

Diplomarbeit

**Angiotensin-(1-7), 5-Hydroxymethyl-2-furfural und
Alphaketoglutarat: Auswirkungen auf die Herzfunktion
isolierter Rattenherzen während Ischämie und Reperfusion**

eingereicht von

Sabrina Kern

Geb.Dat.: 12.09.1986

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Chirurgie Graz

unter der Anleitung von

Ao. Univ.-Prof. Dr. med. univ. Wasler Andrae

(Klinische Abteilung für Herzchirurgie)

Dr. med. univ. Schwarz Michaela

(Klinische Abteilung für Transplantationschirurgie und
Sektion für Chirurgische Forschung)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 17.04.2013

Sabrina Kern

Ich habe mich dazu entschlossen in meiner gesamten Diplomarbeit zur einfacheren Lesbarkeit ausschließlich männliche Formulierungen zu verwenden und möchte hinzufügen, dass selbstverständlich alle Aussagen für beide Geschlechter gelten.

Danksagung

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“ (1)

Johann Wolfgang von Goethe (*1749- +1832)

In erster Linie möchte ich gerne Ao. Univ. –Prof. Dr. med. univ. Wasler Andrae dafür danken, dass er sich dazu bereit erklärt hat diese Diplomarbeit zu betreuen.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Zweitbetreuerin Dr. med. univ. Schwarz Michaela, die viel Mühe und wertvolle Zeit aufgebracht hat um mich bei meiner Abschlussarbeit zu unterstützen.

Meine Eltern, Brigitte und Erich Schaffer, haben es mir ermöglicht Humanmedizin an der Medizinischen Universität Graz zu studieren. Sie sind mir in jeder Lebenslage zur Seite gestanden und haben mir die Möglichkeit gegeben meinen Traum „Ärztin zu werden“ zu verwirklichen. Dafür möchte ich ihnen hier meinen ewigen Dank aussprechen.

Für seine liebevolle Unterstützung, sein großes Verständnis und seine motivierenden Worte bin ich meinem Ehemann, Christian Kern, unendlich dankbar. Er hat mich stets tatkräftig auf meinem Weg begleitet und in meinem Vorhaben bestärkt. Zudem hat er mir technisch beim Verfassen dieser Arbeit eingehend unter die Arme gegriffen.

Ich danke auch meiner Schwiegerfamilie, die jederzeit für mich da war, für ihre Hilfe sowie Dr. med. univ. Julia Leitner, Mag. Thomas Ruck, Sandra Moser und Paul Zajic, dass sie sich die Zeit genommen haben meine Arbeit Korrektur zu lesen.

Vielen herzlichen Dank an alle!

Zusammenfassung

Die Herztransplantation (HTX) hat sich zu der effektivsten Therapie der Herzinsuffizienz im Endstadium entwickelt. Der globale Mangel an Spenderorganen erfordert neue Vorgehensweisen um den Gewebeschaden der Organe zu minimieren und die Funktion dieser im komplexen Ablauf einer Organtransplantation aufrechtzuerhalten.

Verschiedene Risikofaktoren, antigen-abhängige und -unabhängige, sind für die initiale und langfristige Transplantatfunktion, welche postoperativ die Lebensqualität sowie die Lebenserwartung der Patienten beeinflusst, verantwortlich. Die bedeutendsten antigen-unabhängigen Einflüsse, denen ein Spenderorgan ausgesetzt ist, sind vorübergehende Episoden warmer Ischämie im Zusammenhang mit der Hypotension des Spenders, dem Prozess des Hirntodes oder der Revaskularisation sowie ausgedehnte Phasen der kalten Ischämie während der Organkonservierung und Aufbewahrung, gefolgt von Ischämie/Reperfusion. Einer der zugrunde liegenden Mechanismen des Ischämie/Reperfusionsschaden ist die Bildung von „reactive oxygen and nitrogen species“ RONS. Die Regulation der Bildung dieser RONS, entweder durch endogene Abwehrmechanismen oder durch die Verabreichung von Radikalfängern, zeigte in experimentellen und klinischen Versuchen positive Effekte.

Die antioxidativen Eigenschaften der Lösung Karal® konnten bereits in einer vorherigen Masterarbeit in Dosisabhängigkeit während warmer Ischämie gezeigt werden. Ferner wurde die Lösung mit dem endogenen Peptid Angiotensin-(1-7) kombiniert. Während kalter Ischämie der isoliert perfundierten Rattenherzen am Langendorff wurde eine kardioprotektive Wirkung beschrieben.

In dieser Diplomarbeit haben wir die gleiche Kombination in warmer Ischämie mittels Koronarokklusion getestet. Wir können die positiven Effekte, die bereits nach kalter Ischämie beobachtet wurden, während der Reperfusion nach Koronarokklusion bestätigen und bemerkten zusätzlich eine antiarrhythmische Wirkung. Darüber hinaus führten wir eine Pilotstudie zur Testung von NVP, ein neues bisher unbekanntes vasoaktives Peptid, mit einer kleinen Anzahl an Versuchstieren durch. Unsere Beobachtungen deuten zwar auf eine Erhöhung des systolischen Druckes hin, jedoch ohne statistische Signifikanz. Mehr Versuchstiere müssen dafür in weiterführenden Studien miteingeschlossen werden. Gleichwohl Ergebnisse experimenteller Modelle hinsichtlich der Übertragbarkeit auf den Menschen kritisch zu betrachten sind, bietet die schnelle und sichere Reproduzierbarkeit eine großartige Möglichkeit grundlegende Mechanismen zu entdecken und zu beschreiben.

Abstract

Heart transplantation (HTX) has emerged as the most effective therapy for end stage heart failure. The global lack of donor organs requires new approaches to minimize tissue damage and preserve function within the complex sequences of organ transplantation.

Various risk factors, antigen-dependent and -independent, have been identified to be responsible for initial and late graft function, influencing patient's post-transplant life quality and expectancy. The most significant antigen-independent influences that transplanted organs experience are transient episodes of warm ischemia related to donor hypotension, the process of brain death or revascularisation, as well as an extended period of cold ischemia during organ preservation and storage, followed by ischemia/reperfusion I/R. One of the underlying mechanisms of myocardial I/R injury is the generation of reactive oxygen and nitrogen species RONS.

Modulation of RONS generation, either by enhancing the endogenous defence mechanisms or by administration of substances with free radical scavenging abilities showed beneficial effects both in the experimental and clinical setting.

The antioxidative abilities of the new solution Karal® have been proven in a previous master thesis in a dose dependent manner during warm ischemia. Furthermore, the solution was combined with the endogenous and well described peptide Angiotensin-(1-7). An enhanced cardioprotective effect has been described in isolated Langendorff perfused rat hearts during cold ischemia.

In this diploma thesis we tested the same combination during warm ischemia, using a coronary occlusion model.

We were able to confirm the positive previously observed effects after cold ischemia, during reperfusion after coronary occlusion and furthermore an antiarrhythmic effect was seen.

In addition we ran a pilot study with a small amount of animals, testing NVP, a new, previously unknown vasoactive peptide. There was a trend towards increased systolic pressure, although this did not reach statistical significance. More animals have to be included in further studies.

Although the applicability of findings in experimental models on human beings has to be questioned, the fast and secure reproducibility offers a great opportunity for detection and description of basic mechanisms.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	V
1 Einleitung	1
2 Hintergrund	4
2.1 Historischer Rückblick in die Transplantationsmedizin.....	4
2.2 Eurotransplant.....	8
2.3 Gesetzliche Regelungen der Transplantation in Europa	9
2.3.1 Österreich.....	9
2.3.2 Andere europäische Länder	10
2.4 Die Organtransplantation aus religiöser Sicht	12
2.4.1 Das Christentum	12
2.4.2 Jehovas Zeugen	13
2.4.3 Der Islam	14
2.5 Die Herztransplantation	15
2.5.1 Daten aus Österreich im internationalen Vergleich.....	15
2.5.2 Der Weg zur Herztransplantation	16
2.5.3 Die lebensrettende Operation	18
2.5.4 Die Zeit nach der Herztransplantation	20
2.6 Der Ischämie/Reperfusionsschaden.....	23
2.6.1 Oxidativer Stress.....	24
2.6.2 NO, Stickstoffmonoxid	26
2.7 Angiotensin-(1-7).....	28
2.8 α -Ketoglutarat	36
2.8.1 α -Ketoglutarat aus biochemischer Sicht	36
2.8.2 Die klinische Relevanz von α -Ketoglutarat.....	41
5-Hydroxymethyl-2-furfural	43
2.8.3 5-HMF in Lebensmittel.....	43
2.8.4 Die protektive Wirkung von 5-Hydroxymethyl-2-furfural aus klinischer Sicht	45

2.9	Die Langendorff Apparatur	48
2.10	Der Tierversuch:	51
2.10.1	Die gesetzlichen Grundlagen.....	51
2.10.2	Das Tierversuchsrechtsänderungsgesetz vom 28.12.2012	52
2.10.3	Das 3R- Prinzip.....	54
3	Material und Methoden	55
3.1	Die Versuchstiere	55
3.2	Die Aufbereitung des isolierten Rattenherzens	55
3.3	Die Reperfusion des Herzens am Langendorff Apparat	56
3.4	Der Studienablauf.....	57
3.5	Die Versuchsgruppen	60
3.6	Die Inhaltsstoffe der Versuchspersionslösungen.....	61
4	Ergebnisse	63
5	Diskussion	66
5.1	Die Auswahl der Versuchstiere	68
	Glossar	69
	Abkürzungen	70
	Tabellenverzeichnis.....	72
	Abbildungsverzeichnis.....	73
	Literaturverzeichnis	74
	Anhang:.....	85
A.	Formblatt Labortierbestellung	85
B.	Formular für Eintrag in das Widerspruchsregister	86
C.	Organspendeausweis in Deutschland	87

1 Einleitung

„Was uns am Leben erhält, kann uns auch krank machen.“ (2)

Hippokrates von Kos (* um 460- + 380 v. Chr.)

Ein Aphorismus des wohl berühmtesten Arztes der Antike aus Griechenland, der auch heute, wie der Eid des Hippokrates, an Bedeutung und Richtigkeit nicht verloren hat.

Das Element Sauerstoff ist der zweitwichtigste Bestandteil nach Stickstoff in der Luft, das häufigste Element in der festen Erdkruste und das Produkt des Lebens. Der Mensch benötigt, wie viele andere Lebewesen dieser Erde, zum Leben Sauerstoff. Jede einzelne Zelle des menschlichen Organismus ist auf die essentielle aerobe Energiegewinnung angewiesen. Diese Entwicklung im Laufe der Evolution, die eine eindeutige Überlegenheit gegenüber anaeroben Organismen darstellt, hat jedoch eine Kehrseite: RONS „reactive oxygen and nitrogen species“ entstehen laufend im menschlichen Körper bei diesen sauerstoffabhängigen Reaktionen und können für Biomoleküle schädlich sein. Unter physiologischen Bedingungen verhindert allerdings ein antioxidatives Abwehrsystem, dass diese freien Radikale Schäden verursachen können. Wenn dieses Gleichgewicht zwischen RONS und antioxidativen Enzymen kippt, spricht man von oxidativem Stress. Die Folge dieses Ungleichgewichtes ist die endotheliale Dysfunktion. Die endotheliale Dysfunktion ist das Resultat einer Beeinträchtigung der endothel-abhängigen Vasodilatation, durch eine herabgesetzte Bioverfügbarkeit von NO Stickstoffmonoxid. Stickstoffmonoxid wirkt unter physiologischen Bedingungen gefäßerweiternd in der glatten Muskulatur, antiproliferativ, antithrombotisch, antiatherogen sowie antioxidativ. Jedoch unter oxidativem Stress fängt NO das freie Radikal O_2^- Superoxid, das unter diesen Umständen überexprimiert wird, und diese bilden gemeinsam $ONOO^-$ Peroxynitrit, ein hochreaktives zytotoxisches Radikal. Die daraus resultierende endotheliale Dysfunktion stellt den Risikofaktor sowohl für die Entstehung von Arteriosklerose als auch von kardiovaskulären Erkrankungen, die in der westlichen Zivilisation noch immer zu den häufigsten Todesursachen zählen sowie rund 40% der gesamten Mortalität ausmachen, dar.

Bei einem Myokardinfarkt mit anschließender interventioneller Revaskularisation, bei Operationen an den Koronargefäßen bzw. Herzklappen mithilfe einer Herz-Lungen-

Maschine und bei einer Herztransplantation kann es zu ausdehnten Phasen der Ischämie kommen. In wissenschaftlichen Studien konnte gezeigt werden, dass die Wiederherstellung des Blutflusses mit der damit verbundenen Sauerstoffversorgung im ischämischen Myokard zu einer übermäßigen Produktion von RONS führt und die myokardiale Funktion negativ beeinflusst. In der Phase der Reperfusion erwiesen sich die endogene Unterstützung des antioxidativen Systems und die exogene Zugabe von Radikalfängern als kardioprotektiv.

Karal® ist eine antioxidative Lösung und beinhaltet α -Ketoglutarat, ein Zwischenprodukt des Citratzyklus, und 5-Hydroxymethyl-2-furfural. Sie steigert die Freisetzung von NO, vermittelt dadurch eine Vasodilatation, senkt die Konzentration von Peroxynitrit und steigert die Synthese von antioxidativen Enzymen. Eine Kombination von Karal® mit dem Peptid Angiotensin-(1-7) soll noch zusätzlich die protektiven Eigenschaften verbessern.

Das Heptapeptid Ang-(1-7) ist eine aktive Komponente des RAS Renin-Angiotensin-Systems. Das Hormonsystem RAS ist ein bedeutender Regulator des kardiovaskulären Systems und der endothelialen Funktion. Ang-(1-7) ist der Gegenspieler des Peptids Angiotensin II, wird im Wesentlichen aus dem Angiotensin-Converting-Enzym 2 synthetisiert und bindet an einem eigenen Rezeptor, dem Mas-Rezeptor. Ang-(1-7) wirkt antiinflammatorisch, antioxidativ, antiarrhythmisch sowie antiproliferativ und steigert den vasodilatatorischen Effekt durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid.

Karal® bzw. die Kombination von Karal® mit dem Peptid Angiotensin-(1-7) könnte eingesetzt werden um das Herz in warmer bzw. kalter Ischämie vor einem Ischämie/Reperfusionsschaden im Rahmen einer Herztransplantation bzw. einer Revaskularisation bei akutem Myokardinfarkt zu schützen.

Seit der ersten gelungen orthotopen Herztransplantation am Menschen im Jahre 1967 von Christian Barnard und der Markteinführung des Immunsuppressivums Cyclosporin in den 1980ern, entwickelte sich die Herztransplantation zum Goldstandard in der Therapie der terminalen Herzinsuffizienz. In Österreich wie auch in 7 anderen europäischen Ländern sorgt die Stiftung Eurotransplant für eine bestmögliche Verteilung von Organen hirntoter Spendern und verbessert dadurch die Überlebenschancen der Patienten auf der Warteliste.

Das größte Problem der Transplantationsmedizin ist der Organmangel, der sich auch in Statistiken von Eurotransplant widerspiegelt und sich kurzfristig nur schwer ändern lässt. Daher ist es wichtig bei der Optimierung des Transplantationsprozesses anzusetzen.

Das bedeutendste nicht-immunologische Problem der Spenderorgane ist der Reperfusionsschaden nach stattgefundenener Ischämie. Um die Qualität der kostbaren Organe und damit auch das postoperative Überleben der Patienten zu steigern, ist es angezeigt den durch freie Radikale hervorgerufenen Reperfusionsschaden durch perioperative Infusionslösungen („Radikalfänger“) zu mindern. Es wäre damit vielleicht möglich das postoperative Überleben und die Lebensqualität der Empfänger deutlich zu verlängern bzw. zu verbessern.

In einer Masterarbeit aus dem Jahre 2008 von Frau Mariana Macedo Lamacie MSc an der UFMG Federal University of Minas Gerais (Brasilien) konnte bereits an isolierten Rattenherzen an der Langendorff Apparatur durch Zugabe von Karal® in verschiedenen Konzentrationen (5%, 10% und 20%) eine Verbesserung der physiologischen Herzfunktion nach kalter bzw. warmer Ischämie gezeigt werden. Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Masterarbeit eine Kombination von Angiotensin-(1-7) und Karal® 20% nach kalter Ischämie getestet.

In meiner Diplomarbeit war es das Ziel eine Kombination von Angiotensin-(1-7) und Karal® 5% während warmer Ischämie mittels Koronarokklusion zu evaluieren. Das Gedankenkonzept dahinter war, die Einzelkomponenten bei maximalem Effekt soweit wie möglich hinunter zu titrieren. Um einen weiteren wissenschaftlich Aspekt zu zeigen, wurde auch ein neues vasoaktives Peptid (hier NVP genannt), welches ähnlich dem Peptid Angiotensin-(1-7) über den Mas-Rezeptor wirken soll, hinsichtlich seiner antiarrhythmischen Eigenschaften getestet.

Vgl. (3), (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12), (13), (14), (15), (16)

2 Hintergrund

2.1 Historischer Rückblick in die Transplantationsmedizin

Der lateinische Begriff „transplantare“ bedeutet „verpflanzen“ bzw. „versetzen“. In der Medizin versteht man unter Transplantation (TX) das Übertragen von funktionstüchtigen Zellen, Geweben und/oder Organen in ein anderes Individuum bzw. an eine andere Stelle im selben Individuum. Vgl. (17)

Der Grundgedanke, dass ein nicht mehr funktionstüchtiges Organ eine komplexe Erkrankung des gesamten Körpers hervorrufen kann, entwickelte sich erst Ende des 19. Jahrhunderts.



Emil Theodor Kocher (1841-1917), ein schweizer Chirurg, beschäftigte sich intensiv mit der Physiologie, Pathologie sowie Chirurgie der Schilddrüse und erhielt für seine Arbeit 1909 den Nobelpreis für Medizin. Er entdeckte nach Totalexstirpation der Schilddrüse die „Cachexia strumipriva“ und ihm kann eine der ersten Transplantationen in der Geschichte der Medizin zugeschrieben werden.

Abbildung 1 Emil Theodor Kocher (118)

Emil Theodor Kocher verpflanzte 1883 erstmals Schilddrüsengewebe in die Bauchhöhle und unter die Haut im Bereich des Halses bei einem seiner Patienten, der durch die Symptome der Schilddrüsenunterfunktion auffällig wurde. So ergab sich ein neuer invasiver Therapieansatz, für den Fall, dass die konservativen Möglichkeiten ausgeschöpft waren.

Einen weiteren großen Schritt machte 1900 Karl Landsteiner (1868-1943), ein Pathologe aus Österreich. Er beobachtete zahlreiche ungeklärte Todesfälle nach Bluttransfusionen und wollte dem Ganzen auf den Grund gehen. Karl Landsteiner identifizierte die Blutgruppenmerkmale A, B und O (später auch AB sowie den Rhesusfaktor) nachdem er Agglutinationserscheinungen beim Mischen von Blutproben bemerkt hatte. Landsteiner war es möglich seine Ergebnisse 1901 zu veröffentlichen und erhielt dafür im Jahre 1930 den Nobelpreis für Medizin.

Vgl. (18), (19), (20), (21), (22)

Ein weiterer Wegbereiter der Transplantationsmedizin war Alexis Carrel (1873-1944), ein französischer Chirurg. Er perfektionierte die Gefäßnaht und konnte damit die technischen Möglichkeiten der Organtransplantation erweitern. Mit dieser Technik räumte er große Hindernisse aus dem Weg. Zusammen mit Kollegen entdeckte Alexis Carrel zudem, dass die Konservierung von Organen bei künstlicher Hypothermie länger möglich sei, weil sich der Stoffwechsel unter diesen Bedingungen verringert. 1908 gelang ihm die erste Nierentransplantation bei einem Hund, der aber leider nur wenige Stunden überlebte. Für seine Arbeit an der Gefäßnaht und an der Transplantation von Blutgefäßen wie auch von Organen, erhielt Alexis Carrel im Jahre 1912 den Nobelpreis für Medizin.

Die unbekannte Problematik der Abstoßungsreaktion war in den nächsten 30 Jahren die Ursache dafür, dass die Organtransplantation mehr oder weniger praktisch aufgegeben wurde. Erst während des Zweiten Weltkrieges machte Peter Brian Medawar (1915-1987), ein englischer Zoologe, und Sir Frank Macfarlane Burnet (1899-1985), ein australischer Mediziner, eine neue Entdeckung: „die erworbene Immuntoleranz“. Peter Brian Medawar beschäftigte sich in den Jahren zuvor mit der Erforschung der Misserfolge von Hauttransplantationen beim Menschen. Im Jahre 1960 erhielten die beiden Wissenschaftler für ihre Entdeckung den Nobelpreis.

Aufgrund der misslungenen Transplantationen kam man im Jahre 1952 zur Annahme, dass eine TX nur bei eineiigen Zwillingen funktioniere. Daraufhin konnte 1954 die erste erfolgreiche syngene Nierentransplantation bei einem jungen Mann durchgeführt werden. Joseph E. Murray (1919-2012) und Edward D. Thomas (1920-2012) erhielten dafür im Jahre 1990 den Nobelpreis.

Dieser Erfolg legte den Grundstein für weitere Forschungen am Immunsystem. Jean Dausset (1916-2009), ein französischer Mediziner, beschrieb 1958 zum ersten Mal das Humane-Leukozyten-Antigensystem (HLA-System), eine zelluläre Oberflächenstruktur, die das Immunsystem steuert. So fand man heraus, dass der Schlüssel um eine Abstoßungsreaktion zu verhindern, die Suppression des Immunsystems war. Im Jahre 1980 erhielt Jean Dausset gemeinsam mit Baruj Benacerraf (1920-2011) und George D. Snell (1903-1996) den Nobelpreis für die Entdeckung von bestimmten genetischen Strukturen an der Zelloberfläche, die immunologische Reaktionen regulieren.

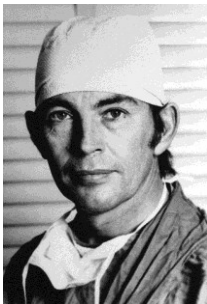
Vgl. (18), (19), (20), (21), (22)

In etwa zur gleichen Zeit, im Jahre 1959, führten Joseph E. Murray und Jean Hamburger (1909-1962), ein französischer Arzt, eine erfolgreiche allogene Nierentransplantation durch. Basierend auf den Entdeckungen von Dausset im Jahre 1958, führte Jean Hamburger danach in Frankreich 1962 eine Gewebetypisierung von Spendern und Empfängern ein.

Im Jahre 1959 wurde zum ersten Mal der Begriff „coma depasse“, ein klinischer Zustand des „irreversiblen Komas“, von zwei französischen Neurologen Pierre Mollaret (1898-1987) und Maurice Goulon (1919-2008) beschrieben. Ein paar Jahre später, 1968, wurde schließlich von einem Komitee der Harvard Medical School bestehend aus Juristen, Medizinern, Ethikern und Theologen der Hirntod dem Tod menschlichen Wesens gleichgesetzt und mit Symptomen beschrieben, die heute noch gültig sind.

In den 60er Jahren kam es zu weiteren wichtigen medizinischen Ereignissen, wovon zwei hier erwähnt sein sollen. Im Jahre 1965 wurde die Stiftung Eurotransplant gegründet um die bessere Verteilung von Organen zu ermöglichen. (siehe 1.2 Eurotransplant)

Vgl. (18), (19), (20), (21), (22)



Am 3.12.1967 wurde in Kapstadt von Christiaan Barnard (1922-2001), einem südafrikanischen Herzchirurgen, die weltweit erste orthotope Herztransplantation von Mensch zu Mensch durchgeführt.

Vgl. (14)

Abbildung 2 Christiaan Barnard (14)

Louis Washkansky, einem 53-jährigen weißen Mann, wurde das Herz der jungen Denise Darvall, die nach einem Autounfall am 2.12.1967 für hirntot erklärt wurde, eingepflanzt. Leider starb Louis Washkansky, als erster Mensch nach einer Herztransplantation, am 18. postoperativen Tag. Denise Darvall wurde, mit der Zustimmung ihres Vaters zur Organentnahme, die erste Spenderin für eine Herztransplantation am Menschen. Der verstorbenen weißen Frau wurde ebenso eine Niere entnommen, um das Leben eines 10-jährigen farbigen Jungen namens Jonathan van Wyk mit Nierenversagen zu retten. Diese Nierentransplantation sorgte damals für Aufregung in Südafrika, da zu diesem Zeitpunkt noch die auf Apartheid beruhende Politik herrschte. Vgl. (14)

Im Jahre 1970 machte die Pharmafirma Sandoz (heute Novartis) eine Entdeckung, die zu einem bedeutenden Aufschwung in der Transplantationsmedizin führte. Auf der Suche nach einem neuen Antibiotikum brachten Mitarbeiter der Firma Sandoz Bodenproben aus Norwegen nach Basel (Schweiz) in das Mikrobiologielabor. Aus einem Stamm (namens *Tolypocladium inflatum*) der Pilzkulturen, die man in diesen Proben gefunden hatte, konnten cyclische Polypeptide isoliert werden. Diese sollten später Cyclosporin genannt werden. Vgl. (15)



Der belgische Immunologe und Leiter der Abteilung, Jean-Francois Borel (*1933) und der schweizer Mikrobiologe Hartmann Stähelin (1925-2011) entdeckten, dass diese neue Substanz Lymphozyten selektiv hemmt.

Vgl. (15)



Abbildung 3 Jean-Francois Borel (127)

Abbildung 4 Hartmann Stähelin (127)

Im Jahre 1976 wurden diese fundamentalen Erkenntnisse erstmals publiziert. Die ersten Tierversuche zeigten vielversprechende Ergebnisse und die Substanz erwies sich effektiver, als andere Behandlungsmethoden zur Verhinderung einer Abstoßung. Bis zur Verwendung von Cyclosporin wurde vorwiegend mit Röntgenstrahlen, Cortison, Azathioprin oder anderen weniger wirksamen Methoden und Medikamenten versucht die Abstoßungsreaktion in Schach zu halten. Cyclosporin verbesserte die Überlebensrate von transplantierten Menschen radikal und war schnell fixer Bestandteil in der Transplantationsmedizin. Im Jahre 1983 wurde dann schließlich Cyclosporin mit dem Handelsnamen Sandimmun® von der Pharmafirma Sandoz auf den Markt gebracht.

Vgl. (15)

Von diesem Zeitpunkt an etablierte sich die Transplantation immer mehr als Behandlungsmethode, die Zahlen der TX verschiedener Organe, Zellen und Geweben stiegen, die Institutionen um die TX vermehrten sich und die Gesetzgeber wurden in dieser Hinsicht zunehmend aktiv.

2.2 Eurotransplant



Abbildung 5 Logo Eurotransplant (23)

Eurotransplant ist eine Stiftung mit Sitz in Leiden (Niederlande), die eine bestmögliche Verteilung von Spenderorganen in Österreich, Deutschland, Belgien, Kroatien, Slowenien, Luxemburg, Ungarn und in den Niederlanden mit Hilfe einer Datenbank gewährleistet. Die Zusammenarbeit von allen Transplantationszentren, mit den dazugehörigen Laboratorien zur Gewebetypisierung und allen Krankenhäusern, in denen Spenderorgane entnommen werden, macht es möglich den bestmöglichen Empfänger auf der Warteliste zu finden. Diese Organisation wurde 1965 von Professor Jon van Rood (*1926), einem niederländischen Immunologen und Mitentdecker des HLA Systems, gegründet. Als erster verfolgte dieser damals den Gedanken einer zentralen Datenbank, welche alle Patienten, die auf eine Spenderorgane warten, erfasst. Er konnte diese Idee in drei Staaten umsetzen und seither wurde das patientenorientierte Register auf 8 Staaten und andere weitere Organe (Herz, Leber, Lunge, Pankreas, Dünndarm) erweitert. Vgl. (23)

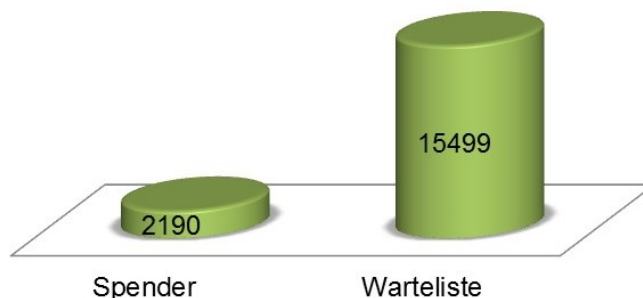


Tabelle 1 Anzahl der verstorbenen Spender und Patienten auf der Warteliste 2011 Vgl. (24)

Aus der jährlichen Statistik von Eurotransplant kann man in Tabelle 1 für das Jahr 2011 entnehmen, dass die Anzahl der Patienten auf der Warteliste, wie zu erwarten, die Anzahl der hirntoten Spender bei weitem übertrifft. Dies spiegelt eines der größten Probleme im Bereich der Transplantationsmedizin, den Organmangel, wider. Zusammengerechnet warten in allen acht Ländern in etwa 15.500 Menschen auf ein bzw. mehrere Spenderorgane und hirntote Spender gab es im Jahr 2011 rund 2200. Insgesamt konnten in allen Mitgliedsstaaten von Eurotransplant aus ca. 2200 Spendern, ca. 7500 Organe entnommen werden und diese ermöglichten 7200 durchgeführte Transplantationen. Vgl. (24)

2.3 Gesetzliche Regelungen der Transplantation in Europa

2.3.1 Österreich

Das Organtransplantationsgesetz vom 13. Dezember 2012 besagt:

„Entnahme von Organen Verstorbener zum Zwecke der Transplantation

§5. (1) Es ist zulässig, Verstorbenen einzelne Organe zu entnehmen, um durch deren Transplantation das Leben eines anderen Menschen zu retten oder dessen Gesundheit wiederherzustellen. Die Entnahme ist unzulässig, wenn den Ärztinnen/Ärzten eine Erklärung vorliegt, mit der die/der Verstorbene/Verstorbene oder, vor deren/dessen Tod, ihr/sein gesetzlicher Vertreter eine Organspende ausdrücklich abgelehnt hat. Eine Erklärung liegt auch vor, wenn sie in dem bei der Gesundheit Österreich GmbH geführten Widerspruchsregister eingetragen ist. Die Entnahme darf nicht zu einer die Pietät verletzenden Verunstaltung der Leiche führen.

(2) Die Entnahme darf erst durchgeführt werden, wenn eine/ein zur selbständigen Berufsausübung berechnigte/berechnigter Ärztin/Arzt den eingetretenen Tod festgestellt hat. Diese Ärztin/Dieser Arzt darf weder die Entnahme noch die Transplantation durchführen. Sie/Er darf an diesen Eingriffen auch sonst nicht beteiligt oder durch sie betroffen sein.“

(25)

Die österreichische Rechtslage besagt auch, dass der Wille des Patienten in Form eines Widerspruchs, sei es mündlich oder schriftlich, auf jeden Fall zu respektieren ist und jenem der nächsten Angehörigen vorzuziehen ist. Vgl. (26)

Mit dem vollendeten 16. Lebensjahr ist es jederzeit in Österreich möglich einen Widerspruch gegen die Entnahme von Organen, Organteilen oder Geweben im Widerspruchsregister zu dokumentieren. Das Österreichische Bundesinstitut für Gesundheitswesen (ÖBIG), ein Geschäftsbereich der Gesundheit Österreich GmbH, verwaltet dieses Widerspruchsregister, stellt online ein Formular (siehe im Anhang: B Formular für Eintrag in das Widerspruchsregister) zur Verfügung und ermöglicht so jedem österreichischen Staatsbürger den Eintrag in dieses Register. Im Falle einer potenziellen Organspende kann eine Abfrage im Widerspruchsregister zu jeder Uhrzeit von berechtigten Personen über die Notrufnummer der Vergiftungsinformationszentrale in Wien erfolgen. Vgl. (27), (28)

2.3.2 Andere europäische Länder

Neben Österreich gilt für die Entnahme von Organen bzw. Geweben toter Spender die Widerspruchsregelung auch noch in folgenden Ländern: Italien, Luxemburg, Portugal, Schweden, Slowenien, Spanien, Tschechien und Ungarn. Vgl. (29)

Es gibt allerdings noch andere Lösungsansätze, wie z.B.:

- Widerspruchsregelung mit Einspruchsrecht der Angehörigen:

Diese Regelung hat sich in Belgien, Finnland und Norwegen durchgesetzt. Vgl. (29)

- Entscheidungslösung:

Am 01. November 2012 wurde in Deutschland die erweiterte Zustimmungsregelung durch die Entscheidungslösung im deutschen Transplantationsgesetz TPG, welches im Jahre 1997 ursprünglich in Kraft getreten ist, ersetzt. Vgl. (30)

Das TPG regelt in Deutschland die Übertragung, Spende und Entnahme von Organen bzw. Geweben und besagt:

„§ 1 Ziel und Anwendungsbereich des Gesetzes

(1) Ziel des Gesetzes ist es, die Bereitschaft zur Organspende in Deutschland zu fördern. Hierzu soll jede Bürgerin und jeder Bürger regelmäßig im Leben in die Lage versetzt werden, sich mit der Frage seiner eigenen Spendebereitschaft ernsthaft zu befassen und aufgefordert werden, die jeweilige Erklärung auch zu dokumentieren. Um eine informierte und unabhängige Entscheidung jedes Einzelnen zu ermöglichen, sieht dieses Gesetz eine breite Aufklärung der Bevölkerung zu den Möglichkeiten der Organ- und Gewebespende vor. (...)

§ 3 Entnahme mit Einwilligung des Spenders

(1) Die Entnahme von Organen oder Geweben ist (...) nur zulässig, wenn

- 1. der Organ- oder Gewebespender in die Entnahme eingewilligt hatte,*
- 2. der Tod des Organ- oder Gewebespenders nach Regeln, die dem Stand der Erkenntnisse der medizinischen Wissenschaft entsprechen, festgestellt ist und*
- 3. der Eingriff durch einen Arzt vorgenommen wird.“ (31)*

In Deutschland erhalten alle krankenversicherten Bürger mit Vollendung des 16. Lebensjahres Informationsmaterial zur Organspende und einen blanko Organspendeausweis (siehe im Anhang: C Organspendeausweis in Deutschland).

Die Versicherten sollen damit die Möglichkeit haben eine Erklärung zum Thema Organspende zu dokumentieren und können diese anschließend freiwillig abgeben. Vgl. (32)

○ Erweiterte Zustimmungsregelung:

Diese Regelung sieht vor, dass jeder Staatsbürger zu Lebzeiten die Möglichkeit hat einer postmortalen Organentnahme zuzustimmen, z.B.: in Form eines Organspendeausweises. Wenn keine Zustimmung zu Lebzeiten erfolgte, dann können die nächsten Angehörigen, im Sinne des geäußerten Willens des Verstorbenen, über eine Organspende entscheiden. Diese gesetzliche Regelung gilt in Dänemark, Griechenland, England, Irland, Schweiz und in den Niederlanden. Vgl. (29)

○ Informationsregelung:

Der Gesetzgeber geht in diesem Fall davon aus, dass eine Bereitschaft zur Organspende besteht, wenn kein Widerspruch des Verstorbenen zu Lebzeiten eingelegt wurde. Die Angehörigen werden über die Explantation informiert und können keinen Einspruch erheben. In Frankreich und Schweden ist diese Regelung gültig. Vgl. (29)

2.4 Die Organtransplantation aus religiöser Sicht

2.4.1 Das Christentum

„Die Organspende ist eine besondere Form des Zeugnisses der Nächstenliebe.“ (33)

Papst Benedikt XVI, 07. November 2008
Internationaler Kongress der päpstlichen Akademie

Die evangelische und katholische Kirche befürwortet den bemerkenswerten medizinischen Fortschritt und unterstützt die Organspende, um eine Gewebe- bzw. Organtransplantation zu ermöglichen, die wiederum das Leben eines anderen Menschen verlängern, verbessern oder sogar erhalten kann. Der Tod ist zwar das unumgängliche Ende unseres irdischen Lebens, trotzdem begrüßt das Christentum diese medizinische Chance um Krankheiten zu heilen. Im Jahre 1990 haben die Deutsche Bischofskonferenz und der Rat der Evangelischen Kirche in Deutschland eine Arbeitsgruppe zusammengestellt, um das Thema Transplantation von Mensch zu Mensch zu beleuchten und sind zu folgendem Schluss gekommen. Vgl. (34)

„Aus christlicher Sicht gibt es keinen grundsätzlichen Einwand gegen eine freiwillige Organspende.“ (34)

„Nach christlichem Verständnis ist das Leben und damit der Leib ein Geschenk des Schöpfers, über das der Mensch nicht nach Belieben verfügen kann, das er aber nach sorgfältiger Gewissensprüfung aus Liebe zum Nächsten einsetzen darf.“ (34)

„Daß das irdische Leben eines Menschen unumkehrbar zu Ende ist, wird mit der Feststellung des Hirntodes zweifelsfrei erwiesen. (...)Wenn die unaufhebbare Trennung vom irdischen Leben eingetreten ist, können funktionsfähige Organe dem Leib entnommen und anderen schwerkranken Menschen eingepflanzt werden, um deren Leben zu retten und ihnen zur Gesundheit oder Verbesserung der Lebensqualität zu helfen.“ (34)

Auch im Katechismus der katholischen Kirche (Dritter Teil-Zweiter Abschnitt-Die zehn Gebote-Das fünfte Gebot) steht geschrieben: Vgl. (35)

„476 (...)Die Organverpflanzung ist sittlich annehmbar, wenn der Spender seine Zustimmung gegeben hat und keine übermäßigen Gefahren für ihn bestehen. Für die edle Tat der Organspende nach dem Tod muss der tatsächliche Tod des Spenders sicher feststehen.“ (35)

2.4.2 Jehovas Zeugen

Jehovas Zeugen sind eine internationale christliche Religionsgemeinschaft, die seit 2009 in Österreich als solche anerkannt ist. Die Glaubensansichten basieren einzig und allein auf der Heiligen Schrift. Vgl. (36)

Die Zeugen Jehovas lehnen die Transfusion von Vollblut aufgrund biblischer Gebote ab und bestehen deswegen auf Behandlungsalternativen. Vgl. (37)

Die Heilige Schrift besagt:

„²³ Nur halte daran fest, dass du das Blut nicht essest; denn das Blut ist die Seele, und du sollst die Seele nicht mit dem Fleisch essen.“ 5. Moses 12: 23 (38)

„¹ Und der Herr redete mit Mose und sprach: (...) ¹⁰ Und wider einen jeden, der irgend Blut isst, sei er aus dem Haus Israel oder von den Fremden, die unter ihnen wohnen, wider einen solchen, der Blut isst, werde ich mein Angesicht wenden und ihn aus dem Volk ausrotten. ¹¹ Denn die Seele des Fleisches ist im Blute, und ich habe es euch für den Altar gegeben, dass man euch damit Sühne einwirke;“ 3. Moses 17: 1, 10, 11 (38)

Da die Bibel keine klaren Aussagen über die Verwendung maschineller Autotransfusion oder der Verabreichung von Blutfraktionen beinhaltet, muss jeder Christ für sich selbst überlegen, in wieweit er mit einer Behandlung dieser Art einverstanden ist. Eine offizielle Webseite der Zeugen Jehovas besagt auch, dass die Einwilligung in eine Organtransplantation oder Organspende, sofern dies ohne Übertragung von Blut möglich ist, die private Gewissensentscheidung jedes einzelnen Christen ist. Vgl. (37)

Diese Ansicht entwickelte sich allerdings erst im Laufe des 20. Jahrhunderts, denn in „Der Wachturm“, einer religiösen Zeitschrift der Zeugen Jehovas, hieß es in einer Ausgabe im Jahre 1968, dass eine Organtransplantation Kannibalismus sei. Bei einer TX isst der Mensch das Fleisch eines anderen und Gott gab nicht die Erlaubnis, durch die Aufnahme von Menschenfleisch Leben zu verlängern. Es wurden ebenso Organspenden „nicht erlaubt“, da ein Christ über seinen Körper nicht selbst verfügen darf, da er ihn Gott hingegeben hat um seinen Willen zu erfüllen. Im Jahre 1980 änderten sich diese Überzeugungen und „Der Wachturm“ veröffentlichte, dass in der Bibel zwar die Aufnahme von Blut, jedoch nicht die von menschlichen Geweben verboten ist und es würde daher keine disziplinären Folgen für Jehovas Zeugen geben. Vgl. (39)

2.4.3 Der Islam

„Wie für das Christentum und das Judentum gilt auch für den Islam, daß er verschiedene Richtungen und einen gewissen Pluralismus der Auffassung kennt. (...) In Einzelfragen der Transplantationsmedizin bestehen zwischen den sunnitischen Rechtsschulen und der schiitischen Rechtsauffassung Unterschiede. (...) Zur Feststellung des Todeszeitpunkts liegt allerdings ein Gutachten der Internationalen Versammlung für islamisches Rechtswesen vom Oktober 1986 vor, das breite Akzeptanz in alle islamischen Ländern gefunden hat und bei der Thematik von Hirntodkriterium und postmortalen Organspende als islamischer Grundsatz gilt. (...) Nach diesem Rechtsgutachten gilt ein Mensch als tot (...) Bei vollständigem irreversiblen ärztlich festgestellten Herz- und Atemstillstand (...) irreversiblen ärztlich festgestellten Ausfall der Hirnfunktion, auch wenn die Herz- und Atemfunktion noch mechanisch aufrechterhalten wird (...) Die Transplantationsmedizin wird vom Islam grundsätzlich positiv bewertet. Organtransplantationen gelten als >>eine erlaubte lobenswerte Handlung und wohltätige Hilfeleistung<< (...) die (...) weder den islamischen Vorschriften noch der islamischen Auffassung von Menschenwürde widerspricht. (...) Die Organentnahme von Verstorbenen, selbst die Verwendung von technischen und sogar tierischen Material wird aber der Lebendspende vorgezogen. (...) Nach sunnitischer Rechtsmeinung können sowohl Muslime als auch Anhänger anderer Offenbarungsreligionen und Nichtgläubige als Organspender wie als Organempfänger akzeptiert werden. Begründet wird dies mit dem Hinweis auf die allen Menschen unabhängig von ihrer weltanschaulichen Überzeugung von Gott verliehene Würde. (...) Die schiitische Rechtsschule erlaubt Muslimen den Empfang eines Fremdorgans, und zwar sowohl von anderen muslimischen wie nichtmuslimischen Spendern. (...). Die Organentnahme von einem Muslim ist nach schiitischer Meinung allerdings generell verboten und darf nur erfolgen, wenn sie für die Lebenserhaltung eines anderen Muslims notwendig ist (...).“ (40)

2.5 Die Herztransplantation

2.5.1 Daten aus Österreich im internationalen Vergleich

Laut einer Statistik der Stiftung Eurotransplant befanden sich im Jahr 2011 in Österreich 887 Menschen auf der Wartliste für ein Spenderorgan, davon warteten 67 Patienten, im Endstadium ihrer Erkrankung, auf ein Herz. Vgl. (24)

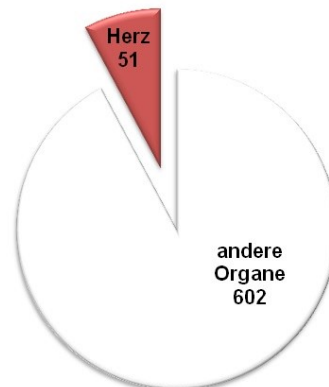


Tabelle 2 Anzahl der durchgeführten Transplantationen in Österreich 2011 Vgl. (24)

In Österreich konnten im Jahre 2011 aus 195 Spendern 673 Organe explantiert und 653 Transplantationen vorgenommen werden. Wie in der Tabelle 2 zu sehen ist, waren von diesen 653 Transplantationen, 51 Herztransplantationen. In Österreich werden HTX an 3 (Universitätsklinikum Landeskrankenhaus Graz, Universitätsklinik Innsbruck und Allgemeines Krankenhaus Wien) von den 7 Transplantationszentren durchgeführt.

Vgl. (24)

Jeder Verstorbene im Alter von 0-90 Jahren darf in Österreich explantiert werden, außer der Verstorbene hat Widerspruch eingelegt, einen metastasierenden Tumor, ist HIV positiv oder befand sich zum Zeitpunkt des Sterbens im septischen Schock. In diesen Fällen ist eine Entnahme von Organen und Organteilen absolut kontraindiziert. Die Spender sind in ca. $\frac{2}{3}$ der Fälle über 45 Jahre alt und mit einem nahezu ausgeglichenen Verhältnis weiblich bzw. männlich. Im Vergleich dazu sind weltweit die Spender ca. 33 Jahre alt und in etwa 70 % davon Männer. Die Organspender in Österreich sterben in $\frac{2}{3}$ der Fälle an zerebrovaskulären Ereignissen und in den restlichen $\frac{1}{3}$ der Fälle an Schädelhirntraumata, anderen Traumata bzw. anderen nicht näher bezeichneten Ätiologien. Weltweit sterben in etwa die Hälfte der Organspender an einem Schädelhirntrauma und die andere Hälfte an einem zerebrovaskulären Ereignis bzw. anderen Ursachen. Etwa 60% der

Herztransplantierten in Österreich sind über 45 Jahre und in 80% der Fälle männlich. Weltweit zeigt sich ein durchschnittliches Alter von 51 Jahren bei Herztransplantierten mit einer nahezu gleichen prozentuellen Geschlechterverteilung.

Vgl. (26), (41)

2.5.2 Der Weg zur Herztransplantation

Das Endstadium einer Herzinsuffizienz mit massiver klinischer Symptomatik, fortschreitender schlechter Prognose und dem Fehlen weiterer medikamentöser Therapieoptionen, stellt die Indikation für eine Herztransplantation dar. Wenn alle pharmakologischen, interventionellen und chirurgischen Möglichkeiten ausgeschöpft sind und keine Besserung der subjektiven Beschwerden eintritt, ist die Herztransplantation der Goldstandard für Patienten im terminalen Stadium. Vgl. (42)

Folgende Transplantationsgründe mit gerundeter prozentueller Häufigkeit zeigen sich in der Literatur:

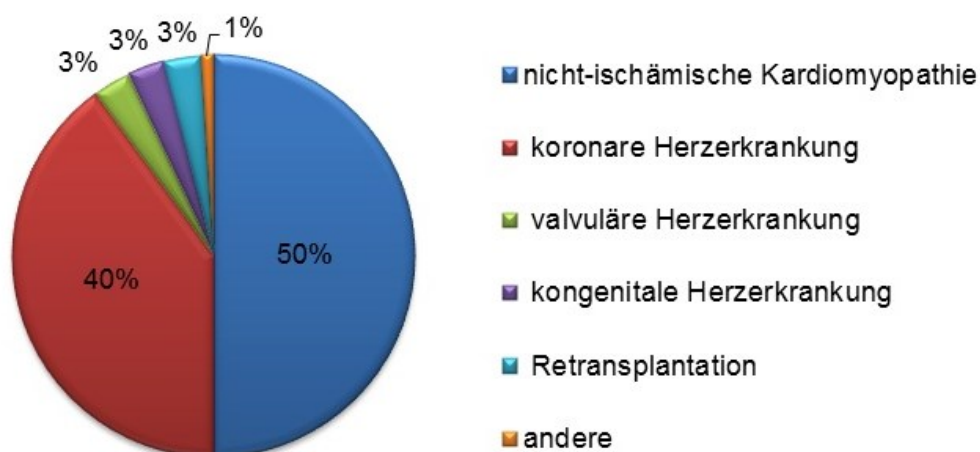


Tabelle 3 Transplantationsgründe Vgl. (41)

Definition der Herzinsuffizienz:

„Unter dem Begriff Herzinsuffizienz versteht man pathophysiologisch eine Funktionsstörung des Herzens mit herabgesetztem Herzzeitvolumen, in deren Folge nicht genügend Blut durch die Körperperipherie gepumpt wird, um die Durchblutung aller Organe in Ruhe sowie unter Belastung zu gewährleisten und ihren metabolischen Bedarf zu decken.“ (43)

Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz nach der New York Heart Association:

NYHA-Stadium	Subjektive Beschwerden bei HI
I	<i>Beschwerdefreiheit, normale körperliche Belastbarkeit</i>
II	<i>Beschwerden bei stärkerer körperlicher Belastung</i>
III	<i>Beschwerden schon bei leichter körperlicher Belastung</i>
IV	<i>Beschwerden in Ruhe</i>

Tabelle 4 NYHA-Stadien (44)

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind eine der führenden Todesursachen in Europa und den USA. Laut einer Statistik der Weltgesundheitsorganisation zur Mortalität nichtübertragbarer Krankheiten im Jahre 2008, starben in Österreich von 710 Menschen pro 100.000 Einwohner, 44% an kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes. Zudem starben im Vergleich dazu in etwa 35% an Krebs. In Deutschland kam es im Jahre 2008 zu einer Mortalität von 750/100.000 Einwohner. Rund 46% dieser Menschen erlagen ihrer kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes, in etwa 34% einem kanzerogen Geschehen. In den USA kam es im Jahre 2008 zu 784/100.000 Todesfällen. Davon sind ca. 40% an kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes sowie ca. 31% an Krebs verstorben.

Vgl. (45)

Bevor eine Herztransplantation an einem Patienten durchgeführt wird, sollte man sicherstellen, dass der Patient gut informiert, motiviert und in der Lage ist, den intensiven postoperativen Behandlungen nachzukommen. Die HTX verbessert das Überleben, die Lebensqualität und eine berufliche Wiedereingliederung ist in den meisten Fällen wieder möglich. Vgl. (42)

Die Verfügbarkeit eines Spenderherzens ist nicht vorhersehbar und so auch nicht der Operationstermin der lebensnotwendigen Herztransplantation. Dazu kommt, dass die Zahl an Spenderherzen bei weitem nicht den Bedarf der Patienten auf der Wartliste decken kann. Daraus resultieren unerwartet lange Wartezeiten, die im Rahmen einer interdisziplinären Betreuung überbrückt werden müssen. Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz mit akuter oder chronischer Dekompensation, denen kein Multiorganversagen droht, werden auf Intensivstationen medikamentös, interventionell und chirurgisch betreut. Wenn all diese Therapiemaßnahmen nicht zum Erfolg führen bzw.

der Patient nicht stabilisiert werden kann, können mechanische Kreislaufunterstützungen (VAD) „als bridging“ zum Einsatz kommen. Ventricular assist devices sind mechanische Kreislaufunterstützungen, die entweder intra- oder extrakorporal liegen und eine operative Implantation benötigen. Vgl. (46), (47), (48)

„Die möglichen Ziele einer Kreislaufunterstützung sind:

- 1. Überbrückung bis zu einer weiteren Entscheidung (bridge to decision)*
- 2. Überbrückung bis zur Organerholung (bridge to recovery)*
- 3. Überbrückung bis zu einer definitiven Entscheidung, ob HTx sinnvoll oder möglich (bridge to candidacy)*
- 4. Überbrückung bis zur HTx (bridge to transplant)*
- 5. Definitiver Organersatz (destination therapy oder alternative to transplantation)“ (49)*

Patienten, die leider für eine Herztransplantation nicht geeignet sind, können von einer Organersatztherapie profitieren. Neue Ergebnisse zeigen, dass mechanische Systeme eine 1-Jahresüberlebensrate von 86% aufweisen. Bei dieser alternativen Therapie zur Herztransplantation können trotz laufender Optimierungen folgende Komplikationen auftreten: Blutungen, Thrombembolien, Infektionen und Geräteversagen. Zudem sind die Pumpen selbst und die Implantationen dieser mechanischen Systeme sehr kostspielig.

Vgl. (49)

2.5.3 Die lebensrettende Operation

In der Regel wird eine orthotope Herztransplantation nach medianer Sternotomie mithilfe einer Herz-Lungen-Maschine vorgenommen. Die heterotope HTX wird praktisch nicht mehr durchgeführt, da sich zeigte, dass die Belassung des Empfängerherzens und der seitliche Anschluss des Spenderherzens in der rechten Pleurahöhle deutlich schlechtere klinische Ergebnisse hatte. Das Spenderherz wird meist im Rahmen einer Multiorganentnahme explantiert. Das Herz wird noch schlagend im Spender beurteilt („plaquefreier“ Abgang der Koronargefäße), nach Abklemmen sowie Kanülierung der Aorta ascendens und Eröffnen der Vena cava superior wie auch der Vena cava inferior mit einer 4°C kalten Kardioplegielösung (wie z.B.: Celsior®) perfundiert. Besonderes Augenmerk muss daraufgelegt werden, dass es während der Explantation nicht zu einer Volumenbelastung des rechten Herzens kommt. Das Spenderherz wird zur gleichen Zeit

von außen mit Kochsalzlösung gekühlt und nach der Entnahme in einen 3-fach sterilen Beutel aufbewahrt. Das Spenderherz wird in einer eisgefüllten Kühlbox transportiert und hat eine Ischämietoleranz von bis zu 4 Stunden. Es gibt verschiedene operative Techniken einer Herztransplantation, wie zum Beispiel die Technik nach Lower (Richard Lower, *1929- +2008) und Shumway (Norman E. Shumway, *1923- +2006), die bicavale Technik oder die total orthotope Herztransplantation. Bei der genannten klassischen Technik nach Lower und Shumway, die erstmals 1960 beschrieben wurde, wird das Empfängerherz an der Grenze zwischen Atrium und Ventrikel durchtrennt. Für die darauffolgende Transplantation bleiben die beiden Vorhöfe, die Aorta und die Pulmonalarterie des Empfängers erhalten. Die neuen, relativ großen Vorhöfe bestehen danach aus dem des Empfängers und Spenders. Im Gegensatz zu der Technik nach Lower und Shumway, wird bei der bicavalen Anastomose der rechte Vorhof des Empfängers entfernt und das rechte Atrium des Spenderherzens mit den beiden Hohlvenen anastomosiert. Im Jahre 1991 veröffentlichte Gilles Dreyfuss (*1951), ein französischer Herzchirurg, mit Kollegen den Artikel „Total orthotopic heart transplantation: An alternative to the standard technique“ in der Zeitschrift „The Annals of Thoracic Surgery“. Da die Inzidenz einer AV-Klappeninsuffizienz bei einer Herztransplantation nach Lower und Shumway erhöht ist, entwickelte Dreyfuss mit seinen Kollegen die Technik der totalen orthotopen Herztransplantation. Das Empfängerherz wird dabei komplett entfernt und das Spenderherz mit beiden Atrien und Ventrikel anastomosiert. Patienten mit Klappenvitien oder erweiterten Vorhöfen profitieren von dieser Methode. Die total orthotope Herztransplantation wird in manchen Zentren routinemäßig durchgeführt und verlängert die Operationsdauer nicht wesentlich. Vgl. (50), (51), (52), (53)

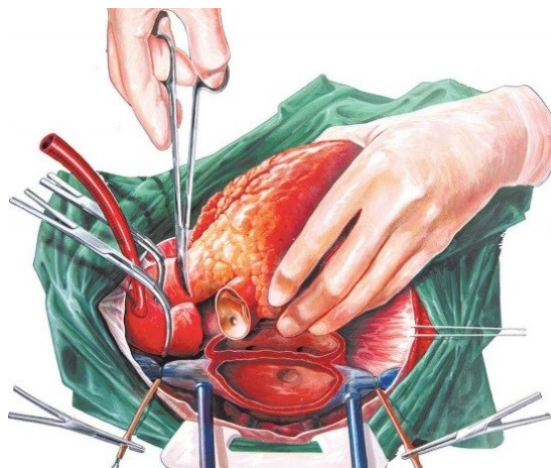


Abbildung 6 Zeichnung von L. Metznerbauer 1984 (54)

2.5.4 Die Zeit nach der Herztransplantation

Ein Bericht der internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation „ISHLT“ veröffentlichte, dass die Überlebensrate eines Herztransplantierten nach einem Jahr bei in etwa 90%, nach 5 Jahren um die 80% und nach 10 Jahren bei ca. 50% liegt. Die perioperative Mortalität einer HTX liegt in etwa bei 7%. Die Handhabung der Langzeitkomplikationen der lebensnotwendigen Immunsuppressiva ist nach einer Herztransplantation die Herausforderung. Das Transplantatversagen, die Abstoßungsreaktion, die Transplantatvaskulopathie (CAV- Cardiac Allograft Vasculopathy), Infektionen und Malignitäten machen neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren einem Patient nach einer Herztransplantation zu schaffen. Vgl. (55), (56)

Die Transplantate versagen wenn meist schon in den ersten 30 Tagen postoperativ. Im ersten Jahr und vor allem in den ersten Monaten nach der HTX bereiten vorwiegend nosokomiale, wie auch katheterassoziierte Infektionen dem Patient Schwierigkeiten und sind erheblich für die Frühsterblichkeit von Herztransplantierten verantwortlich. Im ersten Jahr bzw. in den ersten 6 Monaten nach einer Transplantation ist die Häufigkeit von Abstoßungsreaktionen am größten. Trotz Immunsuppression kann eine Abstoßung auftreten und der Patient daran in weiterer Folge versterben. Die meisten Patienten sind anfänglich im Rahmen einer Abstoßungsreaktion noch asymptomatisch und daher ist es von wesentlicher Bedeutung regelmäßige Biopsien durchzuführen, um eine eventuelle Abstoßung frühzeitig zu erkennen. Bei fortgeschrittener Abstoßungsreaktion zeigen sich beispielsweise folgende unspezifischen Beschwerden: Unruhe, Fieber oder Dyspnoe. In diesem Stadium kann es aber allerdings schon zu spät für den Patienten sein.

Vgl. (41), (55), (50)

Die Endomyokardbiopsie ist der Goldstandard für die Früherkennung von Abstoßungsreaktionen. Die Klassifikation der zellulären Abstoßungsreaktion erfolgt nach den Leitlinien der ISHLT „The ISHLT Guidelines For The Care Of Heart Transplant Recipients“. Die erste histologische Klassifikation für Abstoßungsreaktionen nach Herztransplantationen wurde 1990 veröffentlicht und war in 7 Grade eingeteilt. Im Jahre 2005 wurde eine überarbeitete Version dieser Klassifikationen publiziert und ist so in den Richtlinien von 2010 gültig. Vgl. (56)

Grade (R= revised)	
0R	keine zelluläre Abstoßung
1R	milde zelluläre Abstoßung
2R	moderate zelluläre Abstoßung
3R	schwere zelluläre Abstoßung

Tabelle 5 Grade der Abstoßungsreaktion Vgl. (56)

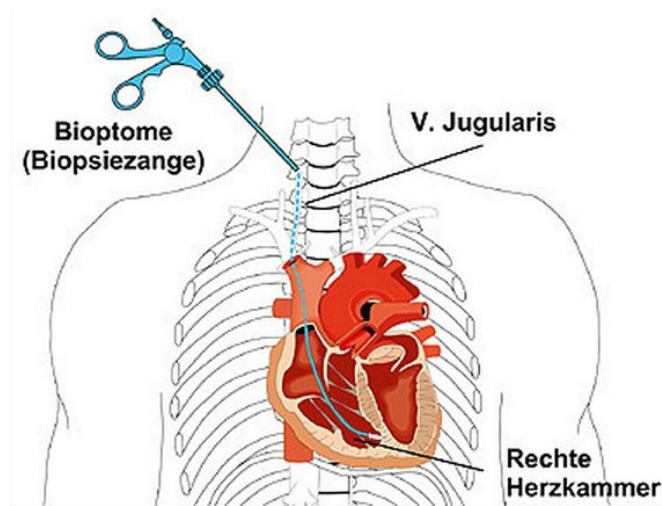


Abbildung 7 Durchführung einer EMB (57)

Das Überleben wird im ersten postoperativen Jahr von Graftversagen, Infektionen und Abstoßungsreaktionen bestimmt. Das Langzeitüberleben der Herztransplantierten wird zum größten Teil durch die Entwicklung der Transplantatvaskulopathie limitiert. Bei der CAV, im Gegensatz zur fokalen Arteriosklerose im nicht transplantierten Herz, treten diffuse sowie konzentrische Intimaschäden auf, die schnell fortschreiten. Die Prävalenz der CAV beträgt bereits nach dem ersten postoperativen Jahr 10% und nach 5 Jahren 50%. Der intravaskuläre Ultraschall und die jährlich durchgeführten Koronarangiographien bieten die Möglichkeit das Ausmaß der CAV zu quantifizieren, um frühzeitig einschreiten zu können. Die Denervierung des transplantierten Herzens verhindert ein Auftreten von Angina pectoris Beschwerden und so zeigt die frühe CAV einen asymptomatischen Verlauf. Symptome treten meist erst dann auf, wenn die Erkrankung mehr oder weniger mit therapeutischen Interventionen nicht mehr aufzuhalten ist. Die Therapieoptionen der CAV sind bescheiden, daher muss man hier auf Prophylaxe und Früherkennung setzen. Vgl. (58)

Nach einer Herztransplantation steigt der diastolische wie auch der systolische Blutdruck an. Bis zu 95% der erwachsenen Herztransplantierten leiden 5 Jahre nach der Operation an einem arteriellen Hypertonus. Im Gegensatz zum essentiellen Hypertonus lässt sich dieser sekundäre Hypertonus nach einer Herztransplantation nicht durch die herkömmlichen Risikofaktoren beeinflussen und kann daher nur symptomatisch behandelt werden.

Vgl. (56), (59)

Die Langzeiteinnahme von Immunsuppressiva ist neben der Entwicklung einer CAV und eines arteriellen Hypertonus auch ein großer Risikofaktor für Diabetes mellitus. In den ersten 5 Jahren nach einer Herztransplantation tritt bei 35% der Patienten ein Diabetes mellitus auf. Die Therapie ist dieselbe wie bei einem Diabetes mellitus Typ II nicht transplantierten Patienten. Dieser neu aufgetretene Diabetes mellitus nach einer Herztransplantation ist mit Komplikationen wie Infektionen, CAV und Graftversagen vergesellschaftet. Dazu kommt, dass in etwa 11% der Herztransplantierten nach 5 Jahren und 30% nach 10 Jahren eine chronische Niereninsuffizienz aufweisen. Vgl. (56)

Malignitäten sind im Langzeitüberleben einer der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität. Auch hier ist die chronische Immunsuppression ein Risikofaktor für die Entstehung. Die Prävalenz bei Erwachsenen liegt bei ca. 15% nach 5 Jahren postoperativ und bei in etwa 32% nach 10 Jahren. Die häufigsten malignen Veränderungen findet man in der Haut und in Form von Lymphomen. Solide Tumore findet man bei Herztransplantierten unter chronischer Immunsuppression am häufigsten in der Lunge und der Prostata. Zur Prophylaxe dient eine Minimierung der Dosierung der essentiellen Immunsuppressiva und zur Früherkennung werden die Patienten angehalten sich regelmäßigen Screening-Untersuchungen zu unterziehen, wie zum Beispiel die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens PSA im Blut. Vgl. (56)

2.6 Der Ischämie/Reperfusionsschaden

In der westlichen Zivilisation zählen kardiovaskuläre Erkrankungen zu den häufigsten Todesursachen und machen rund 40% der gesamten Mortalität aus. Vgl. (5)

„Der Anteil der Patienten, die an Herz-Kreislauf-Beschwerden leiden, ist in Europa im Verlauf des letzten Jahrhunderts stetig gestiegen. Gründe dafür sind in erster Linie die Verbesserung der medizinischen Grundversorgung, die verbesserte Hygiene sowie der wachsende Wohlstand, wodurch Infektionskrankheiten, welche noch im 19. Jahrhundert die häufigste Todesursache darstellten, deutlich zurückgegangen sind. In der zunehmend alternden Bevölkerung von heute steigt somit die Prävalenz von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, welche v.a. in den späteren Lebensdekaden vorkommen. Zusätzlich bedingt der wachsende Wohlstand die Zunahme von sog. Wohlstandserkrankungen, welche durch das relative Überangebot von Nahrung sowie körperlicher Inaktivität bedingt sind. Dies führte zu einer massiven Zunahme von Übergewichtigkeit (Adipositas), Diabetes und anderen Risikofaktoren für Herz-Kreislauf-Erkrankungen. In den letzten 25 Jahren stagniert die Prävalenz der kardiovaskulären Erkrankungen allerdings, es ist sogar (v.a. bei Männern) eine leichte Abnahme festzustellen. Dies wird sowohl auf die zunehmende Verbesserung der Primärintervention (z.B. Rauchverbot), als auch auf eine zunehmende Sensibilisierung der Bevölkerung zurückgeführt.“ (60)

Trotz zahlreicher Weiterentwicklungen in der Therapie des akuten Myokardinfarktes, spielt dieser nach wie vor eine wesentliche Rolle in der Mortalität westlicher Länder. Neben der intravenösen Verabreichung von neuen Medikamenten, brachte die Reperfusionstherapie in den 80er-Jahren den Durchbruch in der Behandlung des akuten Myokardinfarktes und verbesserte dadurch die Prognose merklich. Im Laufe der Zeit beobachtete man allerdings, dass die Prognose dieser Patienten trotz frühestmöglicher und erfolgreicher Reperfusion des ischämischen Areals, aufgrund der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, schlecht blieb. Solche Begebenheiten bemerkte man auch bei Operationen mit kardiopulmonalem Bypass. Die myokardiale Funktion verschlechterte sich, obwohl der Blutfluss wiederhergestellt wurde. Die Ursache dafür ist der Reperfusionsschaden. Vgl. (6), (5)

Beim akuten Myokardinfarkt, bei Operationen mit kardiopulmonalem Bypass sowie bei der Herztransplantation kann es zu einer ausgedehnten Ischämie kommen, die das Leben der Zellen und letztendlich die Funktion des Herzen gefährdet. Je nach Dauer der Ischämie bis zur Reperfusion wird das Myokard irreversibel geschädigt oder erholt sich wieder. Eine kurzanhaltende Ischämie (bis zu 20 Minuten) bis zur Wiederherstellung des Blutflusses resultiert in einem reversiblen Myokardschaden und im vorerst ischämischen Myokard lässt sich auch keine Nekrose nachweisen. Die Einschränkung der Kontraktilität ist nur vorübergehend und erholt sich wieder vollständig, entweder gleich bzw. erst nach einer gewissen Zeit. Diese anhaltende kontraktile Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion wird als „myocard stunning“ bezeichnet. Eine länger andauernde Ischämie (ab 45 Minuten) verursacht irreversible Myokardschäden und eine Nekrose der Zellen. Die Wiederherstellung des Blutflusses und der Sauerstoffversorgung ist zwar für das Überleben der Zellen bzw. des Organismus lebensnotwendig, jedoch präsentiert sich der essentielle Sauerstoff in der Reperfusion des zuvor ischämischen Myokards als schädlich. Die pathologischen Veränderungen nach der Wiederherstellung physiologischer Bedingungen sind eine Folge der Reperfusion. Vgl. (6), (5)

2.6.1 Oxidativer Stress

„Die Fähigkeit zur sauerstoffabhängigen Oxidation wasserstoffübertragender Coenzyme hat allen aerob lebenden Organismen eine außerordentliche effektive Energiequelle erschlossen, die ihnen eine deutliche Überlegenheit über anaerobe Organismen gegeben hat. (...) Ein Nachteil dieser Entwicklung ist allerdings, dass bei sauerstoffabhängigen Redoxreaktionen spontan oder enzymkatalysiert sog. reaktive Sauerstoffspezies entstehen, die außerordentlich reaktiv und deswegen schädlich für Biomoleküle sind (...).“ (7)

„Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, „reactive oxygen species“) werden fortlaufend im Körper gebildet und durch antioxidative Abwehrmechanismen wieder entfernt. Oxidativer Stress entsteht entweder durch eine erhöhte Exposition gegenüber Oxidanzien oder eine erniedrigte antioxidative Kapazität.“ (8)

Die RONS (reactive oxygen and nitrogen species) sind freie Radikale und entstehen laufend bei pathologischen sowie physiologischen Prozessen im menschlichen Körper. Vgl. (61)

„Ein freies Radikal ist definiert als ein Atom, eine Atomgruppe oder ein Molekül, das ein oder mehrere ungepaarte Elektronen in einem äußeren Orbital enthält (...).“ (61)

Diese freien Radikale sind unter anderem für den Reperfusionsschaden des Myokards nach vorausgegangener Ischämie verantwortlich. Es zeigte sich, dass die Reperfusion eine Beeinträchtigung der myokardialen Funktion hervorruft, antioxidative Interventionen den Myokardschaden verringern und die Wiederherstellung des Blutflusses im ischämischen Myokard zu einer übermäßigen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt. Mittels Elektronen-Paramagnetischen-Resonanzspektroskop kann man direkt die Bildung von freien Radikalen im Labor messen. Diese Untersuchungsmethode ist durch die paramagnetische Eigenschaft der freien Radikale möglich. Zu den freien Radikalen gehören: Sauerstoffanion O_2^- , Hydroxylradikal OH und Wasserstoffperoxid H_2O_2 . Freie Radikale greifen die DNA, Proteine sowie Membranlipide an und führen zu teils schwerwiegenden Schäden. Die Proteine können ihre Struktur und Funktion sowie die Membrankanäle ihre Permeabilität verändern. ROS führen zu einer Peroxidation der Membranlipide und diese leitet schließlich den Zelltod ein. Das primäre Ziel des oxidativen Stresses, bzw. des Ungleichgewichtes zwischen freien Radikalen und der antioxidativen Kapazität, ist das Endothel. Die endotheliale Dysfunktion ist die Folge der gekippten Balance und ist beteiligt bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, wie auch ihren Risikofaktoren, zum Beispiel dem arteriellen Hypertonus. Die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase sorgen unter physiologischen Bedingungen dafür, dass die ROS eliminiert werden und keinen Schaden anrichten können. SOD eliminiert in erster Linie Superoxid durch Konvertierung zu H_2O_2 . Glutathionperoxid und Katalase spalten dann H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff. Während der Ischämie bzw. Reperfusion ist jedoch die Aktivität des antioxidativen Systems sehr eingeschränkt. In einer Studie erwies sich die Überexpression von SOD in Ratten nach einem Herzinfarkt als überaus protektiv und verringerte den ischämischen Schaden.

Vgl. (62), (5), (6), (7), (9)

2.6.2 NO, Stickstoffmonoxid

Vgl. (5), (6), (7), (62), (9)

Ein weiteres freies Radikal, welches in den 80er Jahren als Vasodilatator der glatten Gefäßmuskulatur entdeckt wurde, ist NO Stickstoffmonoxid. Stickstoffmonoxid wird aus L-Arginin mittels NO-Synthasen hergestellt.

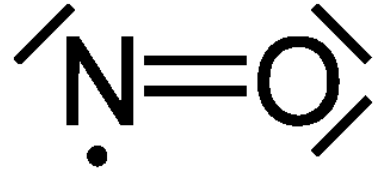


Abbildung 8 Strukturformel Stickstoffmonoxid (130)

Es existieren 3 Isoformen dieser NOS: eNOS (endotheliale NOS), nNOS (neuronale NOS) und iNOS (induzierbare NOS). Die iNOS kommt normalerweise nicht in der Zelle vor, kann jedoch in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten induziert werden. Einige Zellarten im Herzgewebe enthalten potentielle Quellen für ROS, wie zum Beispiel Kardiomyozyten, Endothelzellen sowie neutrophile Granulozyten. Die Freisetzung von NO wird nach der Oxygenierung des ischämischen Myokards hochreguliert und eNOS- bzw. iNOS-KO (knock out) Mäuse wiesen schwerere Myokardschäden im Vergleich zu den Wildtypen auf. Dies deutet darauf hin, dass NO eine protektive Rolle während Ischämie/Reperfusion einnimmt. Unter physiologischen Bedingungen vermittelt NO eine Vasodilatation und eine Plättchenhemmung. Zudem weist NO antiproliferative, antithrombotische, antiatherogene und antioxidative Eigenschaften auf. Stickstoffmonoxid NO fängt Superoxid, das ebenfalls mittels eNOS gebildet werden kann, und reagiert gemeinsam mit O_2^- jedoch zu Peroxynitrit $ONOO^-$. Peroxynitrit ist zytotoxisch und wird vorwiegend in den ersten beiden Minuten der Reperfusion synthetisiert. Experimente zeigten, dass die Hemmung von NOS bzw. die Verabreichung von Radikalfängern zu einer schnelleren Erholung der Kontraktilität führten. Daher nimmt man an, dass Peroxynitrit die Herzfunktion negativ beeinflusst. Peroxynitrit $ONOO^-$ löst eine Lipidperoxidation aus, oxidiert die Lipoproteine und legt so einen Grundstein für die Arteriosklerose. Zur Beibehaltung einer normalen endothelialen Funktion sowie letztendlich einer normalen kardiovaskulären Funktion, ist ein Gleichgewicht zwischen der Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Superoxid notwendig. Unter physiologischen Bedingungen dient das intrazelluläre Superoxid dem Gleichgewicht des Endothels, doch unter pathologischen Bedingungen steigt der Gehalt von O_2^- extrazellulär an und die Bioverfügbarkeit von NO wird durch die schlechtere Diffusion in die glatte Gefäßmuskulatur herabgesetzt.

Der exzessive Anstieg von Superoxid im Endothel ruft eine Vasokonstriktion und Entzündung hervor. Dies resultiert in einer endothelialen Dysfunktion aufgrund der herabgesetzten Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid und dem aufgetretenen Ungleichgewicht zwischen den RONS und dem antioxidativen System. Die verringerte Bioverfügbarkeit von NO ist eine Folge von reduzierter Synthese oder vermehrter Bildung von Peroxynitrit gemeinsam mit O_2^- . Einer der größten regulatorischen Mechanismen des kardiovaskulären Systems und so auch der endothelialen Funktion ist das Renin-Angiotensin-System. Das Peptid Angiotensin II, eines der ursprünglich bekannten Komponenten des RAS, fördert die Bildung von Superoxid durch Aktivierung der membrangebundenen NADPH-Oxidase und ist so an der Vasokonstriktion sowie der Hypertrophie beteiligt. In den 80er- bzw. 90er-Jahren fanden Wissenschaftler allerdings heraus, dass es den Gegenspieler Angiotensin-(1-7) zu Angiotensin II gibt. Angiotensin-(1-7) fördert nicht nur die Freisetzung von NO im Gehirn, Herz und Gefäß, sondern hemmt auch dort die Bildung von O_2^- und verringert den oxidativen Stress. Dazu verstärkt Ang-(1-7) die Expression und Aktivität der eNOS im Gehirn und ruft allgemein eine Vasodilatation hervor. Das Peptid Angiotensin-(1-7) verbessert die endotheliale Funktion und erweist sich so als kardioprotektiv.

2.7 Angiotensin-(1-7)

Vgl. (62), (63), (64), (11), (65), (66), (67), (12), (68), (69), (70), (71), (72), (73), (74), (75), (76), (77), (78), (79), (80)

Das Renin-Angiotensin-System ist ein wichtiges Hormonsystem und spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalt sowie des Blutdruckes. In der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen ist das RAS von wesentlicher Bedeutung und wird im Fall von kardialen Schäden wie zum Beispiel eines Myokardinfarktes oder einer Herzinsuffizienz hochreguliert. Patienten, die an einem Bluthochdruck bzw. einer Herzinsuffizienz leiden, sowie Patienten nach einem Myokardinfarkt weisen bei medikamentöser Therapie, die mit der Blockade des RAS einhergeht, eine Verbesserung der klinischen Symptomatik auf. Das RAS ist ein Schlüsselement in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen, wie des arteriellen Hypertonus, der einen wesentlichen kardiovaskulären Risikofaktor darstellt. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind noch immer einer der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt. Daher ist es unbedingt notwendig weitere Forschungen zur Entwicklung neuer Therapieansätze zu betreiben. Engagierten Wissenschaftlern gelang es in harter Arbeit bereits neue Komponenten des RAS zu entdecken und diese genauer zu untersuchen.

„Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System RAAS

Grundlagen: Das von den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates sezernierte Renin spaltet als Protease im Plasma aus dem hauptsächlich in der Leber gebildeten Glykoprotein Angiotensinogen nur ein N-terminales Dekapeptid ab. Dieses Angiotensin I (ANG I) wird durch das Angiotensin-I-Converting-Enzym (ACE, ebenfalls eine Protease) sehr schnell um zwei Aminosäuren zum Oktapeptid Angiotensin II (ANG II) verkürzt. (...) ANG II stimuliert die Synthese des Mineralkortikoids Aldosteron in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde. Die Wirkungen von Ang II und Aldosteron als eigentliche Hormone des Systems münden in der Kontrolle des Blutdrucks, des Extrazellulärvolumens und des Natrium- sowie Kaliumhaushalts zusammen.“ (81)

Im Rahmen mehrerer Studien entdeckten Wissenschaftler unterschiedlicher Forschungsgruppen, dass das Oktapeptid Angiotensin II nicht das einzige aktive Peptid des RAS ist. Ihnen ist es gelungen auch noch andere Peptide zu identifizieren. Angiotensin I kann neben Ang II ebenso noch zu folgenden Peptiden metabolisiert werden: Angiotensin-(1-7), Angiotensin-(3-8), Angiotensin III und Angiotensin IV. Des Weiteren ist es Ihnen gelungen, das bisher unbekannte Pendant des ACE zu finden, namens Angiotensin-Converting-Enzym 2.

Das Glykoprotein ACE 2 wird in Kardiomyozyten, Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Myofibroblasten sowie im Endothel exprimiert. ACE 2 kann Angiotensin II durch Entfernung einer Aminosäure abbauen und auf diese Weise das biologisch aktive Heptapeptid Angiotensin-(1-7), das anschließend an dem Mas-Rezeptor bindet, bilden. Der endogene Regulator ACE 2 hat eine 400-fach höhere Affinität zu Ang II als zu Ang I. Zudem kann Ang-(1-7) weniger effizient aus Angiotensin I gebildet werden. Bei dieser Synthese wird Angiotensin I hydrolysiert und aus dem dadurch hervorgebrachten Angiotensin-(1-9), wird Ang-(1-7) gebildet.

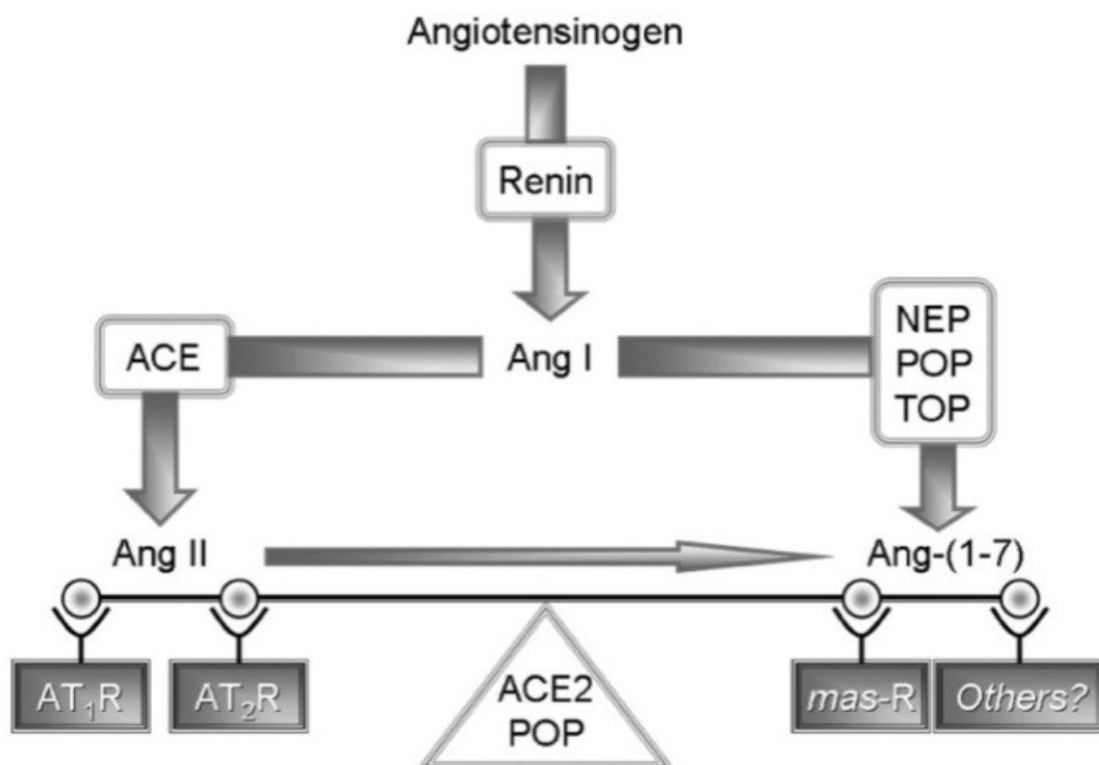


Abbildung 9 Das Renin-Angiotensin-System (66)

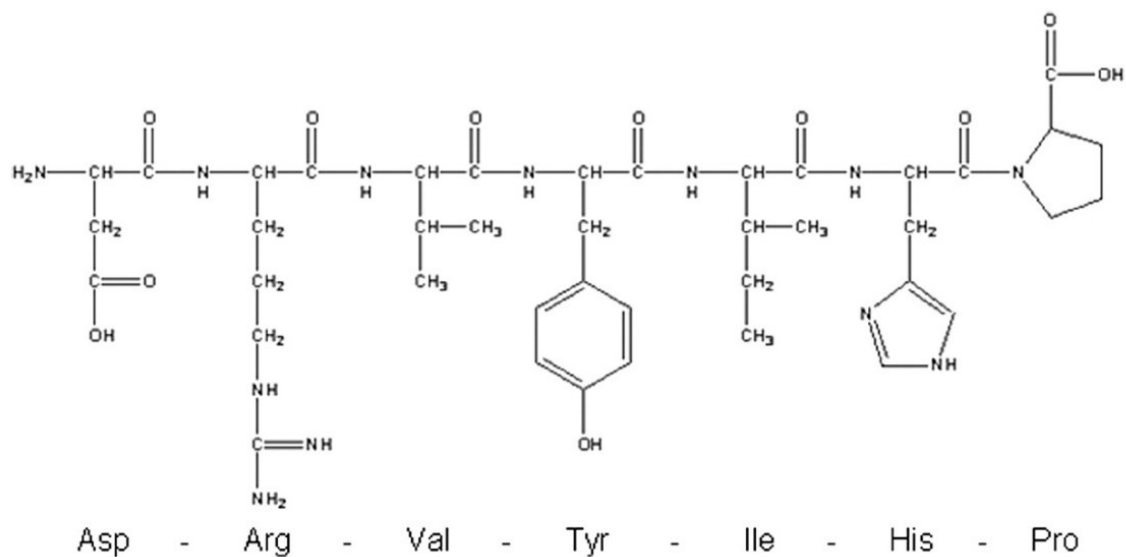


Abbildung 10 Die Strukturformel des Heptapeptid: Angiotensin (1-7) (66)

Das Heptapeptid Angiotensin-(1-7), dessen Aminosäuresequenz der Abbildung 10 zu entnehmen ist, hat ein Molekulargewicht von 899 Mol/L und ist der Gegenspieler zu Angiotensin II. So ergeben sich zwei aktive Achsen des Renin-Angiotensin-Systems. Auf der einen Seite die ACE/Ang II/AT-1-Rezeptor Achse und auf der anderen die ACE 2/Ang-(1-7)/Mas-Rezeptor Achse.

Angiotensin II bindet an den Angiotensin-II-Rezeptor vom Subtyp 1 und wirkt direkt positiv inotrop wie auch positiv chronotrop auf das Herz. Die ACE/Ang II/AT-1-Rezeptor Achse fördert Entzündungen, die Entwicklung einer endotheliale Dysfunktion, die Entstehung einer Arteriosklerose, die Zellproliferation, die Wachstumsfaktoren für Myozyten, die Ausbildung einer Hypertrophie, die Bildung einer Fibrose, den oxidativen Stress und bewirkt eine Vasokonstriktion. Die Bindung von Ang II an dem Angiotensin-II-Rezeptor vom Subtyp 2 würde eine umgekehrte Wirkung hervorrufen. Ang II wird bei akutem Myokardinfarkt hochreguliert und hingegen im Endstadium einer Herzinsuffizienz herabreguliert. Die Therapie eines Bluthochdruckes besteht hauptsächlich in der Reduzierung des Gehaltes und Hemmung der Signalübertragung von Ang II, mittels ACE-Hemmer und AT-1-Rezeptorantagonisten. ACE-Hemmer und AT-1-Rezeptorantagonisten inhibieren nicht nur Ang II sondern sind gemeinsam mit Aldosteron-Antagonisten die klassischen Medikamente zur Therapie einer Herzinsuffizienz. Alle drei erhöhen die Aktivität und Expression von ACE 2 und damit auch die von Ang-(1-7).

Angiotensin-(1-7) wurde im Jahre 1988 entdeckt und bald erkannte man die protektiven Eigenschaften der ACE 2/Ang-(1-7)/Mas-Rezeptor Achse. Es besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von ca. 10 Sekunden und wird bei oraler Aufnahme sehr rasch im Gastrointestinaltrakt abgebaut. Daher ist eine biologisch wirksame orale Applikation nur mit pharmazeutischen Hilfsmitteln (Enkapsulierung in Zellulose) möglich. Ang-(1-7) wirkt antiinflammatorisch, antioxidativ, antiarrhythmisch wie auch antiproliferativ. Zudem steigert Ang-(1-7) den Bradykinin-induzierten vasodilatatorischen Effekt durch eine Freisetzung von Prostaglandinen und Stickstoffmonoxid. Der Stoffwechsel und die Bildung des Heptapeptid Angiotensin-(1-7) findet zu einem großen Teil im Gefäßendothel statt und führt in Abhängigkeit von Spezies bzw. Dosis zu biochemischen und funktionellen Veränderungen.

Im Tiermodell zeigten sich nach Herbeiführen einer Lungenfibrose, einer pulmonaler Hypertonie, einem kanzerogenen Geschehen in der Lunge und einem Acute Respiratory Distress Syndrom bessere klinische Ergebnisse bei Aktivierung der ACE 2/Ang-(1-7)/Mas-Rezeptor Achse. Angiotensin-(1-7) schwächt in der Lunge die DNA-Proliferation ab und verhindert die Apoptose von alveolären Endothelzellen. Eine ACE II Überexpression in Mäusen zeigte bei ARDS eine protektive Wirkung und verbesserte die Aufrechterhaltung der Oxygenierung.



Der Mas-Rezeptor erwies sich als funktioneller Rezeptor des Heptapeptids Angiotensin-(1-7). Das Mas-Gen wurde im Jahre 1986 entdeckt und ist am Chromosom 6 lokalisiert. Es codiert einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor und setzt sich aus 325 Aminosäuren zusammen.

Abbildung 11 Chromosom 6, weiblicher Karyotyp (46,XX) (82)

Ursprünglich wurde das Mas-Gen als Protoonkogen beschrieben, doch man fand heraus, dass Mas keine onkogenen Eigenschaften besitzt. Daher konzentrierten sich weitere Studien nicht mehr auf Mas, als Vorläufer von Onkogenen, sondern auf die Erläuterung der physiologischen Signale und die grundsätzliche Rolle seines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Mas-Gene konnten erfolgreich in Mäusen wie auch Ratten isoliert werden und es zeigten sich in hohen Konzentrationen im Gehirn und in den Hoden sowie in niedriger Konzentration in der Lunge, Milz, Leber, Skelettmuskulatur als auch im Herzen (vor allem in den Kardiomyozyten und im Endothel der Koronararterien).

Ang-(1-7) konnte mithilfe seines selektiven Antagonisten A779, als Ligand des Mas-Rezeptors identifiziert werden. Mittels der Entwicklung von Knock-Out-Mäusen konnten die funktionellen Veränderungen des biologisch aktiven Liganden Ang-(1-7) und des synthetischen Agonisten AVE0991 analysiert werden. AVE0991 ist eine nicht-peptidische Verbindung und ist, im Gegensatz zu seinem natürlichen Pendant, bei oraler Applikation wirksam. Der synthetische Agonist hat eine 10-fach höhere Affinität zu dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor Mas und ahmt die Effekte des Peptids Ang-(1-7) erfolgreich nach.

„Das Prinzip der Knock-out-Mäuse

Will man die Funktion eines Gens untersuchen, so vergleicht man Tiere, die dieses Gen nicht besitzen mit normalen Tieren, die das entsprechende Gen in intakter Form vorliegen haben. Mäuse bei denen man gezielt ein ganz bestimmtes Gen entfernt hat, bezeichnet man als Knock-out-Mäuse. Um sicher zu stellen, dass sich die Knock-out-Maus und die Kontrollmaus nur in dem Knock-out-Gen unterscheiden muss die Knock-Out-Maus aus der Kontrollmaus hervorgegangen sein, d.h. beide Tier müssen den gleichen genetischen Hintergrund besitzen. Es werden deshalb Inzuchttiere verwendet. Diese Inzucht wird schon seit einigen hundert Generationen durchgeführt (konsequente Bruder-Schwester Verpaarung), was dazu führt, dass sich die Tiere genetisch gar nicht oder nur sehr gering unterscheiden.“ (83)

Die erste Knock-Out-Maus wurde im Jahre 1989 von dem amerikanischen Biophysiker Mario R. Capecchi (*1937), dem englischen Biochemiker Oliver Smithies (*1925) sowie dem englischen Anatomen und Embryologen Sir Martin J. Evans (*1941) erschaffen. Sie erhielten im Jahre 2007 den Nobelpreis für ihre Entdeckung:

“principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells” (63)

Bei Mas-KO-Mäusen zeigte sich, dass die durch Ang-(1-7) induzierte endothel-abhängige Vasodilatation der Aorta ausblieb. In den entnommenen Ringen der Aorta thoracica wiesen die Kontrollmäuse eine dosisabhängige Relaxation durch Angiotensin-(1-7) auf. Es fehlte ebenso in Mas-KO-Mäusen die Bindung von Ang-(1-7) in den Nieren und deshalb auch die antidiuretische Aktivität nach akuter Volumenbelastung durch eine peritoneale Injektion destillierten Wassers.

Allgemein zeigte sich, dass die kardiale Expression von Mas abhängig von Art und Dauer der physiologischen bzw. pathophysiologischen Stimuli ist. Andere Liganden des Mas-Rezeptors sind bis zum jetzigen Zeitpunkt noch unbekannt, allerdings ist es in einer Studie gelungen den Mas-Rezeptor von einem anderen zu unterscheiden. Ein weiteres entdecktes Peptid des RAS, Angiotensin IV, bindet vermutlich an einen eigenen Rezeptor, da sich eine vergleichbare Bindung von Ang IV in den Mas-KO-Mäusen und Kontrollmäusen zeigte. Des Weiteren stellte sich heraus, dass Mas nicht nur eine wichtige Funktion im Bereich der kardiovaskulären Regulation einnimmt, sondern auch im Verhalten. Wissenschaftler beschrieben, basierend auf Beobachtungen im Rahmen des EPM-Tests, KO-Mäuse ängstlicher und unruhiger.

„Der elevated plus maze (EPM) ist ein häufig verwendeter Test, der für Ratten und Mäuse eingesetzt werden kann. Mit ihm werden unkonditionierte Handlungsweisen untersucht, die auf dem natürlichen Explorationsdrang der Tiere in einer unbekanntem Umgebung beruhen. Da der EPM relativ schnell durchzuführen ist, wird er gern für pharmakologische Tests genutzt (...) Die erhöhte Plattform besteht aus zwei kreuzförmig angeordneten Stegen, die in einer bestimmten Distanz zum Boden (...) angebracht sind. (...) Zwei gegenüberliegende Arme haben rundherum Sichtblenden (...) (>>geschlossene Arme<<), die beiden anderen Arme haben keine Begrenzungen, also keinen Absturzschutz (>>offenen Arme<<). Für den Test wird die Ratte aus ihrem vertrauten Käfig genommen und in die Mitte des Kreuzes gesetzt, dann wird ihr Explorationsverhalten beobachtet. Wenn das Tier nicht ängstlich ist, wird es seiner natürlichen Neugier folgen und alle vier Stege der Apparatur erkunden, auch die offenen Arme. Wenn es dagegen Angst hat, wird es sich bevorzugt in den scheinbar schützenden, geschlossenen Armen aufhalten. Das Verhalten der Tiere wird mit einer Videokamera aufgezeichnet, und die Häufigkeit der Eintritte in die geschlossenen und offenen Arme sowie die Aufenthaltsdauer darin werden als direktes Maß für ängstliches bzw. nicht ängstliches Verhalten gewertet.“ (84)

Die Kardiomyozyten sind vermutlich die Zielzelle des Peptids Ang-(1-7), da man bei Mas-KO-Mäusen keine Bindung an den Kardiomyozyten beobachten konnte. An den Fibroblasten konnten keine Mas-Rezeptoren entdeckt werden. Allerdings ist es noch nicht ausgeschlossen, dass Ang-(1-7) noch an anderen Rezeptoren bindet.

Mas-KO-Mäuse weisen allgemein eine verminderte Herzfrequenz, ein geringeres Herzminutenvolumen, einen niedrigeren linksventrikulären Druck und einen erhöhten koronaren Gefäßwiderstand auf. In transgenen Ratten, die eine chronisch erhöhte Konzentration an Ang-(1-7) haben, zeigten sich kardioprotektive Eigenschaften am Langendorff-Modell. An den isoliert schlagenden Rattenherzen wurde eine Ligatur der linken Koronararterie durchgeführt. Dies führte zur Ischämie und damit verbunden unter anderem zum Abfall des systolischen Druckes. In den transgenen Ratten kam es im Gegensatz zu den Kontrollratten in der Reperfusion zu keinem weiteren Abfall des Druckes, wie auch zu keiner Veränderung der Herzfrequenz. Des Weiteren beobachtete man in der Reperfusion eine bessere postischämische Kontraktilität, ein erhöhtes Herzminutenvolumen und eine gesteigerte Koronarperfusion. Die Inzidenz und Dauer der Arrhythmien nach Ischämie, verursacht durch eine Ligatur der linken Koronararterie, konnten durch die Überexpression des Peptids Ang-(1-7) in den transgenen Versuchsratten reduziert werden. Zusätzlich zeigte sich ein verstärkter antidiuretischer Effekt, der sich in Form eines geringeren Harnflusses, einer erhöhten Osmolalität und Clearance darstellte.

In einer anderen wissenschaftlichen Studie wurde an männlichen Wistar Ratten eine Thorakotomie mit anschließender Ligatur der LAD und eine darauffolgende 60-tägige Behandlung mit Ang-(1-7) durchgeführt. Im Verlauf wurden regelmäßige echokardiographische Untersuchungen an den Ratten vorgenommen, um die Morphologie und Funktion der Herzen zu evaluieren. Am Ende der Behandlung wurden die Tiere getötet und weitere Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse ergaben eine verbesserte systolische und diastolische Funktion der Herzen sowie eine gesteigerte Koronarperfusion. Die endotheliale Dysfunktion in der Aorta erwies sich nach dem abgelaufenen Myokardinfarkt rückläufig. Auch der Versuch in einer anderen Studie zeigte bei oraler Applikation des synthetischen Agonisten AVE0991 positive Effekte bei Ratten mit kardialer Dysfunktion nach Koronarligatur.

Ebenfalls in einer Studie, wurde an männlichen Lewis Ratten operativ eine Ligatur der LAD gesetzt und 4 Wochen postischämisch eine Untersuchung mittels Katheter zur Messung des linksventrikulären Druckes und der Herzfrequenz durchgeführt. Die Ratten erhielten jedoch postoperativ zu keiner Zeit eine Therapie mit Ang-(1-7). Nach dem interventionellen Eingriff wurden die Versuchstiere getötet und das Herz entnommen.

Die beiden Atrien wie auch die Aorta wurden entfernt, das Herz daraufhin abgewogen und zusätzlich wurden histologische Schnitte angefertigt. Wie zu erwarten zeigten die Lewis Ratten nach dem Myokardinfarkt eine Bradykardie, ein Absinken des systolischen Druckes, eine Erhöhung des enddiastolischen Druckes und eine Hypertrophie des linken Ventrikels. Die immunhistologische Färbung des präparierten Gewebes zeigte eine höhere Konzentration an Ang-(1-7) im Infarktareal und keine Aktivität von Ang-(1-7) in den Fibroblasten.

Andere Versuche ergaben bei der Behandlung mit dem nichtselektiven synthetischen β -Adrenorezeptoragonisten Isoproterenol in transgenen Mäusen mit einer Überexpression des Peptids Ang-(1-7), wie auch in Mäusen denen zusätzlich der nicht-peptidische Agonisten AVE0991 verabreicht wurde, eine verminderte Fibrose und eine geringere Hypertrophie.

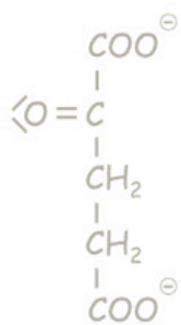
Eine Überexpression von Angiotensin-(1-7) in transgenen Versuchstieren erwies sich ebenfalls als protektiv, bei Behandlung mit Ang II Infusionen über einen längeren Zeitraum. Die Verabreichung von Ang II führte zum Anstieg des systolischen Druckes, aber es zeigte sich eine abgeschwächte Remodellierung im Ventrikel. Daher ist anzunehmen, dass eine Überproduktion von Ang-(1-7) vor Remodellierung, bei Ang-II-induzierter-Hypertrophie eine schützende Funktion hat. Unter normalen hämodynamischen Bedingungen hatte die erhöhte Konzentration an Ang-(1-7) keinen Einfluss auf die Herzfrequenz, Kontraktilität oder den Blutdruck.

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu gesunden Probanden ließen sich interessanterweise im menschlichen Urin geringere Mengen an Ang-(1-7) nachweisen. In einer anderen Untersuchung fand man heraus, dass eine vermehrte Expression von ACE 2 und somit höhere Werte von Ang-(1-7) eine limitierte Rolle in der gesunden Niere spielt, jedoch bei Nierenschäden ACE 2 eine positive Wirkung hat.

Sprague Dawley Ratten, die chronisch mit Ang-(1-7) mittels subkutaner Infusion behandelt wurden, hatten im Vergleich zur Kontrollgruppe nach erfolgreich erzeugtem ischämischen Insult, weniger neurologische Defizite und kleinere Infarkte. So konnte man auch eine zerebroprotektive Eigenschaft des Heptapeptids Angiotensin-(1-7) nachweisen.

2.8 α -Ketoglutarat

2.8.1 α -Ketoglutarat aus biochemischer Sicht



α -Ketoglutarat ist eine α -Ketosäure und besteht aus folgenden Grundbausteinen, die um das α -C-Atom angeordnet sind: einer Carboxyl-Gruppe, einer Keto-Gruppe und einer Seitenkette. α -Ketoglutarat ist grundsätzlich ein wichtiger Bestandteil im gesamten Stoffwechsel der Aminosäuren (Um-, Auf- und Abbauvorgängen) und ist ein Zwischenprodukt im Citratzyklus. Vgl. (85) (86) (87)

Abbildung 12 α -Ketoglutarat (120)

Aminosäuren (oder auch α -Aminocarbonsäuren genannt) setzen sich, wie in Abbildung 13 zu sehen ist, aus einer Amino-Gruppe, einer Carboxyl-Gruppe, einem Wasserstoffatom und einer individuellen Seitenkette zusammen. Sie unterscheiden sich im Grundgerüst nur an der Keto-Gruppe, die sich anstelle der Aminogruppe befindet. Mittels dieser Seitenkette lassen sich die vielen Aminosäuren voneinander unterscheiden. Vgl. (85) (86) (87)

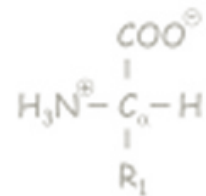


Abbildung 13 Grundgerüst einer Aminosäure (120)

Man unterscheidet zwischen proteinogenen Aminosäuren, die für die Synthese der Proteine verantwortlich sind, und nicht-proteinogenen Aminosäuren, die aus den proteinogenen Aminosäuren hervorgehen. Die 20 bzw. 21 proteinogenen Aminosäuren sind die Bausteine aller Peptide (bestehend aus 2–100 Aminosäuren) und Proteinen (bestehend aus einer Kette von mehr als 100 Aminosäuren) an den Ribosomen. Bis auf 8 essentielle Aminosäuren, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, können alle anderen Aminosäuren vom Körper selbst hergestellt werden. Die mit der Nahrung aufgenommenen Eiweiße, werden im Rahmen der Verdauung zu Aminosäuren abgebaut, gelangen so ins Blut und können von hier aus in die Zelle aktiv transportiert werden. Um diese Flut von Aminosäuren vollständig verwerten zu können, ist die Transaminierung zuständig. Bei diesem Umbau wird die Amino-Gruppe einer nicht benötigten Aminosäure auf eine α -Ketosäure übertragen. Durch diese Reaktion wird die Ketosäure zu einer Aminosäure und die ehemalige Aminosäure wird zur Ketosäure. Im Rahmen der Transaminierung wird z.B.:

die NH₂-Gruppe der Aminosäure durch eine Aminotransferase auf Oxalacetat oder α-Ketoglutarat übertragen. So wird die wichtigste Aminosäure, die intrazellulär am häufigsten vorkommt, hergestellt: Glutamat. Die Aminosäure Glutamat und die Ketosäure α-Ketoglutarat stehen in enger Verbindung zueinander. Beispiele der Transaminierung sind in Abbildung 14 und Abbildung 15 zu sehen. Vgl. (85) (86) (87)

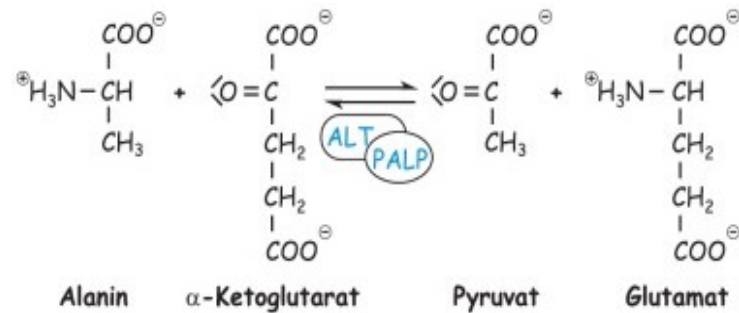


Abbildung 14 Synthese durch ALT oder GPT (122)

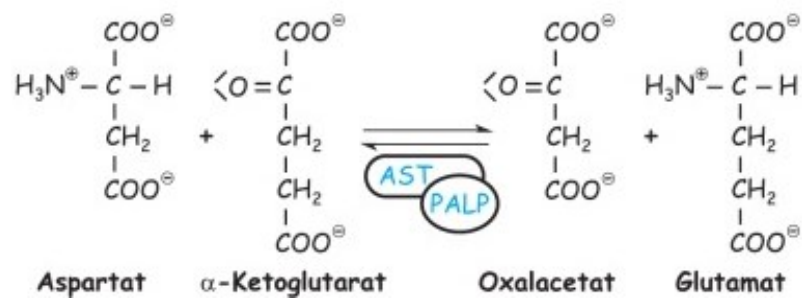


Abbildung 15 Synthese durch AST oder GOT (122)

Mit Hilfe der Aminotransferasen können im Grunde alle Aminosäuren ineinander umgewandelt werden. In Abbildung 15 und Abbildung 14 sind die wohl wichtigsten Enzyme zu erkennen: Alanin-Aminotransferase und Asparat-Aminotransferase. Glutamat ist eine nicht essentielle Aminosäure und gehört zu den 3 wichtigsten Aminosäuren, abgesehen von Alanin und Aspartat. Glutamat kommt in einer hohen Konzentration im gesamten ZNS vor und ist neben biogenen Aminen (wie z.B.: Noradrenalin oder Serotonin) und Acetylcholin ein wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter. Zusätzlich zu den 2 schon erwähnten Enzymen, AST und ALT, kann Glutamat auch ebenfalls aus α-Ketoglutarat, durch ein drittes Enzym, GLDH, synthetisiert werden.

Vgl. (85) (86) (87)

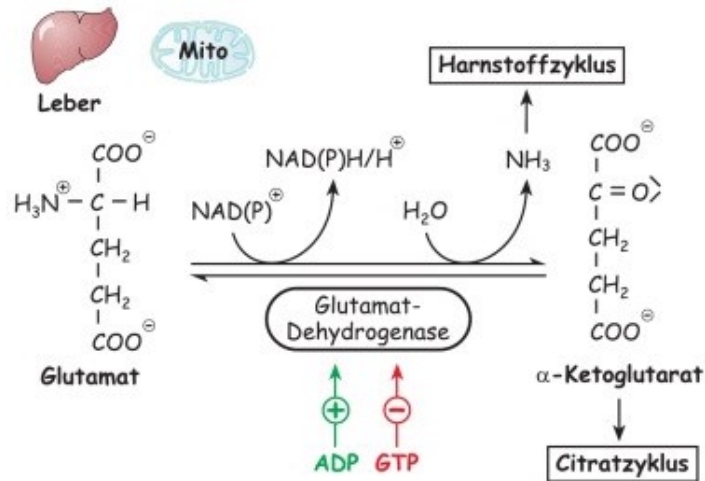


Abbildung 16 Oxidative Desaminierung von Glutamat (121)

Das Enzym, Glutamat- Dehydrogenase, kommt nur in den Mitochondrien vor und baut Glutamat, zu α -Ketoglutarat und Ammoniak NH_3 ab. Die Desaminierung durch GLDH ist eine reversible Reaktion und wechselt die Richtung je nach Konzentration. Daher kann bei vermehrt anfallenden Stickstoff bzw. Ammoniak, Glutamat aus α -Ketoglutarat und dem freien Ammoniak gebildet werden und umgekehrt. Der Stickstoff NH_2 (die Aminogruppe) ist das größte Problem des Stoffwechsels von Aminosäuren und Proteinen. Wenn die Aminogruppe NH_2 freigesetzt und nicht auf eine Ketosäure übertragen wird, entsteht Ammoniak (NH_3), welches toxisch ist. Das entstandene Ammoniak wird im Zuge des Harnstoffzyklus, der nur in der Leber stattfindet, zu Harnstoff umgeformt. Harnstoff wird dann ans Blut abgegeben und über die Niere schließlich ausgeschieden. α -Ketoglutarat ist somit wesentlich an der Stickstoffentsorgung beteiligt und ist ein wichtiges Endprodukt wie auch ein entscheidender Ausgangsstoff. Wie in der Abbildung 16 zu sehen ist, erfüllt α -Ketoglutarat auch im Citratzyklus eine tragende Rolle. Fast alle Aminosäuren werden letztendlich zu Zwischenprodukten des Citratzyklus zerlegt. Vgl. (85) (86) (87)

Der Citratzyklus wurde 1937 von Hans Adolf Krebs (1900-1981), der schon im Jahre 1932 durch die Entdeckung des Harnstoffzyklus mit seinem Kollegen Kurt Henseleit (1907-1973) bekannt wurde, entdeckt. Der Mediziner und Biochemiker, Hans Adolf Krebs, erhielt 1953 den Nobelpreis für die Entdeckung des Citratzyklus.



Abbildung 17 Hans Adolf Krebs (89)

Vgl. (88) (89)

Der Citratzyklus ist ein amphiboler Stoffwechselweg, der in den Mitochondrien aller Zellen, mit Ausnahme der Erythrozyten, abläuft und sich in unmittelbarer Nähe der Atmungskette befindet. Die roten Blutkörperchen, die strenggenommen eigentlich keine Zellen sind weil sie keinen Zellkern besitzen, weisen keine Mitochondrien und auch keine Atmungskette auf. Ihre einzige Energiequelle ist die anaerobe Glykolyse (= Abbau von Glukose zu Laktat über Pyruvat). Mithilfe der Substratketten-Phosphorylierung ist es möglich, abseits der Atmungskette (bzw. oxidativen Phosphorylierung) ATP Adenosintriphosphat zu bilden. Die Substratketten-Phosphorylierung findet im Stoffwechsel an 3 Orten (2-mal in der Glykolyse und einmal im Citratzyklus) statt. In den Mitochondrien entstehen innerhalb des Citratzyklus aus Acetyl CoA, das durch den Abbau von ketogenen Aminosäuren sowie in der Glykolyse aus Pyruvat und durch β -Oxidation von Fettsäuren entsteht, folgende Moleküle: CO_2 , GTP, ATP, NADH/H^+ und FADH_2 . Die Reduktionsäquivalenten, NADH/H^+ und FADH_2 , werden schließlich in der Atmungskette weiter umgesetzt und ermöglichen schließlich die Synthese von ATP, der lebenswichtigen Energiequelle jeder Zelle. Neben dieser katabolen Funktion stehen die Zwischenprodukte des Citratzyklus der Biosynthese von Glukose, Aminosäuren, Häm und Fettsäuren zur Verfügung und erfüllen so die anabolen Aufgaben des Citratzyklus. Vgl. (85) (86) (87)

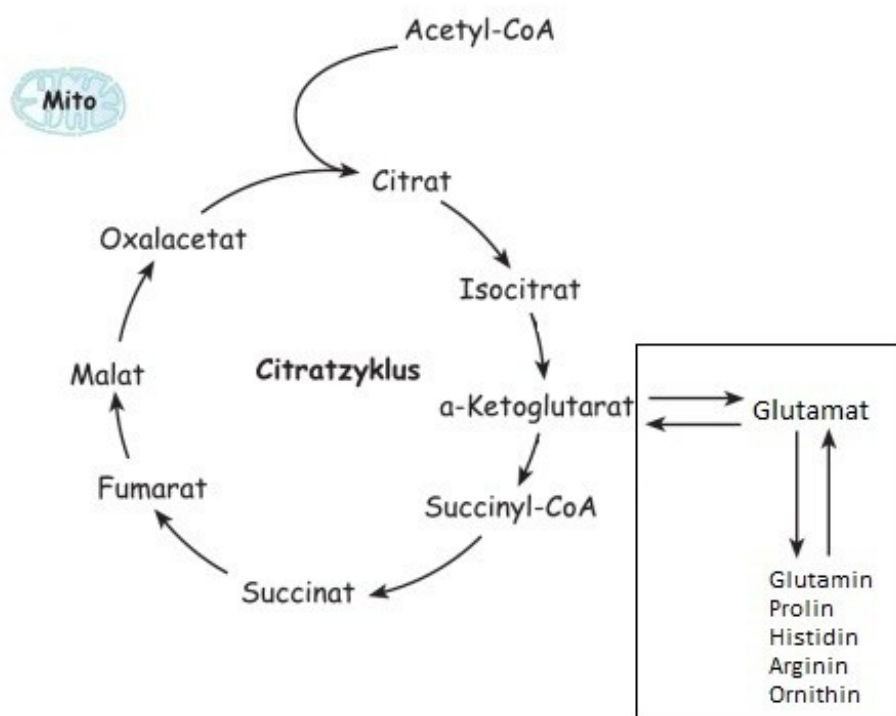


Abbildung 18 Der Citratzyklus (123)

Dieser Prozess, wie in Abbildung 18 zu sehen ist, zeigt wie Acetyl CoA in verschiedenen Reaktionen abgebaut wird und wie verschiedene Zwischenstufen entstehen. α -Ketoglutarat ist eine Zwischenstufe und dient, neben Malat und Oxalacetat, der Biosynthese von Aminosäuren. Aus α -Ketoglutarat entsteht Glutamat und aus dieser Aminosäure können andere Aminosäuren, wie z.B.: Glutamin, Histidin, Arginin oder Prolin hervorgehen. Umgekehrt, wie auch im rechteckigen Ausschnitt in Abbildung 18 zu sehen ist, können diese 5 Aminosäuren so über α -Ketoglutarat in den Citratzyklus einmünden.

Vgl. (85) (86) (87)

2.8.2 Die klinische Relevanz von α -Ketoglutarat

In einer randomisiert kontrollierten Studie, veröffentlicht im Jahre 1995 in der medizinischen Fachzeitschrift „The Lancet“, wurden 13 von 24 Männern, mit symptomatischer 3-Gefäß-KHK, während eines operativen Eingriffes an den Koronarien, zur Blutkardioplegie geringe Mengen von α -Ketoglutarat hinzugefügt. Diese 13 Männer zeigten postoperativ einen abgeschwächten ischämischen Schaden am Herz. Das Herz ist während herzchirurgischen Eingriffen einer Ischämie ausgesetzt und trotz aller protektiven Maßnahmen, weisen dennoch die meisten Patienten postoperativ einen Anstieg biochemischer Marker für eine Myokardischämie, wie CK-MB oder Troponin-T, auf. Vgl. (13)

Troponin, dessen Serumspiegel bereits zwei bis sechs Stunden nach Myokardischämie ansteigen kann, und CK-MB (Creatin-Kinase-Muscle-Brain), die auch bereits nach vier bis acht Stunden erhöht sein kann, sind die Marker der ersten bzw. zweiten Wahl zur Diagnostik von Myokardschäden. Vgl. (90)

Die Herzinsuffizienz ist die häufigste postoperative Ursache für Mortalität und Morbidität. Der gestörte Stoffwechsel des Herzens ist in der frühen postoperativen Phase die wichtigste Ursache für die myokardiale Dysfunktion. Für die geringe Aufnahme von Substraten und die reduzierte Sauerstoffkapazität soll die reduzierte Aktivität des Citratzyklus verantwortlich sein. Die eingeschränkte Verfügbarkeit von seinen Zwischenprodukten, wie zum Beispiel von α -Ketoglutarat, soll unter anderem hierfür der Grund sein. Das Vorhandensein von α -Ketoglutarat bestimmt die Erholung der Muskelproteinsynthese nach chirurgischen Traumata. Der myokardiale Gehalt von α -Ketoglutarat ist aber während Herzoperationen sehr niedrig, da α -Ketoglutarat unter ischämischen Bedingungen im Citratzyklus sehr schnell verbraucht wird. α -Ketoglutarat wird unter Ischämie zur ATP-Synthese mittels Substratketten-Phosphorylierung herangezogen. Neben den beiden Möglichkeiten im Rahmen der Glykolyse, ist der Citratzyklus die dritte Möglichkeit außerhalb der Atmungskette, ATP herzustellen. Das aus α -Ketoglutarat entstandene Succinyl CoA wird durch eine Reaktion, in der ATP frei wird, mit Succinyl CoA-Synthetase zu Succinat umgewandelt. Abgesehen von der ATP-Synthese, wird α -Ketoglutarat vermehrt in Glutamin umgewandelt. Nicht nur die Muskulatur sondern auch das Herz ist, im Verhältnis zu seiner Größe, ein großer Exporteur von Glutamin. Glutamin geht aus Glutamat, nach Bindung von NH_3 hervor, und hat unter den Aminosäuren im Blutplasma die höchste Konzentration. Das Amid Glutamin fixiert

den Stickstoff und ermöglicht so eine Entgiftung der Zellen sämtlicher Organe. Das Glutamin, wahrscheinlich der wichtigste Transporter von Stickstoff, ist eine nicht essentielle Aminosäure und transportiert NH_2 über die Blutbahn vor allem zur Leber, zu den Nieren und zum Darm. In der Leber kann aus Glutamin Ammoniak wieder freigesetzt werden und im Harnstoffzyklus zu Harnstoff verwertet werden. In der Niere neutralisiert der gewonnene Ammoniak den Urin und trägt zur Regulation des pH-Wertes bei. Des Weiteren wird Glutamin in den Zellen der proximalen Tubuli zur renalen Gluconeogenese verwendet. Vgl. (13) (86)

Im Darm, vor allem im Dünndarm, ist Glutamin die wichtigste Energiequelle für die Enterozyten und damit bedeutend für die Barrierefunktion der Darmmukosa. Unter Stresssituationen (wie OP-Traumata) oder unter inflammatorischen Umständen, wird α -Ketoglutarat, nach Umwandlung zu Glutamin, in großen Mengen nicht nur zur Niere, Leber, oder Darm sondern auch zum Immunsystem exportiert. Da auch die schnell proliferierenden Zellen des Immunsystems auf Glutamin angewiesen sind. Glutamin aktiviert die zelluläre Abwehr und hemmt die systemische Entzündungsreaktion. Vgl. (13) (91)

Aufgrund dieser genannten Gesichtspunkte stellten Wissenschaftler, wie 1995 in „The Lancet“ publiziert, die Hypothese auf, dass die Bereitstellung von α -Ketoglutarat bei koronaren Revaskularisationen die oxidative Kapazität des Myokards verbessert und so vor ischämischen Schäden schützt. Diese Studie zeigte, dass sich durch die Beimengung von α -Ketoglutarat zur Blutkardioplegie die aerobe Kapazität verbesserte und der arterielle Sauerstoffgehalt in der behandelten Gruppe höher war. Zusätzlich zeigten sich durch die Behandlung mit α -Ketoglutarat niedrigere Serumkonzentration von CK-MB und Troponin-T, die 4 Stunden nach Wiedereröffnung der Aorta gemessen wurden. Ausgehend von diesem Standpunkt findet α -Ketoglutarat eventuell in Zukunft klinische Anwendung in der Prävention von Herzinsuffizienz bei Myokardischämie. Vgl. (13)

5-Hydroxymethyl-2-furfural

2.8.3 5-HMF in Lebensmittel



Louis Camille Maillard (1878-1936), ein französischer Chemiker und Physiker, beschäftigte sich mit den chemischen Reaktionen von Aminosäuren mit Zucker und beschrieb erstmals im Jahre 1912, die nach ihm benannte „Maillard-Reaktion“. Vgl. (92)

Abbildung 19 Louis Camille Maillard (125)

„Ab etwa 140°C verbinden sich Aminosäuren unter Abgabe von Wasser und Zucker. Dabei entstehen hochreaktive Verbindungen, deren Endprodukte als Melanoide bezeichnet werden. Diese klingen gefährlich, können es auch sein, sind es aber meist nicht. Sie sorgen für das wunderbare Aroma von geröstetem Kaffee, dem atemberaubenden Geruch eines Schweinsbratens, den köstlichen Duft eines Gulasch und den unvergleichbaren Geschmack einer Brotkruste. Bei all diesen Beispielen ist die Maillard-Reaktion federführend.“ (93)

Die Maillard-Reaktion oder auch sogenannte nichtenzymatische Bräunungsreaktion besteht aus einer Reihe von Reaktionen und ist sehr vielseitig. Bei der Maillard-Reaktion reagieren abhängig von Temperatur, Zeit und pH-Wert Aminosäuren und Zucker, wie Glukose, Laktose, Maltose oder Galaktose, miteinander. Die dabei entstehenden Maillard-Produkte sind verantwortlich für Aroma, Geschmack und Farbe in Lebensmittel. Ein Maillard-Produkt ist zum Beispiel 5-Hydroxymethyl-2-furfural oder auch 5-HMF genannt, das aus 3-Desoxy-hexoson unter der Abspaltung von 2 Molekülen H_2O entsteht. Des Weiteren entsteht HMF bei der Abspaltung von 2 Molekülen Wasser bei der Erhitzung von Monosacchariden in einer Säure. HMF wird in Lebensmittel immer dann nachgewiesen, wenn kohlenhydrathaltige Lebensmittel erhitzt werden und dessen Gehalt wird im Zuge von Lebensmittelkontrollen untersucht. Allerdings gibt es für den Gehalt von HMF in Lebensmittel keine gesetzlichen Höchstwerte. In frischen bzw. naturbelassenen Lebensmittelsind nur Spuren von HMF enthalten und ist so ein Qualitätsmerkmal, beispielsweise für Honig. 5-Hydroxymethyl-2-furfural wird vorwiegend in Brot, Kaffee, Trockenobst (insbesondere Zwetschken), Karamellprodukten, Honig und Fruchtsäften

beschrieben. Das gehäufte Vorkommen von 5-HMF in Lebensmittel war der Grund für einige wissenschaftliche Studien, in denen zum Teil 5-HMF ein gesundheitliches Risiko nachgesagt wurde. Im Jahre 2011 wurde von Wissenschaftlern in einem Artikel mit dem Titel: „Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food“ (Molecular Nutrition & Food Research), in einem umfangreichen Überblick, verfügbare toxikologische Daten aus neuesten Forschungen bezüglich eines kanzerogenen Potenzials von 5-HMF, zusammengefasst. Trotz der zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse in den erwähnten Studien, zeigte sich ungeachtet dessen, kein Beweis für ein kanzerogenes Potential. In Tierexperimenten wurden keine toxischen Effekte von 5-HMF im Bereich von 80-100 mg/kg Körpergewicht. Zu erwähnen ist allerdings, dass die Zahl der durchgeführten Studien und die Artenvielfalt begrenzt waren. Es konnten keine Schlussfolgerungen auf den Menschen gezogen werden. Zum Zeitpunkt dieser wissenschaftlichen retrospektiven Arbeit konnte keine Aussage zur zulässigen Tagesdosis von 5-HMF getroffen werden. Es existiert kein Hinweis auf ein toxisches Potential der Substanz 5-HMF und eine Gefährdung der Gesundheit durch den Konsum von 5-HMF ist sehr unwahrscheinlich.

Vgl. (10) (92) (94)

Auch das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) in Deutschland, eine wissenschaftliche Institution des Bundesministerium, die neben anderen wichtigen Angelegenheiten für die Optimierung der Lebensmittelsicherheit zuständig ist, gab in einer Stellungnahme im Jahre 2011 bekannt, dass mögliche gesundheitliche Risiken des Stoffes 5-Hydroxymethylfurfural für den Menschen hinsichtlich Kanzerogenität, Genotoxizität oder genereller Toxizität, nicht bestätigt werden können, beziehungsweise diese zum derzeitigen Stand der Wissenschaft als sehr gering bis nicht vorhanden einstufen werden. Das BfR sieht aber von weiteren zukünftigen Studien nicht ab.

Vgl. (95) (96)

2.8.4 Die protektive Wirkung von 5-Hydroxymethyl-2-furfural aus klinischer Sicht

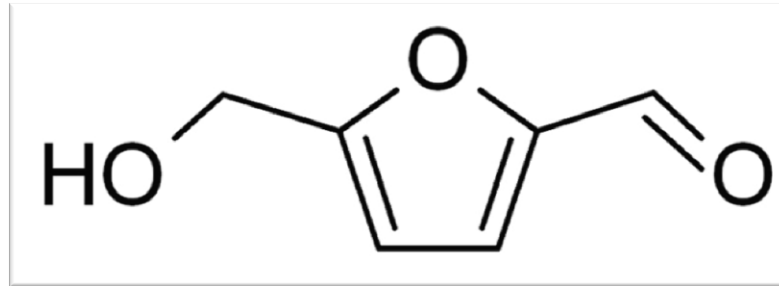


Abbildung 20 Strukturformel von 5-HMF Vgl. (126)

Im Jahre 2005 wurde in „The British Journal of Haematology“ in einem Artikel über 5-Hydroxymethyl-2-furfural, als möglicher zukünftiger Therapieansatz der Sichelzellanämie, berichtet. Bei der Sichelzellanämie, einer der häufigsten Hämoglobinopathie, führt eine autosomal-rezessiv vererbte Mutation, zur Bildung eines abnormen Hämoglobin (HbS). Vgl. (97) (98)

„Bei herabgesetzter Sauerstoffspannung kommt es bei homozygoten Anlageträgern zur Polymerisation von HbS, wobei die Erythrozyten eine starre Sichelform (Sichelzellen) annehmen.“ (97)

In dieser Studie wurden, in vitro an venösen Blutproben von homozygoten Patienten und in vivo an transgenen Mäusen mit Sichelzellanämie, die Effekte von 5-Hydroxymethyl-2-furfural unter hypoxischen Bedingungen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass 5-HMF an das intrazelluläre HbS bindet und in weiterer Folge die Polymerisation von HbS verhindert. Die prozentuellen Anteile an Sichelzellen in Blutausstrichen waren in den behandelten Gruppen unter Hypoxie niedriger. Die Überlebensrate und die Überlebensdauer der behandelten Mäuse war durch eine orale Gabe von 5-HMF im Vergleich zu den nicht behandelten transgenen Mäusen höher. 5-HMF zeigte in dieser Studie großes Potenzial für weiterführende Untersuchungen, als eventuelles Medikament zur Therapie von Sichelzellanämie. Vgl. (98)

„The Journal of Microbiology and Biotechnology“ publizierte 2009 einen Artikel über die antioxidative Aktivität von 5-HMF. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit gelang es erstmals aus roten Meeresalgen der Gattung „Laurencia undulata“, die bekannt für ihre Produktion einzigartiger Metaboliten mit umfangreicher Bioaktivität sind, 5-Hydroxymethyl-2-furfural zu isolieren und anschließend zu untersuchen. 5-HMF wurde an drei verschiedenen Zelllinien auf zytotoxische Effekte untersucht und als ungefährlich empfunden. Synthetische Antioxidantien sind zwar günstig und effektiv, jedoch gehen sie mit Nebenwirkungen, wie einer Kanzerogenität einher und sind so in ihrer Anwendung limitiert. Daher könnte 5-HMF mit seiner natürlichen Herkunft eine zukunftsorientierte Alternative bieten. Die Untersuchungen dieser Wissenschaftler zeigte, dass 5-HMF die intrazelluläre Produktion von ROS schwächt, freie Radikale von verschiedenen Typen abfängt, die Aktivität des oxidativen Enzyms Myeloperoxidase vermindert, die Oxidation von Membranproteinen hemmt und die Expression von Glutathion (GSH) sowie Superoxid-Dismutase (SOD) steigert. 5-Hydroxymethyl-2-furfural reduziert somit den oxidativen Stress in den Zellen und wirkt antioxidativ. 5-HMF unterstützt das antioxidative System durch gesteigerte Expression von zwei wichtigen Radikal- und reaktiven Sauerstoffspeziesfängern, SOD und GSH. Gleichzeitig hemmt 5-HMF die Produktion von ROS. Die Oxidation von Membranproteinen wird gehemmt, wodurch die Membranpermeabilität erhalten bleibt und ein programmierter Zelltod verhindert werden kann. Die schon genannten Effekte von 5-HMF versuchen das Gleichgewicht zwischen ROS bzw. freien Radikalen, die im Laufe des Zellstoffwechsels und der Atmungskette gebildet werden, und den antioxidativen Enzymen wie auch nicht enzymatischen Faktoren, zu halten, um Schäden zu verhindern. Unkontrollierte freie Radikale sollen an verschiedenen neurodegenerativen bzw. entzündlichen Erkrankungen, wie auch Diabetes mellitus, Krebs und vor allem beim Altern beteiligt sein. Dem „Jungbrunnen“, 5-HMF, soll daher in Zukunft mehr Aufmerksamkeit hinsichtlich klinischer Anwendung und Verwendung in der Pharmaindustrie bzw. in Lebensmittel geschenkt werden. Vgl. (99)

Der Artikel „The protective role of 5-HMF against hypoxic injury“ wurde 2011 in der Fachzeitschrift „Cell Stress and Chaperones“ veröffentlicht und identifizierte 5-Hydroxymethyl-2-furfural als antihypoxisch wirkendes Mittel aus Kräutern. Basierend auf einer vivo Studie an Mäusen, bei der sich herausstellte, dass die Vorbehandlung mit 5-HMF die Überlebenszeit und Überlebensrate dieser Mäusen unter hypoxischen Umständen

steigert, folgten weiterführende Untersuchungen in vitro, zur protektiven Rolle von 5-HMF betreffend hypoxischer Schäden. ECV304 Zellen (Endothelzellen aus einer humanen Umbilikalvene), die morphologisch und biochemisch sehr ähnlich zu ursprünglichen Endothelzellen sind, wurden ohne und mit (für 1 Stunde) Vorbehandlung mit 5-HMF 24 Stunden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und dabei wurde die Zellapoptose, die Zellnekrose, das mitochondriale Membranpotenzial sowie die Expression von ERK beobachtet. 5-HMF verhindert unter Hypoxie eine Zellnekrose, vermindert die Apoptoserate, schützt vor einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials und hemmt die Aktivierung des Enzyms ERK. Die Proteinkinase ERK gehört zu den MAP-Kinasen, phosphoryliert intrazellulär irreversibel die Aminosäuren Serin bzw. Threonin und kann Prozesse von Zellproliferation bis hin zum programmierten Zelltod vermitteln. Kaskaden dieser Reaktionen findet man auch in der Signaltransduktion. Das mitochondriale Membranpotenzial ist wichtig um vor hypoxischen Schäden zu schützen, die von ROS provoziert werden können, und spiegelt die Funktion der Mitochondrien wieder. Da Mitochondrien eine Rolle in der Apoptose einnehmen, wirkt sich eine Erhaltung des MMP positiv auf das Zellüberleben aus. Auch wenn nicht alle genauen Details über die ablaufenden Mechanismen geklärt werden konnten, konnte doch eines festgehalten werden, die positiven Effekte von 5-Hydroxymethyl-2-furfural unter Hypoxie. Vgl. (100) (101)

2.9 Die Langendorff Apparatur

Im Jahre 1895 entwickelte der Mediziner Oscar Langendorff, (1853-1908), basierend auf der Erfindung des isoliert perfundierten Froschherzens von Elias Cyon (1843-1912) aus dem Jahr 1866, die bis heute fundamental unveränderte Langendorff Technik, der retrograden Perfusion des isolierten Säugetierherzens. Mit dieser Methode war es möglich die Physiologie, Pathophysiologie, Elektrophysiologie bzw. Morphologie des Herzens zu erforschen, ein breites Spektrum von Parametern zu messen und so die Basis für unser heutiges Verständnis und Wissen über das Herz zu schaffen.



Abbildung 21 Oscar Langendorff (124)

Oscar Langendorff benutzte damals für seine Forschungsarbeit Herzen von Hunden, Katzen oder Hasen und demonstrierte, dass das Herz die Nährstoffe sowie den Sauerstoff aus dem Blut über die Koronargefäße bezieht und Änderungen der Koronardurchblutung einen Einfluss auf die mechanische Funktion des Herzens haben. Theoretisch ist es möglich alle Säugetierherzen zu verwenden, jedoch werden heutzutage am häufigsten Ratten als Versuchstiere herangezogen. Nach erfolgreicher terminaler Anästhesie (volatil bzw. intraperitoneal) des Versuchstieres, in möglichst ruhiger und stressfreier Umgebung, wird bei dem Säugetier eine Thorakotomie vorgenommen, das Herz von umliegenden Strukturen gelöst und entnommen. Die absolute Schmerzfreiheit und tiefe Anästhesie des Versuchstieres muss vor der Inzision abgewartet werden und kann zum Beispiel bei Ratten mit Hilfe des Fußrückzugreflexes getestet werden. Nach erfolgreicher Entnahme des Herzens sollte es sofort in eine eiskalte Lösung, in welcher die Kontraktion des Herzens sistiert, gegeben werden. Das isolierte Herz sollte möglichst innerhalb von maximal 5 Minuten nach Entnahme wieder reperfundiert werden. Dafür wird die Aorta ascendens des isolierten Herzens, unter Vermeidung von Luftembolien an einer Kanüle fixiert. Der Durchmesser der Kanüle sollte je nach Spezies der geplanten Versuchstiere gewählt werden. Die Kanüle sollte nicht zu tief eingeführt werden, da sie sonst die Aortenklappe verletzen und eine Insuffizienz hervorrufen könnte. Ein Teil der Perfusionslösung würde so in den linken Ventrikel verloren gehen. Das restliche extrakardiale Gewebe sollte noch entfernt werden und eine Inzision im Ausflusstrakt des rechten Ventrikels (Pulmonalarterie) durchgeführt werden, um so einen freien Abfluss zu gewährleisten.

Vgl. (102) (103)

Eine kristalloide Lösung mit oder ohne roten Blutkörperchen bzw. Vollblut perfundiert, unter konstanten Druck (bzw. Flow), Temperatur sowie Oxygenierung retrograd über die Kanüle in der A. ascendens das Herz. Die Aortenklappe verschließt sich aufgrund des retrograden Flusses und Druckes. Dadurch gelangt die Lösung über die beiden Ostien, der Koronararterien an der Aortenwurzel in das Koronargefäßsystem und anschließend über den Koronarsinus in das rechte Atrium. Der konstante Flow bzw. Druck haben beide ihre Vor- und Nachteile. Allerdings zeigte sich, dass ein konstanter Perfusionsdruck für Studien zur Ischämie geeigneter ist und in Studien zur endothelialen Funktion ein konstanter Flow bevorzugt wird. Der Perfusionsdruck sollte je nach Spezies eingestellt werden und sollte aber nicht mehr als 60-70 mmHg betragen, da sonst die Gefahr einer Aorteninsuffizienz besteht. Je nach Apparatur ist es möglich den Koronarfluss in regelmäßigen Zeitintervallen zu messen, ein EKG mit oberflächlich angebrachten Elektroden abzuleiten und die systolische wie auch diastolische Funktion des linken Ventrikels aufzuzeichnen. Die Kontraktionsfunktion wird mit Hilfe eines Ballons, der nach Entfernung des linken Herzohres über das linke Atrium durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt wird, gemessen.

Das Herz steht so dem Untersucher mehrere Stunden für zahlreiche Messungen am isolierten Organ, d.h. jedoch abgetrennt von jeder humoralen und neuronalen Regulation, zur Verfügung. Dieser Vorgang ist sicher und einfach reproduzierbar, jedoch für jedes Versuchstier eine tödliche Untersuchung. Nach all den vergangenen Jahren seit 1895 und sicherlich zahlreichen Modifizierungen blieb dennoch das generelle Prinzip von Oscar Langendorff erhalten und liefert auch heute immer wieder in Rahmen von gut konzipierten Studien aufschlussreiche und konstant reproduzierbare Daten.

Vgl. (102) (103)

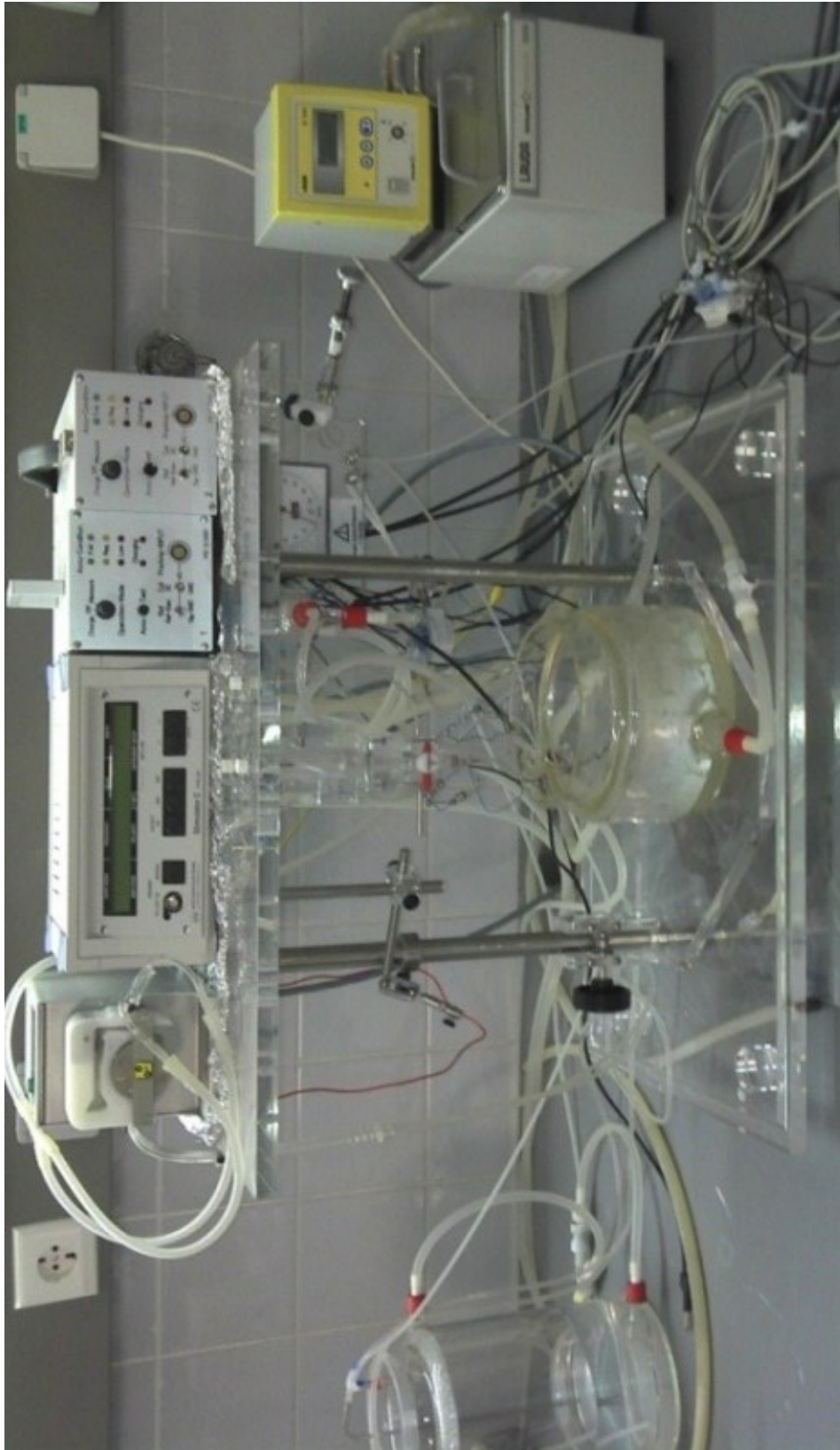


Abbildung 22 Die Langendorff Apparatur

2.10 Der Tierversuch:

2.10.1 Die gesetzlichen Grundlagen

Die Definition laut Tierversuchsgesetz 1988 der Republik Österreich:

„§ 2. Tierversuche im Sinne dieses Bundesgesetzes sind alle für das Tier belastenden, insbesondere mit Angst, Schmerzen, Leiden oder dauerhaften Schäden verbundenen experimentellen Eingriffe an oder Behandlungen von lebenden Wirbeltieren, die über die landwirtschaftliche Nutzung und veterinärmedizinische Betreuung hinausgehen und das Ziel haben, eine wissenschaftliche Annahme zu prüfen, Informationen zu erlangen, einen Stoff zu gewinnen oder zu prüfen oder die Wirkung einer bestimmten Maßnahme am Tier festzustellen.“ (104)

Das Interesse eines Tierversuches sollte darin bestehen, Krankheiten bei Tier/ Mensch zu erkennen, therapieren und zu verhindern, die Physiologie bei Mensch/ Tier zu erforschen, die Umwelt zu schützen und die Ausbildung zu fördern. Zu diesen Zwecken ist ein Tierversuch in der Republik Österreich gestattet:

„§ 3 (1) (...) a) für Forschung und Entwicklung, b) für berufliche Ausbildung, c) für medizinische Diagnose und Therapie, d) für Erprobung und Prüfung natürlicher oder künstlich hergestellter Stoffe, Zubereitungen oder Produkte, e) für die Erkennung von Umweltgefährdungen und f) für die Gewinnung von Stoffen.“ (104)

Sinnvolle Hypothesen und Methoden eines Tierversuches sollten den anerkannten Stand der Wissenschaft entsprechen und man sollte daraus möglichst viele Erkenntnisse gewinnen können. Ein Tierversuch ist nicht zugelassen, wenn bereits derselbe Versuch durchgeführt wurde, an deren Resultate kein Zweifel an Richtigkeit wie auch Aussagekraft besteht und zusätzlich nicht zu erwarten ist, dass sich neue Erkenntnisse durch einen erneuten Tierversuch ergeben. Jeder Tierversuch benötigt eine Genehmigung, die vor der Durchführung beantragt werden muss. Die Entnahme von Organen, Geweben und/oder Zellen aus dem toten Tier bzw. lebenden (narkotisierten) Tier, zur Untersuchungen der isolierten Zellen, Geweben oder der isolierten Organen, wie auch zum Zweck der TX oder Anlegen von verschiedensten Kulturen, benötigt keine Genehmigung. Vgl. (104)

2.10.2 Das Tierversuchsrechtsänderungsgesetz vom 28.12.2012

Das TVRÄG der Republik Österreich besagt im 3. Abschnitt „Anforderung an Züchter, Lieferanten und Verwender“ laut § 19 „Anforderungen an das Personal“:

„(2) Das Personal muss entsprechend ausgebildet und geschult sein, ehe es eine der folgenden Tätigkeiten ausführt: 1. Durchführung von Tierversuchen oder 2. Gestaltung von Tierversuchen und Projekten oder 3. Pflege von Tieren oder 4. Tötung von Tieren.

(3) Personen, die 1. Tätigkeiten gemäß Abs. 2 Z 1 ausüben, dürfen diese Tätigkeiten nur unter der Verantwortung oder Aufsicht von Projektleiterinnen oder Projektleitern (§ 27) durchführen oder 2. Tätigkeiten gemäß Abs. 2 Z 3 und 4 ausüben, dürfen diese Tätigkeiten nur unter der Verantwortung oder Aufsicht von Projektleiterinnen oder Projektleitern (§ 27) (...)bis sie die erforderliche Sachkunde nachweisen.“ (105)

Die Europäische Kommission besteht auf entsprechende Kenntnisse.

Europäisches Übereinkommen zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere, Teil VII, Artikel 26:

„Personen, die Verfahren durchführen, daran teilnehmen oder in Verfahren verwendete Tiere pflegen, einschliesslich der Überwachung, müssen eine angemessene Bildung und Ausbildung haben.“ (106)

Die Europäische Union insistiert auf geeignete Schulungen des Personals.

Richtlinie 86/609/EWG des Rates vom 24. November 1986 zur Annäherung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften der Mitgliedstaaten zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, Artikel 14:

„Personen, die Versuche durchführen, daran beteiligt sind oder bei Versuchen verwendete Tiere pflegen einschliesslich der Personen, die Aufsichtsfunktionen ausüben, müssen eine entsprechende Ausbildung nachweisen. Insbesondere müssen die Personen, die die Versuche durchführen oder ihren Ablauf überwachen, in einer mit dem durchzuführenden Versuch im Zusammenhang stehenden wissenschaftlichen Disziplin ausgebildet worden sein, über die erforderlichen Fähigkeiten im Umgang mit Versuchstieren und für deren Pflege verfügen und der zuständigen Behörde einen hinreichenden Ausbildungsstand für die Wahrnehmung ihrer Aufgaben nachgewiesen haben.“ (107)

Die Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) wurde im Jahre 1978 gegründet und ist eine Vereinigung von verschiedenen europäischen Gesellschaften für Versuchstierkunde. FELASA veröffentlicht Leitlinien und hat eine Kooperation mit der Europäischen Kommission, dem Europäischen Parlament und dem Europarat. Des Weiteren publiziert FELASA Empfehlungen zur Ausbildung und Schulung von Personen, die mit Versuchstieren arbeiten und/oder Tierversuche durchführen.

Vgl. (108), (109)

Diese Personengruppe wird in 4 Kategorien eingeteilt:

Kategorie	Beschreibung
A	Personen, die Tiere pflegen
B	Personen, die Tierversuche durchführen
C	Personen, die für Leitung der Tierversuche verantwortlich sind
D	Fachleute auf dem Gebiet der Versuchstierkunde

Tabelle 6 Kategorien der FELASA (110), (109)

Bezüglich der Kategorie B sowie C

„(...) wurde beschlossen, daß Wissenschaftler, die für die Planung oder Durchführung von Tierversuchen verantwortlich sind, als qualifiziert angesehen werden, wenn sie zwei Voraussetzungen erfüllen:

- Abschluß eines Universitätsstudiums – z.B. als „Bachelor“ oder „Master“ (...) – in einem biomedizinischen Fach, z.B. Biologie (...), Medizin oder Veterinärmedizin;
- Teilnahme an einem Grundkursus „Versuchstierkunde“, von mindestens 80* Stunden bzw. an einem Kurs ähnlicher Art (...) oder an einer entsprechenden anerkannten Bildungs- oder Ausbildungsmaßnahme.“ (110)

„Der Personenkreis der Kategorie D ist in der Regel für die oben erwähnten speziellen Ausbildungsmaßnahmen zuständig.“ (110)

2.10.3 Das 3R-Prinzip

Die UFAW (Universities Federation for Animal Welfare), gegründet 1926 von Major Charles Hume, ist eine britische Wohltätigkeitsorganisation, die sich weltweit für den Schutz aller Tiere engagiert. Diese Organisation hat sich zum Ziel gesetzt das Interesse für den Tierschutz zu fördern, Informationen zum Tierschutz zu verbreiten, die Gesetzgebung für den Tierschutz anzuregen und das Leid aller Versuchstiere zu verringern. Sie veröffentlichten im Jahre 1947 das allererste Handbuch zur Verbesserung des Wohlergehens aller Tiere, die für die Wissenschaft verwendet werden. Das Handbuch der UFAW „The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals“ wurde über die Jahre mehrmals überarbeitet und ist nun bereits in der 8. Edition erhältlich. In den 50er-Jahren wurde von Professor William Russell und Rex Burch das 3R-Prinzip entwickelt und das Buch „The Principle of Humane Experimental Technique“ im Jahre 1959 veröffentlicht. Die Philosophie der 3Rs hatte großen Einfluss auf den Tierschutz und ist nun weltweit anerkannt. Die 3R`s setzen sich aus folgenden Begriffen zusammen:

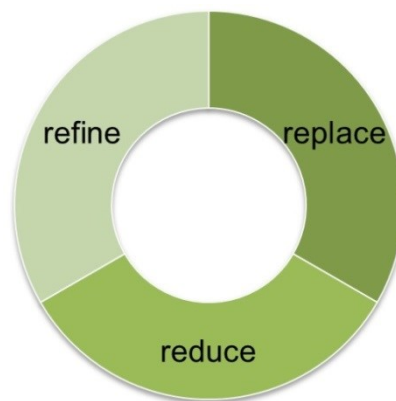


Abbildung 23 Das 3R-Prinzip nach Russell und Burch Vgl. (111) (112)

Jeder Versuchsleiter, der eine große ethische Verantwortung trägt, sollte sich vor jedem Projekt im Sinne von „replace“ fragen, ob ein Tierversuch wirklich notwendig ist oder ob es vielleicht andere Methoden oder Verfahren gibt, um diesen zu ersetzen. Wenn ein Tierversuch unvermeidlich sein sollte, um aussagekräftige Erkenntnisse zu erlangen, dann sollten dafür im Sinne von „reduce“ so wenig wie möglich Versuchstiere herangezogen werden. Die Tiere sollen eine gute Pflege, eine artgerechte Unterbringung und eine veterinärmedizinische Versorgung bekommen und im Sinne von „refine“ muss darauf geachtet werden, dass die Belastungen und Schmerzen für die Tiere minimiert werden. Vgl. (111) (112)

3 Material und Methoden

3.1 Die Versuchstiere

Männliche Sprague-Dawley Ratten, 12-14 Wochen alt und 200-300g schwer, wurden vom Institut für Versuchstierzucht und -haltung der Medizinischen Fakultät in Humberg bei Wien bezogen (siehe im Anhang: A Formblatt Labortierbestellung). Die Labortiere erhielten laut gültigem Tierversuchsgesetz für ihre Gesundheit und ihr Wohlergehen eine angemessene Unterkunft am

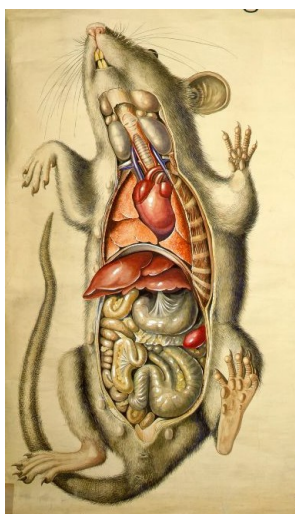


Abbildung 24 Sprague-Dawley Ratte (128)

Institut für Biomedizinische Forschung (Hahnhof) am LKH Univ.-Klinikum Graz. Die Ratten wurden in einem geschlossenen, gefilterten Belüftungssystem in Makrolon Typ III Käfigen zu je maximal 5 Tieren gehalten. Sie wurden vom fachkundigen Stammpersonal des Institutes mit Futter und Trinkwasser ad libitum versorgt. Die Beleuchtung in den Räumlichkeiten der Tierhaltung unterlag einem automatischen 12 Stunden Tag/Nacht Rhythmus und die Temperatur (20-24°C) sowie die Luftfeuchtigkeit (55% +/- 10%) wurden in ihrer Konstanz vom Personal kontrolliert. Zudem wurde der Gesundheitsstatus der Labortiere regelmäßig überprüft und im Rahmen der Haltung bzw. Pflege der Labortiere wurden strenge Hygienevorschriften vom Personal beachtet.

Vgl. (113)

3.2 Die Aufbereitung des isolierten Rattenherzens



Den Sprague-Dawley Ratten wurde intraperitoneal 400 IU Heparin verabreicht und das Gewicht der Tiere erhoben. Anschließend bekamen die Versuchstiere in ruhiger sowie stressfreier Umgebung zur terminalen Anästhesie intraperitoneal Ketamin (70-100mg/kg) und Gewacalm (0,2mg/kg KG) appliziert. Nach sicherer Feststellung der absoluten Schmerzfreiheit wurde eine Thorakotomie an den Ratten durchgeführt, das Herz vom umliegenden Gewebe getrennt und daraufhin entnommen.

Abbildung 25 Ausschnitt eines Situs der Ratte, *Rattus norvegicus* (129)

Das isolierte Rattenherzen wurde so rasch wie möglich an der Aorta ascendens unter Vermeidung von Luftembolien kanüliert (Kanüliendurchmesser: 5mm), fixiert und reperfundiert.

3.3 Die Reperfusion des Herzens am Langendorff Apparat

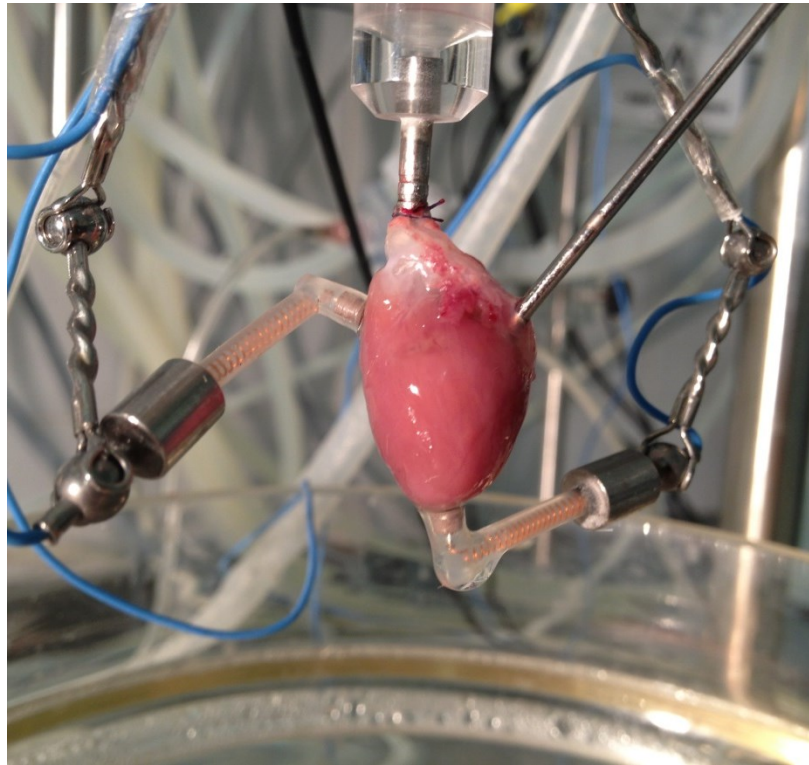


Abbildung 26 Isoliert schlagendes Rattenherz am Langendorff

Nach Kanülierung sowie Fixierung des Rattenherzens am Langendorff, wurden nun noch extrakardiale Strukturen entfernt (falls vorhanden) und eine Inzision der Pulmonalarterie gesetzt, um einen freien Abfluss zu gewährleisten. Zwei Elektroden zur Abnahme eines EKGs wurden im Bereich des rechten Herzohres und der Herzspitze oberflächlich angebracht. Zur Messung der systolischen wie auch diastolischen Funktion des linken Ventrikels, wurde ein Ballon nach Entfernung des linken Herzohres über das linke Atrium durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt.

Das Herz wurde mit einer sogenannten Krebs-Ringer-Lösung bei gleichbleibender Temperatur von $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, bei konstanter Oxygenierung (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid) und permanentem Perfusionsdruck von 70mmHg (± 10 mmHg) perfundiert.

3.4 Der Studienablauf

Das Rattenherz wurde in der Stabilisierungsphase mit der Krebs-Ringer-Lösung bei gleichbleibender Temperatur von $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, bei konstanter Oxygenierung (95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid) und permanentem Perfusionsdruck von 70mmHg ($\pm 10\text{mmHg}$) für 20 Minuten perfundiert. Das isoliert schlagende Herz sollte die Möglichkeit haben sich an der Langendorff Apparatur zu stabilisieren. In dieser Zeit war es möglich die Elektroden anzubringen, den Ballon in den linken Ventrikel einzuführen und noch weitere leichte Veränderungen zur Optimierung vorzunehmen. Danach erfolgte eine Perfusion des Herzens für weitere 20 Minuten, die sogenannte Baseline (siehe Abbildung 29 Das Messprotokoll). In regelmäßigen Abständen von 5 Minuten wurde der Koronarfluss, mittels Auffangen des Perfusats für 1 Minute, gemessen. Mit dem Beginn der Baseline durften keine Veränderungen mehr vorgenommen werden und die Dokumentation wurde begonnen. In der sogenannten Baseline wurde das Rattenherz mit verschiedenen Lösungen perfundiert und einige Parameter, mittels einer Datenerfassungssoftware für isoliert perfundierte Herzen namens ISOHEART® (Version 1.5, Jänner 2004), dokumentiert. Nach Ablauf der Baseline wurde eine Ligatur der LAD gesetzt und für 15 Minuten belassen, die sogenannte Okklusion (siehe Abbildung 29 Das Messprotokoll).

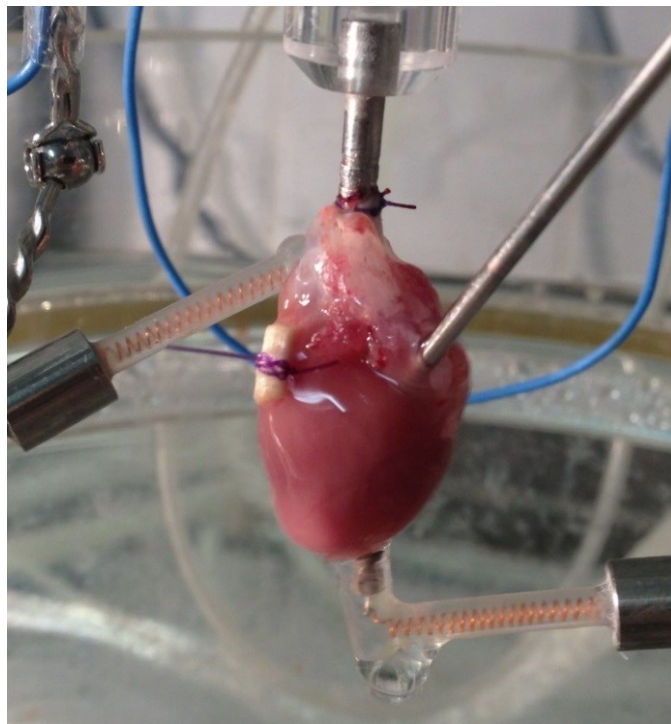


Abbildung 27 Okklusion der LAD am Rattenherz

Nach dem Lösen der Ligatur wurde das Herz weitere 30 Minuten am Langendorff retrograd perfundiert, die sogenannte Phase der Reperfusion (siehe Abbildung 29 Das Messprotokoll). Die Dauer und Inzidenz postischämischer Arrhythmien wurde basierend auf den ASI (siehe Tabelle 7 Arrhythmia Severity Index, ASI) klassifiziert. Nach Ablauf der 30 Minuten wurde das Rattenherz dekanüliert und das Herzgewicht gemessen.

ARRHYTHMIA (min)	SCORE (ASI)
0 to 3	2
3 to 6	4
6 to 10	6
10 to 15	8
15 to 20	10
20 to 25	11
25 to 30	12 *

* (irreversible)

Tabelle 7 Arrhythmia Severity Index, ASI (114)

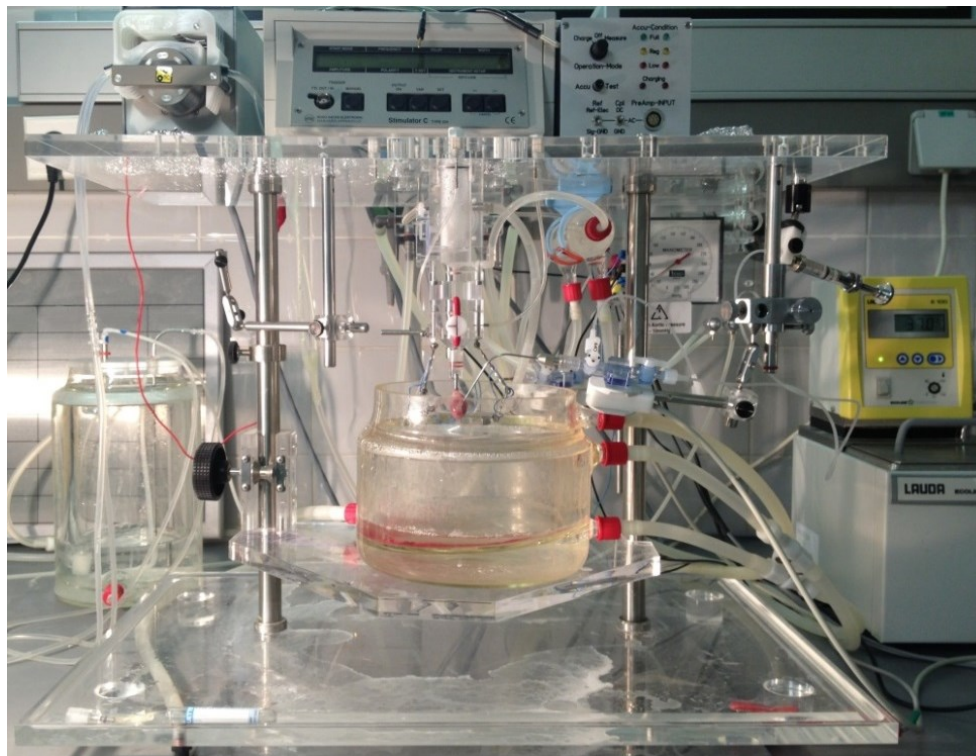


Abbildung 28 Das isoliert schlagende Rattenherz am Langendorff

Angiotensin-(1-7), 5-Hydroxymethyl-2-furfural und α -Ketoglutarat:

Auswirkungen auf die Herzfunktion isolierter Rattenherzen

während Ischämie und Reperfusion



Number: ____

Date:

body weight (g)	
heart weight (g)	

Heparin	400	IU	
Ketamin		mg	(70-100mg/kg)
Gewacalm		mg	(0,2mg/kg)

TIME	FLOW m/min
baseline	
	0
	5
	10
	15
	20
occlusion	
	0
	5
	10
	15
reperfusion	
	0
	5
	10
	15
	20
	25
	30

ASI	
-----	--

<http://www.schulbilder.org/malvorlage-ratte-110437.html>

Abbildung 29 Das Messprotokoll


3.5 Die Versuchsgruppen

 Kontrolle (n= 6)


Perfusion ab Baseline mit Krebs-Ringer-Lösung.

 Angiotensin-(1-7) (n= 5)

Perfusion ab Baseline mit Krebs-Ringer-Lösung und 0,22 ng/L Angiotensin-(1-7).

 Karal 5% (n= 7)

Perfusion ab Baseline mit Krebs-Ringer-Lösung und Karal ® 5%.

 Angiotensin-(1-7)+Karal 5% (n= 10)

Perfusion ab Baseline mit Krebs-Ringer-Lösung, 0,22 ng/L Angiotensin-(1-7) und Karal ® 5%.

 NVP (n= 4)

Perfusion ab Baseline mit Krebs-Ringer-Lösung und 0,22 ng/L Mas-Agonist.

3.6 Die Inhaltsstoffe der Versuchspertusionslösungen

Zusammensetzung der Krebs-Ringer-Lösung (2000ml)	
1900 ml	MiliQH ₂ O
4,4 g	NaHCO ₃
4,2 g	Dextrose
100 ml	Stock-Solution

Tabelle 8 Krebs-Ringer-Lösung

Zusammensetzung Stock-Solution (1000ml)	
700 ml	MiliQH ₂ O
138,4 g	NaCl
7,0 g	KCl
3,2 g	KH ₂ PO ₄ *
2,8 g	MgSO ₄
7,4 g	CaCl ₂ H ₂
* oder 5,8 g	MgSO ₄ 7H ₂ O

Tabelle 9 Stock Solution

Zusammensetzung von Karal ® 5%		
Verbindung	Menge	Konzentration (mmol)
Alphaketoglutarat	9 g	61,64
5-Hydroxy-Methylfurfural	3 g	23,79
N-Acetyl-Selenium-L-Methionin	2 g	0,0084
N-Acetyl-L-Methionin	0,1 g	0,52
Glucose	30 g	166,52
H ₂ O	1 l	

Tabelle 10 Karal ® 5%

Zusammensetzung von Mas-Agonist		
Verbindung	Molekulargewicht	Konzentration
NVP	1075 Mol/L	0,22 ng/L

Tabelle 11 Mas-Agonist

4 Ergebnisse

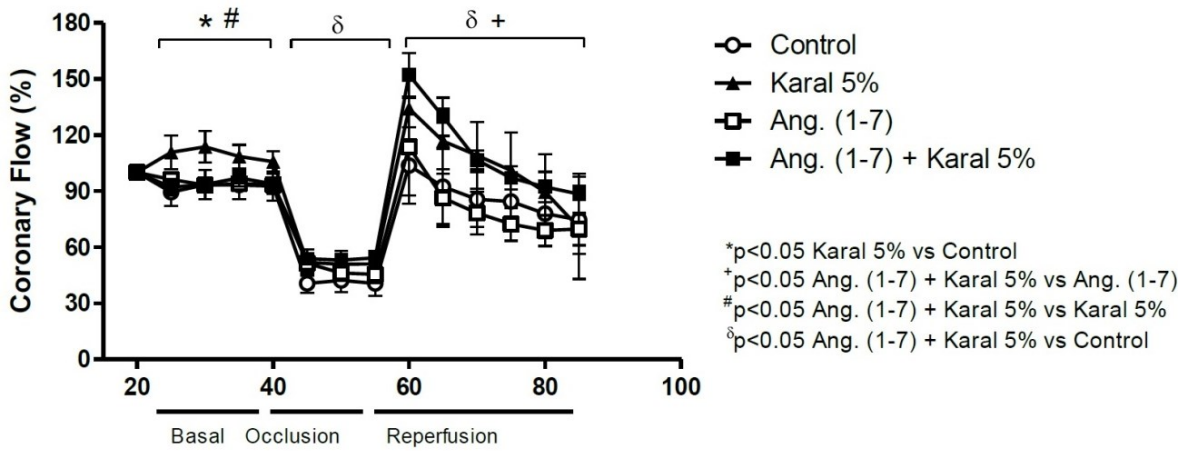


Tabelle 12 Der Koronarfluss

Die Tabelle 12 zeigt durch einen signifikanten Abfall des Koronarflusses in allen Versuchsgruppen die erfolgreiche Okklusion der LAD. Des Weiteren zeigt sich in Tabelle 12 zwischen der Kontroll-Gruppe und der Karal 5%-Gruppe eine signifikante Steigerung des Koronarflusses über das ganze Experiment. Zusätzlich zeigt die Kombination von Karal 5% und Angiotensin-(1-7) im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls eine signifikante Zunahme des Koronarflusses (beides $p<0.05$).

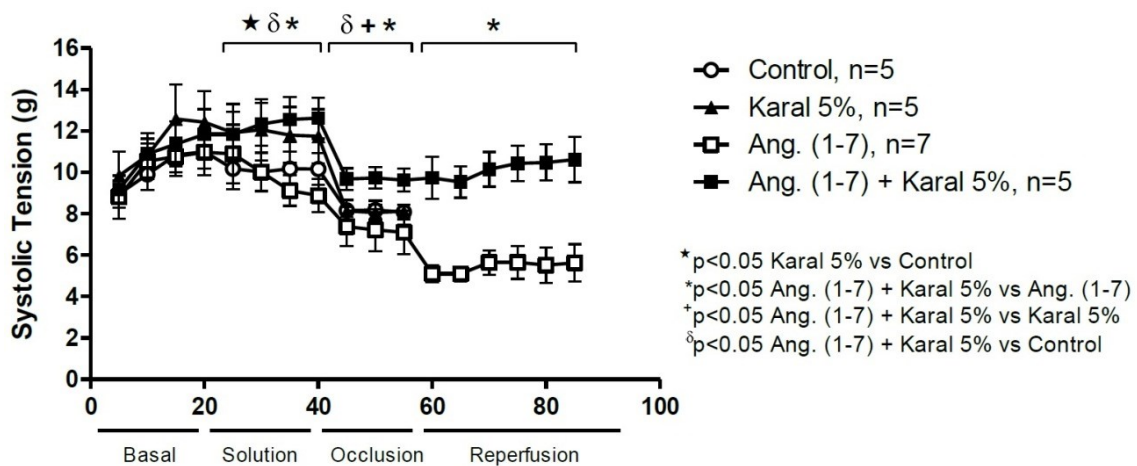


Tabelle 13 Der systolische Druck

Die Tabelle 13: Der systolische Druck zeigt dieselbe Charakteristik, wie der Koronarfluss in Tabelle 12 in allen Abschnitten des Versuches.

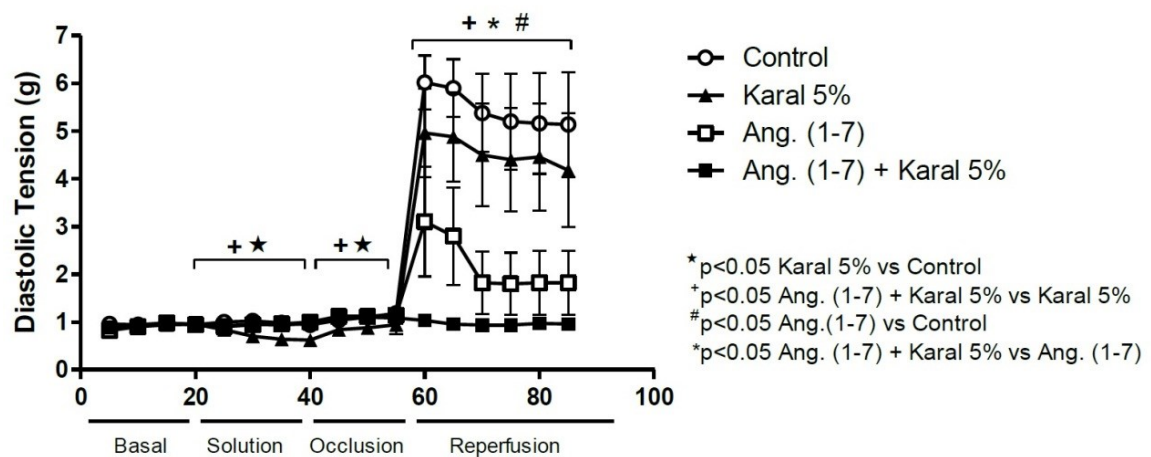


Tabelle 14 Der diastolische Druck

Die Tabelle 14 zeigt während der Diastole durch die Kombination von Karal 5% und Angiotensin-(1-7) im Vergleich zu den Einzelsubstanzen bzw. der Kontrolle ($p<0.05$) eine maximale Relaxation.

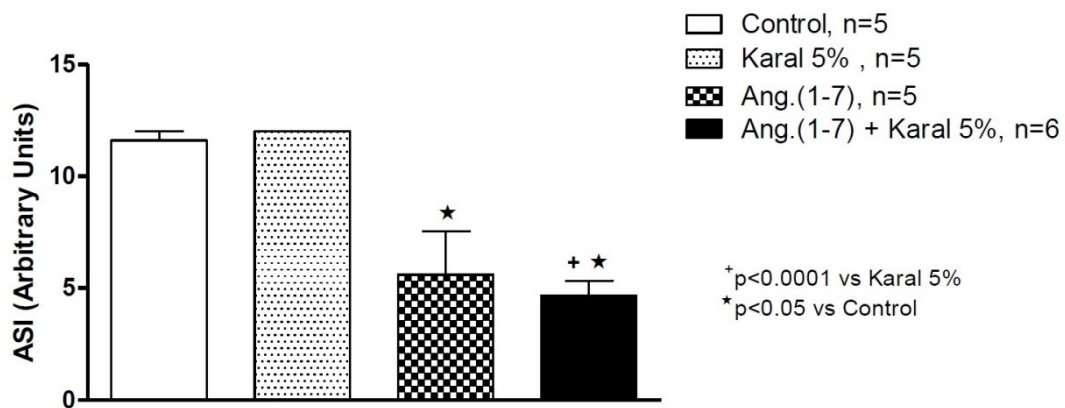


Tabelle 15 Der ASI

Die Tabelle 15 zeigt den Arrhythmia Severity Index, der die Dauer und Inzidenz der postischämischen Arrhythmien beschreibt. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich hier, ein Wiedereintreten des normalen Herzrhythmus der Angiotensin-(1-7)-Gruppe in Minute 5 der Reperfusion, sowie das Einsetzen einer rhythmischen Herzaktion der Kombination von Karal 5% und Angiotensin-(1-7) in Minute 4 der Reperfusion-

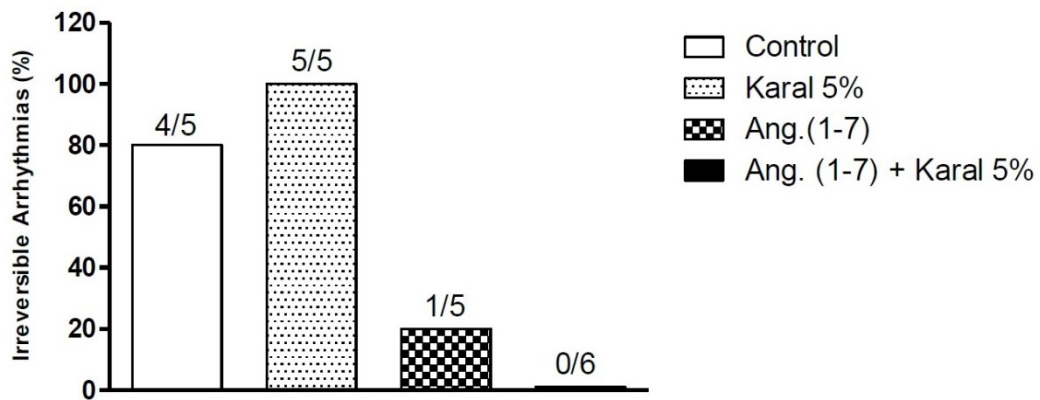


Tabelle 16 Das Aufkommen von irreversiblen Arrhythmien

Die Tabelle 16 beschreibt das Auftreten von irreversiblen Arrhythmien. In der Kontroll-Gruppe flimmerten 4 von 5 Herzen und in der Karal 5%-Gruppe sogar 5 von 5 Herzen während des gesamten Experimentes. In der Angiotensin-(1-7)-Gruppe wies nur eines von 5 und in der Kombinations-Gruppe keines der 6 Herzen eine irreversible Arrhythmie auf.

5 Diskussion

Chirurgische Eingriffe am Herzen, wie z.B.: interventionell vorgenommene Revaskularisationen, Bypass-Operationen, Herzklappen-Operationen mithilfe einer Herz-Lungen-Maschine oder Herztransplantationen, führen zu prolongierten Phasen der warmen und kalten Ischämie. In der anschließenden Phase der Reperfusion, wie in einigen wissenschaftlichen Studien bewiesen werden konnte, spielt der oxidative Stress eine wichtige Rolle in der Morbidität und Mortalität. Der Oxidative Stress im Rahmen eines chirurgischen Traumas beeinträchtigt die regulierende Funktion der vasoaktiven Substanz NO Stickstoffmonoxid. Die Aktivität der eNOS ist während der Ischämie bzw. Reperfusion reduziert und daher die Expression von NO vermindert. NOS können je nach Verfügbarkeit von Substraten und Kofaktoren neben NO auch Superoxid O_2^- synthetisieren. Unter physiologischen Umständen hält sich die Expression wie auch die Interaktion von den beiden Molekülen (NO und O_2^-) im Gleichgewicht, jedoch nicht unter oxidativem Stress. Die Folge des Ungleichgewichtes der RONS „reactive oxygen and nitrogen species“ und dem antioxidativen System, ist die endotheliale Dysfunktion. Die endotheliale Dysfunktion ist das Resultat einer Beeinträchtigung der endothel-abhängigen Vasodilatation, die durch eine herabgesetzte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid hervorgerufen wird, und stellt den Risikofaktor für die Entstehung einer Arteriosklerose dar. Eine reduzierte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid und eine Überexpression von Superoxid verursacht eine stärkere Produktion von Peroxynitrit $ONOO^-$, einem hochreaktiven Radikal, welches aus Stickstoffmonoxid und Superoxid gebildet wird. Peroxynitrit nitriert bzw. oxidiert die Aminosäure L-Arginin, die einzige Vorstufe von NO in der Synthese durch NOS, hemmt so die Produktion von Stickstoffmonoxid, führt so zu einer Überexpression von O_2^- und so wieder zu einer vermehrten Bildung von $ONOO^-$.

Um das Herz in der Reperfusion vor den Auswirkungen des oxidativen Stresses zu schützen, wird endogen das antioxidative System hochreguliert. Des Weiteren zeigt das Zusetzen von Radikalfängern (exogen) vor allem bei tierexperimentellen in vitro Studien einen deutlichen Benefit. Allerdings müssen diese Daten sehr kritisch beurteilt werden, da in vitro Experimente einerseits die Komplexität eines lebenden Organismus mit all seinen Wechselwirkungen nicht darstellen können und andererseits sind tierexperimentelle Studien auch nicht eins zu eins auf den Menschen übertragbar. Trotzdem bieten sie gerade

wegen der hohen und verlässlichen Reproduzierbarkeit eine wichtige Grundlage im Bereich der medizinischen Forschung.

In einer Masterarbeit der UFMG (Brasilien) wurden erstmals die antioxidativen und dosisabhängigen Eigenschaften von Karal® publiziert. Karal® erwies sich durch eine gesteigerte Freisetzung von NO und eine daraus resultierende Vasodilatation als kardioprotektiv. α -Ketoglutarat reduziert die Konzentration von Peroxynitrit ONOO⁻ und schützt so unter anderem vor Schäden an der DNA bzw. den Membranlipiden. 5-HMF steigert zudem endogen die Freisetzung der beiden Enzyme Glutathionperoxidase und Superoxiddismutase. Eine Kombination mit dem Peptid Angiotensin-(1-7) verbessert zusätzlich die positiven Eigenschaften von Karal®.

Das Heptapeptid Angiotensin-(1-7) ist eine wesentliche aktive Komponente im Renin-Angiotensin-System und ein Gegenspieler des Angiotensin II. Angiotensin-(1-7) erwies sich nach seiner Entdeckung im Jahre 1988 als antioxidativ, durch eine gesteigerte Produktion von NO Stickstoffmonoxid und wirkt per se auch als Radikalfänger. Die positiven Eigenschaften dieser beiden Antioxidanzien, Angiotensin-(1-7) sowie Karal®, potenzieren sich in Kombination und reduzieren so den oxidativen Schaden an der Zelle durch freie Radikale, die vermehrt während der Reperfusion gebildet werden.

Interessant ist, dass die Expression des endogenen Peptids Angiotensin (1-7) in Patienten, die an einer Herzerkrankung leiden, hinaufreguliert ist. Wie bereits früher beschrieben, ist der Wirkungsmechanismus dieses Peptides mittlerweile über die ACE 2/Ang-(1-7)/Mas-Rezeptor Achse nicht nur gut bekannt, sondern in zahlreichen tierexperimentellen und humanen Studien belegt und weitgehend akzeptiert.

Die gesteigerte Wirkung der Kombination erklären wir durch folgende Tatsache: Wir wissen, dass das Heptapeptid an seinen aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin durch Peroxynitrit nitriert wird, und somit, wie wir glauben, inaktiviert wird. In einer anderen publizierten Studie zeigte sich mittels NMR-Spektroskopie, dass in der Anwesenheit von 5-HMF und Alphaketoglutarat diese Nitrierung nicht stattfindet. Derzeit ist dieser Mechanismus jedoch rein empirisch. Um diese Theorie wissenschaftlich zu bestätigen, wird gerade parallel zu dieser Diplomarbeit in einer anderen Arbeit das Peptid Angiotensin-(1-7) mit Peroxynitrit „beschossen“ und diese Verbindung dann an isolierten Rattenherzen ausgetestet. Sollte sich eine Verschlechterung der Herzfunktion, wie sie zu erwarten wäre, zeigen könnte man diese Hypothese mit wissenschaftlichen Daten untermauern.

Bezüglich des neuen Peptides (NVP) konnten wir aufgrund der geringen Versuchstieranzahl bis dato noch keine signifikanten Aussagen treffen. In der NVP-Gruppe (n=4) konnte im Vergleich zur Kontrolle zwar keine Steigerung des Koronarflusses bzw. eine Verbesserung der antiarrhythmischen Eigenschaften beobachtet werden, jedoch zeigte sich eine deutliche Steigerung der systolischen Funktion nach Zugabe des Peptides in der bekannten Konzentration von 0,22 ng/l. In der Zukunft wird eine Erhöhung der Anzahl von Versuchstieren zeigen, ob das Peptid ähnliche Eigenschaften, wie das Heptapeptid Angiotensin-(1-7) aufweist oder nicht. Sollte nach Abschluss dieser Pilotversuche ein Anhalt zur weiteren Erforschung des Peptides gegeben sein, wird in weiterer Folge auch der Mechanismus dahinter (Wirkung über den Mas-Rezeptor) im Rahmen einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit geklärt werden müssen.

5.1 Die Auswahl der Versuchstiere.

Um einen möglichst nahen klinischen bzw. menschlichen Bezug zu gewährleisten, sollte man für die Untersuchung der regionalen Ischämie am Herz ein Versuchstier wählen, das der Anatomie des menschlichen Herzens ähnlich ist. Das Koronargefäßsystem des Schweines ist dem eines Menschen hinsichtlich des Verzweigungsmusters, der Koronarversorgung der Leitungsbahnen und der Papillarmuskeln sehr ähnlich. Das Schwein besitzt kleine Anastomosen zwischen der linken und rechten Koronararterie. Ganz im Gegensatz zu einem Hund, der ein ausgedehntes Kollateralsystem aufweist. Allerdings ist der Hund als Versuchstier in unseren Breiten weniger geläufig. Das menschliche Verzweigungsmuster der Koronarien liegt zwischen diesen beiden Extremen (Schwein und Hund). Im Falle einer akuten Koronarligatur beim Schwein wie auch z.B.: beim Schafen oder Hasen sind die weniger ausgeprägten Anastomosen nicht ausreichend um lebensbedrohliche ventrikuläre Arrhythmien und/oder Nekrosen zu verhindern. Der Hund wie auch z.B.: die Ratte oder die Maus haben eine höhere Überlebensrate beim akuten Verschluss einer Koronararterie. Die Lage des Koronarsystems ist ein weiteres Problem bei Ratten und Mäusen. Das Koronarsystem bei Ratten bzw. Mäusen kann sich mehr subepikardial als epikardial befinden. Dies kann eine sichere und genaue Identifizierung von Strukturen schwierig gestalten. Die Ligatur der LAD mit einem Faden wird daher an der üblichen Stelle, an der sich normalerweise die LAD befindet, gesetzt. So wird das Gefäß samt dem kompletten umliegenden Areal straff ligiert und damit eine regionale Ischämie erzeugt. Vgl. (115)

Glossar

allogen	früher homogen, von genetisch unterschiedlichen Individuen der gleichen Spezies stammend
amphibol	zweideutig
anabol	den Aufbaustoffwechsel betreffend
chachexia strumipriva	Schilddrüsenunterfunktion
exzitatorisch	erregend
heterotop	örtlich abweichend
katabol	zum Abbaustoffwechsel gehörig
orthotop	örtlich übereinstimmend
revised	verbessert, überarbeitet
syngen	früher isogen, von genetisch identischen Individuen stammend
to reduce	reduzieren, verringern
to refine	verfeinern, weiterentwickeln
to replace	ersetzen, austauschen

Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACE 2	Angiotensin-Converting-Enzym 2.
ALT	Alanin-Aminotransferase, alter Name: GPT
Ang I	Angiotensin I
Ang II	Angiotensin II
Ang IV	Angiotensin IV
Ang-(1-7)	Angiotensin-(1-7)
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
AST	Aspartat-Aminotransferase, alter Name: GOT
AT-1-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1
AT-2-Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 2
EPR(S)	Elektronen-Paramagnetische-Resonanzspektroskop
ERK	extracellular signal regulated kinase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HLA- System	Humane-Leukozyten-Antigensystem
HMF	Hydroxymethylfurfural
HTX	Herztransplantation/en
KG	Körpergewicht
KO	Knock-Out
LAD	left anterior descending coronary artery
MAP	mitogen-activated protein
MMP	mitochondrial membrane potential
NMR	Nuclear magnetic resonance
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen
RAS	Renin-Angiotensin-System

RIVA	lat.: Ramus interventricularis anterior engl.: LAD, left anterior descending
RONs	reactive oxygen and nitrogen species
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
SOD	Superoxiddismutase
TPG	Transplantationsgesetz
TVRÄG	Tierversuchsrechtsänderungsgesetz
TX	Transplantation/en
VAD	Ventricular assist device
Vgl.	Vergleiche

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Anzahl der verstorbenen Spender und Patienten auf der Warteliste 2011 Vgl. (24).....</i>	<i>8</i>
<i>Tabelle 2 Anzahl der durchgeführten Transplantationen in Österreich 2011 Vgl. (24).....</i>	<i>15</i>
<i>Tabelle 3 Transplantationsgründe Vgl. (41)</i>	<i>16</i>
<i>Tabelle 4 NYHA-Stadien (44)</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 5 Grade der Abstoßungsreaktion Vgl. (56)</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 6 Kategorien der FELASA (110), (109).....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 7 Arrhythmia Severity Index, ASI (114)</i>	<i>58</i>
<i>Tabelle 8 Krebs-Ringer-Lösung</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 9 Stock Solution.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabelle 10 Karal[®] 5%</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 11 Mas-Agonist</i>	<i>62</i>
<i>Tabelle 12 Der Koronarfluss.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 13 Der systolische Druck</i>	<i>63</i>
<i>Tabelle 14 Der diastolische Druck.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabelle 15 Der ASI.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabelle 16 Das Aufkommen von irreversiblen Arrhythmien.....</i>	<i>65</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Emil Theodor Kocher (118)	4
Abbildung 2 Christiaan Barnard (14)	6
Abbildung 3 Jean-Francois Borel (127)	7
Abbildung 4 Hartmann Stähelin (127)	7
Abbildung 5 Logo Eurotransplant (23)	8
Abbildung 6 Zeichnung von L. Metzenbauer 1984 (54)	19
Abbildung 7 Durchführung einer EMB (57)	21
Abbildung 8 Strukturformel Stickstoffmonoxid (130)	26
Abbildung 9 Das Renin-Angiotensin-System (66)	29
Abbildung 10 Die Strukturformel des Heptapeptid: Angiotensin (1-7) (66)	30
Abbildung 11 Chromosom 6, weiblicher Karyotyp (46,XX) (82)	31
Abbildung 12 α -Ketoglutarat (120)	36
Abbildung 13 Grundgerüst einer Aminosäure (120)	36
Abbildung 14 Synthese durch ALT oder GPT (122)	37
Abbildung 15 Synthese durch AST oder GOT (122)	37
Abbildung 16 Oxidative Desaminierung von Glutamat (121)	38
Abbildung 17 Hans Adolf Krebs (89)	38
Abbildung 18 Der Citratzyklus (123)	39
Abbildung 19 Louis Camille Maillard (125)	43
Abbildung 20 Strukturformel von 5-HMF Vgl. (126)	45
Abbildung 21 Oscar Langendorff (124)	48
Abbildung 22 Die Langendorff Apparatur	50
Abbildung 23 Das 3R-Prinzip nach Russell und Burch Vgl. (111) (112)	54
Abbildung 24 Sprague-Dawley Ratte (128)	55
Abbildung 25 Ausschnitt eines Situs der Ratte, <i>Rattus norvegicus</i> (129)	55
Abbildung 26 Isoliert schlagendes Rattenherz am Langendorff	56
Abbildung 27 Okklusion der LAD am Rattenherz	57
Abbildung 28 Das isoliert schlagende Rattenherz am Langendorff	58
Abbildung 29 Das Messprotokoll	59

Literaturverzeichnis

1. [Online] [Zitat vom: 14. 4 2013.] <http://www.aphorismen.de/zitat/1115>.
2. [Online][Zitat vom: 25. März 2013.]
http://www.aphorismen.de/suche?text=Was+uns+am+Leben+erh%C3%A4lt%2C+kann+uns+auch+krank+machen&autor_quelle=hippokrates&thema=.
3. **Helmut Wachter, Arno Hauser, Gilbert Reibnegger.** *Chemie für Mediziner.* 8. Auflage. 2002. S. 213. ISBN: 3-11-017581-9.
4. **Golder, Werner.** *Hippokrates und der Corpus Hippocraticum: Eine Einführung für Philologen und Mediziner.* 2007. ISBN-13: 978-3826033353.
5. **Karol A. Kaminski, Tomasz A. Bonda, Janusz Korecki, , Wlodzimierz J. Musial.** Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury. *International Journal of Cardiology.* 2002, 86, S. 41-59.
6. **James L. Park, Benedict R. Lucchesi.** Mechanisms of Myocardial Reperfusion Injury. *Annals of Thoracic Surgery.* 1999, 68, S. 1905-1912.
7. **Löffler, Georg.** *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie.* 7. s.l. : Springer, 2008. S. 178-179. ISBN-13: 978-3540765110.
8. **Detlev Ganten, Josef Köhrle, Klaus Ruckpaul.** *Molekularmedizinische Grundlagen Von Para- und Autokrinen Regulationsstörungen.* s.l. : Springer, 2006. S. 162. ISBN-13: 978-3540287810.
9. **Jay L. Zweier, Hassan Talukder.** The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovascular Research.* 2006, 70, S. 181-190.
10. **S. Bachmann, M. Meier, A. Känzig.** 5-Hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Lebensmitteln. *Lebensmittelchemie.* 1997, 51, S. 49-50.
11. **A.J. Ferreira, R.A.S. Santos.** Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2005, 38, S. 499-507.
12. **Anderson J. Ferreira, Robson A. S. Santos, Mohan K. Raizada.** Angiotensin-(1-7)/Angiotensin-Converting Enzyme 2/Mas Receptor Axis and Related Mechanisms. *International Journal of Hypertension.* 2012, S. 2. Article ID 690785.
13. **Ulf Kjellman, Kerstin Björk, Rolf Ekroth, Hans Karlsson, Rudolf Jagenburg, Folke Nilsson, Gunnar Svensson, Jan Wernerman.** α -ketoglutarate for myocardial protection in heart surgery. *The Lancet.* 4. März 1995, 345, S. 552- 553.
14. **Cooper, David K.C.** Christiaan Barnard and his contributions to heart transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation.* 2001, 20, S. 599-610.

15. Novartis Transplant Österreich. [Online] [Zitat vom: 16. Jänner 2013.] http://www.transplant.at/organtransplantation/geschichte_organtransplantation.shtml.
16. **Lamacìe, Mariana Macedo.** *FUNCAO CARDIACA E FLUXA CORONARIANO DE CORACOES ISOLADOS DE RATOS MANTIDOS EM SOLUCAO CARDIOPLEGIA, efeitos da administracao de alfacetogluturato/5-HMF (solucao Karal®) e Angiotensina (1-7).* INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLOGICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. 2008. Masterarbeit.
17. **Pschyrembel, Willibald.** *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.* 2012. ISBN-13: 978-3110277883.
18. **Hammelmann, Iris.** *Entdecker& Erfinder.* München : Compact Verlag GmbH, 2010. ISBN 978 3 8174 8077 7.
19. **Thomas, Schlich.** *Die Erfindung der Organtransplantation- Erfolg und Scheitern des chirurgischen Organersatzes (1880-1930).* Frankfurt/Main : Campus Verlag , 1998. ISBN 3 593 35940 5.
20. **Wolfgang Hach, Viola Hach-Wunderle.** *Blickpunkte in die Medizingeschichte des 19.Jahrhunderts.* Stuttgart : Schattauer GmbH, 2007. ISBN 978 3 7945 2592 8.
21. *Nobelprize.org, The Official Site of the Nobel Prize.* [Online] [Zitat vom: 15. Juni 2012.] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1912/, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1930/.
22. *Nobelprize.org, The Official Site of the Nobel Prize.* [Online] [Zitat vom: 15. Juni 2012.] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1990/, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1980/, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1960/.
23. Eurotransplant. [Online] [Zitat vom: 16. Jänner 2013.] http://www.eurotransplant.org/cms/index.php?page=about_brief.
24. *Eurotransplant, International Foundation.* [Online] [Zitat vom: 15. Juni 2012.] <http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=Year-Statistics-20113.pdf>.
25. RIS, Bundeskanzleramt Rechtsinformationssystem. [Online] [Zitat vom: 17. Jänner 2013.] http://www.ris.bka.gv.at/Dokumente/BgblAuth/BGBLA_2012_I_108/BGBLA_2012_I_108.html.

26. Gesundheit Österreich GmbH. [Online] [Zitat vom: 15. Juni 2012.]
http://www.goeg.at/cxdata/media/download/tx_statistik_2001_2010.pdf,
http://www.goeg.at/cxdata/media/download/1_spenderkriterien_12.pdf,
http://www.goeg.at/cxdata/media/download/5_rechtliche_Grundlagen_10.pdf.
27. Gesundheit Österreich GmbH, Widerspruch. [Online] [Zitat vom: 15. Juli 2012.]
<http://www.goeg.at/de/Widerspruchsregister>.
28. Gesundheit Österreich GmbH. [Online] [Zitat vom: 16. Jänner 2013.]
<http://www.goeg.at/index.php?pid=produkteservicesdetail&service=8&smark=viz&noreplace=yes>.
29. DSO Deutsche Stiftung Organtransplantation. [Online] [Zitat vom: 16. Jänner 2013.]
http://www.dso.de/uploads/tx_dsodl/Gesetzliche_Regelungen_Ausland_2012.pdf.
30. DSO Deutsche Stiftung Organtransplantation. [Online] [Zitat vom: 16. Jänner 2013.]
<http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/gesetzliche-grundlagen.html>.
31. Bundesministerium der Justiz, Gesetze im Internet. [Online] [Zitat vom: 16. Jänner 2013.]
<http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/tpg/gesamt.pdf>.
32. Deutsche Stiftung Organtransplantation. [Online] [Zitat vom: 16. Jänner 2013.]
<http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/themaorganspende/organspendeausweis.html>.
33. Vatikan , Der heilige Stuhl. [Online] [Zitat vom: 4. Jänner 2013.]
http://www.vatican.va/holy_father/benedict_xvi/speeches/2008/november/documents/hf_ben-xvi_spe_20081107_acdlife_ge.html.
34. Deutsche Bischofskonferenz. [Online] [Zitat vom: 4. Jänner 2013.]
http://www.dbk-shop.de/media/files_public/lnuwlkvhjwjj/DBK_61.pdf.
35. Vatikan, Der heilige Stuhl. [Online] [Zitat vom: 4. Jänner 2013.]
http://www.vatican.va/archive/compendium_ccc/documents/archive_2005_compendium-ccc_ge.html.
36. Offiziellen Website von Jehovas Zeugen in Österreich . [Online] [Zitat vom: 7. Jänner 2013.]
<http://www.jehovas-zeugen.at/Geschichte.6.0.html>.
37. Jehovas Zeugen Informationsportal. [Online] [Zitat vom: 7. Jänner 2013.]
<http://www.jehovaszeugen.de/Wie-wir-ueber-medizinische-Behandlu.76.0.html>.
38. *Die Bibel*. 20. Auflage. s.l. : Deutsche Bibelgesellschaft, 1991. ISBN: 3438012707.
39. Netzwerk Sektenausstieg. [Online] [Zitat vom: 7. Jänner 2013.]
<http://datei.sektenausstieg.net/literatur/blutAslan.pdf>.

40. **Fuat Oduncu, Ulrich Schroth.** *Organtransplantation, Organgewinnung und -verteilung, Perspektiven (Medizin-Ethik-Recht)*. 2003. S. 110-117. ISSN: 3 525 45708 1.
41. **Andreas J. Flammer, Frank Ruschitzka, Matthias Hermann.** Langzeitergebnisse nach Herztransplantation. [Hrsg.] the Swiss Society for Angiology, the Swiss Society of Hypertension and the Swiss Paediatric Cardiology Society Swiss Society of Cardiology. *Kardiovaskuläre Medizin*. Oktober 2009, Bd. 12, 10, S. 266-272.
42. *European Society of Cardiology*. [Online] [Zitat vom: 29. Jänner 2013.] <http://www.escardio.org/guidelines-surveys/esc-guidelines/GuidelinesDocuments/Guidelines-Acute%20and%20Chronic-HF-FT.pdf>.
43. **Christiane Bieber, Hanns-Wolf Baenkler, Keikawus Arastéh, Roland Brandt, Tushar Chatterjee.** *Duale Reihe Innere Medizin*. 3. s.l. : Thieme, 2012. S. 94. ISBN-13: 978-3131181633.
44. **Gerd Herold, Mitarbeiter.** *Innere Medizin*. 2008. S. 190. ISBN-13: 978-3890197043.
45. *World Health Organization*. [Online] [Zitat vom: 29. Jänner 2013.] <http://apps.who.int/gho/data/?vid=2490#>, <http://apps.who.int/gho/data/?vid=2490#>, <http://apps.who.int/gho/data/?vid=2490#>.
46. **Erdmann, Erland.** *Klinische Kardiologie: Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. s.l. : Springer, 2011. S. 121. ISBN-13: 978-3642164804.
47. **Antretter, Herwig.** Extrakorporale Unterstützungssysteme -LVAD/BVAD. *Journal für Kardiologie*. 2004, 11, S. 28-30.
48. **D. Zimpfer, A. Zuckermann, G. Wieselthaler, A. Kocher, M. Czerny, A. Mühlbauer, S. Rödler, R. Pacher, M. Hülsmann, E. Wolner, M. Grimm.** Indikationen zur Herztransplantation. *Journal für Kardiologie*. 2004, 11, S. 42-43.
49. **Paul Mohacsia, Mario Stalderb, Michele Martinella, Thierry Carrelb.** Herztransplantation und mechanische Kreislaufunterstützung, Aktueller Stand und Perspektiven (Teil 2). *Schweizerisches Medizin-Forum*. 2011, 6, S. 98-102.
50. **Doris Henne-Bruns, Michael Dürig, Bernd Kremer.** *Duale Reihe Chirurgie*. 4. 2012. S. 1257, 1259. ISBN-13: 978-3131252944.
51. **Gilles Dreyfus, Victor Jebara, Sherban Mihaileanu and Alain F. Carpentier.** Total orthotopic heart transplantation: An alternative to the standard technique. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1991, 82, S. 1181-1184.
52. **Sack, F.-U.** Technik der Herztransplantation: Standardprozedur oder Raum für Weiterentwicklung. *Transplantationsmedizin*. 2010, Bd. 1, 22, S. 47-53.

53. Herztransplantation SüdWest e.V. [Online] [Zitat vom: 29. Jänner 2013.] <http://www.herztransplantation.de/pdf/HTX-was-ist-das.pdf>.
54. Meduni Wien, 25 Jahre Herztransplantation. [Online] [Zitat vom: 30. Jänner 2013.] http://www.meduniwien.ac.at/typo3/fileadmin/htx/uploads/media/Imageposter_25j_HTX_web2.pdf.
55. **Josef Stehlik, Leah B. Edwards, Anna Y. Kucheryavaya, Christian Benden, Jason D. Christie, Fabienne Dobbels, Richard Kirk, Axel O. Rahmel, Marshall I. Hertz.** The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplant Report—2011. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2011, Bd. 11, 30, S. 1078-1094.
56. *The International Society of Heart and Lung Transplantation Guidelines for the care of heart transplant recipients.* [Online] [Zitat vom: 30. Jänner 2013.] <http://www.ishlt.org/publications/guidelines.asp>.
57. Universitätsspital Zürich, Klinik für Kardiologie. [Online] [Zitat vom: 6. Februar 2013.] <http://www.kardiologie.usz.ch/HealthProfessionals/Behandlungsangebot/Myokardbiopsien/Seiten/default.aspx>.
58. **Gerhard Pözl, M. Frick.** Transplantvaskulopathie – Pathophysiologie, Diagnose und Therapie. *Journal für Kardiologie*. 2009, 3-4, S. 80-84.
59. **Stanek, Brigitte.** Hochdruck nach Herztransplantation: Ursachen, Risiken, Therapieoptionen. *Journal für Hypertonie*. 2002, 1, S. 15-19.
60. **Jan Steffel, Thomas F. Lüscher.** *Herz-Kreislauf*. s.l. : Springer, 2010. S. 24. ISBN-13: 978-3642167171.
61. **Werner Siems, Klaus Krämer, Tilman Grune.** *Oxidativer Stress und Pharmaka*. s.l. : Govi-Verlag, 2005. ISBN-13: 978-3774110281.
62. **Luiza A Rabelo, Natalia Alenina, Michael Bader.** ACE2–angiotensin-(1–7)–Mas axis and oxidative stress in cardiovascular disease. *Hypertension Research*. 2011, 34, S. 154-160.
63. *Nobelprize.org, The Official Web Site of the Nobel Prize.* [Online] [Zitat vom: 15. Jänner 2013.] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/popular-medicinprize2007.pdf.
64. **Hedrich, Hans.** *The Laboratory Mouse*. 2. 2012. S. 356. ISBN-13: 978-0123820082.

65. **AJ Ferreira, RAS Santos, AP Almeida.** Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. September 2002, Bd. 35, 9, S. 1083- 1090.
66. **Aaron J. Trask, Carlos M. Ferrario.** Angiotensin-(1-7): Pharmacology and New Perspectives. *Cardiovascular Drug Reviews*. 2007, 25, S. 162–174.
67. **Adam P. Mecca, Robert W. Regenhardt, Timothy E. O'Connor, Jason P. Joseph, Mohan K. Raizada, Michael J. Katovich Colin Sumners.** Cerebroprotection by angiotensin-(1–7) in endothelin-1-induced ischaemic stroke. *Experimental Physiology*. 2011, 10, S. 1084-1096.
68. **Anderson J. Ferreira, Tatiane M. Murc,a, Rodrigo A. Fraga-Silva, Carlos Henrique Castro, Mohan K. Raizada, Robson A. S. Santos.** New Cardiovascular and Pulmonary Therapeutic. *International Journal of Hypertension*. 2012, S. 13. Article ID 147825.
69. **Carlos Henrique de Castro, Robson Augusto Souza dos Santos, Anderson José Ferreira, Michael Bader, Natalia Alenina, Alvaír Pinto de Almeida.** Evidence for a Functional Interaction of the Angiotensin-(1–7) Receptor Mas With AT1 and AT2 Receptors in the Mouse Heart. *Hypertension*. 2005 , 46, S. 937-942.
70. **Chantal Mercure, Alvaro Yogi, Glaucia E. Callera, Anna B. Aranha, Michael Bader, Anderson J. Ferreira, Robson A. S. Santos, Thomas Walther, Rhian M. Touyz and Timothy L. Reudelhuber.** Angiotensin(1-7) Blunts Hypertensive Cardiac Remodeling by a Direct Effect on the Heart. *Circulation Research*. 2008, 103, S. 1319-1326.
71. **Chris Tikellis, M. C. Thomas.** Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a KeyModulator of the Renin Angiotensin Systemin Health and Disease. *International Journal of Peptides*. 2012, S. 8. Article ID 256294.
72. **David B. Averill, Yuichiro Ishiyama, Mark C. Chappell, Carlos M. Ferrario.** Cardiac Angiotensin-(1-7) in Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation*. 2003, 108, S. 2141-2146.
73. **Eneas R. M. Gomes, Robson A. S. Santos, Silvia Guatimosim.** Angiotensin-(1-7)-Mediated Signaling in Cardiomyocytes. *International Journal of Hypertension*. 2012, S. 8. Article ID 493129.
74. **Fulvia D.Marques, Marcos B.Melo, Leandro E. Souza, Maria Claudia C. Irigoyen, Ruben D. Sinisterra, Frederico B. de Sousa, Silvia Q. Savergnini, Vinicius B. A.**

- Braga, Anderson J. Ferreira, Robson A. S. Santos.** Beneficial Effects of Long-Term Administration of an Oral Formulation of Angiotensin-(1–7) in Infarcted Rats. *International Journal of Hypertension*. 2012, S. 12. Article ID 795452.
75. **Michael Bader, Robson A Santos, Thomas Unger, U Muscha Steckelings.** New therapeutic pathways in the RAS. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2012, 13, S. 505-508.
76. **Natalia Alenina, Ping Xu, Brit Rentzsch, Eugene L. Patkin Michael Bader.** Genetically altered animal models for Mas and angiotensin-(1–7). *Experimental Physiology*. 2008, 93, S. 528-537.
77. **R. A. S. Santos, A. C. Simoes e Silva, C. Maric, D. M. R. Silva, R. P. Machado, I. de Buhr, S. Heringer-Walther, S. Veloso B. Pinheiro, M. T. Lopes, M. Bader, E. P. Mendes, V. S. Lemos, M. J. Campagnole-Santos, H.-P. Schultheiss, R. Speth, T. Walther.** Angiotensin-(1–7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003, 100, S. 8258–8263.
78. **Robson A. S. Santos, Anderson J. Ferreira, Ana Cristina Simões e Silva.** Recent advances in the angiotensin-converting. *Experimental Physiology*. 2008, 93, S. 519-527.
79. **Robson AS Santos, Anderson J Ferreira, Thiago Verano-Braga, Michael Bader.** Angiotensin-converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the Renin Angiotensin System. *Journal of Endocrinology*. 23. Oktober 2012.
80. **A.J. Ferreira, R.A.S. Santos, A.P. Almeida.** Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2002, 35, S. 1089-1090.
81. **Jan Behrends, Josef Bischofberger, Rainer Deutzmann.** *Duale Reihe Physiologie*. s.l. : Georg Thieme Verlag, 2012. S. 319. ISBN-13: 978-3131384126.
82. **Jan Murken, Tiemo Grimm, Elke Holinski-Feder.** *Humangenetik*. s.l. : Georg Thieme Verlag, 2006. S. 143. Abb. 2.9. ISBN-13: 978-3-13-139297-8.
83. **Carmine, Franz.** *Genomtechnologie und Stammzellforschung - Ein verantwortbares Risiko?: Fakten und Meinungen*. 1. s.l. : Govi-Verlag, 2003. S. 90. ISBN-13: 978-3774110007.
84. **Gerhard Gründer, Otto Benkert.** *Handbuch der Psychopharmakotherapie*. 2. s.l. : Springer, 2012. S. 248. ISBN-13: 978-3642198434.
85. **Löffler, Georg.** *Basiswissen Biochemie*. 6. s.l. : Springer, 2005. ISBN: 3-540-23885-9.

86. **Horn, Florian.** *Biochemie des Menschen.* 5. s.l. : Thieme, 2012. ISBN: 978-3-13-1308856.
87. **Florian Horn, Isabelle Moc, Nadine Schneider, Christian Grillhöl, Silke Berghold, Gerd Lindenmeier.** *Biochemie des Menschen.* 3. s.l. : Thieme, 2005. ISBN: 3-13-130883-4.
88. **Eckart, Wolfgang Uwe.** *Illustrierte Geschichte der Medizin: Von der französischen Revolution bis zur Gegenwart.* s.l. : Springer, 2010. S. 296- 297. 9783642126093.
89. *Nobelprize.org, The Official Site of the Nobel Prize.* [Online] [Zitat vom: 26. November 2012.]
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1953/krebs.html.
90. **Furger, Philipp.** *Labor quick.* 1. s.l. : Thieme, 2008. S. 39; 108-109. ISBN: 978-3131475213.
91. **Hilmar Burchardi, Reinhard Larsen, H.-P. Schuster, P.M.Suter.** *Die Intensivmedizin.* 9. s.l. : Springer, 2003. S. 256-257, 768. ISBN: 3540008829.
92. **Werner Baltes, Reinhard Matissek.** *Lebensmittelchemie.* 7.Auflage. s.l. : Springer, 2011. S. 133-134, 141- 144. ISBN: 978-3642165382.
93. **Gruber, Werner.** *Die Genussformel.* Salzburg : Ecowin Verlag GmbH, 2008. S. 122. ISBN: 978-3-902404-59-6.
94. **Klaus Abraham, Rainer Günter, Katharina Berg, Gerhard Heinemeyer, Alfonso Lampen, Kalus E. Appel.** Toxicology and risk assessment of 5-Hydroxymethylfurfural in food. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2011, 55, S. 667-678.
95. Bundesinstitut für Risikobewertung. [Online] [Zitat vom: 7. Dezember 2012.]
http://www.bfr.bund.de/de/das_bundesinstitut_fuer_risikobewertung__bfr_-280.html.
96. Bundesinstitut für Risikobewertung. [Online] [Zitat vom: 7. Dezember 2012.]
http://www.bfr.bund.de/cm/343/5_hmf_gehalte_in_lebensmitteln_sind_nach_derzeitigem_wissenschaftlichen_kennntnisstand_gesundheitlich_unproblematisch.pdf.
97. **Werner Böcker, Helmut Denk, Philipp U. Heitz.** *Pathologie.* 3. . s.l. : Elsevier GmbH, 2004. S. 516. ISBN-10: 3437423819.
98. **Osheiza Abdulmalik, Martin K. Safo, Qiukan Chen, Jisheng Yang, Carlo Brugnara, Kwaku Ohene-Frempong, Donald J. Abraham, Toshio Asakura.** 5-hydroxymethyl-2-furfural modifies intracellular sickle haemoglobin and inhibits sickling of red blood cells. *British Journal of Haematology.* 2005, 128, S. 552-561.



99. **Yong-Xin Li, Yong Li, Zhong Ji Qian, Moon-Moo Kim, Se-Kwon Kim.** In Vitro Antioxidant Activity of 5-HMF Isolated from Marine Red Alga *Laurencia undulata* in Free-Radical-Mediated Oxidative Systems. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2009, 19, S. 1319-1327.
100. **Ming-Ming Li, Li-Ying Wu, Tong Zhao, Lei Xiong, Xin Huang, Zhao-Hui Liu, Xue-Lai Fan, Cheng-Rong Xiao, Yue Gao, Yun-Bao Ma, Ji-Jun Chen, Ling-Ling Zhu, Ming Fan.** The protective role of 5-HMF against hypoxic injury. *Cell Stress and Chaperones*. 2011, 16, S. 267-273.
101. **Peter Karlson, Detlef Doenecke, Jan Koolman, Georg Fuchs, Wolfgang Gerok.** *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15. 2005. S. 495. ISBN-10: 3133578154.
102. **Robert M. Bell, Mihaela M. Mocanu, Derek M. Yellon.** Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion. [Hrsg.] David Eisner. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. Juni 2011, Bd. 50, 6, S. 940- 950.
103. **Skrzypiec-Springa Monika, Grotthusa Bartosz, Szeląga Adam, Schulz Richard.** Isolated heart perfusion according to Langendorff- still viable in the new millenium. [Hrsg.] M.J. Curtis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. März- April 2007, Bd. 55, 2, S. 113- 126.
104. RIS, Bundeskanzleramt Rechtsinformationssystem. [Online] [Zitat vom: 16. Juni 2012.] http://www.ris.bka.gv.at/Dokumente/BgblPdf/1989_501_0/1989_501_0.pdf.
105. Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung. [Online] [Zitat vom: 6. März 2013.] http://www.bmwf.gv.at/fileadmin/user_upload/forschung/BGBLA_2012_I_114.pdf.
106. Schweizerische Eidgenossenschaft. [Online] [Zitat vom: 7. März 2013.] http://www.admin.ch/ch/d/sr/0_457/index.html#fn2.
107. EUR-LEX, Zugang zum EU-Recht. [Online] [Zitat vom: 7. März 2013.] <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31986L0609:De:HTML>.
108. FELASA. [Online] [Zitat vom: 7. März 2013.] <http://www.felasa.eu/content/about-us>.
109. **Guillen, Javier.** FELASA Guidelines and Recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*. Mai 2012, 51, S. 311–321.
110. GV-SOLAS Gesellschaft für Versuchstierkunde. [Online] [Zitat vom: 7. März 2013.] http://www.gv-solas.de/assets/files/PDFs/pdf_PUBLIKATION/aus-uebersetzung_a_c.pdf.
111. **Richmond, Jon.** The Three Rs. [Buchverf.] James Kirkwood Robert Hubrecht. *The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. 8. s.l.: Wiley-Blockwell, 2010.

112. *UFAW Universities Federation for Animal Welfare*. [Online] [Zitat vom: 17. Juni 2012.]
<http://www.ufaw.org.uk/history.php>, <http://www.ufaw.org.uk/about.php>,
<http://www.ufaw.org.uk/highlights.php>, <http://www.ufaw.org.uk/public-list.php>.
113. **Graz, Institut für Biomedizinische Forschung**. LABORORDNUNG TIERBIOLOGIE. erhalten von Frau Ing. Gabriela Horwarth am 13.02.2013.
114. **S.Q. Savergnini, A.M. Reis, R.A.S. Santos, P.E.B. Santos, A.J. Ferreira, A.P. Almeida**. Effects of short-term administration of estradiol on reperfusion arrhythmias in rats of different ages. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2012, 45 (12), S. 1248-1254.
115. **Gross, David R**. *Animal Models in Cardiovascular Research*. New York, USA : Springer, 2009. ISBN: 978-0-387-95961-0.
116. Gesundheit Österreich GmbH, Widerspruchformular. [Online] [Zitat vom: 15. Juli 2012.] http://www.goeg.at/cxdata/media/download/widerspruch_erwachsene_neu.pdf.
117. Organspende Info. [Online] [Zitat vom: 16. Jänner 2013.] <http://www.organspende-info.de/sites/all/files/files/Organspendeausweis%20ausfuellbar.pdf>.
118. *Nobelprize.org, The Official Site of the Nobel Prize*. [Online] [Zitat vom: 15. Juni 2012.] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1909/.
119. Watchtower, Offizielle Website der Jeugen Jehovas. [Online] [Zitat vom: 15. Juli 2012.] http://www.watchtower.org/x/hb/article_01.htm.
120. **Horn, Florian**. *Biochemie des Menschen*. 5. s.l. : Thieme, 2012. S. 178. ISBN: 978-3-13-1308856.
121. —. *Biochemie des Menschen*. 5. s.l. : Thieme, 2012. S. 184. ISBN: 978-3-13-1308856.
122. **Florian Horn, Isabelle Moc, Nadine Schneider, Christian Grillhöl, Silke Berghold, Gerd Lindenmeier**. *Biochemie des Menschen*. 3. s.l. : Thieme, 2005. S. 176. ISBN: 3-13-130883-4.
123. **Horn, Florian**. *Biochemie des Menschen*. 5. s.l. : Thieme, 2012. S. 205. ISBN: 978-3-13-1308856.
124. Universität Rostock. [Online] [Zitat vom: 15. Juni 2012.] <http://physiologie.med.uni-rostock.de/>.
125. Wikipedia, The Free Encyclopedia. [Online] [Zitat vom: 6. Dezember 2012.] http://en.wikipedia.org/wiki/File:Louis_Camille_Maillard.jpg.

126. *Wikipedia, die freie Enzyklopädie*. [Online] [Zitat vom: 5. Dezember 2012.]
<http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Hydroxymethylfurfural.png&filetimestamp=20081221011515>.
127. *David Moore's World of Fungi*. [Online] [Zitat vom: 16. Jänner 2013.]
http://www.davidmoore.org.uk/Sec04_01.htm.
128. *Research animal models*. [Online] [Zitat vom: 13. Februar 2013.]
www.criver.com/en-US/ProdServ/ByType/ResModOver/ResMod/Pages/SpragueDawleyRat.aspx.
129. HERMANN VON HELMHOLTZ-ZENTRUM FÜR KULTURTECHNIK, Katalog der wissenschaftlichen Sammlungen der Humboldt-Universität zu Berlin . [Online] [Zitat vom: 13. Februar 2013.] <http://www.sammlungen.hu-berlin.de/dokumente/10941/>.
130. Wikipedia. [Online] [Zitat vom: 15. Februar 2013.]
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nitric_oxide.svg.

Anhang:

A. Formblatt Labortierbestellung

	Formblatt Labortierbestellung B-BF	Dokument: FB602 Seite: 1 von 2				
<input checked="" type="checkbox"/> Himberg <input type="checkbox"/> Charles-River <input type="checkbox"/> Harlan <input type="checkbox"/> JAX <input type="checkbox"/> Sonstige: _____						
<p style="color: red; font-size: small;">!Gesundheitszeugnisse der Tiere mit diesem Formblatt übermitteln! !Bei SPF-Haltung sind die Health Reports nach FELASA der vergangenen 18 Monate vorzuweisen! (ohne diesen können keine Tiere aufgenommen werden).</p>						
Rechnungsadresse: Finanzabteilung der Medizinischen Universität Universitätsplatz 3, 8010 Gra z <small>Innenauftragsnummer:</small> <small>Arbeitsgruppenleiter(in) ev. Inst.-Bicropol:</small> <small>Verantwortliche/r Forscher(in):</small> DR. M. SCHWARZ	Lieferadressen: <input checked="" type="checkbox"/> Institut für Biomedizinische Forschung Roseggerweg 48, 8036 Gra z <input type="checkbox"/> ZMF Graz, Stiftingtalstraße 24, 8010 Gra z <input type="checkbox"/> Vorklinik-Tierhaltung UG Harrachgasse 21, 8010 Gra z <input type="checkbox"/> Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie, Universitätsplatz 4 <input type="checkbox"/> Institut für Pathologie, Auenbruggerplatz 25 <input type="checkbox"/> Sonstige:.....					
Spezies/ Stamm	Anzahl		Alter	Gewicht(g)	Verpackung	
Sonstiges	m w				Normal Filter	Übernahme/Mängel
SPRAGUE DAWLEY	10			200-300	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
					<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
					<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
					<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Sonstiges:						
Bereitstellungstermin: 1.03.2012			Versandart: <input checked="" type="checkbox"/> Abholung <input type="checkbox"/> Versand			
Verwendungszweck: <input type="checkbox"/> OE, <input type="checkbox"/> Zucht, <input checked="" type="checkbox"/> Tierversuch / Genehmigung: GZ: Organentnahme (Lagerdorf)						
Auftrag zur Bestellung:					Bestätigung B-BF:	
ASS. DR. M. SCHWARZ Datum: 23.02.2012 Unterschrift: 						
Übernahme bestätigen:						
<small>Name: _____ Datum: _____ Unterschrift: _____</small>						

Letzte Änderung 23.02.2012

B. Formular für Eintrag in das Widerspruchsregister

Widerspruch
gegenüber einer Organ- und Gewebeentnahme – Erwachsene
(im Sinne des Widerspruchsregisters gelten Personen ab 16 Jahren als Erwachsene)

An das
Widerspruchsregister
Gesundheit Österreich GmbH / Geschäftsbereich ÖBIG
Stubenring 6
1010 Wien

Ich,

<input style="width: 95%; height: 20px; border: none;" type="text"/> <small>Vorname/n u. akad. Grad/e in Blockschrift¹</small>	<input style="width: 95%; height: 20px; border: none;" type="text"/> <small>Nachname/n in Blockschrift¹</small>		
<input style="width: 95%; height: 20px; border: none;" type="text"/> <small>Sozialversicherungsnummer (unbedingt anführen)</small>	<input style="width: 95%; height: 20px; border: none;" type="text"/> <small>Geburtsdatum</small>	<input type="checkbox"/> Männlich	<input type="checkbox"/> Weiblich

Adresse

gebe hiermit meinen Widerspruch gegenüber einer allfälligen Organ- und Gewebeentnahme bekannt.²

Ich bin mit der EDV-mäßigen Erfassung und Verarbeitung meiner Daten sowie mit der Weitergabe meines Widerspruches bei Anfrage durch berechtigtes Krankenhauspersonal einverstanden. Ich bin weiters damit einverstanden, dass diese Daten in regelmäßigen Abständen durch Abgleich mit dem Datenbestand des Hauptverbandes der österreichischen Sozialversicherungsträger aktualisiert werden.

<input style="width: 95%; height: 20px; border: none;" type="text"/> <small>Ort, Datum</small>	<input style="width: 95%; height: 20px; border: none;" type="text"/> <small>Unterschrift</small>
---	---

Die Bestätigung erfolgt bei angegebener E-Mail-Adresse per E-Mail sonst per Post.

E-Mail-Adresse

1 Allfällige Namensänderungen bitte schriftlich bekanntgeben (mit Angabe des Geburtsdatums).
2 Nur komplett ausgefüllte Formulare können berücksichtigt werden.

Gesundheit Österreich
GmbH • • •

Vgl. (116)

C. Organspendeausweis in Deutschland

Organspendeausweis		
nach § 2 des Transplantationsgesetzes		
Organspende		
Name, Vorname		Geburtsdatum
Straße		PLZ, Wohnort
	Bundeszentrale für gesundheitliche Aufklärung	 Organspende schenkt Leben.
Antwort auf Ihre persönlichen Fragen erhalten Sie beim Infotelefon Organspende unter der gebührenfreien Rufnummer 0800 / 90 40 400 .		

Erklärung zur Organ- und Gewebespende	Für den Fall, dass nach meinem Tod eine Spende von Organen/Geweben zur Transplantation in Frage kommt, erkläre ich:		
	<input type="radio"/>	JA , ich gestatte, dass nach der ärztlichen Feststellung meines Todes meinem Körper Organe und Gewebe entnommen werden.	
	oder <input type="radio"/>	JA , ich gestatte dies, mit Ausnahme folgender Organe/Gewebe:	
	oder <input type="radio"/>	JA , ich gestatte dies, jedoch nur für folgende Organe/Gewebe:	
	oder <input type="radio"/>	NEIN , ich widerspreche einer Entnahme von Organen oder Geweben.	
	oder <input type="radio"/>	Über JA oder NEIN soll dann folgende Person entscheiden :	
		Name, Vorname	Telefon
		Straße	PLZ, Wohnort
		Platz für Anmerkungen/Besondere Hinweise	
		DATUM	UNTERSCHRIFT

Vgl. (117)