiedererwärmung auf 35 °C bzw. vor dem Beginn der Reperfusion (T2) und am Ende der Reperfusion (T3). Zum Zeitpunkt T2 hatten dementsprechend zwei der Gruppen bereits einmalig *DNase I* bekommen, zum Zeitpunkt T3 hatte dann eine Gruppe zusätzlich auch einen zweiten *DNase I* Bolus erhalten. Die Plasmaproben wurden bei - 80 ° C eingefroren und gelagert. Nach Beendigung des letzten Tierversuches wurden diese dann untersucht.

3.2.6.1. Quantifizierung der zellfreien DNA (cfDNA)

Von Interesse waren die cfDNA-Levels, die mit Hilfe des Quant-iT PicoGreen dsDNA Assays bestimmt wurden. Die Plasmaproben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und zentrifugiert. Zum Erstellen einer linearen DNA-Konzentrationskurve wurde ds-DNA-Standard von Kalb Thymus mit phosphatgepufferter Salzlösung ohne Magnesium und Kalzium (PBS) in fünf verschiedenen Konzentrationen [2 µg/ml – 0,125 µg/ml] verdünnt. Sowohl für die ds-DNA-Standard-Proben als auch für die Plasmaproben der Versuchstiere wurde ein Messwert sowie ein Leerwert bestimmt. Für den Messwert wurden 50 µl einer Plasmaprobe bzw. 50 µl ds-DNA-Standard mit 150 µl verdünnter PicoGreen-Lösung gefärbt. In einem zweiten Well wurden 50 µl Plasma oder ds-DNA-Standard mit 150 µl PBS gemischt, was in der folgenden Fluoreszenzmessung als Leerwert zu interpretieren war. Dieser wurde von dem jeweiligen Messwert abgezogen. Die komplette Messung fand als Doppelbestimmung statt. Die Fluoreszenzintensität wurde direkt mit einem Mikroplatten Reader (Victor 3, Perkin Elmer) gemessen.

3.2.6.2. Bestimmung der DNase – Aktivität

Zusätzlich wurde die Aktivität des Enzyms DNase im Plasma nach einem etablierten Protokoll quantifiziert. Die Plasmaproben wurden 1:10 mit PBS, MgSO₄ [10mM] und 1 µg/ml Kalb Thymus DNA verdünnt. Die Proben wurden dann mit PicoGreen gefärbt und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, damit die DNase ihre Wirkung auf die hinzugegebene DNA ausüben konnte. Die Fluoreszenzintensität der Proben wurde zum Zeitpunkt 0 h (vor der Inkubation) und zum Zeitpunkt 2 h (nach der Inkubation) mittels eines Mikroplatten Readers (Victor 3, Perkin Elmer) gemessen. Die DNase - Aktivität wurde berechnet als Quotient zwischen der

Fluoreszenzintensität zum Zeitpunkt 0 h und zum Zeitpunkt 2 h, wobei höhere Werte für eine höhere DNase Aktivität sprechen. Demnach ist die Abnahme der Fluoreszenzintensität in der jeweiligen Probe proportional zu der cfDNA-Menge und umgekehrt proportional zu der DNase Aktivität.

3.2.6.3. Quantifizierung von sICAM-1 und Zytokine im Plasma

Für das Quantifizieren der Levels der Zytokine IFN- γ , IL-10, IL-6 und TNF- α im Tierplasma wurde ein Immunoassay (ProcartaPlex 4 Plex, Thermo Fisher) und der Levels des Endothelschadenmarkers sICAM-1 ein Simplex Kit (Rat ICAM-1 Procarta Plex Simplex, Thermo Fisher) nach Gebrauchsanweisungen des Herstellers (Thermo Fisher) benutzt. Alle Proben wurden anhand des Geräts Luminex 200 System (Thermo Fisher), befindlich in dem Max-Plank-Institut für Stoffwechselforschung, Köln, analysiert.

3.2.7. Datenauswertung

Nach Beenden des letzten Versuches wurde die Zugehörigkeit jedes Tiers zu einer der drei Gruppen entblindet.

Die Daten für die statistische Auswertung wurden aus den digitalen Aufzeichnungen der einzelnen Versuche entnommen. Auf diesen kann zu jedem Zeitpunkt die an dem jeweiligen Ring gemessene Kraftveränderung in cN abgelesen werden. Abbildung 10 stellt als Auszug aus einer Messung ein Beispiel dar.

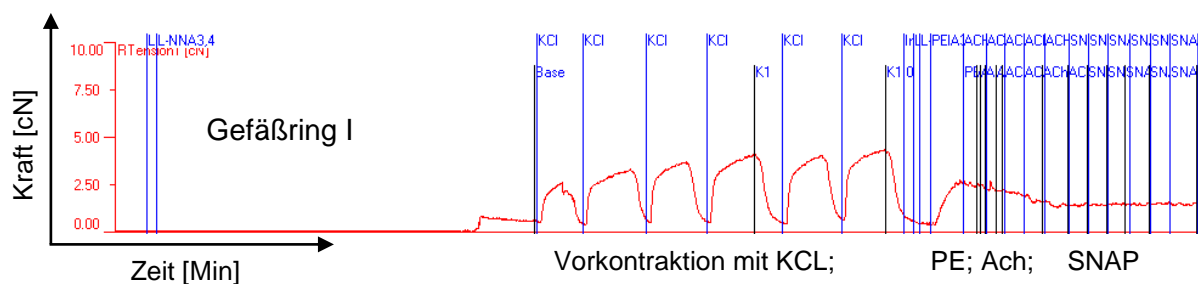


Abbildung 10: Digitale Aufzeichnung einer Messung an einem Gefäßring

Als Vergleichswert wurde die maximale gemessene Kontraktionskraft nach der Phenylephrin-Gabe genommen. Die gemessene Kraftreaktion der Gefäße nach jeder folgender Substanzgabe wurde als prozentualer Anteil von dem Phenylephrin-Maximum berechnet. Für jede Messung wurde ein Mittelwert der Messwerte an Gefäßringen I und II (endothelabhängige Vasoreaktion) und ein Mittelwert der Messwerte an Gefäßringe III und IV (endothelunabhängige Vasoreaktion) gebildet. Für jede Tiergruppe wurde ein Mittelwert dieser Daten berechnet und statistisch ausgewertet.

Aufgrund von diffuser Blutung und folglich sehr niedrigen Hämoglobinwerten und katecholaminrefraktärer Hypotonie während der operativen Prozedur wurden zwei

Versuchstiere aus der Gesamtauswertung herausgenommen. Somit ergaben sich jeweils 7 Tiere für die Kontrollgruppe und für Gruppe „1 x DNase I“ und 8 Tiere für Gruppe „2 x DNase I“. Die aus den Plasmaprobenmessungen gewonnenen Daten wurden für jede Tiergruppe und Zeitpunkt (T1, T2, T3) statistisch analysiert.

Die statistische Analyse und die grafische Darstellung erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) errechnet. Der Kolmogorov-Smirnov Test wurde angewendet, um die Normalverteilung der Daten zu überprüfen. Es wurde eine Varianzanalyse (one-way ANOVA) der normal verteilten Werte der verschiedenen Gruppen mittels Newman Keuls post-hoc Test berechnet. Der Pearson Korrelationskoeffizient (r) wurde eingesetzt, um Korrelationen festzustellen. Als statistisch signifikante Ergebnisse wurden P-Werte <0.05 angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Einfluss von DNase I auf die Gefäßfunktion

In dieser Studie wurden Ratten an eine HLM für Kleintiere angeschlossen. Im Rahmen des Verfahrens wurde ein Kreislaufstillstand erzeugt, indem die Ratten im Rahmen des DHCA unterkühlt wurden. Dadurch wurde eine kontrollierte Ischämie induziert, gefolgt von einer Wiedererwärmung und Reperfusion der Versuchstiere.

Die Versuchstiere wurden zufällig und gleichmäßig in drei Gruppen aufgeteilt, wobei die erste die Kontrollgruppe war. Die Tiere, die in der zweiten Versuchsgruppe eingeschlossen wurden, bekamen eine einmalige *DNase I* Gabe (i.v.) vor dem DHCA (T1). Die Tiere in der dritten Gruppe erhielten eine weitere, zweite *DNase I* Gabe nach der Wiedererwärmung bzw. vor der Reperfusion (T2). Am Ende der Reperusionszeit (T3) wurden die Tiere euthanasiert und ihre Aorten für weitere Untersuchungen entnommen.

Zur Überprüfung der Auswirkung von i.v. *DNase I* Gabe intraoperativ auf die Gefäßfunktion wurden funktionelle Untersuchungen an den postoperativ entnommenen Rattenaorten durchgeführt. Nach einer Vorkontraktion mit 0,1 μM Phenylephrin (PE) wurden die gewonnenen Gefäßringe mit Acetylcholin (1 nM – 10 μM) dilatiert, wodurch die endothelabhängige Gefäßreaktion zwischen den Tieren aus den drei Versuchsgruppen verglichen werden konnte (Abbildung 11). Die Gefäßringe der Tiere, die zweimalig *DNase I* bekommen hatten, wiesen die am stärksten ausgeprägte Vasodilatationsfähigkeit unter den drei Gruppen auf, was an der deutlich abnehmenden Kontraktionskraft im Vergleich zur PE-Vorkontraktion erkennbar ist. Die Aortenringe der Tiere aus der „2 x *DNase I*“ Gruppe reagierten auf die drei höchsten Acetylcholinkonzentrationen (100 nM - 10 μM) mit einer signifikant besseren Relaxation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei den Tieren, die nur eine *DNase I* - Gabe bekommen hatten, konnte auch eine sichtbar bessere endothelabhängige Vasorelaxation im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden, diese war aber statistisch nicht signifikant.

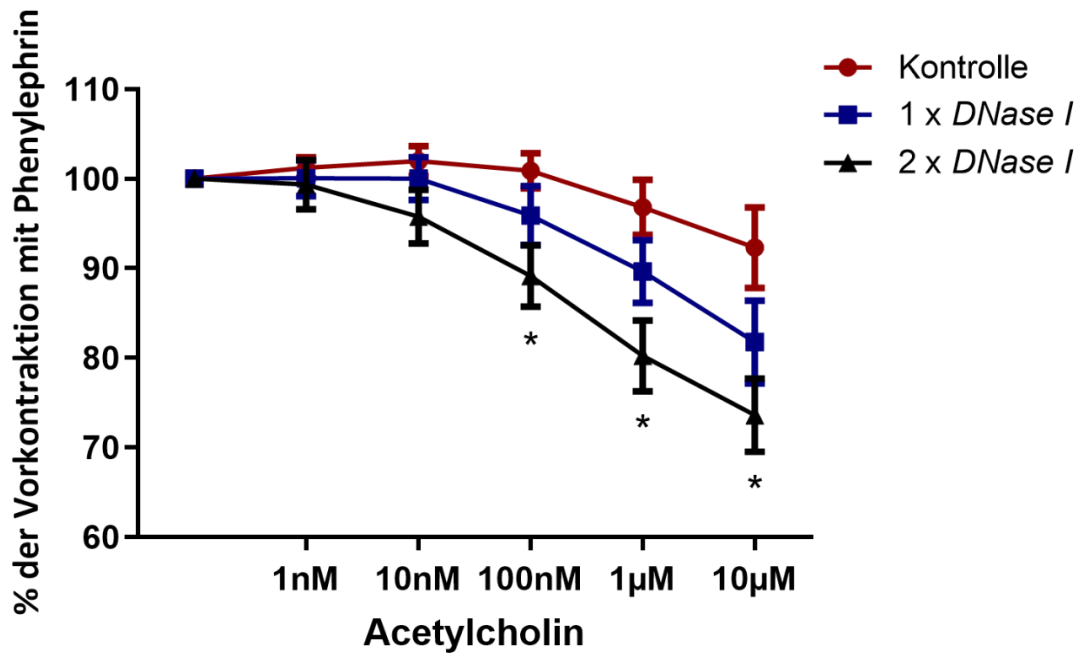


Abbildung 11: Endothelabhängige Gefäßreaktion. Die mit Phenylephrin (0,1 µM) vorkontrahierten Gefäßringe wurden mit Acetylcholin (1 nm – 10 µM) als Auslöser der endothelabhängigen NO-Produktion dilatiert. Die dadurch bewirkte Vasorelaxation ist als Verhältnis zu der PE-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Kontrolle (n=7), 1 x DNase I (n=7), 2 x DNase I (n=7). *p<0,05 im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Als Kontrolle wurde in einem parallelen Ansatz die endothelunabhängige Vasoreaktion überprüft, nachdem im Vorfeld an bestimmten Gefäßringen die endothelabhängige NO-Produktion gehemmt wurde. Dies erfolgte während den funktionellen *ex vivo* Untersuchungen durch die Hinzugabe von L-NNA (100 µM), welches das Enzym eNOS inhibiert. Die Hinzugabe von Acetylcholin (1 nm – 10 µM) zu den mit PE-vorkontrahierten Gefäßringen führte dann zu keiner Dilatation (nicht gezeigt), was den Erfolg der Hemmung der eNOS bestätigte. Zu den Gefäßringen wurde dann SNAP (0,1 nM – 10 µM) als externer NO-Donor hinzugefügt. Wie in Abbildung 12 zu sehen, führten vor allem die zwei höchsten SNAP-Konzentrationen (1 µM, 10 µM) zu einer deutlich erkennbaren Abnahme der an den Gefäßringen aller drei Gruppen gemessenen Kontraktionskraft im Vergleich zur PE-induzierten Vorkontraktion.

Die Messung der endothelunabhängigen Reaktion in den drei Versuchsgruppen zeigte sehr ähnliche Ergebnisse. Auf keiner SNAP-Konzentration zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Versuchsgruppen, wobei aber die Dilatationsfähigkeit der Gefäßringe in allen Versuchsgruppen auf externer NO-Hinzugabe gegeben war. Das nahezu gleiche Ergebnis in der Funktion der Gefäßringe aller Gruppen nach externer NO-Gabe deutet darauf hin, dass die Gefäßringe nicht beschädigt und grundsätzlich funktionsfähig waren.

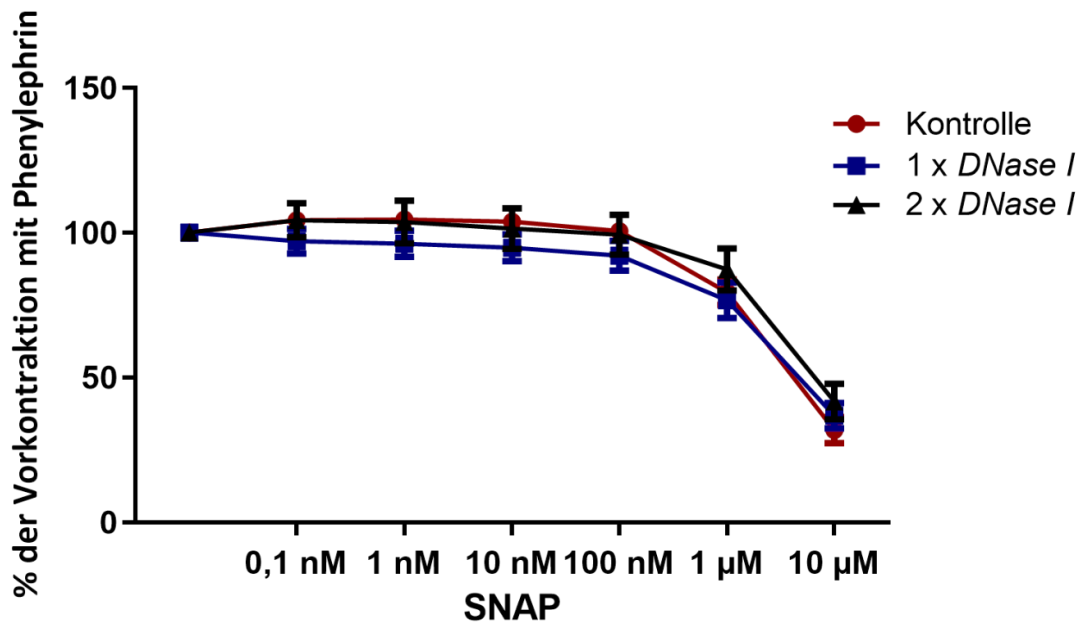


Abbildung 12: Endothelunabhängige Gefäßreaktion. Um die endothelunabhängige Gefäßreaktion zu testen, erfolgte die Hemmung der endothelialen NO-Synthase mit L-NNA (100 µM). Nach einer PE-induzierten (0,1 µM) Vorkontraktion wurde der NO-Donor SNAP (0,1 nM – 10 µM) zu den Gefäßringen hinzugegeben. Die dadurch bewirkte Vasorelaxation ist als Verhältnis zu der PE-induzierten Vorkontraktion dargestellt. Kontrolle (n=6), 1 x *DNase I* (n=7), 2 x *DNase I* (n=7).

Zur weiteren Untersuchung der Auswirkung von *DNase I* auf die Gefäße wurde der Endothelschadenmarker ICAM-1 im Plasma der Tiere zu drei verschiedenen Zeitpunkten quantitativ gemessen – vor dem Start der extrakorporalen Zirkulation (T1) sowie vor (T2) und nach der Reperfusion (T3) (Abbildung 13). Zum einen ergab sich ein signifikanter Anstieg der ICAM-1 - Konzentration innerhalb jeder Gruppe nach der Reperfusion (T3) im Vergleich zu der ICAM-1 - Menge vor dem Start der EKZ (T1) und zusätzlich im Vergleich zu der ICAM-1-Menge vor der Reperfusion (T2). Zum anderen zeigte die Messung signifikant niedrigere Konzentrationen von ICAM-1 nach der Reperfusion (T3) in der Tiergruppe, die nur einen *DNase I* Bolus bekommen hatte, verglichen mit der ICAM-1 - Konzentration in der Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt (T3). Die Abnahme der ICAM-1 – Konzentration nach der Reperfusion (T3) in den Versuchstieren, die zweimalig *DNase I* erhalten haben im Vergleich zu den Kontrolltieren, war zwar deutlich erkennbar, aber nicht signifikant.

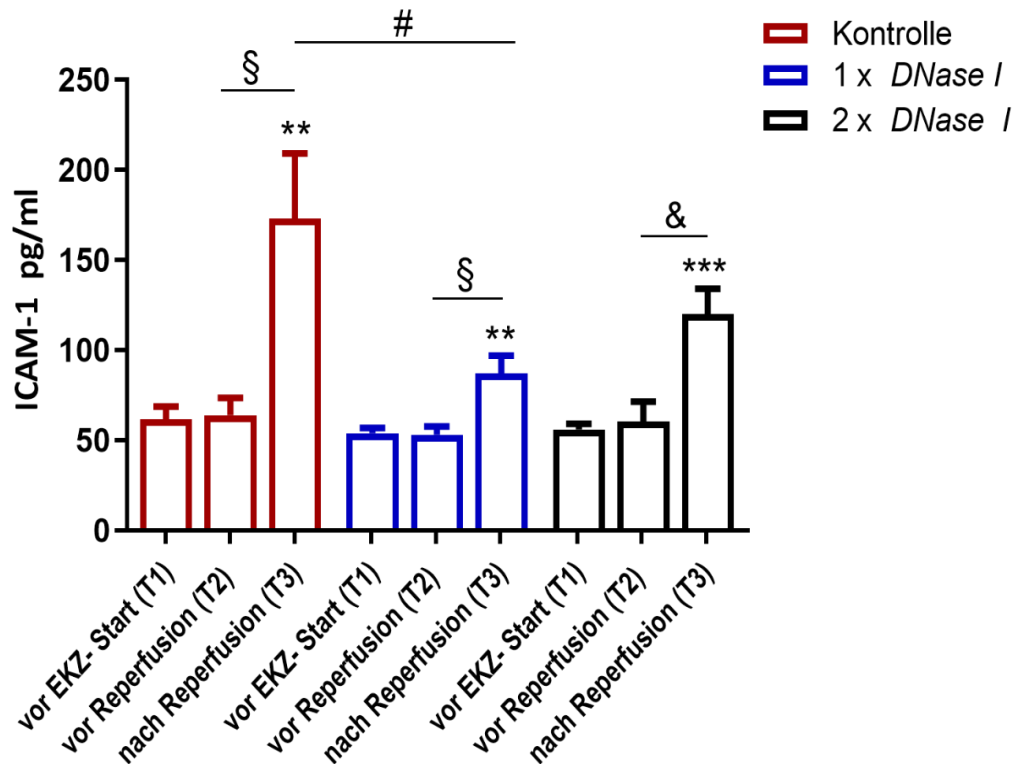


Abbildung 13: Quantifizierung von ICAM-1 im Plasma. Zur Untersuchung der Endothelaktivierung wurde als Marker für Endothelschaden das lösliche Intrazelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) im Plasma bestimmt. Kontrolle (n=7), 1 x *DNase I* (n=7), 2 x *DNase I* (n=8). **p<0,01, ***p<0,001 vs. T1; #p<0,05, §p<0,01, &p<0,001.

4.2. Auswirkung von *DNase I* auf die *DNase* - Aktivität und auf die cfDNA-Konzentration

Um Rückschlüsse auf die Aktivität des während der chirurgischen Prozedur intravenös verabreichten Enzyms *DNase I* ziehen zu können, wurde im Weiteren die *DNase* – Aktivität in den Plasmaproben zu allen Zeitpunkten bestimmt (Abbildung 14A).

In der Gruppe, die nur einmalig *DNase I* bekommen hatte, war eine erhöhte *DNase* Aktivität vor der Reperfusion (T2) zu messen. Auf der anderen Seite war in dieser Gruppe nach der Reperfusion (T3) eine kaum veränderte Aktivität der *DNase* im Vergleich zum Zeitpunkt T1 (vor dem EKZ-Start) zu erkennen. Im Unterschied dazu, zeigte sich bei den Ratten, die zweimalig *DNase I* bekommen hatten, sowohl vor (T2) als auch nach der Reperfusion (T3) eine signifikant erhöhte *DNase*- Aktivität im Vergleich zum Zeitpunkt T1 (vor dem EKZ-Start). Der statistische Vergleich unter den einzelnen Versuchsgruppen zeigte, dass die *DNase* - Aktivität vor der Reperfusion (T2) in der „1 x *DNase I*“ und in der „2 x *DNase I*“ Gruppe signifikant höher war, verglichen mit der Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt (T2).

Nur in den Ratten, die eine zweite *DNase I* - Behandlung zum Zeitpunkt T2 (vor der Reperfusion) erfahren hatten, war die *DNase* - Aktivität auch nach der Reperfusion (T3) signifikant höher, verglichen mit den anderen beiden Versuchsgruppen.

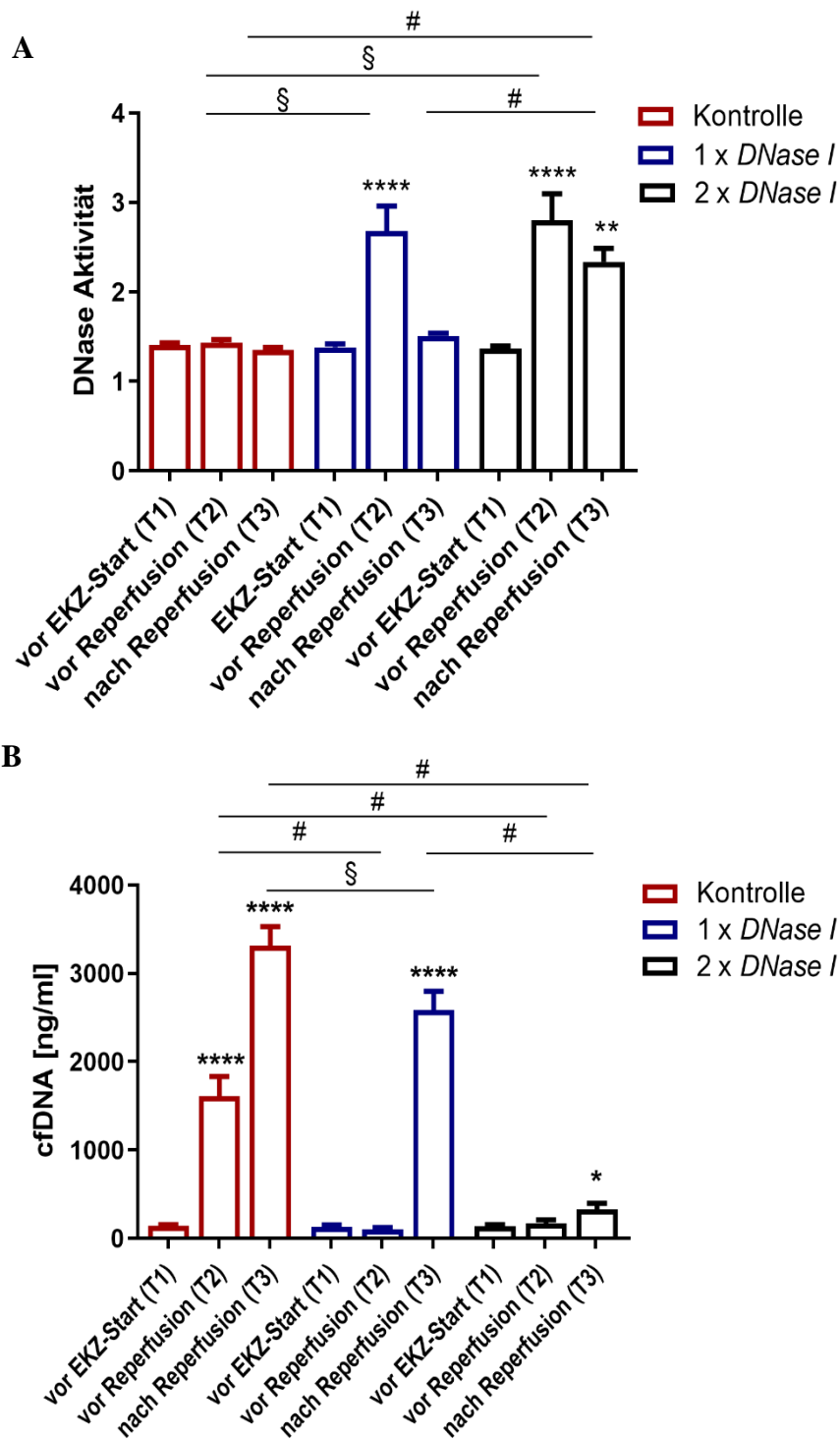


Abbildung 14: Bestimmung der DNase-Aktivität und der cfDNA-Konzentration im Plasma. Die Messung der DNase Aktivität (A) wurde durchgeführt, um die Wirkung des intraoperativ gegebenen Enzyms DNase I beurteilen zu können. Um eine Aussage über die Veränderung der cfDNA-Konzentration im Plasma nach i.v. DNase I – Gabe treffen zu können, wurden die cfDNA-Levels (B) im Plasma quantifiziert. Kontrolle (n=7), 1 x DNase I (n=7), 2 x DNase I (n=8). *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001 vs. T1; §p<0,01, #p<0,0001.

Zusätzlich wurden auch die cfDNA-Levels im Plasma quantitativ bestimmt (Abbildung 14B). Die cfDNA - Menge war nach der Reperfusion (T3) in allen Gruppen im Vergleich zum Zeitpunkt vor dem EKZ-Start (T1) erhöht, wobei dies am deutlichsten in der Kontrollgruppe zu sehen war. Außerdem zeigte sich vor der Reperfusion (T2) in der Kontrollgruppe auch eine signifikant erhöhte cfDNA-Menge im Vergleich zum Zeitpunkt T1.

Bei den Gruppen, die *DNase I* vor dem DHCA bekommen hatten, konnte vor der Reperfusion (T2), also circa zwei Stunden nach der erwähnten *DNase I* – Gabe, eine sehr niedrige cfDNA-Konzentration nachgewiesen werden und dadurch eine signifikante Senkung der cfDNA-Mengen im Plasma im Vergleich zur Kontrollgruppe (T2).

Nach der Reperfusion (T3) konnte zum einen eine signifikant niedrigere Menge an cfDNA in der „1 x *DNase I*“ sowie in der „2 x *DNase I*“ - Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. Zu diesem Zeitpunkt nach der Reperfusion (T3) hatte die „2 x *DNase I*“ Gruppe auch den zweiten *DNase I* Bolus bereits erhalten. Entsprechend war in den Tieren der „2 x *DNase I*“ Gruppe die cfDNA-Konzentration nach der Reperfusion (T3) signifikant niedriger als in der „1 x *DNase I*“ Gruppe zum gleichen Zeitpunkt (T3).

Weiterhin von Interesse war, ob die cfDNA-Levels im Plasma mit der endothelabhängigen Gefäßfunktion zusammenhängen. Die cfDNA-Konzentrationen aus allen Versuchstieren, die zum Zeitpunkt T3 gemessen wurden, sowie die im Vergleich zur PE-induzierten Vorkontraktion erreichte endothelabhängige Relaxationsfähigkeit der Aortenringe nach Zugabe von 10 µM Acetylcholin wurden verwendet, um eine Korrelation zu erstellen.

In Abbildung 15 ist zu sehen, dass die Versuchstiere, in deren Plasma am Ende der Reperfusion (T3) die höchsten cfDNA-Konzentrationen gemessen wurden, in der funktionellen Untersuchung auch die schwächste Dilatation nach Acetylcholingabe und somit eine deutlich schlechtere Endothelfunktion aufwiesen. Wiederum hatten die Tiere mit niedrigeren cfDNA-Levels nach der Reperfusion eine bessere endothelabhängige Vasorelaxation.

Grundsätzlich wiesen die Tiere mit *DNase I* - Behandlung während EKZ mit DHCA nach der Reperfusion (T3) die niedrigsten cfDNA-Konzentrationen im Plasma auf (Abbildung 14B).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der cfDNA-Plasmakonzentration und der Endothelfunktion besteht. Die positive Korrelation zwischen diesen zwei Faktoren deutet darauf hin, dass sich hohe cfDNA-Levels negativ auf die Endothelfunktion auswirken.

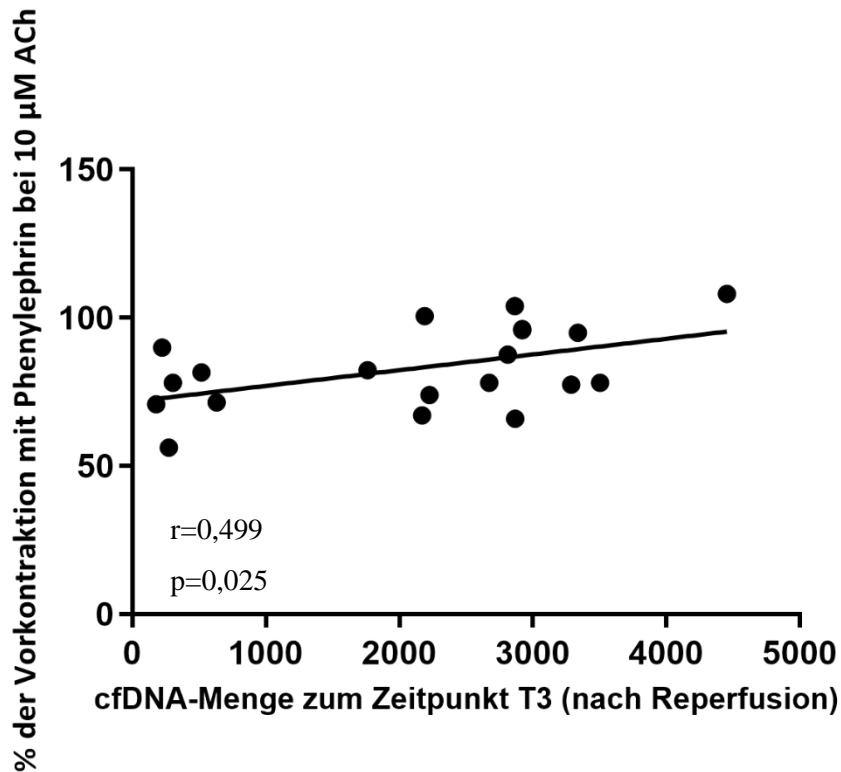


Abbildung 15: Korrelation zwischen der cfDNA-Konzentration und der endothelabhängigen Gefäßfunktion. Um den Zusammenhang zwischen den cfDNA-Konzentrationen nach der Reperusionsphase zum Zeitpunkt T3 und der durch Acetylcholin (10 µM) bewirkten Vasorelaxation aller Versuchstiere zu untersuchen, wurde eine Korrelation nach Pearson errechnet. Diese war positiv (Pearson's Koeffizient $r=0,499$) und statistisch signifikant ($p=0,025$).

4.3. Einfluss von DNase I auf die Entzündungsreaktion

Zur Evaluierung der Entzündungsreaktion unter EKZ und ihrem Zusammenhang mit *DNase I* wurden die Zytokine IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ im Plasma der Tiere quantifiziert (Abbildung 16). Die Zytokinkonzentrationen wurden in den zu den Zeitpunkten vor EKZ-Start (T1), vor (T2) und nach Reperfusion (T3) entnommenen Plasmaproben bestimmt. Dies erfolgte mittels eines kundenspezifischen Immunoassays.

Wie in Abbildung 16 zu sehen, ließen sich bei allen Zytokinen zu den Zeitpunkten vor dem EKZ-Start (T1) und vor der Reperfusion (T2) sehr niedrige bis hin zu nicht detektierbaren Mengen unterhalb der Nachweisgrenze messen. Nach der Reperfusion (T3) konnte ein deutlicher Anstieg der Konzentrationen aller gemessenen Zytokine innerhalb der jeweiligen Gruppen beobachtet werden.

Es konnte eine signifikante Reduktion des proinflammatorischen Zytokins IL-6 nach der Reperfusion (T3) bei Ratten mit zweimaliger *DNase I*-Behandlung im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe (T3) ermittelt werden. Zusätzlich ließ sich nach der Reperfusion (T3) eine Erhöhung des vorwiegend antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in den Gruppen mit einmaliger und zweimaliger *DNase I*-Gabe im Vergleich zur Kontrollgruppe (T3) vermuten, wobei dieser

Unterschied statistisch nicht signifikant war. Ebenso schien die TNF- α -Erhöhung zum Zeitpunkt T3 in der „2 x DNase I“ Gruppe etwas stärker als in den anderen zwei Gruppen (T3) ausgeprägt zu sein, wobei dies auch keine statistische Signifikanz aufwies.

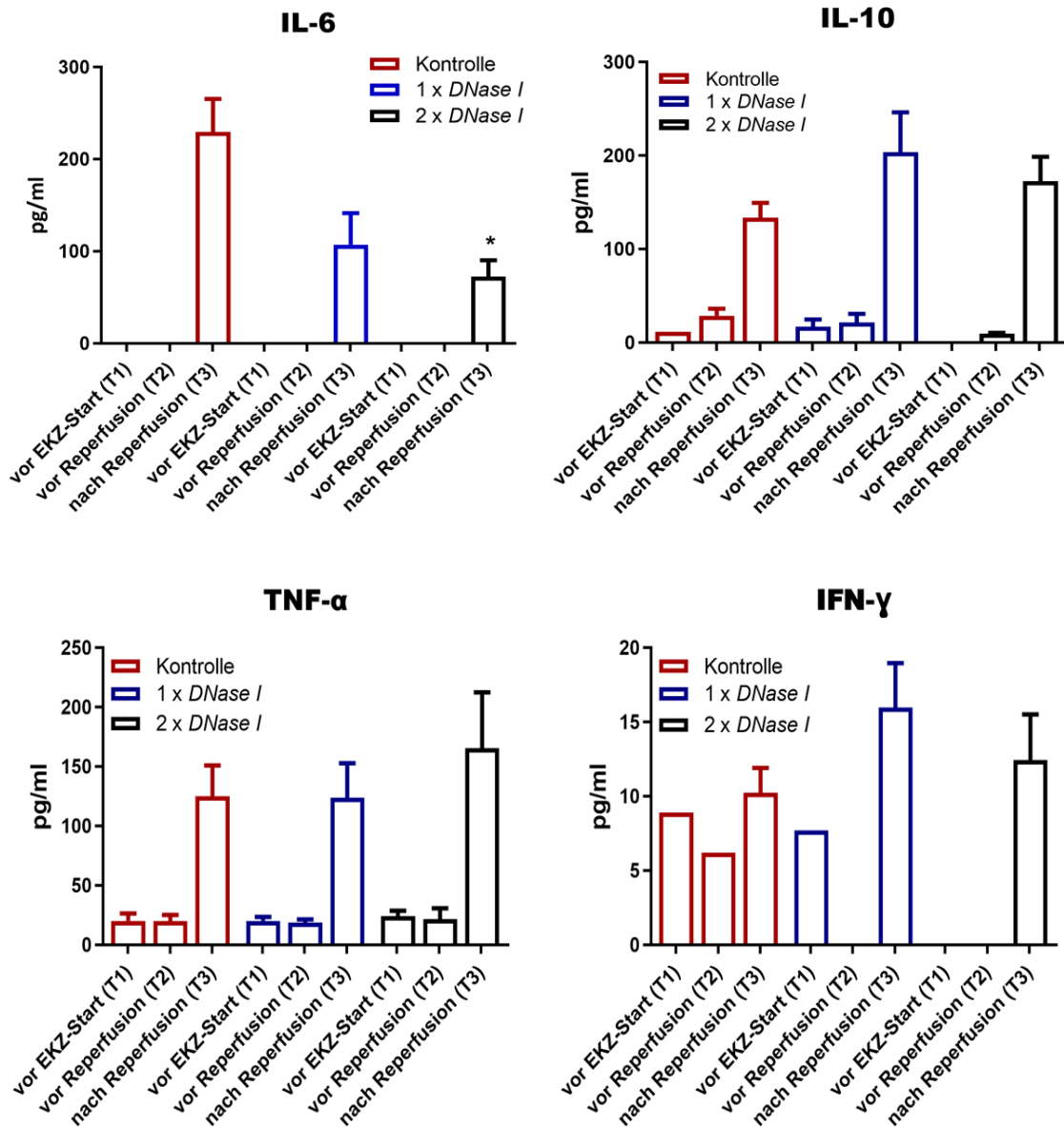


Abbildung 16: Quantifizierung von Zytokinen im Plasma. Um Einblicke über die Entzündungsreaktion bei Ratten mit *Deep Hypothermic Cardiac Arrest* und EKZ sowie über die Wirkung von *DNase I* auf diese zu bekommen, wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ im Plasma der Tiere bestimmt. Kontrolle (n=7), 1 x *DNase I* (n=7), 2 x *DNase I* (n=8). *p<0,05 vs. Kontrollgruppe (T3).

5. Diskussion

Die chirurgischen Eingriffe mit der Unterstützung einer HLM sind unentbehrlich für die heutige Herzchirurgie. Trotz ständigen Verbesserungen und Innovationen der HLM⁸⁵ sowie Optimierung der Leitlinien zur Durchführung des Operationsablaufs und des perioperativen Managements⁸⁶, gehen diese Eingriffe mit einer hohen postoperativen Komplikationsrate einher. Zu den Komplikationen gehört auch die SIRS, welche durch das körpereigene Immunsystem verursacht wird und häufig zu einer postoperativen Organdysfunktion führt⁸⁷.

In dem hier vorgestellten Projekt handelt es sich um ein HLM-Modell der Ratte mit tiefer Hypothermie, anhand dessen die Wirkung des Enzyms *DNase I* auf das Endothel und auf die postoperative Entzündungsreaktion untersucht wird. Hierfür wurde die SIRS-Entwicklung durch die Messung verschiedener Substrate im Blutplasma quantifiziert. Untersucht wurden die Veränderungen der Plasmakonzentrationen von cfDNA/NETs, welche ein Mechanismus der Zellabwehr darstellen, sowie von einer Auswahl an Zytokinen. Zusätzlich wurden funktionelle *ex vivo* Testungen an den Tiergefäßen durchgeführt, um die Gefäßfunktion und die Endothelschädigung zu evaluieren.

Viele verschiedene pathophysiologische Kaskaden sind an der SIRS - Entstehung beteiligt. Um die Aktivierung dieser zu minimieren, werden zum einen technische Optimierungen der HLM untersucht. Darunter zu nennen sind zum Beispiel die minimierte extrakorporale Zirkulation, das Durchführen von Operationen für Koronarbypässe ohne HLM (off-pump coronary artery bypass) und das Anwenden von Ultrafiltration und Leukozytenfiltration während der Eingriffe⁸⁸.

Zum anderen setzt sich ein Schwerpunkt der Forschung auf mögliche therapeutische Ansatzpunkte gegen einzelne körpereigene Mechanismen der inflammatorischen Immunreaktion. Dazu gehört eine Palette von Medikamenten, unter welchen Cortikosteroide, Complementfaktorinhibitoren, Phosphodiesteraseinhibitoren und antioxidative Pharmaka als Beispiele genannt werden können⁸⁹. In diesem Sinne untersucht die hier vorgestellte Studie eine mögliche protektive Wirkung des Enzyms *DNase I* auf das Endothel. Das Enzym *DNase I* wird vom menschlichen Körper vor allem im Pankreas produziert⁶⁷. Unter bestimmten Bedingungen wird die *DNase I* aktiviert und zerstört Chromatinstrukturen⁹⁰.

Diese Funktion findet bereits klinische Anwendung als die rekombinante humane *DNase I* (*Pulmozyme*) bei der Behandlung der zystischen Fibrose. Bei dieser Erkrankung besteht eine erhöhte Sekretviskosität, welche durch freigesetzte extrazelluläre DNA bedingt ist. *DNase I* destruiert dann diese zellfreie DNA und führt somit zu einer leichteren Sekretablösung und zu einer Symptombesserung⁶⁹.

Die Interaktion zwischen *DNase I* und cfDNA/NETs stand im Fokus dieser Arbeit. NETs stellen einen vor einigen Jahren entdeckten Mechanismus der Immunabwehr dar. Sie werden durch aktivierte PMNs nach bestimmten Stimuli freigesetzt und bestehen aus einem

Chromatingerüst. Pathogene Mikroorganismen werden in das produzierte Chromatingerüstnetz eingefangen und immobilisiert²⁹.

Die Freisetzung von NETs wird durch verschiedene Faktoren induziert, unter diesen auch aktivierte Thrombozyten und proinflammatorische Zytokine^{33,37}. Trotz ihrer primären Abwehrfunktion gibt es bei einer Überproduktion von cfDNA/NETs eine zunehmende Zahl an Hinweisen für Pathologien. Einige Bestandteile der NETs, wie Histone und MPO, sind verantwortlich für die Zytotoxizität der NETs⁶⁴. Die NETs führen zu Gewebsschaden und insbesondere Schädigung der epithelialen und endothelialen Zellen, zu Erhöhung des Thromboserisikos und besitzen eine proinflammatorische Wirkung durch die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine³⁵.

Eine durch I/R-Schaden verursachte Zunahme der cfDNA/NETs-Konzentrationen im Plasma wurde bereits in einem Ratten-Modell für intestitiellen I/R Schaden⁷² sowie für testikuläre Torsion demonstriert^{72,91}. In Anbetracht dessen spielt die NETs-Freisetzung eine Rolle bei der pathophysiologischen Entzündungskaskade nach HLM-Eingriffen beim Menschen, weil der I/R-Schaden maßgeblich für die SIRS-Entstehung ist⁹². In diesem Zusammenhang konnten Qi *et al.* zeigen, dass die Aktivierung der PMNs infolge der EKZ mit der erhöhten Konzentration von cfDNA korreliert, sodass die cfDNA-Plasmaquantifizierung als Marker der NETs-Freisetzung angenommen werden kann⁴⁵. Darüber hinaus haben frühere Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Endothelzellschädigung nach EKZ mit einer cfDNA-Plasmakonzentrationserhöhung assoziiert ist⁴⁶.

Auch die Studie von Savchenko *et al.* zeigt eine protektive Wirkung von *DNase I* auf das Gewebe. Das Enzym führte zu einer Reduktion der cfDNA/NETs-Konzentration im Plasma und einer Minderung des myokardialen Schadens nach I/R⁷⁰. Eine weitere Studie zeigt, dass die Anwendung von *DNase I* zu einer Reduktion der NETs-Gewebsdichte, einer Verbesserung der koronaren mikrovaskulären Durchgängigkeit sowie einer Verminderung der Infarktgröße im Rahmen der myokardialen Ischämie und dem koronaren "no reflow" Phänomenen führt⁹³. Des Weiteren wurde in der Studie von Boettcher *et al.* eine Reduktion der Apoptose, des oxidativen Stresses und der Inflammation durch i.v. Administration von *DNase I* nachgewiesen⁹¹.

In dieser Arbeit konnten zum einen erhöhte cfDNA/NETs Konzentrationen im Plasma der Tiere der Kontrollgruppe nach dem EKZ-Anschluss gezeigt werden. Zum anderen führte die i.v. Verabreichung von *DNase I* zu einer deutlichen Reduktion der cfDNA/NETs Plasmakonzentration, übereinstimmend mit den Ergebnissen von Boettcher *et al.*⁹¹ Hier wichtig sind auch die Hinweise auf eine kurzzeitige Wirksamkeit des Enzyms. In der Tiergruppe, die *DNase I* einmalig vor dem EKZ-Start bekommen hat, konnte eine Reduktion der cfDNA/NETs nur nach der Wiedererwärmung, aber nicht nach der Reperfusion erreicht werden. Im Plasma der Tiere, die zwei Mal *DNase I* bekommen haben, zeigten sich niedrige cfDNA/NETs Konzentrationen auch am Ende der Reperfusion.

Die Aktivität des Enzyms DNase im Plasma wurde in dieser Studie ebenfalls gemessen. Bei den Tieren mit einer einmaligen *DNase I* Dose zeigte sich eine hohe DNase Aktivität nur nach der Wiedererwärmung der Tiere. Nach der Reperfusion war die DNase Aktivität wieder auf dem Anfangslevel. Im Unterschied dazu zeigte sich in der Messung der DNase Aktivität in der Gruppe mit zwei *DNase I* Gaben ähnlich hohe Ergebnisse sowohl nach der Wiedererwärmung der Tiere als auch nach der Reperfusion. Die oben bereits erwähnten Ergebnisse bezüglich der kurzfristigen enzymatischen Wirkung des Enzyms *DNase I* im Serum werden hier bestätigt. Dies lässt sich womöglich durch im Plasma vorhandenen Inhibitoren der DNase Aktivität wie z.B. Aktin erklären⁹⁴.

Die Veränderungen der Endothelfunktion durch die EKZ wurden in zahlreichen Studien erforscht. Es ist bekannt, dass eine Schädigung des Endothels infolge der EKZ durch Faktoren der inflammatorischen Immunreaktion des Körpers bedingt ist und in Zusammenhang mit vielen der postoperativen Komplikationen steht⁶¹. Die inflammatorischen Bedingungen führen bei mit EKZ operierten Patienten zu einer Plasmakonzentrationserhöhung von sICAM-1, was als Zeichen einer erhöhten Endothelzellexpression von ICAM-1 gedeutet wird. Letzteres ist notwendig für die Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten⁹⁵.

In dieser Studie konnte die sICAM-1-Konzentrationsveränderung durch EKZ reproduziert werden. Im Plasma der Versuchstiere der Kontrollgruppe waren während und am Ende des EKZ-Modells mit tiefer Hypothermie gestiegene sICAM-1-Konzentrationen nachweisbar. Zusätzlich konnte in der Kontrollgruppe ein Konzentrationsanstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α sowie von dem antiinflammatorischen IL-10 am Ende der Reperfusion der Tiere nachgewiesen werden. Eine ähnliche Veränderung dieser Mediatoren wurde auch bereits im Plasma von Patienten nach EKZ nachgewiesen^{96,21}. Daraus lässt sich ableiten, dass das EKZ-Modell mit tiefer Hypothermie eine inflammatorische Immunreaktion im Tierorganismus provoziert, welche mit der menschlichen inflammatorischen Immunreaktion auf die EKZ vergleichbar ist. Diese Erhöhung der Zytokinkonzentration im Plasma ist mitbedingt durch die entstandenen cfDNA/NETs. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass die NETs im Sinne ihrer proinflammatorischen Wirkung die Freisetzung von Zytokinen triggern⁹⁷.

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Studie eine Reduktion der Plasmakonzentrationen der Zytokinen IL-6, IL-10 und TNF- α sowie des sICAM-1 durch die i.v. Verabreichung von *DNase I*. Unsere Arbeitsgruppe hat zudem eine signifikante Reduktion der Expression der als Endothelschadenmarker geltende Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM im Aortengewebe nach zweifacher Gabe von i.v. *DNase I* gezeigt⁹⁸. Außerdem ergab sich im Rahmen von Zellkulturuntersuchungen eine Hochregulation der Genexpression von ICAM und VCAM bei Zellen, welche mit NETs inkubiert wurden. Das deutet auf eine Aktivierung der Endothelzellen durch NETs hin, was mit den Ergebnissen von Folco *et al.* übereinstimmt⁹⁹. Zusätzlich fand

sich bei mit *DNase I* behandelten Ratten eine Reduktion der Leukozyteninfiltration des Lungengewebes, was an der geringeren Anzahl von CD45-positiven sowie MPO-positiven Zellen gezeigt wurde. Darüber hinaus war die MPO-Aktivität im Lungengewebe in Ratten mit *DNase I* Behandlung deutlich reduziert⁹⁸.

Diese Hinweise auf eine Reduktion der Inflammation lassen sich am ehesten durch die Reduktion der Plasmakonzentrationen von cfDNA/NETs bei ihrer Degradation durch *DNase I* vermuten. In Anbetracht dessen lässt es sich schließlich schussfolgern, dass die *DNase I* die Entzündungsreaktion minimiert, indem womöglich die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch die Reduktion der dafür mitverantwortlichen cfDNA/NETs reduziert wird.

In dieser Arbeit wurde erstmals auch die Wirkung von *DNase I* auf die Gefäßfunktion *ex vivo* untersucht. Die hierfür verwendete isometrische Messung der Kontraktionskraft der Gefäßringe ist eine etablierte Methode zur Untersuchung der Endothelfunktion *ex vivo*¹⁰⁰.

Die Endothelzellschädigung während EKZ-Eingriffen lässt sich pathophysiologisch auch durch den I/R-Schaden erklären. Dieser verursacht durch eine Reduktion des vom Endothel produzierten NO eine mikrovaskuläre Dysfunktion. Dies ist ein Trigger für die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen und führt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität. Die Reperfusion des ischämischen Gewebes verändert die vasokonstriktive Reaktion der Zellen, sodass eine verschlechterte NO-abhängige endotheliale Vasoreaktivität besteht. Die Hypoxie induziert die Expression von endothelialen Genen wie Adhäsionsmoleküle und Zytokine, während zum Beispiel die eNOS unterdrückt wird. Die Reoxygenation verschärft diese Endothelzellantworten. Die primäre postischämische Manifestation eines Endothelzellschadens und Endothelzelldysfunktion ist die verschlechterte endothelabhängige NO-abhängige Relaxationsfähigkeit der Gefäße⁶³.

Wie bereits beschrieben, führte eine Inkubation mit NETs zu einer gesteigerten Genexpression von ICAM und VCAM im Aortengewebe. Aussagekräftig waren auch die Ergebnisse der sICAM-1 Quantifizierung als Endothelschadensmarker und Marker der Endothelzellaktivierung. Die niedrigeren sICAM-1-Konzentrationen am Ende des EKZ-Eingriffes mit tiefer Hypothermie in der Tiergruppe, die *DNase I* bekommen hat im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe deuten auf eine reduzierte Endothelzellaktivierung und -schädigung. sICAM spielt für den Austritt von Leukozyten ins extravasale Gewebe, wo sie ihre zytotoxischen gewebsschädigenden Substanzen freisetzen, eine entscheidende Rolle¹¹. Aufgrund dessen ist durch die *DNase I* Behandlung eine Verminderung des Gewebsschadens zu erwarten und konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Im Rahmen der funktionellen Testungen an den Rattenaorten konnte das Verabreichen von i.v. *DNase I* eine signifikante Verbesserung der Vasoreaktion und somit eine Verminderung des Endothelschadens erzeugen. Die durch *DNase I* reduzierte sICAM-1-Konzentrationen bestätigen die protektive

Wirkung der *DNase I* auf das Endothel und seine Funktionsfähigkeit sowie die Minimierung der Endothelzellaktivierung und vermutlich der daraus folgenden Gewebsschaden.

Während EKZ Eingriffen entsteht, wie in dieser Doktorarbeit gezeigt sowie in klinischen Studien mit Patienten bereits bestätigt, eine Erhöhung der cfDNA/NETs-Plasmakonzentrationen. Es konnte dargestellt werden, dass Histone und MPO als Bestandteile der NETs eine von deren Konzentration abhängige Zytotoxizität besitzen und zu dem Zelltod von Endothelzellen führen können⁶⁴.

Es ist anzunehmen, dass die Reduktion der cfDNA-Konzentrationen zu einer Verminderung der Endothelzellschädigung beiträgt. Die statistische Analyse unserer Ergebnisse ergab eine positive Korrelation zwischen den cfDNA/NETs - Levels und der endothelabhängigen Gefäßreaktion. Daraus kann gedeutet werden, dass eine erhöhte cfDNA/NETs-Konzentration mit einer schlechteren Endothelfunktion einhergeht.

Somit lässt es sich schlussfolgern, dass eine direkte protektive Auswirkung von dem Enzym *DNase I* auf das Endothel besteht. Dadurch bewirkt *DNase I* womöglich eine Verbesserung der Gefäßfunktion nach EKZ-Eingriffen.

Trotzdem muss in Betracht gezogen werden, dass die eNOS nicht der einzelne Mechanismus zur NO-Produktion der Endothelzellen ist, sondern auch andere Enzyme, wie z.B. die iNOS daran beteiligt sind. Die iNOS wird vor allem im Rahmen der Inflammation aktiviert⁵⁶ und wurde in unserem Studienmodell nicht pharmakologisch gehemmt, sodass ein gewisser Anteil der erzeugten Vasodilatation auch durch die iNOS bedingt sein könnte. Nichtsdestotrotz waren die Tiere der drei Versuchsgruppen bis auf die *DNase I* Gaben den gleichen Bedingungen ausgesetzt. Somit kann die gezeigte deutliche Verbesserung der Endothelfunktion durch *DNase I* als aussagekräftig angenommen werden.

Um die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf Menschen und somit in die klinische Praxis zu überprüfen, muss man die Stärken und Schwächen des hier verwendeten Tiermodells diskutieren. Das Benutzen von Ratten als Versuchstiere ist eine etablierte wissenschaftliche Methode und beruht insbesondere auf den physiologischen und anatomischen Ähnlichkeiten zwischen den zwei Arten¹⁰¹. Auf der einen Seite simuliert das Modell pathophysiologische Inflamationsbedingungen infolge des I/R-Schadens. Andererseits wird in dem Modell der Kreislaufstillstand nicht durch Kardioplegie, sondern durch tiefe Hypothermie erreicht. Diese wird bei Menschen vor allem bei Operationen zur Reparatur von Aortendissektionen angewendet. Bei der Mehrzahl der restlichen kardiochirurgischen Eingriffe kommt eine moderate oder milde Hypothermie zum Einsatz. Die niedrige Temperatur senkt den Sauerstoffbedarf des Organismus und erhöht die Ischämie-Toleranz-Grenze der Zellen¹⁰².

Die in der klinischen Praxis verwendete kardioplegische Lösung bewirkt einen zusätzlich myokardprotektiven pharmakochemischen Kreislaufstillstand¹⁰³. Trotz den Unterschieden zu den HLM-Eingriffen am Menschen in der Klinik hat sich das Rattenmodell mit tiefer

Hypothermie als gute Methode zur Überprüfung von therapeutischen Möglichkeiten gegen die EKZ induzierte Inflammation bewiesen⁷⁸.

Ein Nachteil dieser Studie stellt das Euthanasieren der Tiere am Ende der Reperfusion dar. Ohne dies wäre die Endothelfunktionsmessung nicht möglich. Ein nächster wichtiger Punkt ist aber die Tatsache, dass die Ratten das Modell postoperativ nicht lange überleben. Die Entwicklung eines Modells oder die Modifikation dieses in Richtung einer längeren postoperativen Überlebenszeit der Tiere ist ein sinnvoller zukünftiger Ansatz. Somit könnten die mittelfristigen Auswirkungen von *DNase I* auf den Organismus erforscht werden.

Schlussfolgernd lässt es sich zusammenfassen, dass *DNase I* protektiv auf das Endothel wirkt und die inflammatorische Abwehrreaktion infolge von EKZ reduziert. Dabei scheint die Verabreichung von zwei *DNase I* Dosen in gewissem Abstand ein besseres Ergebnis zu zeigen. *DNase I* wird bereits in der klinischen Praxis bei anderen Erkrankungen wie die zystische Fibrose als Therapie eingesetzt, sodass die Erforschung von weiteren therapeutischen Einsatzmöglichkeiten sinnvoll erscheint. Die Beherrschung der komplexen überschießenden Entzündungsreaktion nach EKZ mit dem Ziel einer Minimierung der postoperativen Komplikationen begrenzt sich sicherlich nicht auf eine einzelne pathophysiologische Kaskade.

Eine Entwicklung und Erforschung von verschiedenen Ansatzpunkten und deren Zusammenspiel ist unentbehrlich. Dabei kann *DNase I* sicherlich ein sinnvoller therapeutischer Punkt dieser komplexen Reaktion darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Larsen R. Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thoraxund Gefäßchirurgie. 7 ed: Springer Berlin, Heidelberg; 2009.
2. Passaroni AC, Silva MAdM, Yoshida WB. Cardiopulmonary bypass: development of John Gibbon's heart-lung machine. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2015; **30**(2): 235-45.
3. Beckmann A, Meyer R, Lewandowski J, Markewitz A, Gummert J. German Heart Surgery Report 2019: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery. *Thorac Cardiovasc Surg* 2020; **68**(4): 263-76.
4. Baehner T, Boehm O, Probst C, et al. Kardiopulmonaler Bypass in der Herzchirurgie. *Der Anaesthesist* 2012; **61**(10): 846-56.
5. Schirmer U. Hypothermie in der Herzchirurgie. *Der Anaesthesist* 2007; **56**(9): 930-5.
6. Sarkar M, Prabhu V. Basics of cardiopulmonary bypass. *Indian J Anaesth* 2017; **61**(9): 760-7.
7. Day JRS, Taylor KM. The systemic inflammatory response syndrome and cardiopulmonary bypass. *International Journal of Surgery* 2005; **3**(2): 129-40.
8. Prondzinsky R, Knüpfer A, Loppnow H, et al. Surgical trauma affects the proinflammatory status after cardiac surgery to a higher degree than cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; **129**(4): 760-6.
9. Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 2001; **89**(1): 29-46.
10. Kats S, Schönberger JP, Brands R, Seinen W, van Oeveren W. Endotoxin release in cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: pathophysiology and possible therapeutic strategies. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011; **39**(4): 451-8.
11. Warren OJ, Smith AJ, Alexiou C, et al. The Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass: Part 1—Mechanisms of Pathogenesis. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2009; **23**(2): 223-31.
12. Squicciarro E, Labriola C, Malvindi PG, et al. Prevalence and Clinical Impact of Systemic Inflammatory Reaction After Cardiac Surgery. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2019; **33**(6): 1682-90.
13. Kern H. SIRS und Sepsis nach kardiochirurgischen Eingriffen: Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät - Universitätsklinikum Charité; 2001.
14. Warltier David C, Laffey John G, Boylan John F, Cheng Davy CH. The Systemic Inflammatory Response to Cardiac Surgery: Implications for the Anesthesiologist. *Anesthesiology* 2002; **97**(1): 215-52.
15. Lindman BR, Goldstein JS, Nassif ME, et al. Systemic inflammatory response syndrome after transcatheter or surgical aortic valve replacement. *Heart* 2015; **101**(7): 537-45.

16. Hunt BJ, Parratt RN, Segal HC, Sheikh S, Kallis P, Yacoub M. Activation of Coagulation and Fibrinolysis During Cardiothoracic Operations. *The Annals of Thoracic Surgery* 1998; **65**(3): 712-8.
17. Edmunds LH, Colman RW. Thrombin During Cardiopulmonary Bypass. *The Annals of Thoracic Surgery* 2006; **82**(6): 2315-22.
18. Sablotzki A, Dehne M, Welters I, et al. Alterations of the cytokine network in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 1997; **12**(6): 393-403.
19. Steinberg JB, Kapelanski DP, Olson JD, Weiler JM. Cytokine and complement levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; **106**(6): 1008-16.
20. Deng MC, Wiedner M, Erren M, Möllhoff T, Assmann G, Scheld HH. Arterial and venous cytokine response to cardiopulmonary bypass for low risk CABG and relation to hemodynamics. *Eur J Cardiothorac Surg* 1995; **9**(1): 22-9.
21. Gasz B, Lenard L, Racz B, et al. Effect of cardiopulmonary bypass on cytokine network and myocardial cytokine production. *Clin Cardiol* 2006; **29**(7): 311-5.
22. Franke A, Lante W, Fackeldey V, et al. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. *The Annals of Thoracic Surgery* 2002; **74**(2): 363-70.
23. Passaroni AC, Felicio ML, Campos N, Silva MAM, Yoshida WB. Hemolysis and Inflammatory Response to Extracorporeal Circulation during On-Pump CABG: Comparison between Roller and Centrifugal Pump Systems. *Braz J Cardiovasc Surg* 2018; **33**(1): 64-71.
24. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K-i, Nakamura M. Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine* 2005; **29**(4): 169-75.
25. Martin C, Saux P, Mege JL, Perrin G, Papazian L, Gouin F. Prognostic values of serum cytokines in septic shock. *Intensive Care Med* 1994; **20**(4): 272-7.
26. Krakauer T. IL-10 inhibits the adhesion of leukocytic cells to IL-1-activated human endothelial cells. *Immunol Lett* 1995; **45**(1-2): 61-5.
27. Lane JS, Todd KE, Lewis MP, et al. Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. *Surgery* 1997; **122**(2): 288-94.
28. Giomarelli P, Scolletta S, Borrelli E, Biagioli B. Myocardial and lung injury after cardiopulmonary bypass: role of interleukin (IL)-10. *Ann Thorac Surg* 2003; **76**(1): 117-23.
29. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; **303**(5663): 1532-5.
30. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood* 2013; **122**(16): 2784-94.
31. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; **176**(2): 231-41.

32. Yipp BG, Petri B, Salina D, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 2012; **18**(9): 1386-93.
33. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death. *J Parasitol Res* 2012; **2012**: 929743-.
34. Gupta AK, Joshi MB, Philippova M, et al. Activated endothelial cells induce neutrophil extracellular traps and are susceptible to NETosis-mediated cell death. *FEBS Lett* 2010; **584**(14): 3193-7.
35. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nature Reviews Immunology* 2018; **18**(2): 134-47.
36. Kaplan MJ, Radic M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. *J Immunol* 2012; **189**(6): 2689-95.
37. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* 2007; **13**(4): 463-9.
38. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**(36): 15880-5.
39. Masuda S, Nakazawa D, Shida H, et al. NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clinica Chimica Acta* 2016; **459**: 89-93.
40. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther* 2019; **20**(8): 1057-67.
41. Gould TJ, Lysov Z, Liaw PC. Extracellular DNA and histones: double-edged swords in immunothrombosis. *J Thromb Haemost* 2015; **13 Suppl 1**: S82-91.
42. Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, et al. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Crit Care* 2012; **16**(4): R151-R.
43. Meng W, Paunel-Gorgulu A, Flohe S, et al. Deoxyribonuclease is a potential counter regulator of aberrant neutrophil extracellular traps formation after major trauma. *Mediators of inflammation* 2012; **2012**: 149560.
44. Jackson Chornenki NL, Coke R, Kwong AC, et al. Comparison of the source and prognostic utility of cfDNA in trauma and sepsis. *Intensive Care Med Exp* 2019; **7**(1): 29-.
45. Qi Y, Uchida T, Yamamoto M, et al. Perioperative Elevation in Cell-Free DNA Levels in Patients Undergoing Cardiac Surgery: Possible Contribution of Neutrophil Extracellular Traps to Perioperative Renal Dysfunction. *Anesthesiol Res Pract* 2016; **2016**: 2794364-.
46. Paunel-Gorgulu A, Wacker M, El Aita M, et al. cfDNA correlates with endothelial damage after cardiac surgery with prolonged cardiopulmonary bypass and amplifies NETosis in an intracellular TLR9-independent manner. *Scientific reports* 2017; **7**(1): 17421.
47. Pugsley MK, Tabrizchi R. The vascular system: An overview of structure and function. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2000; **44**(2): 333-40.

48. Touyz RM, Alves-Lopes R, Rios FJ, et al. Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovasc Res* 2018; **114**(4): 529-39.
49. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci* 2019; **20**(18).
50. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 2013; **9**(10): 1057-69.
51. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; **333**(6174): 664-6.
52. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function: From vascular biology to clinical applications. *The American Journal of Cardiology* 2002; **90**(10, Supplement 3): L40-L8.
53. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 2004; **109**(23 Suppl 1): Ii27-32.
54. Förstermann U, Mülsch A, Böhme E, Busse R. Stimulation of soluble guanylate cyclase by an acetylcholine-induced endothelium-derived factor from rabbit and canine arteries. *Circ Res* 1986; **58**(4): 531-8.
55. Rapoport RM, Draznin MB, Murad F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 1983; **306**(5939): 174-6.
56. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 2012; **33**(7): 829-37, 37a-37d.
57. Behrends J BJ, Deutzmann R, Ehmke H, Frings M, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J et al. *Duale Reihe Physiologie*. 2 ed: Stuttgart: Thieme; 2012.
58. Brettner F, Chappell D, Schwartz L, et al. Vascular Endothelial Dysfunction during Cardiac Surgery: On-Pump versus Off-Pump Coronary Surgery. *Eur Surg Res* 2017; **58**(5-6): 354-68.
59. Schmid FX, Floerchinger B, Vudattu NK, et al. Direct evidence of endothelial injury during cardiopulmonary bypass by demonstration of circulating endothelial cells. *Perfusion* 2006; **21**(3): 133-7.
60. Boyle EM, Jr., Pohlman TH, Johnson MC, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 1997; **63**(1): 277-84.
61. Giacinto O, Satriano U, Nenna A, et al. Inflammatory Response and Endothelial Dysfunction Following Cardiopulmonary Bypass: Pathophysiology and Pharmacological Targets. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2019; **13**(2): 158-73.
62. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002; **21**(2): 232-44.

63. Korthuis RJ. Mechanisms of I/R-Induced Endothelium-Dependent Vasodilator Dysfunction. *Advances in pharmacology (San Diego, Calif)* 2018; **81**: 331-64.
64. Saffarzadeh M, Juenemann C, Queisser MA, et al. Neutrophil extracellular traps directly induce epithelial and endothelial cell death: a predominant role of histones. *PLoS One* 2012; **7**(2): e32366.
65. Panagiotopoulos I, Palatianos G, Michalopoulos A, Chatzigeorgiou A, Prapas S, Kamper EF. Alterations in biomarkers of endothelial function following on-pump coronary artery revascularization. *J Clin Lab Anal* 2010; **24**(6): 389-98.
66. Videm V, Albrigtsen M. Soluble ICAM-1 and VCAM-1 as markers of endothelial activation. *Scand J Immunol* 2008; **67**(5): 523-31.
67. Takeshita H, Mogi K, Yasuda T, et al. Mammalian deoxyribonucleases I are classified into three types: pancreas, parotid, and pancreas-parotid (mixed), based on differences in their tissue concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **269**(2): 481-4.
68. Zhou Z, Zhu C, Ren J, Dong S. A graphene-based real-time fluorescent assay of deoxyribonuclease I activity and inhibition. *Anal Chim Acta* 2012; **740**: 88-92.
69. Wagener JS, Kupfer O. Dornase alfa (Pulmozyme). *Curr Opin Pulm Med* 2012; **18**(6): 609-14.
70. Savchenko AS, Borissoff JI, Martinod K, et al. VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* 2014; **123**(1): 141-8.
71. Vogel B, Shinagawa H, Hofmann U, Ertl G, Frantz S. Acute DNase1 treatment improves left ventricular remodeling after myocardial infarction by disruption of free chromatin. *Basic Res Cardiol* 2015; **110**(2): 15.
72. Wang S, Xie T, Sun S, et al. DNase-1 Treatment Exerts Protective Effects in a Rat Model of Intestinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Scientific reports* 2018; **8**(1): 17788.
73. Liguori GR, Kanas AF, Moreira LF. Managing the inflammatory response after cardiopulmonary bypass: review of the studies in animal models. *Rev Bras Cir Cardiovasc* 2014; **29**(1): 93-102.
74. Dong GH, Wang CT, Li Y, et al. Cardiopulmonary bypass induced microcirculatory injury of the small bowel in rats. *World J Gastroenterol* 2009; **15**(25): 3166-72.
75. Doguet F, Litzler P-Y, Tamion F, et al. Changes in mesenteric vascular reactivity and inflammatory response after cardiopulmonary bypass in a rat model. *The Annals of Thoracic Surgery* 2004; **77**(6): 2130-7.
76. Khan TA, Bianchi C, Araujo EG, Ruel M, Voisine P, Sellke FW. Activation of pulmonary mitogen-activated protein kinases during cardiopulmonary bypass¹ ¹Funding was provided by grants from the National Institutes of Health, NIH R01 HL46716-07 and NIH R43 HL-65863. Dr. Khan is supported by an Individual National Research Service Award from the National

- Institutes of Health, NIH NRSA 1F32 HL69651-01. *Journal of Surgical Research* 2003; **115**(1): 56-62.
77. Glavind-Kristensen M, Brix-Christensen V, Toennesen E, et al. Pulmonary endothelial dysfunction after cardiopulmonary bypass in neonatal pigs. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; **46**(7): 853-9.
78. Engels M, Bilgic E, Pinto A, et al. A cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest rat model for the investigation of the systemic inflammation response and induced organ damage. *Journal of inflammation (London, England)* 2014; **11**: 26.
79. Pinto A, Jahn A, Immohr MB, et al. Modulation of Immunologic Response by Preventive Everolimus Application in a Rat CPB Model. *Inflammation* 2016; **39**(5): 1771-82.
80. MacKenzie A, Wadsworth RM. Extracellular L-arginine is required for optimal NO synthesis by eNOS and iNOS in the rat mesenteric artery wall. *Br J Pharmacol* 2003; **139**(8): 1487-97.
81. Kim HR, Appel S, Vetterkind S, Gangopadhyay SS, Morgan KG. Smooth muscle signalling pathways in health and disease. *J Cell Mol Med* 2008; **12**(6A): 2165-80.
82. Pacifici GM. Clinical Pharmacology of Indomethacin in Preterm Infants: Implications in Patent Ductus Arteriosus Closure. *Pediatric Drugs* 2013; **15**(5): 363-76.
83. Joachim Rassow KH, Roland Netzker RD. Duale Reihe Biochemie: Georg Thieme Verlag KG 2008; 2008.
84. Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *J Biol Chem* 1996; **271**(31): 18596-603.
85. Hessel EA, 2nd. A Brief History of Cardiopulmonary Bypass. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2014; **18**(2): 87-100.
86. Hessel EA. What's New in Cardiopulmonary Bypass. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2019; **33**(8): 2296-326.
87. McGuinness J, Bouchier-Hayes D, Redmond JM. Understanding the inflammatory response to cardiac surgery. *The Surgeon* 2008; **6**(3): 162-71.
88. R. Clive Landis P, * Jeremiah R. Brown, PhD,† David Fitzgerald, CCP,‡ Donald S. Likosky, PhD,§ Linda Shore-Lesserson, MD, FASE,|| Robert A. Baker, PhD, CCP,¶ and John W. Hammon, MD**. Attenuating the Systemic Inflammatory Response to Adult Cardiopulmonary Bypass: A Critical Review of the Evidence Base.
89. Warren OJ, Watret AL, de Wit KL, et al. The Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass: Part 2—Anti-Inflammatory Therapeutic Strategies. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2009; **23**(3): 384-93.
90. Zhu B, Gong Y, Chen P, Zhang H, Zhao T, Li P. Increased DNase I activity in diabetes might be associated with injury of pancreas. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2014; **393**(1): 23-32.

91. Boettcher M, Meier D, Jiménez-Alcázar M, et al. Degradation of Extracellular DNA by DNase1 Significantly Reduces Testicular Damage After Testicular Torsion in Rats. *Urology* 2017; **109**: 223.e1-.e7.
92. Aljure OD, Fabbro M. Cardiopulmonary Bypass and Inflammation: The Hidden Enemy. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia* 2019; **33**(2): 346-7.
93. Ge L, Zhou X, Ji WJ, et al. Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; **308**(5): H500-9.
94. Prince WS, Baker DL, Dodge AH, Ahmed AE, Chestnut RW, Sinicropi DV. Pharmacodynamics of recombinant human DNase I in serum. *Clin Exp Immunol* 1998; **113**(2): 289-96.
95. Eikemo H, Sellevold OF, Videm V. Markers for endothelial activation during open heart surgery. *Ann Thorac Surg* 2004; **77**(1): 214-9.
96. Howell KW, Cleveland JC, Jr., Meng X, et al. Interleukin 6 production during cardiac surgery correlates with increasing age. *J Surg Res* 2016; **201**(1): 76-81.
97. Warnatsch A, Ioannou M, Wang Q, Papayannopoulos V. Inflammation. Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 2015; **349**(6245): 316-20.
98. Weber C, Jenke A, Chobanova V, et al. Targeting of cell-free DNA by DNase I diminishes endothelial dysfunction and inflammation in a rat model of cardiopulmonary bypass. *Scientific reports* 2019; **9**(1): 19249-.
99. Folco EJ, Mawson TL, Vromman A, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial Cell Activation and Tissue Factor Production Through Interleukin-1 α and Cathepsin G. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2018; **38**(8): 1901-12.
100. Totoson P, Maguin-Gaté K, Prati C, Wendling D, Demougeot C. Mechanisms of endothelial dysfunction in rheumatoid arthritis: lessons from animal studies. *Arthritis Research & Therapy* 2014; **16**(1): 202.
101. Bryda EC. The Mighty Mouse: the impact of rodents on advances in biomedical research. *Missouri medicine* 2013; **110**(3): 207-11.
102. Gocoł R, Hudziak D, Bis J, et al. The Role of Deep Hypothermia in Cardiac Surgery. *Int J Environ Res Public Health* 2021; **18**(13): 7061.
103. Ali JM, Miles LF, Abu-Omar Y, Galhardo C, Falter F. Global Cardioplegia Practices: Results from the Global Cardiopulmonary Bypass Survey. *J Extra Corpor Technol* 2018; **50**(2): 83-93.

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der extrakorporalen Zirkulation	12
Abbildung 2: Mechanismen der NETs-Produktion	15
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion von eNOS	17
Abbildung 4: Übersicht des chirurgischen Ablaufs mit Deep hypothermic circulatory arrest. Das Bild wurde für die hier beschriebene Studie modifiziert	26
Abbildung 5: Rattenaorta in Krebs-Henseleit-Puffer. Das Fett- und Bindegewebe wurden bereits entfernt.	27
Abbildung 6: Gefäßringe. Rattenaorta.	27
Abbildung 7: Überblick der Anlage zur Endothelfunktionsmessung	27
Abbildung 8: Schematische Darstellung einer einzelnen Messvorrichtung.....	28
Abbildung 9: Gespannter Aortenring zwischen den zwei rostfreien Stäbchen.....	29
Abbildung 10: Digitale Aufzeichnung einer Messung an einem Gefäßring	32
Abbildung 11: Endothelabhängige Gefäßreaktion.....	35
Abbildung 12: Endothelunabhängige Gefäßreaktion.....	36
Abbildung 13: Quantifizierung von ICAM-1 im Plasma.....	37
Abbildung 14: Bestimmung der DNase-Aktivität und der cfDNA-Konzentration im Plasma...38	
Abbildung 15: Korrelation zwischen der cfDNA-Konzentration und der endothelabhängigen Gefäßfunktion.....	40
Abbildung 16: Quantifizierung von Zytokinen im Plasma	42

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für die Endothelfunktionsmessung benutzte Chemikalien	22
Tabelle 2: Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers	23
Tabelle 3: Für die Plasmauntersuchungen benutzte Materialien	23
Tabelle 4: Für die Messungen benutzte Geräte	24

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe wurden mit dem Artikel *Targeting of cell-free DNA by DNase I diminishes endothelial dysfunction and inflammation in a rat model of cardiopulmonary bypass* in dem Journal *Scientific reports* 2019 vorabveröffentlicht.

Weber C, Jenke A, Chobanova V, et al. Targeting of cell-free DNA by DNase I diminishes endothelial dysfunction and inflammation in a rat model of cardiopulmonary bypass. *Scientific reports* 2019; **9**(1): 19249-.