

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum für Chirurgie
Klinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Walther

**Beurteilung des Einflusses von Sirolimus und Everolimus
auf den Ischämie-Reperfusionsschaden im humanen Gefäßmodell**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Mike Wenzel

aus Offenbach am Main

Frankfurt am Main, 2018

Dekan/in: Professor Dr. Josef Pfeilschifter

Referent/in: Professor Dr. Andres Beiras-Fernandez

Korreferent/in: Professor Dr. Thomas Walther

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2018

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	9
1.1. Anatomie und Physiologie des Herzens und der Gefäße.....	9
1.1. Koronare Herzerkrankung	11
1.1.1. Arteriosklerose & Kardiovaskuläre Risikofaktoren	11
1.1.2. Myokardischämie	14
1.1.3. Behandlungsoptionen	15
1.1.3.1. Revaskularisation & Ischämie-Reperfusionsschaden.....	16
1.2. Organtransplantation	20
1.2.1. Immunsuppression nach Herztransplantation.....	21
1.3. Sirolimus.....	22
1.3.1. Wirkung	22
1.3.2. Einsatzgebiete	24
1.4. Everolimus.....	25
1.4.1. Wirkung	26
1.4.2. Einsatzgebiete	27
2. Material und Methoden	29
2.1. Ein- & Ausschlusskriterien.....	29
2.2. Bioreaktor	29
2.3. Vorbereitungen	32
2.3.1. Vollblut & Blutparameter	33
2.3.1.1. Vorbehandlung des Blutes vor Versuchsbeginn.....	33
2.3.1.2. Gefäße	35
2.4. Versuchsdurchführung.....	36
2.4.1. Reperfusion.....	37
2.4.2. Entnahme von Blutproben	38
2.5. Post-Reperfusion	39
2.5.1. Blutsera.....	39
2.5.1.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	39
2.5.1.1.1. Interleukin-6	40
2.5.1.1.2. TNF- α	41
2.5.1.1.3. VEGF	43

2.5.2.	Immunhistologiepräparate	44
2.5.2.1.	CD11b.....	49
2.5.2.2.	CD31.....	50
3.	Ergebnisse	51
3.1.	Blutgasanalyse	51
3.1.1.	Sauerstoffsättigung im Reperfusionenblut.....	51
3.1.2.	Kohlendioxidpartialdruck	52
3.1.3.	pH-Messung.....	53
3.2.	ELISA-Daten	54
3.2.1.	Interleukin-6.....	54
3.2.1.1.	Kontrollgruppe.....	54
3.2.1.2.	Sirolimus	56
3.2.1.3.	Everolimus	57
3.2.1.4.	Vergleich der Mittelwerte von der Kontrollgruppe vs. Everolimus vs. Sirolimus	58
3.2.2.	TNF- α	59
3.2.2.1.	Kontrollgruppe.....	59
3.2.2.2.	Sirolimus	60
3.2.2.3.	Everolimus	61
3.2.2.4.	Vergleich der Mittelwerte von der Kontrollgruppe vs. Everolimus vs. Sirolimus	62
3.2.3.	VEGF	64
3.2.3.1.	Kontrollgruppe.....	64
3.2.3.2.	Sirolimus	65
3.2.3.3.	Everolimus	66
3.2.3.4.	Vergleich der Mittelwerte von der Kontrollgruppe vs. Everolimus vs. Sirolimus	67
3.3.	Immunhistochemie-Daten.....	69
3.3.1.	CD11b.....	69
3.3.2.	CD31	73
4.	Diskussion	78
4.1.	Präoxygenierung im Model des Bioreaktor	78
4.2.	Bioreaktor, Reperfusion & Gefäße	79
4.3.	Blutgasanalyse	81

4.4. ELISA-Daten	83
4.4.1. Interleukin-6.....	84
4.4.2. TNF- α	85
4.4.3. VEGF	86
4.5. Immunhistochemie.....	88
4.5.1. CD 11b.....	88
4.5.2. CD31	89
4.6. Schlussfolgerung.....	91
5. Abbildungsverzeichnis	93
6. Literaturverzeichnis	95
7. Zusammenfassung in deutscher Sprache	111
8. Zusammenfassung in englischer Sprache.....	113
9. Danksagung	115
10. Schriftliche Erklärung.....	115

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Vollständiger Name
s.g.	sogenannt
vgl.	Vergleiche
Abb.	Abbildung
mod.	Modifiziert
KHK	Koronare Herzkrankheit
ACS	Akutes Koronarsyndrom
IL-6	Interleukin 6
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
AP	Angina Pectoris
STEMI	ST-Strecken-Hebungsinfarkt
NSTEMI	Nicht- ST-Strecken-Hebungsinfarkt
PCI	Perkutane Koronarintervention
IRI	Ischämie-Reperfusionsschaden
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
HLA	Humanes-Leukozyten-Antigen
MMF	Mycophenolat-Mofetil
mTOR	Mammalian target of Rapamycine
PCNA	Proliferation-Cell-Nuclear-Antigens
GvHD	Graft-versus-Host-Disease

MCV	mittleres korpuskuläres Volumen
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
I.E.	Internationalen Einheiten
HLM	Herz-Lungen-Maschine
BGA	Blutglasanalyse
NaCl	Natrium-Chlorid-Lösung
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
HKT	Hämatokrit
min	Minute
µl	Mikroliter
nl	Nanoliter
h	Stunde
cm	Zentimeter
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
kDa	Kilo-Dalton
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
rpm	Rounds per minute
RLU	relative light units
ANOVA	Analysis of Varianz
VE	vollentionisiert
HRP	Horseradish Peroxidase
mAb	Monoklonarer Antikörper

SEM	Standardfehler des Mittelwerts
vs.	Versus
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
sO ₂	Sauerstoffsättigung

1. Einleitung

1.1. Anatomie und Physiologie des Herzens und der Gefäße

Das Herz befindet sich als essentielles zentrales Organ im Mediastinum des menschlichen Thorax. Umgeben wird das Herz von einer bindegewebigen Hülle – dem Perikard. Die darunterliegende für die Herzaktion verantwortliche Muskulatur wird als Myokard bezeichnet. Von innen ist das Herz mit der bindegewebigen Schicht namens Endokard ausgekleidet. Am Herzen selber werden grundsätzlich vier Herzhöhlen unterschieden: Der rechte Vorhof, der rechte Ventrikel sowie der linke Vorhof und der linke Ventrikel. Neben der örtlichen Unterteilung kann am Herzen ein Niederdruck- sowie ein Hochdrucksystem unterschieden werden. Das Niederdrucksystem ist auch als Lungenkreislauf bekannt. Im Lungenkreislaufsystem findet eine Oxygenierung des venösen - vom Körperkreislauf zum Herzen rückströmenden - Blutes statt. Über die Arteriae pulmonales, welche aus dem Truncus pulmonalis des rechten Ventrikels entspringen, gelangt sauerstoffarmes Blut in die Lunge. Das Körperkreislaufsystem (oder auch Hochdrucksystem) versorgt den Körper sowie den Herzmuskel mit oxygeniertem, sauerstoffhaltigem Blut welches vom linken Ventrikel über die Aorta in den Körperkreislauf ausgeworfen wird. Kurz oberhalb der in der Aorta ascendens gelegenen Aortenklappe gehen die rechte und linke Koronararterie ab (Arteria coronaria dextra und sinistra), die über weitere Aufzweigungen das Myokard mit Blut versorgen. Eine besondere medizinische Bedeutung haben die drei großen Koronargefäße Ramus circumflexus, Arteria interventricularis anterior sowie die Arteria coronaria dextra, welche ausgehend aus der Arteria coronaria dextra und sinistra das Herz mit Blut versorgen (siehe Abb. 1).¹ Der Blutfluss durch die Koronargefäße erfolgt hauptsächlich in der Diastole der Herzaktion mit ungefähr 70-80ml/min/100g Blut unter körperlicher Ruhebedingungen. Dieser Blutfluss kann über eine Vasodilatation bzw. eine Vasokonstriktion der Koronararterien reguliert und erhöht bzw. erniedrigt werden.²

Der histologische Aufbau eines Gefäßes gliedert sich in drei Hauptabschnitte: Die Innenwand der Gefäße wird luminal durch die Endothelzellen der Tunica intima ausgekleidet. Der Tunica intima folgt abluminal die Tunica media, welche eine aus glatten Muskelzellen bestehende Muskelschicht darstellt. Die Tunica media ist für die obengenannte Vasokonstriktion bzw. -dilatation der Gefäße verantwortlich. Die lumenferne, äußerste Gefäßschicht bildet die bindegewebige Tunica adventitia, die

unter anderem für die Einlagerung des Gefäßes in das umgebende Gewebe sorgt. Zwischen den einzelnen Schichten der Tunica intima und Tunica media sowie zwischen Tunica media und Tunica adventitia befindet sich jeweils s.g, Membrana elastica interna bzw. externa (siehe Abb. 2).³

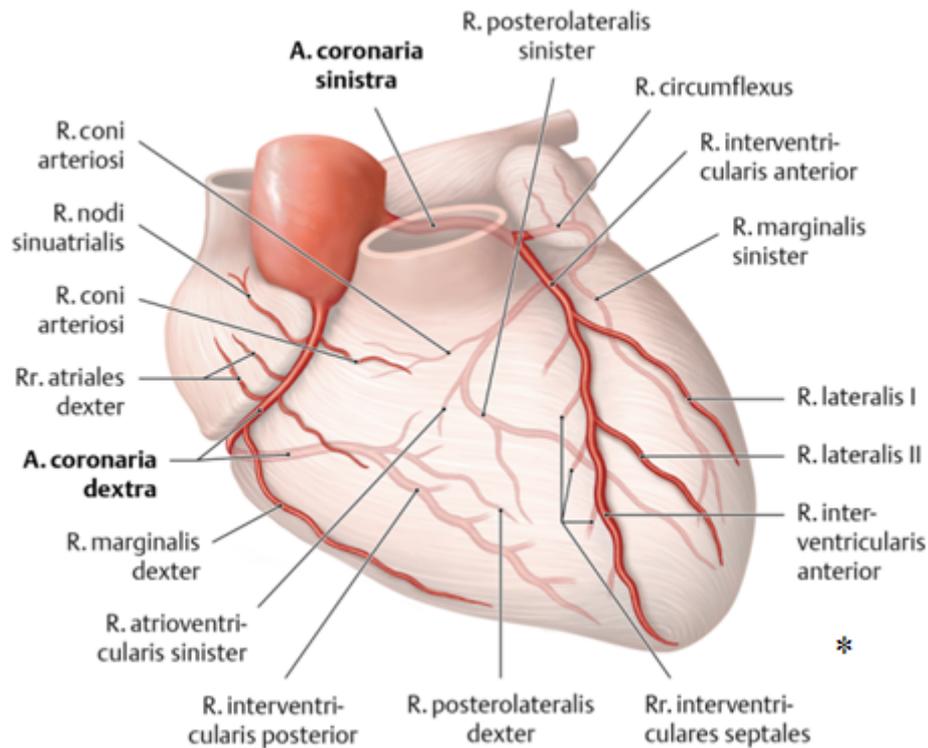


Abb. 1: Anatomie des Herzens und der Koronargefäße. Zu sehen ist das Herz von ventral mit linkem Vorhof, linken Ventrikel, rechtem Vorhof und rechten Ventrikel (nicht beschriftet). Weiterhin erkennt man die, für die Klassifikation von Stenosen wichtigsten, drei großen Koronargefäße: Den Ramus circumflexus, die Arteria interventriculares anterior nach Abgang von der aus der Aorta ascendens entspringenden Arteria coronaria sinistra sowie die ebenfalls aus der Aorta entspringende Arteria coronaria dextra. Weitere kleinere - das Myokard versorgende- Koronarien sind zu sehen und beschriftet (modifiziert (Mod.) nach Thieme).

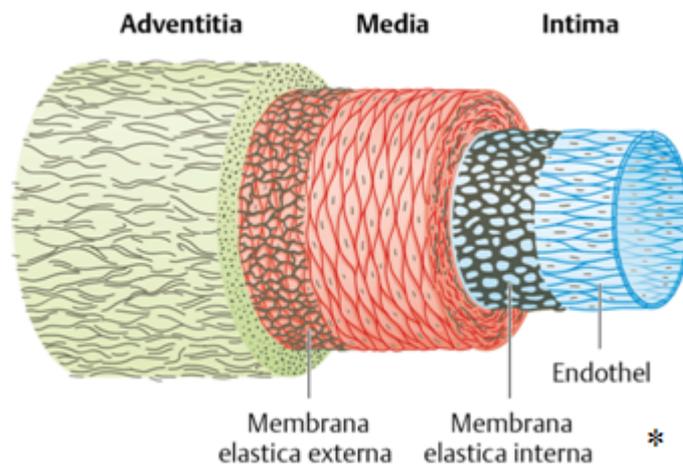


Abb. 2. Histologischer Aufbau eines Gefäßes. In der Abbildung sind alle in Kapitel 1.1. beschriebenen Schichten eines Gefäßes zu erkennen. Blau dargestellt ist die innerste Schicht: Das Endothel. Das Endothel stellt die Tunica intima dar und begrenzt das Gefäß nach luminal hin. Die bindegewebe Membrana elastica interna grenzt die aus glatten Muskelzellen bestehende Tunica media (rot) von der Tunica intima ab. Die grün dargestellte Tunica adventitia wird ebenso von einer membranartigen Schicht –der Membrana elastica externa- von der luminaler gelegenen Tunica media abgegrenzt (mod. nach. Thieme).

1.1. Koronare Herzerkrankung

Die Koronare Herzerkrankung (KHK) gehört in der westlichen Welt und insbesondere in Deutschland mit zu den häufigsten Todesursachen. So starben im Jahr 2014 in Deutschland ca. 70.000 Menschen an chronisch ischämischen Herzerkrankungen.⁴ Definiert wird die Koronare Herzerkrankung laut Herold als eine symptomatische Manifestation von Arteriosklerose in den Koronargefäßen.⁵ Ist mehr als eine der drei großen Koronararterien (Ramus circumflexus, Arteria interventriculares anterior und Arteria coronaria dextra) von manifestierter, stenosierender Arteriosklerose betroffen, spricht man von einer Zwei- bzw. Drei-Gefäß-KHK oder auch Mehrgefäß-KHK. Ist die Arteria coronaria sinistra vor ihrer Aufzweigung in den Ramus circumflexus und die Arteria interventriculares anterior betroffen, spricht man von einer Hauptstammstenose.

1.1.1. Arteriosklerose & Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Die Arteriosklerose stellt eine Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems dar, der eine komplexe, multifaktorielle Pathogenese zu Grunde liegt und die Gegenstand bisheriger und aktueller Forschung ist. Verschiedene Hypothesen der Pathogenese der Arteriosklerose wurden im Laufe der jahrelangen medizinischen Forschung erhoben und ergänzt: So ging man ursprünglich davon aus, dass der Arteriosklerose eine Verletzung der Endothelzellschicht –sprich der Tunica intima- zu Grunde läge, welche in der Folge zu einer proinflammatorischen Signalkaskade führe und letztendlich die Arteriosklerose bedinge. Hierbei wurde zum Beispiel eine Hypertonus-bedingte Intimaschädigung als möglicher Auslöser der Arteriosklerose angenommen. Diese Theorie der arteriosklerotischen Pathogenese ist unter dem Namen „Response-to-injury-Theorie“ bekannt geworden.⁶

Im Laufe weiterer Forschungen konnte eine weitere wichtige pathogenetische Ursache der Arteriosklerose benannt werden: Die Oxidation von LDL-Cholesterinmolekülen (sogenannte (s.g.) „Lipoprotein-induced-arteriosclerosis-Theorie“).⁷ Oxidiertes LDL werde hierbei von im Blutkreislauf zirkulierenden Monozyten (welche sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren) an den Gefäßwänden der Arterien aufgenommen. Die Monozyten/Makrophagen setzen sich im weiteren Verlauf an und innerhalb der Tunica intima und media ab und bilden s.g. Schaumzellen. Hierbei transmigrieren die Makrophagen über die Endothelzellschicht oder nutzen geschädigte Endothelzellwände zum Eindringen (vgl. Kapitel 1.1.3.1.).⁸⁻¹⁰ Eine Ansammlung dieser Schaumzellen wird als arteriosklerotischer Plaque bezeichnet. Demzufolge stellt eine Hyperlipidämie bzw. ein erhöhter LDL-Cholesterinwert im Blut ein hohes Risiko für die Entstehung der Arteriosklerose dar.¹¹ Klinisch spiegelt sich das im Framingham Risikoalgorithmus wieder: Ab einem Blutgesamtcholesterinspiegel im Blut von >240mg/dl wird von einem hohem Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis in den nächsten 10 Jahren ausgegangen.^{12,13}

Der Prozess der arteriosklerotischen Umwandlung der Arterien wird auf molekularer Ebene als eine Art Inflammation verstanden: Im Blut zirkulierende Makrophagen und auch dendritische Zellen sezernieren Botenstoffe (s.g. Zytokine), die in der Folge Endothelzellen zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen anregen sowie auch im Blut zirkulierende Leukozyten zu jenem inflammatorisch-arteriosklerotisch veränderten Gewebeabschnitt locken. Als besonders wichtiges Zytokin und Schlüsselmolekül ist in diesem Zusammenhang Interleukin-6 (IL-6) zu nennen. Sowohl Endothelzellen als auch Monozyten/Makrophagen sezernieren IL-6 über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in dem arteriosklerotischen Umbauprozess der Gefäßwände.^{14,15} Dies führt einerseits zur weiteren Rekrutierung und Anlockung von im Blut zirkulierender Lymphozyten an jene Gefäßstelle sowie zur Proliferation der glatten Muskelzellen der Tunica media und demzufolge zur Ausweitung bzw. Vergrößerung des arteriosklerotischen Plaques in und an der Gefäßwand.^{16,17}

Khan et al. konnten außerdem zeigen, dass auch oxidiertes LDL an sich eine chemotaktische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen besitzt, bzw. an der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen (wie Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1; unter anderem Ligand des CD11b/CD18-Komplexes) und Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1)) in der Frühphase der Arteriosklerose über den Tumor-Nekrose-Faktor- α

(TNF- α) beteiligt ist.¹⁸ TNF- α wird als weiteres Schlüsselmolekül der Arteriosklerose neben IL-6 vor allem von Makrophagen ausgeschüttet und sorgt unter anderem für eine Stimulation der Endothelzelltransmigration von neutrophilen Granulozyten an jener Gefäßsstelle.¹⁹ Weiterhin wird durch Exozytose von Weibel-Palade-Körperchen (Zellorganelle der Endothelzellen mit Inhalt von unter anderem Zytokinen oder Selectinen) das Adhäsionsmolekül P-Selectin auf der eigenen Zellmembran vermehrt exprimiert, welche im Blut zirkulierende Leukozyten zur Anheftung an die Endothelzellmembran über ihren Liganden PSGL-1 binden.²⁰ Im weiteren Verlauf wird die Bindung von Leukozyten an das Endothel durch weitere komplexe Adhäsionsmoleküle verstärkt, wie zum Beispiel E-Selectin, CD31 (PECAM-1) und dem CD11b/CD18-Komplex (Integrin $\alpha_m\beta_2$; vgl. Abb. 4).²¹⁻²⁶

Durch Bindung und Aktivierung der Leukozyten (insbesondere der Lymphozyten und neutrophile Granulozyten) am Gefäßendothel werden jene Leukozyten dazu angeregt, trans- oder parazellulär über die Endothelschicht ins arterielle Gewebe zu migrieren.²⁷ Hierbei spielen neben den genannten Adhäsionsmolekülen, auch Proteine wie Metallomatrixproteasen aus der Extrazellulärmatrix eine gewisse Rolle.²⁸ Der Gesamtprozess der Leukozytenmigration über die Endothelzellmembran in das Gefäßgewebe wird als Leukozytendiapedese bezeichnet (vgl. Abb. 6).

Bereits Mitte der 80er Jahre konnten in der großen PROCAM-Studie mehrere Risikofaktoren für die pathogenetische Entstehung von Arteriosklerose und kardiovaskulären Ereignissen quantifiziert und benannt werden. Diese sind neben der bereits erwähnten Hypertonie (>140/90 mmHg) und LDL-Cholesterinerhöhung (>160mg/dL Blutserumspiegel) das Lebensalter (männlich >45 Jahre, weiblich >55 Jahre), Nikotinabusus, KHK/Myokardinfarkte bei erstgradigen männlichen Verwandten vor dem 55 Lebensjahr sowie bei weiblichen erstgradigen Verwandten unter dem 65 Lebensjahr.^{29,30} Weiterhin gelten ein Diabetes mellitus mit einem HbA1c >6,5% sowie erniedrigte HDL-Cholesterinserumspiegel (<40 mg/dL Männer, <50mg/dL Frauen) sowie erhöhte Triglyceridspiegel (>150mg/dL) in der Literatur als Risikofaktoren.^{5,31,32} Weitere andere mit der Arteriosklerose assoziierte Risikofaktoren sind ein erhöhter Lipoprotein-(a)-Spiegel, Hyperfibrinogenämie sowie Feinstaubbelastung und Depression.³³⁻³⁷ Regelmäßige Bewegung bedingt hingegen einen entscheidenden positiven Einfluss auf die Progression von arteriosklerotisch befallenen Gefäßen.³⁸

1.1.2. Myokardischämie

Als Myokardischämie bezeichnet man einen Zustand der Minderdurchblutung von Myokard mit arteriellem Blut, welcher einen s.g. Myokardinfarkt zu Folge haben kann. Auch können arterielle Hypoxien (bedeutet einen Abfall der Sauerstoffsättigung (sO_2) im arteriellen Blut $<95\%$) zu einer Minderversorgung vom Myokard mit Sauerstoff führen. Als Quelle einer Ischämie können sowohl arteriosklerotische Stenosen als auch rupturierte arteriosklerotische Plaques (welche als Thromben im Gefäß fungieren können) zu Koronarinsuffizienzen und Myokardinfarkten führen. Beide Fälle führen aufgrund einer teilweisen bis vollständigen Flusslimitation des Blutes in den Gefäßen zur Einschränkung der Versorgung des Myokards mit Blut und folglich zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff. Hierbei kann die Myokardischämie in verschiedenen Formen auftreten: Es werden zunächst sowohl symptomatische von nicht-symptomatischen (stummen) Ischämien unterschieden. Symptomatische Ischämien werden wiederum in eine stabile Angina Pectoris (AP; laborchemisch ohne Troponinanstieg im Blut) sowie das Akute Koronarsyndrom (ACS) unterteilt. Auch das ACS lässt sich noch in seine drei Unterformen instabile AP (kein laborchemischer Troponinanstieg im Blut und in der Abgrenzung zur stabilen AP mit Symptomprogredienz, Symptomen in Ruhelage oder erstmaliger AP), ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) und Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) differenzieren. Beim STEMI und NSTEMI kommt es, im Gegensatz zur AP, stets zum Troponinanstieg im Blut (vgl. Abb. 3).⁵

Die Myokardischämie kann je nach Lokalisation und Dauer verschiedene Auswirkungen und Folgen haben. Hierbei sind häufig Herzrhythmusstörungen sowie Kammerflimmern oder ein plötzlicher Herztod zu beobachten.³⁷ Desweiteren treten gehäuft Herzwandaneurysmen sowie Mitralklappeninsuffizienzen aufgrund von Papillarmuskelabrissen auf. Eine weitere Langzeitfolge von Myokardischämien sind chronische Herzinsuffizienzen.⁵

Histologisch lassen sich nach einem Myokardinfarkt verschiedene Stadien innerhalb des Myokards unterscheiden: Innerhalb der ersten 6h nach Beginn der Ischämie werden zunächst einzelne Zellbestandteile (Mitochondrien, Zellmembranen) fragmentiert. Nach 6-12h lassen sich erstmals Koagulationsnekrosen nachweisen. 12-24h nach

Ischämiebeginn entsteht eine lokale Inflammation im Myokard (siehe Abschnitt 1.2.3.1. Revaskularisation & Ischämie-Reperfusionsschaden), worauf in der Folge eine Proliferation von Granulationsgewebe einsetzt (nach 3-7 Tagen). Das andauernde Endstadium nach Wochen der Ischämie bildet kollagenes weißes Narbengewebe.^{3,39}

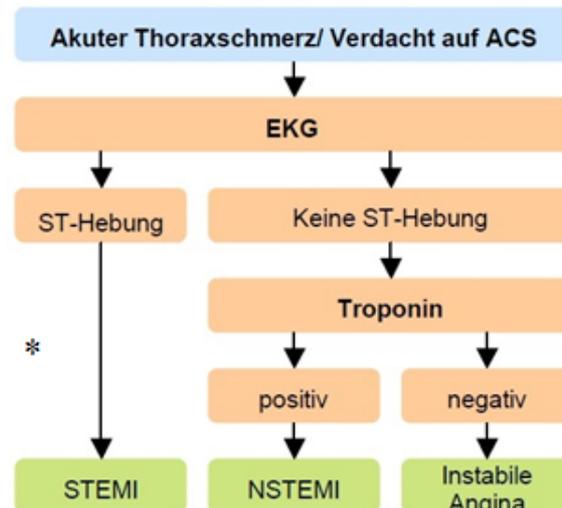


Abb. 3: Algorithmus zur Klassifikation des ACS. Bei Verdacht auf ein ACS wird zunächst ein 12-Kanal-EKG geschrieben. Zeigen sich ST-Hebungen in den EKG-Ableitungen, wird die Diagnose eines STEMI gestellt. Fallen im EKG keine ST-Hebungen auf, kann aufgrund des Troponins im Blut eine Differenzierung vorgenommen werden. Der NSTEMI ist Troponin-positiv, wohingegen die instabile AP Troponin-negativ ist (mod. nach Medix).

1.1.3. Behandlungsoptionen

Die Behandlungsoptionen der KHK richten sich nach dem Schweregrad der Symptomatik des Patienten sowie der Anzahl und Größe der arteriosklerotischen Gefäßstenosen (vgl. Abb. 4). Allen Behandlungsoptionen gemein ist eine medikamentöse Therapie und Verhaltensänderungen des Patienten in Bezug auf Risikofaktoren der Arteriosklerose (vgl. Kapitel 1.1.1.). Die medikamentöse Therapie beinhaltet primär lebenslang eine Plättchenaggregationshemmung mittels Acetylsalicylsäure (100mg/Tag), einen HMG-Co-A-Reduktasehemmer („Statine“) sowie einen β -Blocker und einen ACE-Hemmer.^{40,41}

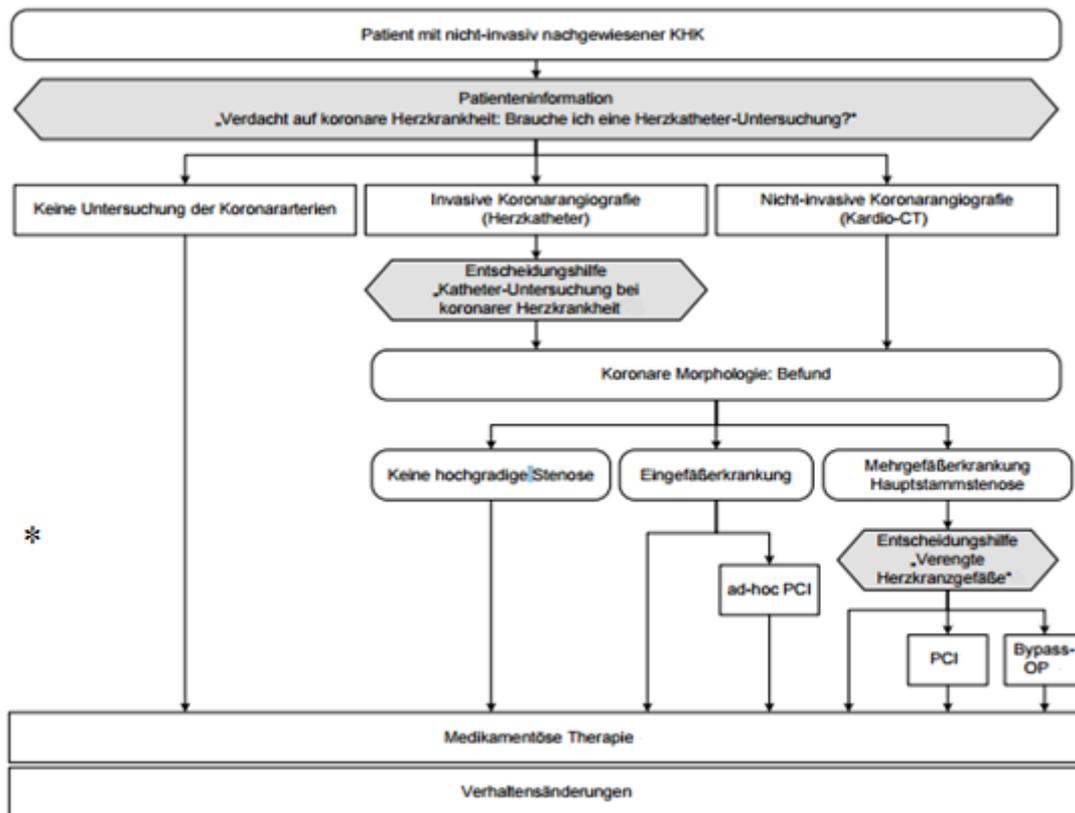


Abb. 4: Algorithmus der Behandlung von KHK. Je nach morphologischem Befund der Stenose und Lokalisation werden verschiedene Therapieschemen unterschieden. Gemein ist die medikamentöse Therapie und die Verhaltensänderung des Patienten im Bezug auf sein Risikoprofil für eine KHK. Wie aus der Abbildung hervorgeht, werden nach Sicherung des morphologischen Koronarbefunds (z.B. über eine Herzkatheteruntersuchung oder eine Kardiocomputertomographie) drei mögliche Behandlungswege unterschieden: bei geringfügiger Stenose ist die Behandlungsoption nur eine medikamentöse Therapie. Bei der Eingefäßerkrankung wird eine zügige perkutane Koronarintervention (PCI) plus nachfolgender medikamentöser Therapie durchgeführt. Bei einer Mehrgefäßerkrankung bzw. Hauptstammstenose wird neben der medikamentösen Therapie und einer PCI für die Langzeitversorgung eine Bypass-Operation angestrebt (mod. nach Leitlinien.de).

1.1.3.1. Revaskularisation & Ischämie-Reperfusionsschaden

Ist bei einer KHK die Indikation zu einer Revaskularisation gegeben, gibt es verschiedene Möglichkeiten zur Durchführung dieser. Bei einer vollständigen/hochgradigen Stenose bzw. einem gesichertem Myokardinfarkt sollte der Eingriff schnellstmöglich nach der Diagnose erfolgen, damit die Myokardischämiezeit möglichst kurz gehalten wird. Innerhalb eines Zeitfensters von 90 Minuten nach Symptombeginn ist die Methode der Wahl die Akut-PCI, bei welcher über einen vorgeschobenen Ballonkatheter die Stenose aufgedehnt wird und meist anschließend

mittels Stent versorgt wird. Diese Stents können unbeschichtet oder mit Immunsuppressiva oder Cytostatika beschichtet sein.⁴² Als Immunsuppressivum oder Cytostatikum werden unter anderen Sirolimus, Everolimus oder Paclitaxel verwendet.⁴³⁻⁴⁵ Wird der neunzigminütige Zeitraum für eine mechanische Revaskularisation überschritten, oder gibt es keine strukturelle Möglichkeit zur einer Akut-PCI kann eine medikamentös induzierte Fibrinolyse Abhilfe schaffen.⁴⁶

Eine andere Möglichkeit der Revaskularisation bei KHK-Patienten bietet eine Bypass-Operation. Bei dieser wird eine körpereigene Arterie oder Vene des Patienten auf die von den Stenosen betroffenen Koronararterien genäht, um die Stenose mittels Kollaterale zu umgehen. Als Arterie wird hierbei zumeist die linke Arteria mammaria interna genutzt. Vorteil hierbei ist, dass die Arterie meistens an ihrem physiologischen Abgang aus der Arteria subclavia gelassen werden kann. Seltener wird auch die Arteria radialis verwendet. Soll ein venöser Bypass gelegt werden, wird meist die Vena saphena magna des Unterschenkels genutzt, welche zunächst (ebenso wie die A. radialis) an die Aorta ascendens anastomosiert werden muss, um als Kollaterale fungieren zu können.⁴⁷

Laut Leitlinie der Europäischen Kardiologischen Gesellschaft sollte bei einer Ein- bzw. Zweigefäß-KHK ohne Beteiligung der Arteria coronaria sinistra bevorzugt eine PCI angewendet werden. Bei Dreigefäß-KHK oder einer Hauptstammstenose wird vor allem zu einer Bypass-Operation geraten (vgl. Abb. 4).⁴⁶

Nach einer Myokardischämie aber vor allem auch insbesondere nach einer Reperfusion des Gewebes durch Revaskularisation kommt es in diesem zu einem Inflammationsprozess, der sich ähnlich dem der Arteriosklerose verhält. Die pathologischen Vorgänge und Schäden nach Reperfusion am ischämischen Gewebe werden Ischämie-Reperfusionsschaden (oder auch Ischemia Reperfusion Injury (IRI)) genannt.

Der komplexe Mechanismus des IRI spielt sich folgendem Maßen ab: Zunächst kommt es in der Ischämiephase im Gewebe verstärkt zu einer Hypoxie-bedingten Expression des Transkriptionsfaktor NF- κ B, wodurch unter anderem IL-6 in den geschädigten Endothelzellen gebildet wird. Ebenso wird Hypoxie-bedingt über den Transkriptionsfaktor HIF- α der proangiogenetischen Faktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) verstärkt zur Synthese angeregt.⁴⁸⁻⁵¹ Während der Ischämie kommt es in den Zellen zum Verbrauch der noch vorhandenen und gespeicherten ATP-Vorräte. Die zelluläre Energiegewinnung wird in der Folge auf anaerobe

Stoffwechselfvorgänge umgestellt. Als Folge dessen bilden sich unter anderem membrangängige Moleküle wie Adenosin, Inosin und Hypoxanthin sowie als Nebenprodukte dieser Reaktionen reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS).⁵² Durch den Verbrauch der zellulären Energieträger fehlen dem Zellstoffwechsel Ausgangsstoffe für die Resynthese von benötigtem ATP. Folglich kommt es zum Ausfall bzw. verminderten Aktivität der ATP-abhängigen Na⁺-K⁺-ATPase in den Membranen des ischämischen Gewebes, sodass sich im Verlauf ein intrazellulärer osmotischer Konzentrationsgradient gegenüber dem Extrazellularraum aufbaut, der zu einer ödematösen Schwellung der Zellen führt.⁵³ Auch konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB im Falle einer ROS-Bildung –wie in beschriebener Kaskade- hochreguliert wird.⁵⁴ Durch eine vermehrte Expression von NF-κB kommt es darauf anschließend weiterhin zur verstärkten Ausschüttung von Zytokinen wie IL-6 und TNF-α sowie Expression und Präsentation von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 und CD11b/CD18 auf Endothelzellen, sodass ähnlich dem inflammatorischen Prozess der Arteriosklerose eine Anheftung von im Blut zirkulierenden Leukozyten an das geschädigte ischämische Gewebe stattfinden kann.^{14,15,55,56} Die Hochregulierung von NF-κB bedingt somit einen Teufelskreis: Der Transkriptionsfaktor verstärkt einerseits die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF-α, welche wiederum ihrerseits eine Hochregulation der Expression von NF-κB fördern.⁵⁷

Eine weitere verheerende Eigenschaft der ROS ist, dass Endothelzellen direkt durch die gebildeten Sauerstoffradikale und -spezies geschädigt werden. Dieser Schaden wird als Endotheldysfunktion bezeichnet. Die Endotheldysfunktion bedingt sowohl eine erhöhte Gefäßpermeabilität als auch eine weitere Zytokinfreisetzung und Adhäsionsmolekülexpression wie z.B. CD31 und CD11b/CD18. Dies begünstigt in der Folge vor allem den Prozess der Leukozytendiapedese insbesondere durch Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten (vgl. Abb. 5).^{58-27,59} Lucchesi et al. sowie weitere Studien konnten nachweisen, dass neben den Endothelzellen auch neutrophilen Granulozyten ihrerseits massiv proinflammatorische Zytokine sowie ROS freisetzen und damit die Diapedese selbst über eine Progression der Endotheldysfunktion begünstigen (vgl. Abb. 6).⁶⁰⁻⁶³

Nicht nur durch neutrophile Zellen werden ROS gebildet: Wird nach einer Ischämie des Gewebes eine Revaskularisation bzw. Reperfusion eingeleitet, werden durch Verbrauch von Metaboliten wie Hypoxanthin sowie durch das oxygenierte arterielle Blut erneut

massiv ROS gebildet, was eine weitere Schädigung des Gewebes und Steigerung des IRI bedingt.⁶⁴ Das Phänomen, welches besagt, dass die Reperfusion von ischämischem Gewebe mit sauerstoffhaltigem Blut den IRI vergrößert, wird in der Literatur als Sauerstoffparadoxon bezeichnet.

Eine weitere Veränderung während des Ischämiezeitraumes sowie der Reperfusion ist ein möglicher zellulärer Abwehrmechanismus von glatten Muskelzellen der Gefäße sowie Kardiomyozyten gegenüber einem Ischämie-bedingten Zelltod. Hierbei handelt es sich zunächst um den Abfall des intrazellulären pH-Werts. Nach beginnender Reperfusion werden die sauren Metabolite bzw. Protonen aus dem Intrazellularraum vor allem durch den Na⁺/H⁺-Kanal in das reperfundierende Blut ausgewaschen und ein physiologischer zellulärer pH-Wert pendelt sich in den Zellen ein.⁶⁵⁻⁶⁷ Dieser Vorgang wird in der Literatur als pH-Paradoxon beschrieben.

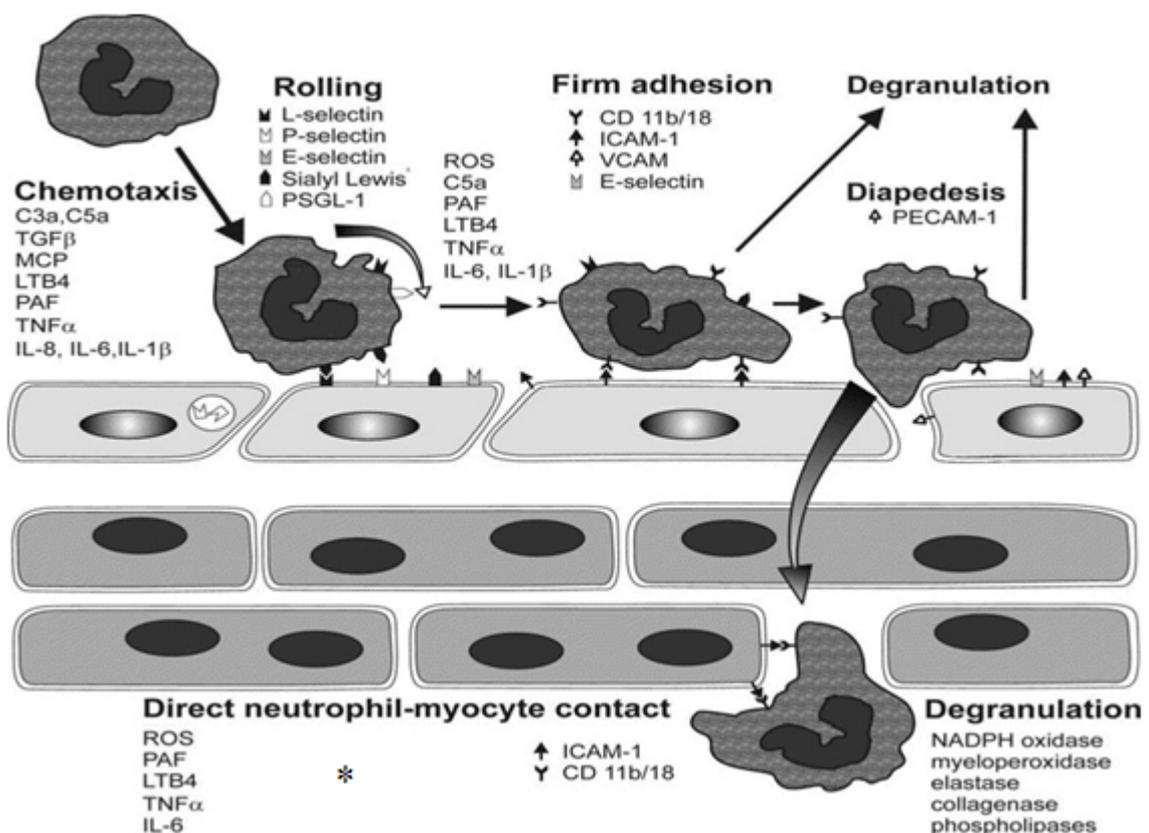


Abb. 5: Leukozytendiapedese. Zu sehen ist der Vorgang der Leukozytendiapedese. Zunächst kommt es über das s.g. Rolling (eine Art „abrollen“ der Leukozyten auf dem Endothel) und einer lockeren Selektin-Bindung zur Annäherung der im Blut zirkulierenden Leukozyten ans Endothel. Durch die Annäherung werden zytokinvermittelt die vorhandenen Bindungen durch Adhäsionsmoleküle wie z.B. der Integrinkomplex CD11b/CD18 hochexprimiert und verstärkt. Dadurch kommt es zur schrittweisen festen Anlagerung der Leukozyten auch mittels CD31 an das Endothel. Nach der Bindung und Aktivierung kommt es letztendlich zur Transmigration der Leukozyten in das Gewebe. Bereits transmigierte Makrophagen verstärken über Zytokinausschüttung die weitere Annäherung und Ortsdetektion der Leukozyten aus dem Blut. Eine Entzündungskaskade im Gewebe der Gefäße entsteht in der Folge (mod. nach Kaminski et al.).

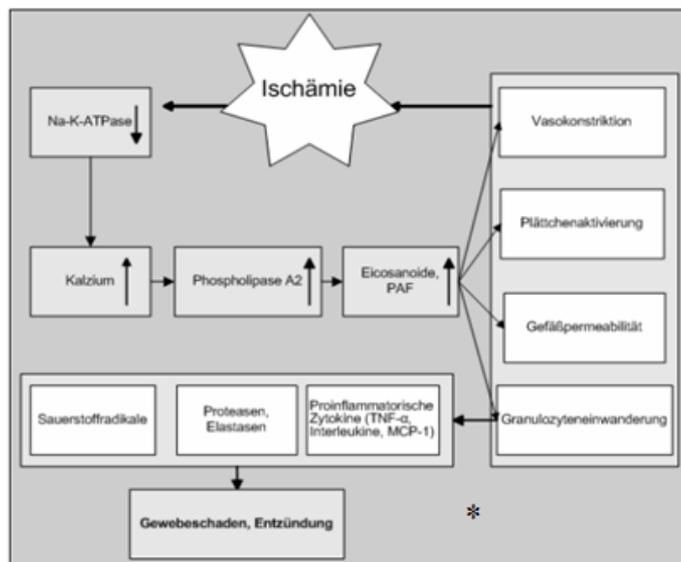


Abb. 6: Zelluläre Veränderungen während der Ischämie. Zu sehen ist die einsetzende Kaskade während des Ischämiezeitraums. Über den Zusammenbruch des zellulären Elektrolytgradienten durch Minderung in der Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ kommt es zu vielseitigen nachgeschalteten Prozessen. Über einen intrazellulären Kalziumanstieg kommt es über die Phospholipase A2 sowie dem Plättchen-aktivierenden Faktor und Eicosanoiden zur Vasokonstriktionen der betroffenen Gefäße, einer Plättchenaktivierung sowie einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität sowie der Einwanderung von Granulozyten in das ischämische Gewebe. Die Granulozyten setzen ihrerseits proinflammatorische Moleküle sowie ROS und Enzyme wie Proteasen und Elastasen frei, welche den IRI im Gewebe massiv verstärken (mod. nach Transplantation.de).

1.2. Organtransplantation

Unter einer Organtransplantation (hier am Beispiel der Herztransplantation) versteht man die operative Übertragung eines Spenderorgans auf einen bedürftigen Organempfänger. Eine Herztransplantation stellt als Therapieform meist die letztmögliche Therapieoption dar. Die Indikation für eine Herztransplantation ist zumeist eine therapierefraktäre terminale Herzinsuffizienz im Endstadium (s.g. NYHA

IV Stadium). Die Herzinsuffizienz kann hierbei zum Beispiel Folge eines langjährigen KHK nach Myokardinfarkt sein. Weitere verschiedene Herzparameter wie z.B. die linksventrikuläre Ejektionsfraktion, die Herzfrequenz oder der Blutdruck werden für die Abschätzung der Bedürftigkeit eines Spenderherzens herangezogen.^{68,69}

1.2.1. Immunsuppression nach Herztransplantation

Ein generelles Problem bei einer allogenen Organtransplantation stellt eine mögliche Abstoßungsreaktion des Empfängers dar (s.g. Graft-versus-Host-Disease). Eine chronische Abstoßung des Herzens vermittelt über die Koronarien wird auch Transplantatvaskulopathie genannt. Hierbei kommt es zu einer chronischen Inflammationsreaktion der Gefäße im transplantierten Herzen. Diese Inflammation kann in der Folge eine Koronararteriosklerose bedingen, welche dem Inflammationsmechanismus aus Kapitel 1.1.1 ähnelt. Der Auslöser einer Transplantatvaskulopathie scheint wie Hollenberg et al. herausgefunden eine Schädigung des Endothels zu sein.⁷⁰ Durch Unterschiede in den Humanen-Leukozyten-Antigenen(HLA)-Subtypen des Empfängers und dem Spenderorgan (s.g. HLA-Mismatch) kommt es zur Zytokinausschüttung durch Leukozyten mit anschließender Leukozytendiapedese über Adhäsionsmoleküle wie unter anderem ICAM-1 und dem entsprechenden Liganden auf den Endothelzellen CD11b/CD18.⁷¹ Auch spielt die Ischämiezeit des Spenderherzens zwischen Explantation am Spender und Implantation am Empfänger eine Rolle in der Inflammationsentstehung. Hierbei wird durch die Abschneidung der Blutzufuhr und Oxygenierung des Herzens ein künstlicher IRI im Transplantatgewebe erzeugt, welcher auch mit der Bildung von ROS einhergeht (genauer Mechanismus vgl. Kapitel 1.2.3.1.).^{72,73} Diesen IRI am zu transplantierenden Organ gilt es möglichst gering zu halten.

Bei einer abstoßungsbedingten Transplantatvaskulopathie finden sich im Vergleich zu einer KHK-bedingten Arteriosklerose eine höhere Durchwanderung der Gefäße mit Immunzellen, eine geringeren Kollateralbildungen der Gefäße, eine intakt gebliebene Membrana elastica interna, eine geringe Kalzifikation innerhalb des Gefäßes, ein generell eher konzentrisches Ausbreitungsmuster und eine diffus-distale Lokalisation.⁷⁴⁻

⁷⁸ Oft führt eine Transplantatvaskulopathie außerdem im Verlauf zu einem

Funktionsverlust des Transplantationsorgans und macht eine erneute Transplantation unumgänglich bzw. ist teilweise mit einer der Haupttodesursache im ersten Jahr nach der Herztransplantationen.⁷⁹

Als Prophylaxe einer Abstoßungsreaktion werden die Empfänger nach der Transplantation standardmäßig lebenslang mit Immunsuppressiva behandelt, um die HLA-Mismatch-bedingte Immunantwort auf das transplantierte Organ zu unterdrücken. Als immunsuppressive Therapie wird zumeist eine Tripple-Therapie aus einem Glucokortikoid, einem Calcineurininhibitor oder einem mTOR(mammalian target of Rapamycine)-Inhibitor wie Everolimus oder Sirolimus plus Azathioprin oder Mycophenolat-Mofetil gegeben. Teilweise wird die Therapie durch monoklonale Antikörper erweitert.⁸⁰⁻⁸³

1.3. Sirolimus

Sirolimus besitzt seit März 2001 die Zulassung als Medikament für den Raum der Europäischen Union unter dem Handelsname Rapamune®.⁸⁴ Erstmals wurde die Substanz mit makrozyklischer Laktonstruktur (siehe Abb. 7) 1972 im Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* auf einer der Osterinseln (Rapa Nui) bei einer Expedition auf der Suche nach neuen antimikrobiellen Wirkstoffen entdeckt. Ein veralteter Name für Sirolimus ist aufgrund seines Fundortes Rapamycin.⁸⁵

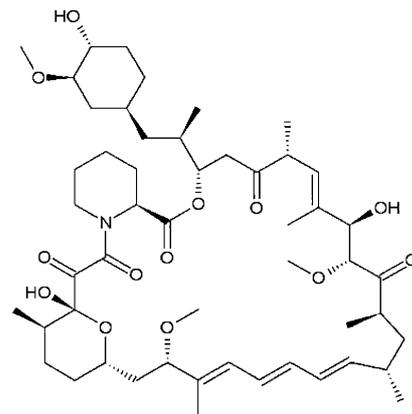


Abb. 7: Strukturformel von Sirolimus. Summenformel $C_{51}H_{79}NO_{13}$, bei einem Molekulargewicht von 914,17g/mol (mod. nach Streit et al.)

1.3.1. Wirkung

Sirolimus wirkt in humanen Zellen als mTOR-Inhibitor. Das mTOR-Molekül ist eine Serin/Threoninkinase, welche sich aus den Unterkomplexen mTOR-C1 und mTOR-C2 zusammensetzt.⁸⁶ Der mTOR-Komplex wird physiologisch durch Wachstumsfaktoren

sowie den JAK/STAT-Kinase weg aktiviert.⁸⁷ Intrazellulär aufgenommen geht Sirolimus zunächst einen Komplex mit einem Bindungsprotein namens FKBP-12 ein.^{88,89} Dieser Komplex hemmt in der Folge direkt das mTOR-Protein, sodass die weitere Signalkaskade ausgehend von mTOR unterbunden wird. Physiologisch aktiviert das mTOR-Protein eine Proteinkinase namens P70S6K. Diese Proteinkinase phosphoryliert im Verlauf das S6-Protein einer ribosomalen S40 Untereinheit sowie den Elongationsfaktor eEF-2 zur weiteren Synthese zellulärer Proteine.⁸⁹⁻⁹¹ Auch führt eine aktivierte Proteinkinase P70S6K über Zwischenschritte zur Synthese des Proliferation-Cell-Nuclear-Antigens (PCNA). Das PCNA ist essentieller Bestandteil der DNA-Transkription in der S-Phase eines Zellzyklus.⁹² Diese beiden Mechanismen werden nun durch Sirolimus gehemmt, sodass es zum Sistieren des Zellzyklus in der S- sowie von physiologischen Abläufen der zellulären Proteinbiosynthese kommt.

Ein weiterer Wirkungszweig des Sirolimus-FKBP-12-Komplexes ist die Hemmung der Phosphorylierung des Proteins 4E-BP1. Phosphoryliertes 4E-BP1 spaltet sich von seiner physiologischen Bindung zum Initiationsfaktor eIF-4E ab, sodass dieser Faktor aktiviert wird und nachgeschaltet den Zellapparat für die Synthese von Wachstums- und Zellproliferationsproteinen antreibt.⁹³ Durch diese Mindersynthese bzw. Inhibition kommt es unter anderem zu einem antiproliferierenden Effekt auf glatten Muskelzellen der Gefäßwände.^{94,95}

Weiterhin bewirkt Sirolimus, dass die Aktivitäten der Kinasenkomplexe cdk4/Cyclin-D sowie cd2/Cyclin-E gedrosselt werden. Diese Cyclinkomplexe spielen eine wichtige Rolle beim Übergang der verschiedenen Zellzyklusphasen. Der cd2/Cyclin E-Komplex ist hierbei essentiell beim Übergang von der G1- in die S-Phase, was nun durch die Sirolimuswirkung unterdrückt wird.⁹⁶ Vor allem der Zellzyklus von T-Lymphozyten ist hiervon betroffen, sodass Sirolimus sowohl direkt auf die zelluläre Immunantwort als auch indirekt mittels Suppression des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 wirkt.^{97,98} Auch bewirkt die verminderte Interleukin-2-Ausschüttung eine Hemmung auf die Ausdifferenzierung von B-Lymphozyten zu antigenproduzierenden Plasmazellen.⁹⁹ Des Weiteren deutet der Versuch von Dhingra et al. darauf hin, dass mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus eine Blockade der Wirkung des Transkriptionsfaktors NF- κ B verursacht und somit über die Inhibierung des Signalweges von TNF- α dazu beiträgt, den Ischämie-Reperfusionsschaden einzudämmen (vgl. Kapitel 1.1.3.1.).^{100,101}

Insgesamt kann zusammengefasst werden, dass Sirolimus über die Inhibierung des mTOR-Signalweges sowohl über die zytokinvermittelte Zellproliferation und – differenzierung als auch über die direkte Cyclin-Komplexinhibierung eine Inhibition der Lymphozyten bewirkt (vgl. Abb. 8 und 9).

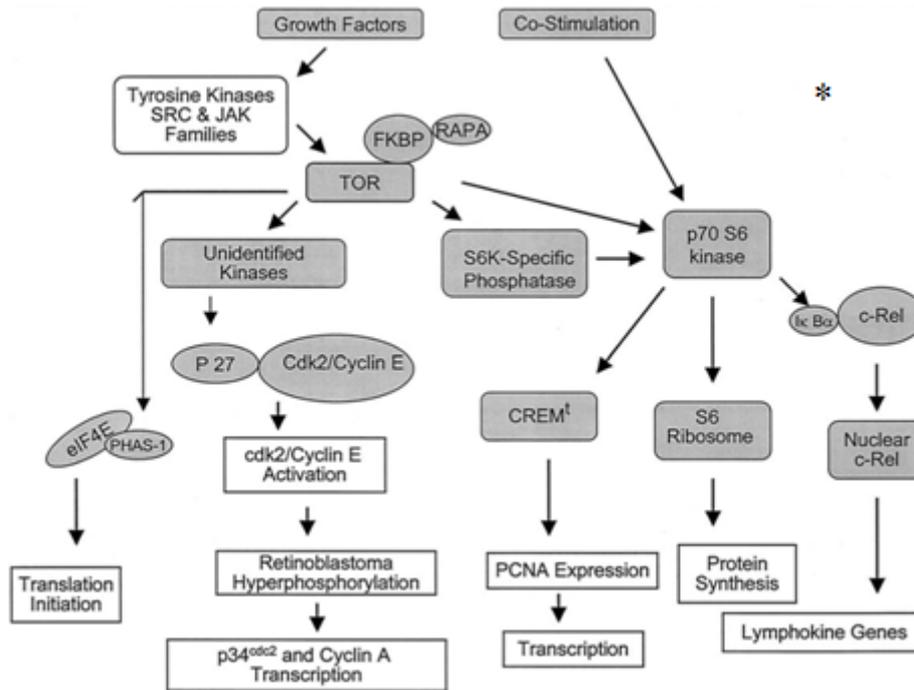


Abb. 8: Signalkaskade des mTOR-Komplexes. Wachstumsfaktoren sorgen über eine Aktivierung des JAK- und STAT-Kinasewegs zu einer Stimulation des mTOR-Komplexes. Dieser Komplex aktiviert Initiationsfaktoren wie eIF4E und verschiedene Kinasen, welche wiederum über Cyclin-Komplex-Regulierung zur Proliferation bzw. Proteinbiosynthese führen. Eine entscheidende Kinase stellt die p70S6-Kinase dar, welche im weiteren Verlauf über ribosomale Aktivierung und PCNA-Expressionvermehrung die Zellzyklen und Proteinsynthesen steuert. Über eine Hemmung des mTOR-Proteins bewirkt Sirolimus sowohl eine Hemmung der p70S6-Kinase sowie eine Drosselung der Aktivitäten von Cyclin-Komplexen und des Initiationsfaktors eIF-4E. In der Folge kommt es zur Suppression der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und der Zellproliferation bzw. Differenzierung von Lymphozyten. Durch Hemmung der Proliferation finden mTOR-Inhibitoren Einzug in aktueller Forschung der Tumorthherapie, da z.B. eine unkontrollierte Cyclin-E-Aktivität zu einem Retinoblastom führen kann (mod. nach Sehgal et al.).

1.3.2. Einsatzgebiete

Ein häufiges Einsatzgebiet von Sirolimus ist die immunsuppressive Therapie nach Organtransplantationen zur Verhinderung von akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen (vgl. Kapitel 1.2.1.). Bei Versuchen an Affen wurde nachgewiesen, dass Sirolimus zur zeitweisen Regressionen bei Transplantatvaskulopathien beitragen kann.¹⁰² Ein Vorteil von Sirolimus gegenüber anderen

Immunsuppressiva wie z.B. Tacrolimus ist hierbei, dass dieses nicht nephrotoxisch wirkt, was vor allem nach Nierentransplantationen von Bedeutung ist.¹⁰³

Auch konnte gezeigt werden, dass Sirolimus nach Herztransplantationen das Risiko für die Entstehung einer KHK senkt sowie über die Inhibierung der Proteinkinase p70S6 protektiv auf Myokardinfarkte wirken kann und über dem hinaus zusätzlich den IRI über Blockade des Transkriptionsfaktors NF-κB und einer Verminderung von ROS eingrenzt.^{83,104,105} Zur IRI Eingrenzung trägt auch die Sirolimus-bedingte Inhibierung von T-Lymphozyten bei.¹⁰⁶

Ein weiterhin verbreitetes Einsatzgebiet ist die mit Sirolimus beschichtete Einsetzung von Stents bei KHK, da hierdurch die Restenoserate sowie die Häufigkeit für klinische Herzsymptomaten gesenkt werden können (vgl. Kapitel 1.1.3.1.).^{43,107}

In einigen Studien wurde darüber hinaus bestätigt, dass die mTOR-Signalkaskade über Stimulation der Bildung des VEGF neovaskularisch wirkt. Sirolimus steht deshalb als mTOR-Inhibitor im Fokus der Forschung als Neovaskularisationshemmer sowie als Zellzyklusphasenstabilisator Einsatz in der Tumorthherapie zu finden (vgl. Abb. 8).¹⁰⁸⁻¹¹⁰

1.4. Everolimus

Everolimus ist ebenso wie Sirolimus ein makrozyklisches Lakton (vgl. Abb. 9), welches allerdings nur synthetisch hergestellt werden kann. Chemisch betrachtet liegt der Unterschied in der Struktur zwischen Everolimus und Sirolimus in der Anlagerung einer Hydroxyethylgruppe am C₄₂-Atom von Everolimus.^{111,112,112,113} Seit 2003 besitzt Everolimus unter dem Handelsnamen Certican® seine Zulassung für die EU.¹¹⁴

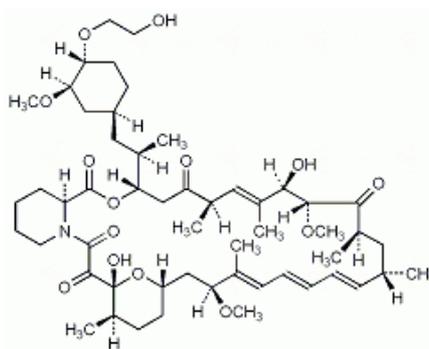


Abb. 9: Strukturformel von Everolimus.
Summenformel C₅₃H₈₃NO₁₄, bei einem Molekulargewicht von 958,2g/mol (mod. nach Medpharm-Text.de).

1.4.1. Wirkung

Durch die Ähnlichkeit in der molekularen Struktur ist die Wirkungsweise von Everolimus ähnlich der von Sirolimus. Everolimus ist somit ebenfalls ein Inhibitor des mTOR-Komplexes (vgl. Kapitel 1.3.1. und Abb. 8).^{115,116} Durch die Veränderung in der Molekularstruktur ergeben sich allerdings Unterschiede zwischen den Derivaten, die vor allem auf der Pharmakokinetik beruhen: Die Halbwertszeit von Everolimus wird durch die synthetische Modifikation von Sirolimus von 63h auf 24-31h gesenkt. Auch führt die Anlagerung der Hydroxyethylgruppe zu einer hydrophileren Eigenschaft und einer größeren oralen Bioverfügbarkeit als die von Sirolimus.¹¹⁷ Sowohl Sirolimus als auch Everolimus sind Substrate des CYP-P450-3A4/5 und CYP-450-2C8-Systems und werden darüber verstoffwechselt.¹¹⁸

Als Analogon zu Sirolimus wirkt Everolimus somit zunächst auch über die Komplexbildung an das Protein FKBP-12. Die Everolimus-FKBP-12-Bindung an den mTOR-C2-Komplex ist hierbei stärker als die von Sirolimus.¹¹⁹ In der Folge werden die nachgeschalteten Prozesse und Proliferationswege über mTOR und NF- κ B blockiert. Everolimus ist demzufolge auch ein Inhibitor der direkten zellulären Immunantwort der T-Lymphozyten durch Arrest in den G1-S-Zellphasezyklen als auch über den Zwischenschritt der Inhibition der Signaltransduktion mittels Interleukin-2 oder TNF- α . Auch konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten über Inhibierung der Ausbildung von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, ICAM-1 und CD11b gehemmt werden. Everolimus eignet sich deshalb ebenso wie Sirolimus, den Ischämie-Reperfusionsschaden einzugrenzen und es zeigt ebenso eine Reduktion von ROS.^{101,120-122} In einigen Versuchen zeigte sich, dass Everolimus möglicherweise eine stärkere inhibitorische Gesamtwirkung auf dem mTOR-Komplex und nachgeschaltete Endothelprozesse besitzt als Sirolimus.¹²³ Darüber hinaus wirkt Everolimus analog als mTOR-Inhibitor inhibitorisch auf Expression des Hypoxie-induzierten Wachstumsfaktors VEGF wie Sirolimus.¹²⁴

1.4.2. Einsatzgebiete

Durch die Hemmung der Leukozytendiapedese durch Everolimus wird dieses als Standardtherapie zur Prophylaxe von Transplantatvaskulopathien am Herzen, der GvHD nach Nierentransplantationen sowie als Salvage Therapy bei chronischer GvHD eingesetzt. Entsprechend der Wirkung von Everolimus werden somit die proinflammatorischen Prozesse der Abstoßungen supprimiert.^{80,81,125,126} In Studien hat sich herausgestellt, dass nach Herztransplantationen eine Kombinationstherapie von Everolimus mit niedrigdosiertem Cyclosporin A ebenso effektiv im Bezug auf die Immunsuppression als auch auf die Stärke der Nephrotoxizität ist, wie eine übliche Standarddosis Cyclosporin A kombiniert mit MMF. Somit konnte sich eine nephroprotektivere Therapie mit Everolimus dank Einsparung des nephrotoxischen Cyclosporins etablieren.¹²⁷⁻¹³⁰ Auch führte diese Therapiekombination zum verminderten Remodeling am Herzen (Fibrosierung und Dilatation z.B. nach Myokardinfarkt) und der damit folgenden linksventrikulären Hypertrophie.¹³¹ Ebenso findet Everolimus Anwendung in Kombination mit Tacrolimus nach Lebertransplantationen.¹³²

Weitere Anwendungsgebiete des Everolimus sind das über den Angriffspunkt der Blockade des Initiationsfaktors eIF-4E und der antiangiogenetischen Wirkung auf über Verringerung der VEGF-Expression als Chemotherapeutikum bei metastasierten Nierenzellkarzinom, neuroendokrinen Tumoren des Pankreas und Riesenzellastrozytomen.¹³³⁻¹³⁷

Ebenso wie Sirolimus wird Everolimus dazu genutzt, sowohl bioresorbierbare Stents als auch Metallstents für die Behandlung der KHK zu beschichten, um Restenoseraten zu senken. Es zeigten sich hierbei bessere Ergebnisse als in der Behandlung mit Paclitaxel als auch mit Sirolimus.^{45,138,139}

Fragestellung:

Beurteilung des Einflusses von Sirolimus und Everolimus auf den Ischämie-Reperfusionsschaden im humanen Gefäßmodell

anhand von drei Versuchsgruppen (Kontrollgruppe, Sirolimus-Gruppe sowie Everolimus-Gruppe) mittels Quantifizierung des Interleukin-6, TNF- α – sowie VEGF-Spiegels im Reperfusionsblut des Bioreaktors sowie der Expression und Quantifizierung von CD11b-positiven und CD31-positiven Gefäßendothelzellen.

2. Material und Methoden

Für die Versuche am humanen Gefäßmodell wurden sieben Gefäße von Bypass-Operationen mit nicht-medikamentös zugesetzten Blutproben reperfundiert (Kontrollgruppe n= 7), sechs Gefäße mit dem Zusatz von Sirolimus im Blut (n= 6) sowie sieben Gefäße mit Zusatz von Everolimus im Blut reperfundiert (n=7). Insgesamt wurden somit 20 Gefäße verwendet.

2.1. Ein- & Ausschlusskriterien

Das Einschlusskriterium für die Benutzung humaner Gefäße aus einer Bypass-Operation war, dass das Lebensalter des Gefäßspenders/spenderin über 18 Jahre lag.

Ausschlusskriterien für die Benutzung humaner Gefäße aus einer Bypass-Operation waren:

- Insulinpflichtige Diabetiker
- Infektiöse Patienten (v.a. chronische Infektionen wie HIV und Hepatitiden)
- Variköse Gefäßzustände
- Tiefe Venenthrombosen in der Anamnese
- Reperfusionisblutlagerung >48h

2.2. Bioreaktor

Der benutzte Bioreaktor für die Reperfusion humaner Gefäße aus Bypass-Operationen ist eine Sonderanfertigung, welche im Rahmen einer Bachelorarbeit im Fachbereich „Medizintechnik und Technomathematik“ der Fachhochschule Aachen an der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Frankfurt entstand.¹⁴⁰ Diese Bachelorarbeit beruht auf der Weiterentwicklung der Grundlage eines Bioreaktormodells, welches zunächst in interdisziplinärer Zusammenarbeit an der Technischen Universität München angefertigt wurde.¹⁴¹ Bereits einige Vorversuche mit

nicht-humanen Gefäßmodellen sowie Kreislaufmodelle zur Perfusion einzelner Organe dienten hierbei außerdem als Vorbild.^{142,143}

Der Bioreaktor kommt zur Simulation des humanen Blutkreislaufs und Gefäßsystems zum Einsatz. Er verfügt über ein eigenes Reservoir, welches in dieser Versuchsdurchführung als Blutreservoir dient. Über Konnektoren und Schlauchsysteme – angetrieben von einer Rollerpumpe – wird hierbei humanes Blut durch die Gefäße geleitet.

Die Gefäße befinden sich während der gesamten Reperfusion in einem mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gefüllten Zylinder, welcher ein physiologisches Milieu simulieren soll. Nach Durchfluss des Blutes durch die Gefäße fließt das Blut über einen ableitenden Schlauchschenkel erneut in das Blutreservoir und schließt somit den Kreislauf.

Bestand die Möglichkeit bei einer Bypass-Operation mehrere Gefäßstücke zu erhalten, konnten insgesamt bis zu drei Gefäße parallelgeschaltet in das System des Bioreaktors integriert und somit gleichzeitig reperfundiert werden (vgl. Abb. 10 und 11).

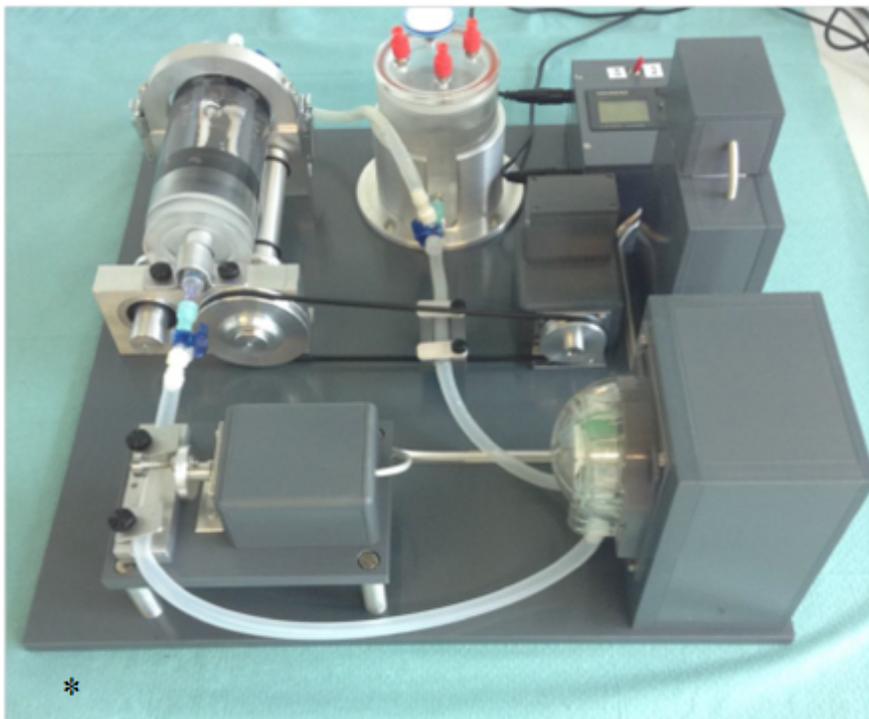


Abb. 10: Bioreaktor. Rechts oben befindet sich der die Steuereinheit. Links daneben befindet sich das zentrale Blutreservoir, aus dem mittels Schläuchen das Blut zur rechts unten befindlichen Okklusionspumpe getrieben werden. Nach Durchlauf durch die Pumpe wird das Blut letztendlich durch den mit PBS-Lösung gefüllten Zylinder (links oben) mit den eingespeisten Gefäßen geleitet. Der Blutkreislauf schließt sich in der Folge durch erneuten Anschluss an das Reservoir (mod. nach Herrmann).

Um Luftembolien in dem simulierten Gefäß- und Blutkreislauf zu vermeiden, wird anhand von Empfehlungen und analog zur Priming-Technik bei Herz-Lungen-Maschinen während herzchirurgischer Operationen eine Entlüftung der im Schlauchsystem befindlichen Luft durchgeführt.^{140,144,145} Diese Entlüftung findet über Drei-Wege-Hähne proximal des/der zwischengeschalteten Gefäßes/Gefäße statt, um die Luft bei Reperfusionbeginn nicht durch die verwendeten Gefäße zu pumpen und somit Gewebeschäden zu vermeiden.



Abb. 11: Gefäßreservoir inklusive einem Gefäß. In der Abbildung erkennt man die Konstruktion, in welcher die Gefäße während der Versuchsdurchführung im Bioreaktor eingespannt sind. Auf dieser Abbildung ist rechtsseitig ein humanes Gefäß in die Vorrichtung über Konnektoren und Nahtmaterial eingespannt. Unten befindet sich der blutzuführende, oben der blutabfließende Schenkel der Konstruktion. Der Einbau mehrerer Gefäße gleichzeitig ist in diesem Konstrukt möglich. Umgeben wird die Vorrichtung während der Versuchsdurchführung mittels einem Zylinder, welcher mit PBS-Lösung gefüllt ist.

2.3. Vorbereitungen

Tabelle 1: Materialien für die Vorbereitungen des Versuchs

Equipment	Hersteller
Vollblut Blutgruppe AB, Rhesusfaktor negativ	Deutsches Rotes Kreuz, Blutspendedienst Baden- Württemberg/Hessen, Institut Frankfurt am Main
automatischen Hämatologie- Analysator	Sysmex KX -21N (Sysmex, Kōbe, Japan)
Blutgasanalysegerät	Radiometer A/S ABL 5 (Radiometer A/S, Kopenhagen, Dänemark)
Krebs-Henseleit-Lösung	0,9l Aqua dest., Krebs-Henseleit-Buffer (Sigma- Aldrich, St. Louis, USA), 0,373g Calciumchlorid, 2,1g Natriumbicarbonat, pH-Justierung auf 7,1-7,3 mit HCl oder NaOH
Heparin 25000IE/5ml	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Kleintier-Herz-Lungen- Maschine	Modell 2000 (Martin Humbs Ingenieurbüro für Feinwerktechnik, Valley, Deutschland)
Membranoxygenator	Oxyphan PP50/280 (Membrana, Neuss, Deutschland)
Druckgas-Sauerstoffgerät	Sauerstoff medicAL 100 % 2L 200bar (Air liquide, Paris, Frankreich)
Druckminderer	ARTN-0026 (Dräger, Lübeck, Deutschland)
PBS-Lösung	Life technology (Carlsbad, USA)
NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Nahtmaterial	Prolene 4-0 (Ethicon, Somerville, USA)

2.3.1. Vollblut & Blutparameter

Für die Versuche wird Vollblut des Deutschen Roten Kreuz-Blutspendedienstes Baden-Württemberg/Hessen vom Institut in Frankfurt am Main verwendet. Ausschließlich nicht-infektiöses Blut der Blutgruppe AB und Rhesusfaktor Negativ wird hierfür benutzt, um Antikörper gegen Blutgruppen der Gefäßspender im Blutserum auszuschließen.

Vor Versuchsbeginn wird mittels automatischen Hämatologie-Analysator eine Hämatokritmessung (HKT) vorgenommen. Darüber hinaus werden durch diesen Analysator Erythrozyten- und Leukozytenzahlen sowie das mittlere korpuskuläres Volumen (MCV) quantifiziert.

Mittels eines Blutgasanalysegeräts wird außerdem vor Versuchsbeginn der Sauerstoffpartialdruck (pO_2) des Vollblutes gemessen, um Entscheidungen über die Präoxygenierung treffen zu können.

2.3.1.1. Vorbehandlung des Blutes vor Versuchsbeginn

Für die Versuche wird jeweils 150 ml Vollblut benutzt. Um standardisierte Vollblutproben für die Versuche zu generieren, werden die Blutproben mittels Krebs-Henseleit-Lösung auf einen einheitlichen Hämatokritwert von 30% gesenkt. Dies geschieht angelehnt an ähnliche Vorversuche an Nicht-Human-Gefäßen zur Testung von Immunsuppressiva bzgl. des IRI.¹⁴³ Hierbei wird das notwendige Volumen an Krebs-Henseleit-Lösung mittels folgender Gleichung berechnet und den 150 ml Vollblut hinzugegeben:

- (1) $HKT * \text{Blutvolumen [in ml]} = \text{Zellbestandteile [in ml]}$
- (2) $\text{Zellbestandteile [in ml]} / 0,3 = \text{Benötigtes Gesamtvolumen [in ml]}$
- (3) $\text{Benötigtes Gesamtvolumen [in ml]} - 150 \text{ ml Vollblut} = \text{Benötigte Menge an Krebs-Henseleit-Lösung für Senkung von HKT auf 30\%}$

Nach dieser Standardisierung wird anschließend den Blutmengen 5000 Internationalen Einheiten (I.E.) Heparin (Heparin 25000IE/5ml) hinzugefügt, um die Koagulabilität innerhalb des Schlauch- und Reservoirsystems zu senken. Ohne Antikoagulation besteht ein hohes Risiko einer Thrombenbildung aufgrund von nicht-humanen Oberflächen der Schlauchsysteme. Diese Zugabe geschieht in Anlehnung an eine Heparinzugabe während einer Bypass-Operation mittels Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine, bei welcher dies eine Standardprozedur darstellt.¹⁴⁶

Ein weiterer Vorbereitungsschritt stellt die ca. 15 minütige Erwärmung des Blutes mittels eines Wasserbads dar, um das Blut auf die physiologische Körpertemperatur von 37 Grad Celsius anzuheben.

Damit während des Reperfusionzeitraums ein pO_2 von 100% aufrecht erhalten werden kann, werden die Blutproben vor Versuchsbeginn mittels einer Kleintier-Herzlungenmaschinen (HLM) mit einem Flow von durchschnittlich 30ml/min präoxygeniert. Eine Kleintier-HLM stellt eine etablierte Methode in der Erforschung des IRI dar.¹⁴⁷ Diese genutzte Kleintier-HLM wird mit einer Rollerpumpe betrieben. Hieran angeschlossen ist in dem Versuchsaufbau ein Membranoxygenator mit einer Oxygenierungsoberfläche von ca. 500cm² und einem maximalen Durchfluss von ca. 60ml/min. Die Präoxygenierung des Versuchsblutes wird beendet, sobald durch eine Blutgasanalyse (BGA) ein pO_2 zwischen annähernd 90-100% erreicht wird.

Für die Präoxygenierung wird hierbei ein Druckgas-Sauerstoffgerät mit >99,5% Sauerstoffgehalt benutzt (2 Liter-Flasche, 200bar). Zur Druckregulation und Schutz des Blutes vor Überdruck wird ein Druckminderer zwischen geschaltet.

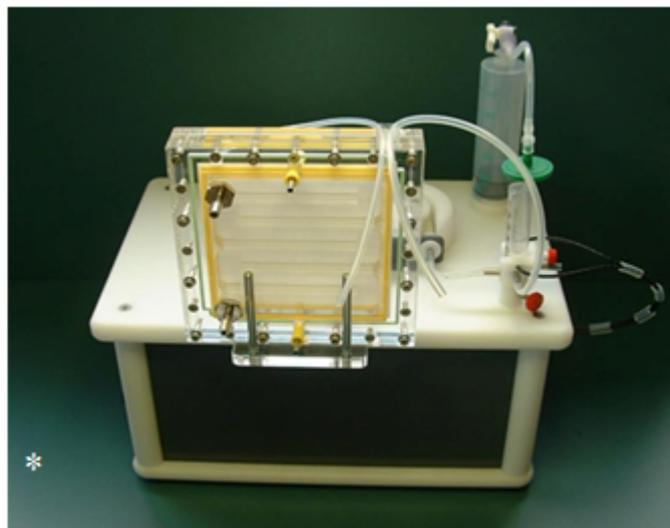


Abb. 12: Kleintier-HLM. (vorherige Seite) Auf der Abbildung erkennt man die genutzte Kleintier-HLM. Diese HLM befördert Blut aus dem Reservoir des Bioreaktors mittels einer auf der Abbildung hinter der Oxygenatormembran verdeckten Rollerpumpe zum angebauten Membranoxygenator (durchsichtiges Plastikgehäuse mit gelben Dichtungen). Dies geschieht mittels Silikonschläuche, welche das Blut nach Oxygenation wieder ins Reservoir zurückleiten. Auf der nicht gegenüberliegenden Seite der HLM lässt sich über einen Regler die Durchflussrate durch die HLM regulieren (mod. nach Herrmann).

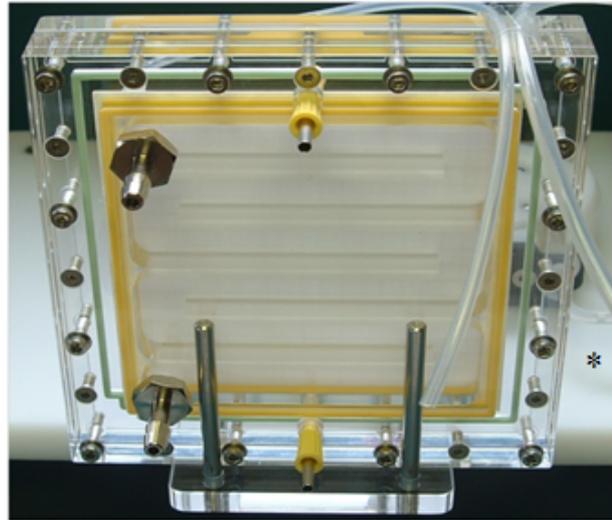


Abb. 13: Membranoxygenator. Der abgebildete Membranoxygenator wird mittels Schläuchen an die Kleintier-HLM angeschlossen und dient der Anreicherung der Präoxygenierung des Blutes. An die schwer zu erkennenden Öffnungen in der Mitte rechts und Mitte links werden jeweils ein Ein- und Auslass für die Anschlüsse an das Sauerstoffgerät befestigt. Über die gelben Anschlüsse (jeweils oben und unten) werden Silikonschläuche montiert, welche dem Blutein- und ausstrom dienen. Der Blutfluss erfolgt entlang der Schwerkraft durch Mikrokapillaren von oben nach unten. Nach der Oxygenierung wird das Blut in das Reservoir des Bioreaktors zurückgeleitet (mod nach Herrmann).

2.3.1.2. Gefäße

Als Gefäße wurden im humanen Gefäßmodell Stücke von Arterien und Venen verwendet, welche bei Bypass-Operationen an der Kerkhoff-Klinik in Bad Nauheim keine Verwendung in der jeweiligen OP fanden, allerdings vor der Bypass-Legung als mögliche Bypässe aus dem Empfänger präpariert wurden. Hierbei handelt es sich wahlweise um die Vena saphena magna, die Arteria thoracica interna sinistra sowie seltener die Arteria radialis (Ethikantrag 299/14 Universitätsklinikum Frankfurt).

Nach der Entnahme im Operationssaal wurden die Gefäße entweder in einer 0,9% Natrium-Chlorid- oder einer PBS-Lösung bis zum Transport aufbewahrt.

Während der Ischämiezeit des Transports werden die Gefäße jeweils durch Kühlakkumulatoren und Isolationsbehälter einer Hypothermie ausgesetzt und zum Forschungslabor der Klinik für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Frankfurt transportiert.

Im Labor des Universitätsklinikums werden die eintreffenden Gefäße per Hand sowohl proximal als auch distal mittels Einzelknopfnähten (Prolene 4-0) an Konnektoren des Schlauchsystems befestigt. Des weiteren werden mögliche Gefäßabgänge verschlossen und die Gefäße auf Unversehrtheit und Durchgängigkeit überprüft und mittels PBS-Lösung durchgespült. Falls Venen verwendet werden, werden diese bei Beinhaltung von Venenklappen so eingebaut und vernäht, dass ein physiologischer anterograder Blutfluss gewährleistet werden kann.

2.4. Versuchsdurchführung

Tabelle 2: Zusätzliche Materialien für die Versuchsdurchführung

Equipment	Hersteller
Bioreaktor	Sonderanfertigung der TU München und Goetheuniversität Frankfurt
Silikonschläuche	6mm ID; 1.5mm Wandstärke (Deutsch & Neumann, Berlin, Deutschland)
Konnektoren	<ul style="list-style-type: none"> • 3-Wege-Hähne Discifix C3 (B. Braun Melsungen, Deutschland) • Luerlock Combi-Stopper (B. Braun Melsungen, Deutschland) • Luerlock Adapter 6mm (Vieweg, Kranzberg, Deutschland) • Luerlock Adapter 2mm (Vieweg, Kranzberg, Deutschland) • Luerlock Rotationsadapter (Kimal, Uxbridge,

	Großbritannien)
Sirolimus	Cayman Chemical (Ann Arbor, USA)
Everolimus	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
EDTA-Blut Röhrchen	S-Monovette 4.9ml K3E (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)

2.4.1. Reperfusion

Durch Angabe des Entnahmezeitpunktes der Gefäße aus dem Spenderorganismus kann ein standardisierter Ischämiezeitraum von 4h bis maximal 5h bis zum Reperfusionzeitpunkt bei den Versuchen eingehalten werden. Nach Ablauf des Ischämiezeitraums wird das heparinisierte, erwärmte und präoxygenierte Blut dem Reservoir zugeführt. Sofern Gefäße mit dem Zusatz von Sirolimus bzw. Everolimus reperfundiert werden sollten, wurden die Medikamente nun dem Reservoir beigelegt.

Bei Zusatz von Sirolimus wird ein Wirkspiegel im Versuchsblut von 10 ng/ml generiert. Dieser Wirkspiegel wird anhand der Literatur und Versuchen von Sirolimus in der immunsuppressiven Therapie nach Transplantationen sowie durch die Herstellerempfehlung gewählt.^{84,148}

Bei einer medikamentösen Herstellerdosierung von 0,25 mg/ml werden 6 µl Sirolimus durch Eppendorf-Pipetten der Blutprobe zugeführt.

Die Menge an Sirolimus berechnete sich wie folgt:

- (1) Soll-Dosis / Ist-Dosis * Blutvolumen = Benötigte Sirolimus-Menge
- (2) $(10 \text{ ng/ml} / 2,5 \cdot 10^5 \text{ ng/ml}) \cdot 150 \text{ ml} = 0,006 \text{ ml} = 6 \text{ µl Sirolimus}$

Bei Einsatz von Everolimus wird ein Wirkspiegel von 5 ng/ml im Versuchsblut eingestellt. Auch hier wird die Dosis anhand einschlägiger Literatur in Bezug auf immunsuppressive Therapie nach Organtransplantationen und Vaskulopathien ausgewählt.^{114,149,150}

Bei einer medikamentösen Herstellerdosis von 0,5 mg/ml wurden 1,5 µl Everolimus durch Eppendorf-Pipetten der Blutprobe zugeführt.

Die Menge an Everolimus berechnete sich wie folgt:

- (1) Soll-Dosis / Ist-Dosis * Blutvolumen = Benötigte Everolimus-Menge
- (2) $(5 \text{ ng/ml} / 5 \cdot 10^5 \text{ ng/ml}) * 150 \text{ ml} = 0,0015 \text{ ml} = 1,5 \text{ µl Everolimus}$

Um ein System des physiologischen Koronarflusses zu simulieren, werden die Einstellungen an der Rollerpumpe durch eine elektrische Vorrichtung am Bioreaktor so gewählt, dass der Fluss ähnlich dem des Koronarflusses von 70-80ml/min/100g entspricht.²

Die Reperfusionzeit beträgt standardisiert 120 Minuten. Das Gefäßmodell steht während der Reperfusionzeit unter ständiger Beobachtung und es werden zu definierten Zeitpunkten stets Kontrolluntersuchungen im Blut vorgenommen (siehe Kapitel 2.4.2.).

2.4.2. Entnahme von Blutproben

Nach standardisierten Zeitpunkten der Reperfusion werden dem Gefäßmodell jeweils zwei Blutproben entnommen.

Einerseits dient eine Blutprobe in EDTA-Blutröhrchen der späteren Analyse des Blutserums, die andere Blutprobe wird mittels BGA auf den aktuellen pO₂, PCO₂ und pH-Wert hin untersucht. Um dem Bioreaktor und Blutkreislauf nicht zu viel Blut zu entziehen, wurde auf eine BGA zum Zeitpunkt t-1 und/oder t-2 teilweise verzichtet.

Entnahme Zeitpunkte nach Reperfusionsbeginn waren:

- 1) 0. Min (t-0)
- 2) 15. Min (t-1)
- 3) 30. Min (t-2)
- 4) 60. Min (t-3)
- 5) 120. Min (t-4)

2.5. Post-Reperfusion

2.5.1. Blutsera

Die an fünf Zeitpunkten abgenommenen Blutproben werden nach Reperfusionseende in EDTA-Blut Röhrchen bei 3000U für 10 Minuten zentrifugiert. Der zentrifugierte Überstand (Blutserum) wird mittels Einmalpipetten in vier verschiedene Eppendorf-Gefäße abpipettiert und bis zur Analyse bei -80 Grad Celsius eingefroren.

2.5.1.1. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Tabelle 3: Material und Geräte für den ELISA von IL-6, TNF- α und VEGF

Equipment	Hersteller
ELISA Interleukin-6	QuantiGlo® ELISA (R&D Systems Bio-Techne, Minneapolis, USA)
ELISA TNF- α	QuantiGlo® ELISA (R&D Systems Bio-Techne, Minneapolis, USA)
ELISA VEGF	QuantiGlo® ELISA (R&D Systems Bio-Techne, Minneapolis, USA)
Mikrotiterplattenshaker	Thermostar (Deelux, Gödensdorf, Deutschland)
ELISA-Reader	Infinite M200 (Tecan, Männedorf, Schweiz)

Das gewonnene Blutserum wird mittels ELISA auf die Konzentrationen von Interleukin-6, TNF- α und VEGF zu den jeweiligen Entnahmezeitpunkten analysiert und im Hinblick auf Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe sowie der Sirolimus- bzw. Everolimusgruppe (vgl. Kapitel 3) untersucht.

Ein ELISA stellt eine Möglichkeit dar über Antikörper-Antigen-Bindung sowie mittels Farbdetektion einen Stoffnachweis bzw. eine Konzentrationsmessung zu erbringen.¹⁵¹

Die jeweiligen ELISA werden in der so genannten Sandwich-ELISA-Technik ausgeführt. Dieses Prinzip funktioniert folgendermaßen: Zunächst werden jeweils monoklonale Antikörper für IL-6, TNF- α und VEGF auf Mikrotiterplatten ausplattiert (die Platten werden „vorgecoatet“). Im nachfolgenden Schritt werden in die Probenwells der Mikrotiterplatten Standardvergleichslösungen sowie die Blutserumproben aus den Versuchsreihen der Kontrollgruppe, Sirolimus- und Everolimusgruppe hinzugegeben. Falls die Proben eines der gesuchten Moleküle enthält, binden diese nun an die auf der Mikrotiterplatte gebundenen monoklonalen Antikörper über dessen Antigenbindungsstellen des Antikörper-Leichtkettenfragments.¹⁵² Nach mehreren Waschschrinen folgt eine Inkubation der Wells mit einem polyklonalen Antikörper gegen je nach ELISA und Untersuchung für IL-6, TNF- α oder VEGF. Nach erneutem Waschen der Wells wird ein Luminol/Peroxidase-Substrat zugefügt. Je nach Menge des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexes kommt es zu unterschiedlich starken Farbumschlägen der Substratlösung (z.B. durch Fluoreszenzfärbung oder wie hier durch Chemolumineszenz).^{153,154} Durch den Vergleich des Farbumschlags der Standardlösung mit dem der Probenwells ist die Quantifizierung von Interleukin-6, TNF- α oder VEGF abhängig von der Intensität der optischen Extinktion möglich. Zum Ausschluss von Fehlermessungen werden jeweils Doppelbestimmung der einzelnen ELISA-Werte durchgeführt.

2.5.1.1.1. Interleukin-6

Interleukin-6 (ehemals B-Zell-stimulierender Faktor) ist ein 22-28kDa schweres, aus 183 Aminosäuren bestehendes Zytokin, welches unter anderem eine Schlüsselposition in der proinflammatorischen Signalkaskade einnimmt. Insbesondere in dem Hypoxie-bedingten Inflammationsprozess des IRI von Gefäßen spielt IL-6 eine herausragende Rolle.^{14,155–157}

IL-6 wird unter anderen von Zellen der Immunabwehr wie T- Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie Endothelzellen gebildet und fördert über dies hinaus die Immunglobulinexpression von B-Lymphozyten.^{155,158,159}

Interessant ist die Quantifizierung der Interleukin-6 Konzentrationen in den verschiedenen Versuchsgruppen, da Interleukin-6 auch durch Expression des

Transkriptionsfaktors NF- κ B vermehrt gebildet wird.¹⁵ Wie in Kapitel 1.3 und 1.4. beschrieben, wird die Expression von NF- κ B durch mTOR-Inhibitoren wie Sirolimus als auch Everolimus gemindert.¹⁰⁰

Der ELISA für IL-6 wurde anhand des QuantiGlo® ELISA in folgenden Schritten durchgeführt:

- (1) Zusammentragung der benötigten Reagenzien, Standardlösungen, Blutserumproben
- (2) Zugabe von 100 μ l Assay Diluent RD1-83 zu jedem Well der Mikrotiterplatte
- (3) Zugabe entweder von 100 μ l der Standardlösung, Kontrollprobe oder der Blutserumprobe mit nachfolgender Abklebung der Wells
- (4) 2h Inkubationszeit auf einem Mikrotiterplattenshaker bei Raumtemperatur mit 500 \pm 50 rpm
- (5) Vierfacher Waschgang der Wells mit je 400 μ l ELISA-Kit-Waschpuffer und anschließender Trocknung
- (6) Zugabe von 200 μ l Human-IL-6-Konjugat zu jedem Well mit nachfolgender Abklebung
- (7) 3h Inkubationszeit auf einem Mikrotiterplattenshaker bei Raumtemperatur mit 500 \pm 50 rpm
- (8) Vierfacher Waschgang der Wells mit je 400 μ l ELISA-Kit-Waschpuffer und anschließender Trocknung
- (9) Zugabe von 100 μ l Glo-Reagenz zu jedem Well
- (10) 5-20 min Inkubationszeit auf einer lichtgeschützten Unterlage
- (11) Bestimmung der relativen Lichteinheiten (RLU) mit 1,0 Minuten Latenzzeit und 0,5 Sekunden/Well mittels ELISA-Reader

2.5.1.1.2. TNF- α

TNF- α ist ein aus 26kDa schweres Zytokin, dass sowohl transmembran (233 Aminosäuren lang) gebunden, als auch löslich (153 Aminosäuren lang) vorkommen kann.¹⁶⁰

Ähnlich wie IL-6 spielt TNF- α unter anderem eine große Rolle in der Pathogenese der Inflammation, Proliferation als auch der Apoptose. TNF- α wird unter anderen von Monozyten (oder ausdifferenzierten) Makrophagen, natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), B- und T-Lymphozyten sowie Endothelzellen gebildet.^{161,162} TNF- α wirkt sowohl direkt auf vaskuläre Endothelzellen als auch auf Kardiomyozyten und sorgt hierbei für eine erhöhte Leukozytenadhäsion.¹⁶³ Außerdem aktiviert TNF- α sowohl selber, als auch über die Hochregulation des Transkriptionsfaktors NF- κ B aktivierend auf den Pathway von NF- κ B.⁵⁷ Durch TNF- α werden zusätzlich neutrophile Granulozyten aktiviert bzw. das inflammatorische Gewebe durch diese infiltriert, welche entscheidend und zentral zum in diesen Versuch zu erforschenden IRI beitragen (z.B. über ROS).¹⁶⁴⁻¹⁶⁷ Auch kann eine therapeutische Inhibition von TNF- α nach Herzoperationen die Rate der Niereninsuffizienzen möglicherweise begrenzen.¹⁶⁸ Anhand dieses Wirkungsspektrums ergeben sich somit die Überlegungen der Quantifizierung von TNF- α durch mTOR-Inhibitoren im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Der ELISA für TNF- α wurde anhand des des QuantiGlo® ELISA in folgenden Schritten durchgeführt:

- (1) Zusammentragung der benötigten Reagenzien, Standardlösungen, Blutserumproben
- (2) Zugabe von 100 μ l Assay Diluent RD1-27 zu jedem Well der Mikrotiterplatte
- (3) Zugabe entweder von 100 μ l der Standardlösung, Kontrollprobe oder der Blutserumprobe mit nachfolgender Abklebung der Wells
- (4) 3h Inkubationszeit auf einem Mikrotiterplattenshaker bei Raumtemperatur mit 500 \pm 50 rpm
- (5) Vierfacher Waschgang der Wells mit je 400 μ l ELISA-Kit-Waschpuffer und anschließender Trocknung
- (6) Zugabe von 200 μ l Human-TNF- α -Konjugat zu jedem Well mit nachfolgender Abklebung
- (7) 2h Inkubationszeit auf einem Mikrotiterplattenshaker bei Raumtemperatur mit 500 \pm 50 rpm
- (8) Vierfacher Waschgang der Wells mit je 400 μ l ELISA-Kit-Waschpuffer und anschließender Trocknung

- (9) Zugabe von 100 µl Glo-Reagenz zu jedem Well
- (10) 5-20 min Inkubationszeit auf einer lichtgeschützten Unterlage
- (11) Bestimmung der relativen Lichteinheiten (RLU) mit 1,0 Minuten Latenzzeit und 0,5 Sekunden/Well mittels ELISA-Reader

2.5.1.1.3. VEGF

Die VEGF-Moleküle gehört zu einer Proteinfamilie im menschlichen Körper, welcher verschiedene Unterformen angehören. Der in diesem Fall wichtige Vertreter ist VEGF-A. VEGF-A kommt in verschiedenen Isoformen mit unterschiedlichen Aminosäurelängen im Körper vor. Das spezifische Gewicht beträgt je nach Isoform zwischen 34-42kDa.¹⁶⁹ VEGF-A spielt eine wichtige Rolle in der physiologischen Angiogenese sowie Vaskulogenese.^{170,171}

Die Expression von VEGF-A wird vor allem durch Hypoxie induziert.¹⁷² Auch spielen Zytokine wie IL-1, IL-6, IL8 und TNF- α hierbei eine große Rolle, über deren Signaltransduktion beim IRI bzw. der Inflammation VEGF hochreguliert wird.^{163,173-176} Neben vor allem vaskulären Endothelzellen wird VEGF auch durch neutrophile Granulozyten als auch Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen der Gefäße und Makrophagen sezerniert.¹⁷⁷⁻¹⁸¹

Der ELISA für VEGF wurde anhand des des QuantiGlo® ELISA in folgenden Schritten durchgeführt:

- (1) Zusammentragung der benötigten Reagenzien, Standardlösungen, Blutserumproben
- (2) Zugabe von 150 µl Assay Diluent RD1-8 zu jedem Well der Mikrotiterplatte
- (3) Zugabe entweder von 50 µl der Standardlösung, Kontrollprobe oder der Blutserumprobe mit nachfolgender Abklebung der Wells
- (4) 2h Inkubationszeit auf einem Mikrotiterplattenshaker bei Raumtemperatur mit 500 ± 50 rpm
- (5) Vierfacher Waschgang der Wells mit je 400 µl ELISA-Kit-Waschpuffer und anschließender Trocknung
- (6) Zugabe von 200 µl Human-VEGF-Konjugat zu jedem Well mit nachfolgender

Abklebung

- (7) 3h Inkubationszeit auf einem Mikrotiterplattenshaker bei Raumtemperatur mit 500 ± 50 rpm
- (8) Vierfacher Waschgang der Wells mit je 400 μ l ELISA-Kit-Waschpuffer und anschließender Trocknung
- (9) Zugabe von 100 μ l Glo-Reagenz zu jedem Well
- (10) 5-20 min Inkubationszeit auf einer lichtgeschützten Unterlage
- (11) Bestimmung der relativen Lichteinheiten (RLU) mit 1,0 Minuten Latenzzeit und 0,5 Sekunden/Well mittels ELISA-Reader

Zur Analyse der gewonnenen ELISA-Daten von IL-6, TNF- α und VEGF werden die jeweiligen Mittelwerte der Untersuchungszeitpunkte jeweils der Kontroll-, Sirolimus- und Everolimus-Versuchsgruppe mittels einer One-Way Analysis of Variance (ANOVA) auf Signifikanzunterschiede zum Niveau 5% hin untersucht. Zum Vergleich der Mittelwerte unterhalb der drei Versuchsgruppen an den Untersuchungszeitpunkten wird das Signifikanzniveau von 5% mittels einer Two-Way-ANOVA untersucht.

2.5.2. Immunhistologiepräparate

Tabelle 3: Material und Geräte zur Anfertigung von Immunhistochemiefärbungen CD11b und CD31

Equipment	Hersteller
Einbettautomat	Excelsior ES (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Gießstation	HistoStar (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
Mikrotom	Leica RM2235 (Leica, Wetzlar, Deutschland)
Glasobjektträger	Superfrost (Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland)
Färbeautomat	Mirastainer II (VWR, Pennsylvania, USA)

Mikroskop	MTX-3000 (Müller, Erfurt, Deutschland)
Xylol	Sigma- Aldrich, St. Louis, USA
PBS-Lösung	Life technology, Carlsbad, USA
Target Retrieval Solution Citrate ph6	Dako #S2369 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
Goat Serum	Dako #X0907 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
Isotypkontrolle IgG (Kaninchen)	#sc-2027, 400 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)
Antikörper Diluent	Dako #S3022 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
Hydrogen Peroxidase Block	#TA-125-H202Q (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)
DAB Konzentrat	#CD135C006 (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland)
DAB Substrat Puffer	#PC136R100 (DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland)
Entalan/Histofluid	#6900002 (Marienfeld, Lauda Königshofen, Deutschland)
Meyers Hämatoxylin	#A4840,1000 (Applichem, Darmstadt, Deutschland)
Scottpuffer	Aqua dest. + 0,2% NaHCO ₃ + 2% MgSO ₄

Tabelle 4: Liste benutzter Primärantikörper

Name	mAb	Hersteller
CD11b	Monoklonarer Antikörper IgG (Kaninchen)	#ab133357, 1,143 mg/ml, 1:4000 (Abcam, Cambridge, Großbritannien)
CD 31	Monoklonarer Antikörper IgG (Kaninchen)	#ab76533, 0,278 mg/ml 1:500 (Abcam, Cambridge, Großbritannien)

Tabelle 5: Liste benutzter Sekundärantikörper

Name	mAb	Hersteller
CD11b	Anti-HRP (Kaninchen)	Histofine® #414141F (Nichirei, Tokio, Japan)
CD 31	Anti-HRP (Kaninchen)	Histofine® #414141F (Nichirei, Tokio, Japan)

Für eine Immunhistochemieanalyse der Gefäße werden jeweils 1-2 cm lange Gefäßabschnitte in Histologie-Kassetten bei Raumtemperatur 24h in Formalin (1:5 Verdünnung) gelagert. Nach Ablauf der 24h werden die Gefäßkassetten vom Formalin mittels Leitungswasser abgewaschen und danach in 70%iger Ethanollösungen bei 4 Grad Celsius aufbewahrt. Im weiteren Verlauf werden die Gefäßstücke mittels eines Einbettautomaten, einer paraffinierenden Gießstation und eines Mikrotom auf Glasobjektträgern für die weitere Immunhistochemiefärbungen aufgezogen.

Zur Detektion und Quantifizierung von CD11b und CD31 wurden jeweils immunhistochemische Antikörperfärbungen des Humangewebes auf den Objektträgern in folgender Schrittfolge vorgenommen:

(1) Entparaffinierung:

- Objektträger 5 min in Xylolbad, danach mit Xylol spülen und wieder 5 min in Xylolbad
- Mit 100%iger Alkohollösung spülen und 5 min in 100%iges Alkoholbad

- Mit 96%iger Alkohollösung spülen und 5 min in 96%iges Alkoholbad
- 5 min in 70%iges Alkoholbad
- 5 min in vollentsalzenes (VE) Wasser

(2) Proteindemaskierung:

- Citratpuffer mit Aqua dest. 1:10 verdünnen
- Verdünnter Puffer in Kunststoffküvette erhitzen
- Objektträger in Küvette plazieren und in vorgewärmten Topf 10 min kochen
- Bei geöffneten Küvettendeckel bei Raumtemperatur abkühlen lassen
- Objektträger 3 min in fließenden Leitungswasser und 5 min in PBS Puffer spülen lassen

(3) Blockierung:

- 5%iges Goat-Serum in PBS-Lösung geben
- 1h bei Raumtemperatur Inkubation
- 3 x 1 min mit PBS-Lösung waschen

(4) Peroxidaseblock:

- Schnitte auf Objektträgern mit Peroxidase benetzen
- 10 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer mit geschlossenen Deckel inkubieren
- 3 x 1 min in VE-Wasser spülen
- 3 x 1 min in PBS-Lösung spülen

(5a) Primärantikörper CD11b

- Primärantikörper 1:4000 mit Antikörper-Diluent verdünnen
- Isotypantikörper 1:1400 mit Antikörper-Diluent verdünnen
- Schnitte mit Antikörpern benetzen (Isotypantikörper = Kontrollfärbung)
- Über Nacht bei 4 Grad Celsius in feuchter Kammer mit geschlossenen Deckel Inkubation
- Am Folgetag 3 x 1 min in PBS Lösung spülen

(5b) Primärantikörper CD31

- Primärantikörper 1:500 mit Antikörper-Diluent verdünnen
- Isotypantikörper 1:700 mit Antikörper-Diluent verdünnen
- Schnitte mit Antikörpern benetzen (Isotypantikörper = Kontrollfärbung)
- Über Nacht bei 4 Grad Celsius in feuchter Kammer mit geschlossenen Deckel Inkubation
- Am Folgetag 3 x 1 min in PBS Lösung spülen

(6) Sekundärantikörper

- Schnitte mit Antikörpern benetzen
- 40 min bei Raumtemperatur in feuchter Kammer mit geschlossenen Deckel inkubieren
- 3 x 1 min in PBS Lösung spülen

(7) Detektion mit DAB-Substrat:

- Verdünnung der Substratkonzentration: 1 Tropfen DAB-Substrat-Konzentration + 1ml Substratpuffer
- Bei Raumtemperatur in feuchter Kammer mit geschlossenen Deckel inkubieren (mit mikroskopischer Kontrolle)
- Wenn gewünschte Farbtintensität erreicht ist, sofort mit Aqua dest. (Spritzflasche) vorsichtig spülen
- 5 min in VE-Wasser spülen

(8) Kernfärbung:

- Schnitte 10 min in Meyers Hämatoxylinbad stellen
- Schnitte mit VE-Wasser spülen
- 3x 3 min in Scott-Puffer spülen
- Schnitte mit VE-Wasser spülen

(9) Entwässern:

- 1 min in 70%iges Alkoholbad
- 2x 1min 96%iges Alkoholbad

- 2x 1min 100%iges Alkoholbad
- 2 x 1min in Xylolbad

(10) Eindecken:

- Eindecken der Schnitte mit Etalan
- Überschüssiges Etalan durch Xylolspülung entfernen
- Über Nacht unter Abzug ausdampfen lassen

Nach Fertigstellung der Immunhistochemiepräparate werden diese mittels mikroskopischer Auswertung auf den jeweiligen entsprechenden Marker hin untersucht. Hierbei wurden jeweils pro Gefäß drei Schnitte von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet. Bei der Analyse von CD11b wurden pro Gefäßschnitt fünf zufällig ausgewählte Einstellungen des Mikroskops ausgewertet. Im Fall der CD31-Analyse wurde jeweils der gesamte Gefäßanschnitt auf CD31-positive-Zellen hin untersucht.

2.5.2.1. CD11b

CD11b ist ein 127kDa Oberflächenprotein, was auch unter dem Namen Integrin α_m bekannt ist. Es gehört zusammen mit CD18 (Integrin β_2) als Untereinheit zum heterodimeren Integrinkomplex $\alpha_m\beta_2$. CD11b wird an den Zelloberflächen von Monozyten, neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und sorgt im menschlichen Organismus unter anderem für eine Leukozytenaktivierung und Leukozytentransmigration (über Chemotaxis) und Phagozytose. Dies kann allerdings nur in gleichzeitiger Anwesenheit von CD18 geschehen.^{24,182,183} Auch konnte gezeigt werden, dass der CD11b/CD18-Komplex durch Zytokine wie Interleukin-1 seine eigene Bindungsaktivität auf neutrophilen Granulozyten erhöht und somit proinflammatorische Signalmoleküle dazu beitragen, die inflammatorische Transmigration durch Gefäße zu fördern.^{182,184} Es konnte über dem gezeigt werden, dass der CD11b/CD18-Integrinkomplex beim IRI deutlich hochexprimiert wird.¹⁸⁵

2.5.2.2. CD31

CD31, das auch unter dem Namen PECAM-1 oder Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül bekannt ist, ist ein 120-130kDa Membranprotein.^{186,187} CD31 wird unter anderem von vaskulären Endothelzellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und auch Thrombozyten exprimiert. Auch tragen proinflammatorische Zytokine wie TNF- α dazu bei, dass CD31 hochexprimiert wird.¹⁸⁸ Es spielt nach Bindung an seine Liganden wie z.B. Integrin $\alpha_v\beta_3$ eine herausragende Rolle bei der Aktivierung von Lymphozyten sowie der Leukozytendiapedese von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in Inflammationsprozessen wie dem Ischämie-Reperfusionsschaden, sodass es ein interessantes Target für die Quantifizierung des Ischämie-Reperfusionsschadens darstellt.^{189,190,191} Auch konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des CD31 mit Antikörpern den Ischämie-Reperfusionsschaden eindämmt.¹⁹²

Die aus den Immunhistologiepräparaten gewonnenen Daten werden hinsichtlich ihres Signifikanzniveaus von $\alpha=0,05$ mittels One-Way-ANOVA hin untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Blutgasanalyse

3.1.1. Sauerstoffsättigung im Reperfusionenblut

Die Blutgasanalyse dient dem Zweck der Quantifizierung aktueller Blutparameter vor dem Versuch, während des Versuchs bzw. zum Zeitpunkt nach Reperfusionenende. Vor allem während des Versuchs wurde darauf geachtet, dass die Sauerstoffsättigung immer im physiologischen Bereich liegt. Wie in Abb. 12 erkennbar, liegt die Sauerstoffsättigung bei allen drei Versuchsgruppen unabhängig voneinander (Kontrollgruppe, Sirolimus-Gruppe, Everolimus-Gruppe) jeweils ab dem Zeitpunkt t-2 bzw. t-3 und nach der Versuchsdurchführung jeweils oberhalb von 95% sO₂. Bei der Kontrollgruppe ergibt sich am Zeitpunkt t-0 ein Mittelwert von 99,25% sO₂ ± 0,75% (n=4). In der Folge bleiben die Werte auf konstant hohem Niveau des physiologischen Bereichs. Am Messzeitpunkt t-2 ergibt sich eine Sättigung von 100% sO₂ (n=2) sowie am Zeitpunkt t-3 bei 99,50% sO₂ ± 0,50% (n=2). Zum Zeitpunkt des Reperfusionenende t-4 liegt die Sättigung bei 99,67% sO₂ ± 0,33% (n=3).

In der Sirolimus-Versuchsgruppe kann zum Reperfusionenstart t-0 folgender Mittelwert der Sauerstoffsättigung erhoben werden: 89,20% sO₂ ± 6,62% (n=5). Über einen Durchschnittswert von 99,75% sO₂ ± 0,25% (n=4) am Zeitpunkt t-3 wird ein Reperfusionenendmittelwert von 100% sO₂ ± 0% (n=4; t-4) ausgewertet.

Ähnlich verhält es sich in der Everolimus-Versuchsgruppe: Es ergibt sich ein Anfangsdurchschnittswert am Zeitpunkt t-0 von 97,50% sO₂ ± 2,18% (n=4). An den Zeitpunkten t-2, t-3 und t-4 werden durchgängig Maximalwerte von 100% sO₂ gemessen (je n=4).

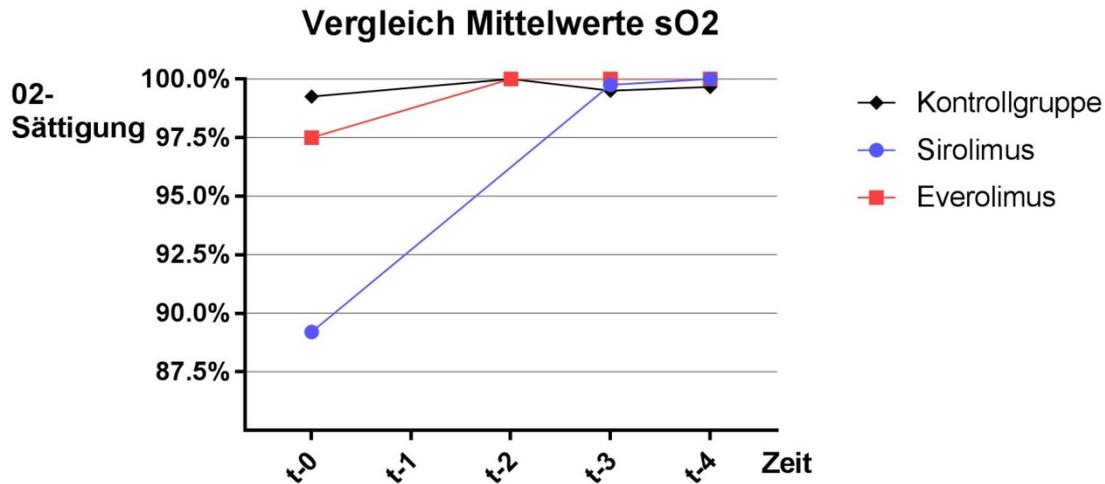


Abb. 14 Vergleich der Mittelwerte der Sauerstoffkonzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuchsgruppen im reperfundierendem Blut. Die gemessenen Mittelwerte der Sauerstoffsättigungen in Prozent werden grafisch den jeweiligen Zeitpunkten der Bestimmung zugeordnet. Hierbei entspricht t-0 dem Start der Reperfusion (0min), t-1 = 15 min, t-2 = 30 min, t-3 = 60 min, t-4 =120 min nach Reperfusionbeginn. Um dem simulierten Blutkreislauf nicht zu viel Blut für BGA-Messungen zu entziehen, werden Messungen am Zeitpunkt t-1 sowie teilweise am Zeitpunkt t-2 unterlassen. BGA-Messungen an den Zeitpunkten nach 60 min (t-3) und nach Reperfusionsende (120 min, t-4) werden obligat durchgeführt. Zu erkennen ist ein nach Reperfusionbeginn ansteigen alle Mittelwerte der Sauerstoffsättigung. Ab den Messzeitpunkten t-2 bzw. t-3 ist in allen drei Versuchsgruppen eine Sättigung über 95% sO₂ zu erkennen und der Sauerstoffparameter der Kontroll- bzw. Versuchsgruppen befindet sich somit in einem konstant physiologischen Sättigungsbereich nahe oder genau der 100% sO₂.

3.1.2. Kohlendioxidpartialdruck

Zum Zeitpunkt der Bestimmung der Sauerstoffsättigung werden ebenfalls die Werte des Kohlendioxidpartialdrucks (pCO₂) im Reperfusionenblut gemessen und ausgewertet. In der Kontrollgruppe wird am Zeitpunkt t-0 Durchschnittswerte von 20,00 mmHg pCO₂ ± 6,00 (n=2) erhoben. Am Zeitpunkt t-2 zeigt sich ein Wert von 15,50 mmHg pCO₂ ± 4,50 (n=2) sowie an t-4 ein Messwert von 12,00 mmHg pCO₂ ± 3,00 (n=2).

In der experimentellen Sirolimus-Gruppe war ein durchschnittlicher Anfangswert von 39,75 mmHg pCO₂ ± 10,08 (n=4) zu verzeichnen. Im Verlauf sinkt der Wert von 7,00 mmHg pCO₂ ± 1,00 (n=3) am Zeitpunkt t-3 auf 4,50 mmHg pCO₂ ± 1,50 (n=2) am Messzeitpunkt t-4.

In der Everolimus-Gruppe wird ein Anfangswert t-0 von 25,25 mmHg pCO₂ ± 3,09 (n=4) erhoben. Am Zeitpunkt t-2 liegt ein Wert von 13,75 mmHg pCO₂ ± 1,44 (n=4)

vor. Über den Wert 13,00 mmHg $pCO_2 \pm 2,12$ (n=4) an t-3 wird ein Endwert am Zeitpunkt t-4 von 11,00 mmHg $pCO_2 \pm 3,06$ (n=3) gemessen (vgl. Abb. 13).

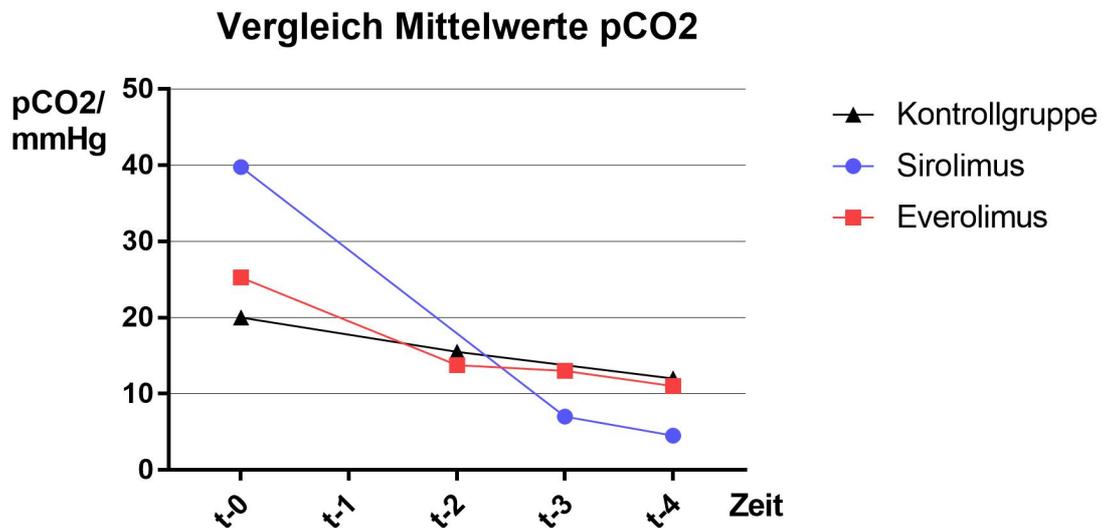


Abb. 15 Vergleich der Mittelwerte des Kohlendioxidpartialdrucks zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuchsgruppen im reperfundierenden Blut. Die gemessenen Mittelwerte des pCO_2 in mmHg werden grafisch den jeweiligen Zeitpunkten der Bestimmung zugeordnet. Hierbei entspricht t-0 dem Start der Reperfusion (0min), t-1 = 15 min, t-2 = 30 min, t-3 = 60 min, t-4 = 120 min nach Reperfusionbeginn. Um dem simulierten Blutkreislauf nicht zu viel Blut für BGA-Messungen zu entziehen, werden Messungen am Zeitpunkt t-1 sowie teilweise am Zeitpunkt t-2/t-3 unterlassen. BGA-Messungen zum Zeitpunkt nach Reperfusionsende (120 min, t-4) werden allerdings obligat durchgeführt. In der Grafik sind in allen drei Versuchsgruppen fallende Graphen des Kohlendioxidpartialdrucks zu beobachten. Die Ausgangswerte des Kohlenstoffpartialdrucks liegen nur bei der Sirolimus-Versuchsgruppe im physiologischen Bereich (vgl. Kapitel 4).

3.1.3. pH-Messung

Analog zur Messung des sO_2 und es pCO_2 werden zu den selben Zeitpunkten pH-Messungen vorgenommen, um Rückschlüsse über einen möglichen pH-Paradoxon des IRI treffen zu können (vgl. Kapitel 1.1.3.1.). In der Kontrollgruppe wird zum Zeitpunkt t-0 ein durchschnittlicher pH-Wert von $7,24 \pm 0,02$ (n=2) gemessen. Dieser Wert steigt über den Wert von $7,28 \pm 0,04$ (n=2) am Zeitpunkt t-3 auf den Endmesspunkt t-4 $7,31 \pm 0,05$ (n=2).

In der Sirolimus-Gruppe liegt am Reperfusionstart t-0 ein pH-Wert von $7,18 \pm 0,04$ (n=4) vor. Dieser Wert steigt in den Folgemessungen an. Am Zeitpunkt t-3 herrscht ein

pH-Wert von $7,32 \pm 0,07$ (n=3). Der Endwert am Reperfusionstopps t-4 beträgt $7,36 \pm 0,11$ (n=2).

In der Everolimus-Gruppe liegt der Anfangs-pH-Wert bei $7,19 \pm 0,03$ (n=4). Am Zeitpunkt t-2 wird ein Durchschnittswert von $7,29 \pm 0,07$ (n=3) errechnet. Dieser Wert steigt über $7,31 \pm 0,05$ (n=4) am Zeitpunkt t-3 auf den End-pH-Wert von $7,35 \pm 0,03$ (t=4, n=3) an (vgl. Abb. 14).

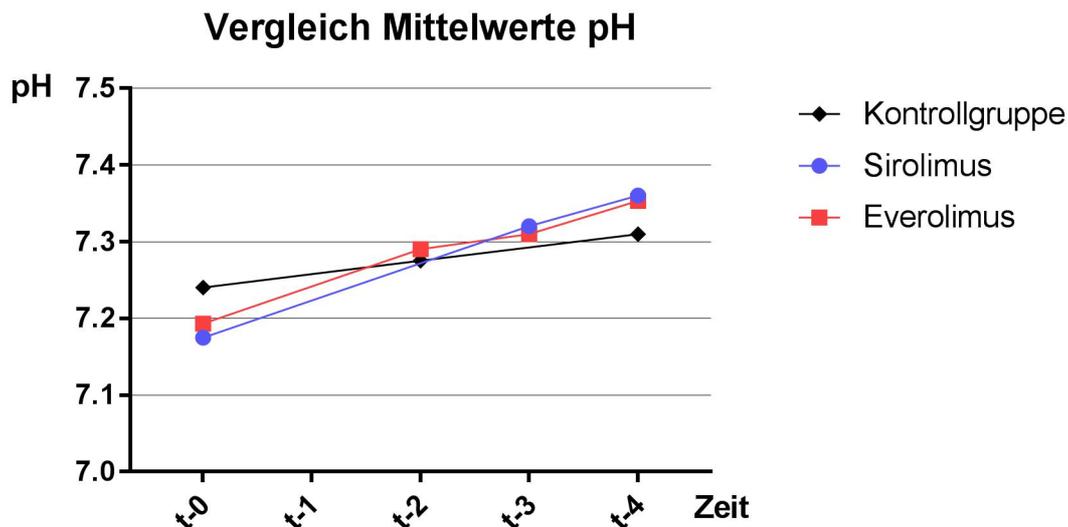


Abb. 16 Vergleich der Mittelwerte des Blut-pH-Wertes zu verschiedenen Zeitpunkten der Versuchsgruppen. Die gemessenen Mittelwerte des pH-Wertes werden grafisch den jeweiligen Zeitpunkten der Bestimmung zugeordnet. Hierbei entspricht t-0 dem Start der Reperfusion (0min), t-1 = 15 min, t-2 = 30 min, t-3 = 60 min, t-4 = 120 min nach Reperfusionbeginn. Um dem simulierten Blutkreislauf nicht zu viel Blut für BGA-Messungen zu entziehen, werden Messungen am Zeitpunkt t-1 sowie teilweise am Zeitpunkt t-2/t-3 unterlassen. BGA-Messungen zum Zeitpunkt nach Reperfusionsende (120 min, t-4) werden allerdings obligat durchgeführt. In der Grafik sind in allen drei Versuchsgruppen konstant steigende Graphen der pH-Werte bis zum Reperfusionsende zu beobachten, was mögliche Rückschlüsse über das s.g. pH-Paradoxon geben kann (vgl. Kapitel 4.3.).

3.2. ELISA-Daten

3.2.1. Interleukin-6

3.2.1.1. Kontrollgruppe

Die Werte zur Bestimmung des Interleukin-6 werden zu den in Kapitel 2.4.2. erwähnten Zeitpunkten nach 0 min (= t-0), 15 min (= t-1), 30 min (= t-2), 60 min (=t-3) und 120 min (=t-4) nach Reperfusionbeginn entnommen. Der Mittelwert der IL-6-

Konzentrationen der Kontrollgruppe liegt zum Entnahmezeitpunkt t-0 bei $0,918 \text{ pg/ml} \pm 0,079 \text{ pg/ml}$ (Standardfehler des Mittelwerts (SEM); $n=8$). In den weiteren Entnahmezeitpunkten t-1 ($0,872 \text{ pg/ml} \pm 0,065 \text{ pg/ml}$; $n=8$), t-2 ($1,003 \text{ pg/ml} \pm 0,080 \text{ pg/ml}$; $n=8$) sowie t-3 ($0,845 \text{ pg/ml} \pm 0,066 \text{ pg/ml}$; $n=8$) sind die Mittelwerte der Interleukin-6-Konzentrationen jeweils im Bereich $\leq 1 \text{ pg/ml}$ geblieben. In den folgenden 60 Minuten Reperfusion steigt der Mittelwert t-4 signifikant an und erhöht sich um mehr als die Verdopplung seines Niveaus von t-3. Der Mittelwert zum Zeitpunkt der letzten Messung t-4 beträgt damit $1,973 \text{ pg/ml} \pm 0,342 \text{ pg/ml}$.

Hinsichtlich der Signifikanzen ergeben sich zwischen den Zeitpunkten t-0, t-1, t-2 und t-3 keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten. Allerdings ist die Messung zum Reperfusionsende t-4 im Vergleich zu den vier vorherigen Zeitpunkten t-0, t-1, t-2 sowie t-3 signifikant erhöht (t-0 vs. t-4; t-1 vs. t-4; t-2 vs. t-4; t-3 vs. t-4, $p < 0,05$). Eine absolute Steigerung des Interleukin-6-Spiegels von $1,056 \text{ pg/ml}$ sowie mehr als eine Verdopplung zwischen Ausgangsmessung und Endmessung ist zu errechnen (vgl. Abb. 17).

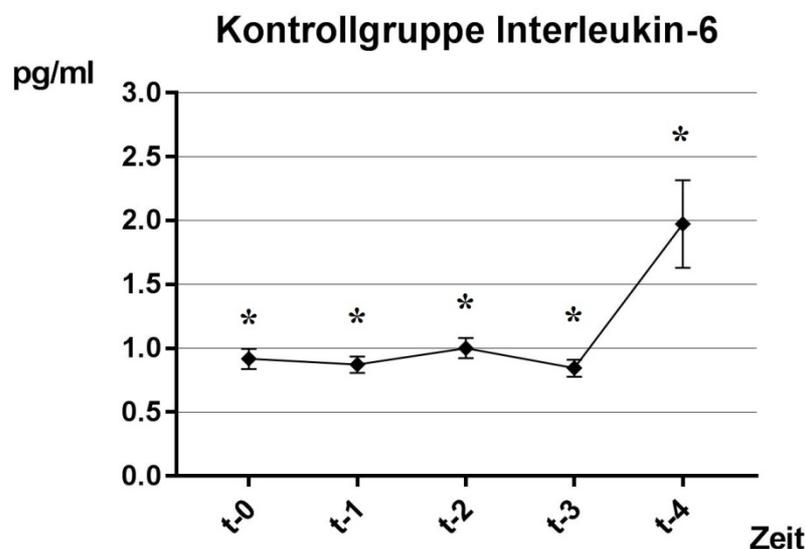


Abb. 17 IL-6-Konzentration in der Kontrollgruppe. Gemessen werden die jeweiligen Konzentrationen von IL-6 in pg/ml im Bezug zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten nach Reperfusion von humanen Blutgefäßen. t-0 entspricht Entnahmezeitpunkt nach 0 min ($n=8$) Reperfusion sowie t-1 = 15 min ($n=8$), t-2 = 30 min ($n=8$), t-3 = 60 min ($n=8$), t-4 = 120 min ($n=6$) nach Reperfusionbeginn. Die Grafik zeigt einen signifikanten Anstieg von IL-6 zum Zeitpunkt t-4 im Vergleich zu den Zeitpunkten t-0 – t-3 auf den Wert $1,973 \text{ pg/ml} \pm 0,342 \text{ pg/ml}$ (t-0 vs. t-4; t-1 vs. t-4; t-2 vs. t-4; t-3 vs. t-4, $*p < 0,05$). Im Vergleich zum Ausgangsniveau steigt der Interleukin-6-Spiegel im Blut um $1,056 \text{ pg/ml}$.

3.2.1.2. Sirolimus

Nach Zugabe von Sirolimus zu dem Reperfusionenblut werden nach an den Zeitpunkten t-0, t-1, t-2, t-3 sowie t-4 erneut die Interleukin-6-Konzentrationen aus dem Reperfusionenblut bestimmt. Die Konzentration liegt vor Reperfusionenbeginn zum Zeitpunkt t-0 bei $1,176 \text{ pg/ml} \pm 0,217 \text{ pg/ml}$ (n=10). Über einen leichten Anstieg der IL-6-Konzentration zum Zeitpunkt t-1 ($1,653 \text{ pg/ml} \pm 0,276 \text{ pg/ml}$; n=12) kommt es zu einem erneuten Absinken der Konzentration zum Zeitpunkt t-2 ($1,573 \text{ pg/ml} \pm 0,294 \text{ pg/ml}$; n=12), allerdings über dem des Ausgangsniveaus von t-0. In der weiteren Folge steigen die Interleukin-6-Werte zum Zeitpunkt t-3 auf $1,760 \text{ pg/ml} \pm 0,305 \text{ pg/ml}$ (n=12) sowie t-4 auf $2,113 \text{ pg/ml} \pm 0,457 \text{ pg/ml}$ (n=12) an.

Im Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte t-0 bis t-4 ergeben sich zwischen den einzelnen Messungen keine signifikanten Unterschiede in den Interleukin-6-Konzentrationen der Sirolimus-Versuchsgruppe (vgl. Abb. 18).

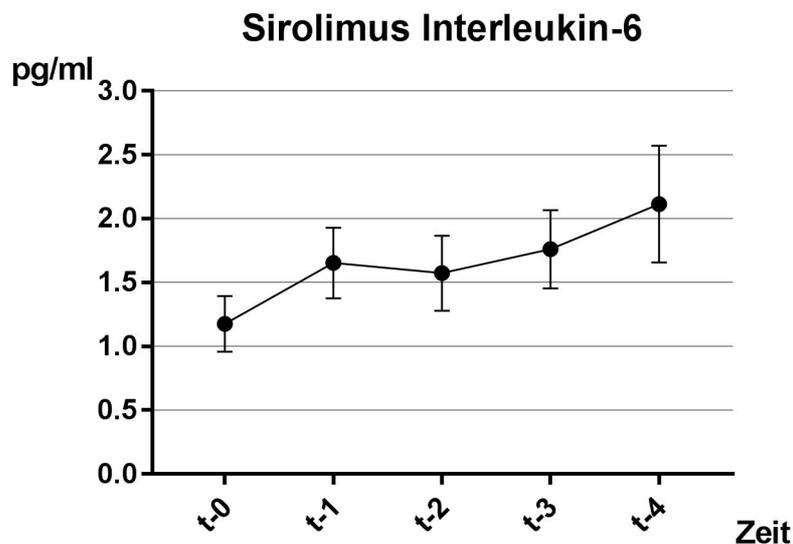


Abb. 18 IL-6-Konzentration nach Sirolimus-Zugabe zum Reperfusionenblut. Gemessen werden die jeweiligen Konzentrationen von Interleukin-6 in pg/ml im Bezug zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten nach der Reperfusion von humanen Blutgefäßen. t-0 entspricht Entnahmezeitpunkt nach 0 min (n=10) Reperfusion sowie t-1 = 15 min (n=12), t-2 = 30 min (n=12), t-3 = 60 min (n=12), t-4 = 120 min (n=12) nach Reperfusionenbeginn. Die Grafik zeigt einen nicht-signifikanten Anstieg der Interleukin-6-Konzentration bis zum Zeitpunkt t-4 mit der Ausnahme einer kurzen Absenkung zum Zeitpunkt t-2. Die Interleukin-6-Konzentration nach 120 min steigt auf den Wert $2,113 \text{ pg/ml} \pm 0,457 \text{ pg/ml}$ und ist somit im Vergleich zum Ausgangsniveau nicht-signifikant erhöht.

3.2.1.3. Everolimus

Analog zur Kontrollgruppe Sirolimus wird in der Versuchsgruppe mit der Everolimus-Zugabe im Reperfusionenblut die Interleukin-6-Konzentrationen zu den definierten Zeitpunkten t-0 – t-4 gemessen. Zum Zeitpunkt t-0 wird ein Mittelwert von 1,668 pg/ml \pm 0,315 pg/ml (n=6) gemessen. Über den Wert 1,304 pg/ml \pm 0,367 pg/ml (n=8) zum Zeitpunkt t-1 fällt die Konzentration zum Zeitpunkt t-2 auf das Minimum der Messreihe (0,630 pg/ml \pm 0,171 pg/ml (n=8)). In der Folge steigen die Werte der IL-6-Konzentration wieder an. Zum Zeitpunkt t-3 ergibt sich eine IL-6-Konzentration von 0,759 pg/ml \pm 0,220 pg/ml (n=8) sowie zum Zeitpunkt t-4 eine Konzentration von 1,041 pg/ml \pm 0,117 pg/ml (n=8). Das Ausgangsniveau der IL-6-Konzentration am Zeitpunkt t-0 wird allerdings nicht erreicht oder überschritten. Eine absolute Reduktion der Interleukin-6-Konzentration zwischen Messbeginn und Messende nach 120 min Reperusionszeit von 0,628 pg/ml ist zu beobachten.

Hinsichtlich der einzelnen Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten lässt sich keine signifikante Änderung im Bezug auf die einzelnen Zeitpunkte der Interleukin-6-Konzentration in der Everolimus-Versuchsgruppe feststellen (vgl. Abb. 19).

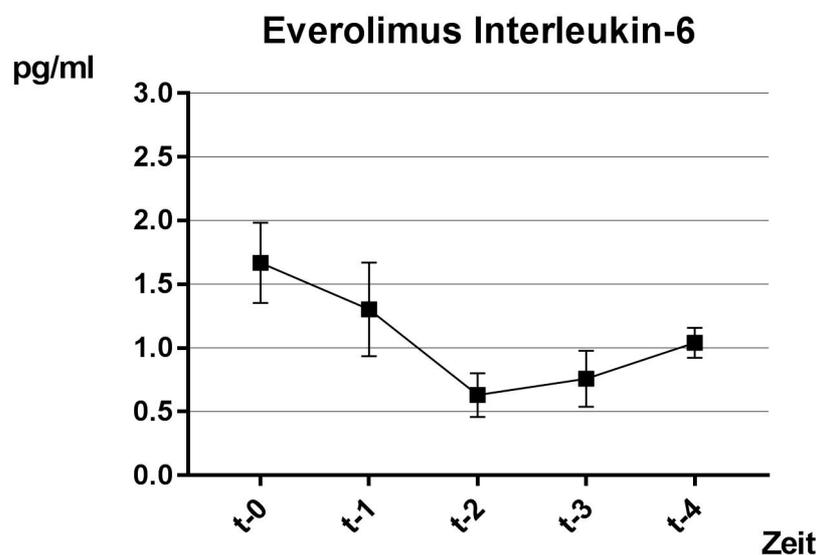


Abb. 19 IL-6-Konzentration nach Everolimus-Zugabe zum Reperfusionenblut. Gemessen werden die jeweiligen Konzentrationen von Interleukin-6 in pg/ml im Bezug zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten nach der Reperfusion von humanen Blutgefäßen. t-0 entspricht Entnahmezeitpunkt nach 0 min (n=6) Reperfusion sowie t-1 = 15 min (n=8), t-2 = 30 min (n=8), t-3 = 60 min (n=8), t-4 = 120 min (n=8) nach Reperfusionenbeginn. Die Grafik zeigt einen nicht-signifikanten Rückgang der Interleukin-6-Konzentration bis 30 min nach Reperfusionenbeginn. In der Folge steigt die Interleukin-6-Konzentration wieder bis zum Wert 1,041 pg/ml \pm 0,117 pg/ml, bleibt jedoch unterhalb des Ausgangsniveaus vor Reperfusionenbeginn (t=0). Im Vergleich zum Ausgangsniveau sank die IL-6-Konzentration um 0,628 pg/ml nach 120 min Reperusionszeit.

3.2.1.4. Vergleich der Mittelwerte von der Kontrollgruppe vs. Everolimus vs. Sirolimus

Im Vergleich der Mittelwerte von der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe Sirolimus als auch der Versuchsgruppe Everolimus zu den verschiedenen Messzeitpunkten t-0 sowie t-1, t-2, t-3 und t-4 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$; vgl. Werte Tabelle 6 und Abb. 20).

Tabelle 6: Vergleich der Mittelwerte der IL-6 Konzentration von der Kontrollgruppe (Ctr) vs. Everolimus (E) vs. Sirolimus (S).

Zeitpunkt	Vergleich der Gruppen	Mittelwert 1 [in pg/ml]	Mittelwert 2 [in pg/ml]
t-0	Ctr. vs. E	0,918	1,668
t-0	Ctr. vs. S	0,918	1,176
t-0	E vs. S	1,668	1,176
t-1	Ctr. vs. E	0,872	1,304
t-1	Ctr. vs. S	0,872	1,653
t-1	E vs. S	1,304	1,653
t-2	Ctr. vs. E	1,003	0,630
t-2	Ctr. vs. S	1,003	1,573
t-2	E vs. S	0,630	1,573
t-3	Ctr. vs. E	0,845	0,759
t-3	Ctr. vs. S	0,845	1,760
t-3	E vs. S	0,759	1,760
t-4	Ctr. vs. E	1,973	1,041
t-4	Ctr. vs. S	1,973	2,113
t-4	E vs. S	1,041	2,113

Vergleich Mittelwerte Interleukin-6

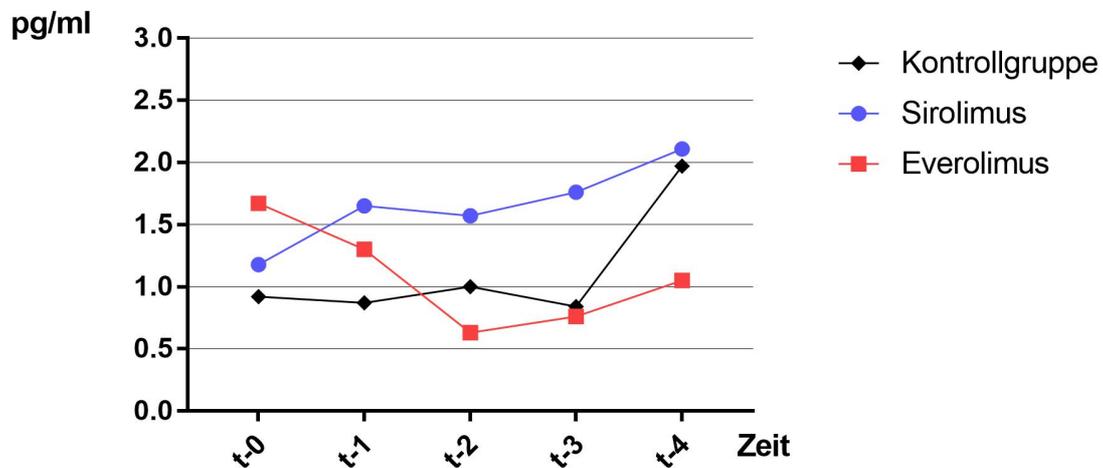


Abb. 20 Vergleich der Mittelwerte der Interleukin-6-Konzentrationen von der Kontrollgruppe sowie der Sirolimus und Everolimus-Gruppe. Der Graph der Kontrollgruppe ist in schwarzer Farbe, der Sirolimus-Graph in blauer Farbe und der Everolimus-Graph in roter Farbe dargestellt. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte nach Reperfusionbeginn und gegen die Konzentrationen von Interleukin-6 in pg/ml auf der y-Achse aufgeführt. t-0 entspricht der Reperfusionzeit von 0 min sowie t-1 = 15 min, t-2 = 30 min, t-3 = 60 min und t-4 = 120 min. Signifikanzunterschiede ergeben sich im Vergleich des Messzeitpunktes t-4 der Kontrollgruppe zu den Messzeitpunkten der Kontrollgruppe t-1 – t-3 (vgl. Kapitel 3.1.1.1.). Ausgehend von einem niedrigen Ausgangsniveau steigen die Konzentrationen von IL-6 in der Kontrollgruppe vor allem in der letzten Stunde der Reperfusion stark an. Die Sirolimus-Gruppe steigt ausgehend von einem höheren Ausgangsniveau als die Kontrollgruppe im Verlauf nur leicht an. Die Everolimus-Gruppe fällt hingegen von einem mittleren Ausgangsniveau im Verlauf deutlich unter den Endwert der IL-6-Konzentrationen der beiden anderen Gruppe ab.

3.2.2. TNF- α

3.2.2.1. Kontrollgruppe

Ähnlich der Konzentrationsbestimmungen von IL-6 wird an den selben standardisierten Zeitpunkten Blutproben für Konzentrationsmessungen von TNF- α dem Reperfusionenblut entnommen. Die Ausgangskonzentration von TNF- α betrug am Zeitpunkt t=0 3,201 pg/ml \pm 0,661 pg/ml (n=9). Nach 15 min Reperfusionzeit sind die gemessenen Werte zum Zeitpunkt t-1 mit 10,840 pg/ml \pm 4,039 pg/ml (n=8) am höchsten in der Verlaufsbeobachtung. Im weiteren Verlauf sinkt der TNF- α -Spiegel wieder, sodass bei t-2 ein Wert von 8,328 pg/ml \pm 2,715 pg/ml (n=8) und t-3 ein Wert von 4,576 pg/ml \pm 0,475 pg/ml (n=8) gemessen werden. Im Verlauf der nächsten

Reperfusionstunde sinkt die TNF- α -Konzentration bis zu t=4 geringfügig weiter ab (4,545 pg/ml \pm 0,873 pg/ml; n=6).

Der Verlauf der TNF- α -Konzentrationen in der Kontrollgruppe ergibt keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte. Der TNF- α -Spiegel liegt zum Zeitpunkt des t-4 im Vergleich zu Messbeginn t-0 um 1,344 pg/ml erhöht vor (vgl. Abb.21).

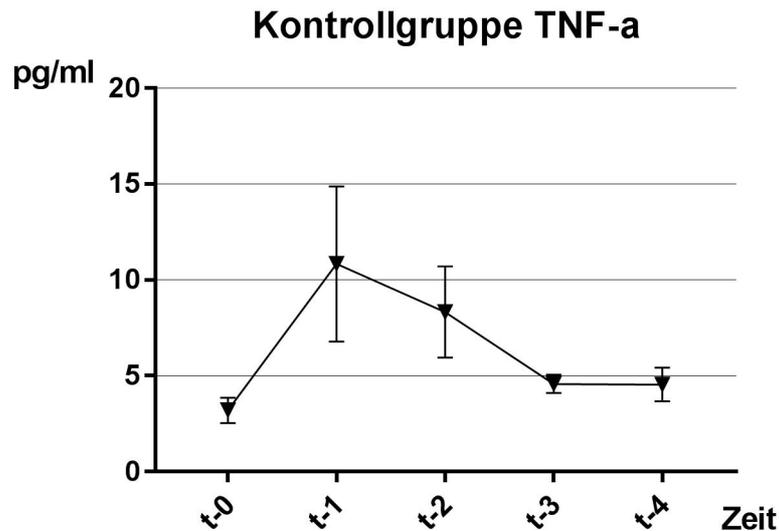


Abb. 21 TNF- α -Konzentration in der Kontrollgruppe. Gemessen werden die jeweiligen Konzentrationen von TNF- α in pg/ml im Bezug zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten nach Reperfusion von humanen Blutgefäßen. t-0 entspricht Entnahmezeitpunkt nach 0 min (n=9) Reperfusion sowie t-1 = 15 min (n=8), t-2 = 30 min (n=8), t-3 = 60 min (n=8), t-4 =120 min (n=6) nach Reperfusionbeginn. Die Grafik zeigt zunächst einen nicht-signifikanten Anstieg von TNF- α bis zum Zeitpunkt t-1 auf 10,840 pg/ml \pm 4,039 pg/ml. Im weiteren Verlauf sinkt die Konzentration wieder ab, bleibt allerdings zwischen t-3 und t-4 relativ konstant oberhalb des Ausgangsniveaus (t=0: 3,201 pg/ml vs. t=4: 4,545 pg/ml).

3.2.2.2. Sirolimus

Die TNF- α -Konzentration wird ebenso nach Zugabe von Sirolimus zum Reperfusionenblut an den Zeitpunkten t-0 bis t-4 bestimmt. Die Anfangskonzentrationsbestimmung von TNF- α liefert zum Zeitpunkt t-0 einen Wert von 4,293 pg/ml \pm 0,887 pg/ml (n=11). Im Verlauf ist die TNF- α -Konzentrationen an den Zeitpunkten t-1, t-2 und t-3 relativ konstant bleibend unterhalb von 5 pg/ml: 4,679 pg/ml \pm 0,796 pg/ml (t=1; n=12), 4,373 pg/ml \pm 0,686 pg/ml (t=2; n=12), 4,301 pg/ml \pm 0,865 pg/ml (t=3; n=11). Im Vergleich hierzu gab es zum letzten Messzeitpunkt eine

signifikante Erhöhung des TNF- α -Spiegels im Reperfusionser Blut. Der Messwert bei t-4 betrug $13,010 \text{ pg/ml} \pm 4,271 \text{ pg/ml}$ ($n=12$).

Die Messwerte zum Zeitpunkt t-4 sind im Vergleich zu allen Messzeitpunkten t-0 bis t-3 signifikant gestiegen (vgl. Abb. 22).

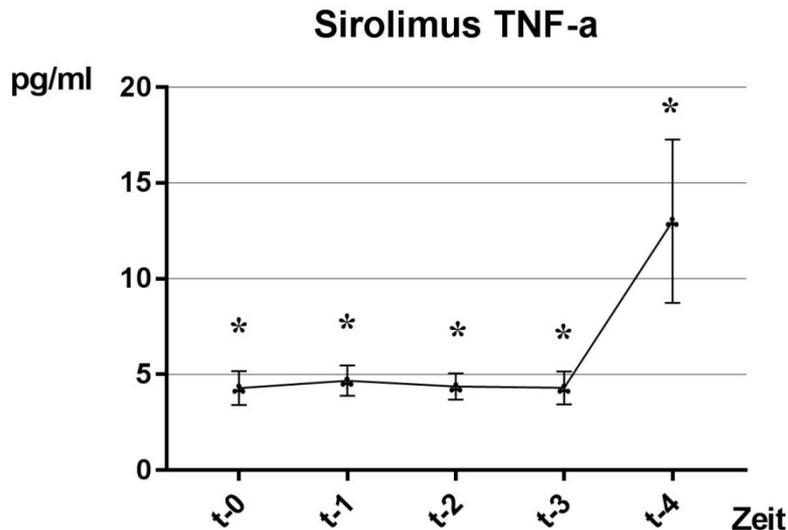


Abb. 22 TNF- α -Konzentration nach Sirolimus-Zugabe zum Reperfusionser Blut. Gemessen werden die jeweiligen Konzentrationen von TNF- α in pg/ml im Bezug zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten nach der Reperfusion von humanen Blutgefäßen. t-0 entspricht Entnahmezeitpunkt nach 0 min ($n=11$) Reperfusion sowie t-1 = 15 min ($n=12$), t-2 = 30 min ($n=12$), t-3 = 60 min ($n=11$), t-4 = 120 min ($n=12$) nach Reperfusionserbeginn. Die Grafik zeigt ein zunächst relativ konstantes TNF- α -Spiegelniveau. Zwischen den Zeitpunkten t-0 bis t-3 steigen die Mittelwertkonzentrationen nicht $>5 \text{ pg/ml}$ an. Signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen den Werten von t-0 – t-3 vs. t-4 (t-0 vs. t-4; t-1 vs. t-4; t-2 vs. t-4; t-3 vs. t-4, $*p < 0,05$).

3.2.2.3. Everolimus

Die Bestimmung des TNF- α -Spiegels nach Everolimus-Zugabe zum Reperfusionser Blut am Zeitpunkt t-0 ergibt einen Wert von $3,753 \text{ pg/ml} \pm 1,112 \text{ pg/ml}$ ($n=7$). Im Verlauf fällt die TNF- α -Konzentration zunächst minimal ab. Zum Messzeitpunkt t-1 wird ein Wert von $3,314 \text{ pg/ml} \pm 0,989 \text{ pg/ml}$ ($n=8$) gemessen. Auch zum Zeitpunkt t-2 befindet sich die Konzentration unterhalb des Ausgangsniveaus bei $3,486 \text{ pg/ml} \pm 0,748 \text{ pg/ml}$ ($n=8$). Am Zeitpunkt t-3 ist die TNF- α -Konzentration mit $4,495 \text{ pg/ml} \pm 0,681 \text{ pg/ml}$ ($n=6$) leicht oberhalb dem Ausgangsniveaus. Zum definierten Endpunkt der Messreihe an Zeitpunkt t-4 wird ein Wert von $7,100 \text{ pg/ml} \pm 2,706 \text{ pg/ml}$ ($n=6$) erhoben.

Die Konzentrationen von TNF- α an den Zeitpunkten t-0 bis t-4 unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Eine absolute Erhöhung zwischen Start- und Endwert der TNF- α -Konzentration von 3,347 pg/ml ist zu beobachten (siehe Abb. 23).

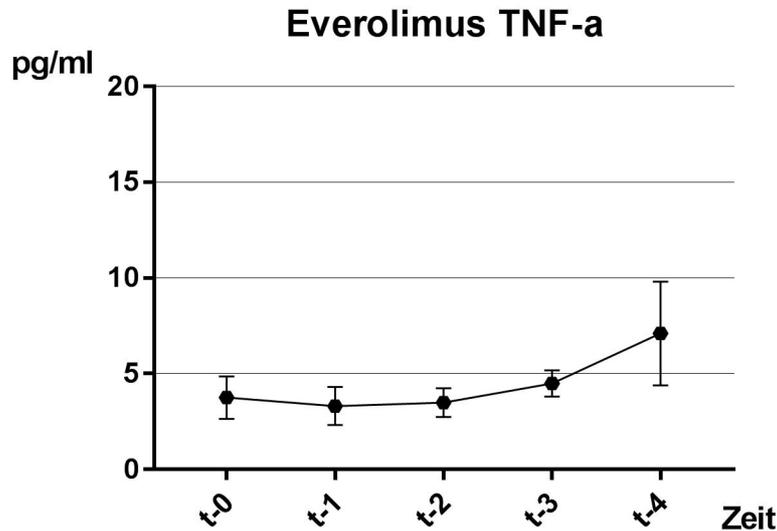


Abb. 23 TNF- α -Konzentration nach Everolimus-Zugabe zum Reperfusionenblut. Gemessen werden die jeweiligen Konzentrationen von TNF- α in pg/ml im Bezug zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten nach der Reperfusion von humanen Blutgefäßen. t-0 entspricht Entnahmezeitpunkt nach 0 min (n=6) Reperfusion sowie t-1 = 15 min (n=8), t-2 = 30 min (n=8), t-3 = 60 min (n=8), t-4 = 120 min (n=8) nach Reperfusionenbeginn. Die Grafik zeigt einen zunächst leichten, nicht-signifikanten Rückgang der TNF- α -Konzentration bis 15 min nach Reperfusionenbeginn. In der Folge steigt die TNF- α -Konzentration wieder leicht an und bleibt jedoch unterhalb des Ausgangsniveaus vor Reperfusionenbeginn (t=2). Über einen weiteren geringfügigen Konzentrationsanstieg bei t-3 erreicht der TNF- α -Spiegel an t-4 seinen bezogen auf die Messungen an t-0 – t-3 nicht-signifikanten Maximalwert.

3.2.2.4. Vergleich der Mittelwerte von der Kontrollgruppe vs. Everolimus vs. Sirolimus

In der Untersuchung und Gegenüberstellung der Mittelwerte von der Kontrollgruppe im Bezug auf die Versuchsgruppe Everolimus und die Versuchsgruppe Sirolimus zu den verschiedenen Zeitpunkten der TNF- α -Konzentrationsmessung t-0 sowie t-1, t-2, t-3 und t-4 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$; vgl. Werte Tabelle 7 und Abb. 24).

Tabelle 7: Vergleich der Mittelwerte der TNF- α -Konzentration von der Kontrollgruppe (Ctr) vs. Everolimus (E) vs. Sirolimus (S).

Zeitpunkt	Vergleich der Gruppen	Mittelwert 1 [in pg/ml]	Mittelwert 2 [in pg/ml]
t-0	Ctr. vs. E	3,201	3,753
t-0	Ctr. vs. S	3,201	4,293
t-0	E vs. S	3,753	4,293
t-1	Ctr. vs. E	10,840	3,314
t-1	Ctr. vs. S	10,840	4,679
t-1	E vs. S	3,314	4,679
t-2	Ctr. vs. E	8,328	3,486
t-2	Ctr. vs. S	8,328	4,373
t-2	E vs. S	3,486	4,373
t-3	Ctr. vs. E	4,576	4,495
t-3	Ctr. vs. S	4,576	4,301
t-3	E vs. S	4,495	4,301
t-4	Ctr. vs. E	4,545	7,100
t-4	Ctr. vs. S	4,545	13,010
t-4	E vs. S	7,100	13,010

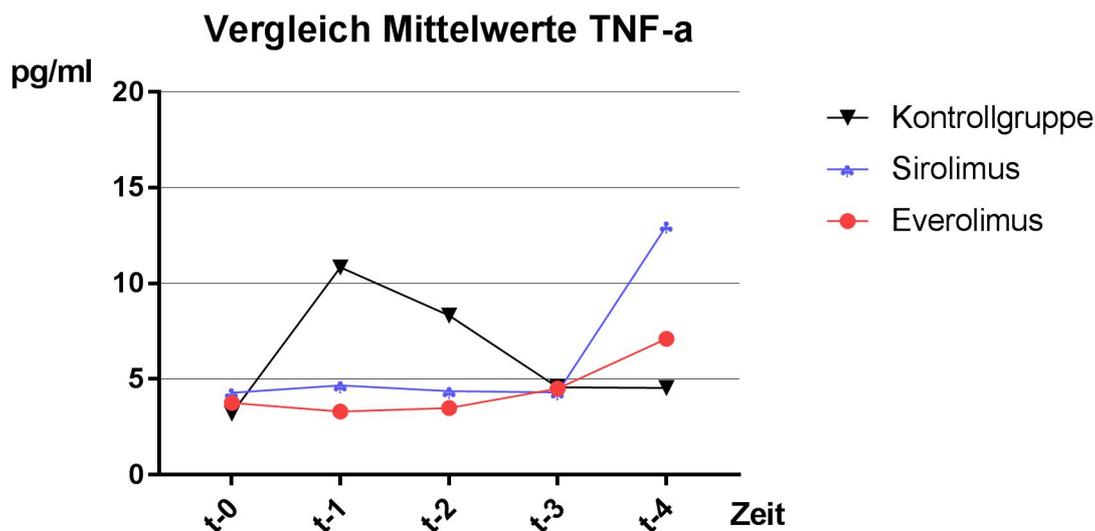


Abb. 24 Vergleich der Mittelwerte der TNF- α -Konzentrationen von der Kontrollgruppe sowie der Sirolimus und Everolimus-Gruppe. Der Graph der Kontrollgruppe ist in schwarzer Farbe, der Sirolimus-Graph in blauer Farbe und der Everolimus-Graph in roter Farbe dargestellt. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte nach Reperfusionbeginn und gegen die TNF- α -Spiegel im Reperfusionserum in pg/ml auf der y-Achse aufgetragen. t-0 entspricht der Reperfusionzeit von 0 min sowie t-1 = 15 min, t-2 = 30 min, t-3 = 60 min und t-4 = 120 min. Im Vergleich der einzelnen Messzeitpunkte unterscheiden sich die Mittelwerte in den drei Gruppen nicht signifikant (* $p < 0,05$). Ausgehend von einem homogenen TNF- α -Konzentrationsniveau steigt die Konzentration in der Kontrollgruppe zunächst stark an, wohingegen die Werte in der Sirolimus und Everolimus-Gruppe zunächst konstant bleiben. Die Messwerte in der Kontrollgruppe fallen im Verlauf allerdings unter das Niveau der Sirolimus und Everolimus-Gruppe ab.

3.2.3. VEGF

3.2.3.1. Kontrollgruppe

Aus denselben Serumproben wie für die Bestimmungen der IL-6- und TNF- α -Konzentrationen werden auch die Blutserumkonzentrationen von VEGF in den verschiedenen Versuchsgruppen an den standardisierten Zeitpunkten bestimmt. In der Kontrollgruppe wird ein Anfangswert zum Start der Reperfusion von $56,209 \text{ pg/ml} \pm 7,953 \text{ pg/ml}$ (t-0; n=8) bestimmt. Die VEGF-Konzentration sinkt im Mittel zum Zeitpunkt t-1 auf den Wert $50,532 \text{ pg/ml} \pm 3,012 \text{ pg/ml}$ (n=8) ab. Die niedrigste Konzentration an VEGF wird in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt t-2 mit $44,866 \text{ pg/ml} \pm 2,127 \text{ pg/ml}$ (n=8) bestimmt. Zum Zeitpunkt t-3 steigt die VEGF-Konzentration auf $76,473 \text{ pg/ml} \pm 7,778 \text{ pg/ml}$ (n=6) an. Am Zeitpunkt des Messendes wird ein VEGF-Mittelwert von $69,102 \text{ pg/ml} \pm 4,971 \text{ pg/ml}$ (n=6) bestimmt.

Ein signifikanter Anstieg der VEGF-Konzentration kann im Vergleich der Messzeitpunkte t-1 sowie t-2 im Bezug zum Messzeitpunkt t-3 errechnet werden (t-1 vs. t-3; t-2 vs. t-3 $p < 0,05$). Die VEGF-Konzentration zu Messbeginn am Reperfusionstart ist im Vergleich zum Messzeitpunkt t-4 um 12,89 pg/ml angestiegen (vgl. Abb. 25).

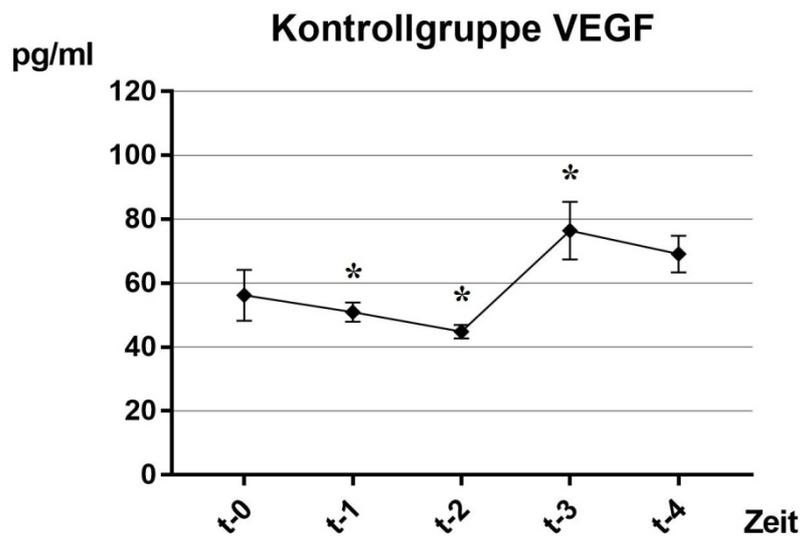


Abb. 25 VEGF-Konzentrationen in der Kontrollgruppe. Gemessen werden die jeweiligen Blutserumkonzentrationen von VEGF in pg/ml im Bezug zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten nach der Reperfusion von humanen Blutgefäßen ohne Medikamentenzugabe. t-0 entspricht dem Blutentnahmezeitpunkt nach 0 min Reperfusion (n=8) sowie t-1 = 15 min (n=8), t-2 = 30 min (n=8), t-3 = 60 min (n=6), t-4 = 120 min (n=6) nach Reperfusionbeginn. Die Grafik zeigt einen zunächst relativ leichten Abfall der VEGF-Konzentration bis zum Zeitpunkt t-2. In der Folge ergibt sich eine signifikante Steigerung der VEGF-Konzentrationen im Vergleich der Messzeitpunkte t-1 und t-3 sowie zwischen den Messzeitpunkten t-2 und t-3 (t-1 vs. t-3; t-2 vs. t-3 $*p < 0,05$).

3.2.3.2. Sirolimus

Die Messungen zum Zeitpunkt t-0 ergeben in der Sirolimus-Versuchsgruppe einen Mittelwert der VEGF-Reperfusionblutkonzentration von 46,891 pg/ml \pm 8,147 pg/ml (n=12). Zum Messzeitpunkt t-1 ergibt sich ein Mittelwert von 51,580 pg/ml \pm 8,726 pg/ml (n=12). In der Folge steigt in der Messung zum Zeitpunkt t-2 die VEGF-Konzentration auf 55,426 pg/ml \pm 9,089 pg/ml (n=12) an. Nach einstündiger Reperfusion beträgt der Mittelwert zum Zeitpunkt t-3 75,223 pg/ml \pm 11,662 pg/ml (n=12). Am Zeitpunkt des Reperfusionsendes t-4 wird ein Wert von 78,028 pg/ml \pm 10,971 pg/ml (n=12) gemessen.

Die Messwerte der VEGF-Konzentration in der Sirolimus-Versuchsgruppe ergeben keine signifikanten Unterschiede innerhalb der zweistündigen Reperfusionzeit. Weder im Vergleich der VEGF-Konzentrationsbestimmung am Reperfusionbeginn, noch zu allen anderen Zeitpunkten untereinander (vgl. Abb. 26).

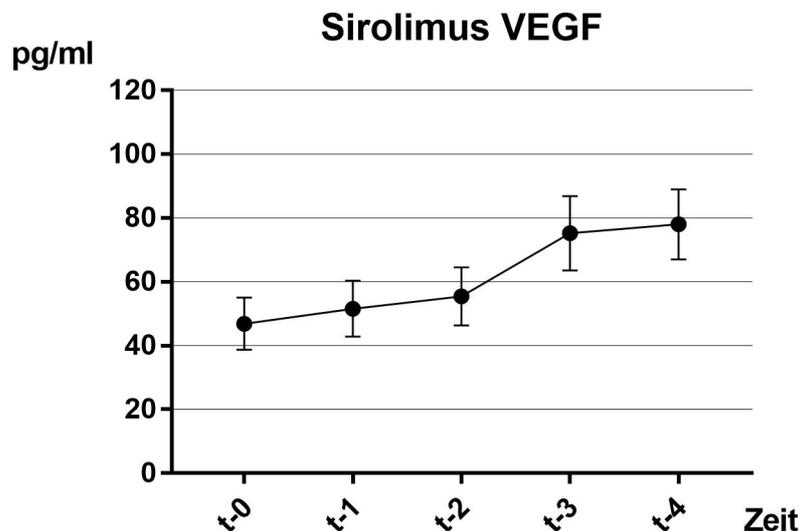


Abb. 26 VEGF-Konzentrationen nach Sirolimus-Zugabe zum Reperfusionblut. Gemessen werden die jeweiligen Blutserumkonzentrationen von VEGF in pg/ml im Bezug zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten nach der Reperfusion von humanen Blutgefäßen mit Sirolimus-Zugabe. t-0 entspricht dem Entnahmezeitpunkt nach 0 min Reperfusion sowie t-1 = 15 min, t-2 = 30 min, t-3 = 60 min, t-4 = 120 min (alle n=12) nach Reperfusionbeginn. Die Grafik zeigt einen zunächst relativ leichten Anstieg des VEGF-Konzentrationsniveaus bis zu t-2. Nach einem deutlicheren VEGF-Anstieg zwischen t-2 und t-3 pendelt sich die VEGF-Konzentration zum Zeitpunkt t-4 auf ca. 78 pg/ml ein. Signifikante Unterschiede ergeben sich zwischen den einzelnen Messzeitpunkten untereinander nicht (*p < 0,05).

3.2.3.3. Everolimus

In der Everolimus-Versuchsgruppe wird ein Anfangsniveau der VEGF-Konzentration am Reperfusionbeginn von 25,423 pg/ml ± 2,282 pg/ml (n=6) gemessen. Nach fünfzehnminütiger Reperfusionzeit steigt dieser Wert zum Zeitpunkt t-1 leicht auf 29,299 pg/ml ± 5,471 pg/ml (n=8) an. Über den Wert 52,236 pg/ml ± 7,033 pg/ml (n=8) am Messzeitpunkt t-2 fällt die VEGF-Serumkonzentration des Reperfusionblutes mit Everolimus-Zusatz auf den Wert 48,107 pg/ml ± 12,109 pg/ml (n=8) ab. Am Ende der zweistündigen Reperfusion wird ein Konzentrationsendwert t-4 von 57,242 pg/ml ± 3,140 pg/ml (n=6) erhoben.

Nach Prüfung auf signifikante Unterschiede kann zwischen den einzelnen Werten der Messzeitpunkte t-0 – t-4 keine Signifikanz errechnet werden. Der Anstieg der VEGF-Konzentration im Serum des Reperfusionserblutes nach Everolimus-Zugabe stellt sich somit als insignifikant dar (vgl. Abb. 27).

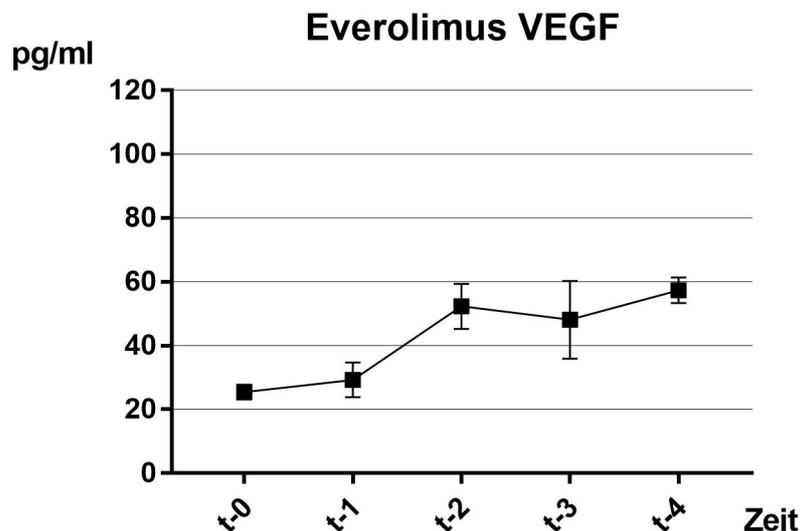


Abb. 27 VEGF-Konzentration nach Everolimus-Zugabe zum Reperfusionserblut. Gemessen werden die jeweiligen Konzentrationen von VEGF in pg/ml im Bezug zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten nach der Reperfusion von humanen Blutgefäßen nach Everolimus-Zugabe. t-0 entspricht Entnahmezeitpunkt nach 0 min (n=6) Reperfusion sowie t-1 = 15 min (n=8), t-2 = 30 min (n=8), t-3 = 60 min (n=8), t-4 = 120 min (n=6) nach Reperfusionserbeginn. Der Graph zeigt einen anfänglich leichten Anstieg der VEGF-Konzentration bis 15 min nach Reperfusionserbeginn (t-1). In der Folge steigt die VEGF-Konzentration zum Zeitpunkt t-2 an und erreicht nach einem Absinken zum Zeitpunkt t-3 seinen Maximalwert zum Zeitpunkt t-4 mit 57,242 pg/ml ± 3,140 pg/ml. Die einzelnen Messwerte ergeben im Vergleich zu den anderen gemessenen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede (*p<0,05).

3.2.3.4. Vergleich der Mittelwerte von der Kontrollgruppe vs. Everolimus vs. Sirolimus

Nach Analyse und Vergleich der Mittelwerte der VEGF-Konzentrationen zwischen den einzelnen Kontroll- bzw. Versuchsgruppen Sirolimus und Everolimus zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten t-0 bis t-4 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abb. 28).

Tabelle 8: Vergleich der Mittelwerte der VEGF- Konzentration von der Kontrollgruppe (Ctr) vs. Everolimus (E) vs. Sirolimus (S).

Zeitpunkt	Vergleich der Gruppen	Mittelwert 1 [in pg/ml]	Mittelwert 2 [in pg/ml]
t-0	Ctr. vs. E	56,209	25,423
t-0	Ctr. vs. S	56,209	46,891
t-0	E vs. S	25,423	46,891
t-1	Ctr. vs. E	50,932	29,300
t-1	Ctr. vs. S	50,932	51,580
t-1	E vs. S	29,300	51,580
t-2	Ctr. vs. E	44,866	52,326
t-2	Ctr. vs. S	44,866	55,426
t-2	E vs. S	52,326	55,426
t-3	Ctr. vs. E	76,473	48,107
t-3	Ctr. vs. S	76,473	75,223
t-3	E vs. S	48,107	75,223
t-4	Ctr. vs. E	69,102	57,342
t-4	Ctr. vs. S	69,102	78,027
t-4	E vs. S	57,342	78,027

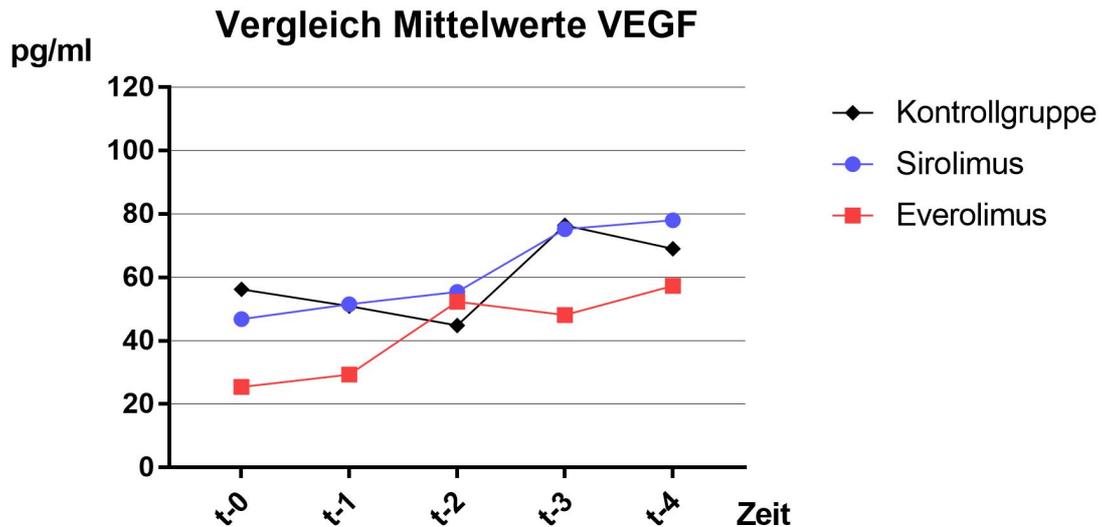


Abb. 28 Vergleich der Mittelwerte der VEGF-Konzentrationen von der Kontrollgruppe sowie der Everolimus- und Sirolimus-Versuchsgruppe. Der Graph der Kontrollgruppe ist in schwarzer Farbe dargestellt. Der Sirolimus-Graph in blauer und der Everolimus-Graph in roter Farbe. Auf der x-Achse sind die Messzeitpunkte (t-0 entspricht der Reperfusionzeit von 0 min sowie t-1 = 15 min, t-2 = 30 min, t-3 = 60 min und t-4 = 120 min) nach Reperfusionbeginn gegen die VEGF-Konzentrationen im Reperfusionblut in pg/ml auf der y-Achse aufgetragen. Die Werte der drei Graphen unterscheiden sich in den Messzeitpunkten t-0 bis t-4 nicht signifikant voneinander. Innerhalb der Kontrollgruppe gibt es allerdings eine signifikante Zunahme der VEGF-Konzentration zwischen Zeitpunkt t-1 vs. t-3 sowie t-2 vs. t-3 ($p < 0,05$). Ausgehend von unterschiedlichen Ausgangsniveaus steigen alle drei Graphen im Verlauf an. Dabei enthält allerdings nur die Kontrollgruppe eine signifikante Zunahme der VEGF-Konzentration im Reperfusionblut. In der Sirolimus- als auch der Everolimus-Versuchsgruppe ist der geringe Anstieg der VEGF-Konzentration insignifikant.

3.3. Immunhistochemie-Daten

3.3.1. CD11b

Die Bestimmung der CD11b-positiven Zellen erfolgt jeweils für fünf zufällig ausgewählte Mikroskopeinstellungen pro jeweiligen Gefäßschnitt. Pro Gefäß wurden jeweils drei Gefäßschnitte a fünf Mikroskopeinstellungen (vierzigfache Vergrößerung) hinsichtlich CD11b-Positivität hin untersucht. Dabei wird so vorgegangen, dass die jeweiligen CD11b-positiven Zellen pro Mikroskopgesichtsfeldeinstellung eines Gefäßes ausgezählt werden. Alle Gefäßschnitte stammen vom Zeitpunkt nach der Reperfusion. Verglichen werden in dieser Untersuchung die durchschnittliche Anzahl der CD-11b-positiven Zellen pro Gefäß in der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen nach Blutzugabe von Sirolimus bzw. Everolimus.

In der Kontrollgruppe findet sich ein Mittelwert von $3,143 \pm 0,708$ positiven CD11b-Zellen (n=21). Im Vergleich dazu ergibt die CD11b-Messung nach Sirolimus-Zugabe zum Reperfusionblut einen Mittelwert von $0,235 \pm 0,106$ positiven CD11b-Zellen (n=17) sowie die Messung nach Everolimus-Zugabe einen Wert von $0,286 \pm 0,101$ positiven CD11b-Zellen (n=21).

Im Hinblick auf Signifikanzunterschiede erweist sich der Vergleich zwischen Kontrollgruppe vs. Sirolimus-Gruppe sowie Kontrollgruppe vs. Everolimus-Gruppe als signifikant ($p < 0,05$). Jeweils wird eine signifikante Reduktion der Anzahl CD11b-positiver Zellen nach Medikamentenzugabe zum Reperfusionblut nachgewiesen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den immunsuppressiven Gruppen „Sirolimus“ und „Everolimus“ ergibt sich nicht. Eine absolute Reduktion der Mittelwerte gibt sich zwischen der Kontrollgruppe und der Sirolimus-Gruppe von 2,908 positiven CD11b-Zellen. Zwischen der Kontrollgruppe und der Everolimus-Gruppe beträgt die absolute Reduktion der positiven CD11b-Zellen im Durchschnitt 2,857 Zellen (siehe Abb.29).

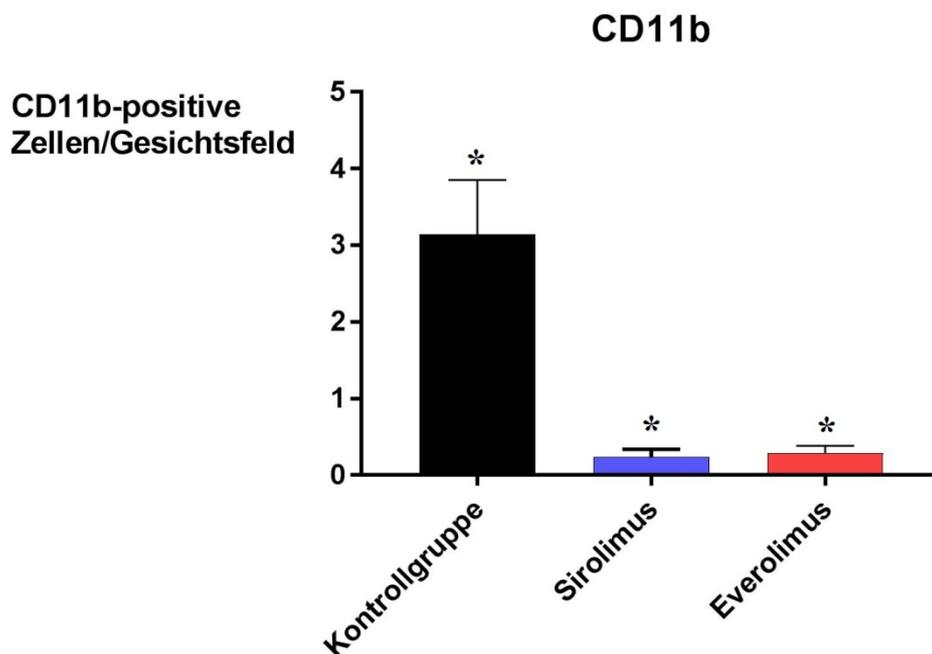


Abb. 29 Vergleich CD11b-positiver Zellen zwischen der Kontrollgruppe, der Sirolimus- und Everolimusgruppe. Im der Grafik sind Säulen der Kontroll-, Sirolimus sowie Everolimusgruppe gegen die CD11b-positiven Zellen pro Gesichtsfeld im Mikroskop aufgetragen. Eine deutliche Reduktion der Anzahl CD11b-positiver-Zellen der Kontrollgruppe ($3,143 \pm 0,708$; n=21) im Vergleich nach der Zugabe von Sirolimus ($0,235 \pm 0,106$; n=17) bzw. Everolimus ($0,286 \pm 0,101$; n=21) zum Reperfusionblut und zweistündiger Reperfusion lassen sich erkennen. Im Hinblick auf Unterschiede in der Signifikanz kann diese im Vergleich von Kontrollgruppe vs. Sirolimus sowie Kontrollgruppe vs. Everolimus bestätigt werden ($*p < 0,05$).

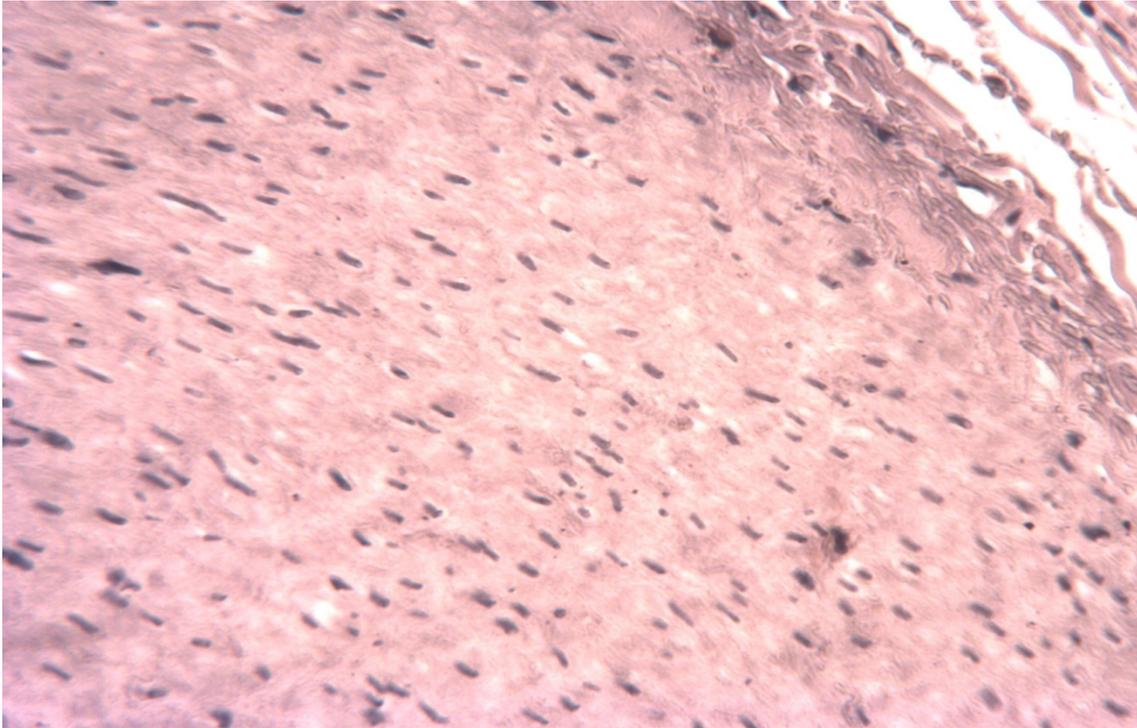


Abb. 30 Kontrollgruppe nach CD11b-Färbung. Die Abbildung lässt ein mikroskopisches Gesichtsfeld der Kontrollgruppe nach CD11b-Färbung erkennen. In der Abbildung erkennt man zwei CD11b-positive Zellen (rechts-unten sowie am oberen mittigen Bildrand). Diese CD11b-positiven Zellen sind anhand ihrer leicht bräunlichen Färbung zu detektieren.

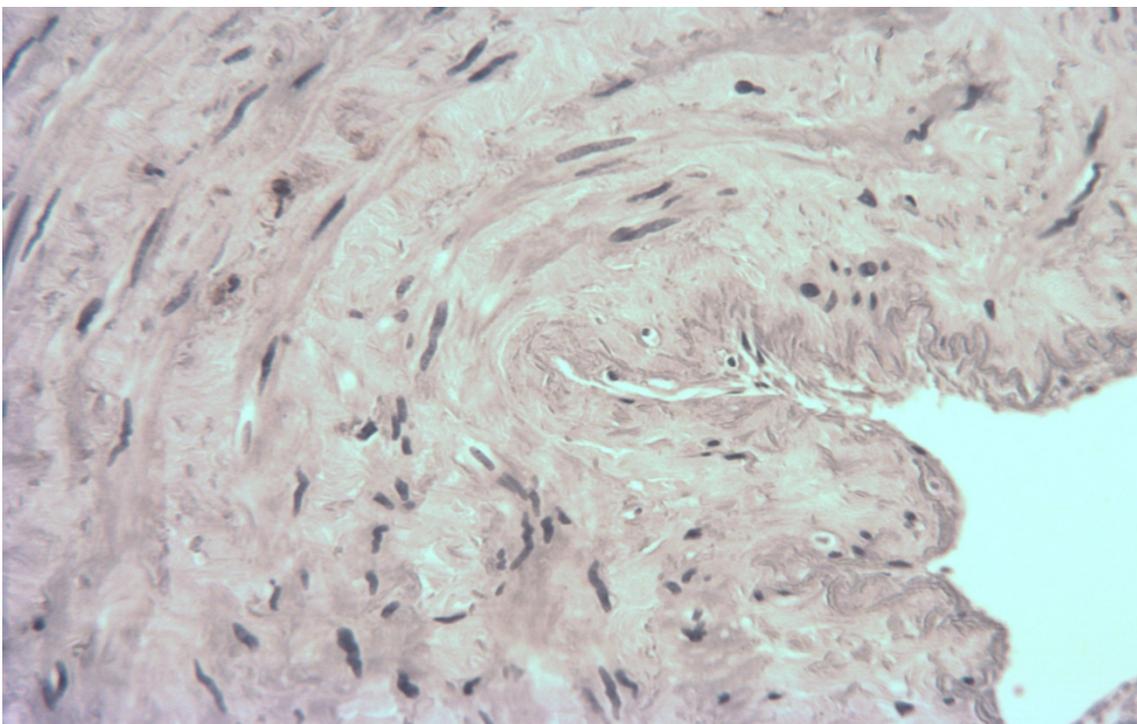


Abb. 31 Gefäß der Sirolimus-Versuchsgruppe nach CD11b-Färbung. In der Abbildung ist ein Anschnitt eines Gefäßes und dessen Lumen zu erkennen. Weder in der Tunica media noch in der Endothelzellschicht lassen sich CD11b-positiv gefärbte Immunzellen nachweisen und erkennen.

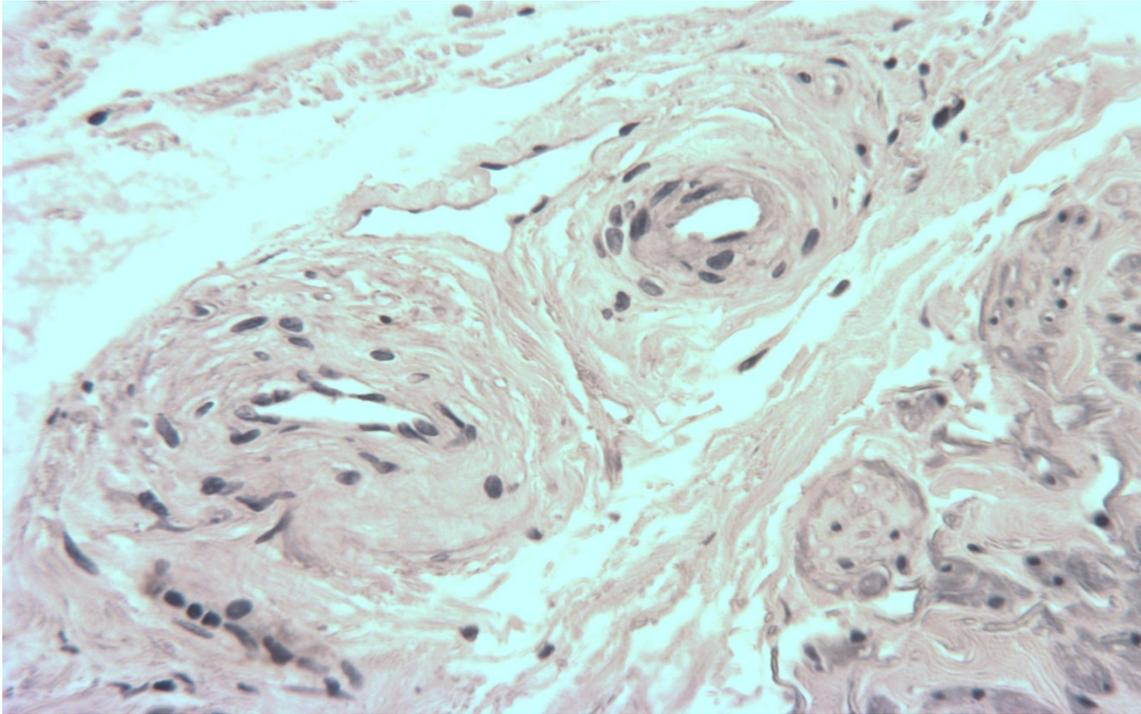


Abb. 32 Gefäß der Sirolimus-Versuchsgruppe nach CD11b-Färbung. In der Abbildung ist ein Anschnitt des Gefäßes der Sirolimus-Versuchsgruppe zu sehen. Auch sind zwei kleinere Gefäße in der Wandstruktur der Tunica adventitia des Gefäßes zu erkennen.. Weder in diesen kleinlumigen Gefäßen, noch in den übrigen Strukturen lassen sich CD11b-positive Zellen detektieren und auffinden.

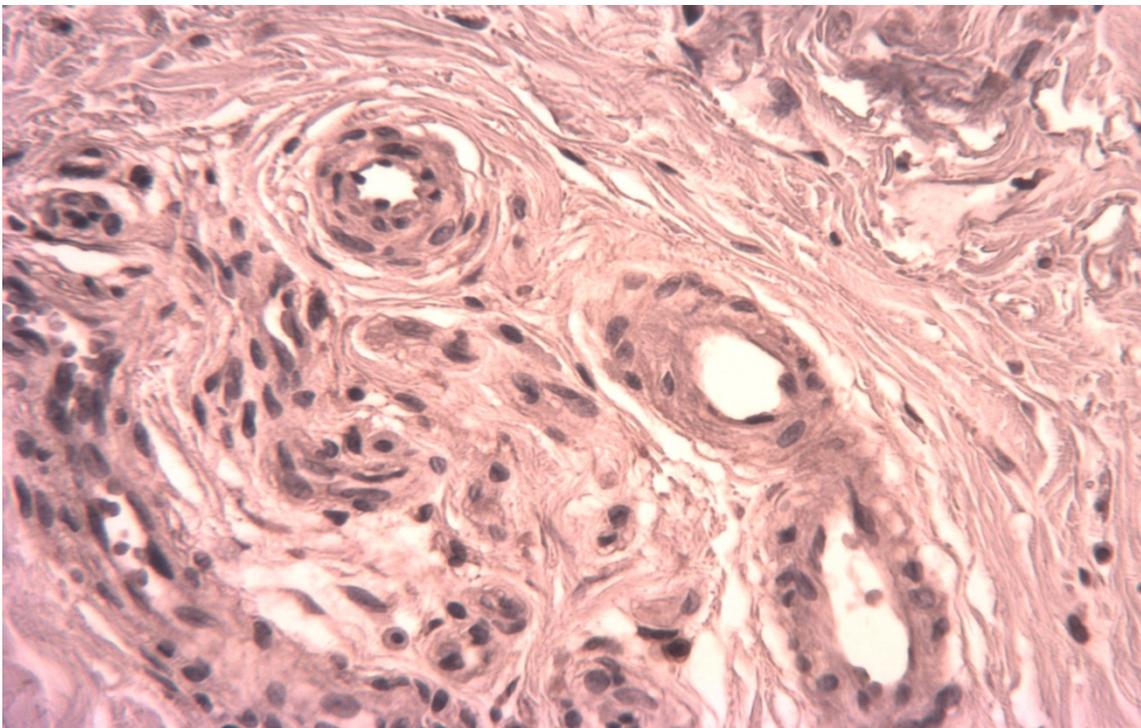


Abb. 33 Gefäß der Everolimus-Versuchsgruppe nach CD11b-Färbung. In der Abbildung ist ein Anschnitt eines der Versuchsgefäße der Everolimus-Gruppe zu sehen. Auch sind mehrere kleinere Gefäße in der Wandstruktur des Gefäßes erkennbar. Weder in diesen kleinlumigen Gefäßen, noch in den übrigen erkennbaren Strukturen lassen sich CD11b-positive Zellen nachweisen.

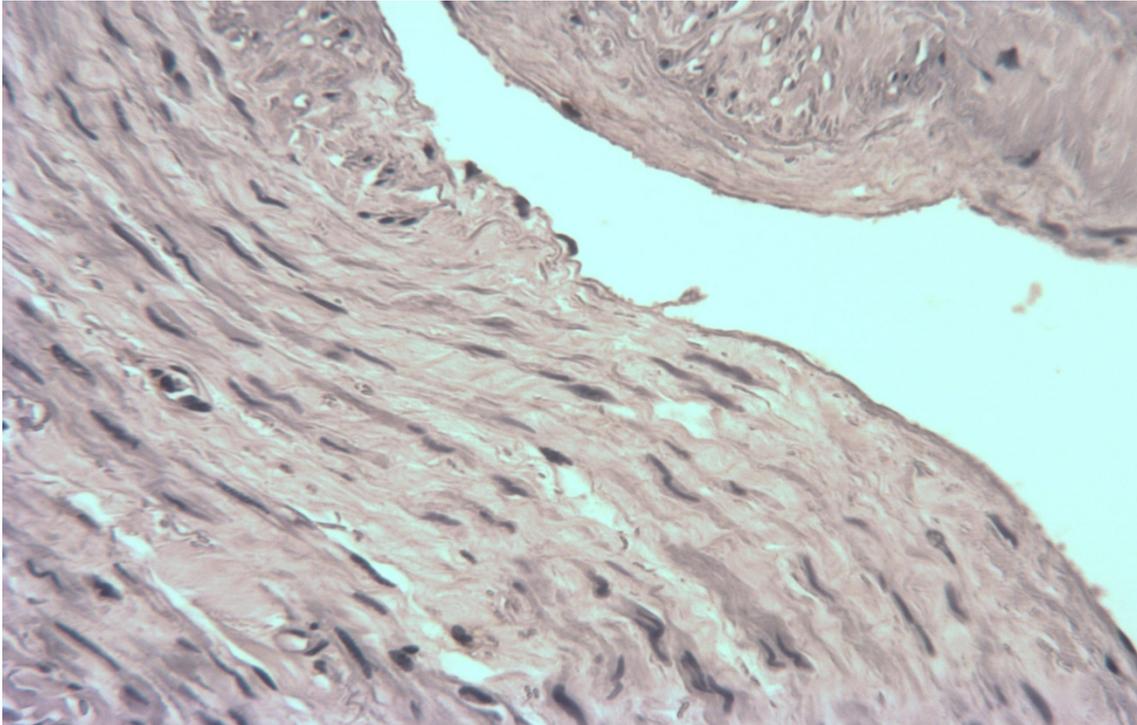


Abb. 34 Gefäß der Everolimus-Versuchsgruppe nach CD11b-Färbung. In der mikroskopischen Ansicht ist ein Anchnitt eines der Versuchsgefäße der Everolimus-Gruppe sowie ein Teil dessen Lumens zu sehen. Es sind in dieser Abbildung keine erkennbar CD11b-gefärbten Zellen zu sehen. Dies betrifft sowohl das Lumen, als auch das Endothel und die angrenzende Muskelschicht der Tunica media.

3.3.2. CD31

Analog zur Bestimmung der CD11b-positiven Zellen erfolgt die Quantifizierung von CD31-positiven endothelialen Gefäßanschnitten durch eine immunhistologische Färbung. Pro Gefäß werden jeweils drei Gefäßschnitte unter dem Mikroskop (vierzigfache Vergrößerung) auf CD31-positive Gefäße abgesucht. Hierbei werden jeweils die gesamten Gefäßschnitte auf CD31-positive Gefäße untersucht. Die Gefäßschnitte werden jeweils nach dem Reperfusionseende entnommen. Die Gefäße werden somit zunächst 120 min reperfundiert.

In der Kontrollgruppe liegt der durchschnittliche Mittelwert bei $10,850 \pm 2,282$ positiver CD31-Gefäße ($n=20$) pro Gefäß. In der Versuchsgruppe nach Sirolimus-Zugabe zum Reperfusionisblut kann ein durchschnittlicher Wert von $3,188 \pm 1,239$ CD31-positiven Gefäßen ($n=16$) erhoben werden. Nach Zugabe von Everolimus zum Reperfusionisblut kann ein Mittelwert von $0,600 \pm 0,294$ CD31-positiver Gefäße ($n=20$) quantifiziert werden.

Im Vergleich der Kontrollgruppe vs. Sirolimus-Gruppe kann ein signifikanter Abfall CD31-positiver Gefäße aufgezeigt werden. Beim Vergleich der Kontrollgruppe vs. Everolimus-Gruppe besteht ebenfalls eine signifikante Reduktion von CD31-positiver Gefäße ($p < 0,05$). Beim Vergleich der Sirolimus-Gruppe vs. Everolimus-Gruppe gibt es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Anzahl CD31-positiver Gefäße. Eine absolute Reduktion in den Mittelwerten CD31-positiver Gefäße pro Gefäßschnitt der Kontrollgruppe im Vergleich zur Sirolimus-Gruppe bzw. der Everolimus-Gruppe von 7,663 bzw. 10,250 CD31-Gefäßen ist gegeben (siehe Abb. 31).

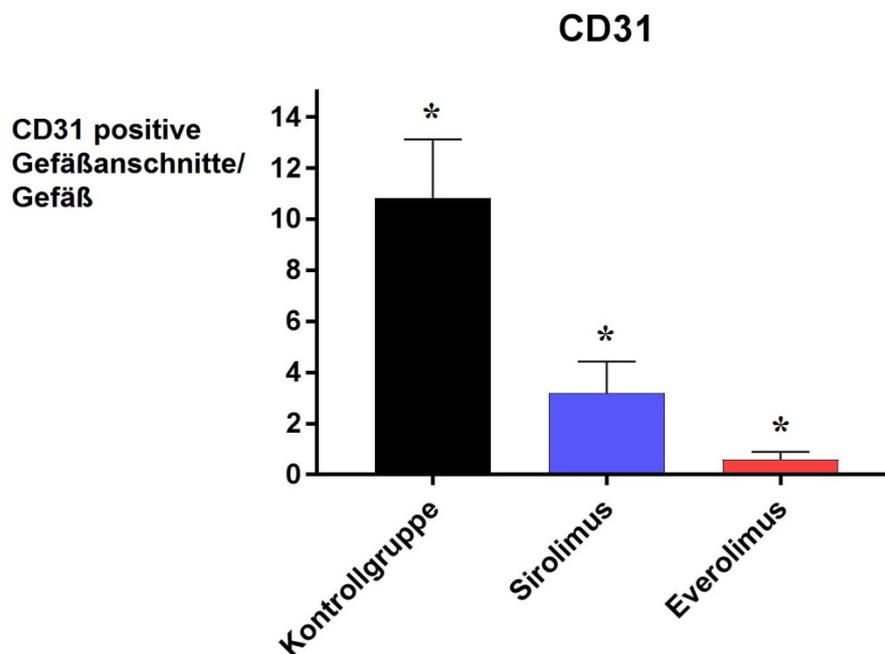


Abb. 35 Vergleich CD31-positiver Gefäßanschnitte zwischen der Kontrollgruppe, der Sirolimus- und Everolimusgruppe. In der Abbildung sind Säulen der Kontroll-, Sirolimus sowie Everolimusgruppe gegen die CD31-positiven Gefäßanschnitte pro Untersuchungsgefäß aufgetragen. Eine starke Reduktion der Anzahl CD31-positiver Gefäße in der Kontrollgruppe ($10,850 \pm 2,282$; $n=20$) im Vergleich nach der Zugabe von Sirolimus ($3,188 \pm 1,239$; $n=16$) bzw. Everolimus ($0,600 \pm 0,294$; $n=20$) zum Reperfusionblut und zweistündiger Reperfusion lassen sich erkennen. Im Hinblick auf Unterschiede in der Signifikanz kann diese im Vergleich von Kontrollgruppe vs. Sirolimus sowie Kontrollgruppe vs. Everolimus gezeigt werden ($*p < 0,05$).

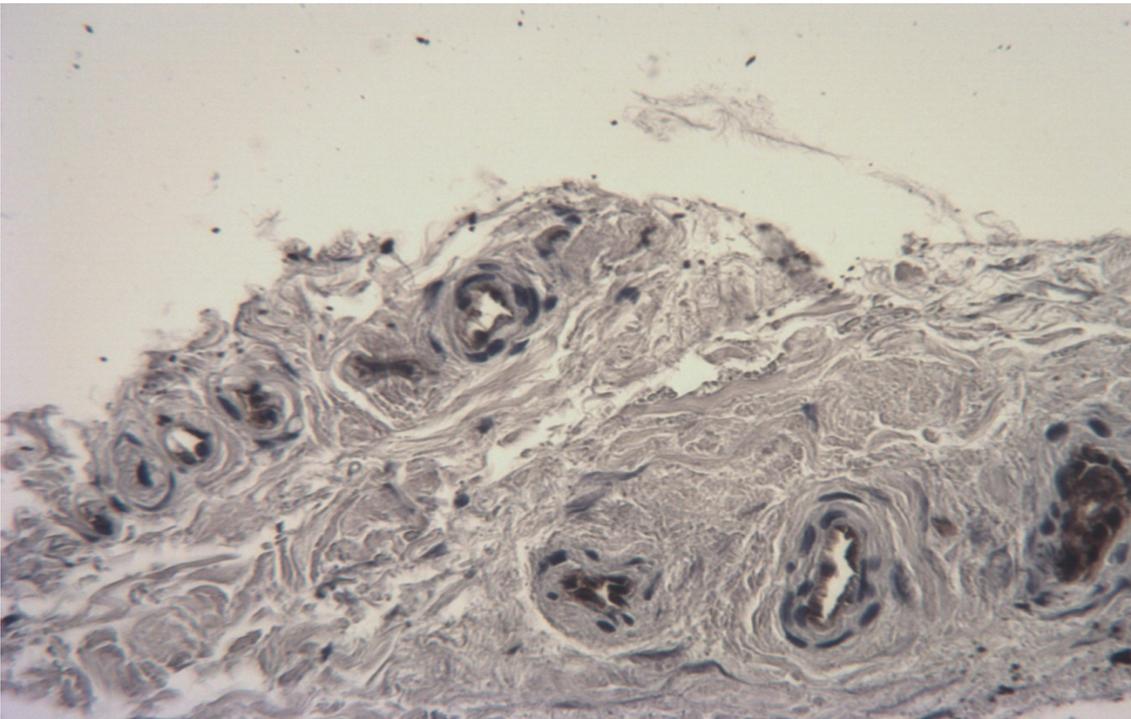
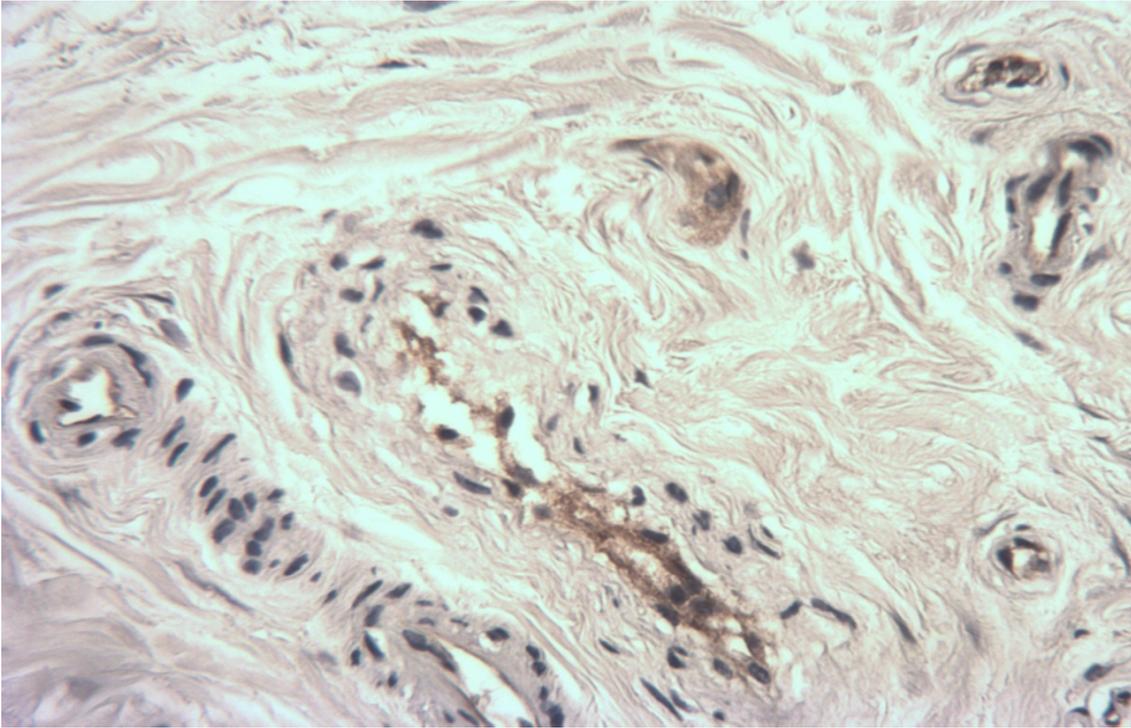


Abb. 36 (oben) + Abb. 37 (unten) Kontrollgruppenfärbung CD31. Zu sehen sind zwei Ausschnitte von Gefäßen der Kontrollgruppe nach CD31-Färbung. Die CD31-Färbung lässt sich als bräunliche Färbung erkennen. In den Anschnitten sieht man verschiedene kleinere und größere Gefäße in den Wandstrukturen/Tunica adventitia der Gefäße der Kontrollgruppe. Dieses angeschnittenen Gefäße haben auf ihrem luminalen Endothel einen deutlich erkennbaren bräunlichen Saum, welche eine Expression des Adhäsionsmoleküls CD31 darstellen.

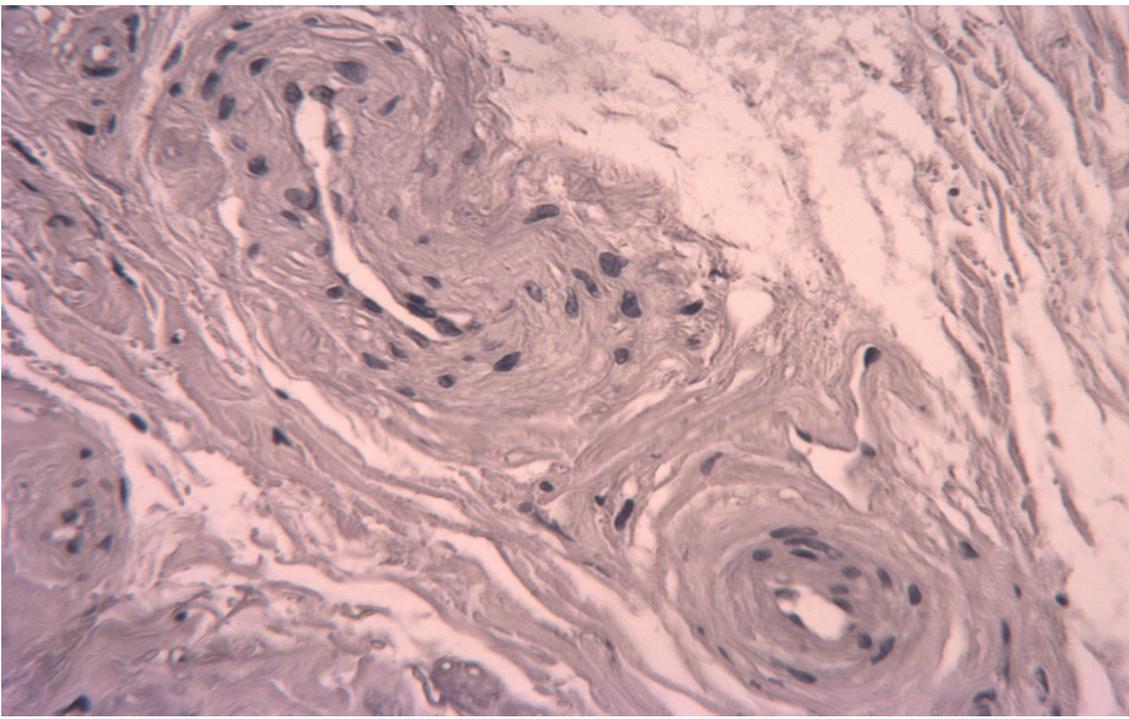
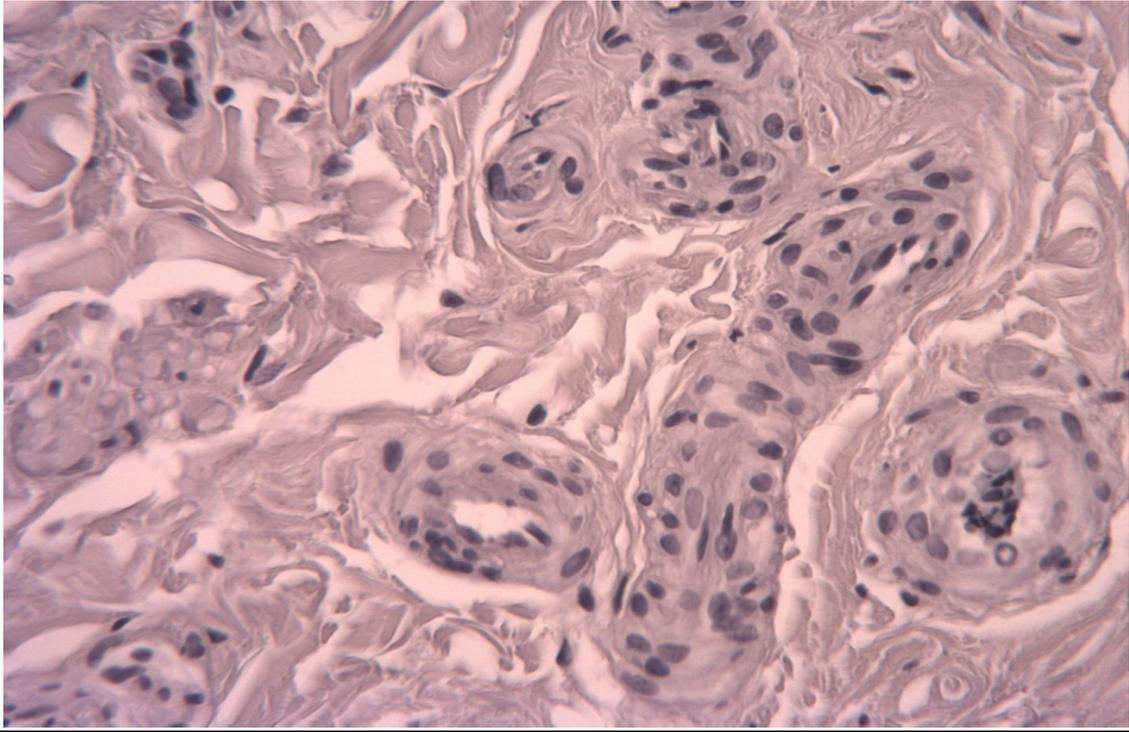


Abb. 38 (oben) + Abb. 39 (unten) Sirolimus-Gruppe CD31-Färbung. Zu sehen sind zwei Anschnitte von Gefäßen der Sirolimus-Versuchsgruppe nach zweistündiger Reperfusion. Auch in diesen Anschnitten lassen sich mehrere kleinere Gefäße in den Wandstrukturen/Tunica adventitia der Versuchsgefäße erkennen. Eine positive CD31-Färbung lässt sich durch einen bräunlichen Saum auf dem Endothel von Gefäßen detektieren. Auf beiden Bildern der Sirolimus-Gruppe sind auf den verschiedenen Gefäßenendothelien keine positiven CD31-Expressionen nachzuweisen.

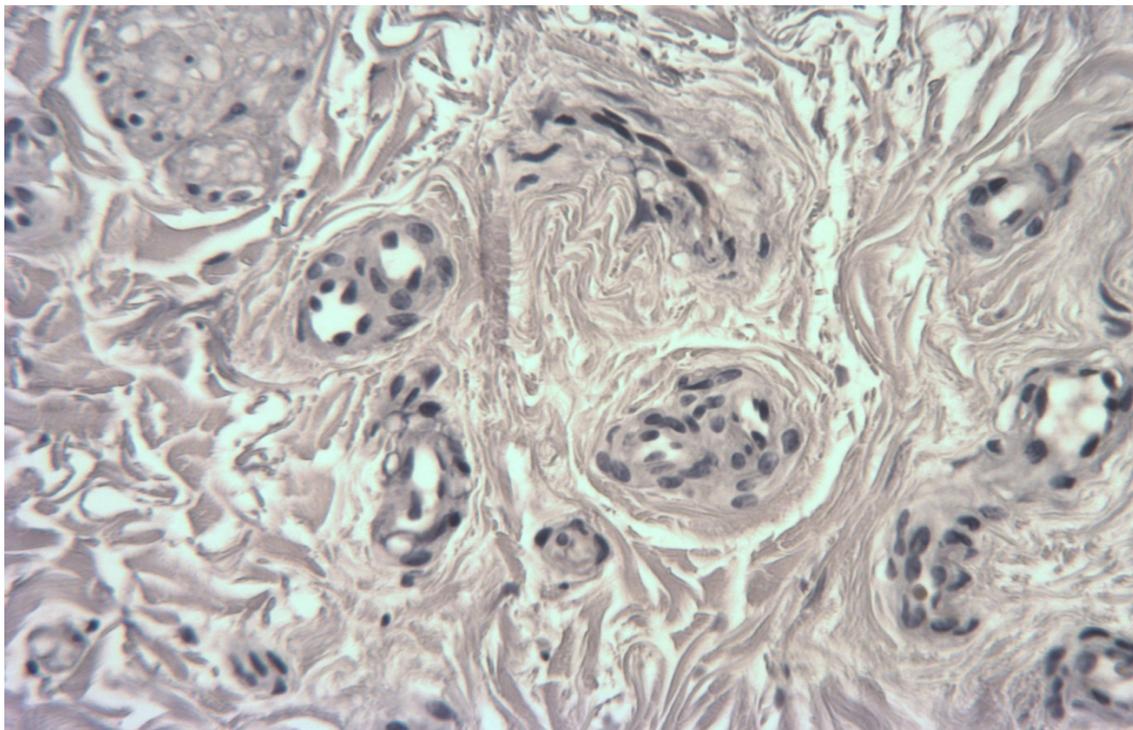
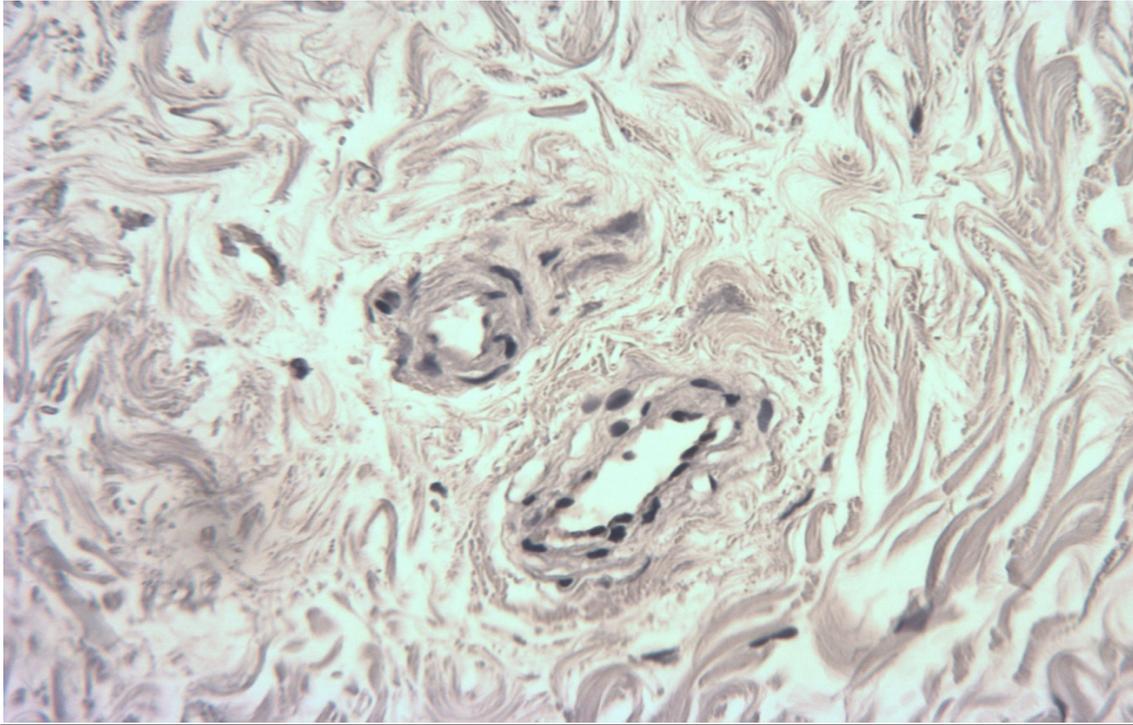


Abb. 40 (oben) + Abb. 41 (unten) Everolimus-Gruppe CD31-Färbung. Zu sehen sind zwei Anschnitte von Gefäßen der Everolimus-Versuchsgruppe nach Reperfusion. Ebenso lassen sich in diesen Anschnitten mehrere kleinere Gefäße in den Wandstrukturen/Tunica adventitia der Versuchsgefäße erkennen. Eine positive CD31-Färbung lässt sich durch einen bräunlichen Saum auf dem Endothel von Gefäßen erkennen. Auf beiden Bildern der Everolimus-Gruppe sind auf den verschiedenen Gefäßenendothelien keine positiven CD31-Expressionen nachzuweisen.

4. Diskussion

4.1. Präoxygenierung im Model des Bioreaktor

Um ein physiologisches Milieu zu erzeugen und zu imitieren, muss das Reperfusionenblut präoxygeniert werden. Durch die Präoxygenierung können Sauerstoffpartialdrücke und Sauerstoffsättigungen im Blut erreicht werden, welche dem physiologischen arteriellen humanen Blutkreislauf ähnlich sind. Da die verwendeten Blutproben allerdings nur venös gespendetes Blut enthalten, liegt die Sauerstoffsättigung ohne Oxygenierung deutlich unterhalb der physiologischen arteriellen Grenzwerte. Unter der Annahme ein arterielles Gefäßkreislaufmodell zu simulieren, sind die vor der Präoxygenierung gemessenen O₂-Werte als hypoxisch zu betrachten (Referenzbereiche: <85% sO₂ = hochgradige Hypoxie, 85-89% sO₂ = mittelgradige Hypoxie, 90-94% sO₂ = mäßige Hypoxie, >94% sO₂ = Normbereich⁵). Um die Sauerstoffsättigung nun auf physiologisch-arterielle Werte anzuheben, wird die Präoxygenierung mittels der Kleintier-HLM vorgenommen. Hierbei wird das Blut mit 100%igen Sauerstoff präoxygeniert. Dies stellt eine Abweichung des physiologischen Sauerstoffanteils in der Atemluft dar. Das übermäßige Angebot an Sauerstoff kann letzten Endes dazu geführt haben, reaktive Sauerstoffspezies zu erzeugen (ROS). Vor allem durch die Einstellung und Oxygenierung des Blutes mit einer großen Menge Sauerstoff pro Minute (Literanzahl O₂/Minute) wird die ROS-Bildung begünstigt. Aufgrund des Bewusstseins dieser Problematik wird bei der Durchführung der Präoxygenierung darauf geachtet, den Sauerstoff-Flow durch den Regler an der Sauerstoffflasche möglichst niedrig zu halten (niedrige Literanzahl O₂/Minute), um die Entstehung von ROS so gering wie möglich zu halten.

Wie durch einige Studien bereits belegt wurde, führen ROS zum deutlichen Anstieg bzw. zur Vergrößerung des Ischämie-Reperfusionsschadens am Endothel (s.g. Sauerstoffparadoxon).^{64,193} Somit könnte der IRI in unserem humanen Gefäßmodell durch ROS-Bildung falsch-erhöht gewesen sein. Wie in Kapitel 1.3. und 1.4. belegt wurde, spielt die Wirkungsweise von Sirolimus und Everolimus in der Blockade des NF-κB-Signalweges eine entscheidende Rolle in der Reduktion von ROS.¹⁹⁴ Durch mögliche falsch-erhöhte ROS-Werte könnten unter Umständen die eigentlichen Entfaltungskräfte der Medikamente auf den ROS-bedingten Ischämie-Reperfusionsschaden nicht richtig ausgenutzt und quantifiziert werden.

In der Gesamtbetrachtung lässt sich allerdings auf die Präoxygenierung nicht verzichten, da hierdurch dem Bioreaktormodell mit humanen Gefäßproben ein essentieller Bestandteil der Simulation des menschlichen Organismus entzogen werden würde, falls das Blut keine physiologisch-arterielle Sauerstoffsättigung aufweise. Eine Quantifizierung dieser Problematik der ROS könnte mittels Messung von ROS vor der Präoxygenierung, nach der Präoxygenierung und nach Reperfusion Aufschluss darüber geben, welcher Anteil der ROS auf die Präoxygenierung und welcher Anteil der ROS auf den Ischämie-Reperfusionsschaden zurückzuführen ist.

Durch die 100%ige Sauerstoffpräoxygenierung kann letztendlich auch das Niveau des Kohlenstoffpartialdrucks im Blutsystem nicht mehr den physiologischen Gegebenheiten des arteriellen Blutkreislaufs aufrecht erhalten werden. Das Blut wird durch die Kleintier-HLM mit Sauerstoff abgesättigt. Demzufolge sinkt bzw. ist das Ausgangsniveau des $p\text{CO}_2$ in der Versuchsdurchführung jeweils bis Ende des Versuchs unterhalb der physiologischen Bereichs (vgl. Kapitel 3.1.2., 4.3. sowie Abb.15).

Eine weitere Problematik der Kleintier-HLM stellt die Okklusion der Schlauchsysteme durch die verwendete Rollerpumpe dar, welche ebenso wie beim Bioreaktormodell verwendet wurde und somit durch die mechanische Kraftausübung auf das Blut Einfluss auf verschiedene Blutparameter nehmen kann (für Diskussion der Rollerpumpe vgl. Kapitel 4.2.).¹⁴⁰

4.2. Bioreaktor, Reperfusion & Gefäße

In der Gesamtbewertung gibt es in diesem Modell des Bioreaktors einige Variablen die möglicherweise den Ausgang und die Ergebnisse der Blutproben sowie der Gefäßproben beeinträchtigt haben können. Vom mechanischen Gesichtspunkten lief der Bioreaktor während der Reperfusionszeiträume fehlerfrei. Eine problematische Komponente des Bioreaktorsystems stellt allerdings die Rollerpumpe dar: Die benutzte Rollerpumpe arbeitet nach dem Prinzip der Verdrängung durch Okklusion des durchführenden Schlauchsystems. Dies bedingt eine mechanische und dumpfe Krafteinwirkung auf die im Blut zirkulierenden Erythrozyten, Leukozyten und Zellbestandteile. Durch diesen Okklusionsdruck auf die Zellbestandteile kann eine mechanische Hämolyse nicht ausgeschlossen werden, was eine Abweichung der

tatsächlichen Werte der BGA bedingen könnte (vgl. Kapitel 4.3. Blutgasanalyse). Um dieser Okklusionsproblematik Herr zu werden, werden in der Kardioteknik vor allem Zentrifugalpumpen verwendet.¹⁴⁰

Um die Reibungskräfte des Blutes in den Silikonschläuchen zu senken, wird der Hämatokrit wie in Vorversuchen einheitlich auf 30% gesenkt.¹⁴³ Dies stellt eine allerdings eine Abweichung zu dem physiologischen Milieu dar und senkt die Konzentrationen der im Blut zirkulierenden und für den Versuch und die Untersuchung der Transmigration entscheidenden Leukozyten pro Milliliter.⁵

Ohne eine entsprechende Antikoagulation entsteht in unseren Versuch ein hohes Risiko für eine Thrombenbildung durch Thrombozytenaggregation aufgrund von nicht-humanen Oberflächen der Schläuche und anderer Bauteile des Bioreaktors, die mit dem reperfundierenden Blut in Berührung kommen.¹⁹⁵ Um der Problematik einer Aktivierung des Gerinnungssystems Herr zu werden, werden die Blutproben, ähnlich wie beim Einsatz von Herz-Lungenmaschinen bei herzchirurgischen Operationen mittels Heparin versetzt.¹⁴⁶ In diesem Versuch erwies sich die Heparinisierung angelehnt an Vorversuche mit Bioreaktoren im Gefäßmodell als adäquat.¹⁴³ Eine Thrombenbildung wurde nicht beobachtet.

Eine weitere Problematik in dem benutzten Reperfusions-Gefäßmodell ist die Verhinderung bzw. Entstehung von Luftembolien. Wie einschlägig bekannt ist, können Luftembolien während (herzchirurgischer) Operationen zu massiven Komplikationen wie neurologischen Schäden führen.^{196,197} Mittels Entlüftung über Drei-Wege-Hähne werden in diesem Versuchsaufbau Vorkehrungen zur Vermeidung einer Luft- bzw. Mikroembolie getroffen. Ein gänzlicher Ausschluss von Mikroembolien besteht in diesem Modell allerdings nicht.

Der Ischämiezeitraum vor der Reperfusion wurde aufgrund der strukturellen Gegebenheiten auf eine Zeitspanne zwischen 4-5h nach Entnahme aus dem Spender festgelegt. In diesem Zeitraum wurden die Gefäße auf Eis bei ca. 4 Grad Celsius gelagert, um die Methode der kalten Ischämie zu imitieren. In anderen Versuchen mit Reperfusionsmodellen werden im Vergleich zu diesem Versuchsaufbau bewusst längere Ischämiezeiträume verwendet.^{198,199} Eine längere Ischämiezeitraum kann eventuell die Realität einer Organtransplantation und den damit verbundenen Ischämie-Reperfusionsschaden der Endothel- und Gefäßzellen zwischen Organentnahme und

Organtransplantation besser wiedergeben. Die gewählte Ischämiezeit sowie die gewählte Reperfusionzeit waren eventuell entsprechend zu kurz gewählt, um das gesamte Ausmaß und den Anstieg der Inflammationsmarker zu detektieren, bzw. signifikante Änderungen in der Suppression von Inflammationsmarkern wie Interleukin-6, TNF- α und VEGF durch die verwendeten Immunsuppressiva Sirolimus und Everolimus zu generieren (vgl. Kapitel 4.4.1., 4.4.2.)

Zu diskutieren bleibt auch die Frage, ob genauere Informationen über die Gefäßspender und eine Unterteilung in Subkategorien anhand von verschiedenen Vorerkrankungen, Geschlecht, Rauchen oder Alter weitere Rückschlüsse auf die Effektivität der zugesetzten Medikamente und damit den Einfluss auf den Ischämie-Reperfusionsschaden haben könnte. Auch könnte zwischen einer akuten und elektiven Bypassversorgung der Gefäßspender unterschieden werden, was nachweislich Auswirkungen auf das inflammatorische Level der Gefäße hat.²⁰⁰ Vorerkrankungen (z.B. ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus und dessen Folgen oder eine Vaskulitis) oder ein ungesunder Lebensstil (wie z.B. wenig Bewegung oder Nikotinabusus) haben nachgewiesener Maßen einen starken Einfluss auf den Zustand der Gefäße sowie deren Inflammationsniveau und beeinflussen somit auch die Vergleichbarkeit zu den Gefäßen von beispielsweise Nicht-Raucher-Spendern (vgl. Kapitel 1.1.1. Arteriosklerose & Kardiovaskuläre Risikofaktoren).^{10,29,32,38,201,202}

4.3. Blutgasanalyse

Die durchgeführte Blutgasanalyse dient der Quantifizierung des Ist-Zustandes der Bluteilkomponenten die für die Vitalität der Gefäße während der Reperfusion nötig sind, um gegebenenfalls Veränderungen vorzunehmen sowie außerdem der Quantifizierung der Qualität des Bioreaktormodells. Außerdem kann hiermit die Gute der Proxymygenierung anhand von Parametern überwacht werden.

Die in Kapitel 4.2. beschriebene Problematik der Schlauchokklusion und der damit verbundenen möglichen Zellhämolyse im Blut kann zu einer Verfälschung der Parameter der Blutgasanalyse führen. Wie bereits in Studien von Lippi et al. gemessen wurde, trägt eine Hämolyse des Blutes dazu bei, die von uns gemessenen Parameter sO_2 , pCO_2 und den pH-Wert zu verändern.²⁰³ Dies kann letztendlich dazu geführt haben,

dass die Parameter des $p\text{CO}_2$ während der Versuchsdurchführung stetig sanken und gegen Reperfusionseende deutlich Werte unterhalb der physiologisch-arteriellen Werte angenommen haben (vgl. Abb. 15). Der physiologische Wertebereich des $p\text{CO}_2$ liegt laut Herold altersunabhängig zwischen 32-43 mmHg bei Frauen und 35-46 mmHg bei Männern.⁵ Mit Ausnahme der Sirolimus-Versuchsgruppe lagen die Anfangsdurchschnittswerte des $p\text{CO}_2$ in der Kontrollgruppe oberhalb und in der Everolimus-Versuchsgruppe unterhalb des physiologischen Referenzbereichs. Alle drei Gruppen zeigten allerdings einen Abfall der $p\text{CO}_2$ -Werte –möglicherweise durch die Sauerstoffabsättigung des Blutes bedingt- am Ende der Reperfusion auf $p\text{CO}_2$ -Werte von 4,50-12 mmHg.

Ebenso wie eine Veränderung des Kohlenstoffpartialdrucks können die Messwerte der pH-Werte durch eine mögliche Hämolyse verändert worden sein. Der physiologische Referenzbereich des arteriellen pH-Wertes beträgt laut Herold in einer arteriellen BGA 7,35-7,45.⁵ Wie durch Lippi et al. belegt werden konnte, liegen die Messwerte Hämolyse der pH-Werte zumeist falsch-niedrig ins saure Milieu verschoben (-0,2%). Hämolyse-bedingt kann es somit zur Freisetzung von sauren Intrazellulärsubstanzen in den Extrazellularraum kommen.²⁰³ Dies kann dazu beigetragen haben, dass die in der BGA gemessenen arteriellen pH-Werte anfangs in der Kontrollgruppe sowie in den beiden Versuchsgruppen unterhalb der Referenzgrenze liegen (vgl. Abb. 16). Eine weitere Erklärung für die zunächst deutlich unterhalb des arteriellen Referenzbereiches gemessenen pH-Werte in den Kontroll- und beiden Versuchsgruppen stellt das s.g. pH-Paradoxon dar: Wie in einigen Studien gezeigt wurde, sinkt in Kardiomyozyten sowie glatten Muskelzellen arterieller Gefäße der pH-Wert während einer Ischämiezeit ab. Dieses Absinken gilt als Schutzmechanismus der Zellen gegen einen einsetzenden Zelltod während des Ischämiezeitraums. Setzt daraufhin eine Reperfusion mittels Blut ein, steigt in der Folge der pH-Wert wieder auf physiologische Werte an.^{66,67} Wenn man dieses Paradoxon mit den erhobenen und gemessenen pH-Daten der durchgeführten Versuche vergleicht, zeigt sich eine Bestätigung des in der Literatur beschriebenen pH-Paradoxons im arteriellen Blutes des Versuchs in allen drei Gruppen: Zu Versuchsbeginn der Reperfusion lagen die pH-Werte aller Gruppen zunächst im azidotischen pH-Wertebereich des Blutes (pH-Werte t=0: Kontrollgruppe: 7,24; Sirolimus-Versuchsgruppe: 7,18; Everolimus-Versuchsgruppe: 7,19), was als Ausschwemmung saurer Molekularsubstanzen der Gefäßzellen gewertet werden kann. Mit zunehmender

Reperfusionsdauer pendeln sich die pH-Werte der drei Versuchsgruppen erneut in physiologische Bereiche ein und lagen in allen drei Gruppen während des Reperfusionsendes innerhalb des Referenzbereichs (pH-Werte t-4: Kontrollgruppe 7,31; Sirolimus-Versuchsgruppe 7,36; Everolimus-Versuchsgruppe 7,36).

4.4. ELISA-Daten

Eine kritisch zu betrachtende Variable in den ELISA-Datenmessungen sind die interindividuellen Unterschiede im Ausgangsniveau der Blutproben hinsichtlich der proinflammatorischen untersuchten Marker. Da das benutzte Versuchsblut nicht von den jeweiligen Gefäßspendern stammt, waren entsprechende Interleukin-6-, TNF- α - und VEGF-Blutkonzentrationen nicht der jeweiligen körperlichen Situation und dem inflammatorischen Pathomechanismus des Gefäßspenders angepasst. Auch wurde somit bei jedem neuen Versuchsdurchlauf mit frischem Blut ein neues Ausgangsniveau der proinflammatorischen Substanzen geschaffen. Da das Modell des Bioreaktors zulässt, dass bis zu drei Gefäße gleichzeitig reperfundiert werden können, wurden in solchen Fällen alle drei Gefäße mit dem selben Blut und möglicherweise falsch zu hohen/falsch zu niedrigen Ausgangskonzentrationen von Interleukin-6-, TNF- α - und VEGF ausgesetzt, welche nicht den Blutkonzentrationen des jeweiligen Gefäßspenders entsprochen hätten.

Ebenso stellt eine Lagerung des Reperfusionblut von an die 48h bis zur Benutzung im humanen Gefäßmodell eine Variable dar, welche nicht unterschätzt werden sollte: Innerhalb des Lagerungszeitraumes kann es bereits zur systematischen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch Leukozyten in die Blutprobe gekommen sein, was sich entsprechend auf das Ausgangsniveau der Inflammationsmarker und Vergleiche des Inflammationsniveaus zu Versuchsdurchläufen mit kürzerer Lagerungszeit des Blutes auswirkt.

4.4.1. Interleukin-6

Die Konzentrationsbestimmung von Interleukin-6 mittels ELISA liefert in der Kontrollgruppe ohne medikamentösen Blutzusatz einen signifikanten Anstieg von Interleukin-6 zum Zeitpunkt t-4 (nach 120 min Reperfusion) im Vergleich zu den Messungen an den Zeitpunkten t-0, t-1, t-2 sowie t-3 (0-60 min Reperfusionszeit) (vgl. Abb. 17 und 20). Es konnte in einigen anderen Studien bereits belegt werden, dass chemotaktische inflammatorische Signalmoleküle wie Interleukin-6 erst 6h nach dem Reperfusionszeitpunkt durch neutrophile Granulozyten freigesetzt werden und damit ihren Beitrag zum Reperfusionsschaden leisten können.^{50,204} Darüber hinaus wurde von Lefer et al. gezeigt, dass die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Bereich des Ischämie-Reperfusionsschadens nach 3-4,5h nach Reperfusionsbeginn noch nicht wirklich stattgefunden hat.⁵⁹ Im Einklang mit den erhobenen Daten könnte der Zeitpunkt des Signifikanzunterschiedes in der Kontrollgruppe stehen: Eine mögliche längere Reperfusion könnte noch weitere Aufschlüsse darüber geben, ob die IL-6 Konzentration noch weiter angestiegen wäre und die Messungen am Zeitpunkt t-4 noch bei weitem nicht der Peak der sich entwickelnden proinflammatorischen Interleukin-6-Konzentrationen sind. Im Gegensatz zu dem signifikanten Anstieg von IL-6 im unbehandelten Reperfusionsblut lassen sich keine signifikanten Veränderungen im reperfundierenden Blut der Sirolimus- bzw. Everolimus-Versuchsgruppe nachweisen (vergleiche Abb. 18-20). Die IL-6-Konzentrationsspiegel im mit Sirolimus bzw. Everolimus versetzten Blut lagen zu allen Zeitpunkten und allen Messungen jeweils im physiologischen Referenzbereich unter 10pg/ml.²⁰⁵ Grundsätzlich stellt eine Generierung verlässlicher Daten am unteren Rand der Nachweisgrenze jeher eine Schwierigkeit dar. Eine Möglichkeit zur Abschätzung der Höhe und der proinflammatorischen Wirkung des Interleukin-6-Spiegels wäre in weiterführenden Versuchen eine Quotientenbildung mittels der Blutserumkonzentration des antiinflammatorischen Markers Interleukin-10.

Aus den erhobenen vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass Sirolimus und Everolimus einen signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration im Vergleich zum Ausgangsniveau verhindern können und somit geeignet sind, die Expression von Schlüsselmolekülen des Inflammationsprozesses im Hinblick auf arteriosklerotische Gefäßprozesse sowie den Ischämie-Reperfusionsschaden einzudämmen bzw. zu

begrenzen.²⁰⁶ Weitere Untersuchungen längerer Reperfusionseiträume hinsichtlich der Veränderungen in der IL-6-Blutserumkonzentration und der langfristigen Wirksamkeit von Sirolimus bzw. Everolimus werden empfohlen.

4.4.2. TNF- α

Ähnlich wie beim Interleukin-6 (vgl. Kapitel 4.4.1.) konnte in verschiedenen Vorversuchen bereits gezeigt werden, dass der TNF- α -Spiegel nach bis zu 24-28h kalter Ischämiezeit signifikant über das Niveau des physiologischen Blutspiegels ansteigt sowie pathologische Wirkspiegel teilweise erst nach 6h Reperfusion erzielt werden.^{182,204} Eine signifikante Veränderung der TNF- α lässt sich in den durchgeführten Versuchen nur am Zeitpunkt t-4 (120 min Reperfusionzeit) der Versuchsgruppe Sirolimus im Vergleich zu den Zeitpunkten t-0 – t-3 nachweisen. Zu dieser signifikanten Veränderung trug eine einzelne Blutkonzentrationsmessung des TNF- α -Wertes von 38,97 pg/ml (Erstbestimmung) bzw. 39,94 pg/ml (Zweitbestimmung) maßgeblich bei.

Möglicherweise wird im Hinblick auf oben zitierte Studien in dieser durchgeführten Versuchskonzeption der Ischämie- sowie der Reperfusionseitraum zu kurz gehalten, um erhöhte pathologische TNF- α -Wirkspiegel zu generieren, auf die die Versuchsgruppen Sirolimus und Everolimus gezielt wirken und diese supprimieren können. Als Grenzwerte des TNF- α -Spiegels im Blut werden Werte <20pg/ml in der laborchemischen Literatur angegeben.²⁰⁵ Die Blutkonzentrationen von TNF- α liegt nur in drei gemessenen Fällen oberhalb der physiologischen Wertschwelle. Diese Werte wurden einmalig in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt t-1 29,26 pg/ml (Erstbestimmung) bzw. deren Zweibestimmung 28,06 pg/ml sowie zweimalig in der Sirolimus-Gruppe am Zeitpunkt t-4 23,66 pg/ml und 38,97 pg/ml (Erstbestimmung) bzw. 24,20 pg/ml sowie 39,94 pg/ml (Zweibestimmung) gemessen. Der nicht-signifikanter An- bzw. Abfall zwischen den einzelnen Messzeitpunkten in der ELISA-Bestimmung der TNF- α -Konzentrationen im reperfundierenden Blut in der Kontrollgruppe und der Everolimus-Gruppe kann somit möglicherweise auf die zu kurze Ischämiezeit des Versuchs hindeuten und somit eventuell das gesamte Wirkpotential von Sirolimus bzw. Everolimus nicht korrekt widerspiegeln (vgl. Kapitel

3.2.2. sowie Abb. 22-24). Ob der signifikante Anstieg der TNF- α -Konzentration im Blut der Sirolimus-Gruppe als eine fehlende Wirksamkeit von Sirolimus auf die Inhibition des TNF- α -Release verstanden werden darf, erscheint unter Anbetracht der möglichen blutbedingten Störvariablen und Sirolimus-Vorversuche bzw. –Studien zweifelhaft (vgl. Kapitel 4.4.).^{100,207–209}

In der Everolimus-Versuchsgruppe lässt sich im Vergleich der drei Versuchsgruppen der Trend eines konstant niedrigen TNF- α -Blutspiegels erkennen. Deutliche signifikante Anstiege, wie man sie bei proinflammatorischen Prozessen der Arteriosklerose oder dem Ischämie-Reperfusionsschadens erwarten würde, konnten somit nicht bestätigt und durch die Everolimus-Blutzugabe verhindert werden. Weiterführende Versuche dieser Konzipierung mit längeren Ischämie- bzw. Reperusionszeiträumen und möglichen Vergleichen zwischen Ischämie- sowie Reperusionszeiträumen im Hinblick auf das Wirkpotential von Sirolimus bzw. Everolimus werden empfohlen, um genauere Aussagen zum Wirkprofil und -potential von Sirolimus bzw. Everolimus auf den Ischämie-Reperfusionsschaden treffen zu können.

4.4.3. VEGF

Bei der Betrachtung der VEGF-Konzentrationen in den verschiedenen experimentellen Versuchsgruppen fällt auf, dass in der Kontrollgruppe signifikante Unterschiede der VEGF-Spiegel herrschen. In der Kontrollgruppe gibt es einen signifikanten Anstieg der VEGF-Konzentration im Verlauf der Reperusionszeit, beginnend nach 60 Minuten (Anstieg von 56,209 pg/ml \pm 7,953 pg/ml auf 76,473 pg/ml \pm 7,778 pg/ml). Im Vergleich hierzu lässt sich kein signifikanter Anstieg in der Sirolimus- sowie Everolimus-Versuchsgruppe erkennen (vgl. Kapitel 3.2.3.).

In Anbetracht aktueller wissenschaftlicher Literatur weiß man, dass VEGF als proangiogenetischer Wachstumsfaktor Hypoxie-induziert durch den Transkriptionsfaktor HIF- α eine außerordentliche Rolle sowohl am myokardialen als auch anderen organischen Inflammationsprozessen (z.B. der Lunge oder Niere) des IRI spielt. Demzufolge steht eine Unterdrückung der VEGF-Ausschüttung im Fokus als Teil der Therapie des IRI.^{210–213} Vor allem neutrophile Granulozyten, welche einen erheblichen Anteil an der eigenen sowie der chemotaktischen Leukozytendiapedese haben, setzen

durch TNF- α Stimulation (welches im Zuge des IRI ebenfalls vermehrt sezerniert wird) massiv VEGF frei.¹⁷⁷ Ebenso wird VEGF durch glatte Muskelzellen der Tunica media der Gefäße freigesetzt und fördert somit den IRI an der betroffenen Stelle durch Stimulation der Hypoxie-induzierten Angiogenese.¹⁷⁸

Die erhobenen Daten der Versuchsdurchführung und die damit einhergehende signifikante Steigerung der VEGF-Blutserumkonzentration in der Kontrollgruppe lassen somit den Schluss zu, dass VEGF in der Kontrollgruppe im Zuge des Ischämie-Reperfusionsschadens erheblich freigesetzt wurde. Wie sich anhand der Sirolimus- als auch der Everolimus-Datenlage ergibt, können beide Medikamente einen signifikanten Anstieg der VEGF-Konzentration der vom IRI betroffenen Gefäße verhindern.

Die gewonnenen Erkenntnisse passen in das Bild der aktuell publizierten Forschungsliteratur über VEGF: Pallet et al. sowie andere Studien schlagen mTOR-Inhibitoren als neue mögliche Strategie für die Reduktion der Inflammation im Zuge des IRI vor.^{51,214} Auch konnten bereits sowohl Sirolimus-beschichtete Stents ihren Nutzen bei der Revaskularisation von Koronarien nach Myokardinfarkt im Bezug auf die VEGF-Sekretion und Restenosierungsrate, als auch Sirolimus als medikamentöse Behandlung seinen Nutzen in der signifikanter Suppression des VEGF-Spiegels beweisen.²¹⁵⁻²¹⁷ Ebenso verhält es sich in Betrachtung der Studienlage über Everolimus: Meyer et al. sowie weitere Studien konnten postulieren, dass Everolimus sowohl Schlüsselfaktoren des IRI wie VEGF- als auch die IL-6-Konzentrationen signifikant effektiv senken kann.^{206,218}

Insgesamt lässt sich in der Betrachtung des Wirkpotentials von Sirolimus als auch Everolimus im Bezug auf den VEGF-vermittelten IRI eine deutliche Effektivität durch die Konstanzhaltung der VEGF-Spiegel während der Reperfusion im Vergleich zum signifikanten Anstieg in der Kontrollgruppe aufweisen. Die gewonnenen Sirolimus- und Everolimus-Versuchsdaten bestätigen somit die Vermutung der mTOR-Inhibitoren als Target für die Eingrenzung des Ischämie-Reperfusionsschadens.

4.5. Immunhistochemie

4.5.1. CD 11b

Wie in der wissenschaftlichen Literatur und in Kapitel 1 und 2 beschrieben, spielen CD11b-positive Zellen eine große Rolle im Prozess der Transmigration bzw. Leukozytendiapedese sowie in der Stimulation und Aktivierung von Leukozyten im pathogenetischen Mechanismus der Arteriosklerose sowie des Ischämie-Reperfusionsschadens.^{23,24,56,184}

Bereits einige Vorversuche an Gefäßmodellen durch Beiras-Fernandez et al. sowie Arbeiten über den Ischämie-Reperfusionsschaden konnten zeigen, dass andere Immunsuppressiva wie z.B. Tacrolimus oder Anti-Thymozyten-Globulin (ATG) den Ischämie-Reperfusionsschaden sowie die Anzahl CD11b-positiver signifikant reduzieren können.^{52,182} Auch konnte bewiesen werden, dass monoklonale Antikörper gegen den CD11b/CD18-Komplex den Ischämie-Reperfusionsschaden eindämmen.²¹⁹ Demzufolge stellt die Anzahl bzw. Messung von CD11b-positiven Zellen einen guten Marker und Endpunkt für die Qualität bzw. Gute der Wirksamkeit der Versuchsgruppen Sirolimus und Everolimus hinsichtlich des IRI dar.

Hinsichtlich der Länge der Ischämie- bzw. Reperusionszeit wurde in der Diskussion der proinflammatorischen Mediatoren wie Interleukin-6 und TNF- α ein möglicherweise zu kurzer jeweiliger Zeitraum diskutiert. Mit Bezug auf die wissenschaftliche Literatur über CD11b und der hier erhobenen Daten und Ergebnisse lässt sich diese Diskussion mit einer durchgeführten Ischämiezeit von 4-5h nicht auf die hier vorliegende CD11b-Datenlage ausweiten.²²⁰ Wie in Kapitel 3.3.1. sowie Abb. 29-34 ersichtlich wird, wird eine deutliche und signifikante Reduktion von CD11b-positiven Zellen in den Versuchsgruppen Sirolimus sowie Everolimus im Hinblick auf die Expression von CD11b-positiven Zellen in der Kontrollgruppe bereits nach zweistündiger Reperusionszeit erreicht und nachgewiesen.

In der medizinischen Literatur wird vermutet, dass Everolimus in Bezug auf die Zelltransmigration - an der CD11b-positive Zellen nachweislich beteiligt sind - ein höheres Potential habe, die Leukozytendiapedese zu inhibieren als der mTOR-Inhibitor Sirolimus.¹²³ In der Gesamtschau der durchgeführten Versuche und der gewonnenen Daten gibt es in Anbetracht der Wirksamkeit bzw. Wirkpotenzunterschiede zwischen

Sirolimus und Everolimus keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der einer Reduktion von CD11b-positiven Zellen.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass mTOR-Inhibitoren wie sowohl Sirolimus, als auch Everolimus einen wertvollen Beitrag dazu leisten, den Ischämie-Reperfusionsschaden hinsichtlich der Transmigration und Aktivierung von Leukozyten am Endothel einzugrenzen. Durch eine signifikante Suppression des essentiellen Leukozytendiapedese-Adhäsionsmoleküls CD11b im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe lassen sich die erhobenen Ergebnisse gut in den Kontext des aktuellen wissenschaftlich publizierten Wissens über mTOR-Inhibitoren und des Ischämie-Reperfusionsschadens am Herzens bzw. an Kardiomyozyten sowie an humanen Gefäßen einspeisen.^{101,221,222}

4.5.2. CD31

Ebenso wie das Adhäsionsmolekül CD11b bzw. der Integriinkomplex CD11b/CD18 nimmt das Adhäsionsmolekül CD31 eine herausragende und essentielle Schlüsselrolle im komplexen Vorgang der Leukozytentransmigration der Arteriosklerose sowie des IRI ein (vgl. auch Abb.5).^{22,25,58,189,192} Auch wurde bereits in vorherigen Versuchen bewiesen, dass monoklonale Antikörper gegen CD31 die Leukozytentransmigration bzw. –diapedese erheblich reduzieren können, da sowohl eine Annäherung sowie das s.g. Rolling als auch eine Zell-Zell-Bindungsverstärkung über auf der Membran der Leukozyten exprimierter Integrine mit dem Gefäßendothel CD31 benötigen.^{189,190}

Auch ist CD31 ähnlich wie CD11b ein klassischer Quantifizierungsmarker des Ischämie-Reperfusionsschadens. So wurde in wissenschaftlichen Arbeiten neben CD11b auch CD31 (PECAM) zur Detektion bzw. Potenzmessung und Güte einzelner Medikamente in Bezug auf den IRI herangezogen. Hierbei konnte zuweilen von Beiras-Fernandez et al. gezeigt werden, dass immunsuppressive Medikamente wie ATG die Anzahl CD31-positiver Zellen bzw. Gefäße im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe signifikant senken kann.¹⁸² Auch wurde CD31 bereits in einem nicht-humanen Gefäßmodell zur Quantifizierung des IRI von Beiras-Fernandez et al. herangezogen.¹⁴³

Obwohl Ferrero et al. belegten, dass CD31 eng mit der Wirkung und Konzentration von TNF- α im Blut zusammenhängt, spielen die in den Versuchen eher niedrig gemessenen TNF- α -Blutserumspiegel keine größere Rolle im Hinblick auf eine signifikante Reduktionen der CD31 Expression.¹⁸⁸ Somit lässt sich die bereits im vorherigen Kapitel diskutierte Thematik des Ischämie- sowie des Reperfusionzeitraums ebenso wenig auf die Datenlage einer möglichen noch nicht vollständigen CD31-Expression übertragen. Hinsichtlich anderer durchgeführter Versuche konnten Studien bereits verdeutlichen, dass sowohl durch Sirolimus-beschichtete Stents als auch durch Everolimus-beschichteten Stents die Anzahl CD31-positiver Zellen im reperfundiertem Areal gesenkt werden kann.^{223,224}

Ebenso wie in den Untersuchungen zu CD11b-positiven Zellen, konnte Sirolimus als auch Everolimus in den Versuchen am humanen Gefäßmodell eine signifikante Reduktion der am Ischämie-Reperfusionsschaden beteiligten CD31-positiven Zellen/Gefäßen im Vergleich zur CD31 Expression in der nicht-behandelten Kontrollgruppe herbeiführen (vgl. Kapitel 3.3.2. sowie Abb. 35-41). Auch lässt sich hier die von Jin et al. aufgestellte Hypothese, dass Everolimus ein höheres Potential in der Inhibierung der endothelialen Zellmigration von Leukozyten besitzt nicht bestätigen. Absolut liegt die gemessenen Anzahlen CD31-positiver Gefäße in der Versuchsgruppe Sirolimus zwar über der der Versuchsgruppe Everolimus, allerdings ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

Zusammenfassend lassen sich sowohl Sirolimus als auch Everolimus als hochpotente Medikamente zur Reduktion der CD31-Expression im humanen Gefäßmodell bezeichnen. Bereits nach der bisweilen kritisch zu diskutierenden Reperfusionzeit von 2h lassen sich signifikante Ergebnisse und Suppressionen vorweisen. Demzufolge trägt Sirolimus wie auch Everolimus dazu bei, dass die während des IRI sowie in der Pathogenese der Arteriosklerose hochexprimierten CD31-Adhäsionsmoleküle signifikant gesenkt werden und somit den durch Leukozytentransmigration ausgelösten Ischämie-Reperfusionsschaden im Vergleich zu unbehandelten Gefäßen zu verringern. Die erhobenen Daten der Versuche und die abgeleiteten Hypothesen gehen somit Hand in Hand mit dem aktuellen status quo der wissenschaftlichen Literatur bezüglich der Wirksamkeit von Sirolimus sowie Everolimus auf den Ischämie-Reperfusionsschaden an humanen Gefäßzellen sowie Kardiomyozten.^{101,221,222}

4.6. Schlussfolgerung

Insgesamt lassen sich im Bezug auf die Messgrößen und Variablen des Bioreaktors und des humanen Gefäßmodells für weiterführende Versuche Verbesserungsvorschläge und Anregungen anbringen: Um der Problematik der Okklusion durch die Rollerpumpe Herr zu werden, wäre der Einbau einer Zentrifugalpumpe als Antriebssystem möglich. Ebenso wäre es denkbar, den Blutdruck maschinell zu messen und zu erfassen, um das Bioreaktorsystem noch feiner den physiologischen humanen Gegebenheiten entweder in arteriellen oder venösen Gefäßen anzupassen zu können.

Für qualitative Aussagen über den Ischämie-Reperfusionsschaden würde neben den in diesem Versuch detektierten Markern eine Quantifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies Sinn ergeben, wie es in einigen Vorversuchen über die Leukozytentransmigration unter anderem von Werner et al. durchgeführt worden ist.²²⁵ Auch würde eine Konzentrationsbestimmung vom anti-inflammatorischen Interleukin-10, welches seinen Effekt unter anderem über Hemmung des NF- κ B-Signalweges und der Suppression der TNF- α -Synthese ausübt, im Bezug auf die Fragestellung wertvoll sein.^{226–228}

Die aus den hier vorliegenden Daten geschlossenen Erkenntnisse belegen, dass der sowohl in der Pathogenese des Inflammationsprozesses der Arteriosklerose und des Ischämie-Reperfusionsschadens am Herzen und anderer Organe hochexprimierten Mediator Interleukin-6 durch eine Blutzugabe von Sirolimus und Everolimus im Vergleich zum Ausgangsniveau relativ konstant gehalten bzw. sogar gesenkt werden kann. In Betrachtung der Inflammations- und IRI-Marker TNF- α sowie VEGF schafft Everolimus auch hier, das Konzentrationsniveau zu stabilisieren, wohingegen Sirolimus dies nur bei VEGF nachweisen kann.

Beim Vergleich der Wirkspektren und der Effektivität lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden mTOR-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus erheben.

Zusammenfassend lässt sich in der Gesamtschau der durchgeführten Versuche und gewonnenen Datenmenge schlussfolgern, dass die Medikamente Sirolimus- bzw. Everolimus ihren größten Nutzen im Hinblick auf den generierten Ischämie-Reperfusionsschaden nach zum Beispiel Herztransplantationen oder Myokardinfarkten im humanen Gefäßmodell vor allem auf die signifikante Suppression von Integrinen und Adhäsionsmolekülen wie CD11b und CD31 im Prozess der

Leukozytentransmigration haben und somit im Einklang der bisherigen wissenschaftlichen Kontextes und Literatur über Sirolimus sowie Everolimus stehen.

5. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

https://viamedici.thieme.de/api/images/l/e/r/i/e/n/ana_007700_herz_koronararterien.png

Abbildung 2:

https://viamedici.thieme.de/api/images/l/c/h/e/m/a/histo_004800_arterie_wand_schema.png

Abbildung 3:

<http://www.medix.ch/files/khk1.jpg>

Abbildung 4:

<http://www.leitlinien.de/mdb/downloads/nvl/khk/khk-4aufl-vers1-kurz.pdf>

Abbildung 5:

Kaminski et al. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *International Journal of Cardiology*. 2002

Abbildung 6:

http://www.transplantation.de/uploads/media/02_Schmaderer.pdf

Abbildung 7:

<http://patentimages.storage.googleapis.com/DE102011100122A1/00110001.png>

Streit F., Christians U., Schiebel HM et al. Structural identification of three metabolites and a degradation product of the macrolide immunosuppressant sirolimus (rapamycin) by electrospray-MS/MS after incubation with human liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*. 1996;24 (11) 1272-1278.

Abbildung 8:

Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc*. 2003;35(3 Suppl):7S–14S.

Quelle Abbildung 8 Abbildungsbeschreibung:

Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J*. 1999;13(8):773-780.

Lundberg AS, Weinberg RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol*. 1998;18(2):753-761.

Abbildung 9:

<http://www.medpharm-text.de/Formeln/Everolimus.gif>

Abbildung 10, 12 und 13:

Herrmann M.: Entwicklung eines neuartigen Perfusionssystems zur Forschung an humanen Organen. Bachelorarbeit zum Erlangen des Grades Bachelor of Engineering. 2014

Abbildung 11:

Eigenaufnahme

Abbildung 14-29 + 35:

Erstellt mit GraphPad Prism7

6. Literaturverzeichnis

1. Schiebler T, Korf H. *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*. 10., vollst. überarb. Aufl. Darmstadt: Steinkopff; 2007.
2. Kurtz A, Pape H-C, Silbernagl S, eds. *Physiologie*. 6., vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010.
3. Lüllmann-Rauch R. *Lehrbuch Histologie*. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009.
4. Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland - 2014. 2016;(Fachserie 12 Reihe 4).
5. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Elsevier; 2016. Elsevier.
6. Ross R. Atherosclerosis: the role of endothelial injury, smooth muscle proliferation and platelet factors. *Triangle*. 1976;15(2-3):45-51.
7. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low-density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation*. 1987;76(3):504-507.
8. Gerrity R. The role of the monocyte in atherogenesis. *Am J Pathol*. 1981;103(2):181-190.
9. Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*. 1981;103(2):191-200.
10. Shirai T, Hilhorst M, Harrison DG, Goronzy JJ, Weyand CM. Macrophages in vascular inflammation--From atherosclerosis to vasculitis. *Autoimmunity*. 2015;48(3):139-151. doi:10.3109/08916934.2015.1027815.
11. Goldstein JL, Anderson RG, Buja LM, Basu SK, Brown MS. Overloading human aortic smooth muscle cells with low density lipoprotein-cholesteryl esters reproduces features of atherosclerosis in vitro. *J Clin Invest*. 1977;59(6):1196-1202. doi:10.1172/JCI108744.
12. International Arteriosclerosis Society. An International Atherosclerosis Society Position Paper: Global Recommendations for the Management of Dyslipidemia. 2013.
13. Lloyd-Jones D, Leip E. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. 2006;(6). doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.548206.
14. Brasier A. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. 2010;86(2):211-218. doi:10.1093/cvr/cvq076.
15. Libermann T, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol*. 1990;10(5):2327-2334.
16. Jones S. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005;175(6):3463-3468.
17. Ikeda, U., Ikeda, M., Seino, Y. et al. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of genetically hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*. 1992;92(2-3):213-218.

18. Khan, BV., Parthasarathy, SS., Alexander, RW. et al. Modified low density lipoprotein and its constituents augment cytokine-activated vascular cell adhesion molecule-1 gene expression in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest.* 1995;95(3):1262-1270. doi:10.1172/JCI117776.
19. Passacuale G, Di Giosia P, Ferro A. The role of inflammatory biomarkers in developing targeted cardiovascular therapies: lessons from the cardiovascular inflammation reduction trials. *Cardiovasc Res.* 2016;109(1):9-23. doi:10.1093/cvr/cvv227.
20. Hattori R, Hamilton, K. K. et al. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem.* 1989;264(14):7768-7771.
21. Fang F, Zhang Wea. PECAM-1 and E-selectin expression in vulnerable plaque and their relationships to myocardial Leu125Val polymorphism of PECAM-1 and Ser128Arg polymorphism of E-selectin in patients with acute coronary syndrome. 2011;39(12).
22. Berman ME, Xie Y, Muller WA. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol.* 1996;156(4):1515-1524.
23. Akyurek ML, Funa K, Wanders Aea. Expression of CD11b and ICAM-1 in an in vivo model of transplant arteriosclerosis. *Transpl Immunol.* 1995;3(2):107-113.
24. Solovjov D, Pluskota E, Plow EF. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem.* 2005;280(2):1336-1345. doi:10.1074/jbc.M406968200.
25. Muller WA. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol.* 1995;57(4):523-528.
26. Harlan JM. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood.* 1985;65(3):513-525.
27. Luscinskas FW, Ma S, Nusrat A, Parkos CA, Shaw SK. Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. *Semin Immunol.* 2002;14(2):105-113. doi:10.1006/smim.2001.0347.
28. Korpos E, Wu C, Song J, Hallmann Rea. Role of the extracellular matrix in lymphocyte migration. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):47-57. doi:10.1007/s00441-009-0853-3.
29. Ludvig J, Miner B, Eisenberg MJ. Smoking cessation in patients with coronary artery disease. *Am Heart J.* 2005;149(4):565-572. doi:10.1016/j.ahj.2004.09.040.
30. Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA.* 1986;256(20):2823-2828.
31. Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *Am Heart J.* 1988;116(6 Pt 2):1713-1724.

32. Assmann G, Schulte H, Cullen, P., et al. Assessing risk of myocardial infarction and stroke: new data from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Eur J Clin Invest.* 2007;37(12):925-932. doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01888.x.
33. Kamstrup, PR., Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard B. Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(5):470-477. doi:10.1016/j.jacc.2013.09.038.
34. Moller, P, Christophersen, DV., Jacobsen, NR. et al. Atherosclerosis and vasomotor dysfunction in arteries of animals after exposure to combustion-derived particulate matter or nanomaterials: a. *Crit Rev Toxicol.* 2016;46(5):437-476. doi:10.3109/10408444.2016.1149451.
35. Ernst E. Fibrinogen: its emerging role as a cardiovascular risk factor. *Angiology.* 1994;45(2):87-93.
36. Adibfar, A., Saleem, M., Lanctot, K. L. et al. Potential Biomarkers for Depression Associated with Coronary Artery Disease: A Critical Review. *Curr Mol Med.* 2016;16(2):137-164.
37. Deutsche Herzstiftung, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufrorschung, Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie, Pädiatrische Kardiologie. Deutscher Herzbericht 2014.
38. Schuler G, Hambrecht R, Schlierf G, et al. Regular physical exercise and low-fat diet. Effects on progression of coronary artery disease. *Circulation.* 1992;86(1):1-11.
39. Riede U, Werner M, Freudenberg Nea. *Basiswissen Allgemeine und Spezielle Pathologie.* Heidelberg: Springer-Medizin-Verl; 2009. Springer-Lehrbuch. <http://dnb.info/997035757/34>.
40. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin, Deutsche Gesellschaft für Kardiologie- Herz- und Kreislaufrorschung e. V. et al. *Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK, 4. Auflage:* Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF); 2016.
41. Hamm C, Bassand J, Agewall Sea. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2011;32(23):2999-3054. doi:10.1093/eurheartj/ehr236.
42. Serruys PW, Jaegere P de, Kiemeneij F, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med.* 1994;331(8):489-495. doi:10.1056/NEJM199408253310801.
43. Gallo R, Padurean A, Jayaraman Tea. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation.* 1999;99(16):2164-2170.

44. Stone G, Rizvi A, Newman Wea. Everolimus-eluting versus paclitaxel-eluting stents in coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2010;362(18):1663-1674. doi:10.1056/NEJMoa0910496.
45. Meng M, Gao B, Wang X, Bai Z-g, Sa R-N, Ge B. Long-term clinical outcomes of everolimus-eluting stent versus paclitaxel-eluting stent in patients undergoing percutaneous coronary interventions: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*. 2016;16:34. doi:10.1186/s12872-016-0206-6.
46. Windecker S, Kolh P, Alfonso Fea. 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J*. 2014;35(37):2541-2619. doi:10.1093/eurheartj/ehu278.
47. Alexander JH, Smith PK. Coronary-Artery Bypass Grafting. *N Engl J Med*. 2016;374(20):1954-1964. doi:10.1056/NEJMra1406944.
48. D'Ignazio L, Rocha S. Hypoxia Induced NF-kappaB. *Cells*. 2016;5(1). doi:10.3390/cells5010010.
49. Yan SF, Ogawa S, Stern DM, Pinsky DJ. Hypoxia-induced modulation of endothelial cell properties: regulation of barrier function and expression of interleukin-6. *Kidney Int*. 1997;51(2):419-425.
50. Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, et al. Relationship of the proinflammatory cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1994;108(4):626-635.
51. Pallet N, Thervet E, Timsit M-O. Angiogenic response following renal ischemia reperfusion injury: new players. *Prog Urol*. 2014;24 Suppl 1:S20-5. doi:10.1016/S1166-7087(14)70059-4.
52. St Peter SD, Moss AA, Mulligan DC. Effects of tacrolimus on ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl*. 2003;9(2):105-116. doi:10.1053/jlts.2003.50020.
53. van Waarde A, Avison MJ, Thulin Gea. Role of nucleoside uptake in renal postischemic ATP synthesis. *Am J Physiol*. 1992;262(6 Pt 2):F1092-9.
54. Roebuck KA. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-kappaB (Review). *Int J Mol Med*. 1999;4(3):223-230.
55. Lefer AM. Role of selectins in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*. 1995;60(3):773-777. doi:10.1016/0003-4975(95)00424-J.
56. Massberg S, Messmer K. The nature of ischemia/reperfusion injury. *Transplant Proc*. 1998;30(8):4217-4223.
57. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336(15):1066-1071. doi:10.1056/NEJM199704103361506.
58. Farooq MM, Serra A, Newman PJ, et al. PECAM-1/IgG attenuates peroxynitrite-mediated extremity reperfusion injury. *J Vasc Surg*. 2001;34(3):555-558. doi:10.1067/mva.2001.115813.
59. Lefer AM, Tsao PS, Lefer DJ, Ma XL. Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J*. 1991;5(7):2029-2034.

60. Lucchesi BR, Werns SW, Fantone JC. The role of the neutrophil and free radicals in ischemic myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21(12):1241-1251.
61. Hansen PR. Role of neutrophils in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1995;91(6):1872-1885.
62. Varani J, Fligiel SE, Till GO, Kunkel RG, Ryan US, Ward PA. Pulmonary endothelial cell killing by human neutrophils. Possible involvement of hydroxyl radical. *Lab Invest.* 1985;53(6):656-663.
63. Paterson IS, Klausner JM, Goldman G, et al. Thromboxane mediates the ischemia-induced neutrophil oxidative burst. *Surgery.* 1989;106(2):224-229.
64. Bagheri F, Khorv V, Alizadeh Aea. Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: Mechanisms and therapies. *Life Sci.* 2016;165:43-55. doi:10.1016/j.lfs.2016.09.013.
65. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357(11):1121-1135. doi:10.1056/NEJMra071667.
66. Holmes ME, Mwanjewe J, Samson SE, et al. Dehydroascorbic acid uptake by coronary artery smooth muscle: effect of intracellular acidification. *Biochem J.* 2002;362(Pt 2):507-512.
67. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, et al. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS.* 1996;76:99-114.
68. Lichtlen PR, Herrmann G. Indications for heart transplantation in end-stage coronary artery disease. *Adv Cardiol.* 1988;36:228-245.
69. Mohacsi P, Carrel T. Herztransplantation--Indikation, Vorgehen, Chancen und Probleme. *Ther Umsch.* 2005;62(7):473-476. doi:10.1024/0040-5930.62.7.473.
70. Hollenberg SM, Klein LW, Parrillo JE, et al. Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death. *Circulation.* 2001;104(25):3091-3096.
71. Ardehali A, Laks H, Drinkwater DC, Ziv E, Drake TA. Vascular cell adhesion molecule-1 is induced on vascular endothelia and medial smooth muscle cells in experimental cardiac allograft vasculopathy. *Circulation.* 1995;92(3):450-456.
72. Day JD, Rayburn BK, Gaudin PB, et al. Cardiac allograft vasculopathy: the central pathogenetic role of ischemia-induced endothelial cell injury. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14(6 Pt 2):S142-9.
73. Schneeberger H, Schleichner S, Illner WD, Messmer K, Land W. The impact of free radical-mediated reperfusion injury on acute and chronic rejection events following cadaveric renal transplantation. *Clin Transpl.* 1993:219-232.
74. Billingham ME. Cardiac transplant atherosclerosis. *Transplant Proc.* 1987;19(4 Suppl 5):19-25.
75. Aranda JM, JR, Hill J. Cardiac transplant vasculopathy. *Chest.* 2000;118(6):1792-1800.
76. Billingham ME. Histopathology of graft coronary disease. *J Heart Lung Transplant.* 1992;11(3 Pt 2):S38-44.
77. Neish AS, Loh E, Schoen FJ. Myocardial changes in cardiac transplant-associated coronary arteriosclerosis: potential for timely diagnosis. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19(3):586-592.

78. Libby P, Swanson SJ, Tanaka H, Murray A, Schoen FJ, Pober JS. Immunopathology of coronary arteriosclerosis in transplanted hearts. *J Heart Lung Transplant.* 1992;11(3 Pt 2):S5-6.
79. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-second Official Adult Heart Transplantation Report--2015; Focus Theme: Early Graft Failure. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34(10):1244-1254. doi:10.1016/j.healun.2015.08.003.
80. Eisen HJ, Tuzcu EM, Dorent R, et al. Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients. *N Engl J Med.* 2003;349(9):847-858. doi:10.1056/NEJMoa022171.
81. Costanzo MR, Dipchand A, Starling R, et al. The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2010;29(8):914-956. doi:10.1016/j.healun.2010.05.034.
82. Nashan B, Moore R, Amlot P, Schmidt AG, Abeywickrama K, Souillou JP. Randomised trial of basiliximab versus placebo for control of acute cellular rejection in renal allograft recipients. CHIB 201 International Study Group. *Lancet.* 1997;350(9086):1193-1198.
83. Keogh A, Richardson M, Ruygrok P, et al. Sirolimus in de novo heart transplant recipients reduces acute rejection and prevents coronary artery disease at 2 years: a randomized clinical trial. *Circulation.* 2004;110(17):2694-2700. doi:10.1161/01.CIR.0000136812.90177.94.
84. European Medicines Agency. European Public Assessment Report (EPAR) for Rapamune.
85. Vezina C, Kudelski A, Sehgal SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo).* 1975;28(10):721-726.
86. Sciarretta S, Volpe M, Sadoshima J. Mammalian target of rapamycin signaling in cardiac physiology and disease. *Circ Res.* 2014;114(3):549-564. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302022.
87. Wang Z, Yu J, Wu J, et al. Scutellarin protects cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury by reducing apoptosis and oxidative stress. *Life Sci.* 2016;157:200-207. doi:10.1016/j.lfs.2016.01.018.
88. Sehgal SN. Rapamune (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin Biochem.* 1998;31(5):335-340.
89. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, et al. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature.* 1994;369(6483):756-758. doi:10.1038/369756a0.
90. Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(10):4441-4445.
91. Guertin DA, Sabatini DM. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal.* 2009;2(67):pe24. doi:10.1126/scisignal.267pe24.

92. Javier AF, Bata-Csorgo Z, Ellis CN, Kang S, Voorhees JJ, Cooper KD. Rapamycin (sirolimus) inhibits proliferating cell nuclear antigen expression and blocks cell cycle in the G1 phase in human keratinocyte stem cells. *J Clin Invest*. 1997;99(9):2094-2099. doi:10.1172/JCI119382.
93. Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J*. 1996;15(3):658-664.
94. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR. Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1995;76(3):412-417.
95. Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF, Flanagan WM, Blenis J, Crabtree GR. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature*. 1992;358(6381):70-73. doi:10.1038/358070a0.
96. Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, et al. Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature*. 1994;372(6506):570-573. doi:10.1038/372570a0.
97. Terada N, Lucas JJ, Szepesi A, Franklin RA, Domenico J, Gelfand EW. Rapamycin blocks cell cycle progression of activated T cells prior to events characteristic of the middle to late G1 phase of the cycle. *J Cell Physiol*. 1993;154(1):7-15. doi:10.1002/jcp.1041540103.
98. Dumont FJ, Staruch MJ, Koprak SL, Melino MR, Sigal NH. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol*. 1990;144(1):251-258.
99. Aagaard-Tillery KM, Jelinek DF. Inhibition of human B lymphocyte cell cycle progression and differentiation by rapamycin. *Cell Immunol*. 1994;156(2):493-507. doi:10.1006/cimm.1994.1193.
100. Dhingra R, Gang H, Wang Y, et al. Bidirectional regulation of nuclear factor-kappaB and mammalian target of rapamycin signaling functionally links Bnip3 gene repression and cell survival of ventricular myocytes. *Circ Heart Fail*. 2013;6(2):335-343. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000061.
101. Kezic A, Becker JU, Thaiss F. The effect of mTOR-inhibition on NF-kappaB activity in kidney ischemia-reperfusion injury in mice. *Transplant Proc*. 2013;45(5):1708-1714. doi:10.1016/j.transproceed.2013.02.110.
102. Ikonen TS, Gummert JF, Hayase M, et al. Sirolimus (rapamycin) halts and reverses progression of allograft vascular disease in non-human primates. *Transplantation*. 2000;70(6):969-975.
103. Augustine JJ, Bodziak KA, Hricik DE. Use of sirolimus in solid organ transplantation. *Drugs*. 2007;67(3):369-391.
104. Di R, Wu X, Chang Z, et al. S6K inhibition renders cardiac protection against myocardial infarction through PDK1 phosphorylation of Akt. *Biochem J*. 2012;441(1):199-207. doi:10.1042/BJ20110033.
105. Das A, Salloum FN, Durrant D, Ockaili R, Kukreja RC. Rapamycin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through JAK2-STAT3 signaling

- pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(6):858-869.
doi:10.1016/j.yjmcc.2012.09.007.
106. Yokota N, Daniels F, Crosson J, Rabb H. Protective effect of T cell depletion in murine renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation.* 2002;74(6):759-763.
doi:10.1097/01.TP.0000020413.44576.65.
 107. Morice M-C, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002;346(23):1773-1780. doi:10.1056/NEJMoa012843.
 108. Trinh XB, Tjalma WAA, Vermeulen PB, et al. The VEGF pathway and the AKT/mTOR/p70S6K1 signalling pathway in human epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer.* 2009;100(6):971-978. doi:10.1038/sj.bjc.6604921.
 109. Fujii T, Yajima R, Tatsuki H, Oosone K, Kuwano H. Anticancer effect of rapamycin on MCF-7 via downregulation of VEGF expression. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2016;52(1):45-48. doi:10.1007/s11626-015-9944-5.
 110. Andorfer P, Heuwieser A, Heinzl A, Lukas A, Mayer B, Perco P. Vascular endothelial growth factor A as predictive marker for mTOR inhibition in relapsing high-grade serous ovarian cancer. *BMC Syst Biol.* 2016;10:33. doi:10.1186/s12918-016-0278-z.
 111. Sedrani R, Cottens S, Kallen J, Schuler W. Chemical modification of rapamycin: the discovery of SDZ RAD. *Transplant Proc.* 1998;30(5):2192-2194.
 112. Kuhn B, Jacobsen W, Christians U, Benet LZ, Kollman PA. Metabolism of sirolimus and its derivative everolimus by cytochrome P450 3A4: insights from docking, molecular dynamics, and quantum chemical calculations. *J Med Chem.* 2001;44(12):2027-2034.
 113. Sigma-Aldrich. Everolimus. In: *Meyler's Side Effects of Drugs*: Elsevier; 2016:213.
 114. Novartis Pharma. Fachinformation Everolimus. 2016.
 115. Neuhaus P, Klupp J, Langrehr JM. mTOR inhibitors: an overview. *Liver Transpl.* 2001;7(6):473-484. doi:10.1053/jlts.2001.24645.
 116. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2715-2729. doi:10.1056/NEJMra033540.
 117. Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(2):83-95. doi:10.2165/00003088-200443020-00002.
 118. Kirchner GI, Winkler M, Mueller L, et al. Pharmacokinetics of SDZ RAD and cyclosporin including their metabolites in seven kidney graft patients after the first dose of SDZ RAD. *Br J Clin Pharmacol.* 2000;50(5):449-454.
 119. Klawitter J, Nashan B, Christians U. Everolimus and sirolimus in transplantation-related but different. *Expert Opin Drug Saf.* 2015;14(7):1055-1070. doi:10.1517/14740338.2015.1040388.
 120. Haubitz M, Brunkhorst R. Influence of a novel rapamycin analogon SDZ RAD on endothelial tissue factor and adhesion molecule expression. *Transplant Proc.* 2002;34(4):1124-1126.

121. Christians U, Gottschalk S, Miljus J, et al. Alterations in glucose metabolism by cyclosporine in rat brain slices link to oxidative stress: interactions with mTOR inhibitors. *Br J Pharmacol*. 2004;143(3):388-396. doi:10.1038/sj.bjp.0705939.
122. Brunner E, Lehle K, Hirt SW, Schmid C, Suesskind-Schwendi M von. Everolimus's influence on persistent acute rejection after experimental lung transplantation. *Adv Clin Exp Med*. 2013;22(3):355-359.
123. Jin Y-P, Valenzuela NM, Ziegler ME, Rozengurt E, Reed EF. Everolimus inhibits anti-HLA I antibody-mediated endothelial cell signaling, migration and proliferation more potently than sirolimus. *Am J Transplant*. 2014;14(4):806-819. doi:10.1111/ajt.12669.
124. Vitiello D, Neagoe P-E, Sirois MG, White M. Effect of everolimus on the immunomodulation of the human neutrophil inflammatory response and activation. *Cell Mol Immunol*. 2015;12(1):40-52. doi:10.1038/cmi.2014.24.
125. Mielke S, Lutz M, Schmidhuber J, et al. Salvage therapy with everolimus reduces the severity of treatment-refractory chronic GVHD without impairing disease control: a dual center retrospective analysis. *Bone Marrow Transplant*. 2014;49(11):1412-1418. doi:10.1038/bmt.2014.170.
126. Vigano M, Tuzcu M, Benza R, et al. Prevention of acute rejection and allograft vasculopathy by everolimus in cardiac transplants recipients: a 24-month analysis. *J Heart Lung Transplant*. 2007;26(6):584-592. doi:10.1016/j.healun.2007.03.005.
127. Lehmkuhl HB, Arizon J, Vigano M, et al. Everolimus with reduced cyclosporine versus MMF with standard cyclosporine in de novo heart transplant recipients. *Transplantation*. 2009;88(1):115-122. doi:10.1097/TP.0b013e3181aacd22.
128. Davies DR, Bittmann I, Pardo J. Histopathology of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity. *Transplantation*. 2000;69(12 Suppl):SS11-3.
129. Ojo AO, Held PJ, Port FK, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med*. 2003;349(10):931-940. doi:10.1056/NEJMoa021744.
130. Potena L, Bianchi IG, Magnani G, et al. Cyclosporine lowering with everolimus or mycophenolate to preserve renal function in heart recipients: a randomized study. *Transplantation*. 2010;89(2):263-265. doi:10.1097/TP.0b013e3181c42b95.
131. Paoletti E, Marsano L, Bellino D, Cassottana P, Cannella G. Effect of everolimus on left ventricular hypertrophy of de novo kidney transplant recipients: a 1 year, randomized, controlled trial. *Transplantation*. 2012;93(5):503-508. doi:10.1097/TP.0b013e318242be28.
132. Fischer L, Klempnauer J, Beckebaum S, et al. A randomized, controlled study to assess the conversion from calcineurin-inhibitors to everolimus after liver transplantation--PROTECT. *Am J Transplant*. 2012;12(7):1855-1865. doi:10.1111/j.1600-6143.2012.04049.x.
133. Konicek BW, Dumstorf CA, Graff JR. Targeting the eIF4F translation initiation complex for cancer therapy. *Cell Cycle*. 2008;7(16):2466-2471. doi:10.4161/cc.7.16.6464.
134. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet*. 2008;372(9637):449-456. doi:10.1016/S0140-6736(08)61039-9.

135. Kulke MH, Bendell J, Kvols L, Picus J, Pommier R, Yao J. Evolving diagnostic and treatment strategies for pancreatic neuroendocrine tumors. *J Hematol Oncol.* 2011;4:29. doi:10.1186/1756-8722-4-29.
136. Turner SG, Peters KB, Vredenburg JJ, Desjardins A, Friedman HS, Reardon DA. Everolimus tablets for patients with subependymal giant cell astrocytoma. *Expert Opin Pharmacother.* 2011;12(14):2265-2269. doi:10.1517/14656566.2011.601742.
137. Giles FJ, Albitar M. Mammalian target of rapamycin as a therapeutic target in leukemia. *Curr Mol Med.* 2005;5(7):653-661.
138. Mukete BN, van der Heijden LC, Tandjung K, et al. Safety and efficacy of everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds versus durable polymer everolimus-eluting metallic stents assessed at 1-year follow-up: A systematic review and meta-analysis of studies. *Int J Cardiol.* 2016;221:1087-1094. doi:10.1016/j.ijcard.2016.07.101.
139. Park KW, Lim W-H, Ahn H-S, et al. Everolimus- versus sirolimus-eluting stents for the treatment of unprotected left main coronary artery stenosis (results from the EXCELLENT registry). *Int J Cardiol.* 2013;168(3):2738-2744. doi:10.1016/j.ijcard.2013.03.086.
140. Herrmann M. Entwicklung eines neuartigen Perfusionssystems zur Forschung an humanen Organen: Bachelorarbeit zum Erlangen des Grades Bachelor of Engineering. 2014.
141. Schulte J, Friedrich A, Hollweck T, et al. A Novel Seeding and Conditioning Bioreactor for Vascular Tissue Engineering. *Processes.* 2014;2(3):526-547. doi:10.3390/pr2030526.
142. Thein E, Sevilmis G, Muenzing S, Hammer C, Messmer K. Evaluation of a system for the perfusion of isolated, rodent organs. *Xenotransplantation.* 2001;8(2):94-99.
143. Beiras-Fernandez A, Chappell D, Hammer C, Thein E. Influence of polyclonal anti-thymocyte globulins upon ischemia-reperfusion injury in a non-human primate model. *Transpl Immunol.* 2006;15(4):273-279. doi:10.1016/j.trim.2006.02.003.
144. Horisberger J, Jegger D, Boone Y, et al. Impact of a remote pump head on neonatal priming volumes. *Perfusion.* 1999;14(5):351-356.
145. Phillips SJ, Thornton K, Barker L, Zeff RH, Balentine B. A disposable heart-lung machine. Results of animal testing. *ASAIO J.* 1993;39(3):M204-7.
146. Davis RF, Gravlee GP, Utley JR. *Cardiopulmonary bypass, principle and practice: Anticoagulation for cardiopulmonary bypass.* 3rd ed. Philadelphia, London: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
147. Gurdan MA. *Etablierung und Validierung eines neuartigen Modells der Kleintier-Herz-Lungenmaschine mit kardioplegischem Herzstillstand an der Ratte;* 2010.
148. Kaczmarek I, Zaruba M-M, Beiras-Fernandez A, et al. Tacrolimus with mycophenolate mofetil or sirolimus compared with calcineurin inhibitor-free immunosuppression (sirolimus/mycophenolate mofetil) after heart transplantation:

- 5-year results. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32(3):277-284.
doi:10.1016/j.healun.2012.11.028.
149. Shipkova M, Hesselink DA, Holt DW, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Everolimus: A Consensus Report. *Ther Drug Monit*. 2016;38(2):143-169.
doi:10.1097/FTD.0000000000000260.
 150. Watanabe T, Seguchi O, Nishimura K, et al. Suppressive effects of conversion from mycophenolate mofetil to everolimus for the development of cardiac allograft vasculopathy in maintenance of heart transplant recipients. *Int J Cardiol*. 2016;203:307-314. doi:10.1016/j.ijcard.2015.10.082.
 151. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871-874.
 152. van Weemen BK, Schuurs AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*. 1971;15(3):232-236.
 153. Hemmila I. Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. *Clin Chem*. 1985;31(3):359-370.
 154. Veitch NC. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*. 2004;65(3):249-259.
 155. Wolvekamp MC, Marquet RL. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett*. 1990;24(1):1-9.
 156. Sharma HS, Das DK. Role of cytokines in myocardial ischemia and reperfusion. *Mediators Inflamm*. 1997;6(3):175-183. doi:10.1080/09629359791668.
 157. Sawa Y, Ichikawa H, Kagisaki K, Ohata T, Matsuda H. Interleukin-6 derived from hypoxic myocytes promotes neutrophil-mediated reperfusion injury in myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;116(3):511-517. doi:10.1016/S0022-5223(98)70018-2.
 158. Jirik FR, Podor TJ, Hirano T, et al. Bacterial lipopolysaccharide and inflammatory mediators augment IL-6 secretion by human endothelial cells. *J Immunol*. 1989;142(1):144-147.
 159. Geiger T, Andus T, Klapproth J, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur J Immunol*. 1988;18(5):717-721. doi:10.1002/eji.1830180510.
 160. Eck MJ, Sprang SR. The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding. *J Biol Chem*. 1989;264(29):17595-17605.
 161. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol*. 1993;9:317-343. doi:10.1146/annurev.cb.09.110193.001533.
 162. Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*. 2001;11(9):372-377.
 163. Sherry B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol*. 1988;107(4):1269-1277.
 164. Zimmerman GA. Endothelial Cell Inflammatory Responses to Tumor Necrosis Factor alpha. *Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(22):13094-13102. doi:10.1074/jbc.271.22.13094.

165. Krishnadasan B, Naidu BV, Byrne K, Fraga C, Verrier ED, Mulligan MS. The role of proinflammatory cytokines in lung ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125(2):261-272. doi:10.1067/mtc.2003.16.
166. Ikeda U, Ikeda M, Kano S, Shimada K. Neutrophil adherence to rat cardiac myocyte by proinflammatory cytokines. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994;23(4):647-652.
167. Donnellan R, Chetty R. Cyclin E in human cancers. *FASEB J.* 1999;13(8):773-780.
168. Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, Cain MP, Harken AH, Meldrum DR. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 1999;277(3 Pt 2):R922-9.
169. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* 1983;219(4587):983-985.
170. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 1989;246(4935):1306-1309.
171. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989;246(4935):1309-1312.
172. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med.* 2005;9(4):777-794.
173. Kawaguchi M, Akagi M, Gray MJ, Liu W, Fan F, Ellis LM. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human gastric cancer cells by interleukin-1beta. *Surgery.* 2004;136(3):686-692. doi:10.1016/j.surg.2003.12.015.
174. Charalambous C, Pen LB, Su YS, Milan J, Chen TC, Hofman FM. Interleukin-8 differentially regulates migration of tumor-associated and normal human brain endothelial cells. *Cancer Res.* 2005;65(22):10347-10354. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0949.
175. Huang S-P, Wu M-S, Shun C-T, et al. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J Biomed Sci.* 2004;11(4):517-527. doi:10.1159/000077902.
176. Chu S-C, Tsai CH, Yang S-F, et al. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod.* 2004;30(10):704-707.
177. Gaudry M, Bregerie O, Andrieu V, El Benna J, Pocard MA, Hakim J. Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood.* 1997;90(10):4153-4161.
178. Namiki A, Brogi E, Kearney M, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270(52):31189-31195.
179. Sugishita Y, Shimizu T, Yao A, et al. Lipopolysaccharide augments expression and secretion of vascular endothelial growth factor in rat ventricular myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268(2):657-662. doi:10.1006/bbrc.2000.2165.

180. Nauck M, Roth M, Tamm M, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997;16(4):398-406. doi:10.1165/ajrcmb.16.4.9115750.
181. McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, et al. Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest.* 1996;98(2):482-489. doi:10.1172/JCI118815.
182. Beiras-Fernandez A, Chappell D, Hammer C, Beiras A, Reichart B, Thein E. Impact of polyclonal anti-thymocyte globulins on the expression of adhesion and inflammation molecules after ischemia-reperfusion injury. *Transpl Immunol.* 2009;20(4):224-228. doi:10.1016/j.trim.2008.11.004.
183. Iwasaki A. The importance of CD11b+ dendritic cells in CD4+ T cell activation in vivo: with help from interleukin 1. *J Exp Med.* 2003;198(2):185-190. doi:10.1084/jem.20030737.
184. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med.* 1990;171(4):1155-1162.
185. Liu RR, Li J, Gong JY, et al. MicroRNA-141 regulates the expression level of ICAM-1 on endothelium to decrease myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2015;309(8):H1303-13. doi:10.1152/ajpheart.00290.2015.
186. Muller WA, Ratti CM, McDonnell SL, Cohn ZA. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med.* 1989;170(2):399-414.
187. Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 1991;114(5):1059-1068.
188. Ferrero E, Villa A, Ferrero ME, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced vascular leakage involves PECAM1 phosphorylation. *Cancer Res.* 1996;56(14):3211-3215.
189. Piali L, Hammel P, Uherek C, et al. CD31/PECAM-1 is a ligand for alpha v beta 3 integrin involved in adhesion of leukocytes to endothelium. *J Cell Biol.* 1995;130(2):451-460.
190. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med.* 1993;178(2):449-460.
191. Nourshargh S, Krombach F, Dejana E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J Leukoc Biol.* 2006;80(4):714-718. doi:10.1189/jlb.1105645.
192. Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1992;86(3):937-946.
193. Vanden Hoek TL, Li C, Shao Z, Schumacker PT, Becker LB. Significant levels of oxidants are generated by isolated cardiomyocytes during ischemia prior to

- reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29(9):2571-2583.
doi:10.1006/jmcc.1997.0497.
194. Jones WK, Brown M, Ren X, He S, McGuinness M. NF-kappaB as an integrator of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling? *Cardiovasc Toxicol.* 2003;3(3):229-254.
 195. Davis RF, Gravlee GP, Utley JR. *Cardiopulmonary bypass, principle and practice: Blood-surface interface.* 3rd ed. Philadelphia, London; 2007.
 196. Clark RE, Brillman J, Davis DA, Lovell MR, Price TR, Magovern GJ. Microemboli during coronary artery bypass grafting. Genesis and effect on outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;109(2):249-57; discussion 257-8.
doi:10.1016/S0022-5223(95)70386-1.
 197. Blauth CI, Smith PL, Arnold JV, Jagoe JR, Wootton R, Taylor KM. Influence of oxygenator type on the prevalence and extent of microembolic retinal ischemia during cardiopulmonary bypass. Assessment by digital image analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990;99(1):61-69.
 198. Li S, Guan Q, Chen Z, Gleave ME, Nguan CYC, Du C. Reduction of cold ischemia-reperfusion injury by graft-expressing clusterin in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(7):819-826. doi:10.1016/j.healun.2011.03.007.
 199. Mohara J, Oshima K, Tsutsumi H, Takeyoshi I, Matsumoto K, Morishita Y. FK409 ameliorates ischemia-reperfusion injury in heart transplantation following 12-hour cold preservation. *J Heart Lung Transplant.* 2000;19(7):694-700.
 200. Berg K, Jynge P, Bjerve K, Skarra S, Basu S, Wiseth R. Oxidative stress and inflammatory response during and following coronary interventions for acute myocardial infarction. *Free Radic Res.* 2005;39(6):629-636.
doi:10.1080/10715760400028027.
 201. Wright JL, Churg A. Effect of long-term cigarette smoke exposure on pulmonary vascular structure and function in the guinea pig. *Exp Lung Res.* 1991;17(6):997-1009.
 202. Lepantalo M, Fiengo L, Biancari F. Peripheral arterial disease in diabetic patients with renal insufficiency: a review. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012;28 Suppl 1:40-45. doi:10.1002/dmrr.2233.
 203. Lippi G, Fontana R, Avanzini P, Sandei F, Ippolito L. Influence of spurious hemolysis on blood gas analysis. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51(8):1651-1654.
doi:10.1515/cclm-2012-0802.
 204. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61(3):481-497.
doi:10.1016/j.cardiores.2003.10.011.
 205. Schaenzler N, Bieger W. *Laborwerte.* Erweiterte und aktualisierte Neuauflage, 1. Auflage. München: Gräfe und Unzer Verlag GmbH; 2016. Der große GU Kompass.
 206. Meyer S, Neeff H, Thomusch O, et al. Everolimus Improves Microcirculatory Derangements in Experimental Postischemic Pancreatitis Modulating the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor, Interleukin 6, and Toll-Like Receptor 4. *Pancreas.* 2015;44(8):1245-1251. doi:10.1097/MPA.0000000000000428.

207. Zhu J, Lu T, Yue S, et al. Rapamycin protection of livers from ischemia and reperfusion injury is dependent on both autophagy induction and mammalian target of rapamycin complex 2-Akt activation. *Transplantation*. 2015;99(1):48-55. doi:10.1097/TP.0000000000000476.
208. Yin L, Ye S, Chen Z, Zeng Y. Rapamycin preconditioning attenuates transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Int J Neurosci*. 2012;122(12):748-756. doi:10.3109/00207454.2012.721827.
209. Cicora F, Roberti J, Vasquez D, et al. Preconditioning donor with a combination of tacrolimus and rapamycin to decrease ischaemia-reperfusion injury in a rat syngenic kidney transplantation model. *Clin Exp Immunol*. 2012;167(1):169-177. doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04487.x.
210. Dashkevich A, Raissadati A, Syrjala SO, et al. Ischemia-Reperfusion Injury Enhances Lymphatic Endothelial VEGFR3 and Rejection in Cardiac Allografts. *Am J Transplant*. 2016;16(4):1160-1172. doi:10.1111/ajt.13564.
211. Lan C-C, Peng C-K, Tang S-E, Wu S-Y, Huang K-L, Wu C-P. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody Suppresses ERK and NF-kappaB Activation in Ischemia-Reperfusion Lung Injury. *PLoS One*. 2016;11(8):e0159922. doi:10.1371/journal.pone.0159922.
212. Jeong EK, Jang HJ, Kim SS, et al. Protective Effect of Polydeoxyribonucleotide Against Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *Transplant Proc*. 2016;48(4):1251-1257. doi:10.1016/j.transproceed.2016.01.028.
213. Logue OC, McGowan JWD, George EM, Bidwell GL3. Therapeutic angiogenesis by vascular endothelial growth factor supplementation for treatment of renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016;25(5):404-409. doi:10.1097/MNH.0000000000000256.
214. Riesterer O, Zingg D, Hummerjohann J, Bodis S, Pruschy M. Degradation of PKB/Akt protein by inhibition of the VEGF receptor/mTOR pathway in endothelial cells. *Oncogene*. 2004;23(26):4624-4635. doi:10.1038/sj.onc.1207596.
215. Gao JQ, Zheng JP, Jin HG, et al. A new rapamycin-abluminally coated chitosan/heparin stent system accelerates early re-endothelialisation and improves anti-coagulant properties in porcine coronary artery models. *Clin Invest Med*. 2014;37(6):E395-402.
216. Obata J-e, Kitta Y, Takano H, et al. Sirolimus-eluting stent implantation aggravates endothelial vasomotor dysfunction in the infarct-related coronary artery in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(14):1305-1309. doi:10.1016/j.jacc.2007.06.031.
217. Gonzalez-Mateo GT, Aguirre AR, Loureiro J, et al. Rapamycin Protects from Type-I Peritoneal Membrane Failure Inhibiting the Angiogenesis, Lymphangiogenesis, and Endo-MT. *Biomed Res Int*. 2015;2015:989560. doi:10.1155/2015/989560.
218. Lane HA, Wood JM, McSheehy PMJ, et al. mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2009;15(5):1612-1622. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-2057.

219. Jaeschke H, Farhood A, Bautista AP, Spolarics Z, Spitzer JJ, Smith CW. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Hepatology*. 1993;17(5):915-923.
220. Harris AG, Leiderer R, Peer F, Messmer K. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am J Physiol*. 1996;271(6 Pt 2):H2388-98.
221. Khan S, Salloum F, Das A, Xi L, Vetovec GW, Kukreja RC. Rapamycin confers preconditioning-like protection against ischemia-reperfusion injury in isolated mouse heart and cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(2):256-264. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.04.014.
222. Chen-Scarabelli C, Agrawal PR, Saravolatz L, et al. The role and modulation of autophagy in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Geriatr Cardiol*. 2014;11(4):338-348. doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2014.01.009.
223. Joner M, Nakazawa G, Finn AV, et al. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(5):333-342. doi:10.1016/j.jacc.2008.04.030.
224. Steigerwald K, Ballke S, Quee SC, et al. Vascular healing in drug-eluting stents: differential drug-associated response of limus-eluting stents in a preclinical model of stent implantation. *EuroIntervention*. 2012;8(6):752-759. doi:10.4244/EIJV8I6A115.
225. Werner I, Guo F, Kiessling AH, et al. Treatment of endothelial cell with flavonoids modulates transendothelial leukocyte migration. *Phlebology*. 2015;30(6):405-411. doi:10.1177/0268355514531951.
226. Gu M, Zheng A-B, Jin J, et al. Cardioprotective Effects of Genistin in Rat Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Studies by Regulation of P2X7/NF-kappaB Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2016;2016:5381290. doi:10.1155/2016/5381290.
227. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 inhibits pulmonary NF-kappaB activation and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1999;277(5 Pt 1):L919-23.
228. Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, Lentsch AB. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB. *Hepatology*. 1999;30(1):203-208. doi:10.1002/hep.510300120.

7. Zusammenfassung in deutscher Sprache

Systemerkrankungen der arteriellen Gefäße stellen eine häufige Todesursache in Deutschland und der westlichen Welt dar. Hierbei sind vor allem die auf Grundlage von Arteriosklerose entstehende Koronare Herzerkrankung sowie der Myokardinfarkt zu nennen. Ursache des Myokardinfarktes ist eine Minderperfusion und damit bedingte Ischämie des Myokardgewebes. Ziel einer jeden Minderperfusion ist die therapeutisch schnellstmögliche Reperfusion. Ischämie- und Hypoxie-bedingt entstehen hierbei durch inflammatorische Prozesse, Ansammlung toxischer Metabolite, veränderter Protein-Expressionsmuster sowie durch das reperfundierende Blut der sogenannte Ischämie-Reperfusionsschaden. Dieser komplexe Effekt lässt sich über dem hinaus auch bei Organtransplantationen beobachten.

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Versuch den Ischämie-Reperfusionsschaden durch den Einfluss von mTOR-Inhibition im humanen Gefäßmodell zu quantifizieren. Hierbei wurden die mTOR-Inhibitoren Sirolimus und Everolimus verwendet. Beide Immunsuppressiva finden aktuell unter anderem klinische Anwendung nach Organtransplantationen. Bereits in einigen Studien konnten positive Effekte von Sirolimus als auch Everolimus auf den Ischämie-Reperfusionsschaden nachgewiesen werden. Dieser Versuch sollte nun weitere zielführende Erkenntnisse hinsichtlich mTOR-Inhibition und proinflammatorischer Prozesse sowie der Expression von Zell-Adhäsionsmolekülen im humanen Gefäßmodell liefern. Ebenso sollte die Qualität des Bioreaktors als adäquates Humangefäß-Perfusionsmodell evaluiert werden.

Als Versuchsgrundlage wurde hierbei eine Ischämiezeit der Gefäße von vier bis fünf Stunden festgelegt. Die verwendeten Gefäße wurden in der Folge nach standardisierten Kriterien (Präoxygenierung, Heparinisierung, 37° Grad Celsius Temperatur, Blutgruppe AB Rhesusfaktor negativ, Hämatokritwert 30%) zwei Stunden lang mittels Vollblut im Bioreaktormodell reperfundiert. Unterschieden wurde hierbei eine Gefäßkontrollgruppe (n=7), von einer Sirolimus-Gruppe (n=6, standardisierte Blutkonzentration 10ng/ml) und einer Everolimus-Gruppe (n=7, standardisierte Blutkonzentration 5 ng/ml). Nach standardisierten Zeitpunkten der Reperfusion (0 Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, 60 Minuten und 120 Minuten) wurden jeweils Blutproben dem simulierten Kreislauf entnommen. Mittels Blutgasanalyse wurde über die Bestimmung des

Sauerstoffpartialdrucks, des Kohlendioxidpartialdrucks sowie des pH-Wertes eine qualitative Evaluierung des Bioreaktors als humanes Gefäßmodell vorgenommen. Des Weiteren dienten die Blutproben zur Erfassung der proinflammatorischer Marker Interleukin-6, TNF- α , sowie VEGF während der unterschiedlichen Zeitpunkte der Blutentnahme. Nach Beendigung der Reperfusion wurden Gefäßproben mittels immunhistochemischen Verfahren auf die Expression der Zell-Adhäsionsmoleküle CD31 sowie CD11b hin untersucht.

Aufgrund durchgeführter Versuche konnte gezeigt werden, dass in der Kontrollgruppe die Interleukin-6- sowie VEGF-Spiegel signifikant im Zuge der Reperfusion anstiegen. Sirolimus als auch Everolimus konnten demgegenüber einen signifikanten Anstieg dieser proinflammatorischen Signalmoleküle verhindern. Im Vergleich des proinflammatorischen TNF- α konnte allerdings ein signifikanter Einfluss der mTOR-Inhibitoren nicht bestätigt werden. Hinsichtlich des Expressionsmusters konnte Sirolimus als auch Everolimus eine signifikante Reduktion von sowohl CD31-positiven als auch CD11b-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe aufzeigen.

In der Zusammenschau lässt sich aus den erhobenen Daten schlussfolgern, dass der Bioreaktor als humanes Gefäßmodell ein suffizientes Perfusionssystem darstellt. Sirolimus als auch Everolimus können über ihren Wirkungsmechanismus der mTOR-Inhibition einen Anstieg proinflammatorischer Moleküle zum Teil verhindern. Den größten Einfluss auf den Ischämie-Reperfusionsschaden nehmen Sirolimus als auch Everolimus hierbei mittels der Suppression von Zell-Adhäsionsmolekülen CD31 und CD11b.

8. Zusammenfassung in englischer Sprache

Arteriosclerosis is a major reason for coronary heart disease and myocardial infarction. These diseases are frequent causes of death in Germany and the Western world. Myocardial infarction is based on hypoperfusion and the ischemia of myocardial tissue. The main treatment of hypoperfusion is the quick reperfusion of ischemic tissue. The Ischemia Reperfusion Injury describes an acute inflammation process which is caused by an Ischemia and Hypoxia period in tissue followed by the accumulation of toxic metabolites and eventually by an inflammatory increase due to the reperfusion through oxygenated blood. The Ischemia Reperfusion Injury plays an important role in the rehabilitation of tissue after cardiac infarcts as well as in the function of transplanted organs.

The aim of the present study was to investigate and compare the potential and influence of the mTOR inhibitors Sirolimus and Everolimus upon Ischemia Reperfusion Injury and the inflammatory process in a human bioreactor model. Sirolimus as well as Everolimus are already used for immune suppression after organ transplantations. Positive effects against Ischemia Reperfusion Injury have been shown by the inhibition of the mTOR complex in previous studies. This study wanted to improve the level of scientific knowledge of mTOR inhibition due to the inflammatory processes and expression of adhesion molecules. Furthermore, the quality of the bioreactor as a sufficient perfusion model was investigated.

The cold ischemia time was set between a minimum of 4 hours and a maximum of 5 hours. All vessels were reperfused for two hours with standardized heparinized pre-oxygenated 37°C warm blood of the group AB rhesus factor negative with adjusted haematocrit to a value of 30%. Without any addition of drugs to the reperfusion blood, seven vessels were reperfused (control group, n=7). Six vessels were reperfused by blood which contained Sirolimus with a blood concentration of 10 ng/ml (Sirolimus group, n=6). Moreover, seven vessels were reperfused with an Everolimus blood concentration of 5 ng/ml (Everolimus group, n=7). The reperfusion time was standardized to 2 hours. 0 minutes, 15 minutes, 30 minutes, 60 minutes and 120 minutes after the start of the reperfusion, blood samples were taken. These samples were used to

quantify the development of the oxygen saturation, the pH-value and the carbon dioxide partial pressure during the reperfusion by a blood gas analyzer in order to evaluate the quality of the bioreactor model. In addition, at the same points of time, blood samples were taken to quantify the value of the inflammatory markers Interleukin-6, TNF- α and VEGF. After the reperfusion, biopsies of the vessels were taken to immunohistologically investigate the inflammatory process of the Ischemia Reperfusion Injury through quantification of the adhesion molecules CD31 and CD11b.

Our investigation of Interleukin-6 and VEGF demonstrated a significant increase of the Interleukin-6- and VEGF-blood level in the control group during the reperfusion time. In comparison, the experimental groups with addition of Sirolimus respectively Everolimus to the reperfusion-blood showed no significant increase of the Interleukin-6- and VEGF-blood level during the reperfusion. The comparison regarding to the TNF- α blood level in the control group and experimental groups showed no significant differences. Furthermore Sirolimus and Everolimus demonstrated a significant decrease of the adhesion molecules CD31 and CD11b after reperfusion. The rates of CD31 positive cells as well as CD11b positive cells were significantly higher in the control group.

As a result, our data indicate that the bioreactor model is a sufficient system to investigate the reperfusion of human vessels. Sirolimus as well as Everolimus demonstrate that mTOR inhibition can help to reduce the Ischemia Reperfusion Injury. The major influence of Sirolimus and Everolimus regarding to the Ischemia Reperfusion Injury are the down regulation of the expression of the adhesion molecules CD31 and CD11b.

9. Danksagung

Ein außerordentlicher Dank gilt meinen Unterstützern und Förderern im Labor der Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Uniklinik Frankfurt. Alle voran ein gebührender Dank an meinen Doktorvater Prof. Dr. Andrés Beiras-Fernandez für die Verwirklichung und überragende Betreuung und Begleitung dieses innovativen Projekts. Danke Dr. rer. nat. Isabella Werner für die Möglichkeit, mit jeder Frage während der Versuchsdurchführung anzuklopfen zu können. Danke an Maryam Tabib für jegliche Unterstützung und Expertise im Labor. Außerdem gilt ein Dank Dr. Manfred Richter für die tolle Kooperation mit der Kerkhoff-Klinik in Bad Nauheim.

Auch möchte ich an dieser Stelle all jenen Freunden danken, die mich in der Zeit von Beginn im Labor bis zum letzten Satz dieser Doktorarbeit begleitet und mich durch Ratschläge und Kritik geprägt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem gutem Freund und Weggefährten Henryk Haffer. Die gemeinsamen Zeiten im Labor und Studium sowie die regen Diskussionen mit Dir überall auf verschiedenen Kontinenten möchte ich nicht missen.

Ein außerordentlicher Dank für die Kraft und Motivation langer Tage und Arbeiten im Labor neben dem täglichen Studium und Verpflichtungen verdanke ich vor allem meinen Eltern Ute und Rudi Wenzel, die mir stets den Rücken freigehalten und niemals Kosten, Mühen und Nerven gescheut haben, mir meine persönlichen Träume und Ziele ermöglichen zu können. Euch widme ich diese Doktorarbeit.

10. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Beurteilung des Einflusses von Sirolimus und Everolimus auf den Ischämie-Reperfusionsschaden im humanen Gefäßmodell

in der Klinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt

unter Betreuung und Anleitung von Professor Dr. med. Andres Beiras-Fernandez mit Unterstützung durch Dipl.-Ing. Dr. rer. nat. Isabella Werner ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

(Frankfurt am Main, 30.05.2018)

(Unterschrift)

Lebenslauf



Persönliche Daten

Name: Mike Wenzel
Geburtsdatum: 16.06.1991
Adresse: Dreieichstr. 35, 60594 Frankfurt
Telefonnr.: 0157/51545494
Email-Adresse: Mikewenzel91@aol.com

Ausbildung

Seit Juli 2018: Assistenzarzt an der Klinik für Urologie,
Universitätsklinikum Frankfurt

Mai 2018: Approbation als Arzt (Note: sehr gut)

Oktober 2016: 2. Staatsexamen (Note: sehr gut)

Seit 2015: Zweitstudium Wirtschaftswissenschaften

September 2013: 1. Staatsexamen (Note: sehr gut)

2011-2018: Studium der Humanmedizin,
Goethe-Universität, Frankfurt

01.09.2010-28.02.2011 Zivildienst, Neurologie, Universitätsklinikum
Frankfurt

2001- 2010: Abitur am Goethe–Gymnasium, Neu-Isenburg
(Note: 1,1)

1997- 2001: Hans-Christian-Andersen Grundschule,
Neu-Isenburg

Wissenschaftliches

2014-2018: Doktorarbeit am Fachbereich
Herz-/Thorax-/Gefäßchirurgie,
Universitätsklinikum Frankfurt

2010: DMV-Abiturpreis

Borgmann H, Wenzel M, Salem J:

GeSRU Academics Awards 2017-prizes and awards for young academic urologists

Urologe A. 2017 Dec;56(12):1618-1622

Borgmann H, Wenzel M, Salem J:

GeSRU Academics Awards 2016: Honoring achievements of young academic urologists

Urologe A. 2016 Dec;55(12):1615-1618

Abstract: European Society for Organ Transplantation Congress 2017

Early application of MTOR inhibitors reduce vascular inflammatory response after ischemia-reperfusion injury.

Mike Wenzel, Pengfei Wang, Isabella Werner, Manfred Richter, Anton Moritz, Christian Vahl, Andres Beiras-Fernandez

Engagement/ Soziales/Mitgliedschaften

Seit 2018: Mitglied GeSRU Academics Arbeitsgruppen
Prostatakarzinom und Rekonstruktive Urologie

Seit 2018: Mitglied GeSRU

2014-2017: Stipendiat efellows

2011-2018: Stipendiat der Friedrich-Naumann-Stiftung
für die Freiheit

Sprachkenntnisse

Deutsch (Muttersprache)

Englisch (Fortgeschritten)

Spanisch (Anfänger)