

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler am
Deutschen Herzzentrum München

Die Hämodynamik drei Wochen alter Lämmer
nach intrauteriner Anlage eines aortopulmonalen
Shunts und lebenslanger Gabe von L-Arginin

Simone Andrea Edenhofer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation:
1. Univ.-Prof. Dr. J. Hess, Ph.D.
2. Priv.-Doz. Dr. S.-M. Bleiziffer

Die Dissertation wurde am 12.12.2011 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2012
angenommen.

Simone Edenhofer

Die Hämodynamik drei Wochen alter Lämmer
nach intrauteriner Anlage eines aortopulmonalen
Shunts und lebenslanger Gabe von L-Arginin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
2. Fragestellung	18
2.1 Physiologischer Übergang von intra- zu extrauterinem Kreislauf	18
2.2 Regulation des Lungengefäßwiderstandes (PVR).....	19
2.3 Der L-Arginin – NO – Stoffwechselweg	20
2.4 Erhöhter pulmonaler Blutfluss (PBF) als Grundlage für die Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertonie.....	22
2.5 Ziel dieser Studie	23
3. Material und Methodik	25
3.1 Versuchstiere	25
3.2 Experimentelles Vorgehen	26
3.2.1 Anästhesie der Mutterschafe	26
3.2.2 Operationsvorbereitung	28
3.2.3 Chirurgisches Vorgehen zur intrauterinen Anlage eines aortopulmonalen Shunts.....	29
3.2.4 Postoperative Versorgung der Muttertiere.....	33
3.2.5 Postnatale Versorgung der Lämmer.....	34
3.2.6 Anästhesie der Lämmer	35
3.2.7 Vorbereitung der hämodynamischen Untersuchung der Lämmer.....	36
3.2.8 Hämodynamische Untersuchung der drei Wochen alten Lämmer.....	38
3.2.9 Euthanasie der Versuchstiere	39
3.3 Untersuchte Parameter	39
3.3.1 Lungengefäßwiderstand (pulmonary vascular resistance, PVR)	39
3.3.2 Mittlerer pulmonalarterieller Druck (mean pulmonary arterial pressure, mPAP)	40
3.3.3 Mittlerer linksatrialer Druck (mean left atrial pressure, mLAP)	40
3.3.4 Mittlerer systemarterieller Druck (mean systemic arterial pressure, mSAP)	40
3.3.5 Pulsamplitude (pulse pressure, PP)	40
3.3.6 Pulmonaler Druckgradient (transpulmonary gradient, TPG).....	41
3.3.7 Verhältnis von Lungenblutfluss zu systemischem Blutfluss (Qp/Qs)	41
3.3.8 Blutfluss durch die linke A. pulmonalis (Qlp, Qlp/kgKG)	42
3.3.9 Systemvaskulärer Widerstand (systemic vascular resistance, SVR).....	42
3.4 Statistische Verfahren	43
3.4.1 Berechnungen	43
3.4.2 Grafische Veranschaulichung.....	44

3.5 Ausschlusskriterien.....	45
4. Ergebnisse.....	47
4.1 Ergebnisse der täglichen körperlichen Untersuchungen	49
4.2 Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchungen nach drei Wochen ..	56
4.2.1 Lungengefäßwiderstand (PVR)	56
4.2.2 Mittlerer pulmonalerarterieller Druck (mPAP)	57
4.2.3 Mittlerer linksatrialer Druck (mLAP)	58
4.2.4 Mittlerer systemarterieller Druck (mSAP)	59
4.2.5 Pulsamplitude (PP)	60
4.2.6 Pulmonaler Druckgradient (TPG)	61
4.2.7 Verhältnis von Lungenblutfluss zu systemischem Blutfluss (Qp/Qs)	62
4.2.8 Blutfluss durch die linke A. pulmonalis (Qlp/kgKG)	63
4.2.9 Systemvaskulärer Widerstand (SVR)	64
5. Diskussion	65
6. Zusammenfassung	78
7. Literaturverzeichnis	81
8. Danksagung.....	91

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arterie
Aa.	Arterien
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AO	Aorta
ASD	Atriumseptumdefekt
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ASS	Argininosuccinat-Synthetase
BE	base excess; Basenabweichung
CVO	combined ventricular output; gesamtventrikuläre Auswurfleistung
DA	Ductus arteriosus; Ductus botalli
DHM	Deutsches Herzzentrum München
dSAP	diastolic systemic arterial pressure; diastolischer systemarterieller Druck
HF	Herzfrequenz
i.m.	intramuskulär
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
IQR	interquartile range; Interquartilsabstand
i.v.	intravenös
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
KI	Konfidenzintervall
LA	linkes Atrium
LAP	left atrial pressure; linksatrialer Druck
m	(in Abkürzungen); mean; Mittel-, mittlerer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PA	Pulmonalarterie
PAH	pulmonary arterial hypertension; pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonary arterial pressure; pulmonalarterieller Druck
PBF	pulmonary blood flow; pulmonaler Blutfluss
PCPC	partial cavo-pulmonary anastomosis; partielle cavopulmonale Anastomose
PCWP	pulmonary capillary wedge pressure; pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PDA	persistierender Ductus arteriosus

PDE	Phosphodiesterase
PEEP	positive endexpiratory pressure; positiver endexpiratorischer Druck
PFO	persistierendes Foramen ovale
PGI ₂	Prostazyklin
p.p.	post partum
PVR	pulmonary vascular resistance; Lungengefäßwiderstand
Q	Blutfluss
Q _{lp}	Blutfluss durch die linke Pulmonalarterie
Q _p	Lungenblutfluss
Q _s	Körperblutfluss
RA	rechtes Atrium
RAP	right atrial pressure; rechtsatrialer Druck
RV	rechter Ventrikel
SAP	systemic arterial pressure; systemarterieller Blutdruck
SD	standard deviation; Standardabweichung
sSAP	systolic systemic arterial pressure; systolischer systemarterieller Druck
TCPC	total cavo-pulmonary anastomosis; totale cavopulmonale Anastomose
TPG	transpulmonaler Gradient
TUM	Technische Universität München
VSD	Ventrikelseptumdefekt
Vv.	Venen

1. Einleitung

Angeborene Herzfehler betreffen im Durchschnitt acht von 1000 lebend geborenen Kindern [7] und stellen somit die größte Gruppe aller angeborenen Fehlbildungen dar.

Ein angeborener Herzfehler ist eine strukturelle Fehlbildung des Herzens oder der großen Gefäße. Es liegt dabei entweder eine den Blutfluss behindernde Stenose bzw. Obstruktion oder eine Verbindung zwischen Körper- und Lungenkreislauf vor, welche einen von der Physiologie abweichenden Blutstrom zulässt. Abhängig von den Druckverhältnissen in den beiden Teilkreisläufen kommt es bei Herzfehlern mit Kurzschlussverbindung zwischen sauerstoffreichem und -armem Blut zu einem sogenannten Links-Rechts- oder Rechts-Links-Shunt.

Von einem Links-Rechts-Shunt spricht man, wenn bereits oxygeniertes Blut aus dem Körperkreislauf wieder in den Lungenkreislauf übertritt. Bei normalen Druckverhältnissen, also höherem Blutdruck im Körper- als im Lungenkreislauf, tritt dies zum Beispiel bei septalen Defekten (z.B. bei Atriumseptumdefekt, ASD, Ventrikelseptumdefekt, VSD), persistierendem Ductus arteriosus, PDA oder persistierendem Foramen ovale, PFO, auf.

Besteht ein Links-Rechts-Shunt über einen längeren Zeitraum, kann es durch eine Umkehr der Druckverhältnisse auch zu einer Umkehr der Shuntrichtung und damit der Entstehung eines Rechts-Links-Shunts kommen. Dieser Vorgang wird als Eisenmenger-Reaktion bezeichnet. Da es nach der Shuntumkehr zu einem Übertritt von noch nicht oxygeniertem Blut in den Körperkreislauf kommt, sind Patienten nach stattgehabter Eisenmenger-Reaktion zyanotisch.

Am häufigsten treten Septumdefekte und vaskuläre Fehlbildungen mit Links-Rechts-Shunt auf, wohingegen Kurzschlussverbindungen mit Obstruktion und Rechts-Links-Shunt weniger häufig sind.

Die Spannbreite der klinischen Symptomatik ist groß und abhängig von der Art des Herzfehlers. Sie reicht von asymptomatischen Kindern bis hin zu Kindern, die unter einer Gedeihstörung, Schwitzen, Kurzatmigkeit, einer Zyanose und weiteren Symptomen leiden.

Durch weitreichende Fortschritte, die bislang in der Therapie von Patienten mit angeborenen Herzfehlern erzielt werden konnten, erreichen mittlerweile mehr als 85% der Betroffenen das Erwachsenenalter [7]. Diese Errungenschaft ist allerdings mit einer neuen Herausforderung verknüpft, nämlich der

Vorbeugung bzw. adäquaten Therapie von Rest- und Folgeerkrankungen kongenitaler Herzfehler.

Einen sehr großen Stellenwert nimmt hierbei die Bekämpfung der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) ein.

Sie ist eine bekannte Begleiterscheinung von angeborenen Herzfehlern mit Links-Rechts-Shunt und erhöhtem pulmonalen Blutfluss und -druck [54]. Durch reaktive Veränderungen in der Gefäßstrombahn der Lunge erhöht sich der pulmonale vaskuläre Widerstand (PVR). Als Ursache hierfür gilt eine Einschränkung der Endothel-abhängigen Vasodilatation durch vermehrte Scherkräfte [87], wie sie beispielsweise bei Frühgeborenen mit PDA festgestellt werden konnte [4]. Diese Funktionseinbuße könnte ein wichtiges Ereignis in der Entstehung der PAH darstellen [21]. Wird diesen Veränderungen nicht frühzeitig entgegengewirkt, manifestiert sich eine fixierte PAH mit einhergehendem erhöhtem Mortalitätsrisiko.

Die PAH als Folge angeborener Herzfehler ist keine seltene Erkrankung: Laut den Ergebnissen der Second Natural History Study of Congenital Heart Defects litten 15,4% der 570 Patienten mit verschiedensten Herzfehlentwicklungen an einer PAH [40].

Die PAH gehört zu einer Gruppe von Erkrankungen, die mit dem Überbegriff „Pulmonale Hypertonie“ (PH) zusammengefasst werden. Die Definition der PH basiert auf Messwerten, die im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung erhoben werden können. Eine PH kann demnach diagnostiziert werden, wenn der mittlere pulmonalarterielle Druck (mPAP) in Ruhe mehr als 25 mmHg bzw. mehr als 30 mmHg bei Belastung beträgt. Für die Diagnose einer PAH muss als zusätzliches Kriterium ein pulmonalkapillärer Verschlussdruck (PCWP) von weniger als 15 mmHg vorliegen [3].

Die PAH als Folge eines angeborenen Herzfehlers mit Links-Rechts-Shunt ist eine fortschreitende Erkrankung. Anhaltende Exposition der Lungengefäße gegenüber erhöhtem Blutdruck und -fluss kann zu einem so starken Anstieg des PVR führen, dass der Blutdruck im Lungenkreislauf den im systemischen Kreislauf übersteigt. Daraus resultierend kommt es, wie bereits erwähnt, zu einer Shuntumkehr und Übertritt von venösem Blut in den Körperkreislauf [98]. Die Trias aus systemisch-pulmonaler Verbindung, pulmonaler Gefäßerkrankung und zentraler Zyanose wird als Eisenmenger-Syndrom bezeichnet und repräsentiert die Maximalform der PAH. Der Ausdruck dafür

wurde von Paul Wood geprägt [100]. Die Auftretenswahrscheinlichkeit der PAH ist abhängig von der Art des Herzfehlers der Größe des bestehenden Shunts [27, 63].

Die Eisenmenger-Reaktion ist in Form eines Flussdiagramms in Abbildung 1.1 dargestellt [98].

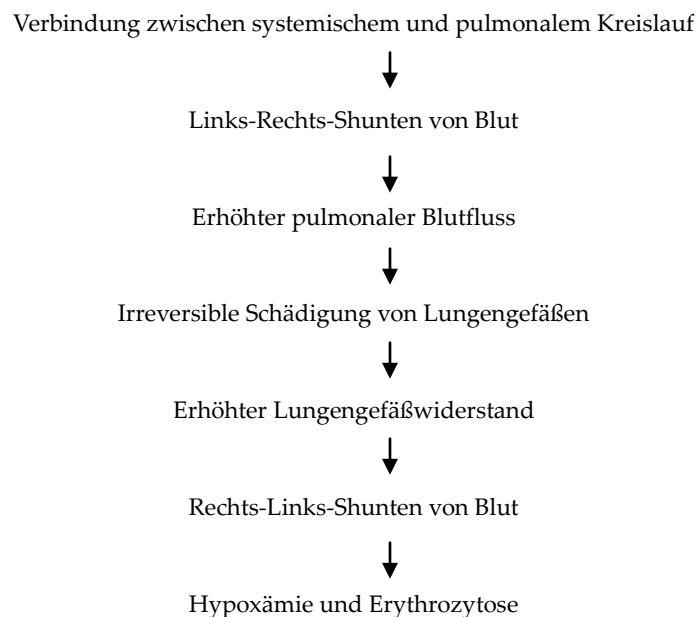


Abbildung 1.1 Darstellung der Eisenmenger-Reaktion modifiziert aus [98]

Am häufigsten von einer PAH betroffen ist die bereits beschriebene Patientengruppe mit Links-Rechts-Shunt und erhöhtem pulmonalem Blutfluss (PBF). Dabei differiert der Manifestationszeitpunkt unter den Betroffenen erheblich: Beispielsweise erkranken Kinder mit einem PDA, VSD, AV-Septumdefekt oder Truncus arteriosus im Gegensatz zu Kindern mit einem ASD deutlicher früher in ihrem Leben. Prinzipiell ist das Risiko einer pulmonalen Gefäßerkrankung umso mehr erhöht, je höher pulmonaler Blutdruck und -fluss sind.

Daneben findet sich eine kleinere, aber wachsende Patientengruppe aus Kindern mit einer Herzfehlentwicklung, die durch eine sogenannte „Single Ventricle-Physiologie“ charakterisiert ist und für deren Prognose die Erforschung der PAH-Entwicklung nicht minder wichtig ist. Das komplexe Hypoplastische Linksherz-Syndrom beispielsweise erfordert als palliative Therapie die chirurgische Anlage einer partiellen bzw. totalen cavopulmonalen

Anastomose (PCPC bzw. TCPC), da der funktionell einzige, rechte Ventrikel über die Aorta den Körperkreislauf versorgen muss. Aus chirurgisch-technischen Gründen ist die Verbindung der Hohlvenen mit der Pulmonalarterie sofort nach der Geburt nicht möglich und sinnvoll. Um die Zeit bis dahin überbrücken zu können, ist die Anlage eines systempulmonalen Shunts zur Gewährleistung der Lungendurchblutung unbedingt erforderlich [67, 83, 92]. In Anbetracht des raschen Wachstums der Kinder und der Unfähigkeit des Shunts sich proportional dazu zu vergrößern, muss dieser so groß gewählt werden, dass die Menge an oxygeniertem Blut ausreicht, bis das Kind für die weiteren chirurgischen Schritte zugelassen wird [92]. Daraus ergibt sich allerdings die Problematik eines vor allem zu Beginn massiv erhöhten PBF und damit verbunden einem Anstieg des PVR [68]. Dies ist insofern bedenklich, als ein normal niedriger PVR bei passivem pulmonalem Blutfluss (mangels pumpendem Ventrikel) entscheidend für das Langzeitüberleben nach TCPC ist [50]. In der Tat könnten bereits frühe, klinisch noch nicht sichtbare Veränderungen des pulmonalen Gefäßbetts das perioperative Risiko und die Langzeitprognose mitbestimmen [19, 21, 72]. Solche Veränderungen zeigten sich indirekt zum Beispiel auch in einem Review über Patienten mit Single Ventricle, die die PCPC überlebten: Ein höheres Alter zum Zeitpunkt der Operation ging mit einem erhöhten postoperativen transpulmonalen Gradienten einher [37].

Die Kenntnis der pathophysiologischen Mechanismen der PVR-Erhöhung nimmt besonders auch in diesem Zusammenhang eine bedeutende Position ein.

Die Ursachen für die pulmonalarterielle Hypertonie beschränken sich allerdings bei weitem nicht auf angeborene Herzfehler. So kann die PAH auch idiopathisch auftreten oder assoziiert sein mit Kollagenosen, portaler Hypertonie, HIV-Infektion, der Aufnahme von Medikamenten/Giften, usw. [57, 63].

Früher erfolgte die Einteilung der PH in eine idiopathische Form zum einen und zum anderen in sekundäre Formen. Nachdem sich aber die idiopathische PH (IPAH) und einige der anderen Formen mit bekannter Ursache sowohl in histopathologischer Sicht und in ihrem Verlauf als auch in Hinblick auf ihr Ansprechen auf die gleiche Therapie sehr ähnlich sind, war es nötig eine neue Einteilung vorzunehmen.

Während des *4th World Symposium on Pulmonary Hypertension* in Dana Point, Kalifornien 2008 wurde die aktuellste Klassifikation der PH verabschiedet,

welche in Abbildung 1.2 dargestellt ist [87]. Die Patienten werden danach, gemäß Ätiologie, in fünf Gruppen unterschieden, wobei die Patienten in Gruppe 1 unter einer PAH leiden.

1 Pulmonary arterial hypertension (PAH)

1.1 Idiopathic PAH

1.2 Heritable

1.2.1 BMPR2

1.2.2 ALK1, endoglin (with or without hereditary hemorrhagic telangiectasia)

1.2.3 Unknown

1.3 Drug- and toxin-induced

1.4 Associated with

1.4.1 Connective tissue diseases

1.4.2 HIV infection

1.4.3 Portal hypertension

1.4.4 Congenital heart diseases

1.4.5 Schistosomiasis

1.4.6 Chronic hemolytic anemia

1.5 Persistent pulmonary hypertension of the newborn

1' Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) and/or pulmonary capillary hemangiomatosis (PCH)

2 Pulmonary hypertension owing to left heart disease

2.1 Systolic dysfunction

2.2 Diastolic dysfunction

2.3 Valvular disease

3 Pulmonary hypertension owing to lung diseases and/or hypoxia

3.1 Chronic obstructive pulmonary disease

3.2 Interstitial lung disease

<p>3.3 Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern</p> <p>3.4 Sleep-disordered breathing</p> <p>3.5 Alveolar hypoventilation disorders</p> <p>3.6 Chronic exposure to high altitude</p> <p>3.7 Developmental abnormalities</p>
<p>4 Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH)</p>
<p>5 Pulmonary hypertension with unclear multifactorial mechanisms</p> <p>5.1 Hematologic disorders: myeloproliferative disorders, splenectomy</p> <p>5.2 Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary Langerhans cell histiocytosis: lymphangiomyomatosis, neurofibromatosis, vasculitis</p> <p>5.3 Metabolic disorders: glycogen storage disease, Gaucher disease, thyroid disorders</p> <p>5.4 Others: tumoral obstruction, fibrosing mediastinitis, chronic renal failure on dialysis</p>

ALK1 = activin receptor-like kinase type 1; BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor type 2; HIV = human immunodeficiency virus.

Abbildung 1.2 Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension (Dana Point, 2008); aus [87]; mit Genehmigung von Elsevier

Die idiopathische Form der PH wie auch die mit kongenitalen Herzfehlern assoziierte PH werden der PAH-Gruppe zugeordnet. Beide Unterformen der PAH ähneln sich sehr in ihrem histopathologischen Bild, welches gekennzeichnet ist durch Mediahypertrophie und Intimaproliferation und -fibrose der pulmonalen Arterien und Arteriolen. In schweren Fällen können plexiforme Läsionen sowie eine nekrotisierende Arteriitis hinzukommen [60].

Die Abbildungen 1.3 und 1.4 entstammen ebenfalls dem Konsensus der internationalen Expertengruppe für PH, die in Dana Point die folgenden Einteilungen bezüglich kongenitaler Herzfehlern mit Links-Rechts-Shunt getroffen haben [87].

1 Type

1.1 Simple pre-tricuspid shunts

1.1.1 Atrial septal defect (ASD)

1.1.1.1 Ostium secundum

1.1.1.2 Sinus venosus

1.1.1.3 Ostium primum

1.1.2 Total or partial unobstructed anomalous pulmonary venous return

1.2 Simple post-tricuspid shunts

1.2.1 Ventricular septal defect (VSD)

1.2.2 Patent ductus arteriosus

1.3 Combined shunts (describe combination and define predominant defect)

1.4 Complex congenital heart disease

1.4.1 Complete atrioventricular septal defect

1.4.2 Truncus arteriosus

1.4.3 Single ventricle physiology with unobstructed pulmonary blood flow

1.4.4 Transposition of the great arteries with VSD (without pulmonary stenosis) and/or patent ductus arteriosus

1.4.5 Other

2 Dimension (specify for each defect if >1 congenital heart defect)

2.1 Hemodynamic (specify Qp/Qs)*

2.1.1 Restrictive (pressure gradient across the defect)

2.1.2 Nonrestrictive

2.2 Anatomic

2.2.1 Small to moderate (ASD \leq 2.0 cm and VSD \leq 1.0 cm)

2.2.2 Large (ASD >2.0 cm and VSD >1.0 cm)

3 Direction of shunt

3.1 Predominantly systemic-to-pulmonary

3.2 Predominantly pulmonary-to-systemic
3.3 Bidirectional
4 Associated cardiac and extracardiac abnormalities
5 Repair status
5.1 Unoperated
5.2 Palliated (specify type of operation[s], age at surgery)
5.3 Repaired (specify type of operation[s], age at surgery)

Abbildung 1.3 *Anatomic-Pathophysiologic Classification of Congenital Systemic-to-Pulmonary Shunts Associated With Pulmonary Arterial Hypertension (Modified From Venice 2003); aus [87]; mit Genehmigung von Elsevier*

A. Eisenmenger syndrome	Includes all systemic-to-pulmonary shunts resulting from large defects and leading to a severe increase in PVR and a reversed (pulmonary-to-systemic) or bidirectional shunt; cyanosis, erythrocytosis, and multiple organ involvement are present
B. PAH associated with systemic-to-pulmonary shunts	Includes moderate to large defects; PVR is mildly to moderately increased, systemic-to-pulmonary shunt is still prevalent, and no cyanosis is present at rest
C. PAH with small defects	Small defects (usually ventricular septal defects <1 cm and atrial septal defects <2 cm of effective diameter assessed by echocardiography); clinical picture is very similar to idiopathic PAH
D. PAH after corrective cardiac surgery	Congenital heart disease has been corrected, but PAH is still present immediately after surgery or recurs several months or years after surgery in the absence of significant postoperative residual lesions

Abbildung 1.4 *Clinical Classification of Congenital Systemic-to-Pulmonary Shunts Associated to PAH; aus [87]; mit Genehmigung von Elsevier*

Die Therapie der PAH richtet sich primär nach der ihr zugrunde liegenden Ursache. Dieses Prinzip nimmt ganz besonders im Bereich der angeborenen Herzfehler einen hohen Stellenwert ein, wenn man bedenkt, dass die chirurgische Korrektur von Herzfehlern mit Links-Rechts-Shunt noch vor Manifestation irreversibler Gefäßläsionen die meisten Patienten heilen kann.

In Ländern mit moderner Diagnostik und Chirurgie ist daher ein Rückgang der Inzidenz von Patienten mit Eisenmenger-Syndrom zu erwarten.

Ein hohes Risiko für die Entwicklung einer PAH tragen aber immer noch die Kinder, deren Herzerkrankung nicht pränatal oder unmittelbar postnatal erkannt wird und diejenigen mit komplexen anatomischen Anomalien (z.B. Single Ventricle-Anatomie).

Ist eine primäre Prävention bereits nicht mehr möglich, bestehen zudem mehrere pharmakologische Möglichkeiten, die das Leben der Patienten verlängern und angenehmer machen können. Alle eingesetzten Agenzien, Kalziumkanalblocker, Prostanoiden, Endothelinantagonisten, Phosphodiesterase-5-Hemmer (PDE-5-Hemmer) und inhaliertes NO (perioperativ eingesetzt), haben Lungengefäß-erweiternde Effekte. Abgesehen von den Kalziumkanalblockern weisen alle aufgezählten Medikamente zudem antiproliferative Eigenschaften auf [6, 24, 99].

Trotz vielfältiger pharmakologischer Möglichkeiten des Eingreifens in den Krankheitsverlauf, spricht jedoch nicht jeder Patient auf die Therapie an und ist die Heilung einer fixierten PH noch nicht möglich. Als letzter Ausweg bleibt in manchen Fällen dann nur noch die Durchführung einer Atrioseptostomie oder einer Lungentransplantation [6].

Dank der zunehmenden Beforschung der Pathogenese der PAH durch frühe krankheitsbestimmende Faktoren, besteht die Aussicht auf neue Behandlungsstrategien, die es in nächster Zukunft zu evaluieren gilt [37].

Die Prognose der pulmonalerteriellen Hypertonie ist bisher trotz aller Anstrengungen unbefriedigend. Nach Diagnosestellung überleben beispielsweise im Durchschnitt 68% der Patienten mit IPAH ein Jahr und nur 34% der Patienten fünf Jahre [77]. Aus der retrospektiven Analyse publizierter Daten geht allerdings hervor, dass Rechtsherzversagen bei Patienten mit kongenitalem Herzfehler erst deutlich später im Krankheitsverlauf auftritt und diese Gruppe im Gegensatz zu anderen dadurch einen Überlebensvorteil aufweist [17, 18, 88].

Zur weiteren Verbesserung der Lebensaussichten von PAH-Patienten hat die exakte Aufklärung der Pathomechanismen dieser Erkrankung höchste Priorität. Um dies gewährleisten zu können, werden insbesondere Tiermodelle benötigt, anhand derer die Situation in vivo möglichst realitätsnah nachgestellt werden kann. Zur künstlichen Schaffung eines Krankheitszustandes mit PH dienen

verschiedene Modelle, die in Abbildung 1.5 aufgelistet sind [49]. Zur Entstehung einer PAH dienen die fett gedruckten Modelle.

1. **Hyperkinetisches Modell (z.B.: Anastomosierung von Lungengefäßen und Aorta bzw. großen Arterien)**
2. **Restriktion oder Obstruktion des Lungengefäßbettes (z.B.: Pneumektomie, Lobektomie oder Embolisation von Lungengefäßen (z.B. mit Fibrin))**
3. Venöse PHN (z.B.: Ligation der Pulmonalvenen [76])
4. Medikamentös induzierte PHN: (z.B.: Monocrotalininjection [23])
5. Chronische Hypoxie (z.B.: Isobare oder Hypobare Beatmung)
6. Chronische Hyperkapnie
7. Kombinationen (z.B. **Pulmonalarterienligation und Shunt [43]**)

Abbildung 1.5 Modelle zur künstlichen Schaffung einer PH; Fett gedruckt sind die Modelle, die eine PAH erzeugen; Modifiziert nach [49]

Um die hämodynamische Situation bei einem Kind mit angeborenem Herzfehler mit Links-Rechts-Shunt nachzuahmen, eignet sich am besten ein Schafmodell, das bereits 1994 von REDDY et al. etabliert wurde [73]. In diesem hyperkinetischen Modell (Punkt 1 in Abbildung 1.5) wird bei einem Schaffetus intrauterin ein aortopulmonaler Shunt angelegt, was ab dem Zeitpunkt der Geburt zu einem erhöhten Lungenblutdruck und -fluss und damit zur Entwicklung einer pulmonalen Gefäßerkrankung führt. Auf diesem Weg besteht die Möglichkeit bereits die frühen pathophysiologischen Determinanten der PAH, welche eine veränderte Gefäßreaktivität und -struktur bedingen, genauer zu erforschen. Damit weist dieses Tiermodell entscheidende Vorteile gegenüber jenen auf, die entweder bereits intrauterin zur Beeinflussung der Kreislaufsituation führen oder die eine Erhöhung von pulmonalem Blutdruck/-fluss erst nach Abschluss der postnatalen Anpassungsvorgänge provozieren.

Weitere Gründe, die den Einsatz eben dieses Modells favorisieren, sind ein ähnliches Geburtsgewicht und Gesamtauswurfvolumen des Herzens (CVO, combined ventricular output) [28] im Vergleich von Mensch und Schaf. Viele grundlegende Erkenntnisse über die fetale Zirkulation und deren Umstellung zum Zeitpunkt der Geburt wurden am Schaf gewonnen [34, 36]. Die Kreislaufverhältnisse im menschlichen Fetus und im Schaffetus sind im Wesentlichen die gleichen [32, 51]. Einen Unterschied gibt es bei der Dauer der Schwangerschaft: Während Schafe nur ca. 150 Tage trächtig sind, dauert eine

Schwangerschaft beim Menschen ca. 280 Tage. Neugeborene Lämmer sind zudem zum Zeitpunkt der Geburt trotz kürzerer Tragzeit reifer als menschliche Neugeborene. Des Weiteren differiert zwischen den beiden Spezies das Verhältnis von rechts- zu linksventrikulärer Auswurfleistung. Während beim Schaffetus das Verhältnis 2:1 ist, beträgt es beim menschlichen Fetus 1,2-1,3:1 [78, 81].

Eine direkte Übertragung der am Schaf gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen ist selbstverständlich nicht möglich. Um Studienergebnisse sinnvoll anwenden zu können, müssen Parallelen und Unterschiede zwischen Modell und Wirklichkeit bewusst sein.

Seit 2004 wird auch am Deutschen Herzzentrum München (DHM) der Technischen Universität München (TUM) dieses Schafmodell zur Erforschung der PAH eingesetzt.

Ziel dieser Studie ist die Untersuchung der Veränderung ausgewählter hämodynamischer Parameter nach lebenslanger Gabe der Aminosäure L-Arginin bei drei Wochen alten Shuntlammern anhand des vorgestellten Modells.

2. Fragestellung

2.1 *Physiologischer Übergang von intra- zu extrauterinem Kreislauf*

Der Übergang von einem intrauterinen Leben, abhängig von der Versorgung durch die Plazenta, auf das selbständige Leben extrauterin, bedarf einer Reihe physiologischer Umstellungsvorgänge. Im Folgenden wird insbesondere auf die perinatalen Veränderungen des Blutkreislaufs eingegangen.

Kennzeichnend für den fetalen Blutkreislauf sind ein niedriger Widerstand der plazentaren Gefäße einerseits und ein hoher pulmonalvaskulärer Widerstand andererseits. Letzterer resultiert aus der Füllung der Lungen mit Fruchtwasser, einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck im fetalen Blut und der Wirkung zahlreicher Mediatoren auf den Gefäßtonus, auf die in Kapitel 2.2 näher eingegangen wird.

Die Konstellation aus einem niedrigen systemischen Blutdruck und einem niedrigen pulmonalen Blutfluss kann nur in Verbindung mit Recht-Links-Shunts auftreten, welche den intrauterinen Blutkreislauf charakterisieren. Das Foramen ovale ermöglicht einen Blutfluss vom rechten ins linke Atrium, der Ductus arteriosus verbindet Pulmonalarterie und Aorta descendens miteinander.

Das mit Sauerstoff angereicherte Blut aus der Plazenta gelangt über die Umbilikalvene in den Fetus. Der größere Anteil des Blutes erreicht unter Umgehung der Leber über den Ductus venosus die untere Hohlvene, während der kleinere Teil der Durchblutung der Leber dient. Das Blut aus der unteren Hohlvene, welches dem Ductus venosus entstammt, shunted aufgrund der Strömung größtenteils über das Foramen ovale vom rechten in den linken Vorhof. Das weniger oxygenierte Blut aus der Leber bzw. unteren Hohlvene und der oberen Hohlvene fließt vom rechten Vorhof in den rechten Ventrikel, ohne sich dabei stark mit dem besser oxygenierten Blut zu vermischen, und von dort aus über die Pulmonalarterie und den Ductus arteriosus in die absteigende Aorta. Nur ca. 10% des rechtsventrikulär ausgeworfenen Blutes durchströmen die Lunge.

Der relativ zu extrauterinen Verhältnissen niedrige Sauerstoffpartialdruck des Blutes trägt zur Aufrechterhaltung des hohen pulmonalvaskulären Widerstands bei.

Das Blut aus der Aorta versorgt die restlichen Organe des Ungeborenen mit Sauerstoff und erreicht darauffolgend über die Umbilikalarterien wieder die Plazenta.

Beim Abklemmen der Nabelschnur nach der Geburt kommt es zu einem Anstieg des systemischen Blutdrucks. Gleichzeitig sinkt mit dem Einsetzen der Atmung der pulmonalvaskuläre Widerstand. Diese Veränderungen bedingen eine Zunahme des Lungenblutflusses und eine Abnahme des Blutflusses durch Foramen ovale und Ductus arteriosus. Die bessere Sauerstoffversorgung des Neugeborenen leitet den Verschluss des Ductus arteriosus ein, während das Foramen ovale sich verschließt, sobald der Druck im linken Atrium den des rechten Atriums übersteigt.

2.2 Regulation des Lungengefäßwiderstandes (PVR)

Bei der Regulation des fetalen pulmonalvaskulären Widerstands wirken mehrere Effekte mit. Eine Komponente, die während dieser Periode zu einem hohen PVR beiträgt, ist die mechanische Kompression der kleinen Lungenarterien durch die Füllung des Alveolarraums mit Fruchtwasser. Desweiteren ist der intrauterin hohe PVR verbunden mit dem physiologisch niedrigen Sauerstoffpartialdruck im systemischen wie pulmonalen fetalen Blut. Die pulmonale Vasokonstriktion vor der Geburt wird zudem durch Azidämie [82] und die Wirkung von endothelialen endo- und parakrinen Botenstoffen wie Leukotrienen (C₄ und D₄) [32] und Endothelin-1 [47] vermittelt.

Das im Gegensatz zum mütterlichen Organismus relativ hypoxische Milieu bedingt auch die Bildung vasoaktiver Substanzen wie Prostazyklin (PGI₂) und Stickstoffmonoxid (NO) im Gefäßendothel der Lunge [85, 86]. Sowohl PGI₂ als auch NO besitzen vasodilatatorische Wirkung, die unter normalen Bedingungen den Grad der pulmonalen Vasokonstriktion zu beeinflussen vermag, jedoch erst im Zustand von fetalem Stress eine bedeutendere Rolle spielt.

Der Abfall des PVR bei der Geburt wird initiiert durch die Entfaltung der Lunge und das Einsetzen der Atmung. Der begrenzte Effekt durch die

Entfaltung der Lunge ist auf die Elimination der Flüssigkeit aus der Lunge und die Freisetzung von vasoaktiven Substanzen wie PGI₂ zurückzuführen und unabhängig vom Blutgasgehalt. Für die stufenweise weitere Erniedrigung des PVR ist die Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks durch Einsetzen der Atmung verantwortlich. Sie ist bedingt durch die direkte Vasodilatation kleiner Lungenarterien und indirekt durch die Freisetzung einer Reihe von vasoaktiven Substanzen. Dabei spielen wiederum PGI₂, Bradykinin und vor allem NO eine entscheidende Rolle [12, 26, 32, 51]. Diese Mechanismen führen zu einer Erhöhung des pulmonalen Blutfluss (PBF) um das Acht- bis Zehnfache [53]. Neben der verbesserten Oxygenierung und NO-Freisetzung führt auch die initiale Erhöhung des PBF durch die damit verbunden Scherkräfte zu einer weiteren Vasodilatation.

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Geburt sinkt der mittlere pulmonalarterielle Druck (mPAP) auf circa 50 Prozent des mittleren systemarteriellen Drucks (mSAP). Nach zwei bis sechs Wochen erreicht er Werte wie sie auch beim Erwachsenen zu finden sind [59, 80].

Während im Fetus ein Zustand aktiver pulmonaler Vasokonstriktion vorliegt, ist postnatal eine aktive pulmonale Vasodilatation erforderlich, um einen normal niedrigen PVR aufrechterhalten zu können. Hierbei scheint NO ebenfalls eine zentrale Rolle zu spielen. Im Tiermodell konnte die Funktion von endogenem NO als Regulator des PVR bei Neugeborenen bei Normoxie wie auch bei Hypoxie herausgestellt werden [62]. Eine Studie an gesunden Kindern konnte gleichermaßen den Beitrag von endothelial produziertem NO zur Bewahrung eines niedrigen pulmonalen Gefäßtonus nachweisen [22]. Die Rolle weiterer vasoaktiver Substanzen wie zum Beispiel Histamin und Serotonin bleibt noch genauer abzuklären.

Neben diesen Vorgängen auf endothelialer Ebene bringt auch die Abnahme der Dicke der glatten Muskelschicht der Lungengefäße einen Abfall der PVR mit sich.

2.3 Der L-Arginin – NO – Stoffwechselweg

NO beeinflusst in entscheidendem Maß sowohl den basalen [89] wie auch den gesteigerten Blutfluss auf regionaler Ebene [25, 97]. Eine Beeinträchtigung der endogenen Bildung von NO könnte wesentlich zur Entstehung von

Erkrankungen beitragen, die durch eine abnormale Gefäßreaktivität gekennzeichnet sind [97]. Die genaue Kenntnis der biochemischen Stoffwechselfvorgänge ist essentiell zur weiteren Aufklärung der Pathophysiologie solcher Krankheiten und Entwicklung neuer Therapieansätze. Es liegen bereits zahlreiche Studien vor, die die Entstehung und den Wirkmechanismus von NO beleuchten: NO wurde früher infolge seiner Herkunft und Funktion EDRF (Endothelium-derived relaxing Factor; Endothel-abhängiger Gefäßmuskel-erschaffender Faktor) genannt [39, 58] und entsteht in vaskulären Endothelzellen aus der Aminosäure L-Arginin [31, 33, 39, 66, 71, 96].

Für die Umsetzung des Substrats in L-Citrullin und NO ist eine Familie von Isoenzymen verantwortlich, die NO-Synthasen (NOS) [35, 66]. Die Isoform III des Enzyms (auch eNOS genannt) wird konstitutiv und vorwiegend in Endothelzellen exprimiert, seine Expression kann durch verstärkte Einwirkung von Scherkräften auf die Gefäßwand noch gesteigert werden. Für die Reaktion benötigte Kofaktoren sind Tetrahydrobiopterin (BH₄), Calmodulin (CaM), NADPH, FAD, FMN und Sauerstoff (O₂) [35].

Scherkräfte und Bindung von Bradykinin, Acetylcholin und anderen an spezifische Rezeptoren der Endothelzellen [1, 25, 33, 96] führen zum Kalziuminflux. Der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration resultiert in einer Aktivitätssteigerung der konstitutiven NOS. Das entstehende NO diffundiert in eine nahegelegene glatte Gefäßmuskelzelle, aktiviert dort eine lösliche Guanylatcyclase (sGC) und bewirkt somit eine Erhöhung der cGMP-Konzentration in der Zielzelle [39, 66]. Die auf diesem Weg bewirkte Endothel-abhängige Vasodilatation findet sich sowohl in Widerstandsgefäßen als auch in größeren Arterien und geringer ausgeprägt auch in Venen [39]. NO beugt außerdem der Thrombozytenaggregation und -adhäsion vor [39] und hemmt vermutlich die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen [35].

NO wird durch Hämoglobin oder Hyperoxide sofort inaktiviert [39].

Abbildung 2.1 gibt schematisch die eNOS mit ihrem Substrat L-Arginin, den Produkten NO, L-Citrullin und Wasser und ihren Kofaktoren wider.

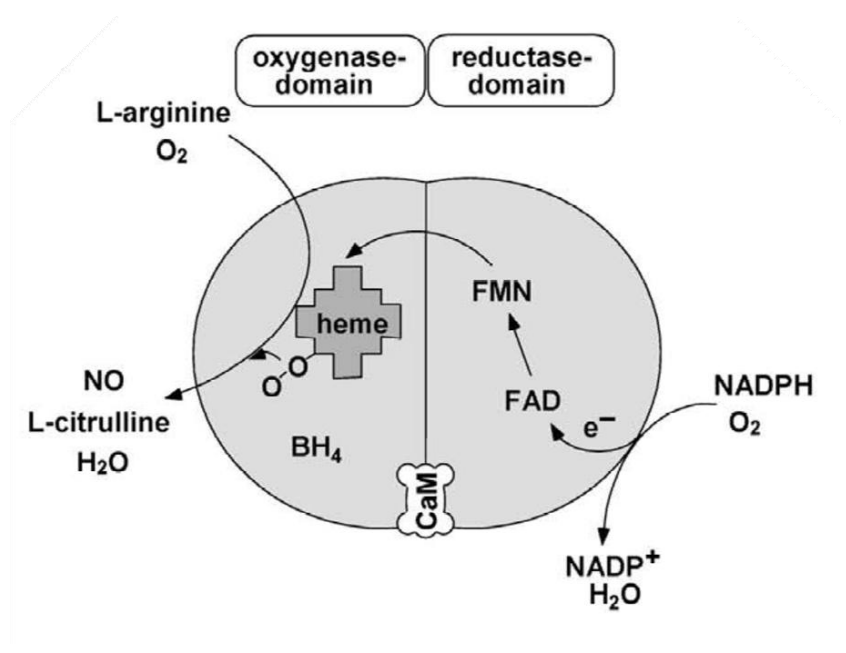


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der eNOS mit ihrem Substrat L-Arginin, ihren Produkten und Kofaktoren; Grafik aus [14]; mit Genehmigung der Oxford University Press

2.4 Erhöhter pulmonaler Blutfluss (PBF) als Grundlage für die Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertonie

Herzfehler, die ein Shunt des Blutes vom systemischen in den pulmonalen Blutkreislauf erlauben, gehen einher mit einem erhöhten pulmonalen Blutfluss (PBF). Dabei rezirkuliert bereits oxygeniertes pulmonalvenöses Blut durch die Lungengefäße. Dieser Umstand zieht, abhängig von der Größe des Shunts und der Höhe des PBF, pathophysiologische Veränderungen des pulmonalen Gefäßbetts nach sich, die bei Persistenz des Defekts zur Entwicklung eines Lungenhochdrucks führen können.

Zum einen bleibt bei den Betroffenen in den ersten Wochen nach der Geburt das physiologische Dünnerwerden der glatten Gefäßmuskulatur aus, das bei gesunden Kindern eine progressive Erniedrigung des PVR zur Folge hat [46]. Hinzu kommen sogar die übermäßige Proliferation von Gefäßmuskulatur und Intima, die in einer Einengung der Gefäßlumina und einer verminderten Reagibilität münden. Mitschuld an diesem irreversiblen Gefäßumbau, im Englischen *vascular remodeling* genannt, könnte eine endotheliale Dysfunktion haben [47].

Um akut das Zuviel an PBF zu limitieren, liegt bei Kindern mit Links-Rechts-Shunt zu Beginn zusätzlich ein Zustand der relativen Vasokonstriktion vor, mit dem das zum Teil symptomarme klinische Erscheinungsbild bei großem Herzdefekt erklärt werden kann.

Für die Einschränkung der Endothelfunktion bei hohem PBF als Ursache für eine pulmonale Hypertonie konnten zahlreiche Studien Hinweise erbringen. So wiesen zum Beispiel Reddy et al. [74] und Steinhorn et al. [91] bei Lämmern mit angeborenem aortopulmonalem Shunt eine selektive Einschränkung der Endothel-abhängigen pulmonalen Vasodilatation sowie eine vermehrte Vasokonstriktion als Antwort auf NOS-Inhibitoren nach [75]. Sharma et al. [84] konnten das in vorherigen Studien gezeigte Defizit in der NO-Signalübertragung bei Shuntlämmern auf Veränderungen im Arginin-metabolismus zurückführen. Ebenfalls im Schafmodell zeigten Oishi et al. eine progressive Dysfunktion der NOS auf [69]. Eine Beeinträchtigung der NOS-Aktivität durch Endothelin-1 (ET-1), das bei erhöhtem PBF dessen Limitierung dient, leistet ihren Beitrag dazu [68]. Im Bereich der klinischen Forschung konnte desgleichen die entscheidende Rolle des Endothels bei der Entwicklung eines Lungenhochdrucks durch erhöhten PBF herausgestellt werden. Sowohl bei Kindern mit erhöhtem Lungenblutfluss aufgrund eines angeborenen Herzfehlers [21] als auch nach Anlage eines kardiopulmonalen Bypass (CPB) [61, 99] wurde eine verminderte Rezeptor- und damit Endothel-abhängige Vasodilatation nachgewiesen. Gorenflo et al. [44] maßen erhöhte Spiegel des NOS-Inhibitors ADMA (asymmetrisches Dymethylarginin) im Plasma von Patienten mit angeborenen Herzfehlern und pulmonaler Hypertension.

2.5 Ziel dieser Studie

Da bei der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie bei erhöhtem pulmonalem Blutfluss das Endothel der Lungengefäße eine entscheidende Rolle zu spielen scheint (siehe Kapitel 2.4), die exakten Pathomechanismen aber noch nicht aufgeklärt sind, gilt es den Fokus der Forschung weiterhin auf diesen Bereich zu richten. Insbesondere bedarf es der genaueren Beleuchtung des Stellenwerts der Aminosäure L-Arginin in der Krankheitsentstehung, nachdem bereits zahlreiche Evidenzen für einen gestörten

Argininmetabolismus bzw. den Nutzen einer Supplementation sprechen [2, 13-15, 20, 29-31, 42, 44, 45, 55, 74, 84, 93, 94, 101].

In einigen Studien konnte beispielsweise eine verminderte L-Argininkonzentration im Plasma [74] bzw. im Lungengewebe [84] nachgewiesen werden. Die Folge sei, laut Sharma et al. [84], eine Entkopplung der NOS mit vermehrter Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Die erniedrigte Konzentration könnte bei erhöhtem PBF einerseits zurückzuführen sein auf eine erhöhte Arginase II-Aktivität (L-Arginin abbauendes Enzym) [29, 101] und eine verminderte Aktivität der Argininosuccinat-Synthetase (ASS) und der Argininosuccinat-Lyase (ASL) (L-Arginin recycelnde Enzyme) [84] andererseits. Des Weiteren liegt bei erhöhtem PBF eine erhöhte Konzentration von asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), einem NOS-Inhibitor, vor [14, 15, 44, 45]. ADMA konkurriert mit L-Arginin um die NOS-Bindestelle und vermindert damit die NO-Bildung.

Zusätzlich gibt es noch eine Reihe weiterer Ansätze für die Erklärung der positiven Wirkung von L-Arginin bei erhöhtem PVR: L-Arginin besitzt eine direkte vasodilatatorische Kapazität [95]; L-Arginin führt durch Insulin-Freisetzung [48] zu Vasodilatation [5]; L-Arginin schwächt die vasokonstriktorische Antwort auf ET-1 ab [30]; L-Arginin verhindert die verminderte NOS-Expression (in Hühnern) [94]; L-Arginin könnte die NO-Freisetzung durch Aufhebung des Effekts von L-Glutamin steigern [2, 42]; L-Arginin führt im chronisch hypoxischen Lungengewebe zu verstärkter Angiogenese und senkt somit den PVR [55].

Alle genannten Studien deuten auf einen potentiellen Nutzen der Supplementation von L-Arginin bei Erkrankungen der Lungengefäße mit erhöhtem PVR hin. Ziel dieser Studie ist es den Effekt einer dreiwöchigen intravenösen Gabe von L-Arginin auf die Hämodynamik bei angeborenen Herzfehlern mit erhöhtem PBF zu untersuchen. Es soll verifiziert werden, ob L-Arginin in dieser frühen Phase der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie bereits Einfluss auf die pulmonale Hämodynamik ausübt und damit zu diesem Zeitpunkt als bestimmender pathophysiologischer Faktor in Frage kommt.

Geprüft werden soll diese Fragestellung am Schafmodell nach intrauteriner Anlage eines aortopulmonalen Shunts nach der von Reddy et al. etablierten Methode [73]. Dieses Tiermodell diene bereits schon des Öfteren der Erforschung des Themenkomplexes der PH [9, 10, 38, 65, 70, 73, 74].

3. Material und Methodik

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienen reinrassige bayerische Bergschafe aus einem privaten Zuchtbetrieb. Diese zeichnen sich durch einen ausgeprägt asaisonalen Paarungsrhythmus aus, der eine Versuchsdurchführung weitgehend unabhängig von der Jahreszeit erlaubt.

Weiterhin eignet sich diese Rasse auch wegen ihrer hohen Fruchtbarkeit mit zweimaliger Lammung im Jahr und häufigen Zwillingen besonders gut für den Versuch. Der jeweils nicht operierte Zwilling kann als Kontrolltier verwendet werden. Handelt es sich beim operierten Lamm um einen Einling, wird möglichst der Zwilling eines verstorbenen operierten Tieres oder aber ein spontan geborenes gesundes Lamm als Kontrolltier verwendet.

Der intrauterine Eingriff führt bei Schafen in der Regel weder zu einer erhöhten Spontanabortrate [52], noch treten, im Gegensatz zur Situation bei Schweinen, Spontangeburt als unmittelbare Folge der Operation gehäuft auf.

Die Größe des fetalen Lamms in der Nähe des Geburtstermins, die vergleichbar ist mit der eines neugeborenen Kindes, erlaubt die in Kapitel 3.2.3 beschriebene chirurgische Manipulation am fetalen Herz.

In seinen Eigenschaften ähnelt das bayerische Bergschaf der in den USA vorwiegend verwendeten Rasse „Mixed Breed Western“, an der das Experiment etabliert wurde [73].

Die zwei bis drei Jahre alten Muttertiere haben ein Lebendgewicht von ca. 60-80 kg. Im Zuchtbetrieb werden sie im Sommer auf Weiden und im Winter in einem Tiefstreustall in Gruppen vom 30 bis 40 Tieren gehalten. Im Stall herrschen Temperaturen von 10°C bis 20°C bei Unterdruckbelüftung. Die relative Luftfeuchtigkeit beträgt 60% bis 80%. Die Tiere werden mit Heu, Grassilage und Zuckerrübenschnitzel gefüttert. Wasser steht zur freien Verfügung. Mineralfutter wird zugefüttert.

Zwei bis drei Tage vor dem chirurgischen Eingriff werden die hochträchtigen Muttertiere in die Tierställe des Zentrums für präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München verbracht.

Die Tiere werden in Boxen von 3 m² gehalten. Die Stalltemperatur beträgt 20°C bis 23°C, die relative Luftfeuchte 60% bis 70%. Die Beleuchtung simuliert einen zwölf Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und ist damit den Ruhezeiten der Tiere angepasst. Dabei herrscht Dunkelphase von 18.00 Uhr bis 6.00 Uhr. Zwischen 6.00 Uhr und 7.00 Uhr wird das Licht langsam bis auf 500 Lux hochgedimmt, zwischen 17.00 Uhr und 18.00 Uhr wieder langsam herunter gedimmt.

Die Schafe werden zweimal täglich mit einer Mischung aus Heupellets und Getreide gefüttert. Heu und Wasser stehen zur freien Verfügung.

Zwölf Stunden vor der Operation wird den Schafen das Futter entzogen. Wasser bleibt weiter frei zugänglich. Ziel ist es Nüchternheit zu gewährleisten und das Risiko einer Aspiration von Speiseresten bzw. Pansensaft zu minimieren. Nüchterne Tiere lassen sich präoperativ leichter auf den Fortschritt der Schwangerschaft untersuchen. Der Uterus ist bei Nüchternheit für chirurgische Manipulationen leichter zugänglich.

Nach der Operation erfolgt die Fütterung wieder wie oben beschrieben.

Nach Geburt der Lämmer werden diese mit ihren Müttern zum Schutz der Neugeborenen von den noch trächtigen Schafen getrennt. Die Lämmer werden bis zur hämodynamischen Untersuchung von der Mutter gesäugt.

Die Mutterschafe werden nach Abschluss des Beobachtungszeitraums von drei Wochen und Euthanasie der Lämmer im Rahmen der hämodynamischen Untersuchung wieder in den Zuchtbetrieb verbracht.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25.05.1998 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-49-09).

3.2 Experimentelles Vorgehen

3.2.1 Anästhesie der Mutterschafe

Die Prämedikation der nüchternen Mutterschafe (zwölf Stunden ohne Futter) erfolgt durch eine Injektion von 10 ml Ketamin (ca. 15 mg/kgKG, i.m.; Narketan® 10, Chassot GmbH, Ravensburg) in die lange Sitzbeinmuskulatur. Nach Eintritt der Wirkung wird das Schaf auf einem Rolltisch in aufrechter

Brustbauchlage in den Operationsbereich gebracht. Dort wird nach Rasur und Desinfektion (Cutasept® F, Bode Chemie, Hamburg) ein Zugang in die rechte V. cephalica (BD Venflon™ Pro, 18 GA, Becton Dickinson, Sweden) gelegt, über den die Narkose mit Propofol (2-4 mg/kgKG, i.v.; Propofol 2% MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) im Bolus eingeleitet wird. Sobald die Muskelspannung des Kiefers nachlässt, wird das Tier in Brustbauchlage intubiert und anschließend auf den Operationstisch in Rückenlage gedreht und mechanisch ventiliert (Cicero EM, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck, Deutschland, Atemminutenvolumen: 10-15 ml/kgKG; Atemfrequenz: 17/min; PEEP (positive endexpiratory pressure): 5 mmHg; Sauerstoff: 30%). Zur Kontrolle der Parameter dient ein Narkosemonitor (Datex-Ohmeda 5/5 Type F-CM 1.00, Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland) und ein Pulsoxymeter (Pulse Oximeter, Nonin Medical Inc., MPLS, MN).

Die Narkoseaufrechterhaltung erfolgt über die Verabreichung von 1,7 – 2,3 l/min Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden).

Ein weiterer venöser Zugang wird in die V. auricularis lateralis des linken Ohres gelegt (BD Venflon™ Pro, 22 GA, Becton Dickinson, Sweden). Nun stehen zwei venöse Zugänge für Medikamentengabe und intraoperativen Flüssigkeitsausgleich zur Verfügung. Der Flüssigkeitsausgleich erfolgt durch Gabe der Vollelektrolytlösungen Ringer Lactat und Deltajonin (Deltajonin® und Ringer- Lösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) in der Dosierung 10 ml/kgKG/h. Über die ersten 500ml Ringer Lactat wird die erste Dosis der perioperativen antibiotischen Prophylaxe verabreicht (1 Million I.E. Penicillin G, Penicillin G®, Jenapharm, Jena; und 40 mg Gentamicin, Gencin®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen).

Am rechten Ohr wird ein arterieller Zugang gelegt, der eine regelmäßige Kontrolle der Blutgaswerte erlaubt (BD Venflon™ Pro, 22 GA, Becton Dickinson, Sweden).

Um die Aspiration von Pansensaft zu verhindern und ein Entweichen von Gasen während der Narkose zu ermöglichen, wird ein Gummischlauch als Magensonde gelegt.

Die Überwachung der Narkosetiefe erfolgt klinisch über den Korneal- und den Lidreflex, sowie über hämodynamische Parameter wie Blutdruck- und Pulsanstiege bzw. -abfälle. Im Bedarfsfall wird die Narkosetiefe über die Isofluranzufuhr korrigiert.

Die Kreislaufparameter werden über eine mechanische Blutdruckmanschette am linken Vorderbein (Memoprint®, © S + B medVETGmbH, Babenhausen) sowie ein Pulsoxymeter (Pulse Oximeter, Nonin Medical Inc., MPLS, MN), dessen Sensor an der Zunge des Mutterschafs angebracht ist, kontrolliert. Die Beatmung wird über eine grafische Darstellung der expiratorischen CO₂-Konzentrationen auf dem Narkosemonitor überwacht und bei Bedarf angepasst, um einen expiratorischen CO₂-Partialdruck von ca. 35 – 40 mmHg aufrechtzuerhalten. Darüber hinaus werden Herz und Lunge klinisch auskultatorisch beurteilt.

Um eine sichere und in allen Operationen vergleichbare Narkose zu gewährleisten, werden in Abständen von ca. 15 min Herzfrequenz, Atemfrequenz, Atemminutenvolumen, Sauerstoffsättigung, Blutdruck, expiratorische CO₂-Konzentration, aktueller Narkosegasflow und der PEEP protokolliert. Unmittelbar nach Narkoseeinleitung und folgend im Abstand von ca. 45 min sowie vor Ausleitung der Narkose wird eine Blutgasanalyse einer arteriellen Blutprobe durchgeführt (Synthesis 10, Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim). Die Blutprobe wird hierzu mit einer heparinisierten 1 ml-Spritze aus dem Zugang in der A. auricularis entnommen. Im Falle einer Azidose mit einer Basenabweichung (base excess, BE) von mehr als -4 wird gemäß Gleichung 3.1 mit Bikarbonat (Natriumhydrogencarbonat 8,4% Infusionslösungskonzentrat, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) entgegengesteuert.

Gleichung 3.1

$$\text{Natriumbikarbonat [ml]} = 0,3 \cdot \text{BE} \cdot \text{kgKG}$$

3.2.2 Operationsvorbereitung

Das narkotisierte Mutterschaf wird am Bauch vom Rippenbogen bis zum Euter großzügig rasiert. Anschließend wird das Operationsgebiet zunächst mit Wasser und Waschbenzin gereinigt und desinfiziert (Cutasept® F, Bode Chemie, Hamburg), bevor die Operateure das Tier unter Einhaltung der Sterilität abdecken.

3.2.3 Chirurgisches Vorgehen zur intrauterinen Anlage eines aortopulmonalen Shunts

Die Anlage des aortopulmonalen Shunts erfolgt nach einer bereits etablierten Methode [73].

Entlang einer mit Lokalanästhetikum (Lidocainhydrochlorid, 5 ml, s.c., Xylocain® 2%, AstraZeneca, Wedel) infiltrierten Linie wird die Haut von Bauchnabel bis Euter mit einem Skalpell (Feather 22) eröffnet. Das Unterhautfettgewebe wird elektrothermisch (ME 400, Firma Martin, Tuttlingen, Deutschland) präpariert und die Bauchdecke im Bereich der Linea alba vom Nabel bis zu Euterband eröffnet.

Durch diese Öffnung wird ein Teil des Uterus aus dem Abdomen nach außen verlagert. Muss der Uterus für einen besseren operativen Zugang zum Lamm rotiert werden, ist nach Beendigung der Operation auf ein Zurückbringen in die Ausgangsposition zu achten, um Komplikationen während des natürlichen Geburtsvorgangs vorzubeugen.

Anhand markanter Strukturen wie Schultergürtel und Kopf kann die Ausrichtung des Fetus palpatorisch bestimmt werden.

Bei Zwillingsschwangerschaften wird der weiter ventral liegende Fetus operiert.

Sind Schulterblatt und Wirbelsäule identifiziert und liegt das Lamm auf seiner rechten Seite, wird der Uterus über dem fetalen Schulterblatt eröffnet und durch die Inzision das linke Vorderbein und der Thorax des Lamms exponiert. Die Extremität wird in Streckung fixiert und zusammen mit dem Uterus mit warmen, feuchten, sterilen Tüchern abgedeckt.

Es erfolgt im Anschluss die Thorakotomie des Lamms im dritten oder vierten Interkostalraum. Das Perikard wird entlang des pulmonalarteriellen Hauptstammes eröffnet und mit Haltnähten an der Haut des Lamms fixiert (2-0 Vicryl®, Ethicon®, Johnson&Johnson Intl., Belgien), um einen bestmöglichen Zugang zum Operationssitus zu gewährleisten.

Abbildung 3.1 illustriert schematisch das im Folgenden beschriebene Vorgehen.

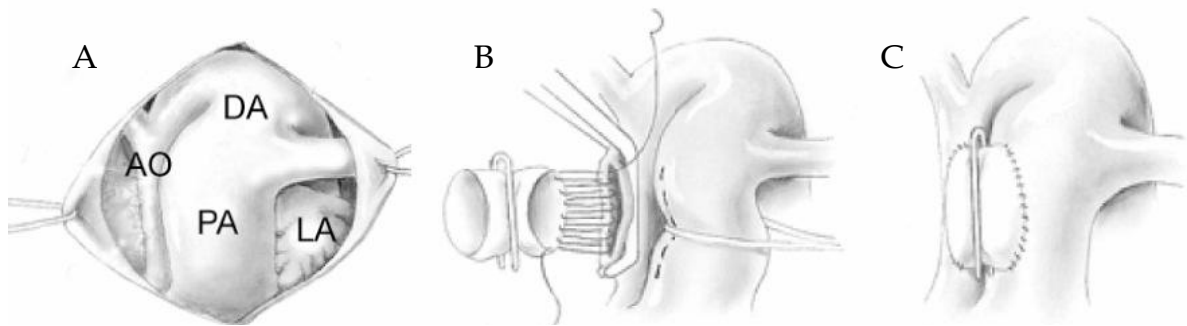
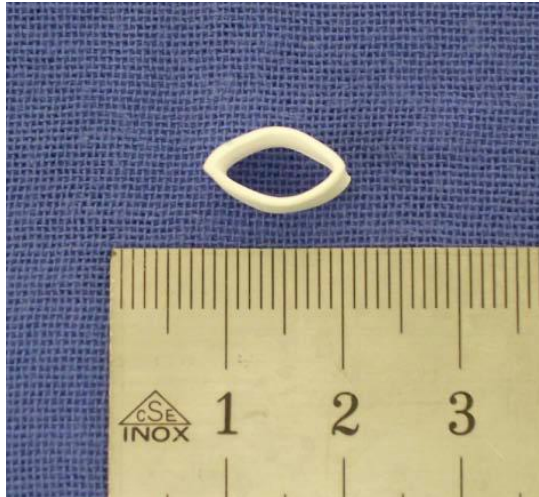


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung des chirurgischen Vorgehens (modifiziert nach REDDY [73]); A: Intraoperativer Situs nach Thorakotomie des Fetus, AO=Aorta, DA=Ductus arteriosus, PA=Pulmonalarterie, LA=Linkes Atrium; B: Anastomosierung der Gefäßprothese an die ausgeklemmte AO; C: Aortopulmonaler Shunt vor Entfernen der Gefäßclips

Die AO und die PA werden freigelegt und die PA wird mit einer Gefäßschlinge (Vessel loops, Patent Pending, MedGeneral, APLS, Minn.) umschlungen. Der zur PA hin gerichtete Teil der AO ascendens wird längs mit einer Gefäßklemme so ausgeklemmt, dass noch ein ausreichender Blutfluss durch das Gefäß gewährleistet ist.

Mit einem spitzen Skalpell wird dieser ausgeklemmte Bereich durch eine Stichinzision eröffnet und diese Öffnung mit feiner Schere und Rückwärtsschere nach vorne und hinten auf die gewünschte Länge von ca. 8 mm erweitert (Abbildung 3.3 - A). Eine Polytetrafluoroethylen - Gefäßprothese (Durchmesser: 8 mm, Goretex®; W.L. Gore and Assoc, USA) (Abbildung 3.2) wird auf eine Länge von ca. 3 mm gekürzt, mit Hilfe von zwei Gefäßclips vorübergehend verschlossen und daraufhin in fortlaufender Nahttechnik mit der AO ascendens anastomosiert (7-0 Prolene®, Ethicon® Johnson&Johnson Intl., Belgien) (Abbildung 3.1 – B, Abbildung 3.3 – B).



*Abbildung 3.2 8 mm Polytetrafluoroethylen-Shunt (Goretex®; W.L. Gore and Assoc., USA)
(Fotografie der Arbeitsgruppe)*

Nachfolgend kann die Gefäßklemme an der AO langsam geöffnet werden. Um eine Blutung an der Anastomose minimal zu halten und die Koagulation im Nahtbereich zu beschleunigen, wird der Operationsbereich locker mit feinen Mullbindenstreifen abgestopft und mit warmer Elektrolytlösung (Ringer-Lösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) gespült.

Nach dem gleichen Prinzip wird nun die PA teilweise ausgeklemmt und an ihrer posteriolateralen Wand eröffnet. In fortlaufender Nahttechnik erfolgt die Anastomosierung mit der noch freien Seite der Gefäßprothese (7-0 Prolene®, Ethicon® Johnson&Johnson Intl., Belgien) (Abbildung 3.3 - C). Es werden dann sowohl die Gefäßklemme (Abbildung 3.1 - C) als auch die Clips des Kunststoffshunts entfernt und durch leichte Kompression bzw. Anlupfen mit einem Fadenrest wird das Shuntlumen vollständig eröffnet. Abbildung 3.3 - D zeigt das Resultat einer intrauterinen Shuntanlage.

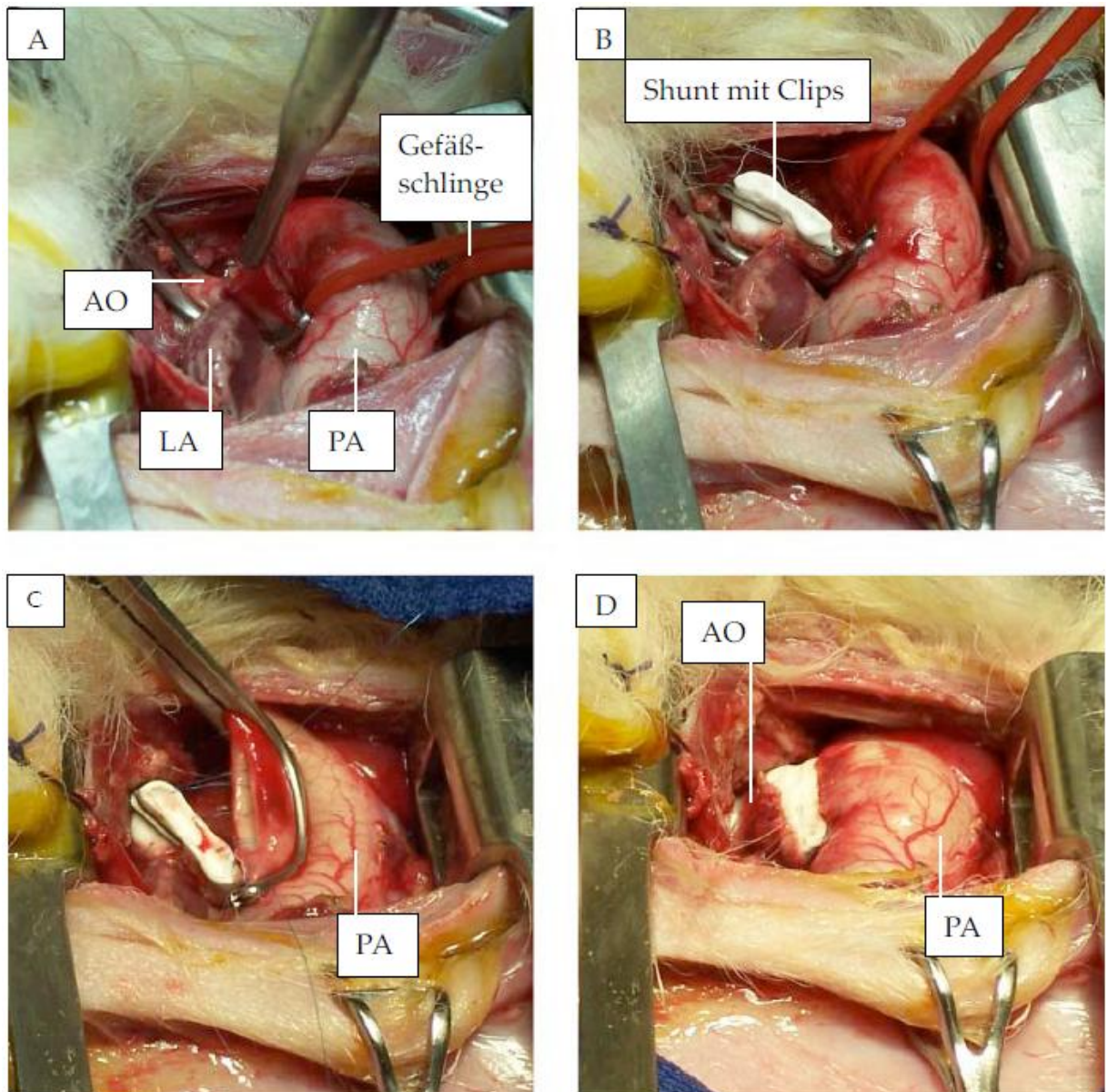


Abbildung 3.3 *Chirurgisches Vorgehen zur intrauterinen Platzierung eines aortopulmonalen Shunts; A: Die PA wird mit Hilfe einer Gefäßumschlingung zur Seite gehalten und die in der Tiefe liegende AO wurde inzidiert. B: Der Shunt wurde aortal anastomosiert. C: Der Shunt wird an der ausgeklemmten und bereits eröffneten Pulmonalarterie anastomosiert. D: Resultat nach Entfernen der Gefäßclips (Fotografien der Arbeitsgruppe)*

Das Perikard, die Thorakotomiewunde und die Unterhaut des Lammes werden schichtweise mit resorbierbarem Nahtmaterial verschlossen (2-0 Vicryl®, Ethicon®, Johnson&Johnson Intl., Belgien). Die Adaptation der fetalen Haut erfolgt durch eine fortlaufende nicht resorbierbare Naht (2-0 Prolene®, Ethicon®, Johnson&Johnson Intl., Belgien). Die vordere Extremität wird wieder

in den Uterus verlagert und dieser wird mit reichlich lauwarmer, steriler Flüssigkeit (Ringer-Lösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) aufgefüllt, um intraoperativ verloren gegangene Amnionflüssigkeit zu ersetzen. Der zweite Teil der perioperativen Antibiose (1 Million I.E. Penicillin G, Penicillin G®, Jenapharm, Jena; 40 mg Gentamicin, Gencin®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) wird direkt intrauterin verabreicht.

Die Uteruswunde wird mit einer fortlaufenden und einer einstülpenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (2-0 Vicryl®, Ethicon®, Johnson&Johnson Intl., Belgien) versorgt. Unter Berücksichtigung der Lage vor der Exposition wird der Uterus wieder in den Bauchraum des Mutterschafes zurückverlagert.

Das Peritoneum des Schafs wird in fortlaufender Technik mit einem Vicrylfaden verschlossen (2 Ethibond®, Ethicon®, Johnson&Johnson Intl., Belgien). Es folgen einen fortlaufende Naht des Unterhautfettgewebes (2-0 Vicryl®, Ethicon®, Johnson&Johnson Intl., Belgien) und eine fortlaufende Intrakutannaht der mütterlichen Bauchhaut (2-0 Prolene® Ethicon® Johnson&Johnson Intl., Belgien). Die Hautnaht und die Umgebung werden mit einem wasserdampfpermeablen Sprühverband (Smith & Nephew, OpSite, England) abgedeckt.

Nach Abstellen der Isoflurannarkose wird das Schaf wieder in Brustbauchlage gedreht, bei suffizienter eigener Atmung extubiert und in den Stall zurückgebracht. Dort wird es bis zum Abklingen der Narkosewirkung beobachtet. Die erste Dosis der postoperativen Schmerzmedikation von 1 mg Buprenorphin (0,005 mg/kgKG, i.m., Temgesic®, Essex Pharma) wird i.m. verabreicht, sobald das Schaf selbständig sicher steht.

3.2.4 Postoperative Versorgung der Muttertiere

Die Muttertiere erhalten unmittelbar nach der Operation und am Folgetag eine standardisierte Schmerzmedikation von 1 mg Buprenorphin (ca. 0,005 mg/kgKG, i.m., Temgesic®, Essex Pharma) sowie über zwei Tage eine antibiotische Behandlung mit jeweils 2 Millionen I.E. Penicillin G (Penicillin G®, Jenapharm, Jena) und 80 mg Gentamicin (Gencin®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) intramuskulär.

Die Tiere werden täglich untersucht. Dabei wird die Bauchwunde inspiziert und auf Schmerzhaftigkeit und eventuelle Nahtdehiszenzen sowie Bruchpforten überprüft. Herz- und Atemfrequenz werden bestimmt. Die

Temperatur wird rektal mit einem handelsüblichen elektronischen Fieberthermometer gemessen. Bei Anzeichen einer Infektion (Hauptkriterium: rektale Temperatur > 40°C) und/oder Schmerzen müssen Antibiose und Schmerztherapie gegebenenfalls angepasst werden.

3.2.5 Postnatale Versorgung der Lämmer

Die Lämmer kommen in der Regel wenige Tage nach der Operation spontan zu Welt. Nur bei offensichtlichen Geburtskomplikationen, die das Wohl von Mutter oder Jungtier gefährden, wird in den Geburtsprozess eingegriffen. Dabei wird versucht den natürlichen Geburtsvorgang beispielsweise bei Lämmern in Steißlage manuell zu unterstützen.

Nach der Geburt werden die Lämmer täglich gewogen und untersucht. Die tägliche Gewichtszunahme der Lämmer liegt bei ca. 100 – 200 Gramm pro Tag. Atem- und Herzfrequenz werden dokumentiert, einmal wöchentlich wird peripher venöses Blut entnommen (an den Tagen 1 und 21 nach der Geburt je 5 ml, an den Tagen 7 und 14 je 2,5 ml). Findet die Geburt statt, solange das Mutterschaf noch analgetisch und antibiotisch abgedeckt ist, so erhalten die Lämmer ebenfalls noch Buprenorphin zur Analgesie (0,005 mg/kgKG, i.m., Temgesic®, Essex Pharma), Penicillin G (50000 IE/kgKG, i.m., Penicillin G®, Jenapharm, Jena) und Gentamicin (2 mg/kgKG, i.m., Gencin®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) zur antibiotischen Versorgung.

Ab dem ersten Lebenstag wird den Lämmern täglich L-Arginin (L-Arginin-Hydrochlorid 21% Braun Infusionslösungskonzentrat, i.v., B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in einer Dosierung von 500 mg/kgKG über einen peripher liegenden Venenverweilkatheter verabreicht, wobei die L-Arginin-Lösung noch einmal mit der gleichen Menge an steriler, isotonischer Natriumchloridlösung (Isotonische Natriumchlorid-Lösung Diaco, Laboratori Diaco Biomedicali S.p.A., Trieste) verdünnt wird. Die Gesamtdosis wird dabei aufgeteilt in zwei Einzeldosen, die im Abstand von ca. zwölf Stunden jeweils morgens (ca. 8:00 Uhr) und abends (ca. 20:00 Uhr) appliziert werden.

Einmal wöchentlich erhalten die Lämmer zudem 100 mg dreiwertiges Eisen i.m. (Myofer®100, Eisen(III)-hydroxid-Dextran-Komplex, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim).

Der Untersuchungszeitraum der beschriebenen Serie beträgt drei Wochen. Danach werden die Lämmer hämodynamisch untersucht.

3.2.6 Anästhesie der Lämmer

Zur Anästhesievorbereitung werden den drei Wochen alten Lämmern an beiden Vv. ceph. antebrr. Zugänge gelegt (BD Venflon™ Pro, 22 GA, Becton Dickinson, Sweden). Die Tiere werden mit Diazepam sediert (0,2 mg/kgKG, i.v., Diazepam-Lipuro®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) und in die Abteilung für experimentelle Herzchirurgie der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Deutschen Herzzentrums München gebracht. Nach Lokalanästhesie der Haut des Ohres (EMLA® Creme, Astra Zeneca GmbH, 22876 Wedel) wird ein intraarterieller Katheter (BD Venflon™ Pro, 22 GA, Becton Dickinson, Sweden) in die A. auricularis gelegt, welcher zur invasiven Blutdruckmessung an einen Druckabnehmer (Notocord® Systems, Croissy sur Seine, Frankreich) angeschlossen wird.

Nach der Gabe von Ketamin (2 mg/kgKG, i.v., Narketan® 10, Chassot GmbH, Ravensburg) erfolgt die Injektion von Propofol (2-4 mg/kgKG, i.v., Propofol 1% MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg).

Das Lamm wird in Rückenlage endotracheal intubiert (6,0 mm Endotrachealtubus, Portex ID 6.0 Soft-Seal, Portex) und mechanisch beatmet (Siemens Elema, Dräger Servo Ventilator, Drägerwerk AG, Lübeck; Atemminutenvolumen: 10 ml/kgKG, Atemfrequenz: 30/min, Inspiratorische Sauerstoffkonzentration: 21%).

Die Muskulatur wird vor Eröffnung des Thorax mit Pancuroniumbromid (0,1 mg/kgKG, i.v., Pancuronium-ratiopharm®, ratiopharm GmbH, 89079 Ulm) relaxiert.

Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgt gewichtsadaptiert und abhängig von der Narkosetiefe mit Ketamin (0,3-0,6 mg/kg/h, i.v., Narketan® 10, Chassot GmbH, Ravensburg), Diazepam (0,01-0,02 mg/kg/h, i.v., Diazepam-Lipuro®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) und Fentanyl (1-2 µg/kg/h, i.v., Fentanyl-Jansen® 0,1 mg/ml, Jansen-Cilag GmbH, 41470 Neuss) über Perfusoren (Spritzenpumpe Pilot A2, Fresenius Vial S.A., 38590 Brezins France). Als Infusion erhalten die Tiere Ringer-Lösung (100ml/kg/h, i.v.; Ringer-Lösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen).

Das Monitoring erfolgt mittels Kapnografie (Capnomac Ultima ULT-S-33-01, Datex Ohmeda, Duisburg) und Pulsoxymetrie (Pulse Oximeter, Nellcor Inc., Hayward USA). Es wird in regelmäßigen Abständen eine Blutgasanalyse (Corning 158 pH/Blutgas Analysator, Corning Medical and Scientific, Medfield, MA) durchgeführt. Bei Bedarf wird eine Azidose gemäß Gleichung 3.1 korrigiert.

Die Überwachung der Körpertemperatur erfolgt kontinuierlich über eine rektale Temperatursonde.

Eine invasive Blutdruckmessung erfolgt zunächst über die A. auricularis, anschließend über einen Katheter in der Aorta descendens (siehe 3.2.7).

3.2.7 Vorbereitung der hämodynamischen Untersuchung der Lämmer

Zur hämodynamischen Untersuchung steht ein Computer zur Verfügung. Dieser ist mit weiteren Hardwarekomponenten wie einem Druckwandler (Stratham Instruments, Hato Rey, PR) und einem Verstärkermodul für eine Ultraschallflusssonde verbunden. Eine spezielle Software (Notocord-hem 3.5, 2002 Edition, Notocord® Systems, Croissy sur Seine, Frankreich) erlaubt die kontinuierliche grafische Darstellung sowie die fortlaufende Aufzeichnung sämtlicher für die Untersuchung erforderlicher hämodynamischer Parameter.

Die Lämmer werden im Bereich der linken Leiste, des rechten Halses sowie des gesamten Brustkorbs geschoren und desinfiziert (Cutasept® F, Bode Chemie, Hamburg).

Die linke A. femoralis wird operativ freigelegt und ein Polyurethankatheter wird in das Gefäß eingebracht und bis in die AO descendens vorgeschoben. Dieser Katheter wird mit einem Druckwandler des Notocord® - Systems verbunden, um eine kontinuierliche Kontrolle und Aufzeichnung von Herzfrequenz und systemarteriellen Mitteldruck (mean systemic arterial pressure, mSAP) zu gewährleisten.

Im Halsbereich wird die V. jugularis externa präpariert, ein vierlumiger Polyurethankatheter (Vierlumiger zentraler Venenkatheter; Polyurethan; 2,9 mm Durchmesser; 20 cm Länge; Arrow® Deutschland GmbH; Erding) eingeführt, in den rechten Vorhof vorgeschoben und fixiert. Seine Lage kann im weiteren Verlauf nach erfolgter Thorakotomie leicht unter Sicht optimiert werden. Über den distalen Schenkel wird mittels eines Druckwandlers der Druck im rechten Vorhof überwacht. Über die verbleibenden Schenkel werden Narkotika und Flüssigkeit verabreicht.

Es erfolgt nun eine Thorakotomie durch komplette Sternotomie. Anschließend wird das Perikard eröffnet und die linke PA freigelegt. Um diese wird eine Ultraschallflusssonde (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY) gelegt, um den pulmonalarteriellen Blutfluss messen zu können. Auch diese Sonde ist mit dem Notocord® - System verbunden.

Am linken Vorhof wird eine Tabaksbeutelnaht (5-0 Prolene®, Ethicon® Johnson&Johnson Intl., Belgien) vorgelegt. Nach Stichinzision wird ein Katheter im Vorhof platziert, durch die vorgelegte Naht fixiert und anschließend mit einem weiteren Druckwandler verbunden.

Nach dem gleichen Verfahren wird ein Katheter in den Hauptstamm der PA distal der künstlichen Gefäßanastomose eingebracht. Bei Kontrolltieren erfolgt dies distal des DA. Mit dem Anschluss an das Notocord®-System ist eine pulmonalarterielle Druckmessung möglich.

Die invasiv gemessenen Parameter dienen im weiteren Verlauf der Untersuchung auch zum Narkosemonitoring.

Abbildung 3.4 zeigt das Setup eines vollständig instrumentierten Lammes.

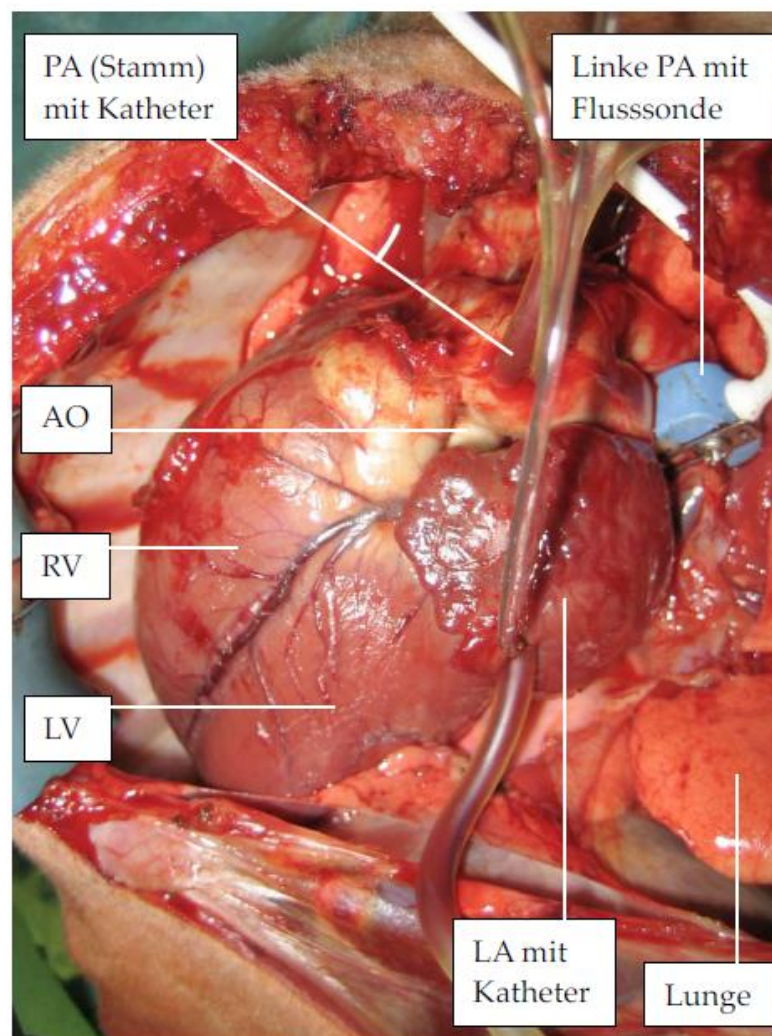


Abbildung 3.4 Eröffneter Lammtorax: zu sehen sind die Katheter im Hauptstamm der PA und im LV sowie die Flusssonde um die linke PA (Fotografie der Arbeitsgruppe)

3.2.8 Hämodynamische Untersuchung der drei Wochen alten Lämmer

Nach dem Zusammenführen der beiden Sternumränder und einer Stabilisierungsphase erfolgt die so genannte Baselinemessung. Hierbei werden die im Folgenden genannten hämodynamischen Parameter über einen Zeitraum von ca. zehn Minuten ohne Manipulation oder Intervention von außen gemessen und aufgezeichnet.

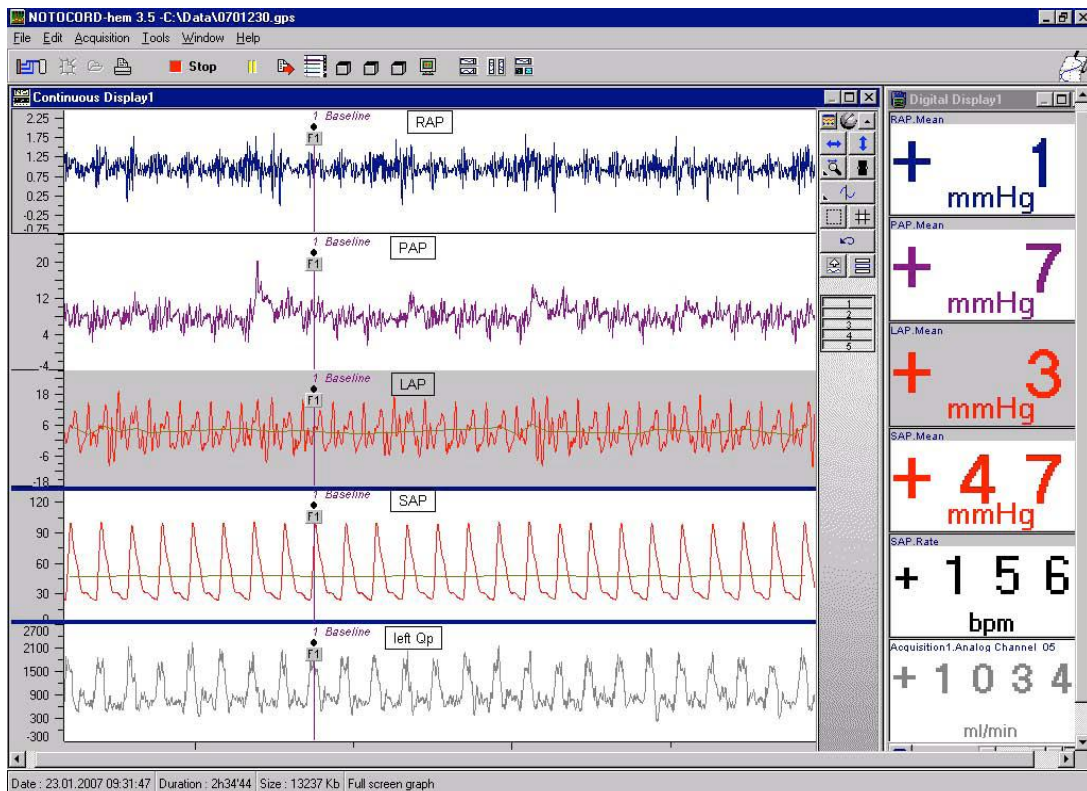


Abbildung 3.5 Screenshot des Notocord® - Programms: Im linken Teil des Bildes werden die Druckkurven von RAP, PAP, LAP, SAP und die Flusskurve von Qp (Lungenblutfluss) (von oben nach unten) in Echtzeit dargestellt; rechts werden die jeweils aktuellen Mitteldrücke bzw. der pulmonalarterielle Blutfluss in Zahlenwerten dargestellt

Die Untersuchung der hämodynamischen Parameter erfolgt in Shunt- und Kontrollgruppen auf gleiche Art und Weise. Die Drücke werden über die intravasalen Polyurethankatheter, die mit dem Druckumwandler (Statham P23Db Druckmesswandler; Statham Instruments, Hato Rey, PR) verbunden sind, kontinuierlich gemessen und im Notocord® - System aufgezeichnet. Die

Druckabnehmer werden auf Höhe der Herzspitze des instrumentierten Lamms auf null geeicht.

Die direkte grafische Darstellung erfolgt in Echtzeit auf dem Bildschirm über das Notocord® - System (Abbildung 3.5). Die Drücke werden neben den Druckkurven als errechnete Mitteldrücke in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) angegeben. Die angezeigten Werte sind über den Zeitraum von einer Minute gemittelt.

3.2.9 Euthanasie der Versuchstiere

Nach abgeschlossener hämodynamischer Untersuchung und Entnahme der Blutproben werden die Lämmer während der Narkose mit 40 ml Kaliumchlorid (Kaliumchlorid 7,45% Infusionslösungskonzentrat, i.v., B.Braun Melsungen AG, Melsungen) euthanasiert. Herz und Lunge werden entnommen und wie die Blutproben für weitere Untersuchungen konserviert.

3.3 Untersuchte Parameter

3.3.1 Lungengefäßwiderstand (pulmonary vascular resistance, PVR)

Der Lungengefäßwiderstand wird nach dem Hagen-Poiseuilleschen und dem Ohmschen Gesetz durch das Verhältnis der Druckdifferenz aus Pulmonalarterie (PA) und linkem Atrium (LA) (mPAP - mLAP) zum Fluss durch die linke PA bezogen auf das Körpergewicht (Q_{lp}/kg) definiert. In der vorliegenden Studie wird so der PVR des linken Lungenflügels berechnet. Die Einheit ist [mmHg/ml*min*kg].

Gleichung 3.2

$$PVR = \frac{mPAP - mLAP}{Q_{lp}/kgKG}$$

3.3.2 Mittlerer pulmonaler arterieller Druck (mean pulmonary arterial pressure, mPAP)

Die Messung des mittleren Drucks in der PA (mPAP) erfolgt invasiv. Der Katheter liegt dazu bei den Shuntlammern im Pulmonalarterienhauptstamm distal der künstlichen Anastomose zwischen PA und AO. Bei Kontrolltieren wird er distal der obliterierten physiologischen aortopulmonalen Verbindung (DA) platziert. Der Druck wird in Millimeter Quecksilbersäule angegeben [mmHg].

3.3.3 Mittlerer linksatrialer Druck (mean left atrial pressure, mLAP)

Der Messkatheter wird, wie in 3.2.7 beschrieben, nach Inzision des LA direkt in diesen eingeführt und dann fixiert. Die Einheit ist [mmHg].

3.3.4 Mittlerer systemarterieller Druck (mean systemic arterial pressure, mSAP)

Hierfür wird der Katheter über die A. femoralis in der Leiste, wie in 3.2.7 beschrieben, bis in die AO descendens eingeführt. Gemessen werden der systolische (sSAP), der diastolische (dSAP) und der mittlere systemarterielle Druck (mSAP). Die Einheit ist jeweils [mmHg].

3.3.5 Pulsamplitude (pulse pressure, PP)

Die Pulsamplitude stellt die Druckamplitude der Pulskurve dar. Sie errechnet sich aus der Differenz von sSAP und dSAP (Gleichung 3.3).

Gleichung 3.3

$$PP = sSAP - dSAP$$

3.3.6 Pulmonaler Druckgradient (*transpulmonary gradient, TPG*)

Der pulmonale Druckgradient beschreibt den Druckunterschied zwischen dem LA und der PA. Er berechnet sich aus der Differenz zwischen dem mittleren pulmonalarteriellen Druck und dem mittleren linksatrialen Druck (Gleichung 3.4). Die Einheit ist [mmHg]. Der pulmonale Druckgradient wird verwendet für die Berechnung des Lungengefäßwiderstandes (PVR; pulmonary vascular resistance) und entspricht, bezogen auf das Ohmsche Gesetz, der Spannung. (vgl. Gleichung 3.2).

Gleichung 3.4

$$\text{Pulmonaler Druckgradient} = mPAP - mLAP$$

3.3.7 Verhältnis von Lungenblutfluss zu systemischem Blutfluss (Q_p/Q_s)

An die zehnminütige Baselinemessung schließt sich die Bestimmung des Verhältnisses von Lungenblutfluss (Q_p) zu systemischem Blutfluss (Q_s) an. Dafür wird mit heparinisierten 1 ml - Spritzen zeitgleich Blut aus dem LA, dem RV, der PA distal der Gefäßanastomose und der AO descendens entnommen. Die Probenentnahme erfolgt über die liegenden Katheter. Die Probe aus dem RV wird durch direkte Punktion mit einer Einmalkanüle gewonnen. Die Sauerstoffsättigungen dieser Proben werden mit einem Hemoxymeter (OSM 2, Radiometer, Copenhagen, Dänemark) gemessen.

Das Verhältnis von Lungenblutfluss (Q_p) zu Systemblutfluss (Q_s) wird nach dem Fickschen Prinzip errechnet. Wie in Gleichung 3.5 beschrieben, wird dafür der Quotient aus Sauerstoffausschöpfung im Systemkreislauf und Sauerstoffausschöpfung im Lungenkreislauf gebildet.

Gleichung 3.5

$$\frac{Q_p}{Q_s} = \frac{sO_{2\ AO} - sO_{2\ RV}}{sO_{2\ LA} - sO_{2\ PA}}$$

3.3.8 Blutfluss durch die linke A. pulmonalis (Q_{lp} , $Q_{lp}/kgKG$)

Der Blutfluss durch die linke PA (Q_{lp}) wird mit einer Ultraschallflussonde (Transonic® Flowprobe, Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY) gemessen. Um den gesamten Lungenblutfluss abzuschätzen, würde man den gemessenen Fluss Q_{lp} durch 0,4 teilen, da der Blutfluss durch den linken Lungenflügel einen Anteil von ca. 40% am gesamten Lungenblutfluss hat.

Da das Blutvolumen vom Körpergewicht abhängig ist, wird für jedes Tier der Quotient aus absolutem pulmonalen Blutfluss und Körpergewicht in Kilogramm berechnet ($Q_{lp}/kgKG$). Die Einheit des Flusses ist [ml/min] bzw. [ml/min/kg].

3.3.9 Systemvaskulärer Widerstand (systemic vascular resistance, SVR)

Der systemvaskuläre Widerstand kann als Quotient aus der Druckdifferenz zwischen AO descendens (mSAP) und RA (mRAP) und dem Blutfluss im systemischen Blutkreislauf (Q_s) errechnet werden. (Gleichung 3.7).

Der Q_s wird aus dem ermittelten Ergebnis von Q_p/Q_s (vergleiche Kapitel 3.3.7) und dem gesamten Lungenblutfluss (Q_p ; vergleiche Kapitel 3.3.8) berechnet. (Gleichung 3.6). Die Einheit ist [mmHg/ml*min*kg].

Da beispielsweise die Berechnung des gesamten Lungenblutflusses auf der Annahme beruht, dass der gemessene Blutfluss durch die linke Lunge daran einen Anteil von ca. 40% hat und sich auch die Berechnung von Q_p/Q_s einiger Vereinfachungen bedient, kann der Wert des SVR nur als Annäherung betrachtet werden.

Gleichung 3.6

$$Q_s = \frac{Q_{lp}/0,4}{Q_p/Q_s}$$

Gleichung 3.7

$$SVR = \frac{(mSAP - mRAP)}{(Q_{lp}/kgKG)/0,4/(Q_p/Q_s)}$$

3.4 Statistische Verfahren

3.4.1 Berechnungen

Die Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchung der Shunt- bzw. Kontrolllämmer mit L-Argininbehandlung werden verglichen mit jenen der entsprechenden Shunt- bzw. Kontrolllämmer ohne L-Argininbehandlung. Zudem werden Vergleiche zwischen L-Arginin – behandelten Shunt- und Kontrolllämmern und zwischen Placebo – behandelten Shunt- und Kontrolllämmern durchgeführt.

Die Datenauswertung wird mit der Statistiksoftware *PASW Statistics 18.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) vorgenommen. Als deskriptive Statistiken werden Mittelwert und Standardabweichung bzw. Median und der Interquartilsbereich (IQR: 25. - 75. Perzentile) angegeben.

Der Vergleich von Mittelwerten zwischen unabhängigen Gruppen wird mittels Student T-Test durchgeführt. Sind wesentliche Voraussetzungen (Normalverteilungsannahme) für diesen Test nicht erfüllt, kommt als nicht-parametrische Alternative der Mann-Whitney-U-Test zum Einsatz. Für relevante Effektgrößen (Mittelwert- bzw. Mediandifferenzen) werden 95%-Konfidenzintervalle angegeben, um die Unsicherheit der Stichprobeninformation (Fallzahl und Datenvariabilität) in der Ergebnisbeschreibung zu berücksichtigen.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt zu einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 5%. Um der multiplen Testproblematik (Zunahme des Fehlers 1. Art mit steigender Anzahl statistischer Tests; [8]) entgegenzuwirken, wird eine Bonferroni-Adjustierung der p-Werte im Falle multipler Gruppenvergleiche vorgenommen. Die Bonferroni-Adjustierung erfolgt dabei variablenweise (Korrektur für multiple Gruppenvergleiche je Variable, aber nicht global für alle Vergleiche), um in Anbetracht der geringen Stichprobengröße keine zu konservativen Ergebnisse zu erhalten.

A priori wurde die Variable mPAP als primäre Zielgröße festgelegt, so dass Resultate bzgl. dieses Endpunktes confirmatorische Aussagekraft besitzen. Alle Analysen bzgl. sekundärer Zielparameter werden als explorative Ergebnisse betrachtet [8].

3.4.2 Grafische Veranschaulichung

Die vorliegenden Ergebnisse werden in Form von Boxplots veranschaulicht. Boxplots, wie in Abbildung 3.6 beispielhaft gezeigt, dienen der Darstellung der Verteilung der Daten und statistischer Kennwerte wie Median, Maximum, Minimum, Spannweite, Quartile und Interquartilsabstand (auf Englisch als interquartile range, IQR bezeichnet). Ein Boxplot besteht aus einem als Box bezeichneten Rechteck und davon ausgehenden Strichen, die Whisker genannt werden. Die Box wird durch das obere und untere Quartil begrenzt und beinhaltet den als horizontalen Strich gezeichneten Median. Der Interquartilsabstand schließt somit den Bereich der gesamten Box ein und beinhaltet die Hälfte aller gemessenen Werte. Die Länge der Whisker beträgt maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstandes. Kommen in einer Messreihe keine sogenannten Ausreißer oder Extremwerte (Werte die mehr als ein 1,5-faches des Interquartilsabstandes betragen) vor, entsprechen die Enden der Whisker dem Minimum bzw. dem Maximum. Extremwerte und Ausreißer werden gesondert gekennzeichnet. Der Bereich zwischen den Extremen, der alle Daten umfasst, wird als Spannweite bezeichnet.

Die Y-Achse zeigt die jeweiligen gemessenen Werte auf. Auf der X-Achse werden die zu vergleichenden Gruppen aufgetragen.

Abbildung 3.6 zeigt beispielhaft die Komponenten eines Boxplot - Diagramms.

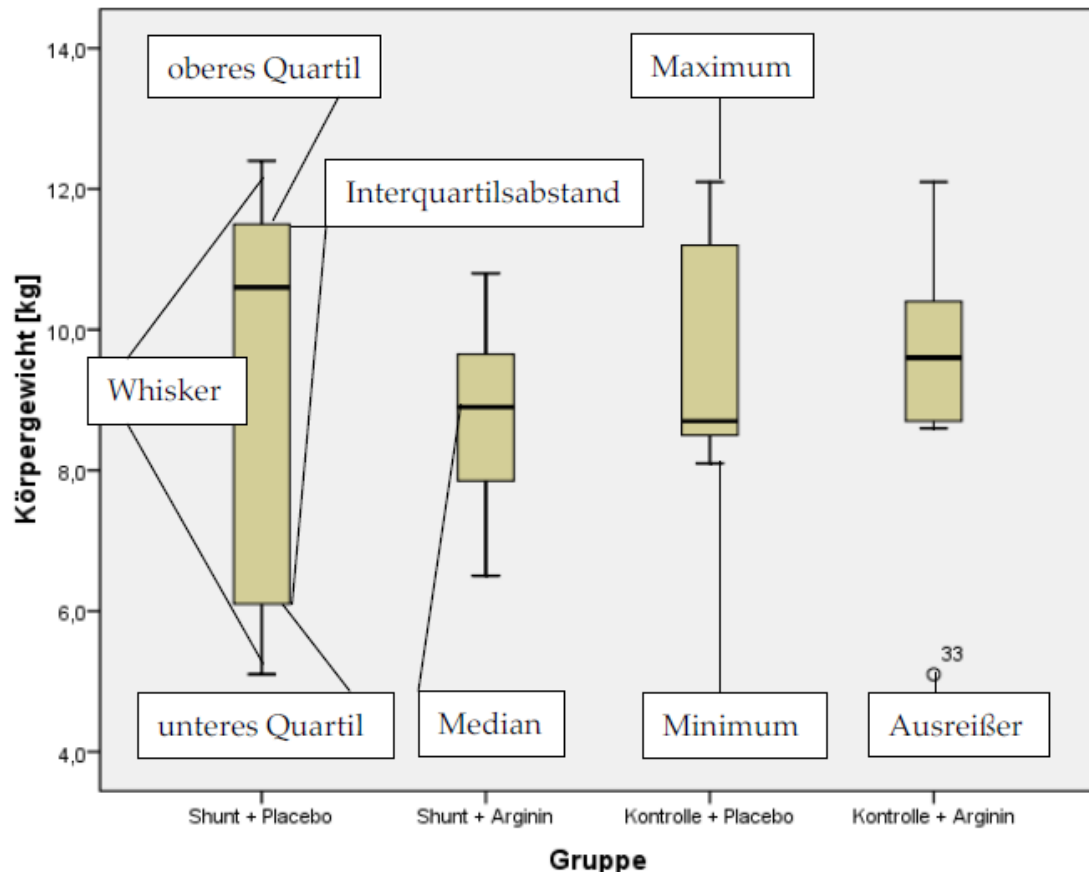


Abbildung 3.6 Beispiel für die grafische Veranschaulichung mit Boxplots

3.5 Ausschlusskriterien

Ziel der Studie ist es Lämmer mit angeborenem aortopulmonalen Shunt bzw. Kontrolllämmer jeweils mit oder ohne L-Argininbehandlung hämodynamisch zu untersuchen. Die Größe des Shunts wird einerseits durch das berechnete Verhältnis von Q_p/Q_s als auch durch anatomische Gegebenheiten definiert. Leider kann die Größe des Shunts nicht vor der hämodynamischen Untersuchung vorausgesagt werden.

Maschinenartiges Geräusch bei der Auskultation, gesteigerte Herzfrequenz und ein großes Herz können lediglich Hinweise sein.

Ob ein Shuntlamm in die endgültige Auswertung aufgenommen werden kann, entscheidet sich nach Q_p/Q_s -Berechnung und Entnahme und Sektion des Herzens. Der Shunt muss vollständig sondierbar sein. Das Verhältnis Q_p/Q_s muss mindestens 1,4 betragen.

Mögliche Ausschlusskriterien ergeben sich aus chirurgisch experimentellen Fehlern (Shunt zugenäht, Shunt nicht eröffnet, etc.) oder angeborenen strukturellen Anomalien (angeborene Herzfehler, Truncus communis, etc.).

In die Kontrollgruppe sollen nach Möglichkeit nur Tiere aufgenommen werden, an deren Geschwistertier die intrauterine Operation durchgeführt wurde. Damit soll die gleiche Exposition gegenüber mütterlichem Stress und diaplazentar übertragenen, medikamentösen Noxen gewährleistet werden.

4. Ergebnisse

Für diese Studie wurde bei 45 Lämmern im Rahmen einer intrauterinen Operation ein aortopulmonaler Shunt angelegt. Der genaue Ablauf dieser Prozedur ist in Kapitel 3.2.3 detailliert beschrieben. Diese Operation, die nach der Geburt einen erhöhten pulmonalen Blutfluss zur Folge hat, war Voraussetzung für die Aufnahme dieser sogenannten Shunttiere in die entsprechende Versuchsgruppe. Ob ein Shunttier das Einschlusskriterium eines Q_p/Q_s von mindestens 1,4 erfüllt, konnte erst während der hämodynamischen Untersuchung nach drei Wochen eruiert werden.

Als Kontrolltiere dienten die gesunden gleichaltrigen Geschwistertiere der Shuntlämmer bzw. gesunde Lämmer nicht operierter Muttertiere.

Der Versuchsbeginn wurde definiert durch den Tag der Geburt der Lämmer, an welchem die zweimal tägliche Gabe von entweder L-Arginin oder Placebo gestartet wurde. Nach einem Beobachtungszeitraum von durchschnittlich 21 Tagen wurden die Lämmer hämodynamisch untersucht.

Von den 45 untersuchten Shunttieren starben 15 bereits vor Versuchsbeginn. Weitere sechs Tiere starben im Beobachtungszeitraum von 21 Tagen oder während der hämodynamischen Untersuchung. Vier davon gehörten der Shunt-Arginin-, zwei davon der Shunt-Placebo-Gruppe an.

Drei Shunttiere mussten aufgrund chirurgisch-experimenteller Probleme und eines daraus resultierenden zu niedrigen Verhältnis von pulmonalem zu systemischem Blutfluss ($<1,4$) aus der Studie ausgeschlossen werden. Trotz standardisierter Operationstechnik konnte, bedingt beispielsweise durch einen von der intrauterinen Lage des Fetus abhängigen Zugangsweg zum Thorax oder die variierende Größe des Fetus, ein optimales chirurgisches Ergebnis nicht immer erzielt werden (Shunt-Arginin-Gruppe: $n=2$; Shunt-Placebo-Gruppe: $n=1$). Ein Shunttier (Shunt-Arginin-Gruppe) wies neben dem ihm zugefügten angeborenen Herzfehler desweiteren ein PFO und einen VSD auf und wurde mit einem Q_p/Q_s von 6,1 aufgrund mangelnder Vergleichbarkeit ebenfalls nicht in die Studie aufgenommen.

Insgesamt wurden 20 Shunttiere in die Auswertung eingeschlossen: elf Tiere gehörten der Shunt-Arginin-, neun Tiere der Shunt-Placebo-Gruppe an.

Von den 28 eingeplanten Kontrolltieren starben zwei vor Versuchsbeginn und sieben im Beobachtungszeitraum (Kontrolle-Arginin-Gruppe: $n=1$; Kontrolle-Placebo-Gruppe: $n=6$).

Insgesamt wurden 19 Kontrolltiere in die Auswertung eingeschlossen: zehn Tiere gehörten der Kontrolle-Arginin-, neun Tiere der Kontrolle-Placebo-Gruppe an.

Von den 19 Kontrolltieren waren 13 die gleichaltrigen Geschwister operierter Lämmer.

Tabelle 4.1 gibt einen Überblick über den Versuchsverlauf.

Die Untersuchungsergebnisse wurden im Rahmen von vier Gruppenvergleichen, wie in 3.4 beschrieben, ausgewertet. Die Vergleiche wurden vorgenommen zwischen den Gruppen Shunt-Placebo – Kontrolle-Placebo (I; dieser Vergleich wurde bereits in einer schon veröffentlichten Studie der Arbeitsgruppe über drei Tage alte Lämmer angestellt [90]), Shunt-Arginin – Kontrolle-Arginin (II), Kontrolle-Arginin – Kontrolle-Placebo (III) und Shunt-Arginin – Shunt-Placebo (IV). Tabelle 4.2 zeigt die Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchung und deren statistische Auswertung. Die signifikanten Ergebnisse ($p < 0,05$; bei variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten) sind fett formatiert.

Tabelle 4.1 Übersicht über den Versuchsverlauf

A. Shunttiere

Anzahl der Shunttiere insgesamt: 45

davon

- vor Versuchsbeginn (vor/unmittelbar nach der Geburt) gestorben: 15
- im Beobachtungszeitraum (21 d p.p.) gestorben: 6
 - Shunt-Arginin-Gruppe: 4
 - Shunt-Placebo-Gruppe: 2
- aus experimentell-technischen Gründen/aufgrund weiterer vorbestehender Herzfehler von der Studie ausgeschlossen: 4
 - Shunt-Arginin-Gruppe: 3
 - Shunt-Placebo-Gruppe: 1
- in die Studie eingeschlossen: 20
 - Shunt-Arginin-Gruppe: 11
 - Shunt-Placebo-Gruppe: 9

B. Kontrolltiere

Anzahl der Kontrolltiere insgesamt: 28

davon

- vor Versuchsbeginn (vor/unmittelbar nach der Geburt) gestorben: 2
- im Beobachtungszeitraum (21 d p.p.) gestorben: 7
 - Kontrolle-Arginin-Gruppe: 1
 - Kontrolle-Placebo-Gruppe: 6
- in die Studie eingeschlossen: 19
 - 13 davon waren Geschwistertiere operierter Lämmer
 - Kontrolle-Arginin-Gruppe: 10

- Kontrolle-Placebo-Gruppe: 9

Tabelle 4.2 *Übersicht über die Ergebnisse und deren statistische Auswertung (die statistisch signifikanten Werte ($p < 0,05$) sind fett formatiert)*

		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz der Mediane/Mittelwerte)			
						I	II	III	IV
PVR [keine Einheit]	Median	0,1	0,1	0,2	0,2	0,044	0,004	>0,99	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	0,1-0,1	0,1-0,2	0,2-0,2	0,2-0,3	[-0,13;-0,03]	[-0,14;-0,04]	[-0,09;0,06]	[-0,05;0,03]
mPAP [mmHg]	Median	14	16	14	11	>0,99	0,000	0,024	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	13-18	13-19	13-15	10-11	[-1,14;4,25]	[2,49;7,47]	[1,21;4,32]	[-4,19;1,89]
mLAP [mmHg]	Median	5	5	4	2	0,124	0,000	0,380	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	4-7	4-7	3-4	2-3	[0,08;3,79]	[1,43;3,92]	[-0,15;1,97]	[-1,7;2,24]
mSAP [mmHg]**	Mittelwert	43	43	52	43	0,092	>0,99	0,036	>0,99
	SD	8	5	7	6	[-15,93;-1,38]	[-5,57;4,43]	[2,31;14,29]	[-5,95;6,39]
PP [mmHg]	Median	22	40	13	14	>0,99	0,172	>0,99	0,700
	IQR (25.-75. Perzentile)	15-26	19-55	12-39	9-31	[-16,79;14,6]	[1,28;37,34]	[-16,51;13,61]	[-33,93;5,2]
TPG [mmHg]	Median	10	10	10	8	>0,99	0,040	0,088	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	9-11	9-13	10-11	8-9	[-1,96;1,29]	[0,44;4,65]	[0,53;3,28]	[-3,59;0,96]
Qp/Qs [keine Einheit]	Median	2,9	2,1	1,0	1,0	0,000	0,000	>0,99	0,380
	IQR (25.-75. Perzentile)	2,4-3,2	1,6-2,8	0,9-1,1	1,0-1,1	[1,33;2,26]	[0,61;1,8]	[-0,09;0,07]	[-0,06;1,26]
Qlp/kgKG [ml/min/kg]	Median	85,8	90,9	60,3	40,8	0,008	0,000	0,624	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	73,4-99,9	78,7-125,1	41,2-66,1	34,3-47,2	[13,48;55,97]	[36,88;76,11]	[-1,29;28,6]	[-30,53;18,45]
SVR [keine Einheit]	Median	0,5	0,3	0,3	0,4	0,760	>0,99	>0,99	0,584
	IQR (25.-75. Perzentile)	0,5-0,6	0,3-0,6	0,3-0,6	0,3-0,5	[-0,05;0,26]	[-0,21;0,11]	[-0,2;0,14]	[-0,06;0,25]
I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo					* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten ** T-Test				
II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin									
III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo									
IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo									

4.1 Ergebnisse der täglichen körperlichen Untersuchungen

Während des Beobachtungszeitraums von 21 Tagen post partum wurden Körpergewicht, Herzfrequenz und Atemfrequenz der Lämmer täglich bestimmt.

Abbildung 4.1 zeigt die Entwicklung des mittleren Körpergewichts der vier Versuchsgruppen. Abbildungen 4.2 und 4.3 stellen die mittleren Körpergewichte am Tag 1 bzw. am Tag 21 nach Geburt der Lämmer dar.

Im statistischen Vergleich der Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Körpergewichts.

Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die Daten zu diesem Parameter.

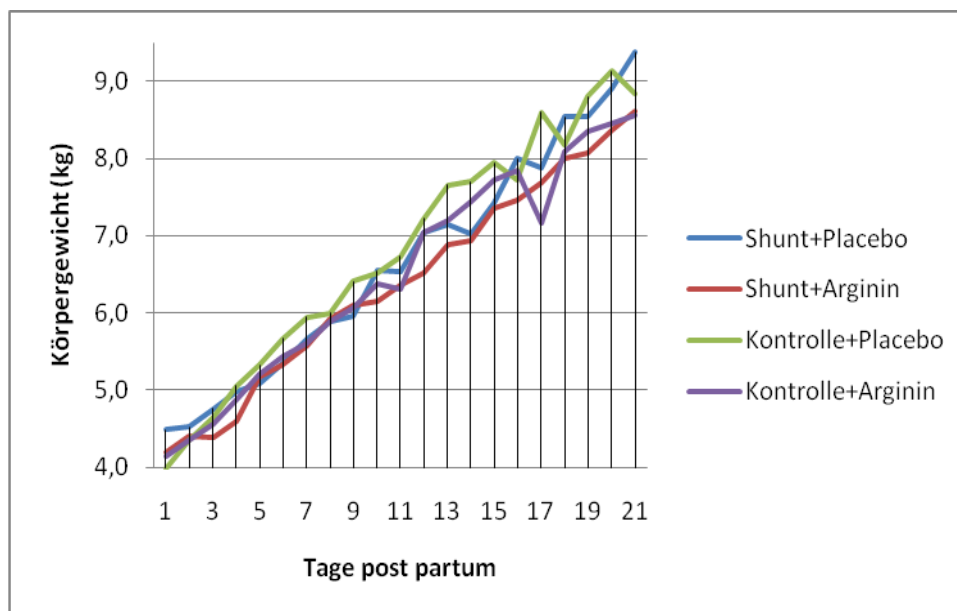


Abbildung 4.1 Entwicklung des jeweils mittleren Körpergewichts [kg] der vier Versuchsgruppen in den 21 Tagen p.p.

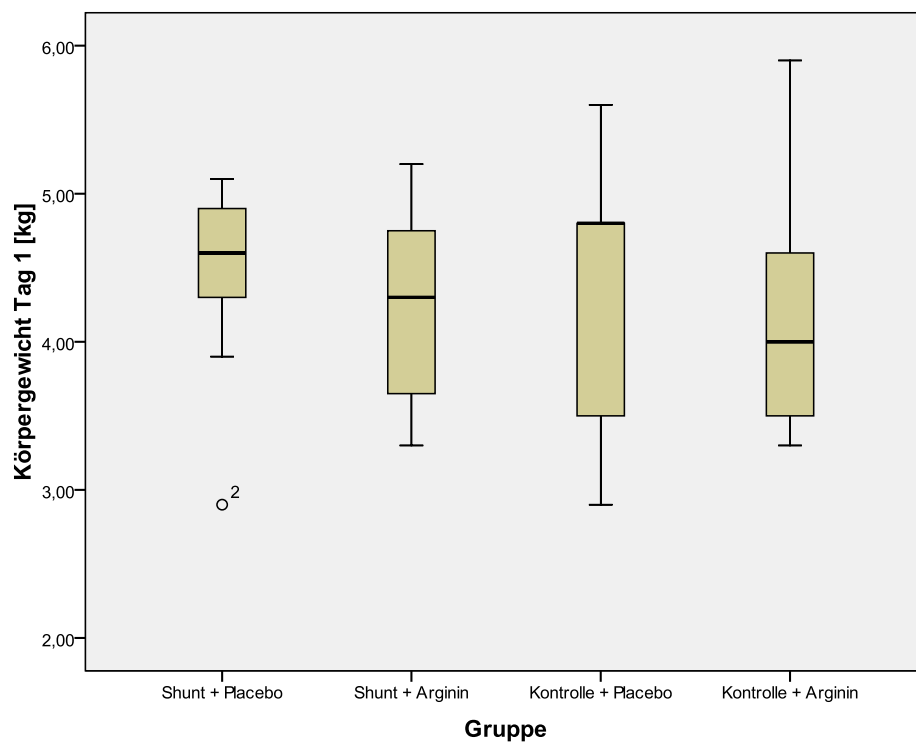


Abbildung 4.2 Jeweils mittleres Körpergewicht [kg] der vier Versuchsgruppen am Tag 1 p.p.

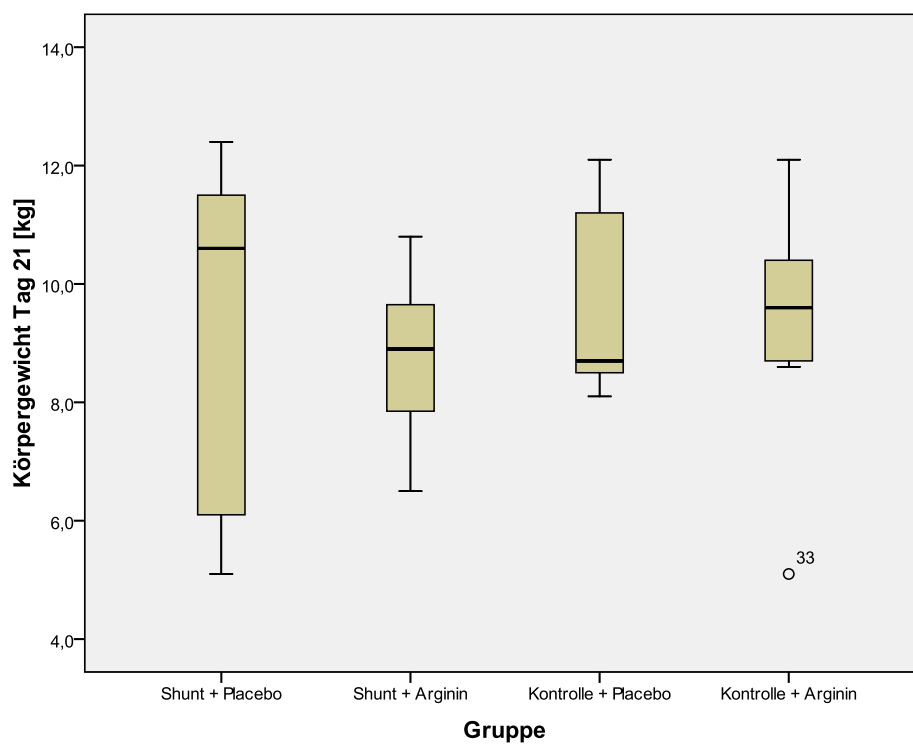


Abbildung 4.3 Jeweils mittleres Körpergewicht [kg] der vier Versuchsgruppen am Tag 21 p.p.

Tabelle 4.3 **Übersicht über die Daten zum Parameter Körpergewicht**

		Shunt- Placebo	Shunt- Arginin	Kontrolle- Placebo	Kontrolle- Arginin	p-Wert*			
						I	II	III	IV
Körpergewicht Tag 1 [kg]	Median	4,6	4,3	4,8	4,0	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	4,3-4,9	3,6-4,8	3,5-4,8	3,5-4,6				
Körpergewicht Tag 21 [kg]	Median	10,6	8,9	8,7	9,6	>0,99	0,816	>0,99	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	6,1-11,5	7,6-9,8	8,5-11,2	8,7-10,4				

I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo	* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten
II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin	
III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo	
IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo	

Abbildung 4.4 zeigt die Entwicklung der jeweils mittleren Herzfrequenz der vier Gruppen im Beobachtungszeitraum. Abbildung 4.5 stellt die Daten zum Parameter Herzfrequenz in Form eines Boxplots dar.

Im statistischen Vergleich der Gruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in den Gruppenvergleichen I (Shunt-Placebo – Kontrolle-Placebo) und II (Shunt-Arginin – Kontrolle-Arginin).

Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über die Daten zum Parameter Herzfrequenz.

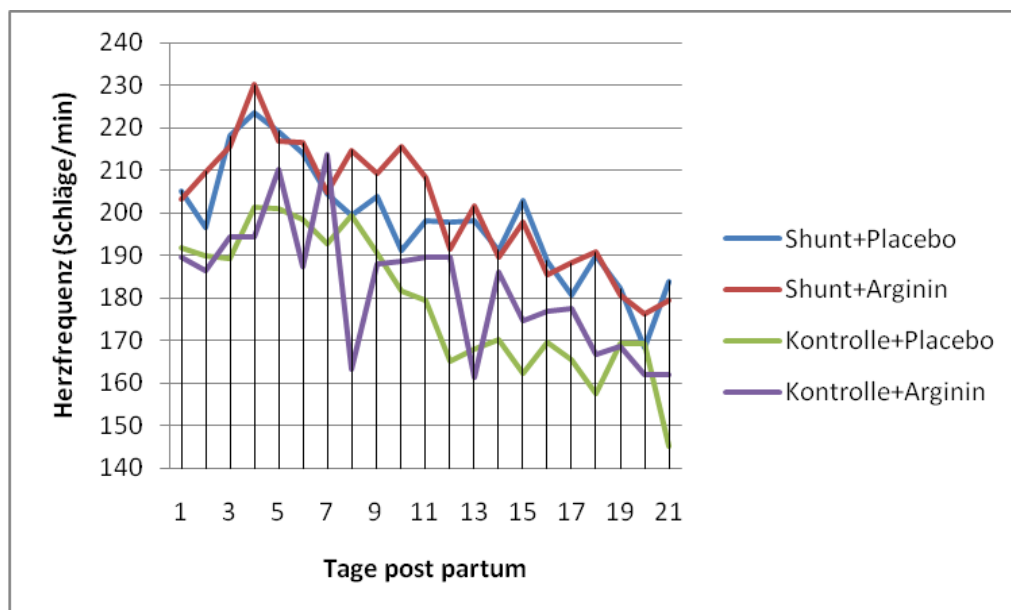


Abbildung 4.4 Entwicklung der jeweils mittleren Herzfrequenz [Schläge/min] der vier Versuchsgruppen in den 21 Tagen p.p.

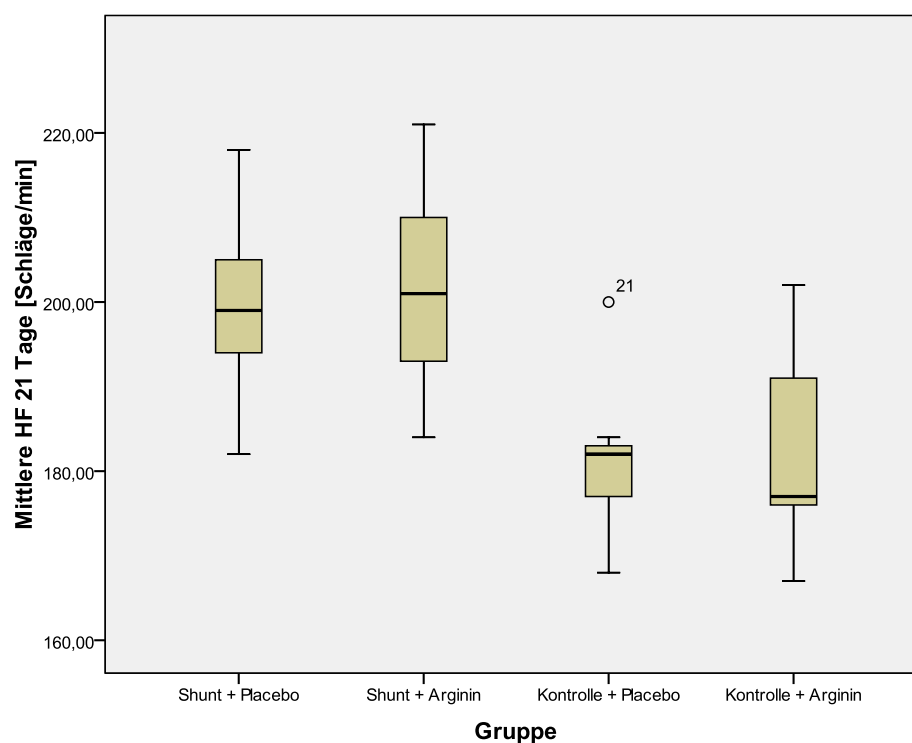


Abbildung 4.5 Jeweils mittlere Herzfrequenz [Schläge/min] der vier Versuchsgruppen in den 21 Tagen p.p.

Tabelle 4.4 Übersicht über die Daten zum Parameter Herzfrequenz (die statistisch signifikanten Werte ($p < 0,05$) sind fett formatiert)

		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert*			
						I	II	III	IV
Mittlere HF 21 Tage [Schläge/min]	Median	199	201	182	177	0,020	0,008	>0,99	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	194-205	192-211	177-183	176-191				

I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo	* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten
II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin	
III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo	
IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo	

Abbildung 4.6 zeigt die Entwicklung der jeweils mittleren Atemfrequenz der vier Gruppen im Beobachtungszeitraum. Abbildung 4.7 stellt die Daten zum Parameter Atemfrequenz in Form eines Boxplots dar.

Im statistischen Vergleich der Gruppen ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) im Gruppenvergleich II (Shunt-Arginin – Kontrolle-Arginin).

Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die Daten zum Parameter Herzfrequenz.

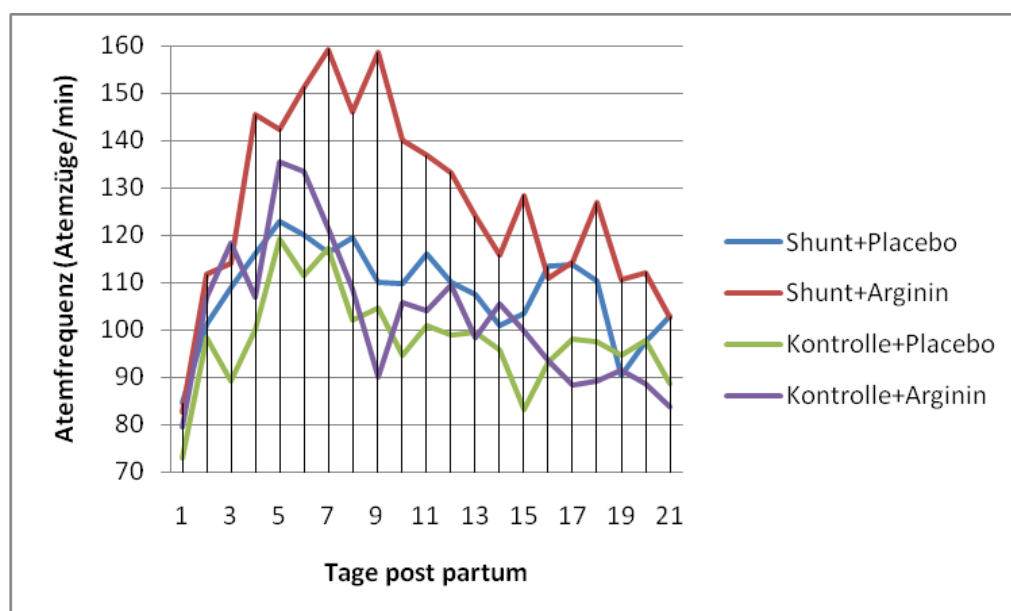


Abbildung 4.6 Entwicklung der jeweils mittleren Atemfrequenz [Atemzüge/min] der vier Versuchsgruppen in den 21 Tagen p.p.

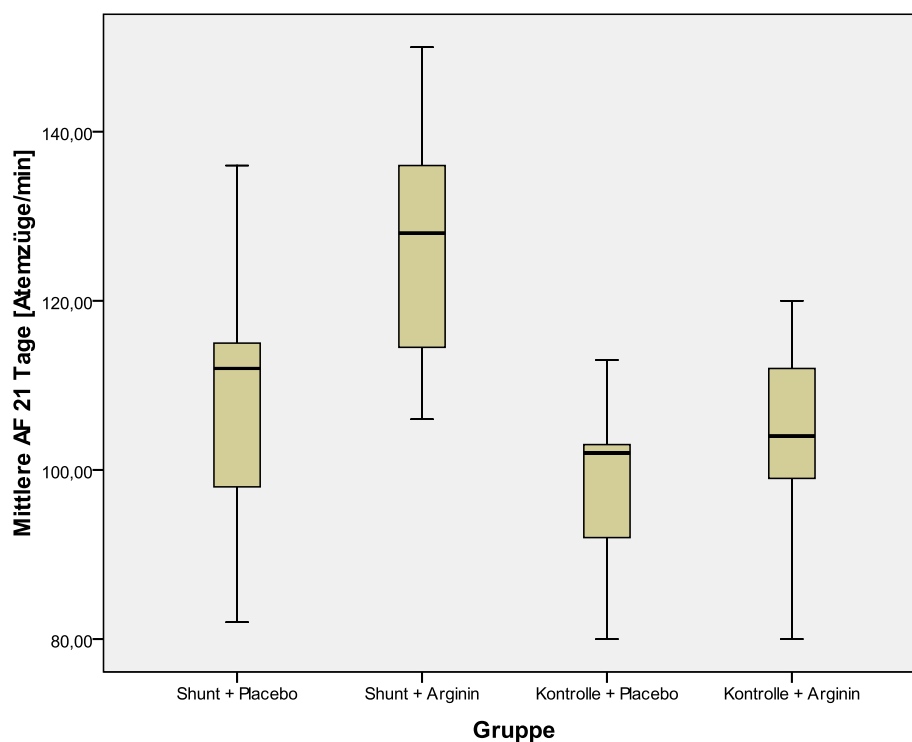


Abbildung 4.7 Jeweils mittlere Atemfrequenz [Atemzüge/min] der vier Versuchsgruppen in den 21 Tagen p.p.

Tabelle 4.5 Übersicht über die Daten zum Parameter Atemfrequenz (die statistisch signifikanten Werte ($p < 0,05$) sind fett formatiert)

		Shunt- Placebo	Shunt- Arginin	Kontrolle- Placebo	Kontrolle- Arginin	p-Wert*			
						I	II	III	IV
Mittlere AF 21 Tage [Atemzüge/min]	Median	112	128	102	104	0,568	0,004	>0,99	0,160
	IQR (25.-75. Perzentile)	98-115	111-137	92-103	99-112				

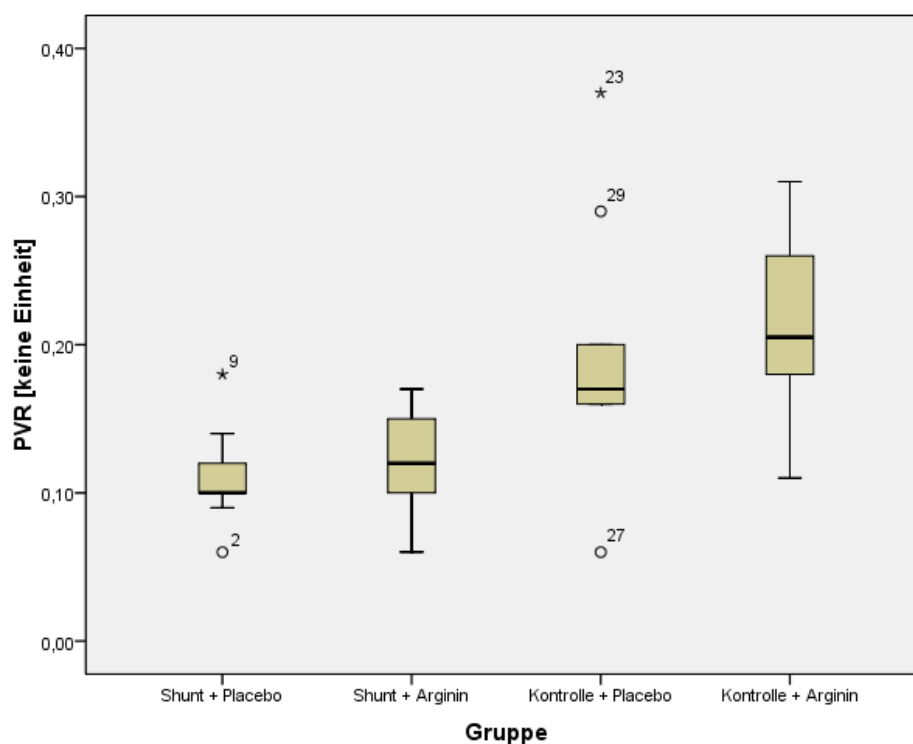
I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo
 II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin
 III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo
 IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo

* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten

4.2 Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchungen nach drei Wochen

4.2.1 Lungengefäßwiderstand (PVR)

Der PVR ist in der Shunt-Placebo-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Placebo-Gruppe und in der Shunt-Arginin-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Arginin-Gruppe signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). In den anderen Gruppenvergleichen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).



PVR [keine Einheit]		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz d. Mediane)			
						I	II	III	IV
	Median	0,1	0,1	0,2	0,2	0,044	0,004	>0,99	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	0,1-0,1	0,1-0,2	0,2-0,2	0,2-0,3	[-0,13;-0,03]	[-0,14;-0,04]	[-0,09;0,06]	[-0,05;0,03]

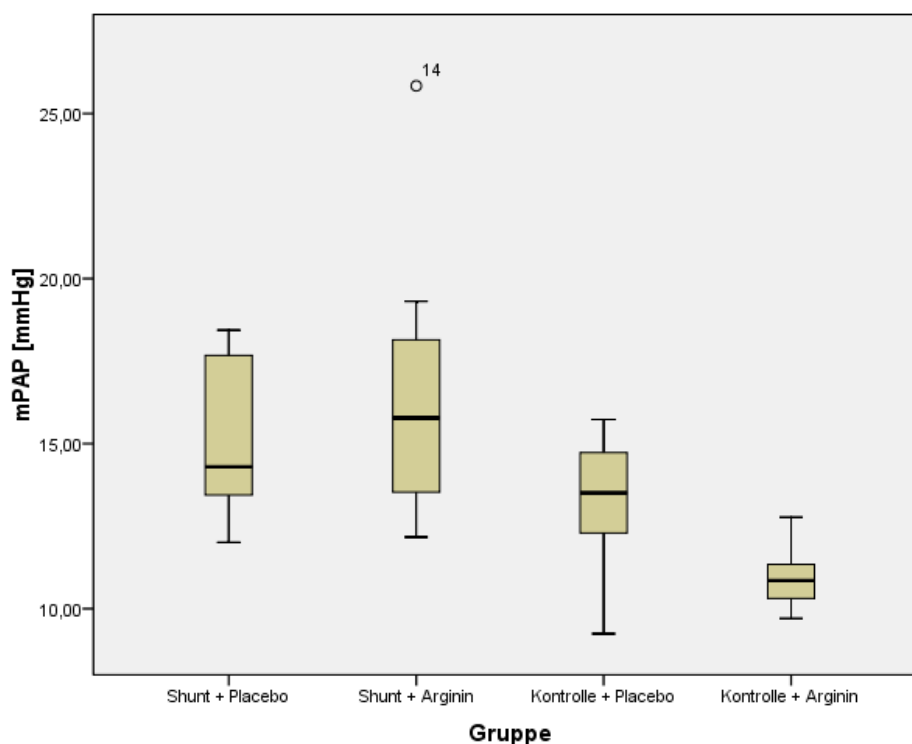
I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo
 II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin
 III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo
 IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo

* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten

Abbildung 4.8 PVR [keine Einheit] mit p-Werten der Gruppenvergleiche

4.2.2 Mittlerer pulmonalarterieller Druck (mPAP)

Der mPAP ist in der Shunt-Arginin-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Arginin-Gruppe signifikant erhöht und in der Kontrolle-Arginin-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Placebo-Gruppe signifikant erniedrigt (jeweils $p < 0,05$). In den anderen Gruppenvergleichen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).



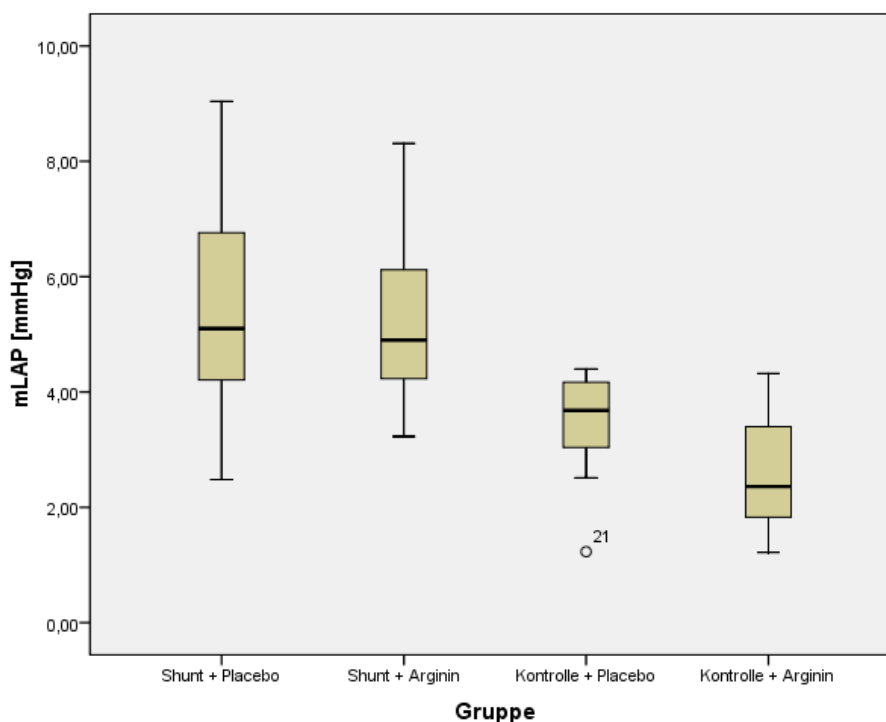
		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz d. Mediane)			
						I	II	III	IV
mPAP [mmHg]	Median	14	16	14	11	>0,99	0,000	0,024	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	13-18	13-19	12-15	10-11	[-1,14;4,25]	[2,49;7,47]	[1,21;4,32]	[-4,19;1,89]

I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo	* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten
II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin	
III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo	
IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo	

Abbildung 4.9 mPAP [mmHg] mit p-Werten der Gruppenvergleiche

4.2.3 Mittlerer linksatrialer Druck (mLAP)

Der mLAP ist in der Shunt-Arginin-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Arginin-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$). In den anderen Gruppenvergleichen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).



		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz d. Mediane)			
						I	II	III	IV
mLAP [mmHg]	Median	5	5	4	2	0,124	0,000	0,380	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	4-7	4-7	3-4	2-3	[0,08;3,79]	[1,43;3,92]	[-0,15;1,97]	[-1,7;2,24]

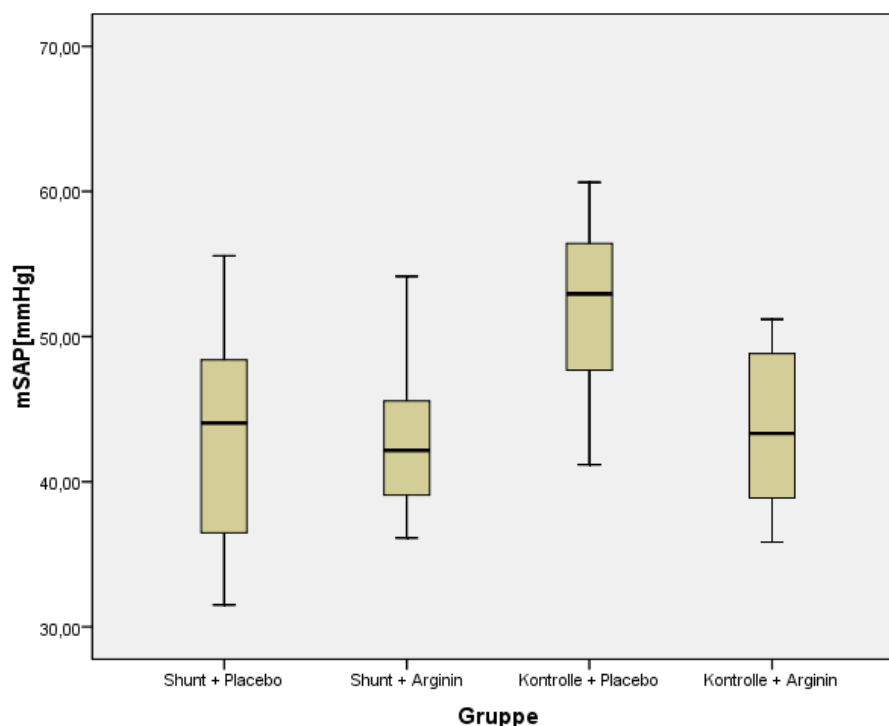
I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo
 II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin
 III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo
 IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo

* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten

Abbildung 4.10 mLAP [mmHg] mit p-Werten der Gruppenvergleiche

4.2.4 Mittlerer systemarterieller Druck (mSAP)

Der mSAP ist in der Kontrolle-Arginin-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Placebo-Gruppe signifikant erniedrigt ($p < 0,05$). In den anderen Gruppenvergleichen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).



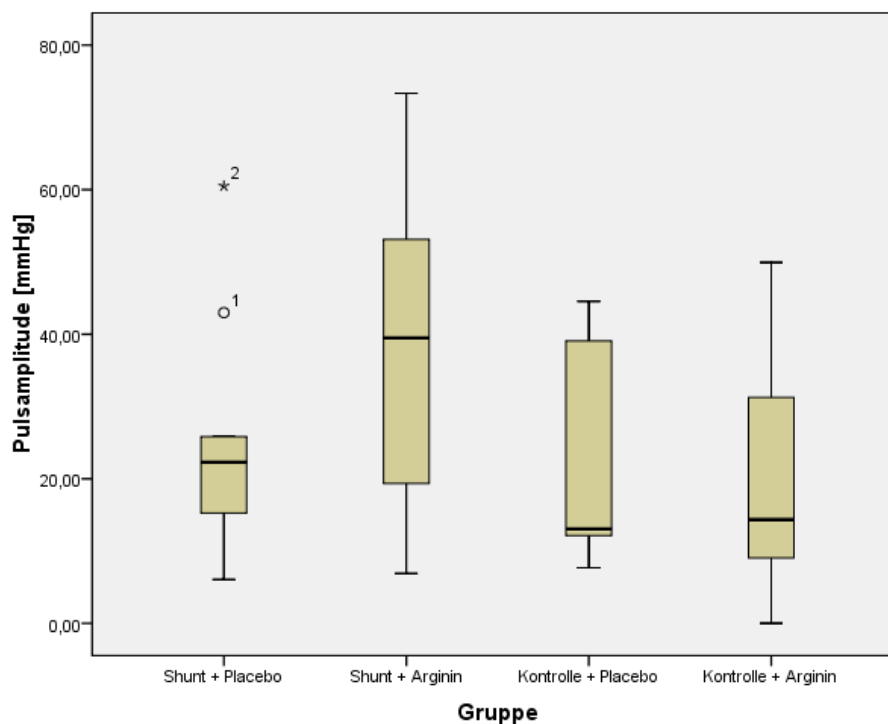
		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz d. Mittelwerte)			
						I	II	III	IV
mSAP [mmHg]**	Mittelwert	43	43	52	43	0,092	>0,99	0,036	>0,99
	SD	8	5	7	6	[-15,93;-1,38]	[-5,57;4,43]	[2,31;14,29]	[-5,95;6,39]

I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo	* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten ** T-Test
II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin	
III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo	
IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo	

Abbildung 4.11 mSAP [mmHg] mit p-Werten der Gruppenvergleiche

4.2.5 Pulsamplitude (PP)

In den vier Gruppenvergleichen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).



PP [mmHg]		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz d. Mediane)			
						I	II	III	IV
Median		22	40	13	14	>0,99	0,172	>0,99	0,700
IQR (25.-75. Perzentile)		15-26	19-55	12-39	9-31	[-16,79;14,6]	[1,28;37,34]	[-16,51;13,61]	[-33,93;5,2]

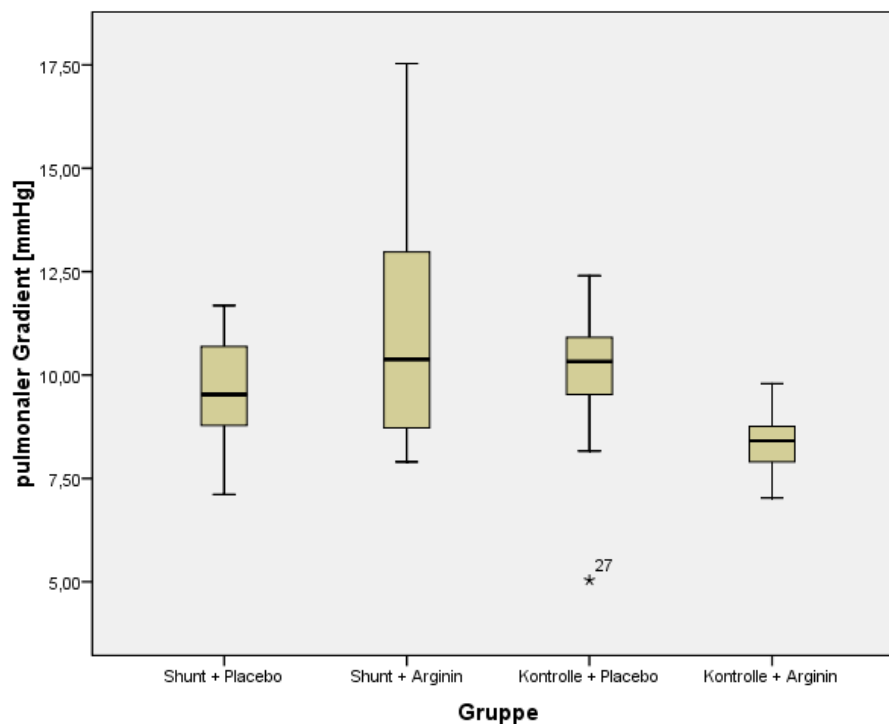
I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo
 II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin
 III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo
 IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo

* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten

Abbildung 4.12 Mittlere PP [mmHg] mit p-Werten der Gruppenvergleiche

4.2.6 Pulmonaler Druckgradient (TPG)

Der TPG ist in der Shunt-Arginin-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Arginin-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$). In den anderen Gruppenvergleichen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).



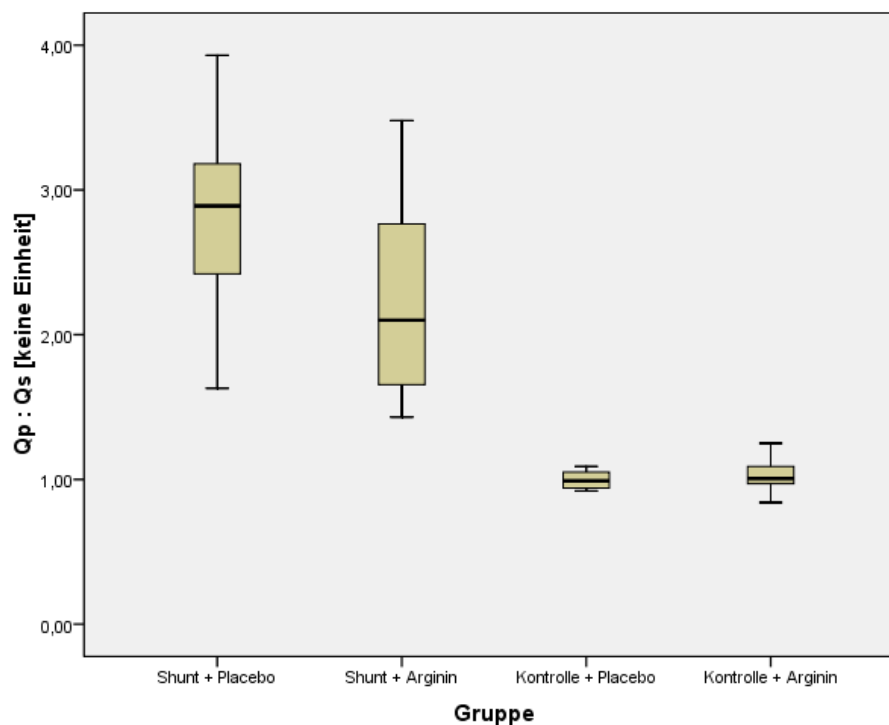
TPG [mmHg]		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz d. Mediane)			
						I	II	III	IV
Median		10	10	10	8	>0,99	0,040	0,088	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	9-11	9-13	10-11	8-9	[-1,96;1,29]	[0,44;4,65]	[0,53;3,28]	[-3,59;0,96]

I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo	* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten
II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin	
III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo	
IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo	

Abbildung 4.13 TPG [mmHg] mit p-Werten der Gruppenvergleiche

4.2.7 Verhältnis von Lungenblutfluss zu systemischem Blutfluss (Qp/Qs)

Das Verhältnis von Qp zu Qs ist in der Shunt-Placebo-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Placebo-Gruppe und in der Shunt-Arginin-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Arginin-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$). In den anderen Gruppenvergleichen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).



		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz d. Mediane)			
						I	II	III	IV
Qp/Qs [keine Einheit]	Median	2,9	2,1	1,0	1,0	0,000	0,000	>0,99	0,380
	IQR (25.-75. Perzentile)	2,4-3,2	1,6-2,8	0,9-1,1	1,0-1,1	[1,33;2,26]	[0,61;1,8]	[-0,09;0,07]	[-0,06;1,26]

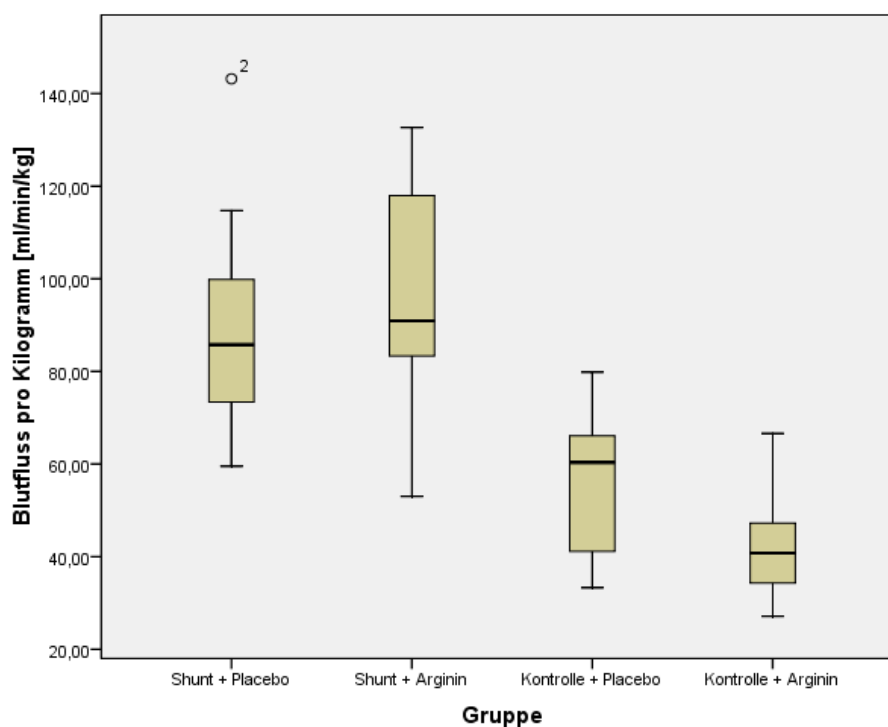
I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo
 II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin
 III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo
 IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo

* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten

Abbildung 4.14 Qp/Qs [keine Einheit] mit p-Werten der Gruppenvergleiche

4.2.8 Blutfluss durch die linke A. pulmonalis (Qlp/kgKG)

Der Qlp/kgKG ist in der Shunt-Placebo-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Placebo-Gruppe und in der Shunt-Arginin-Gruppe gegenüber der Kontrolle-Arginin-Gruppe signifikant erhöht ($p < 0,05$). In den anderen Gruppenvergleichen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).



Qlp/kgKG [ml/min/kg]		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz d. Mediane)			
						I	II	III	IV
Median		85,8	90,9	60,3	40,8	0,008	0,000	0,624	>0,99
	IQR (25.-75. Perzentile)	73,4-99,9	78,7-125,1	41,2-66,1	34,3-47,2	[13,48;55,97]	[36,88;76,11]	[-1,29;28,6]	[-30,53;18,45]

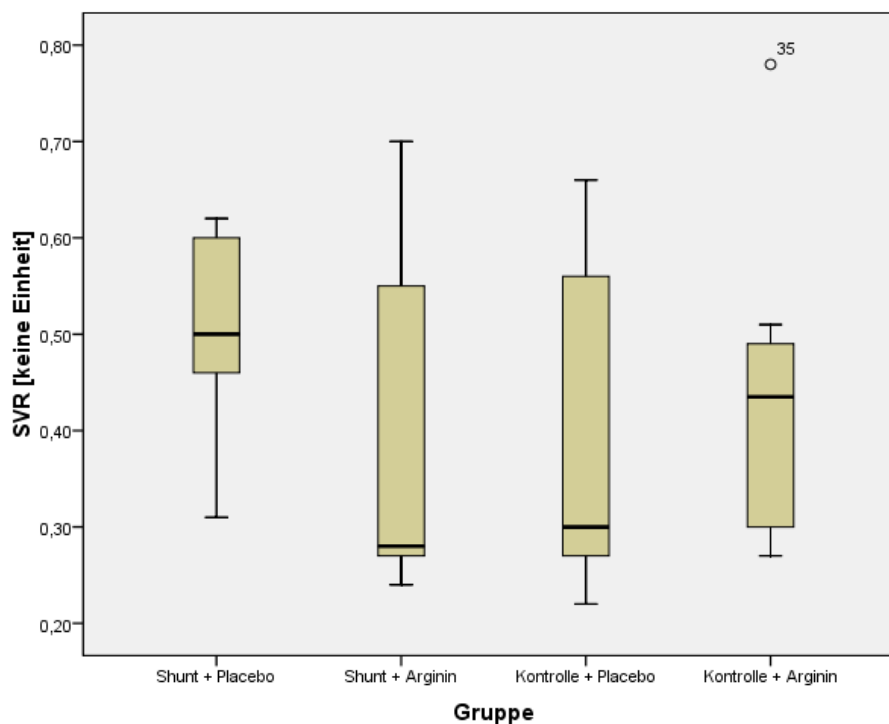
I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo
 II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin
 III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo
 IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo

* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten

Abbildung 4.15 Qlp/kgKG [ml/min/kg] mit p-Werten der Gruppenvergleiche

4.2.9 Systemvaskulärer Widerstand (SVR)

In den vier Gruppenvergleichen ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).



SVR [keine Einheit]		Shunt-Placebo	Shunt-Arginin	Kontrolle-Placebo	Kontrolle-Arginin	p-Wert* (95% KI für die Differenz d. Mediane)			
						I	II	III	IV
	Median	0,5	0,3	0,3	0,4	0,760	>0,99	>0,99	0,584
	IQR (25.-75. Perzentile)	0,5-0,6	0,3-0,6	0,3-0,6	0,3-0,5	[-0,05;0,26]	[-0,21;0,11]	[-0,2;0,14]	[-0,06;0,25]

I: Vergleich Shunt-Placebo - Kontrolle-Placebo II: Vergleich Shunt-Arginin - Kontrolle-Arginin III: Vergleich Kontrolle-Arginin - Kontrolle-Placebo IV: Vergleich Shunt-Arginin - Shunt-Placebo	* entspricht den variablenweise Bonferroni-adjustierten p-Werten
--	--

Abbildung 4.16 SVR [keine Einheit] mit p-Werten der Gruppenvergleiche

5. Diskussion

Ziel dieser Studie war es die hämodynamische Situation im drei Wochen alten Lamm mit angeborenem aortopulmonalen Shunt mit und ohne Gabe von L-Arginin zu beschreiben und zu evaluieren.

Ein Überblick über die ermittelten Daten erbringt eine in dieser Studie nicht nachweisbare L-Arginin-Wirkung auf die drei Wochen alten Shunttiere. Im Gegensatz dazu vermittelt die Aminosäure bei den gleichaltrigen gesunden Kontrolltieren statistisch signifikante Veränderungen der hämodynamischen Parameter mPAP und mSAP ($p < 0,05$). Eine detaillierte Diskussion der einzelnen Ergebnisse findet sich im nun Folgenden.

Bei der genauen Betrachtung der aufgeführten hämodynamischen Parameter ist es notwendig sich deren Unterteilung in direkt gemessene und aus gemessenen Größen errechnete bewusst zu machen. Die Berechnung von PVR und SVR bedient sich physikalischer Gesetze, deren Bedingungen so im tierischen wie menschlichen Organismus nicht vollständig erfüllt werden. Die Interpretierbarkeit dieser Größen ist folglich nur mit Einschränkungen möglich. Auf diese Problematik wird im entsprechenden Abschnitt jeweils genauer eingegangen werden. Die genauesten Werte der hämodynamischen Untersuchung sind somit die durch invasive Messung mittels Druckwandler ermittelten Blutdrücke und der durch Ultraschallsonde gemessene Blutfluss durch die linke PA.

Der Parameter, der am direktesten die Veränderungen bei der Entwicklung einer PH widerspiegelt, weil er das hämodynamische Korrelat der Remodellierungsvorgänge auf struktureller und möglicherweise molekularbiologischer Ebene des pulmonalen Gefäßbetts darstellt, ist der pulmonalvaskuläre Widerstand (PVR). Kapitel 3.3.1 beschreibt, wie er sich als Quotient aus der Differenz von mPAP und mLAP und dem Lungenblutfluss bezogen auf das Körpergewicht errechnen lässt. Da anhand der Ultraschallflusssonde der Blutfluss durch die linke Lunge ermittelt wird, bezieht sich dementsprechend auch der PVR auf den linken Lungenflügel. Auf eine Korrektur wurde auch aufgrund der besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien verzichtet.

Beim Vergleich der Kontrolle-Placebo- mit der Kontrolle-Arginin-Gruppe und der Shunt-Placebo- mit der Shunt-Arginin-Gruppe bezüglich des PVR lässt sich statistisch jeweils kein Unterschied nachweisen ($p > 0,05$). Demnach zeigt L-Arginin bei den Shunttieren keine PVR-senkende Wirkung innerhalb der ersten drei Wochen nach Geburt. Dieses Ergebnis überrascht insofern nicht, als L-Arginin auch den mPAP nicht zu senken vermag. Bei den Kontrolltieren allerdings führt L-Arginin zu einer signifikanten Absenkung des mPAP. Der mLAP verändert sich hingegen nicht signifikant. Damit ist der TPG etwas kleiner, was eventuell auch zu einem leicht verminderten Blutfluss führen könnte ($p > 0,05$). So ließe sich trotz mPAP-Abfall durch L-Arginin die in dieser Studie nicht nachweisbare PVR-Absenkung erklären (siehe Gleichung 3.2).

Im nächsten Schritt wäre nun interessant, ob nach länger bestehendem erhöhten PBF, der in der Placebo-Gruppe bereits einen PVR-Anstieg verursacht, in den Tieren mit L-Arginin-Gabe der PVR auf seinem niedrigen Niveau bleibt.

Diese Information würde Rückschlüsse auf den Anteil der endothelialen Dysfunktion an der Pathogenese der PH erlauben.

Frühere Studien konnten bereits Hinweise auf eine selektive Einschränkung der Endothel-abhängigen pulmonalen Vasodilatation bei erhöhter basaler NO-Aktivität in vier Wochen alten Shuntlämmern liefern [11, 74]. Die erhöhte basale NO-Aktivität wurde dabei hergeleitet aus einer verstärkten Vasokonstriktion als Antwort auf den NOS-Inhibitor LNA (*N* ω -nitro-L-Arginin), einer erhöhten cGMP-Plasmakonzentration, erhöhten eNOS-mRNA und -Proteinlevels. In den acht Wochen alten Shuntlämmern schien hingegen die basale NO-Aktivität nicht mehr hochreguliert zu sein, was den Autor auf eine fortschreitende endotheliale Dysfunktion schließen ließ [10].

Diese Folgerung passt insofern zu unseren hämodynamischen Ergebnissen, als damit zusätzlich der niedrige PVR und die fehlende Reaktion des mPAP/PVR auf die Gabe von L-Arginin erklärt werden könnte. Der Anstieg der eNOS-Genexpression könnte einen frühen Mechanismus der Kompensation eines ansteigenden PVR darstellen. Die immer schwerwiegendere Endothelschädigung durch hohe Scherkräfte könnte den beschriebenen Abfall der NO-Produktion nach acht Wochen zur Folge haben. Der genaue Mechanismus dieses Abfalls und ob dem ein relativer L-Arginin-Mangel zu Grunde liegt, ist noch nicht geklärt.

Wiederum andere Studien befassten sich direkt mit der Rolle von L-Arginin im Zusammenhang mit endothelialer Dysfunktion. Kapitel 2.5 widmet sich ausführlich den Evidenzen für einen gestörten Argininmetabolismus

beziehungsweise dem Nutzen seiner Supplementation [2, 13-15, 20, 29-31, 42, 44, 45, 55, 74, 84, 93, 94, 101].

Wie im Voraus bereits angedeutet, bedient sich die Anwendung physikalischer Gesetze auf diesen Zusammenhang zur Berechnung des PVR einiger Vereinfachungen und Annäherungen, die der direkten Übertragung der gewonnenen Werte in diesem Fall auf das Versuchstier Grenzen setzt.

Sämtlichen Berechnungen der vaskulären Widerstände liegt die hydraulische Abwandlung des Ohmschen Gesetzes (Gleichung 5.1) beziehungsweise das Hagen-Poiseuillesche-Gesetz (Gleichung 5.2) zugrunde.

Gleichung 5.1

$$PVR = \frac{\Delta P}{Q_{lp}}$$

In der hydraulischen Abwandlung des Ohmschen Gesetzes entspricht der Widerstand dem vaskulären Gefäßwiderstand (PVR), die Spannung der Druckdifferenz zwischen arteriellem und venösem Schenkel (ΔP) und der Stromfluss dem Blutfluss pro Minute in der linken PA (Q_{lp}).

Gleichung 5.2

$$Q_{lp} = \frac{\Delta P \pi r^4}{8 \eta l}$$

In Gleichung 5.2 entspricht r dem Gefäßradius, η der Viskosität und l der Gefäßlänge. Formt man das Hagen-Poiseuillesche-Gesetz um und setzt es in Gleichung 5.1 ein, so erhält man folgenden Ausdruck (Gleichung 5.3):

Gleichung 5.3

$$PVR = \frac{8 \eta l}{\pi r^4}$$

Nach Poiseuille sind die Viskosität η und π konstant. Vereinfacht betrachtet ist der PVR beziehungsweise der Quotient aus der Druckdifferenz und dem

Blutfluss demnach umgekehrt proportional zur vierten Potenz des Gefäßradius. Geringe Veränderungen des Gefäßradius, beispielsweise durch Einwirkung vasoaktiver Mediatoren, führen daher bereits zu einer starken Beeinflussung des PVR.

Die Gleichung nach Hagen-Poiseuille trifft für den laminaren und kontinuierlichen Fluss einer Newtonschen Flüssigkeit durch eine starre Röhre mit konstantem Durchmesser zu. In Gefäßen liegen diese Bedingungen so nicht vor. Der Blutfluss ist pulsatil und nicht laminar. Gefäße verlaufen nicht gerade, sondern gewunden und sie verzweigen sich. Das Blut ist keine Newtonsche Flüssigkeit, sondern eine Suspension aus einer Flüssigkeit und korpuskularen Bestandteilen. Zudem ist eben darum die Viskosität des Bluts abhängig vom Hämatokrit, der zum Beispiel bei fetaler Hypoxie oder verzögertem Abklemmen der Nabelschnur erhöht ist. Der PVR steigt bei einer Hämatokriterhöhung nicht linear, sondern logarithmisch an [32]. Desweiteren sind Blutgefäße keine starren Röhren. Ihr Durchmesser ändert sich durch die Pulsation, in Abhängigkeit vom Blutdruck, Sauerstoffpartialdruck und zahlreichen anderen Variablen. Eine Rekrutierung neuer Gefäße bei Anstieg des Blutflusses ist ebenfalls möglich [32].

Da die genannten Einschränkungen der Anwendbarkeit der physikalischen Gesetze auf lebende Organismen aber für alle Versuchstiergruppen gleichermaßen zutreffen, ist ein Vergleich der errechneten Werte durchaus zulässig.

Der von uns errechnete PVR setzt sich aus dem Widerstand der Arterien (PVR_{art}), der Kapillaren (PVR_{kap}) und der Venen (PVR_{ven}) zusammen (Gleichung 5.4). Jeder Summand trägt in etwa gleich zum Gesamt-PVR bei [63].

Hieraus wird deutlich, dass sowohl die Compliance der Gefäße im Verlauf der pulmonalen Strombahn wie auch ihr Gesamtdurchmesser stark variieren [63]. Letzterer ist zentral im Bereich der beiden Lungenarterien noch relativ gering und erreicht ein Höchstmaß auf Kapillarebene [63].

Zudem ist es für die Interpretation des PVR entscheidend, sich genauer mit dem Verzweigungsmuster der Lungengefäße zu befassen. Der Gesamtwiderstand der Lungengefäße lässt sich theoretisch - analog zum Gesamtwiderstand (R) in elektrischen Schaltungen - mit Hilfe der Kirchhoffschen Gesetze (Gleichungen 5.4 und 5.5) für parallel und in Serie geschaltete Widerstandselemente berechnen.

Gleichung 5.4

$$R_{in\ Series} = R_1 + R_2 + \dots + R_n$$

Gleichung 5.5

$$R_{parallel} = \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} + \dots + \frac{1}{R_n}$$

Dabei sind Gefäße aufeinanderfolgender Generationen in Serie und Gefäße der gleichen Generation parallel geschaltet [56].

Bereits mehrere Studien an Lämmern mit erhöhtem PBF konnten von Kontrolllämmern unterschiedliche Verzweigungsmuster der Lungengefäße nachweisen [41, 73]. In drei wie auch in vier Wochen alten Shuntlämmern war die Gesamtquerschnittsfläche der Lungengefäße vergrößert, der PVR unter anderem aufgrund dessen vermindert. Zu dieser Erkenntnis passend fanden Mata-Greenwood et al. in Lämmern mit erhöhtem PBF auch eine erhöhte Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) und dessen Rezeptoren vor [64].

Zusammen mit der passiven Dehnung der Lungengefäße durch die Überdurchblutung der Lunge scheint damit die veränderte Architektur des Gefäßbaums eine Erklärung für den statistisch signifikant verminderten PVR in der Shunt-Placebo- und der Shunt-Arginin-Gruppe im Vergleich mit den entsprechenden Kontrolltiergruppen zu bieten ($p < 0,05$).

In Kindern mit kongenitalen Herzfehlern mit Links-Rechts-Shunt kann der PVR jedoch so stark ansteigen, dass daraus sogar eine Shuntumkehr, eine sogenannte Eisenmenger-Reaktion, resultieren kann (siehe Abbildung 1.1; [98]). Demnach stellt sich die Frage, nach welcher Zeitspanne es im Lammmodell der sich entwickelnden PH zu einem Anstieg des PVR kommen würde. Auch nach acht Wochen scheinen die vaskulären Remodellierungsvorgänge noch nicht so weit fortgeschritten, dass dadurch ein PVR-Anstieg induziert wird [10].

Die Tatsache eines erhöhten mPAP bei noch erniedrigtem PVR in unserem Modell spricht für eine flussbedingte Druckerhöhung in den pulmonalen Arterien, die sekundär durch Veränderungen auf struktureller beziehungsweise molekularbiologischer Ebene einen PVR-Anstieg herbeiführen. Eine Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands könnte für einen weiteren Druckanstieg verantwortlich sein, so dass sich durch die positive Rückkopplung eine Progression der pulmonalen Gefäßerkrankung ergäbe.

Der mittlere pulmonalarterielle Druck (mPAP) fungiert als wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Entwicklung einer pulmonalen Gefäßkrankheit und ist aus diesem Grund auch die primäre Zielgröße dieser Studie. Der PAP wird, wie alle Blutdrücke, invasiv mittels Katheter und daran angeschlossenen Druckwandler kontinuierlich und bei Beatmung des Versuchstiers mit Raumluft gemessen.

Bei Betrachtung der statistischen Vergleichsdaten imponieren die erhöhten mPAP-Werte in der Shunt-Arginin-Gruppe im Gegensatz zur Kontrolle-Arginin-Gruppe ($p < 0,05$). Ein Teil der Erklärung hierfür ist der erhöhte pulmonale Blutfluss in den Tieren mit künstlich geschaffener aortopulmonaler Verbindung. Zum Teil wird wie bereits erwähnt der gesteigerte Blutfluss durch eine Dehnung der Lungengefäße kompensiert, welche zu dem verminderten PVR beitragen könnte. Über dies hinaus allerdings kommt es durch die Überdurchblutung der Lunge zu einer Drucksteigerung in der Pulmonalarterie. Bemerkenswert ist der L-Arginin-Effekt auf die gesunden Kontrollkammern. Die Verabreichung der Aminosäure bewirkt hier eine signifikante Senkung des mPAP ($p < 0,05$). Als Substrat der endothelialen NO-Synthase (eNOS) könnte L-Arginin über die vermehrte Bildung des vasoaktiven NO gefäßerweiternd wirken [33]. Denkbar wäre jedoch auch eine direkt vasodilatatorische beziehungsweise Insulin-vermittelte Wirkung von L-Arginin auf die Lungengefäße [42] oder aber auch eine Vasodilatation durch die Antagonisierung von ADMA [14, 15] oder L-Glutamin [2, 42]. Näheres über bisherige Studien zu L-Arginin findet sich in Kapitel 2.5.

Beim Vergleich der Shunt-Placebo-Gruppe mit der Shunt-Arginin-Gruppe lässt sich jedoch kein L-Arginin-Effekt nachweisen ($p > 0,05$). Möglicherweise ist dies durch den massiv erhöhten PBF zu erklären, der die Lungengefäße in den Tieren mit Links-Rechts-Shunt so stark erweitert, dass eine zusätzliche Vasodilatation durch L-Arginin nicht mehr ins Gewicht fällt oder stattfindet.

Der statistisch signifikante Unterschied zwischen der Shunt-Arginin-Gruppe und der Kontrolle-Arginin-Gruppe bezüglich des mPAP ($p < 0,05$) ist somit wahrscheinlich durch zwei Effekte bedingt: der Erhöhung des mPAP durch den erhöhten PBF in der Shuntgruppe und der Erniedrigung des mPAP in der Kontrollgruppe durch L-Arginin.

Der zweite wichtige Parameter zur Diagnostik einer PH ist der LAP, der in der Routinediagnostik im Menschen dem pulmonalkapillären Verschlussdruck (PCWP) entspricht, der dabei einen Wert von 15 mmHg nicht überschreiten

darf [3]. Der PCWP kann im Rahmen einer Rechtsherzkatheteruntersuchung gemessen werden und ist somit in der klinischen Situation mit geringerem Aufwand ermittelbar als der LAP. Im vorliegenden Modell einer sich entwickelnden PH wurde bei allen Versuchstieren, ebenfalls invasiv und kontinuierlich, der mittlere linksatriale Druck (mLAP) als direktes Korrelat der Belastung des linken Herzens gemessen.

Der mLAP ist in der Shunt-Arginin-Gruppe signifikant höher als in der Kontrolle-Arginin-Gruppe ($p < 0,05$). Hierfür verantwortlich ist der größere Rückfluss von Blut aus der Lunge ins linke Herz, bedingt durch das Shuntvitium und der damit einhergehenden Lungenüberdurchblutung. Wird solch einem Zustand der übermäßigen Volumenbelastung des linken Herzens nicht entgegengewirkt, kann sich aus einer beginnenden Insuffizienz des linken Ventrikels ein ventrikuläres Vorwärtsversagen entwickeln. Ein darauf hindeutender Rückstau des Blutes in die Lunge mit Lungenödem konnte bei der Obduktion der drei Wochen alten Shuntlämmer nicht festgestellt werden. Jedoch ließ sich eine subjektive Vergrößerung des linken Herzens im Sinne einer muskulären Hypertrophie konstatieren, die als Resultat der vermehrten Linksherzbelastung gedeutet werden und der Aufrechterhaltung der linksventrikulären Ejektionsfraktion gedient haben könnte.

Ein erhöhter mLAP bei Herzfehlern mit erhöhtem PBF hat zudem eine Verminderung des transpulmonalen Gradienten (TPG) zur Folge (siehe 3.3.6). Da der TPG, wie später noch genauer erläutert wird, aber Voraussetzung für die Durchblutung der Lunge ist, könnte der erhöhte mLAP eine reflektorische Widerstandserhöhung der Lungengefäße zur Kompensation dieses Zustands mit sich bringen.

Um den Effekt des Links-Rechts-Shunts und von L-Arginin auch außerhalb der pulmonalen Strombahn zu erfassen, gehört der mittlere systemarterielle Druck (mSAP) ebenfalls zu den zu diskutierenden hämodynamischen Parametern. Bemerkenswert ist der statistisch signifikante Abfall des mSAP bei Kontrolltieren bei Gabe von L-Arginin ($p < 0,05$). Diese Drucksenkung im systemischen Kreislauf scheint die Folge der Umsetzung des Substrats L-Arginin durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) in NO im Gefäßendothel zu sein. NO wiederum zieht in der angrenzenden Gefäßmuskulatur eine Relaxation nach sich. Durch die Vasodilatation sinkt der Gefäßwiderstand, was den Blutdruckabfall bedingt.

Bei den Shunttieren zeigt L-Arginin diesen Effekt nicht. Da der systemische Blutfluss im Gegensatz zum Blutfluss der Lunge nicht erhöht ist, sind auch die Gefäße nicht wie in der Lunge vorgedehnt (siehe Besprechung mPAP). Das Potential zur Gefäßerweiterung dürfte demnach noch nicht ausgeschöpft sein. Möglicherweise liegt der Grund für die ausbleibende L-Arginin-Wirkung in der bereits niedrigen Ausgangsposition des mSAP bei den Shunttieren. Eine weitere Absenkung des Blutdrucks bei Tieren mit großem Shunt könnte eventuell in einer kritischen Situation für die Organversorgung münden und unter Umständen auch den Tod der Tiere zur Folge haben. Da die im Beobachtungszeitraum verstorbenen Tiere aufgrund fehlender Daten nicht in die statistische Auswertung mit aufgenommen werden können, könnte dies die Erklärung für den fehlenden Unterschied zwischen Shunt-Placebo- und Shunt-Arginin-Gruppe sein. Wirft man einen Blick auf den Versuchsverlauf, so findet man in der Shunt-Arginin-Gruppe vier im Beobachtungszeitraum verstorbene Tiere, während es in der Shunt-Placebo zwei sind. Aufgrund der geringen Stichprobe kann daraus selbstverständlich noch nicht auf einen kausalen Zusammenhang geschlossen werden.

Die Pulsamplitude, also der Unterschied zwischen systolischen und diastolischen Blutdruckwerten, zeigt in den vier Gruppenvergleichen keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Der Rückfluss von Blut von der Aorta in die Pulmonalarterie durch die künstliche Anastomose während der Diastole scheint die physiologische Windkesselfunktion der Aorta zumindest nicht stark zu beeinflussen.

Einen klinisch höchst relevanten Parameter für Patienten mit erhöhtem PBF stellt der pulmonale Druckgradient (TPG) dar. Dies wird deutlich, wenn man sich zum Beispiel noch einmal die Situation bei funktionell univentrikulären Herzfehlern vor Augen führt. Um eine Durchblutung der Lunge zu gewährleisten, wird bei Kindern mit angeborener Linksherzhypoplasie so bald als möglich nach der Geburt ein (beispielsweise) aortopulmonaler Shunt angelegt. Erst im weiteren Verlauf folgen Operationsschritte, die für eine Trennung von Lungen- und Körperstrombahn sorgen (PCPC, TCPC; siehe Kapitel 1). Kinder, die aufgrund eines größeren künstlich angelegten Shunts erst zu einem späteren Zeitpunkt eine partielle cavopulmonale Anastomose (PCPC) erhielten, hatten im Durchschnitt postoperativ einen etwas höheren TPG, der Einfluss auf die Langzeitprognose haben könne [37]. Im Zustand nach

erfolgter TCPC, also totaler cavopulmonaler Anastomose, fließt das Blut aus den Hohlvenen direkt in die Lunge ohne vorher eine pumpende Herzkammer zu passieren. Ein zu hoher TPG führt zu einem Rückstau des Blutes in das venöse System.

Das Problem eines erhöhten TPG betrifft aber durchaus nicht nur Patienten mit Single Ventricle – Erkrankung. Patienten, deren beispielsweise VSD-bedingter Links-Rechts-Shunt nicht früh genug erkannt und behandelt wurde, haben zum Teil schon strukturelle Veränderungen der pulmonalen Strombahn erfahren und leiden an einer PH. Diese ist definiert als mPAP-Erhöhung bei niedrigem mLAP, also durch einen hohen TPG. Der rechte Ventrikel erfährt durch diesen Umstand eine enorme Druckbelastung, der er auf Dauer bei Progredienz der Erkrankung nicht standhalten kann. Da die Veränderungen der pulmonalen Gefäße irreversibel sind, bleibt in manchen Fällen als letzter Ausweg nur noch eine Transplantation von Herz und Lunge.

Der TPG, der bezogen auf das Ohmsche Gesetz der Spannung entspricht, errechnet sich als Differenz aus mPAP und mLAP (siehe 3.3.6). Die statistische Auswertung der Gruppenvergleiche erbringt folgende Erkenntnisse: Durch den Vergleich der Shunt-Placebo-Gruppe mit der Kontrolle-Placebo-Gruppe, der den Effekt des Shunts zum Vorschein bringt, zeigt sich, dass dieser nach Ablauf von drei Wochen keine Erhöhung des TPG mit sich bringt ($p > 0,05$). Die Konstanz des TPG liegt in der Erhöhung sowohl des mPAP als auch des mLAP bei den Shunttieren begründet. Wie bereits diskutiert, vermag L-Arginin zwar in den Kontrolltieren, jedoch nicht in den Shunttieren den mPAP zu senken. Dementsprechend senkt L-Arginin den TPG auch nur bei den Kontrolltieren ($p > 0,05$), der Unterschied zwischen der Shunt-Arginin- und der Kontrolle-Arginin-Gruppe ist signifikant ($p < 0,05$).

Da mit diesem Tiermodell die Phase der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie bei angeborenen Herzfehlern mit erhöhtem pulmonalem Blutfluss simuliert werden soll, ist ein erhöhter Quotient Q_p/Q_s (Verhältnis aus Lungenblutfluss und Blutfluss durch den systemischen Kreislauf) Einschlusskriterium für Shuntlämmer in diese Studie. Q_p/Q_s muss dabei mindestens einen Wert von 1,4 erreichen (siehe Kapitel 3.5). Dementsprechend sind die Unterschiede in Q_p/Q_s in den Gruppenvergleichen I und II signifikant ($p < 0,05$). Die Werte in den beiden Shuntgruppen streuen von 1,4 bis 3,9. Die Ermittlung des Quotienten ist erst im Rahmen der hämodynamischen Untersuchung drei Wochen nach der Geburt möglich, da hierfür gleichzeitig

Blut aus RV, PA distal des Shunts, LA und Aorta descendens entnommen werden muss. Der Sauerstoffgehalt der Blutproben dient, wie in Gleichung 3.5 beschrieben, der Berechnung von Q_p/Q_s (auch Verhältnis aus Sauerstoffausschöpfung im Lungenkreislauf und im Systemkreislauf). Die Berechnung ist bei Ventilation mit Raumluft, exakt gleichzeitiger Probenentnahme und sofortiger Aufarbeitung der Proben sehr genau [81].

Der absolute Wert des Blutflusses durch die linke Lunge wird mithilfe einer Ultraschallflusssonde bestimmt, die nach stattgehabter Thorakotomie um die linke PA gelegt wird und sich damit distal des aortopulmonalen Shunts befindet. Wie bereits erwähnt, wird dieser Wert auf das jeweilige Körpergewicht des Lamms in Kilogramm bezogen. Dass in den beiden Shunttiergruppen im Durchschnitt ein signifikant höherer $Q_{lp}/kgKG$ vorliegt als in den Kontrolltiergruppen ($p < 0,05$), bestätigt noch einmal die Erfüllung der Voraussetzung zur Simulation des erhöhten PBF bei angeborenen Herzfehlern. Die i.v.-Gabe von L-Arginin scheint bei Lämmern im Alter von drei Wochen, unabhängig vom hämodynamischen Ausgangszustand, den PBF nicht zu beeinflussen (siehe Abb. 4.15).

Letztendlich kann aus den gemessenen hämodynamischen Parametern mSAP, mRAP, $Q_{lp}/kgKG$ und Q_p/Q_s auch der systemvaskuläre Widerstand berechnet werden (siehe Gleichungen 3.6 und 3.7). Dieser unterscheidet sich zwischen Shunt- und Kontrolllämmern nicht ($p > 0,05$) und wird auch durch die Gabe von L-Arginin nicht signifikant beeinflusst ($p > 0,05$).

Während des dreiwöchigen Beobachtungszeitraums nach der Geburt wurden die Lämmer aller Versuchsgruppen täglich körperlich untersucht. Dabei zeigt sich bezüglich des Körpergewichts sowohl am ersten Tag post partum als auch am Tag der hämodynamischen Messungen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen ($p > 0,05$). Abbildung 4.1 zeigt die gleichmäßige stetige Zunahme des jeweils mittleren Körpergewichts in allen vier Versuchsgruppen. Die in anderen Studien beschriebenen Wachstumsstörungen in der Shuntgruppe [73] wurden nicht beobachtet.

Zu beachten ist allerdings, dass in den Kontrollgruppen ca. 70% und in den Shuntgruppen nur ca. 40% der Tiere gleichaltrige Geschwister hatten. Die Erfahrung der Arbeitsgruppe in anderen Versuchsreihen zeigte jedoch Schwankungen des Geburtsgewichts abhängig davon, ob eine Einlings- oder Mehrlingsschwangerschaft vorgelegen hatte. Einlinge hatten dabei tendenziell

ein höheres Geburtsgewicht. Möglicherweise könnte also eine durch die intrauterine Operation bedingte leichte Entwicklungsretardierung der Shuntlämmer durch den höheren Einlingsanteil in diesen Gruppen verdeckt werden.

Um bei der Diskussion der hämodynamischen Parameter Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde die Menge des Lungenblutflusses auf das Körpergewicht der Lämmer bezogen.

Die tägliche Bestimmung von Herz- und Atemfrequenz brachte einen gewissen Unterschied in der Leistungsfähigkeit der Lämmer zu Tage. Dabei differierte die mittlere Herzfrequenz im Vergleich zwischen den Gruppen Shunt-Placebo – Kontrolle-Placebo (Vergleich I) und zwischen den Gruppen Shunt-Arginin – Kontrolle-Arginin (Vergleich II) ($p < 0,05$), wobei die höheren Frequenzen bei den Shunttieren zu finden waren. Der Vergleich der mittleren Atemfrequenzen der 21 Tage post partum zeigte eine signifikant beschleunigte Atmung der Shuntlämmer auf (Gruppenvergleich II; $p < 0,05$).

Die Erhöhung der Herzfrequenz bei den Shunttieren ist durch ihren angeborenen Herzfehler erklärbar. Aufgrund der Rezirkulation des bereits oxygenierten Bluts durch den Lungenkreislauf ist ein höheres Auswurfvolumen des linken Ventrikels vonnöten, um ein ausreichendes Herzminutenvolumen zur Versorgung des Körperkreislaufs aufrechtzuerhalten. Erhöhte Atem- und Herzfrequenz zusammen weisen somit auf die höhere körperliche Belastung der Shunttiere hin.

An dieser Stelle sei noch einmal explizit auf die Einschränkungen bei der Interpretierung der erhobenen Daten hingewiesen. Neben den Vereinfachungen, die für die Errechnung einiger Parameter angenommen werden, gilt es noch weitere Schwächen des Versuchsaufbaus zu beachten [73]. Zum einen betrifft die Intervention beim intrauterinen Anbringen der künstlichen aortopulmonalen Gefäßanastomose die Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen in unterschiedlichem Ausmaß. Zwar sind sowohl Shuntlämmer wie auch deren Zwillinge den Narkosemitteln für die Anästhesie des Muttertiers ausgesetzt, jedoch erleidet nur das Shunttier das Trauma der Thoraxeröffnung. Eine Scheinoperation am Kontrolltier findet nicht zuletzt wegen der schlechteren Zugänglichkeit des weiter unter liegenden Zwillings, sowie der dadurch längeren Narkosedauer nicht statt. Außerdem finden sich in den Kontrollgruppen Tiere, die nicht die Zwillinge operierter Lämmer sind

(sechs Tiere von 19; davon vier in der Kontrolle-Arginin-Gruppe und zwei in der Kontrolle-Placebo-Gruppe).

Die Anlage des aortopulmonalen Shunts könnte zudem bereits pränatal zu einer veränderten hämodynamischen Situation bei den Lammfeten führen. Die physiologische Steigerung des pulmonalen Blutfluss von 4% zu Beginn auf 10% am Ende der Schwangerschaft [79] wird durch die zusätzliche Abflussmöglichkeit von PA zu Aorta möglicherweise abgeschwächt.

Inwieweit unter anderem dadurch die Operation das Shuntlamm in seiner normalen Entwicklung beeinträchtigt, ist nicht vollkommen klar.

Ein weiterer Aspekt, der eventuell die nach drei Wochen Beobachtungszeitraum gemessenen hämodynamischen Werte zu beeinflussen vermag, ist die zur Untersuchung notwendige Narkose der Schafe. Ob die zugeführten Anästhetika den Gefäßtonus vollkommen unbeeinträchtigt lassen, ist schlecht kontrollierbar. Da diese Prozedur aber an jedem Tier vorgenommen wird, ist die Vergleichbarkeit der Werte dennoch gegeben. Es wird darauf geachtet, dass die Lämmer mit einer der Raumluft entsprechenden Sauerstoffkonzentration beatmet werden.

Zu beachten gilt außerdem auch die L-Arginin-Dosierung und das L-Arginin-Verabreichungsintervall, welche natürlich entscheidend für die Nachweisbarkeit eines Effekts sein können. Mit 500 mg/kgKG am Tag wurde eine vergleichsweise hohe Dosierung gewählt. Bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit führten beispielsweise 8 g/d (ebenfalls i.v. verabreicht; entspricht circa 125 mg/kgKG bei einem 65 kg schweren Patienten) bereits zu einer signifikanten Gehstreckenverlängerung [16]. Die Tagesgesamtdosis wurde zur Hälfte morgens und zur Hälfte abends intravenös verabreicht. Die Halbwertszeit von L-Arginin beträgt im Menschen zwischen 0,7 und 1,3 Stunden. Die Länge der Wirkdauer ist nicht genau bekannt.

Trotz seiner Grenzen schafft dieses Modell eine gute Voraussetzung für die Veranschaulichung der Hämodynamik drei Wochen nach der Geburt bei erhöhtem pulmonalem Blutfluss mit und ohne Gabe von L-Arginin.

Zu diesem frühen Zeitpunkt des Bestehens eines Links-Rechts-Shunts herrscht in Shuntlämmern (mit L-Arginin-Gabe) bereits ein signifikant höherer Druck in der Pulmonalarterie als in Kontrolllämmern (mit L-Arginin-Gabe). Da der PVR nach dieser Zeitspanne bei den Shuntlämmern noch erniedrigt ist, scheint der Anstieg des mPAP immer noch flussbedingt zu sein.

L-Arginin bewirkt eine nachweisbare mPAP- und mSAP-Senkung bei den Kontrolltieren, während es bei den gleichaltrigen Shunttieren keinen statistisch signifikanten Effekt zeigt. Interessant wäre eine nochmalige Durchführung des Versuchs mit älteren Lämmern, deren PVR durch eine weiter fortgeschrittene pulmonale Gefäßkrankheit bereits im Anstieg begriffen ist. Möglicherweise manifestiert sich eine durch L-Arginin-Gabe verminderbare endotheliale Dysfunktion erst bei längerfristiger Schädigung des pulmonalen Gefäßendothels durch vermehrte Scherkräfte.

Zur weiteren Erforschung der pathophysiologischen Rolle von L-Arginin bei der Entstehung einer PH bedarf es neben hämodynamischer auch histomorphologischer und molekularbiologischer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Angeborene Herzfehler mit Links-Rechts-Shunt und erhöhtem pulmonalem Blutfluss können die Entwicklung einer pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) bedingen. Die Ursache hierfür sind reaktive Veränderungen in der Lungenstrombahn, die durch die Rezirkulation des bereits oxygenierten pulmonalvenösen Bluts durch die Lunge in Gang gesetzt werden. Das Ausmaß der pathophysiologischen Vorgänge ist dabei abhängig von der Höhe des pulmonalen Blutflusses und damit der Größe des Shunts. Eine endotheliale Dysfunktion der Lungengefäße gilt als mitverantwortlich für die irreversible progrediente Herabsetzung der Gefäßreagibilität.

Für die gezielte Behandlung des Krankheitsbildes der pulmonalarteriellen Hypertonie ist allerdings ein genaueres Verständnis der Pathophysiologie unerlässlich, da nur so Ansatzpunkte für gezielte medizinische Maßnahmen gefunden werden können. Ebenso könnten detaillierte Kenntnisse über den Zeitraum bis zum Auftreten irreversibler Schädigungen der Lungengefäße helfen den günstigsten Zeitpunkt für die Korrektur komplexer Herzfehler mit Links-Rechts-Shunt (z. B. des hypoplastischen Linksherzsyndroms) zu wählen. Die Erforschung des Themenkomplexes PAH dient der Verringerung der krankheitsbezogenen Morbidität und Mortalität und erfolgt im Rahmen dieser Studie anhand eines Tiermodells. Um eine Situation mit signifikant erhöhtem Lungenblutfluss zu schaffen, wurde nach einer bereits etablierten Methode bei 45 Lammfeten intrauterin eine aortopulmonale Gefäßanastomose geschaffen. Nach der Anpassung an das extrauterine Leben führt diese künstliche Gefäßverbindung zu einem Links-Rechts-Shunt.

Ziel dieser Studie ist es die Hämodynamik drei Wochen alter Lämmer mit aortopulmonalen Shunts mit und ohne lebenslanger Gabe von L-Arginin zu untersuchen. Von den 20 in die Studie aufgenommenen Shuntlämmern gehörten elf der Shunt-Arginin- und neun der Shunt-Placebo-Gruppe an. Diese Gruppen wurden jeweils mit einem entsprechenden Kontrollkollektiv aus nicht operierten Lämmern verglichen.

Nachdem in anderen Studien bereits ein gestörter Metabolismus der Aminosäure L-Arginin, Substrat der endothelialen NO-Synthase, nachgewiesen werden konnte, soll nun der Einfluss einer täglichen i.v.-Gabe von L-Arginin auf die pulmonale Hämodynamik in dieser frühen Phase einer sich entwickelnden PAH beleuchtet werden. Sollte sich herausstellen, dass die L-Arginin-Supplementation potentiellen Nutzen verspricht und L-Arginin in der

Krankheitsentstehung eine zentrale Rolle zu spielen scheint, könnte dies der Ausgangspunkt für weitere molekularbiologische Forschung sein.

Bei den hämodynamischen Messungen drei Wochen postnatal ließen sich eine statistisch signifikante Senkung des mittleren pulmonalarteriellen Drucks (mPAP) und des mittleren systemarteriellen Drucks (mSAP) bei den mit L-Arginin behandelten Kontrolltieren verzeichnen. Bei den Shunttieren beeinflusste die tägliche Gabe von L-Arginin die hämodynamischen Parameter nicht signifikant. Der Lungengefäßwiderstand konnte nicht gesenkt werden.

Es gilt allerdings zu bedenken, dass die Vordehnung der Gefäße durch die Lungenüberdurchblutung bei den Shunttieren den vasodilatatorischen Effekt der L-Arginin-Verabreichung überdecken könnte. Die passive Dehnung der Gefäßwand würde auch, zusammen mit der vergrößerten Gesamtquerschnittsfläche der Lungengefäße, den verminderten Lungengefäßwiderstand (PVR) der Shunttiergruppen gegenüber den Kontrolltiergruppen erklären.

Die Tatsache des in unserem Modell noch gesenkten PVR bei den Shunttieren zeigt das Vorliegen einer noch nicht vollständig ausgeprägten PAH an. Vielmehr befinden sich die drei Wochen alten Lämmer mit Links-Rechts-Shunt im Stadium der Entwicklung einer PAH, in dem erhöhte mPAP-Werte durch den erhöhten Blutfluss bedingt sind. Erst die sekundär eintretenden Veränderungen auf struktureller und molekularbiologischer Ebene bewirken vermutlich im weiteren Verlauf den Anstieg des PVR über die Werte bei den Kontrolltieren hinaus. Besonders interessant zu wissen wäre nun, ob zu diesem späteren Zeitpunkt in der Shunt-Arginin-Gruppe der PVR-Anstieg geringer ausgeprägt wäre als in der Shunt-Placebo-Gruppe. Eine solche Erkenntnis würde die Annahme der endothelialen Dysfunktion als entscheidender pathophysiologischer Faktor weiter unterstützen.

Für die Senkung des mSAP bei den Kontrolltieren gilt dieselbe Erklärung wie für den mPAP. Als Substrat der endothelialen NO-Synthese könnte die i.v.-Gabe von L-Arginin über die NO-Freisetzung eine Dilatation der dem Gefäßendothel anliegenden glatten Gefäßmuskulatur bewirken. Durch den Abfall des Gefäßwiderstands kommt es zum Blutdruckabfall.

Der Ausgangswert des mSAP bei den Shunttieren ist aufgrund ihres Herzfehlers möglicherweise etwas niedriger. Eine weitere Absenkung des Blutdrucks könnte eventuell zum Tod der Tiere führen. Da in die statistische Auswertung vor Versuchsende verstorbene Tiere nicht aufgenommen werden

können, könnte das Ausbleiben der mSAP-Senkung durch L-Arginin bei den Shunttieren Ergebnis dieser Verzerrung sein.

Selbstverständlich weist dieses Tiermodell angeborener Herzfehler mit Links-Rechts-Shunt Grenzen auf, die bei der Interpretierung der erhobenen Daten beachtet werden müssen. So ist die Genauigkeit der berechneten Widerstandswerte durch Vereinfachung physikalischer Gesetze eingeschränkt. Fehlende intrauterine Scheinoperation der Kontrolltiere, mögliche Beeinflussung der intrauterinen Zirkulation beim Shunttier und Anästhesie während der hämodynamischen Untersuchung stellen eventuell weitere Störfaktoren dar. Eine zu hohe bzw. zu niedrige Dosierung von L-Arginin könnte ebenfalls die Bedeutung der Ergebnisse verfälschen.

Trotzdem gibt die vorliegende Studie Einblick in die Entwicklung einer PAH bei drei Wochen alten Lämmern mit angeborenem aortopulmonalen Shunt und die Rolle von L-Arginin dabei, gemessen am Ansprechen der hämodynamischen Parameter auf die Verabreichung der Aminosäure.

Versuche an Lämmern mit bereits länger andauernder Schädigung des pulmonalen Gefäßepithels durch vermehrte Scherkräfte könnten zur weiteren Aufklärung der Krankheitsentstehung insofern dienen, als sich eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion möglicherweise erst bei erhöhtem PVR manifestiert. Neben weiteren hämodynamischen Untersuchungen würde parallel dazu durchgeführte histomorphologische und molekularbiologische Forschung sicherlich das Verständnis des Krankheitsbildes der PAH zusätzlich erweitern.

7. Literaturverzeichnis

1. Arnal, J.F., Dinh-Xuan, A.T., Pueyo, M., Darblade, B. and Rami, J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell. Mol. Life Sci.* 55 (1999) 1078–1087.
2. Arnal, J.F., Münzel, T., Venema, R.C., James, N.L., Bai, C.L., Mitch, W.E. and Harrison, D.G. Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability. *J Clin Invest.* . 95 (1995) 2565-2572.
3. Badesch, D.B., Champion, H.C., Sanchez, M.A., Hoeper, M.M., Loyd, J.E., Manes, A., McGoon, M., Naeije, R., Olschewski, H., Oudiz, R.J., and Torbicki, A. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 54 (2009) S55-66.
4. Bancalari, E., Claure, N. and Gonzalez, A. Patent ductus arteriosus and respiratory outcome in premature infants. *Biol Neonate.* 88 (2005) 192-201.
5. Baron, A.D. Hemodynamic actions of insulin. *Am J Physiol.* . 267 (1994) 187-202.
6. Barst, R.J., Gibbs, J.S.R., Hossein, A.G., Hoeper, M.M., McLaughlin, V.V., Rubin, L.J., Sitbon, O., Tapson, V.F. and Galiè, N. Updated Evidence-Based Treatment Algorithm in Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 54 (2009) 78–84.
7. Beghetti, M., Barst, R.J., Naeije, R. and Rubin, L.J. *Pulmonary Arteriel Hypertension Related to Congenital Heart Disease.* 1 ed. (2006), München: Elsevier GmbH.
8. Bender, R., Lange, S. and Ziegler, A. Multiples Testen. *Dtsch. Med. Wschr.* . 132 (2007) 26-29.
9. Black, S.M., Bekker, J.M., Johengen, M.J., Parry, A.J., Soifer, S.J. and Fineman, J.R. Altered regulation of the ET-1 cascade in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Pediatr Res.* 47 (2000) 97-106.
10. Black, S.M., Bekker, J.M., McMullan, D.M., Parry, A.J., Ovadia, B., Reinhartz, O., Lakshminrushimha, S., Mata-Greenwood, E., Steinhorn,

- R.H. and Fineman, J.R. Alterations in nitric oxide production in 8-week-old lambs with increased pulmonary blood flow. *Pediatr Res.* 52 (2002) 233-244.
11. Black, S.M., Fineman, J.R., Steinhorn, R.H., Bristow, J. and Soifer, S.J. Increased endothelial NOS in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 275 (1998) H1643-1651.
 12. Black, S.M., Johengen, M.J., Ma, Z.D., Bristow, J. and Soifer, S.J. Ventilation and oxygenation induce endothelial nitric oxide synthase gene expression in the lungs of fetal lambs. *J Clin Invest.* 100 (1997) 1448-1458.
 13. Block, E.R., Herrera, H. and Couch, M. Hypoxia inhibits L-arginine uptake by pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol.* . 269 (1995) 574-580.
 14. Böger, R.H. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovascular Res.* 59 (2003) 824–833.
 15. Böger, R.H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr.* . 134 (2004) 2842-2847.
 16. Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Thiele, W., Creutzig, A., Alexander, K. and Frölich, J.C. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol.* . 32 (1998) 1336-1344.
 17. Brickner, M.E., Hillis, L.D. and Lange, R.A. Congenital heart disease in adults. First of two parts. . *N Engl J Med.* 342 (2000) 256-263.
 18. Brickner, M.E., Hillis, L.D. and Lange, R.A. Congenital heart disease in adults. Second of two parts. *N Engl J Med.* 342 (2000) 334-342.
 19. Burrows, F.A., Klinck, J.R., Rabinovitch, M. and Bohn, D.J. Pulmonary hypertension in children: perioperative management. *Can Anaesth Soc J.* 33 (1986) 606-628.
 20. Carville, C., Raffestin, B., Eddahibi, S., Blouquit, Y. and Adnot, S. Loss of endothelium-dependent relaxation in proximal pulmonary arteries from rats exposed to chronic hypoxia: effects of in vivo and in vitro supplementation with L-arginine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 22 (1993) 889-896.

21. Celermajer, D.S., Cullen, S. and Deanfield, J.E. Impairment of endothelium-dependent pulmonary artery relaxation in children with congenital heart disease and abnormal pulmonary hemodynamics. *Circulation*. 87 (1993) 440-446.
22. Celermajer, D.S., Dollery, C., Burch, M. and Deanfield, J.E. Role of endothelium in the maintenance of low pulmonary vascular tone in normal children. *Circulation*. 89 (1994) 2041-2044.
23. Chesney, C.F. and Allen, J.R. Animal model: pulmonary hypertension, cor pulmonale and endocardial fibroelastosis in monocrotaline-intoxicated nonhuman primates. *Am J Pathol*. 70 (1973) 489-492.
24. Chin, K.M. and Rubin, L.J. Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 51 (2008) 1527-1538.
25. Cooper, C.J., Landzberg, M.J., Anderson, T.J., Charbonneau, F., Creager, M.A., Ganz, P. and Selwyn, A.P. Role of Nitric Oxide in the Local Regulation of Pulmonary Vascular Resistance in Humans. *Circulation*. 93 (1996) 266-271.
26. Cornfield, D.N., Chatfield, B.A., McQueston, J.A., McMurtry, I.F. and Abman, S.H. Effects of birth-related stimuli on L-arginine-dependent pulmonary vasodilation in ovine fetus. *Am J Physiol*. 262 (1992) H1474-1481.
27. D'Aliento, L., Somerville, J., Presbitero, P., Menti, L., Brach-Prever, S., Rizzoli, G. and Stone, S. Eisenmenger syndrome. Factors relating to deterioration and death. *Eur Heart J*. 19 (1998) 1845-1855.
28. Dawes, G.S. Pulmonary circulation in the foetus and new-born. *Br Med Bull*. 22 (1966) 61-65.
29. Durante, W., Johnson, F.K. and Johnson, R.A. Arginase a critical regulator of NO synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. . 34 (2007) 906-911.
30. Eddahibi, S., Adnot, S., Carville, C., Blouquit, Y. and Raffestin, B. L-arginine restores endothelium-dependent relaxation in pulmonary circulation of chronically hypoxic rats. *Am J Physiol*. 263 (1992) 194-200.
31. Fineman, J.R., Chang, R. and S.J., S. L-Arginine, a precursor of EDRF in vitro, produces pulmonary vasodilation in lambs. *Am. J. Physiol*. 261 (1991) H1563-1569.

32. Fineman, J.R., Soifer, S.J. and Heymann, M.A. Regulation of pulmonary vascular tone in the perinatal period. *Annu Rev Physiol.* 57 (1995) 115-134.
33. Fiscus, R.R. Molecular mechanisms of endothelium-mediated vasodilation. *Semin Thromb Hemost.* 14 (1988) 12-22.
34. Fishman, N.H., Hof, R.B., Rudolph, A.M. and Heymann, M.A. Models of congenital heart disease in fetal lambs. *Circulation.* 58 (1978) 354-364.
35. Forstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. and Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension.* 23 (1994) 1121-1131.
36. Franklin, K.J., Barclay, A.E. and Prichard, M.M. Some observations on the cardio-vascular system in the viable foetal lamb. *J Anat.* 75 (1940) 75-87.
37. Fratz, S., Fineman, J.R., Görlach, A., Sharma, S., Oishi, P., Schreiber, C., Kietzmann, T., Adatia, I., Hess, J. and Black, S.M. Early determinants of pulmonary vascular remodeling in animal models of complex congenital heart disease. *Circulation.* 123 (2011) 916-923.
38. Fratz, S., Meyrick, B., Ovadia, B., Johengen, M.J., Reinhartz, O., Azakie, A., Ross, G., Fitzgerald, R., Oishi, P., Hess, J., Black, S.M., and Fineman, J.R. Chronic endothelin A receptor blockade in lambs with increased pulmonary blood flow and pressure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287 (2004) L592-597.
39. Furchgott, R.F. and Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J.* 3 (1989) 2007-2018.
40. Gersony, W.M., Hayes, C.J., Driscoll, D.J., Keane, J.F., Kidd, L., O'Fallon, W.M., Pieroni, D.R., Wolfe, R.R. and Weidman, W.H. Second natural history study of congenital heart defects. Quality of life of patients with aortic stenosis, pulmonary stenosis, or ventricular septal defect. *Circulation.* 87 (1993) I52-65.
41. Ghorishi, Z., Milstein, J.M., Poulain, F.R., Moon-Grady, A., Tacy, T., Bennett, S.H., Fineman, J.R. and Eldridge, M.W. Shear stress paradigm for perinatal fractal arterial network remodeling in lambs with pulmonary hypertension and increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292 (2007) H3006-3018.

42. Giugliano, D., Marfella, R., Verrazzo, G., Acampora, R., Coppola, L., Cozzolino, D. and D'Onofrio, F. The vascular effects of L-Arginine in humans. The role of endogenous insulin. *J Clin Invest.* . 99 (1997) 433-438.
43. Gorenflo, M., Herpel, E., Ullmann, M.V., Rohlig, K., Demirakca, S., Klimpel, H., Hagl, S., Gebhard, M.M. and Schnabel, P.A. Pulmonary vascular changes in piglets with increased pulmonary blood flow and pressure. *Virchows Arch.* 450 (2007) 643-652.
44. Gorenflo, M., Zheng, C., Werle, E., Fiehn, W. and Ulmer, H.E. Plasma levels of asymmetrical dimethyl-L-arginine in patients with congenital heart disease and pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 37 (2001) 489-492.
45. Harrison, D.G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest.* 100 (1997) 2153-2157.
46. Haworth, S.G. Pulmonary hypertension in childhood. *Eur Respir J.* 6 (1993) 1037-1043.
47. Haworth, S.G. Role of the endothelium in pulmonary arterial hypertension. *Vascul Pharmacol.* 45 (2006) 317-325.
48. Henquin, J.C. and Meissner, H.P. Effects of amino acids on membrane potential and $^{86}\text{Rb}^+$ fluxes in pancreatic B-cells. *Am J Physiol.* 240 (1981) 245-252.
49. Herget, J. and Palecek, F. Experimental chronic pulmonary hypertension. *Int Rev Exp Pathol.* 18 (1978) 347-406.
50. Hess, J. Long-term problems after cavopulmonary anastomosis: diagnosis and management. *Thorac Cardiovasc Surg.* 49 (2001) 98-100.
51. Heymann, M.A. Control of the pulmonary circulation in the fetus and during the transitional period to air breathing. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 84 (1999) 127-132.
52. Heymann, M.A. and Rudolph, A.M. Effect of exteriorization of the sheep fetus on its cardiovascular function. *Circ Res.* 21 (1967) 741-745.
53. Heymann, M.A. and Soifer, S.J. Control of the fetal and neonatal pulmonary circulation, in *Pulmonary Vascular Physiology and Pathophysiology*, E.K. Weir and J.T. Reeves, Editors. (1989), Marcel-Dekker: New York. p. 33-50.

54. Hoffman, J.I., Rudolph, A.M. and Heymann, M.A. Pulmonary vascular disease with congenital heart lesions: pathologic features and causes. *Circulation*. 64 (1981) 873-877.
55. Howell, K., Costello, C.M., Sands, M., Dooley, I. and McLoughlin, P. L-Arginine promotes angiogenesis in the chronically hypoxic lung: a novel mechanism ameliorating pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 296 (2009) L1042-1050.
56. Huang, W., Yen, R.T., McLaurine, M. and Bledsoe, G. Morphometry of the human pulmonary vasculature. *J Appl Physiol*. 81 (1996) 2123-2133.
57. Humbert, M., Morrell, N.W., Archer, S.L., Stenmark, K.R., MacLean, M.R., Lang, I.M., Christman, B.W., Weir, E.K., Eickelberg, O., Voelkel, N.F., and Rabinovitch, M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 43 (2004) 13S-24S.
58. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. and Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 84 (1987) 9265-9269.
59. Iwamoto, H.S., Teitel, D. and Rudolph, A.M. Effects of birth-related events on blood flow distribution. *Pediatr. Res*. 22 (1987) 634-640.
60. Kidd, L., Driscoll, D.J., Gersony, W.M., Hayes, C.J., Keane, J.F., O'Fallon, W.M., Pieroni, D.R., Wolfe, R.R. and Weidman, W.H. Second natural history study of congenital heart defects. Results of treatment of patients with ventricular septal defects. *Circulation*. 87 (1993) 138-151.
61. Kirshbom, P.M., Jacobs, M.T., Tsui, S.S., DiBernardo, L.R., Schwinn, D.A., Ungerleider, R.M. and Gaynor, J.W. Effects of cardiopulmonary bypass and circulatory arrest on endothelium-dependent vasodilation in the lung. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 111 (1996) 1248-1256.
62. Lipsitz, E.C., Weinstein, S., Smerling, A.J. and Stolar, C.J. Endogenous nitric oxide and pulmonary vascular tone in the neonate. *J Pediatr Surg*. 31 (1996) 137-140.
63. Mandegar, M., Fung, Y.C., Huang, W., Remillard, C.V., Rubin, L.J. and Yuan, J.X. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res*. 68 (2004) 75-103.
64. Mata-Greenwood, E., Meyrick, B., Soifer, S.J., Fineman, J.R. and Black, S.M. Expression of VEGF and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR is altered

- in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 285 (2003) L222-231.
65. McMullan, D.M., Bekker, J.M., Parry, A.J., Johengen, M.J., Kon, A., Heidersbach, R.S., Black, S.M. and Fineman, J.R. Alterations in endogenous nitric oxide production after cardiopulmonary bypass in lambs with normal and increased pulmonary blood flow. *Circulation.* 102 (2000) III172-178.
66. Moncada, S. and Higgs, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 329 (1993) 2002-2012.
67. Norwood, W.I., Lang, P. and Hansen, D.D. Physiologic repair of aortic atresia-hypoplastic left heart syndrome. *N Engl J Med.* 308 (1983) 23-26.
68. Oishi, P., Azakie, A., Harmon, C., Fitzgerald, R.K., Grobe, A., Xu, J., Hendricks-Munoz, K., Black, S.M. and Fineman, J.R. Nitric oxide-endothelin-1 interactions after surgically induced acute increases in pulmonary blood flow in intact lambs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290 (2006) H1922-1932.
69. Oishi, P.E., Wiseman, D.A., Sharma, S., Kumar, S., Hou, Y., Datar, S.A., Azakie, A., Johengen, M.J., Harmon, C., Fratz, S., Fineman, J.R., and Black, S.M. Progressive dysfunction of nitric oxide synthase in a lamb model of chronically increased pulmonary blood flow: a role for oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 295 (2008) L756-766.
70. Ovadia, B., Reinhartz, O., Fitzgerald, R., Bekker, J.M., Johengen, M.J., Azakie, A., Thelitz, S., Black, S.M. and Fineman, J.R. Alterations in ET-1, not nitric oxide, in 1-week-old lambs with increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284 (2003) H480-490.
71. Palmer, R.M., Ashton, D.S. and Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333 (1988) 664-666.
72. Rabinovitch, M., Keane, J.F., Norwood, W.I., Castaneda, A.R. and Reid, L. Vascular structure in lung tissue obtained at biopsy correlated with pulmonary hemodynamic findings after repair of congenital heart defects. *Circulation.* 69 (1984) 655-667.
73. Reddy, V.M., Meyrick, B., Wong, J., Khor, A., Liddicoat, J.R., Hanley, F.L. and Fineman, J.R. In utero placement of aortopulmonary shunts. A model of postnatal pulmonary hypertension with increased pulmonary blood flow in lambs. *Circulation.* 92 (1995) 606-613.

74. Reddy, V.M., Wong, J., Liddicoat, J.R., Johengen, M., Chang, R. and Fineman, J.R. Altered endothelium-dependent responses in lambs with pulmonary hypertension and increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol.* 271 (1996) H562-570.
75. Reddy, V.M., Wong, J., Liddicoat, J.R., Johengen, M., Chang, R. and Fineman, J.R. Altered endothelium-dependent responses in lambs with pulmonary hypertension and increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol.* 271 (1996) H562-570.
76. Rosenkrantz, J.G., Carlisle, J.H., Lynch, F.P. and Vogel, J.H. Ligation of a single pulmonary artery in the pig: a model of chronic pulmonary hypertension. *J Surg Res.* 15 (1973) 67-73.
77. Rosenkranz, S. Pulmonary hypertension: current diagnosis and treatment. *Clin Res Cardiol.* 96 (2007) 527-541.
78. Rudolph, A. *Congenital Diseases of the Heart. Vol. 1.* (1975): Year Bk. Med. Pub. 646.
79. Rudolph, A.M. The changes in the circulation after birth. Their importance in congenital heart disease. *Circulation.* 41 (1970) 343-359.
80. Rudolph, A.M. Distribution and regulation of blood flow in the fetal and neonatal lamb. *Circ Res.* 57 (1985) 811-821.
81. Rudolph, A.M. *Congenital Diseases of the Heart: Clinical-Physiological Considerations*, ed. A. Rudolph. Vol. 2. (2001): Futura Publishing Company, New York.
82. Rudolph, A.M. and Yuan, S. Response of the pulmonary vasculature to hypoxia and H⁺ ion concentration changes. *J. Clin. Invest.* 45 (1966) 399-411.
83. Sano, S., Ishino, K., Kawada, M., Arai, S., Kasahara, S., Asai, T., Masuda, Z.-i., Takeuchi, M. and Ohtsuki, S.-i. Right ventricle-pulmonary artery shunt in first-stage palliation of hypoplastic left heart syndrome. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 126 (2003) 504-509.
84. Sharma, S., Kumar, S., Sud, N., Wiseman, D.A., Tian, J., Rehmani, I., Datar, S., Oishi, P., Fratz, S., Venema, R.C., Fineman, J.R., and Black, S.M. Alterations in lung arginine metabolism in lambs with pulmonary hypertension associated with increased pulmonary blood flow. *Vascular Pharmacology.* 51 (2009) 359-364.

85. Shaul, P.W., Farrar, M.A. and Magness, R.R. Oxygen modulation of pulmonary arterial prostacyclin synthesis is developmentally regulated. *Am. J. Physiol.* 265 (1993) H621-628.
86. Shaul, P.W., Farrar, M.A. and Zellers, T.M. Oxygen modulates endothelium-derived relaxing factor production in fetal pulmonary arteries. *Am. J. Physiol.* 262 (1992) H355-364.
87. Simonneau, G., Robbins, I.M., Beghetti, M., Channick, R.N., Delcroix, M., Denton, C.P., Elliott, C.G., Gaine, S.P., Gladwin, M.T., Jing, Z., Krowka, M.J., Langleben, D., Nakanishi, N., and Souza, R. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 54 (2009) S43-54.
88. Sinaiko, A.R., Lauer, R.M. and Sanders, S.P. End points for cardiovascular drug trials in pediatric patients. *Am Heart J.* 142 (2001) 229-232.
89. Stamler, J.S., Loh, E., Roddy, M.A., Currie, K.E. and Creager, M.A. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation.* 89 (1994) 2035-2040.
90. Steidl, M.F. Die Hämodynamik drei Tage alter Lämmer nach intrauteriner Anlage eines aortopulmonalen Shunts, in Fakultät für Medizin. (2009), Technische Universität München München. p. 95.
91. Steinhorn, R.H., Russell, J.A., Lakshminrusimha, S., Gugino, S.F., Black, S.M. and Fineman, J.R. Altered endothelium-dependent relaxations in lambs with high pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280 (2001) H311-317.
92. Stumper, O. Hypoplastic left heart syndrome. *Heart.* 96 (2010) 231-236.
93. Su, Y. and Block, E.R. Hypoxia inhibits L-arginine synthesis from L-citrulline in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol.* . 269 (1995) 581-587.
94. Tan, X., Sun, W.D., Li, J.C., Pan, J.Q., Liu, Y.J., Wang, J.Y. and Wang, X.L. L-arginine prevents reduced expression of endothelial nitric oxide synthase (NOS) in pulmonary arterioles of broilers exposed to cool temperatures. *Vet J.* . 173 (2007) 151-157.
95. Thistlethwaite, P.A., Lee, S.H., Du, L.L., Wolf, P.L., Sullivan, C., Pradhan, S., Deutsch, R. and Jamieson, S.W. Human angiopoietin gene expression is a marker for severity of pulmonary hypertension in patients

- undergoing pulmonary thromboendarterectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* . 122 (2001) 65-73.
96. Tiktinsky, M.H., Cummings, J.J. and Morin, F.C.r. Acetylcholine increases pulmonary blood flow in intact fetuses via endothelium-dependent vasodilation. *Am J Physiol.* 262 (1992) H406-410.
97. Vallance, P., Collier, J. and Moncada, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet.* 2 (1989) 997-1000.
98. Vongpatanasin, W., Brickner, M.E., Hillis, L.D. and Lange, R.A. The Eisenmenger syndrome in adults. *Ann Intern Med.* 128 (1998) 745-755.
99. Wessel, D.L. Current and future strategies in the treatment of childhood pulmonary hypertension. *Progress in Pediatric Cardiology.* 12 (2001) 289-318.
100. Wood, P. The Eisenmenger syndrome or pulmonary hypertension with reversed central shunt. *Br Med J.* 2 (1958) 755-762.
101. Xu, W., Kaneko, F.T., Zheng, S., Comhair, S.A., Janocha, A.J., Goggans, T., Thunnissen, F.B., Farver, C., Hazen, S.L., Jennings, C., Dweik, R.A., Arroliga, A.C., and Erzurum, S.C. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEB J.* . 18 (2004) 1746-1748.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. John Hess für die Überantwortung des Themas dieser Dissertation, seine fundierten Anregungen im Lauf der Untersuchung und die Förderung meiner Arbeit. Er gab mir die Möglichkeit in seiner Forschungseinrichtung im Deutschen Herzzentrum München wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen.

Ebenso danken möchte ich Herrn PD Dr. Sohrab Fratz für die fachliche Betreuung und seine Begleitung bei der Überwindung immer neuer Herausforderungen im Dissertationsprozess, die auch – wie ich glaube – zu meiner persönlichen Weiterentwicklung beigetragen haben. Durch seine eigene Motivation bekräftigte er meinen Enthusiasmus mich in dieses spannende Thema zu vertiefen.

Für die Koordination des Versuchsaufbaus und die praktische Umsetzung des Projekts setzten sich Frau Susanne Naumann, Frau Judith Reiser sowie Herr Dr. Sebastian Haag mit großartigem Engagement ein. Dankeschön. Ihr veterinärmedizinisches Wissen war Voraussetzung für das Gelingen der Versuche. Dank ihrer Aufgeschlossenheit und Positivität gelang es in der Arbeitsgruppe aus Betreuern und Doktoranden ein von großer Herzlichkeit geprägtes Klima zu schaffen. Die freundschaftliche Zusammenarbeit zwischen den Teammitgliedern war für mich eine sehr bereichernde Erfahrung.

Zudem möchte ich meiner Doktorandenkollegin und meinen Doktorandenkollegen Ekatharina Kusmenkov, Josef Auer, Benjamin Göbel und Moritz Baquet für die gute Zusammenarbeit, die produktiven aber auch die geselligen gemeinsamen Stunden danken.

Die Kooperation zwischen der Klinik für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler und der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Deutschen Herzzentrums München sowie dem Zentrum für Präklinische Forschung am Klinikum rechts der Isar der TU München war eine wichtige Voraussetzung für die Arbeit unserer Gruppe. So danke ich allen Beteiligten dieser Einrichtungen, die unser Projekt unterstützend begleiteten. Insbesondere Herrn PD Dr. Christian Schreiber und Herrn Dr. Zsolt Prodán gebührt für das Einbringen ihres chirurgischen Geschicks und ihre zeitliche Flexibilität mein großer Dank.

Meinen Eltern, meinem Freund Benedikt Hofmann und seiner Familie möchte ich für die zahlreichen, den Blick öffnenden Diskussionen danken. Ihr Beistand und ihre Ermunterung sind für mich auch eine belastbare Basis für meine Projekte.