

Aus dem
Institut für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

angefertigt im
Deutschen Herzzentrum München
Klinik für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler
Direktor: Prof. Dr. John Hess

und im
Zentrum für präklinische Forschung
der Technischen Universität München
des Klinikums Rechts der Isar München
Vorstand: Prof. Dr. Markus Schweiger

Angefertigt unter der Leitung von: Prof. Dr. Wolfgang Schmahl

**Wirkung von Furosemid auf das pulmonale Gefäßbett von drei Wochen
alten Lämmern mit intrauteriner Anlage eines großen aortopulmonalen
Shunts**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Sebastian Haag
aus München

München, 2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Schmahl
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Breuer

Tag der Promotion: 13.02.2010

Für meinen Bruder

Tobias Haag

17.10.1974 - 17.04.2006

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	8
1.1	Pulmonale Hypertonie (PH)	10
1.1.1	Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH).....	12
1.2	Furosemid	14
1.3	Fragestellung	18
1.4	Zielsetzung.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN	20
2.1	Versuchstiere	20
2.2	Tiermodell	23
2.3	Experimentelles Vorgehen	25
2.3.1	Anästhesie der Mutterschafe.....	25
2.3.2	Operationsvorbereitung	27
2.3.3	Chirurgisches Vorgehen	27
2.3.4	Postoperative Versorgung der Muttertiere	31
2.3.5	Postnatale Versorgung der Lämmer	32
2.3.6	Anästhesie der Lämmer	33
2.3.7	Vorbereitung der hämodynamischen Untersuchung der Lämmer	34
2.3.8	Hämodynamische Untersuchung der 3 Wochen alten Lämmer.....	36
2.3.9	Blutproben	38
2.3.10	Euthanasie der Versuchstiere	38
2.4	Untersuchte Parameter	39
2.4.1	Mittlerer pulmonalarterieller Druck (mPAP).....	39
2.4.2	Mittlerer linksatrialer Druck (mLAP).....	39
2.4.3	Mittlerer rechtsatrialer Druck (mRAP).....	39
2.4.4	Systemarterieller Druck (SAP).....	39
2.4.5	Pulsamplitude (pulseP).....	40
2.4.6	Verhältnis von mPAP : mSAP	40
2.4.7	Pulmonaler Druckgradient (pulm. gradient).....	40
2.4.8	Herzfrequenz (HR).....	40
2.4.9	Blutfluss der Lunge (Q_{PA} , Q_{PA}/kg).....	40
2.4.10	Pumonalkulärer Widerstand (PVR).....	41
2.4.11	Systemvaskulärer Widerstand (SVR)	41
2.4.12	Verhältnis Lungenblutfluss : Systemblutfluss ($Q_p:Q_s$).....	41
2.4.13	pH-Wert (pH)	42

2.5	Statistische Verfahren	42
2.5.1	Berechnungen	42
2.5.2	Grafische Veranschaulichung.....	43
2.6	Ausschlusskriterien	45
3	EIGENE ERGEBNISSE	46
3.1	Körpergewicht	47
3.2	Tägliche Untersuchungen	48
3.2.1	Herzfrequenz (HR).....	48
3.2.2	Atemfrequenz (RR).....	49
3.3	Hämodynamische Messungen	50
3.3.1	Mittlerer Pulmonalarteriendruck (mPAP)	50
3.3.2	Verhältnis von mPAP : mSAP	51
3.3.3	Pulmonaler Druckgradient (mPAP – mLAP)	52
3.3.4	Blutfluss Lunge / Körpergewicht (Q / kgKG).....	53
3.3.5	Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR).....	54
3.3.6	Lungenblutfluss : Systemblutfluss (Qp : Qs)	55
3.3.7	Mittlerer Blutdruck im linken Vorhof (mLAP)	56
3.3.8	Mittlerer Blutdruck im rechten Vorhof (mRAP)	57
3.3.9	Systemvaskulärer Widerstand (SVR)	58
3.3.10	Mittlerer systemarterieller Blutdruck (mSAP)	59
3.3.11	Diastolischer systemarterieller Blutdruck (dSAP).....	60
3.3.12	Systolischer systemarterieller Blutdruck (sSAP)	61
3.3.13	Pulsamplitude (sSAP-dSAP)	62
3.3.14	Herzfrequenz (HR).....	63
3.4	Blutwerte	64
3.4.1	pH-Wert (pH)	64
3.4.2	Hämoglobin (Hgb).....	65
3.4.3	Kalium (K)	66
4	DISKUSSION.....	67
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	74
6	SUMMARY	75
7	LITERATURVERZEICHNISS	77
8	DANKSAGUNG	83

Im Text verwendete Abkürzungen:

A.	Arterie
Aa.	Arterien
AO	Aorta
APAH	associated pulmonary arterial hypertension, assoziierte pulmonalarterielle Hypertonie
AP-Shunt	Aortopulmonaler Shunt
ASD	Vorhofseptumdefekt
bpm	beats per minute
BW	body weight; Körpergewicht
CO	cardiac output, kardiale Auswurfsleistung
DA	Ductus arteriosus, klinisch oft: Ductus Botalli
DHM	Deutsches Herzzentrum München
DOB	date of birth, Geburtsdatum
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FPAH	familial pulmonary arterial hypertension, familiäre pulmonalarterielle Hypertonie
I.E.	internationale Einheiten
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
LA	linkes Atrium, linker Vorhof
LAP	left atrial pressure, Druck im linken Vorhof
Lig.	Ligamentum
LV	linker Ventrikel
mdSAP	mean diastolic systemic arterial pressure, mittlerer diastolischer systemisch arterieller Druck
mLAP	mean left atrial pressure, mittlerer Druck im linken Vorhof
mmHg	Millimeter Quecksilber
mPAP	mean pulmonary arterial pressure, mittlerer pulmonalarterieller Druck

mSAP	mean systemic arterial pressure, mittlerer systemisch arterieller Druck
msSAP	mean systolic systemic arterial pressure, mittlerer systolischer systemisch arterieller Druck
NO	Stickstoffmonoxid
PA	Pulmonalarterie
PAH	pulmonary arterial hypertension, pulmonalarterielle Hypertonie, pulmonalarterieller Bluthochdruck
PAP	pulmonary arterial pressure, pulmonalarterieller Druck
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PDA	persistierender Ductus arteriosus, klinisch oft: Ductus Botalli
PFO	persistierendes Foramen ovale
PH	pulmonale Hypertonie
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPHN	persistent pulmonary hypertension of the newborn
PV	Pulmonalvene
PVR	pulmonary vascular resistance, Lungengefäßwiderstand
Q	Blutfluss
Q _p	Lungenblutfluss
Q _s	Körperblutfluss
R	resistance, Widerstand
RA	rechtes Atrium, rechter Vorhof
RAP	right atrial pressure
RV	rechter Ventrikel
SAP	systemic arterial pressure
SVR	systemic vascular resistance, systemischer Gefäßwiderstand
TUM	Technische Universität München
UCSF	University of California, San Francisco
V.	Vene
VSD	Ventrikelseptumdefekt
Vv.	Venen
WHO	World Health Organisation

1 EINLEITUNG

Ein Herzfehler ist die häufigste Diagnose unter allen angeborenen „Fehlbildungen“. Angeborene Herzfehler haben etwa acht bis zehn Kinder von 1.000 Neugeborenen. Bei Frühgeborenen ist die Häufigkeit eines Herzfehlers etwa doppelt so hoch. Das Spektrum angeborener Herzfehler reicht von einfachen Defekten, die das Herz-Kreislauf-System wenig beeinträchtigen und sogar symptomlos bleiben können, bis zu sehr schweren Herzerkrankungen, die unbehandelt zum Tode führen. Die häufigsten Veränderungen hierbei sind der Ventrikelseptumdefekt (VSD, ca. 30 %), der Atriumseptumdefekt (ASD, ca. 7,5%) und der persistierende Ductus arteriosus (PDA, ca. 5-10%), der eigentlich kein Herzfehler ist, sondern ein Defekt in den großen, vom Herz abgehenden Gefäßen darstellt, aber ähnliche Folgen für den Körper hat [5].

Durch die Fortschritte in der Forschung, der Kinderkardiologie, der Herzchirurgie und der Anästhesie, erreichen heute über 90 Prozent der Patienten das Erwachsenenalter. In vielen Fällen sind die Patienten jedoch lebenslang chronisch krank. Nach diversen Operationen stellen sich häufig Folgeerkrankungen des Herzens, aber vor allem der Lunge ein, die zu Einschränkungen der Lebensqualität, sowie der Leistungs- und Arbeitsfähigkeit führen und lebensbedrohlich sein können. Bei komplexen Herzfehlern sind oft mehrere Herzoperationen notwendig, um den Kindern eine Lebensqualität mit wenigen, beziehungsweise geringen Einschränkungen zu sichern. In vielen Fällen kann man heute jedoch durch einen einmaligen operativen Eingriff oder minimal invasive Methoden im Herzkatheterlabor eine normale Alltagsbelastbarkeit der Kinder ohne nennenswerte Einschränkungen gewährleisten.

Trotz aufwendiger Vorsorgeuntersuchungen, optimierter postnataler Diagnostik und hoch entwickelten Operationsmethoden, welche die Frühsterblichkeit dieser Kinder deutlich senken, ist die Morbidität und Mortalität der Neugeborenen mit diesen Defekten immer noch hoch. Ursache hierfür sind nicht nur die Schäden am Herz selbst, sondern häufig irreversible Schäden an der Lunge durch sekundäre Veränderungen im

Lungengefäßbett, infolge veränderter Strömungsverhältnisse. Fast alle Herzfehler resultieren aus einer fehlerhaften Verbindung zwischen Lungen- und Körperkreislauf. Es kommt zur Vermischung von oxygeniertem und nicht-oxygeniertem Blut. Entsprechend ihrer Symptomatik unterscheidet man klinisch oft zwischen zyanotischen und nicht-zyanotischen Herzfehlern bzw. Defekten. Nicht-zyanotische Herzfehler oder Defekte sind dabei weitaus häufiger. Vom linken Ventrikel rezirkuliert bereits oxygeniertes Blut über den entsprechenden Defekt in den Lungenkreislauf. Man spricht von einem Links-Rechts-Shunt. Im Gegensatz dazu gelangt beim zyanotischen Herzfehler mit Rechts-Links-Shunt venöses, schlecht oxygeniertes Blut wieder in den Körperkreislauf. Gerade bei einem Links-Rechts-Shunt sind die Probleme der chronischen Erkrankung nicht mehr die primären Schäden am Herzen sondern sekundäre Veränderungen im Lungengefäßbett, die zu einem erhöhten Blutdruck im Lungengefäßsystem führen. Man spricht daher von einer pulmonalen Hypertonie (PH).

1.1 Pulmonale Hypertonie (PH)

Pulmonale Hypertonie (PH) wurde erstmalig 1891 durch Ernst von Romberg, einem deutschen Internisten beschrieben. Die pulmonale Hypertonie bezieht sich auf einen hämodynamischen Zustand, bei dem der in der Pulmonalarterie invasiv gemessene Druck erhöht ist. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definierte PH bis 2008 als einen mittleren pulmonalarteriellen Blutdruck (mean pulmonary arterial pressure, mPAP) von mehr als 25 mmHg in Ruhe oder mehr als 30 mmHg unter Belastung. Mit zunehmendem Alter steigt allerdings der mPAP unter Belastung in erheblichem Maß (1 mmHg in 10 Jahren). Da offenbar bei körperlicher Belastung auch bei Gesunden ein Druckanstieg auf über 30 mmHg auftritt, sollen die Belastungswerte aufgrund ihrer individuellen Heterogenität nicht mehr in die Definition einbezogen werden. Daher wurden bei der 4. Weltkonferenz zur Pulmonalen Hypertonie 2008 in Dana Point mehrere Veränderungen der bisherigen Definition vorgeschlagen. Das Belastungskriterium der PH sollte gestrichen werden (mPAP mehr als 30 mmHg unter Belastung). Damit ist zukünftig [19] ein pulmonalarterieller Mitteldruck von <21 mmHg als normal, Druckwerte >25 mmHg als manifeste pulmonale Hypertonie und der Bereich von 21–25 mmHg als Grenzbereich (Borderline-Hypertonie) einzustufen [48].

Die PH wird nach der modifizierten „WHO-Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie von 2008 (Dana Point)“ in 5 Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 1.1). Die erste Gruppe beschreibt die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH), auf welche sich diese Studie konzentriert [72].

Tabelle 1.1 Updated Clinical Classification of PH (Dana Point, 2008 [72])

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
- 1.6 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
- 3.3. Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern
- 3.4. Sleep-disordered breathing
- 3.5. Alveolar hypoventilation disorders
- 3.6. Chronic exposure to high altitude
- 3.7. Developmental abnormalities

4. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH)

5. Pulmonary hypertension with unclear multifactorial mechanisms

- 5.1. Hematologic disorders: myeloproliferative disorders, splenectomy
- 5.2. Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary Langerhans cell histiocytosis: lymphangioleiomyomatosis, neurofibromatosis, vasculitis
- 5.3. Metabolic disorders: glycogen storage disease, Gaucher disease, thyroid disorders

1.1.1 Pulmonalerterielle Hypertonie (PAH)

Viele angeborene Herzfehler gehen mit einer veränderten Hämodynamik in der Lunge einher. Oft kommt es zu erhöhtem Blutfluss oder erhöhtem Blutdruck, oder zu einer Kombination beider in der A. pulmonalis beziehungsweise den Lungenkapillaren. Diese veränderten Strömungsverhältnisse führen zu Veränderungen des Lungengefäßbetts, die bei anhaltendem Zustand chronisch und irreversibel werden. So kann es durch angeborene Herzfehler zu einer sogenannten assoziierten pulmonalerteriellen Hypertonie (PAH) kommen. Die Prävalenz einer PAH liegt in Europa und Nordamerika bei Patienten mit angeborenen Herzfehlern bei 1,6 – 12,5 Fällen pro eine Millionen Einwohner [28].

Durch die veränderten Strömungsverhältnisse beziehungsweise veränderten mechanischen Scherkräfte des Blutes, hervorgerufen durch den erhöhten Lungenblutfluss (Q_p) und/oder pulmonalerteriellen Blutdruck (PAP), kommt es zu einer Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, welche noch nicht im Detail geklärt sind [17, 37]. Bekannt ist, dass es am Endothel der Lungengefäße zu einer Dysregulation der Vasokonstriktion und Vasodilatation, sowie zu Apoptose und Zellproliferation kommt, an der mehrere Mediatoren beteiligt sind. Schließlich kommt es zu einer Umstrukturierung des Gefäßendothels. Bereits in den späten 1950er Jahren wurden schon erste histologische Untersuchungen gemacht und Klassifizierungen anhand morphologischer Veränderungen des Lungengefäßbetts erarbeitet [38, 40]. Histologisch auffällig waren die zunehmenden muskulären Schichten, später gefolgt von Narbengewebe. Man spricht heute von einem so genannten „Pulmonary vascular remodeling“ [40]. Das Gefäßlumen und die Elastizität der proliferierenden Lungenkapillaren werden immer kleiner. Der Lungenblutdruck (PAP) steigt immer mehr, sodass es zu einer Shunt-Umkehr, von anfangs links-rechts nach rechts-links und zusätzlich zum Rechtsherzversagen und Cor pulmonale kommt. Viktor Eisenmenger beschrieb 1897 das erste Mal einen Patienten mit großem Ventrikelseptumdefekt (VSD) und ausgeprägter Atemnot, der im Rechtsherzversagen (mit Cor pulmonale) verstarb [22]. Man spricht deswegen von der so genannten Eisenmenger-Reaktion (siehe Abbildung 1.1 [81]).

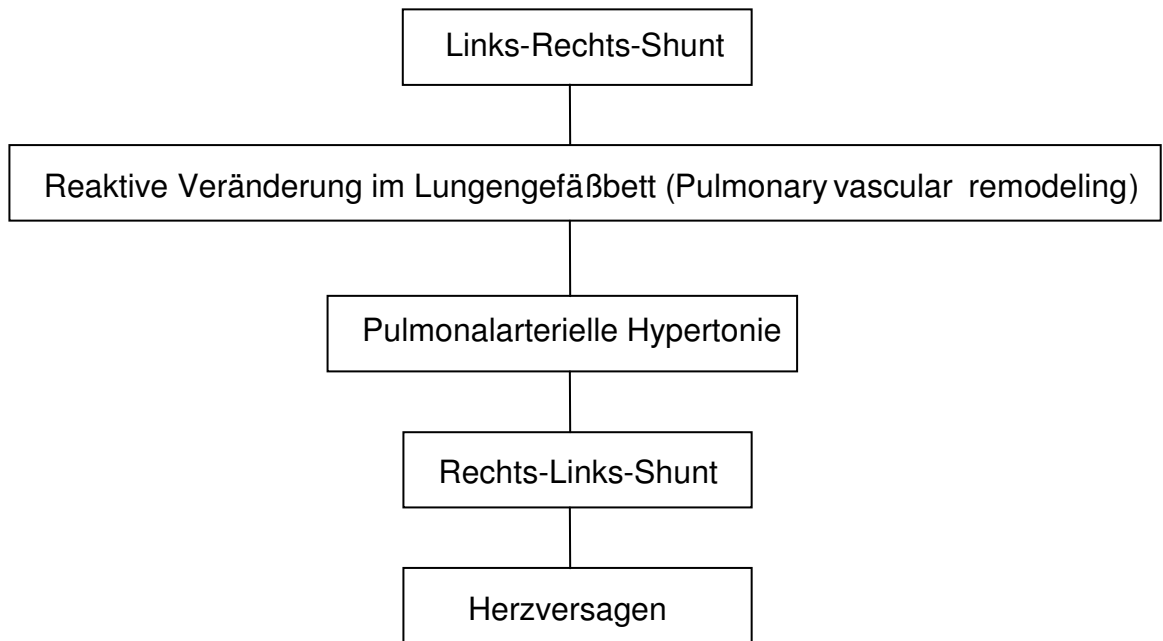


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung einer Eisenmenger-Reaktion [81]

Die Ursachen und Mechanismen für das „Pulmonary vascular remodeling“ sind noch nicht hinreichend geklärt. So ist noch nicht klar, ob es Kräfte durch pathologisch erhöhten Lungenblutfluss oder pulmonalarteriellen Blutdruck sind, die für die Umstrukturierung der Pulmonalgefäße verantwortlich sind. Sicher ist, dass durch veränderte, mechanische Scherkräfte des Blutflusses in den Lungenkapillaren diese Prozesse initiiert werden.

Für die Aufklärung und zur Gewinnung eines Verständnisses der Prozesse, die für ein „Pulmonary vascular remodeling“ verantwortlich sind, ist am Deutschen Herzzentrum München eine Arbeitsgruppe gegründet worden, die in Zusammenarbeit mit der TUM (Technischen Universität München), der UCSF (University of California, San Francisco) und dem Medical College of Georgia, ein Tiermodell mit künstlich, in utero angelegten aortopulmonalen Shunt etabliert hat. Hierbei wird Lämmern in utero ein künstlicher Shunt (8mm Gore-Tex® Schlauch) zwischen der Aorta und der A. pulmonalis eingesetzt. Die Lämmer kommen dann natürlich zur Welt und haben durch diese künstliche Verbindung von Aorta und A. pulmonalis von Geburt an einen Links-Rechts-Shunt mit erhöhtem Lungenblutfluss und Lungenblutdruck. Mit diesem Tiermodell wird die Situation eines Ductus arteriosus persistens (Ductus Botalli persistens)

simuliert.

1.2 Furosemid

Die PAH ist mit einer Vielzahl kardialer, pulmonaler und systemischer Erkrankungen assoziiert. Die Prognose der Patienten mit PAH hängt im Wesentlichen von der Ursache und dem Zeitpunkt der Diagnose ab. Aufgrund der vielen unterschiedlichen Ursachen und der, bei scheinbar gleichem Schweregrad, unterschiedlichen Verhaltensmuster, gibt es nicht nur eine Therapieform für die PAH. In vielen Studien wurden histologische, molekularbiologische und klinische Erkenntnisse gewonnen, durch die es heute zielgerichtete Behandlungsstrategien für die PAH gibt. Weltweit hat sich in den letzten 10 Jahren eine Gruppe von anerkannten Medikamenten etabliert. Dazu zählen die Stickstoffmonoxid (NO-)Therapie [57], Endothelin1-Rezeptorblocker (z.B. Bosentan [80]), selektive Phosphor-diesterase5-Hemmer (z.B. Sildenafil [29]) und Prostazykline (z.B. Epoprostenol, Iloprost [15]). Zusätzlich werden Kalziumkanalblocker (z.B. Nifedipin, Amlodipin), Antikoagulantien (z.B. Phenprocoumon) und Diuretika (z.B. Furosemid [13, 80, 21]) verabreicht.

Bei einigen assoziierten Formen der PAH mit verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz findet Furosemid (Lasix®, Furorese® etc.) Verwendung als Vorlastsenker [80], um die Volumenbelastung des rechten Herzens zu reduzieren. Es ist ein Medikament, welches in der klinischen Medizin bekanntermaßen als Diuretikum verwendet wird, um die Nierenaktivität zu steigern. Es hemmt den Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransport an der Membran des dicken, aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife des Nierentubulus. Dadurch kommt es zu einer reduzierten Wasserrückresorption aus dem Primärharn im Nierentubulus, welche mit einem Verlust von Wasser, Kalium und Natrium einhergeht. Indikationen für das Schleifendiuretikum sind Bluthochdruck, Aszites, Pleuraergüsse, Lungenödeme und andere Ödeme (einschließlich Hirnödem) etwa infolge Herzinsuffizienz oder aufgrund von Leber-, Nierenerkrankungen oder Verbrennungen, unter bestimmten Umständen auch ein drohendes Nierenversagen.

Bei Patienten mit PAH mit assoziierter Herzinsuffizienz kommt es bei einem chronischen Zustand zu einer Dilatation des rechten Vorhofs und Ventrikels und somit Kompression des linken Ventrikels (Cor pulmonale). Diese Volumenbelastung reduziert die Auswurfleistung des Herzens bei Patienten mit Rechtsherzinsuffizienz. Hier ist Furosemid als Vorlastsenker geeignet um das Herz zu entlasten und den Symptomen von Dyspnoe aufgrund von pulmonalen und abdominalen Ödemen entgegen zu wirken.

Neben der Wirkung als Diuretikum und Vorlastsenker wurde in verschiedenen Studien auch eine vasoaktive Wirkung beobachtet [49,75,2,33,21,56]. Furosemid ist in der Lage den Gefäßtonus und damit die Hämodynamik zu verändern. Das bedeutet Furosemid hat neben seiner diuretischen Wirkung auch einen indirekten oder direkten vasoaktiven Effekt. Gerade bei Patienten mit akuten und chronischen Herzinsuffizienzen wurde nach intravenöser Applikation eine Verbesserung der Symptome, noch vor dem Einsetzen der Diurese beobachtet [21]. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Furosemid in der Lage ist Pulmonalvenen und sogar Pulmonalarterien zu relaxieren bzw. zu dilatieren (siehe Tabelle 1.2.). Die Mechanismen für diese Funktionen sind bis heute weitestgehend unklar. In verschiedenen „in vivo-Studien“ konnte ein vasodilatativer Effekt nachgewiesen werden. So konnten Lundergan et al. an in vivo isolierten Lungenlappen von Hunden die dilatative Wirkung von Furosemid durch Senken des PAP zeigen [49]. Bei „in vitro-Studien“ wurde ein direkt arteriodilatativer Effekt beobachtet. Stevens et al. zeigte die dilatative bzw. relaxierende Wirkung an isolierten Pulmonalarterienringen von Meerschweinchen nach Präkonstriktion mit Norepinephrin [75]. Abrahams et al. beobachteten die dilatative Wirkung von Furosemid an isolierten Pulmonalarterienringen von Ratten [2]. Greenberg et al. zeigten eine relaxierende Wirkung von Furosemid an verschiedenen Venen von Hunden (Mesenterial-, Milz-, Lungenvenen und der Vena saphena) [33]. Auch am Menschen wurde in vivo gezeigt, dass Furosemid eine venodilatative Wirkung hat. So konnten Pikkers et al. in einer in vivo Studie mit einer therapeutischen Dosis Furosemid den Blutdruck in der dorsalen Handvene des Menschen lokal senken. Eine Dilatation der Arterien lies sich aber sogar in

supratherapeutischen Dosen nicht zeigen [56].

Auch bei vorhergehenden Studien mit AP-Shunt-Modellen bei Lämmern gab es Hinweise auf eine direkte, dilatative Wirkung auf die Pulmonalgefäße. So hatten Fratz et al. 2004 [27] eine Serie von Lämmern mit intrauterin angelegten AP-Shunt beobachtet, bei denen ab dem Tag der Geburt von zweimal täglich Furosemid in einer therapeutischen Dosis (1mg/kg) intramuskulär appliziert wurde. Verglichen mit historischen Shunt-Tieren ohne Furosemid-Behandlung von Reddy et al. [60] war der pulmonalarterielle Druck erniedrigt, der pH erhöht und das Pulmonary vascular remodeling gehemmt. Wegen dieser Unterschiede wurde vermutet, dass Furosemid vasodilatative Effekte im pulmonalen Gefäßbett haben könnte.

Neben diesen Hinweisen gibt es eine Reihe von verschiedenen Studien die diese nicht diuretischen, dilatativen Effekte beschrieben. Wichtig hierbei ist die Unterscheidung von arteriellen und venösen Gefäßen sowie die Lokalisation im Körper (Übersicht: siehe Tabelle 1.2):

Tabelle 1.2 Einteilung der Lokalisation der Wirkung von Furosemid

Arterien der Lunge [2, 49, 75]

Venen der Lunge [65]

Arterien des Körpers und anderer Organe [4, 16, 73, 76]

Venen des Körpers und anderer Organe [2, 6, 53, 56]

Viele Studien zeigten eine direkte arterio- oder venodilatative Wirkung von Furosemid, unabhängig von der diuretischen Wirkung (siehe Tabelle 1.2). Verschiedene Studien auf der anderen Seite konnten keinen vasoaktiven, extrarenalen Effekt darstellen [6, 36, 56] oder zeigten sogar paradoxe Reaktion wie z.B. einen Anstieg von PVR [45]. Die Mechanismen sind immer noch weitgehend ungeklärt. Deswegen gibt es verschiedene Hypothesen [21], um diese direkt oder auch indirekt vasoaktiven Effekte zu erklären (siehe Abbildung 1.2).

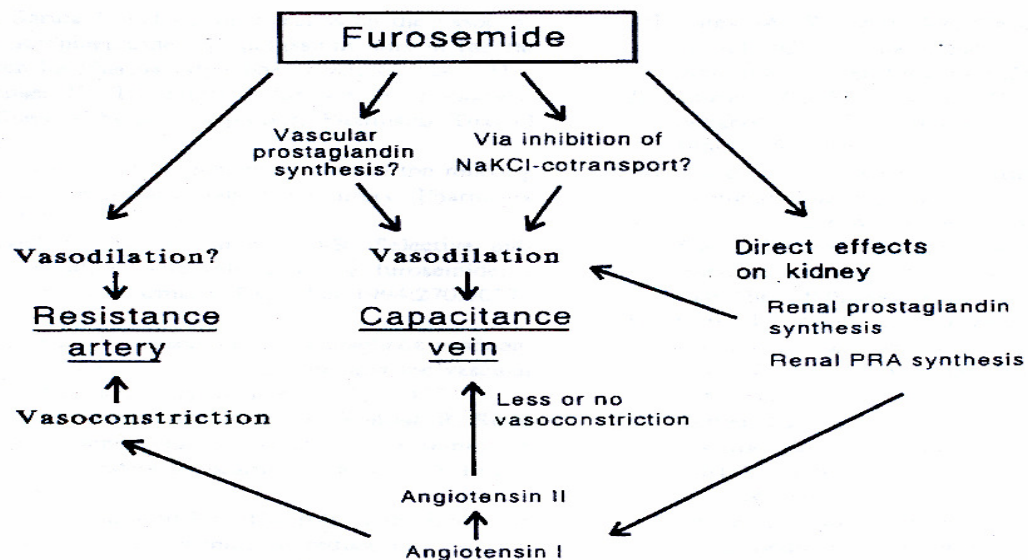


Abbildung 1.2 Hypothesen verschiedener Wirkung von Furosemid [21]

Furosemid könnte direkt auf die Arterien wirken und dadurch PVR senken. Es könnte aber auch einen direkten Effekt durch lokale Prostaglandin-Ausschüttung geben. In einigen Studien war die Reaktion der Gefäße auf Furosemid durch Indomethacin (hemmt die Cyclooxygenase 1 und 2 und somit die Prostaglandinsynthese) gehemmt worden. Eine weitere Hypothese wäre, dass die Hemmung des NaKCl-Kotransports auch direkt an den Gefäßen eine Rolle spielt, da die Vasodilatation in einigen Studien von der Kalium-Konzentration abhängig war [58]. Eine indirekte Wirkung über eine Hormon-Ausschüttung aus der Niere (Renin-Angiotensin-Aldosteron System) könnte hemmend auf die Vasokonstriktion wirken [21].

Diese Effekte könnten zu einer Weitstellung der Pulmonalarterien beitragen und so den PAP und PVR senken und damit eine Blutdrucksenkung bewirken. Interessant ist, ob Furosemid in den Prozess des pulmonary vascular remodeling eingreifen kann, beziehungsweise eine Wirkung auf das pathologisch veränderte Lungengefäßbett hat.

Aufgrund der Fülle dieser Hinweise aus dem klinischen sowie aus dem wissenschaftlichen Bereich, und besonders wegen den Beobachtungen von Fratz et al. 2004 [27], wird in dieser Studie der hämodynamische Effekt von Furosemid im pulmonalen Gefäßbett in einem aortopulmonalem Shunt-Modell bei Lämmern im Alter von drei Wochen untersucht und statistisch dargestellt.

1.3 Fragestellung

Hat Furosemid eine dilatative Wirkung auf das pulmonalarterielle Gefäßbett bei drei Wochen alten Lämmern mit aortopulmonalem Shunt?

Aufgrund der Beobachtungen von Fratz et al. 2004 (siehe Kapitel 1.2 [27]) und vielen anderen Studien in Bezug auf die vasodilatative Wirkung von Furosemid (siehe Kapitel 1.2), bedarf es weiterer Studien, die die Wirkung von Furosemid im pulmonalen Gefäßbett bei Lämmern mit aortopulmonalen Shunt klar darstellen. Wenn PAP durch die chronische Gabe von Furosemid signifikant gesenkt würde, wäre dies ein klarer Hinweis auf die Fähigkeit von Furosemid den Gefäßtonus von Pulmonalgefäßen zu beeinflussen. Dies könnte auch eine Bedeutung für die Behandlung von Patienten mit PAH haben. So könnte Furosemid den Pulmonalarteriendruck niedrig halten und möglicherweise den Prozess des pulmonary vascular remodeling hemmen. Es würde zusätzlich dazu beitragen, die noch ungeklärten, vasodilatierenden Mechanismen von Furosemid zu verstehen. Furosemid ist bereits ein anerkanntes Medikament in der Therapie bei akuten und chronischen Herzfehlern sowie der PAH und wird weltweit bei diesen Patienten verwendet. Es fehlen aber Studien mit randomisierten Ergebnissen, die den Nutzen von Diuretika bei PAH beweisen [80]. Dies ist ein weiterer Grund für die Notwendigkeit dieser Studie.

1.4 Zielsetzung

In dieser Studie soll die Wirkung von Furosemid im pulmonalen Gefäßbett von drei Wochen alten Lämmern mit intrauteriner Anlage eines großen, aortopulmonalen Shunts dargestellt werden. Es ist bekannt, dass es durch diesen angeborenen Herzfehler zu veränderten Strömungs- und Scherkräften im Lungenblutfluss kommt und diese zu einer Umstrukturierung des pulmonalen Gefäßbetts führen. Dies ist bereits in den ersten drei Wochen schon morphologisch sichtbar (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Fratz et al. 2009). In der Studie von Fratz et al. 2004 [27] gibt es Hinweise auf eine vasodilatative Wirkung von Furosemid im Lungengefäßbett von Lämmern mit aortopulmonalen Shunt, sowie Zeichen für eine hemmende Wirkung des Furosemids auf die vaskuläre Umstrukturierung (siehe Kapitel 1.2.). Kriterien sind hierbei Änderungen des pulmonalarteriellen Drucks (PAP), des Lungenblutflusses (Qp), des Drucks im linken Vorhof (LAP), des pulmonalvaskulären Widerstands (PVR), des pulmonalen Gradienten und des Verhältnisses des Lungenblutdrucks und des Systemblutdrucks (PAP:SAP), sowie zu erwartende Elektrolytverschiebungen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienen reinrassige Bayerische Bergschafe aus einem privaten Zuchtbetrieb. In der Herde von ca. 250 Mutterschafen laufen immer ein bis zwei Böcke mit. Deshalb werden, abhängig vom saisonalen Brunftverhalten der Bergschafe, kontinuierlich Lämmer geboren. Es kommt im Herbst bis in den Winter und im Frühjahr bis zum Frühsommer jeweils zu einem Anstieg der Geburten. Im Hochsommer kommen sehr wenige Lämmer zur Welt. Das gewährleistet eine saisonal weitgehend unabhängige Versuchsplanung mit einer Pause über ein bis zwei Monate im Sommer. Zusätzlich stehen ausreichend Kontrolllämmer zur Verfügung da Bergschafe, vor allem im Winter, oft Zwillinge austragen. Wegen des weniger frischen Futters im Winter tragen die Mütter im Frühsommer dagegen öfter nur ein Lamm aus. Handelt es sich bei dem operierten Tier um einen Einling, wird möglichst ein Zwilling, dessen operiertes Geschwistertier gestorben ist, bzw. ein spontan geborenes gesundes Lamm als Kontrolltier verwendet.

Zudem erlauben die Tiere aufgrund ihrer Größe die in Kapitel 2.3.3 beschriebene chirurgische Manipulation am fetalen Herzen. Spontangeburt als unmittelbare Folge des Eingriffes, wie sie bei Schweinen gehäuft vorkommen, wurden bislang selten beobachtet. Außerdem sind Größe, Gewicht und andere physiologische Daten der Lämmer gut mit denen neugeborener Kinder zu vergleichen.

In seinen Eigenschaften ähnelt das bayerische Bergschaf der in den USA vorwiegend verwendeten Rasse „Mixed Breed Western“. Diese Rasse wurde bereits bei den Arbeiten von Reddy, Black und Fineman [7-12, 24, 27, 59, 60] benutzt.

Die 2 bis 3 Jahre alten Muttertiere haben ein Lebendgewicht von ca. 60-80 kg. Im Zuchtbetrieb werden sie im Sommer auf Weiden und im Winter in einem Laufstall mit Tiefenstreu in Gruppen von 30 – 40 Tieren gehalten. Im Stall herrschen Temperaturen von 10 bis 20° C bei

Unterdruckbelüftung. Die relative Luftfeuchtigkeit beträgt 60 bis 80%. Die Tiere werden mit Heu, Grassilage und Zuckerrübenschnitzel gefüttert. Mineral und Salzlecksteine sowie Wasser stehen zur freien Verfügung.

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 (TUM), Ismaninger Str. 22, München verbracht.

Die Tiere werden in Gruppen von maximal drei Tieren in Boxen von ca. 5m² gehalten. Die Stalltemperatur beträgt 20 bis 23 °C, die relative Luftfeuchte 60 bis 70%. Die Beleuchtung simuliert einen 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus und ist damit den Ruhezeiten der Tiere angepasst. Dabei herrscht eine 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 heruntergedimmt.

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

Zwölf bis achtzehn Stunden vor der Operation wird den Schafen das Futter entzogen. Wasser bleibt weiter frei zugänglich. Ziel ist es den Panseninhalt zu reduzieren, um das Risiko einer Aspiration von Pansensaft zu minimieren und im Bauchraum besser chirurgisch arbeiten zu können. Zusätzlich lassen sich nüchterne Tiere prä-operativ leichter auf den Fortschritt der Trächtigkeit untersuchen. Direkt nach der Operation wird die Mutter sofort wieder mit Futter versorgt.

Nach der Geburt werden die Mütter mit ihren Lämmern zum Schutz der Neugeborenen von den anderen Schafen getrennt. Die Lämmer werden bis zur hämodynamischen Untersuchung von der Mutter gesäugt.

Nach Abschluss des Beobachtungszeitraumes von 21(\pm 2) Tagen und den hämodynamischen Messungen bei den Lämmern mit anschließender Euthanasie werden die Mutterschafe wieder zu dem Zuchtbetrieb gebracht und dort mit speziellen Ohrmarken entsprechend gekennzeichnet und in einer getrennten Herde gehalten. Diese Schafe sind somit keine

Lebensmittel produzierenden Tiere mehr, da sie mit Medikamenten behandelt werden, die nicht für den Lebensmittel liefernden Verkehr zugelassen sind. Sie dürfen demnach nicht geschlachtet werden und deren Fleisch ist nicht mehr für den menschlichen Verzehr bestimmt. (Verordnung (EG) Nr. 1774/2002 des Europäischen Parlaments). Die Schafe können aber ohne Einschränkung für die Zucht weiter verwendet werden.

Das Tierversuchsvorhaben ist gemäß § 8 des Deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 25.05.1998 durch die Regierung von Oberbayern am 18.12.2003 genehmigt worden. Siehe auch Tierversuchsantrag AZ: 209.1/211-2531-93/03.

Es werden für diese Studie insgesamt 47 Mütter operiert. 4 dieser Mütter erweisen sich während der Operation als nicht trächtig, beziehungsweise die Trächtigkeit erweist sich als nicht weit genug fortgeschritten. Bei 43 Müttern wird eine Shunt-Operation durchgeführt. Bei 23 der mit Shunt versehenen Lämmer kann die Studie nicht beendet werden. Gründe dafür sind folgende: In 6 Fällen sterben die Lämmer noch während der Operation, in 2 Fällen stirbt die Mutter nach der Operation, in 6 Fällen sterben die Lämmer vor Geburt und kommen tot auf die Welt, in 6 Fällen sterben die Lämmer nach der Geburt, in 2 Fällen sterben die Lämmer während der hämodynamischen Messung, in 1 Fall ist der angelegte AP-Shunt funktional verschlossen, also $Q_p:Q_s=1$. Bei 20 der Lämmer kann der Versuch mit den hämodynamischen Messungen erfolgreich mit 10 Tieren ohne Furosemid-Behandlung und 10 Tieren mit Furosemid-Behandlung abgeschlossen werden. 27 Geschwister dieser operierten Shunt-Lämmer werden für die Kontrollen herangezogen. 1 Lamm stirbt vor der Geburt, und wird bereits marzeriert geboren. 6 der Lämmer sterben nach oder während der Geburt. So kann auch hier bei 10 Lämmern ohne Furosemid-Behandlung und 10 Lämmern mit Furosemid-Behandlung die Studie erfolgreich mit den hämodynamischen Messungen beendet werden.

2.2 Tiermodell

Seit Jahrzehnten werden Modelle der chronischen Hypoxie benutzt, um Veränderungen morphologischer und molekularbiologischer Art bei pulmonaler Hypertension zu untersuchen. Fraglich ist jedoch, ob das Modell der chronischen Hypoxie für die flussbedingte pulmonale Hypertonie benutzt werden kann, da noch nicht gezeigt wurde, dass die Mediatoren in beiden Krankheitsprozessen den gleichen Regulationsmechanismen unterliegen. Die durch Hypoxie verursachte pulmonale Hypertension ist ein Prozess, der von den Alveolen ausgeht, die flussbedingte pulmonale Hypertension wird jedoch sehr wahrscheinlich durch einen endothelialen Prozess ausgelöst.

Ein ideales Tiermodell sollte die realen Pathomechanismen eines angeborenen Herzfehlers darstellen. Viele Spezies (v.a. Ratten, Kälber [74], Hunde, Schweine [32, 35, 63], Affen [14]) wurden zu Versuchen herangezogen. Viele dieser Studien wurden jedoch erst an älteren Tieren durchgeführt und konnten aufgrund der bereits abgeschlossenen postnatalen Anpassungsvorgänge keinen Aufschluss mehr über frühzeitige Veränderungen geben. Das hier in München (Deutsches Herzzentrum München und Zentrum für Präklinische Forschung, Rdl) und in San Francisco (Cardiovascular Research Institute [60]) bereits etablierte Schafmodell hat den Vorteil, dass die Lämmer bereits mit dem künstlich angelegten Herzfehler auf die Welt kommen, wie Kinder mit der gleichen Erkrankung. Dadurch ist es möglich, die Auswirkungen der pathophysiologischen Veränderungen des Lungengefäßbettes in der postnatalen Phase (Übergang vom fetalen zum erwachsenen Kreislauf) zu untersuchen.

Das Schaf ist hierbei die ideale Spezies für fetale Überlebensstudien, da es eine Manipulation des Fetus ohne Spontanabort erlaubt. Fetale und neugeborene Lämmer zeigen viele hämodynamische und hormonelle Funktionen, die denen des Menschen sehr ähnlich sind. Die Physiologie und Pathophysiologie gesunder, fetaler und neugeborener Lämmer sind bereits extensiv untersucht worden. Hierbei sind besonders die Arbeiten von Dawes et al. [18-20] in den 1950er und 1960er sowie die Arbeiten von

Rudolph et al. [25, 26, 65-69] seit den 1970er Jahren hervorzuheben. Diese Untersuchungen bieten den experimentellen Hintergrund, auf dem sich dieses Projekt stützt. Zusätzlich ist das fetale und neugeborene Lamm groß genug, um die chirurgische Manipulation und Instrumentation mit einer geringen, chirurgischen Mortalität und eine hohe Erfolgsrate der physiologischen Messungen zuzulassen.

Für das Modell werden vier Gruppen gebildet:

Tabelle 2.1 Vier Gruppen von Lämmern mit n=10

Gruppe	Furosemid	Anzahl = n
Shunt ohne Furosemidbehandlung	—	n = 10
Shunt mit Furosemidbehandlung	1mg/kg/12 Std.	n = 10
Kontrolle ohne Furosemidbehandlung	—	n = 10
Kontrolle mit Furosemidbehandlung	1mg/kg/12 Std.	n = 10

Die Geschwister der Shunt-Lämmer bilden jeweils die gesunden Kontrollgruppen mit oder ohne Furosemid. Jede dieser Gruppen hat eine Anzahl von n=10 Lämmern, die alle nach einem Beobachtungszeitraum im Alter von 21 (± 1) Tagen hämodynamisch untersucht werden. Die Gruppen mit Furosemidbehandlung bekommen 21 Tage lang eine therapeutische Dosis von 1mg/kg alle zwölf Stunden morgens und abends in die lange Sitzbeinmuskulatur gespritzt. In einem randomisierten Vorgehen wurde die Reihenfolge der Shunt- und Kontrolltiere für die Furosemidbehandlung bestimmt.

2.3 Experimentelles Vorgehen

2.3.1 Anästhesie der Mutterschafe

Die Prämedikation bzw. Sedation der nüchternen Mutterschafe (12-18 Stunden ohne Futter) erfolgt durch eine Injektion von 15 mg/kgKG Ketamin 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. Die Narkose wird mit Propofol (2-4 mg/kgKG, i.v.; Propofol 2% MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) im Bolus eingeleitet. Sobald die Muskelspannung des Kiefers nachlässt, wird das Tier in Brustbauchlage intubiert und anschließend auf den OP Tisch in Rückenlage gedreht und sofort mechanisch ventiliert (Servo-Ventilator 900D, Siemens-Elema, Schweden, Atemminutenvolumen: 10-15 ml/kg KGW. Atemfrequenz: 17 /min; PEEP: 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 Pulsoximeter (Pulse Oximeter, Nonin Medical Inc., MPLS, MN). Die Narkoseaufrechterhaltung erfolgt über 1,7 – 2,3 l/min Isofluran (2-2,3 l/min; Forene®, Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden)

Ein weiterer venöser Zugang wird in die V. auricularis lateralis des rechten 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 über 10 ml/kgKG/h Vollelektrolytlösungen Ringer Lactat und Deltajonin (Deltajonin® und Ringer-Lösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen). Dabei wird über die ersten 500ml Ringer Lactat die erste Dosis der perioperativen antibiotischen Prophylaxe verabreicht 1 Million I.E. Penicillin G und 40 mg Gentamycin (Penicillin G®, Jenapharm, Jena; Gentamycin Gencin®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen)

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

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

Die Überwachung der Narkosetiefe erfolgt klinisch über den Korneal- und den Lidreflex, sowie 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 medVET GmbH, Babenhausen), sowie ein Pulsoxymeter (Datex-Ohmeda 5/5 Type F-CM 1.00, Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland) dessen Sensor an der Zunge des Mutterschafs angebracht ist, kontrolliert. Die Beatmung wird über eine graphische Darstellung der expiratorischen CO₂ Konzentrationen auf dem Narkosemonitor überwacht und bei Bedarf angepasst, um einen expiratorischen CO₂ Partialdruck von ca. 35 – 41 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. 15min Herzfrequenz, Atemfrequenz, Atemminutenvolumen, Sauerstoffsättigung, Blutdruck, expiratorische CO₂ Konzentration, aktueller Narkosegasflow und der PEEP (positive endexpiratory pressure) protokolliert. Unmittelbar nach Narkoseeinleitung und folgend im Abstand von ca. 45min, sowie während der Baseline-Messung, wird eine Blutgasanalyse einer arteriellen Blutprobe durchgeführt. (Synthesis 10, Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim). Dazu wird aus dem Zugang in der A. auricularis mit einer heparinisierten 1ml Spritze eine Blutprobe entnommen. Bei einer Azidose mit einem BE von mehr als -2 wird mit Bikarbonat (Natriumhydrogencarbonat 8,4% Infusionslösungskonzentrat, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) gemäß Formel 2.1 gegengesteuert.

Formel 2.1 Berechnung des Bedarfs an Natriumbikarbonat bei Azidose

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

2.3.2 Operationsvorbereitung

Der Bauch des Tieres wird vom kaudalen Rippenrand bis zum Euter großzügig rasiert. Mit Wasser und Waschbenzin werden grobe Verschmutzungen in mehreren Arbeitsgängen beseitigt. Die Haut wird mehrmals desinfiziert (Cutasept® F, Bode Chemie, Hamburg). Unter sterilen Bedingungen wird das Operationsfeld von den Chirurgen mit Tüchern eingegrenzt.

2.3.3 Chirurgisches Vorgehen

Entlang der, mit Lokalanästhetikum (Xylocain 2%, Astra Zeneca Wedel) infiltrierten Mittellinie, wird ein 25-30cm langer Hautschnitt zwischen Bauchnabel und Euter mit einem Skalpell (Feather 22) durchgeführt. 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 werden Teile des Uterus aus dem Abdomen nach außen verlagert und palpatorisch anhand markanter Strukturen wie Kopf und Beckenknochen die Lage und die Ausrichtung des Fötus bestimmt.

Muss der Uterus für eine bessere operative Zugänglichkeit zum Lamm rotiert werden, ist nach Beendigung der Operation unbedingt auf ein Zurückbringen in die Ausgangsposition zu achten, um Torsionen und Komplikationen im natürlichen Geburtsvorgang verhindern.

Bei Zwillingsschwangerschaften wird der leichter zugängliche Fötus 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 zugänglich gemacht. Die Extremität wird in Streckung mit einer Klemme fixiert, zusammen mit dem Uterus mit feuchtwarmen, sterilen

Tüchern abgedeckt und während der Operation feucht gehalten.

Nach Eröffnen der Haut und Präparieren der Muskeln wird im dritten oder vierten Intercostalraum der linken Seite eine Thorakotomie des Lammes gemacht. Die Öffnung wird mit einem Rippenspreizer geweitet. Das Perikard wird entlang des pulmonalarteriellen Hauptstammes eröffnet und mit Haltenähten an der Haut des Lammes fixiert (2-0 Vicryl®, Ethicon®, Johnson&Johnson Intl., Belgien), um einen bestmöglichen Zugang zum Operationssitus zu gewährleisten.

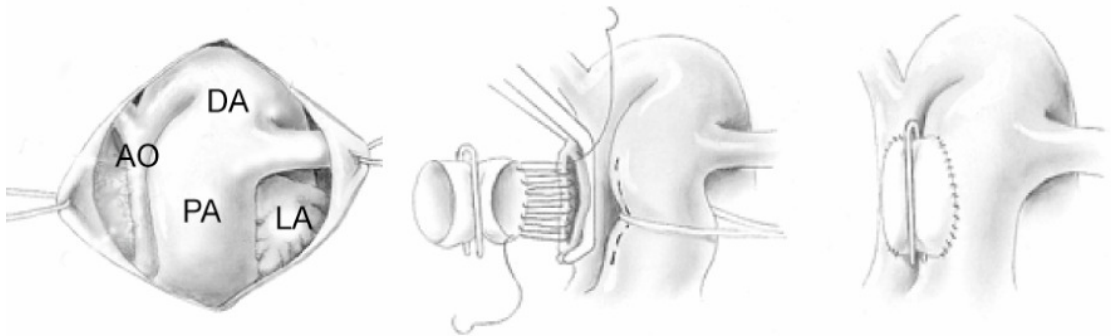


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des chirurgischen Vorgehens (modifiziert nach Reddy, Meyrick et al. 1995 [60]) AO=Aorta; DA=Ductus arteriosus; PA=Pulmonalarterie; LA=Linker Vorhof.

Die Pulmonalarterie wird freipräpariert und mit einer Gefäßschlinge umfasst (Vesseloops, Patent Pending, MedGeneral, APLS, Minn.). Die Aorta ascendens wird freigelegt und seitlich bzw. längs mit einer Gefäßklemme „teilausgeklemmt“, sodass damit ein ausreichender Blutfluss neben der Klemme gewährleistet ist.

Mit einem spitzen Skalpell wird dieser ausgeklemmte Bereich durch eine Stichinzision eröffnet und mit einer feinen Schere bzw. Rückwärtsschere nach vorne und hinten auf die gewünschte Länge von ca. 10-12mm erweitert. (Abbildung 2.3 - A)

Eine Polytetrafluoroethylen Gefäßprothese (Durchmesser 8 mm, Goretex®; W.L. Gore and Assoc) wird auf eine Länge von ca. 3-4 mm gekürzt (Abbildung 2.2) und es werden zwei Gefäß-Clips zum

vorübergehenden Verschluss der Gefäßprothese platziert. Diese wird in fortlaufender Nahttechnik mit der AO ascendens anastomosiert (7-0 Prolene®, Ethicon® Johnson&Johnson Intl., Belgien). (Abbildung 2.3 – B)

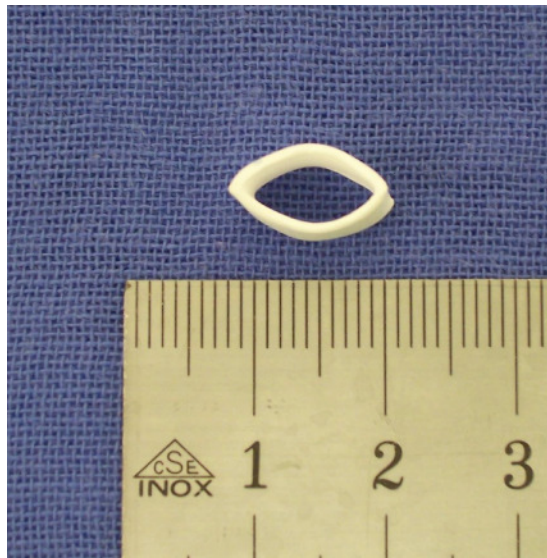


Abbildung 2.2 Ein 8mm Polytetrafluoroethylen-Shunt (Goretex; W.L. Gore and Assoc)

Danach 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 stetig mit warmer Elektrolytlösung (Ringer-Lösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) gespült.

Nach dem gleichen Prinzip wird die PA ausgeklemmt und an ihrer der Aorta zugewandten Seite eröffnet. In fortlaufender Nahttechnik erfolgt die Anastomosierung mit der freien Seite der Gefäßprothese (7-0 Prolene®, Ethicon® Johnson&Johnson Intl., Belgien). (Abbildung 2.3 – C)

Auf oben beschriebene Weise wird auch hier die Klemme entfernt. Die Clips werden vom Kunststoff-Shunt abgezogen und durch leichte Kompression beziehungsweise „Anlupfen“ mit einem Fadenrest wird das Shunt-Lumen vollständig eröffnet. Abbildung 2.3 – D zeigt das Resultat einer intrauterinen Shunt-Anlage.

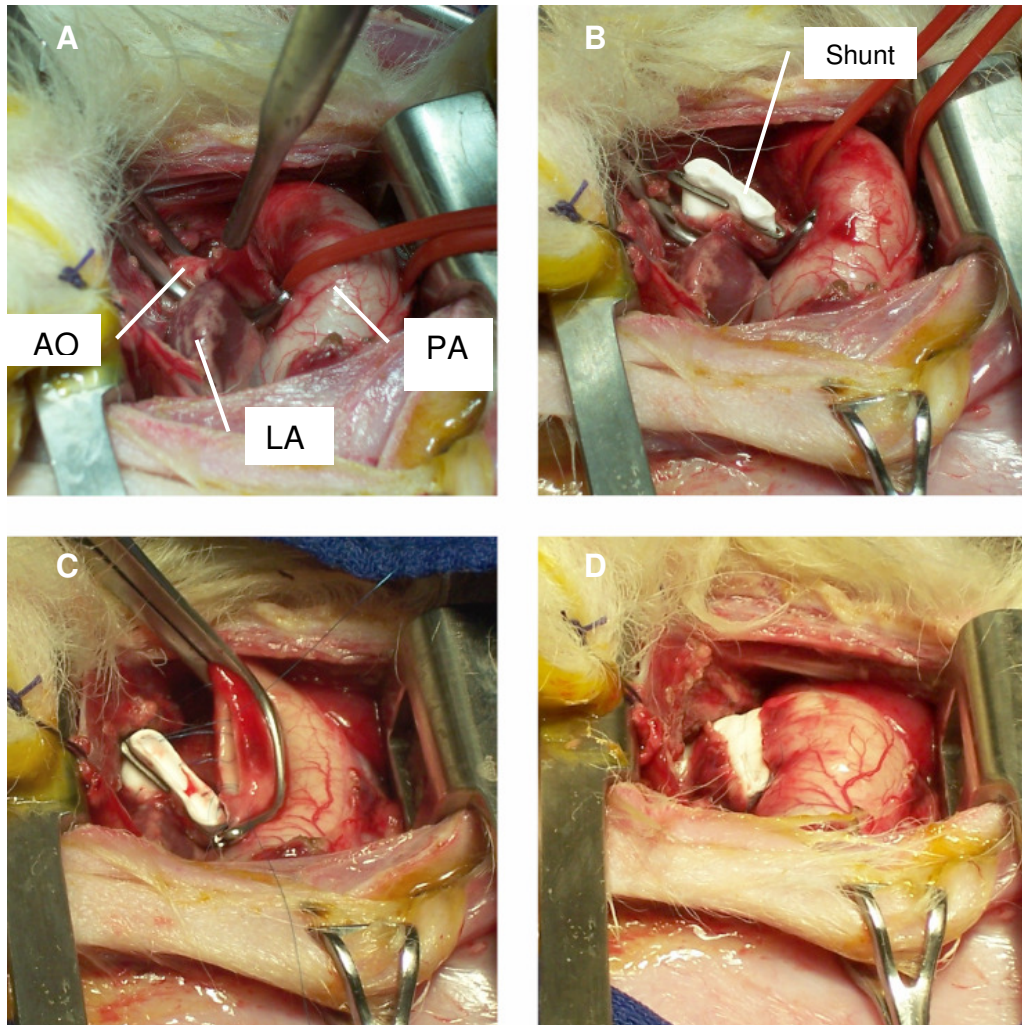


Abbildung 2.3 Chirurgisches Vorgehen zur intrauterinen Platzierung eines aortopulmonalen Shunts A: Die Pulmonalarterie (PA) wird mit Hilfe einer Gefäßumschlingung zur Seite gehalten und die, in der Tiefe liegende Aorta (AO) wurde inzidiert. LA=linker Vorhof B: Der Shunt wurde aortal anastomosiert. C: Der Shunt wird an der ausgeklemmten und bereits eröffneten Pulmonalarterie anastomosiert. D: Resultat nach Entfernen der Gefäßclips

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. Direkt intrauterin wird auch der zweite Teil

der perioperativen Antibiose (1 Millionen I.E., Penicillin G®, Jenapharm, Jena; Gentamycin 40 mg, Gencin®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) 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 Schafes wird in fortlaufender Technik mit einem Vicrylfaden verschlossen (2 Vicryl®, Ethicon®, Johnson&Johnson Intl., Belgien). Es folgt eine fortlaufende Naht des Unterhautgewebes (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 gebracht. Sobald eine suffiziente Eigenatmung zu erkennen ist, wird es extubiert und in den Stall zurückgebracht. Der Kopf wird während der ganzen Aufwachphase stabilisiert und über dem Pansenniveau gehalten, um ein Aspirieren von regurgitierten Verdauungssäften zu vermeiden. Das Schaf wird bis zum völligen Abklingen der Narkosewirkung beobachtet. Die erste Dosis der postoperativen Schmerzmedikation von 1mg Burprenorphin (0,005 mg/kg KGW, i.m., Temgesic®, Essex Pharma) wird i.m. verabreicht sobald das Schaf selbstständig sicher steht, da es durch das Burpenorphin bei kleinen Wiederkäuern zur Atemdepression kommen kann.

2.3.4 Postoperative Versorgung der Muttertiere

Die Muttertiere erhalten unmittelbar nach der Operation und am Folgetag eine standardisierte Schmerzmedikation von 1 mg Burprenoprphin (0,005 mg/kgKG, i.m., Temgesic®, Essex Pharma) i.m. sowie über 2 Tage eine antibiotische Behandlung mit jeweils 2 Millionen I.E. Penicillin und 80 mg Gentamycin i.m. (2 Millionen I.E. Penicillin G®, Jenapharm, Jena;

Gentamycin 80 mg, Gencin®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen).

Die Tiere werden täglich untersucht. Die Bauchwunde wird inspiziert und auf Schmerzhaftigkeit, Entzündungsanzeichen 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.

2.3.5 Postnatale Versorgung der Lämmer

Die Lämmer der operierten Schafe kommen wenige Tage (ca. 10 +-8) nach der Operation spontan zu Welt. Nur bei offensichtlichen Geburtskomplikationen, die das Wohl der Mutter oder der Lämmer gefährden, wird von Seiten der Versuchsleitung in den Geburtsprozess eingegriffen. Hierbei gilt es ggf. Geburtshilfe zu leisten. Aufgrund des intrauterinen Eingriffs kann es zu Fehlstellungen des Fötus kommen, die dann eine natürliche Geburt durch das Becken unmöglich machen. Hier ist veterinärmedizinische Erfahrung nötig, um durch manuelles Eingreifen und fachgerechtes Korrigieren der Fehlstellungen zur richtigen Zeit, die Lämmer auf natürlichen Weg zu entwickeln.

70 bis 80% der Mütter bekommen abhängig von der Jahreszeit Zwillinge. Die Geschwister der Shuntlämmer werden als gesunde Kontrolltiere für den direkten Vergleich in die Studie mit einbezogen. Nach der Geburt werden die Lämmer täglich gewogen. Die tägliche Gewichtszunahme der Lämmer liegt bei ca. 100-200g/d. Atem- und Herzfrequenz werden dokumentiert. Findet die Geburt innerhalb des analgetischen und antibiotischen Therapiezeitraumes des Mutterschafes statt, so erhalten die Lämmer ebenfalls noch Buprenorphin zur Analgesie (0,005 mg/kgKG, i.m., Temgesic®, Essex Pharma), Penicillin (50.000 I.E. Penicillin G®, Jenapharm, Jena) und Gentamycin (2 mg/kgKG i.m., Gencin®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen) zur antibiotischen Versorgung. Ab dem ersten Tag wird den Lämmern der Shunt-Gruppe und der Kontroll-Gruppe alle zwölf Stunden 1mg/kgKG Furosemid i.m. (Furorese, Furosemid-

Natrium 10mg/ml, Hexal AG, 83607 Holzkirchen) intramuskulär in die lange Sitzbeinmuskulatur appliziert. Die Reihenfolge von Furosemid behandelten und nicht behandelten Tieren wurde randomisiert. Einmal pro Woche erhalten sie dreiwertiges 100mg Eisen i.m. (Myofer®100, Eisen(III)-hydroxid-Dextran-Komplex, Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim). Der Untersuchungszeitraum der beschriebenen Serie beträgt 21(±2) Tage. Danach werden die Lämmer hämodynamisch untersucht.

2.3.6 Anästhesie der Lämmer

Zur Anästhesievorbereitung werden den drei Wochen alten Lämmern an beiden Venae 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 das Deutsche Herzzentrum München, Abteilung für experimentelle Herzchirurgie (Lazarettstraße 62, 80636 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) an der A. auricularis gelegt und an einen Druckabnehmer zur invasiven Blutdruckmessung (Notocord Systems) angeschlossen.

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) zur Einleitung der Narkose.

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

Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgt gewichtadaptiert und abhängig von der Narkosetiefe mit Ketamin (0,3-0,6 mg/kg/Std, i.v., Narketan® 10, Chassot GmbH, Ravensburg) Diazepam (0,01-0,02 mg/kg/Std Diazepam-Lipuro®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) und

Fentanyl (1-2µg/kg/Std, Fentanyl®-Jansen 0,1mg/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/kgKG/h, i.v.; Ringer-Lösung®, DeltaSelect GmbH, Pfullingen).

Das Monitoring erfolgt mittels Kapnographie (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 Formel 2.1 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 2.3.7)

2.3.7 Vorbereitung der hämodynamischen Untersuchung der Lämmer

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

Die linke A. inguinalis externa wird operativ freigelegt und ein Polyurethankatheter wird bis in die Aorta descendens vorgeschoben. Dieser Katheter wird mit einem Druckwandler des Notocord Systems verbunden, um eine kontinuierliche Kontrolle und Aufzeichnung von Herzfrequenz und systemarteriellem Mitteldruck (mean systemic arterial pressure, mSAP) zu gewährleisten.

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

Die Muskulatur wird vor Eröffnung des Thorax mit Pancuroniumbromid (0,1 mg/kgKG i.v.; Pancuronium-ratiopharm, ratiopharm GmbH, Ulm) relaxiert. Es erfolgt eine Thorakotomie durch komplette Sternotomie. Anschließend wird das Perikard eröffnet und die linke PA freigelegt. Um diese wird eine Ultraschallflussonde (Größe 6, Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY) gelegt, um den pulmonalarteriellen Blutfluss messen zu können. Auch diese Sonde ist mit dem Notocord System verbunden (siehe Abbildung 2.4).

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 (siehe Abbildung 2.4).

Nach dem gleichen Verfahren wird ein Katheter in den Hauptstamm PA distal der künstlichen Gefäßanastomose platziert. Bei den Kontrolltieren erfolgt dies distal des natürlichen, verschlossenen Ductus arteriosus (Lig. arteriosum). Mit dem Anschluss an das Notocord System ist eine pulmonalarterielle Druckmessung möglich (siehe Abbildung 2.4).

Die invasiv gemessenen Parameter werden mit speziellen Hardwarekomponenten wie Druckwandler (Stratham Instruments, Hatfield, PA) und Verstärkermodul für eine Ultraschallflussonde (T206, small animal bloodflowmeter, Transonic Systems Inc, Ithaca, New York, 14850 USA) verbunden und in digitale Signale umgewandelt, mit Hilfe eines Computers digital aufgezeichnet und später ausgewertet. Eine spezielle Software (Notocord-hem 3.5, Notocord Systems, Croissy-sur-Seine, Frankreich) erlaubt die kontinuierliche grafische Darstellung sowie die fortlaufende Aufzeichnung sämtlicher, für die Untersuchung erforderlichen hämodynamischen Parameter. Diese kontinuierlich gewonnenen Daten dienen im weiteren Verlauf der Untersuchung auch für das Narkosemonitoring.

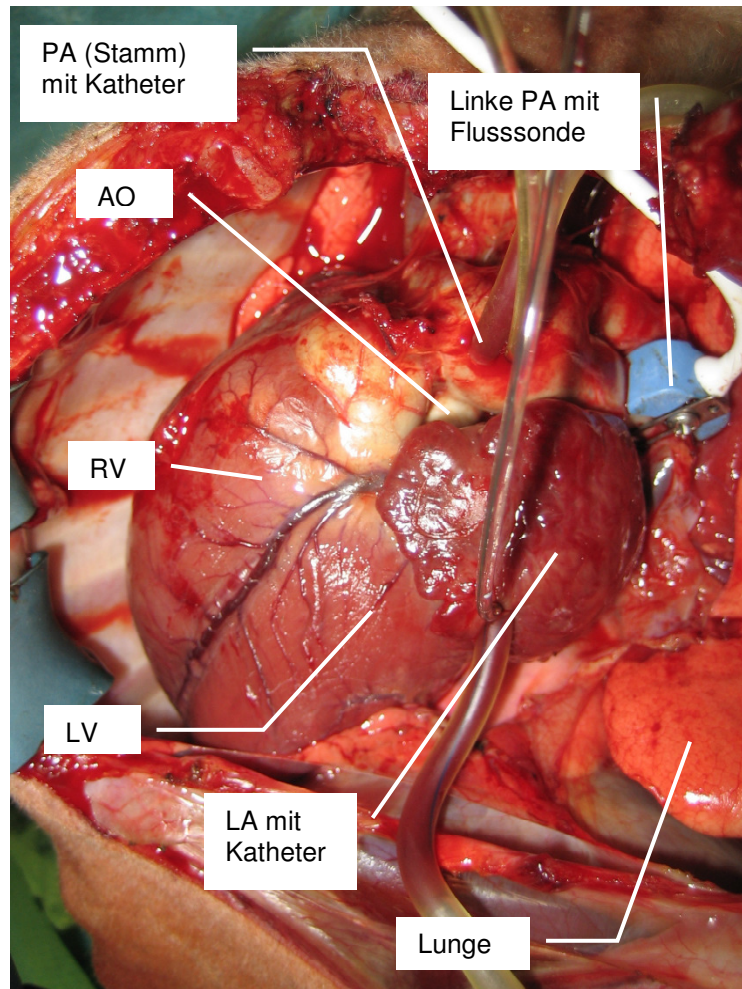


Abbildung 2.4 Eröffneter Lammtorax: Die Katheter aus V. jugularis externa und A. femoralis liegen jeweils intraatrial bzw. in der Aorta descendens; zu sehen sind die Katheter im Hauptstamm der PA und im LV sowie die Flusssonde um die linke PA

2.3.8 Hämodynamische Untersuchung der 3 Wochen alten Lämmer

Nach Stabilisierung aller hämodynamischen Parameter und einer Erholungsphase erfolgt die sogenannte Baseline-Messung. Hierbei werden die im Folgenden genannten hämodynamischen Parameter über einen Zeitraum von ca. 10 min. ohne Manipulation oder Intervention von Außen gemessen.

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

Die Druckabnehmer werden auf Höhe der Herzbasis des instrumentierten Lammes auf Null geeicht.

Die direkte grafische Auswertung erfolgt in Echtzeit auf dem Bildschirm über das Notocord-System (siehe Abbildung 2.5). Die Drücke werden neben den Druckkurven als errechnete Mitteldrücke in Millimeter Quecksilbersäule (mmHg) angegeben. Alle erfassten Werte sind gemittelte Werte über den Zeitraum von einer Minute, aus dem Steady-State-Bereich, in dem die Baseline-Messung stattfindet.

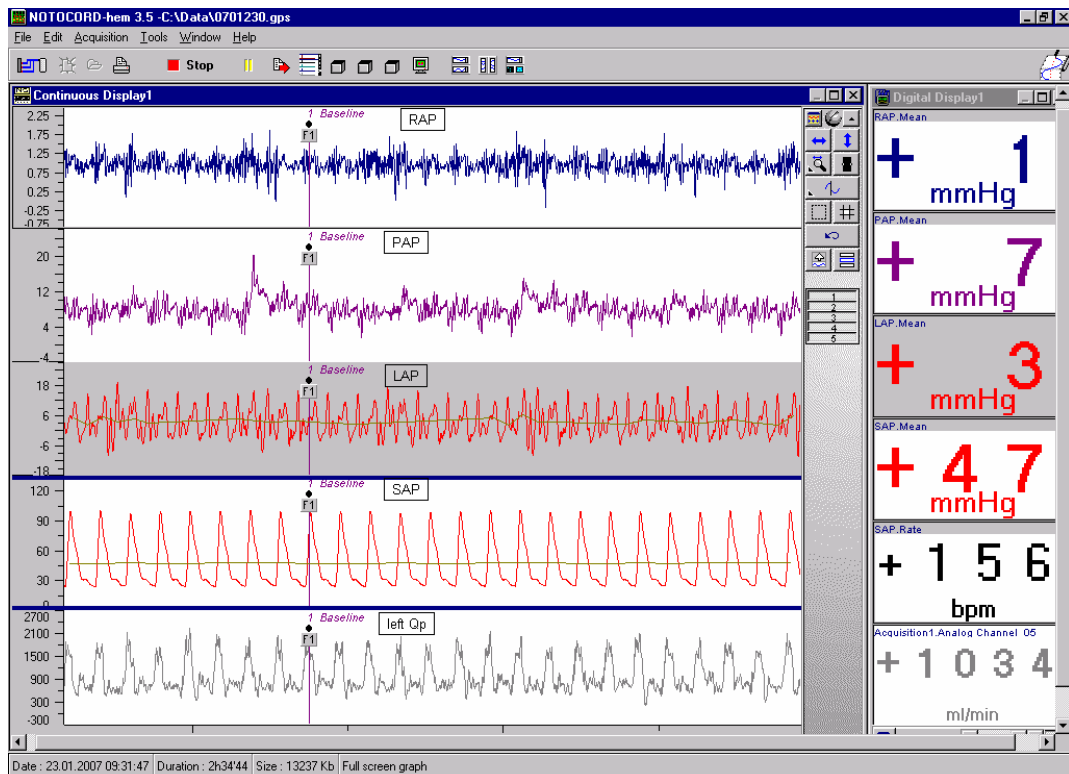


Abbildung 2.5 Screenshot des Notocord Software-Programms; In den linken $\frac{3}{4}$ der Bildhälfte werden die Druckkurven von RAP, PAP, LAP, SAP und die Flusskurve von Qp in Echtzeit dargestellt; rechts werden die jeweils aktuellen Mitteldrücke bzw. der pulmonalarterielle Blutfluss dargestellt.

2.3.9 Blutproben

Während der Baseline-Messung wird mit einer heparinisierten Einwegspritze arterielles Blut aus der A. femoralis genommen. Mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes (348 ph/Blood Gas Analyzer, Bayer HealthCare, Chiron Diagnostics Limited, Essex, UK) werden die Blutgase und die Elektrolytwerte gemessen.

Nach den hämodynamischen Messungen werden Blutproben aus der Pulmonalarterie und aus dem linken Vorhof in Serum-, EDTA- und Citratmonovetten (S-Monovette®, Sarstadt, Aktiengesellschaft & Co., 51588 Nürnberg) gewonnen. Diese Proben werden bei Raumtemperatur mit 3000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten zentrifugiert (Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments, 37520 Osterode). Danach wird jeweils der Überstand der Probe ohne die korpuskulären Bestandteile in 2ml Eppendorfer Röhrchen (Standart Reaktionsgefäß 3810, Eppendorf Deutschland GmbH, 50389 Wessling-Berzdorf) pipettiert. Diese Proben werden beschriftet und anschließend sofort in flüssigen Stickstoff gefroren und später bei -80 °C konserviert.

2.3.10 Euthanasie der Versuchstiere

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

2.4 Untersuchte Parameter

2.4.1 Mittlerer pulmonalarterieller Druck (mPAP)

Die Messung des mittleren Blutdrucks in der Pulmonalarterie (mPAP, mean pulmonary arterial pressure) erfolgt direkt und invasiv. Der Katheter wird direkt in den Pulmonalarterienhauptstamm, distal der Gefäßprothese gelegt und ist durch eine Tabaksbeutelnaht fixiert. Bei Kontrolltieren wird er distal der obliterierten, physiologischen, aortopulmonalen Verbindung (DA) dem Ligamentum arteriosum, platziert. Der Druck wird in Millimeter Quecksilbersäule angegeben (mmHg). Die Technik der Messung des Blutdrucks erfolgt wie in Kapitel 2.3.7. und 2.3.8 beschrieben.

2.4.2 Mittlerer linksatrialer Druck (mLAP)

Für die Messung des mittleren Blutdrucks im linken Vorhof (mLAP, mean left atrial pressure) wird ein Katheter direkt in den linken Vorhof eingeführt und fixiert. Die Einheit ist mmHg (siehe Kapitel 2.3.7).

2.4.3 Mittlerer rechtsatrialer Druck (mRAP)

Die Messung des mittleren Druckes im rechten Vorhof (mRAP, mean right atrial pressure) erfolgt über einen vierlumigen Katheter, der über die Vena jugularis externa bis in den rechten Vorhof vorgeschoben und anschließend mit dem Druckwandler verbunden wird. Die Einheit ist mmHg (siehe Kapitel 2.3.7).

2.4.4 Systemarterieller Druck (SAP)

Für den systemarteriellen Druck (SAP, systemic arterial pressure) wird ein Katheter über die A. femoralis, wie unter 2.3.7 beschrieben, bis in die Aorta descendens eingeführt. Gemessen wird der systolische (sSAP), der diastolische (dSAP) und der mittlere (mSAP) systemarterielle Druck. Die Einheit ist mmHg.

2.4.5 Pulsamplitude (pulseP)

Die Pulsamplitude (pulseP, pulsepressure) stellt die Druckamplitude der Pulskurve dar. Sie wird errechnet aus der Differenz von sSAP und dSAP. Die Einheit ist mmHg.

2.4.6 Verhältnis von mPAP : mSAP

Das Verhältnis des mittleren pulmonalarteriellen Drucks zum mittleren systemarteriellen Druck wird aus dem Quotienten von mPAP und mSAP errechnet (mPAP : mSAP).

2.4.7 Pulmonaler Druckgradient (pulm. gradient)

Der pulmonale Druckgradient beschreibt den Druckunterschied zwischen dem LA und der PA. Er errechnet sich aus der Differenz zwischen dem mittleren pulmonalarteriellen Druck (mPAP) und dem mittleren linksatrialen Druck (mLAP). Einheit ist mmHg. Der pulmonale Druckgradient entspricht bezogen auf das Ohm'sche Gesetz der Spannung in der Berechnung des PVR. (siehe Formel 2.2 und Formel 2.3)

Formel 2.2 Berechnung des pulmonalen Druckgradienten

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

2.4.8 Herzfrequenz (HR)

Die Herzfrequenz (HR, heartrate) wird aus der Pulskurve der invasiven arteriellen Druckmessung über das Notocordsystem errechnet. Die Einheit ist die Anzahl der Schläge pro Minute (beats per minute, bpm).

2.4.9 Blutfluss der Lunge (Q_{PA} , Q_{PA}/kg)

Der Blutfluss durch die linke Pulmonalarterie (Q_p) wird mit einer Ultraschall Flusssonde (Transonic® Flowprobe, Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY) gemessen (siehe Kapitel 2.3.8). Da das Blutvolumen vom Körpergewicht abhängig ist, wird für jedes Tier der absolute pulmonale

Blutfluß (Q_p) auf pro Kilogramm Körpergewicht umgerechnet ($Q_p/kgKG$). Die Einheit des Flusses ist Milliliter pro Minute [ml/min].

2.4.10 Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR)

Der Pulmonalvaskuläre Widerstand (PVR, pulmonary vascular resistance) wird gemäß des Ohm'schen Gesetzes als das Verhältnis der Druckdifferenz aus mPAP und mLAP zum Fluß in der PA bezogen auf das Körpergewicht (Q_p/kg) definiert. Die Einheit ist mmHg/ml/min/kg.

Formel 2.3 Berechnung von PVR

$$PVR = \frac{mPAP - mLAP}{Q_{PA} / kg}$$

2.4.11 Systemvaskulärer Widerstand (SVR)

Der Systemvaskuläre Widerstand (SVR, systemic vascular resistance) errechnet sich aus dem Quotienten der Druckdifferenz von Aorta descendens (mSAP) und RA (mRAP) und Blutfluss im systemischen Blutkreislauf (Q_s).

Formel 2.4 Berechnung von SVR

$$SVR = \frac{(mSAP - mRAP)}{(Q_{PA} / kg) / 0,4 / (Q_{PA} / Q_{SA})}$$

2.4.12 Verhältnis Lungenblutfluss : Systemblutfluss ($Q_p:Q_s$)

An die zehnminütige Baseline-Messung schließt sich die Messung des Verhältnisses von Lungenblutfluss (Q_p) zu systemischen Blutfluss (Q_s) an ($Q_p : Q_s$). Dafür werden zeitgleich Blut mit heparinisierten 1ml Spritzen aus dem LA, dem RV, der PA distal der Gefäßanastomose und der Aorta descendens entnommen. Die Probenentnahme erfolgt über die angebrachten Katheter. Die Probe aus dem RV wird durch direkte Punktion abgenommen mit einer Einmalkanüle. Die Sauerstoffsättigung dieser Proben wird mit einem Hemoximeter (OSM 3, Radiometer, Copenhagen, Dänemark) bestimmt.

Das Verhältnis von Lungenblutfluss (Q_p) zum Systemblutfluss (Q_s) wird nach dem Fickschen Prinzip errechnet. Es errechnet sich wie in Formel 2.5 beschrieben.

Formel 2.5 Gleichung von Fick zur Berechnung von $Q_p : Q_s$

$$\frac{Q_{PA}}{Q_{SA}} = \frac{O_{2SA} - O_{2RV}}{O_{2LA} - O_{2PA}}$$

2.4.13 pH-Wert (pH)

Mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes (348 ph/Blood Gas Analyzer, Bayer HealthCare, Chiron Diagnostics Limited, Essex, UK) wird der pH-Wert zur Baseline gemessen. Die pH-Wert-Messung erfolgt aus heparinisiertem, systemarteriellen Blut aus der A. femoralis.

2.5 Statistische Verfahren

2.5.1 Berechnungen

Die Ergebnisse aus der hämodynamischen Untersuchung der Shunt-Tiere ohne Furosemidbehandlung und der Shunt-Tiere mit Furosemidbehandlung wurden mit der Kontrollgruppe ohne Furosemidbehandlung und der Kontrollgruppe mit Furosemidbehandlung verglichen.

Die statistische Auswertung erfolgt mit SPSS (SPSS Version 16.0, SPSS Inc., Chicago, USA). Das Signifikanzniveau p im Vergleich der gemessenen Parameter beträgt jeweils 5% (0,05). Aufgrund der geringen Versuchstierzahlen wird in allen Vergleichen die exakte (2-seitige) Signifikanz bestimmt.

Die jeweiligen Gruppen werden hinsichtlich der Zielparameter verglichen. Zunächst wird für jede Gruppe die Anzahl der für die Auswertung zur Verfügung stehenden Tiere (n), Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum und Maximum errechnet.

Für den Vergleich der Shuntgruppe mit der Kontrollgruppe werden die Absolutwerte des jeweils untersuchten Parameters in Relativwerte umgerechnet und die Basalwerte auf jeweils 100% gesetzt. Die beiden Gruppen werden mittels einem parameterfreien, statistischen Test für unabhängige Variablen (U-Test, Mann-Whitney) verglichen. Dieser Test dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen, ob zwei unabhängige Verteilungen A und B (zum Beispiel eine Unbeeinflusste und eine Beeinflusste) zu derselben Grundgesamtheit gehören.

Für die statistische Auswertung des Versuchsverlaufs innerhalb einer Gruppe vergleicht man deren Absolutwerte der unterschiedlichen Messzeitpunkte miteinander und unterzieht diese einem Test für abhängige Variablen, dem Wilcoxon-Rangsummentest. Dieser Test ist der gebräuchlichste nicht parametrische Test für den Vergleich der Mediane zweier abhängiger Zufallsgrößen. Vorher werden jedoch alle Vierer-Kombinationen bzw. alle Dreier-Kombinationen mit dem Kruskal-Wallis-Test auf eine Tendenz hin geprüft. Dies bezeichnet man als geschlossene Testprozedur nach R. Marcus et al. [53].

2.5.2 Grafische Veranschaulichung

Die vorliegenden Ergebnisse werden als Box Plots dargestellt. Abbildung 2.6 stellt beispielhaft das verwendete Box Plot Modell dar. Die Y-Achse zeigt die jeweiligen gemessenen Werte auf. Auf der X-Achse werden die vier verschiedenen Gruppen gegeneinander dargestellt. Diese Art der Darstellung erlaubt auf den ersten Blick die Interpretation von Median, und Maximalwertverteilung.

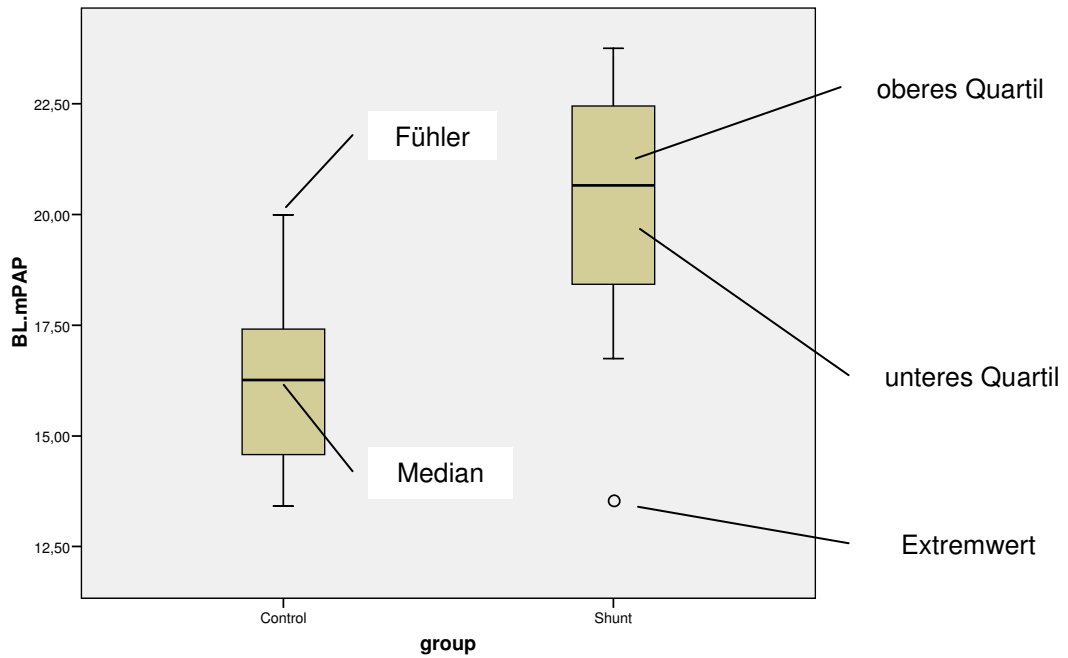


Abbildung 2.6 Beispiel, grafische Veranschaulichung mit Box Plot-Diagrammen

Als Box wird das durch die Quartile bestimmte Rechteck bezeichnet. Sie umfasst 50% der Daten. Durch die Länge der Box ist der Interquartilsabstand (interquartile range, IQR) abzulesen. Dies ist ein Maß der Streuung, welches durch die Differenz des oberen und unteren Quartils bestimmt ist.

Als „Fühler“ (Whisker) werden die horizontalen/vertikalen Linien bezeichnet. Die Länge der Fühler beträgt maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstands ($1,5 \times \text{IQR}$) und wird immer durch einen Wert aus den Daten bestimmt. Werte, die über dieser Grenze liegen, werden separat in das Diagramm eingetragen und als Extremwerte bezeichnet. Gibt es keine Werte außerhalb der Fühler, so wird die Länge des Fühlers durch den maximalen bzw. minimalen Wert festgelegt.

2.6 Ausschlusskriterien

Ausdrückliches Ziel der Studie ist es, zwei Gruppen von Lämmern (und deren Kontrollgruppen) mit großem, angeborenen, aortopulmonalen Shunt hämodynamisch zu untersuchen. Eine der beiden Gruppen (sowie eine Kontrollgruppe) wird mit Furosemid behandelt. Beide Shunt-Gruppen werden mit dem Kontrollkollektiv einmal mit und einmal ohne Furosemid verglichen. 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 Lamm der Shuntgruppe zugesprochen werden kann, entscheidet sich nach $Q_p:Q_s$ -Berechnung sowie Entnahme und Sektion des Herzens. Der Shunt muss vollständig sondierbar sein. Das $Q_p:Q_s$ -Verhältnis hat klinisch relevant ($>1,5$) zu sein.

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

3 EIGENE ERGEBNISSE

Im Zeitraum von 19.02.2004 bis 23.01.2008 wurden 43 Lämmer für diese Studie intrauterin operiert und ein großer aortopulmonaler Shunt wurde angelegt. 27 Tiere gleichen Alters, bei denen lediglich die Mutter bzw. das Zwillingstier operiert wurden dienten als gesunde Kontrolltiere (siehe Kapitel 2.2). Die Lämmer kamen 10 d (\pm 8 d SD) nach der Operation zur Welt. 11 Tiere der Shuntgruppe sowie 12 Tiere der Shuntgruppe mit Furosemid wurden drei Wochen (\pm 1 d SD) nach der Geburt hämodynamisch untersucht (siehe Kapitel 2.3.8). Von insgesamt 23 untersuchten Lämmern wurden 20 in die Studie eingeschlossen (n=20). Davon jeweils zehn in die Shuntgruppe (n=10) und zehn in die Shuntgruppe mit Furosemid (n=10). Drei Tiere der Shuntgruppe und Shuntgruppe mit Furosemid wiesen Ausschlusskriterien (vgl. 2.6) auf.

Für den Vergleich mit gesunden Tieren wurde eine Kontrollgruppe ohne Furosemid (n=10) und eine Kontrollgruppe mit Furosemid (n=10) ebenfalls nach drei Wochen (\pm 1 d SD) hämodynamisch untersucht.

Sinnvoll war der Vergleich folgender Gruppen:

Tabelle 3.1 Gruppen im statistischen Vergleich

Shunt	gegen	Kontrolle
Shunt	gegen	Shunt + Furosemid
Kontrolle	gegen	Kontrolle + Furosemid

Die Untersuchungsergebnisse aller Gruppen wurden, wie in Tabelle 3.1 beschrieben, verglichen.

Tabelle 2.1 in Kapitel 2.2 verschafft einen Überblick über die untersuchten Tiere.

3.1 Körpergewicht

Die Tiere wurden täglich klinisch untersucht und mindestens alle zwei Tage wurde das Körpergewicht mit einer digitalen Waage bestimmt.

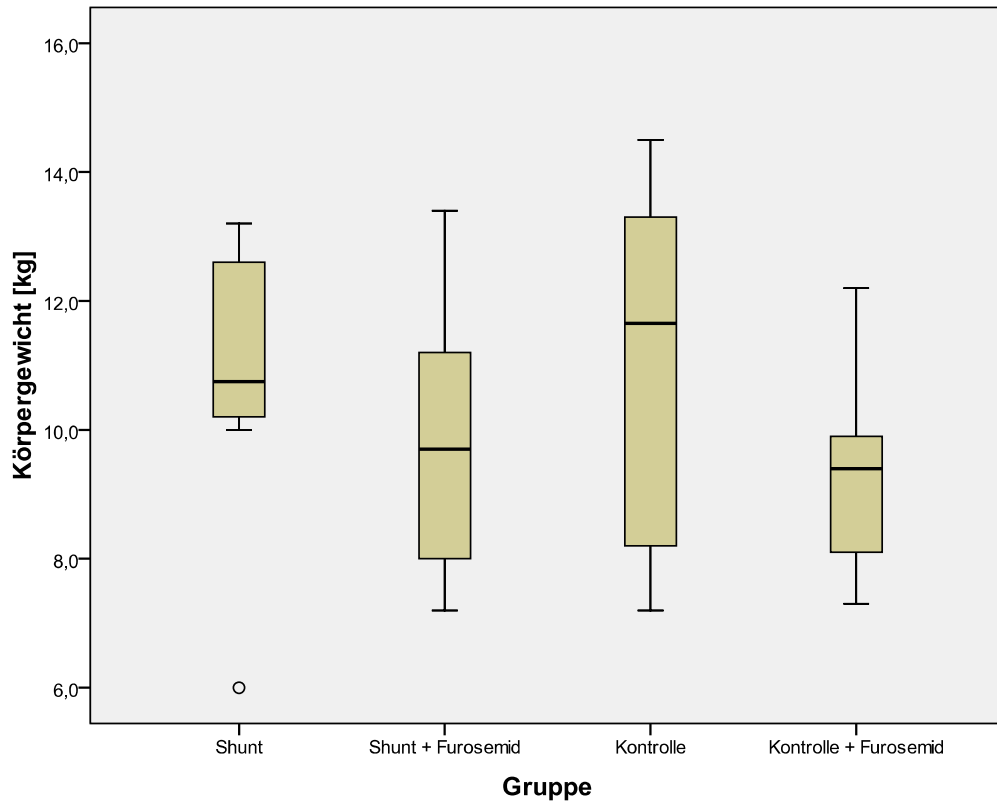


Abbildung 3.1 Körpergewicht im Gruppenvergleich im Alter von 3 Wochen

Gruppe	Körpergewicht im Durchschnitt
Alle Tiere bei Geburt	4,3 kg
Alle Tiere nach 21 (\pm 1) Tagen	10,24 kg

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,853
Shunt – Shunt + F	0,165
Kontrolle – Kontrolle + F	0,247

Der statistische Vergleich der oben genannten Gruppen hat keinen signifikanten Unterschied gezeigt.

3.2 Tägliche Untersuchungen

3.2.1 Herzfrequenz (HR)

Die Tiere wurden täglich untersucht und die Herzfrequenz auskultatorisch bestimmt (Abbildung 3.2).

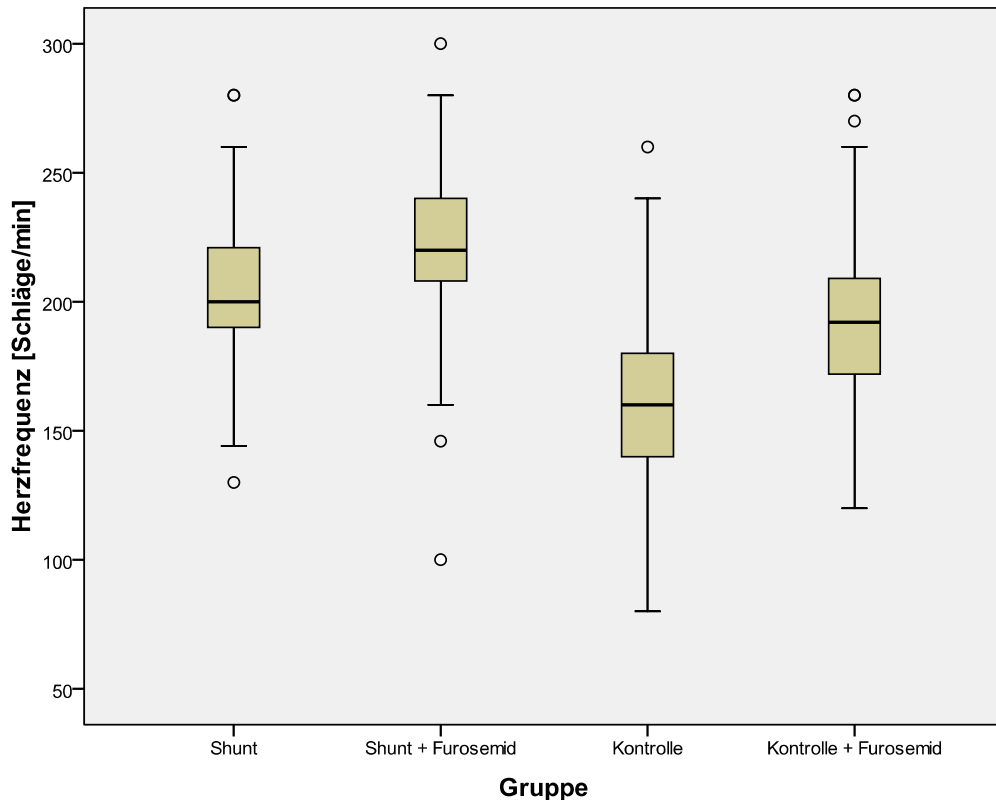


Abbildung 3.2 Herzfrequenz im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	> 0,00
Shunt – Shunt + F	> 0,00
Kontrolle – Kontrolle + F	> 0,00

Zu erkennen ist, dass die Herzfrequenz der Shunttiere signifikant ($p=0,00$) höher ist als die der gesunden Tiere. Auffallend ist, dass beide Gruppen mit Furosemid (Shunt + F und Kontrolle + F) eine höhere Frequenz haben als jeweilige die Vergleichsgruppe ($p=0,00$). D.h. die Herzfrequenz der Kontrolle + F ist höher als die der Kontrolle – F und die der Shunttiere + F ist höher als die der Shunttiere – F.

3.2.2 Atemfrequenz (RR)

Die Tiere wurden täglich untersucht und die Atemfrequenz auskultatorisch bestimmt (Abbildung 3.3).

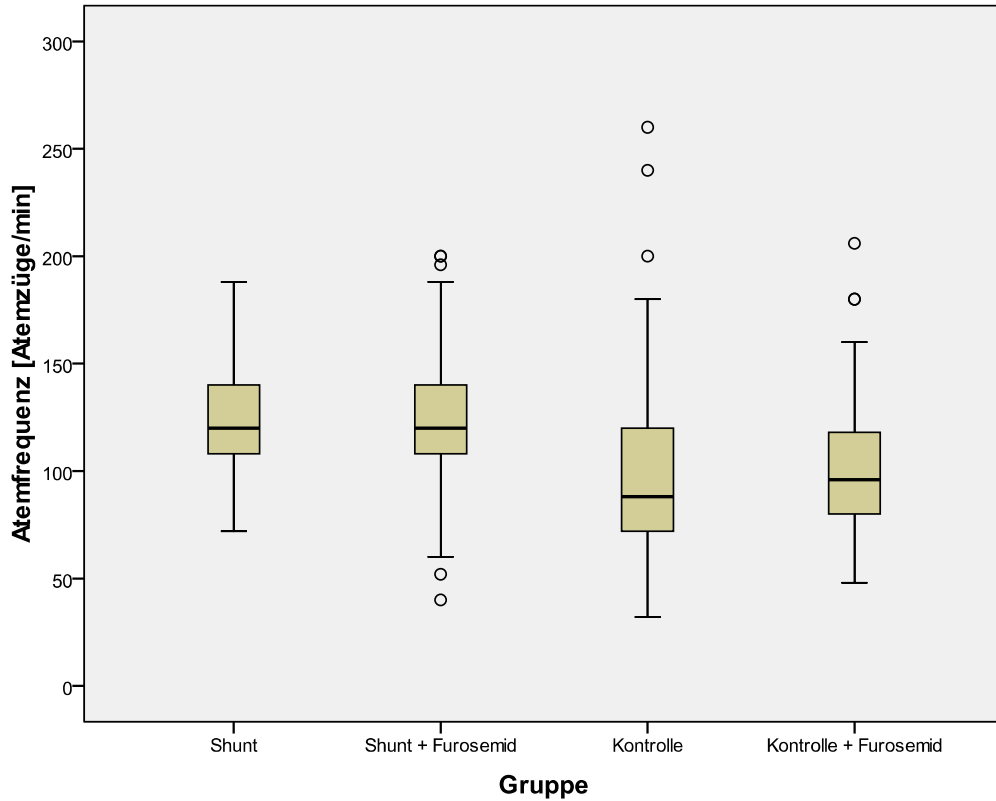


Abbildung 3.3 Atemfrequenz im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	> 0,00
Shunt – Shunt + F	0,95
Kontrolle – Kontrolle + F	0,176

Die Shunt-Tiere haben eine signifikant ($p=0,00$) höhere Atemfrequenz als die gesunden Kontrolltiere. Ebenso verhält es sich bei den beiden Shunt-Tieren mit Furosemid im Vergleich mit den Kontroll-Tieren mit Furosemid. Es besteht jedoch kein Unterschied zwischen der Shuntgruppe und der Shuntgruppe mit Furosemid.

3.3 Hämodynamische Messungen

Die bei den hämodynamischen Messungen (siehe 2.3.8) gewonnenen Daten werden digital gespeichert, ausgewertet und mit Hilfe von Boplots dargestellt

3.3.1 Mittlerer Pulmonalarteriendruck (mPAP)

Der mPAP ist bei keiner der verglichenen Gruppen signifikant verändert.

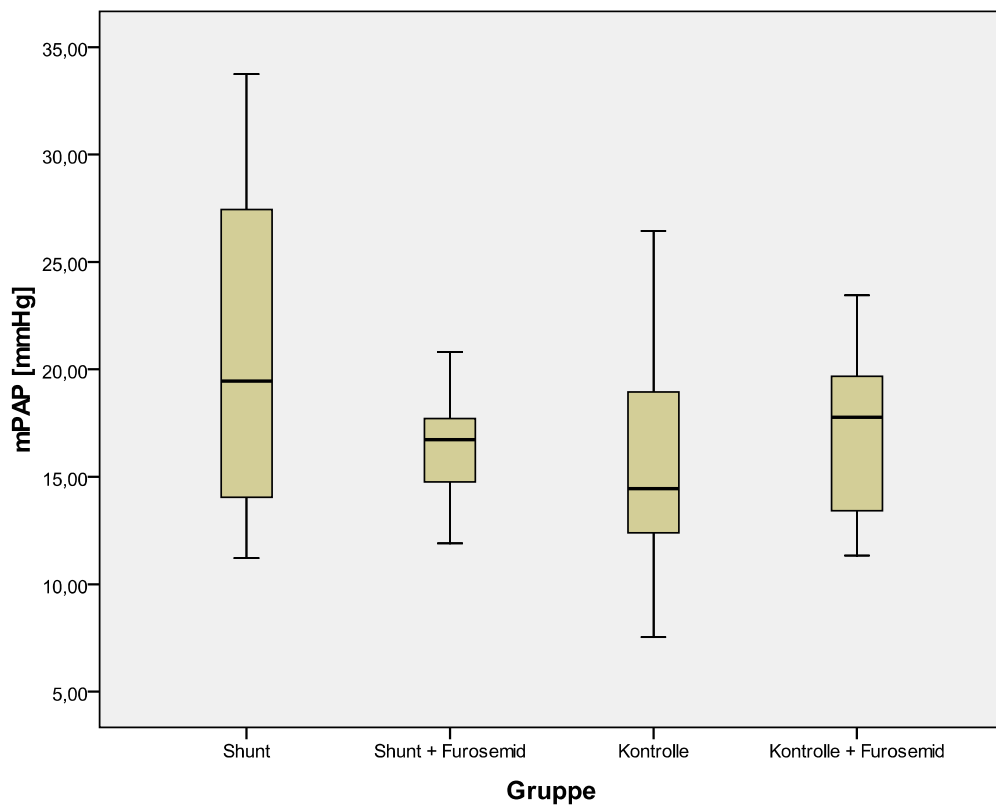


Abbildung 3.4 Mittlerer Pulmonalarteriendruck im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,096
Shunt – Shunt + F	0,15
Kontrolle – Kontrolle + F	0,364

3.3.2 Verhältnis von mPAP : mSAP

Das Verhältnis aus mPAP : mSAP ist bei keiner der verglichenen Gruppen signifikant verändert.

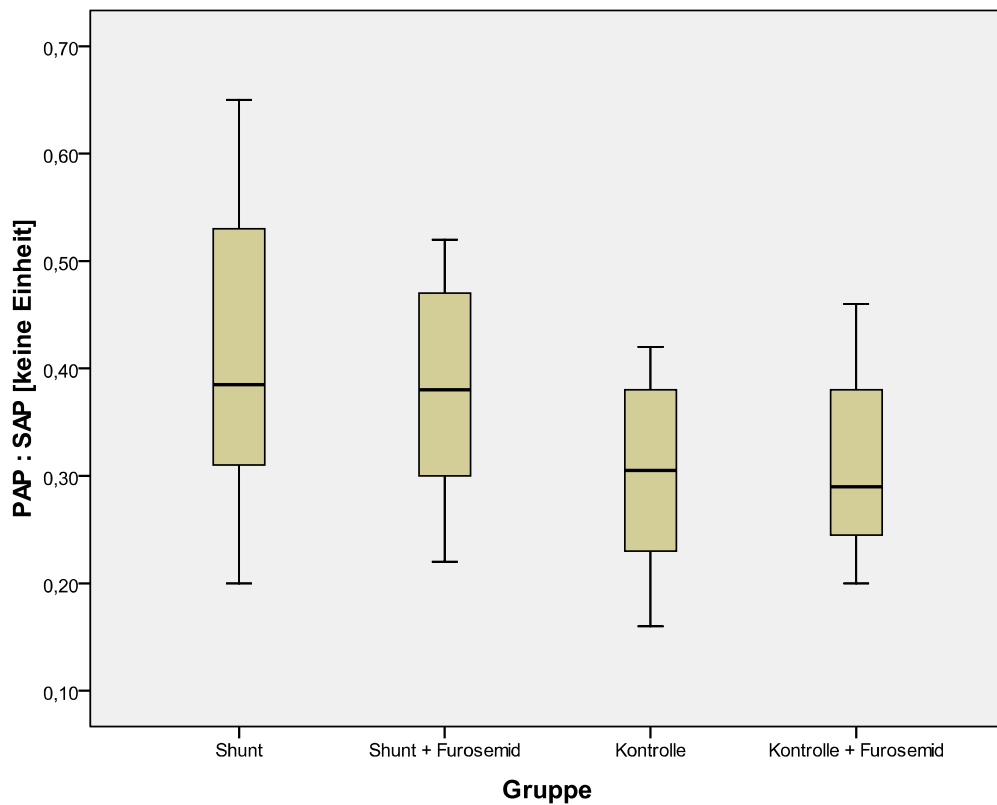


Abbildung 3.5 Verhältnis von mPAP : mSAP im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,09
Shunt – Shunt + F	0,60
Kontrolle – Kontrolle + F	0,88

3.3.3 Pulmonaler Druckgradient (mPAP – mLAP)

Der Unterschied bei pulmonalen Druckgradienten ist bei keiner der verglichenen Gruppen signifikant.

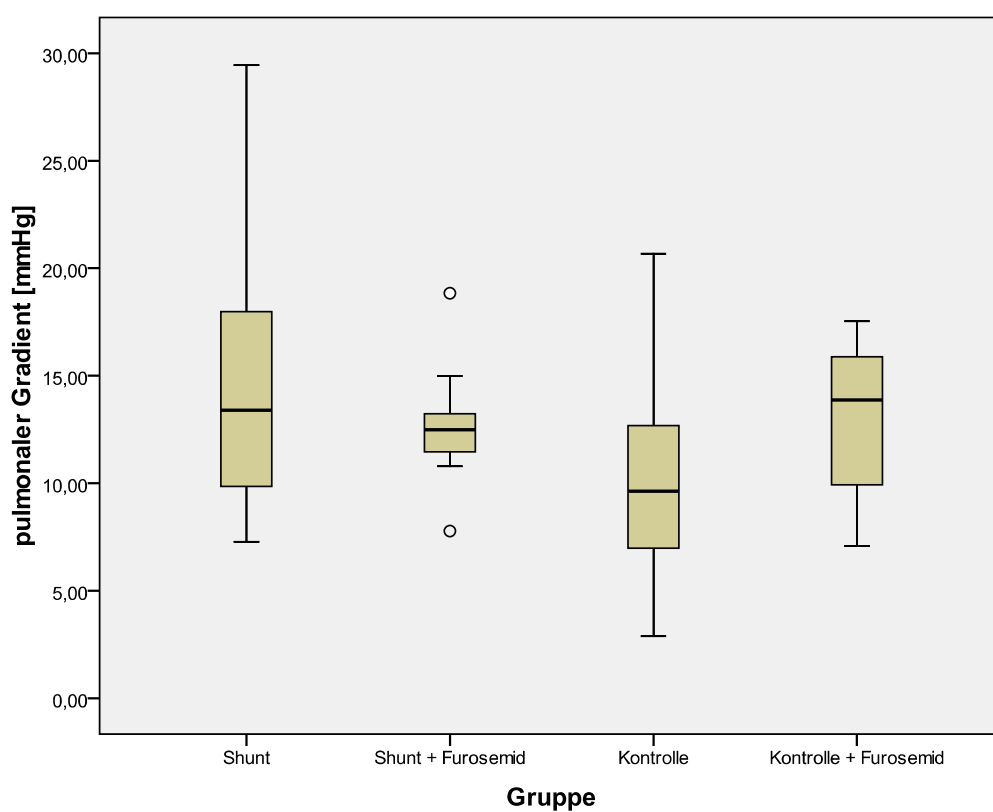


Abbildung 3.6 Pulmonaler Druckgradient im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,08
Shunt – Shunt + F	0,45
Kontrolle – Kontrolle + F	0,13

3.3.4 Blutfluss Lunge / Körpergewicht (Q / kgKG)

Der Blutfluss/kg ist bei der Shunt-Gruppe im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe signifikant erhöht. Im Vergleich der Shunt-Gruppe mit der Shuntgruppe mit Furosemid ist kein signifikanter Unterschied vorhanden.

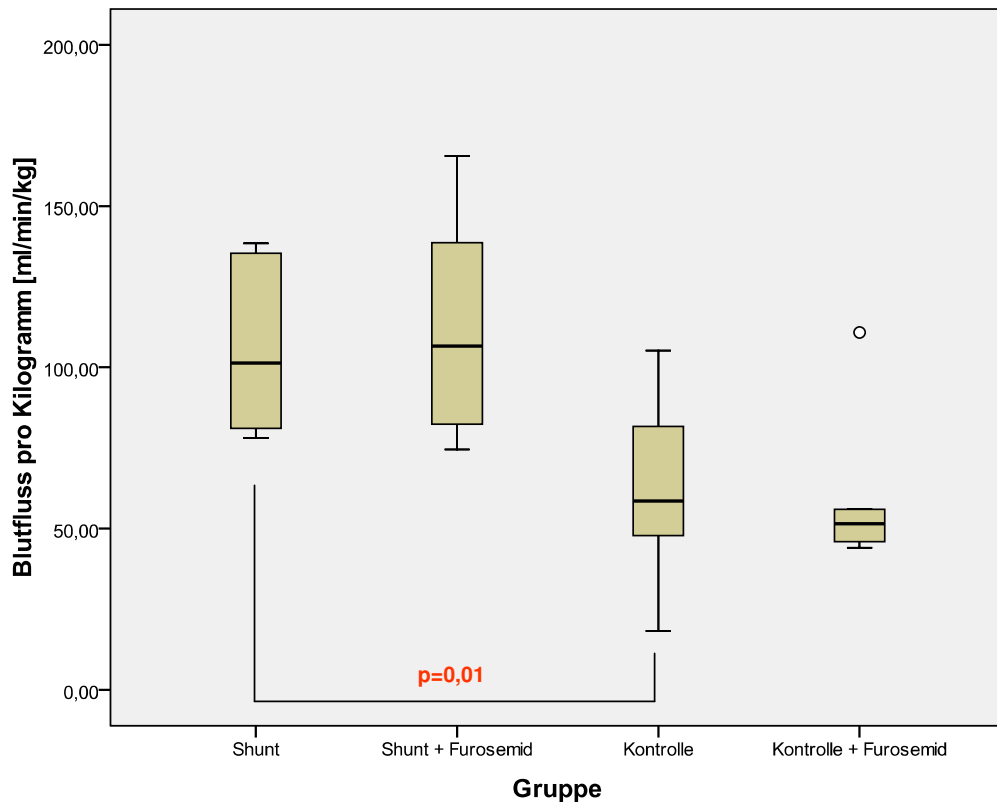


Abbildung 3.7 Blutfluss Lunge / Körpergewicht im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,01
Shunt – Shunt + F	0,55
Kontrolle – Kontrolle + F	0,94

3.3.5 Pulmonalvaskulärer Widerstand (PVR)

Der pulmonalvaskuläre Widerstand ist bei keiner der verglichenen Gruppen signifikant verändert.

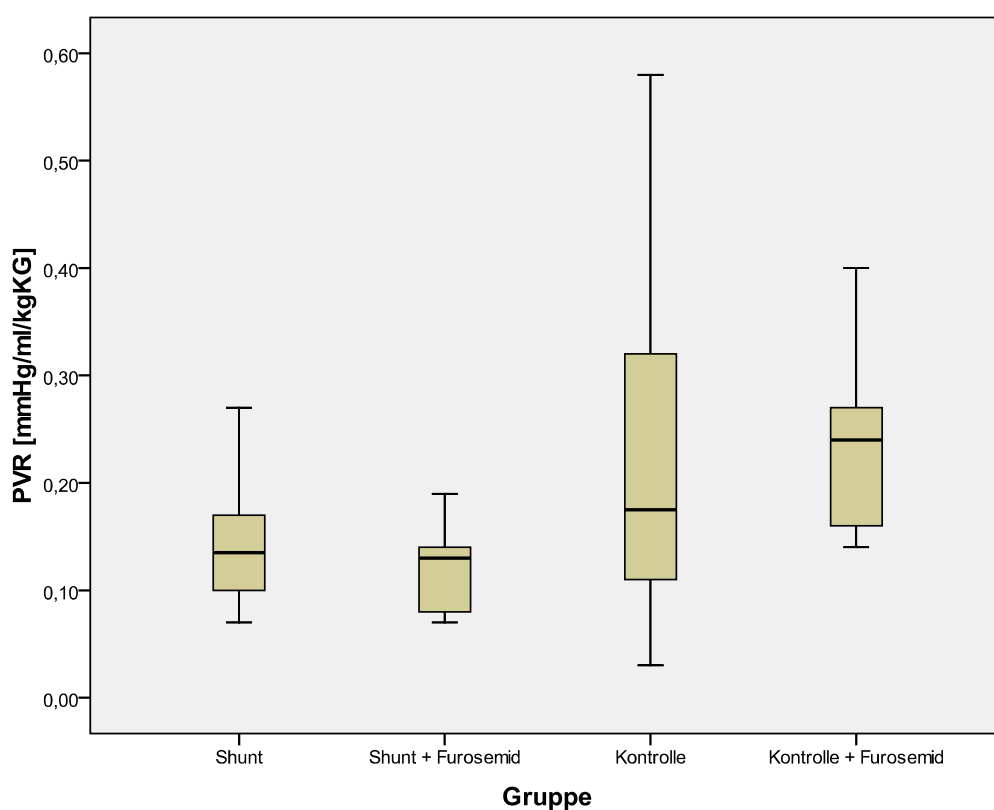


Abbildung 3.8 Pulmonalvaskulärer Widerstand im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,31
Shunt – Shunt + F	0,38
Kontrolle – Kontrolle + F	0,36

3.3.6 Lungenblutfluss : Systemblutfluss (Qp : Qs)

Das Verhältnis Lungenblutfluss zu Systemblutfluss ist in der Shunt-Gruppe signifikant erhöht. Beim Vergleich der Shunt-Gruppe mit der Shunt-Gruppe mit Furosemid ist kein signifikanter Unterschied vorhanden.

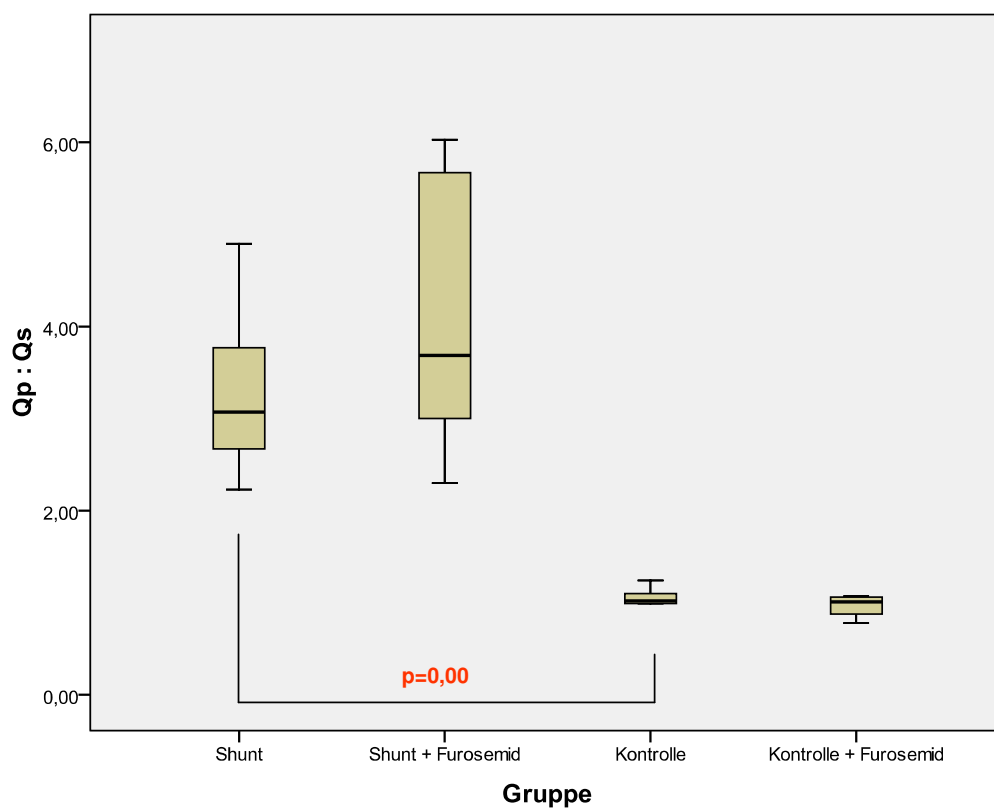


Abbildung 3.9 Lungenblutfluss : Systemblutfluss im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	> 0,00
Shunt – Shunt + F	0,20
Kontrolle – Kontrolle + F	0,15

3.3.7 Mittlerer Blutdruck im linken Vorhof (mLAP)

Der mLAP ist bei den Shunt-Lämmern mit Furosemid signifikant niedriger ($p=0,03$) als bei den Shunt-Lämmern ohne Furosemid.

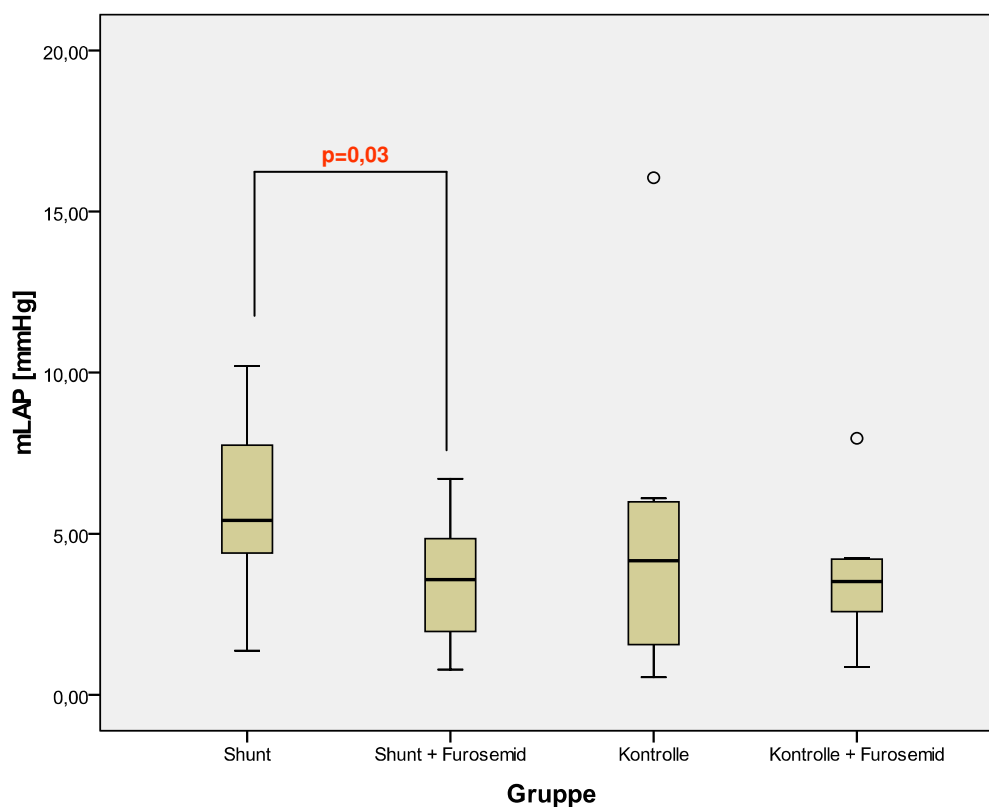


Abbildung 3.10 Mittlerer Blutdruck im linken Vorhof im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,26
Shunt – Shunt + F	0,03
Kontrolle – Kontrolle + F	0,60

3.3.8 Mittlerer Blutdruck im rechten Vorhof (mRAP)

Der mRAP ist bei keiner der verglichenen Gruppen signifikant verändert.

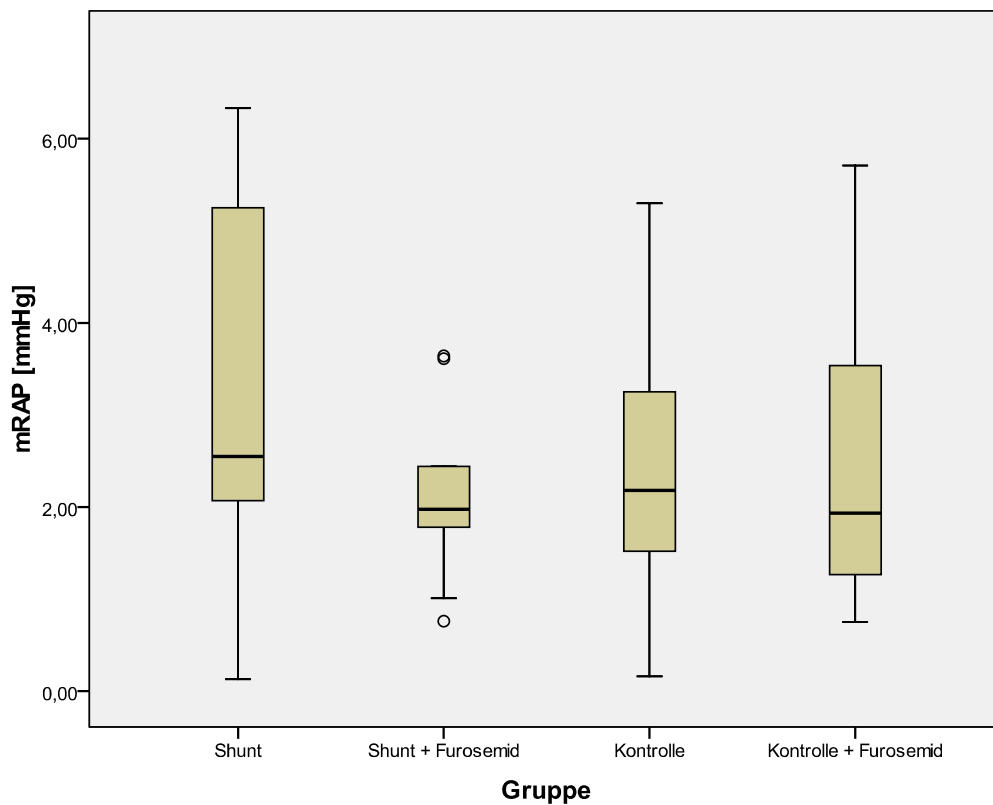


Abbildung 3.11 Mittlerer Blutdruck im rechten Vorhof im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,29
Shunt – Shunt + F	0,08
Kontrolle – Kontrolle + F	0,65

3.3.9 Systemvaskulärer Widerstand (SVR)

Der systemvaskuläre Widerstand ist bei den Shunt-Tieren im Vergleich zu den Kontroll-Tieren signifikant erhöht. Bei dem Vergleich der Shunt-Tiere mit den Shunt-Tieren mit Furosemid ist kein signifikanter Unterschied vorhanden.

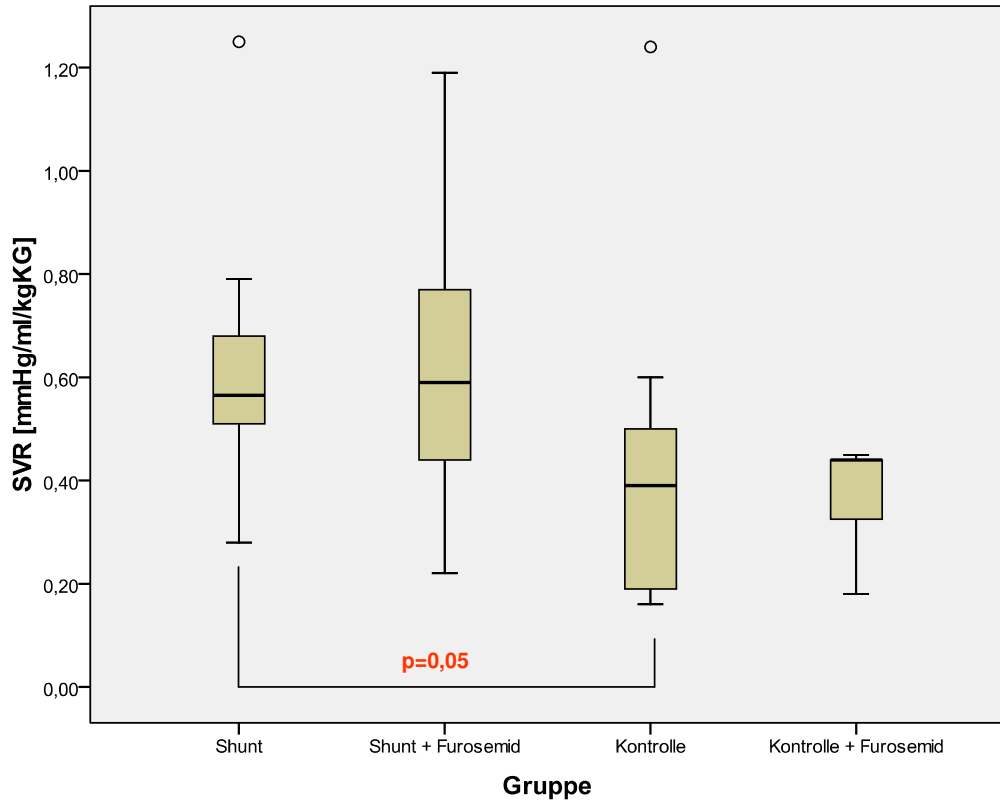


Abbildung 3.12 Systemvaskulärer Widerstand im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,05
Shunt – Shunt + F	0,97
Kontrolle – Kontrolle + F	0,62

3.3.10 Mittlerer systemarterieller Blutdruck (mSAP)

Der mSAP ist bei keiner der verglichenen Gruppen signifikant verändert.

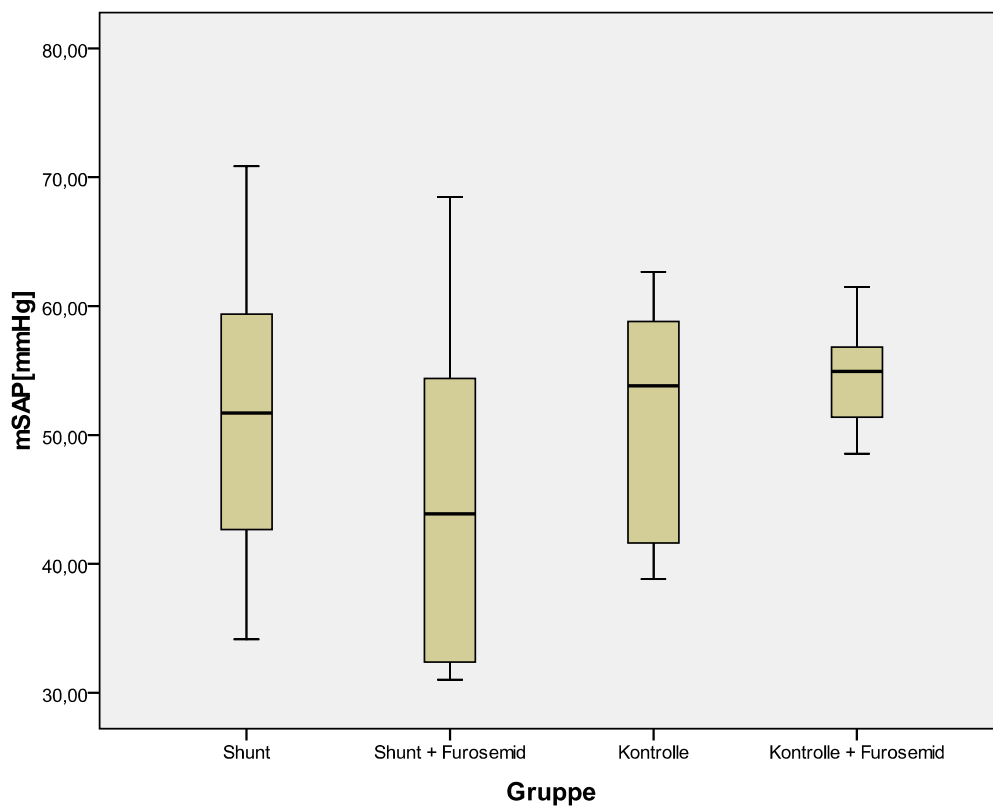


Abbildung 3.13 Mittlerer systemarterieller Blutdruck im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,45
Shunt – Shunt + F	0,97
Kontrolle – Kontrolle + F	0,23

3.3.11 Diastolischer systemarterieller Blutdruck (dSAP)

Der dSAP ist bei der Shunt-Gruppe im Vergleich zu der gesunden Kontroll-Gruppe signifikant erniedrigt ($p=0,00$). Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich der anderen Gruppen (Abbildung 5.8).

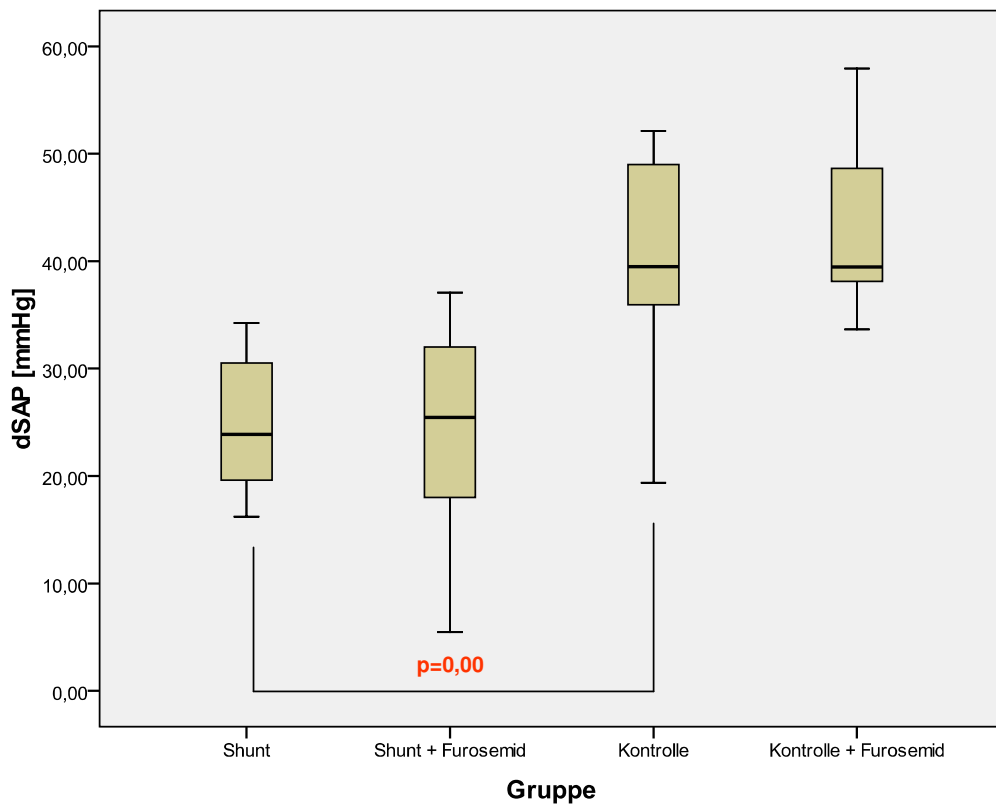


Abbildung 3.14 Diastolischer systemarterieller Blutdruck im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	> 0,00
Shunt – Shunt + F	1,00
Kontrolle – Kontrolle + F	0,34

3.3.12 Systolischer systemarterieller Blutdruck (sSAP)

Der sSAP ist bei keiner der verglichenen Gruppen signifikant verändert.

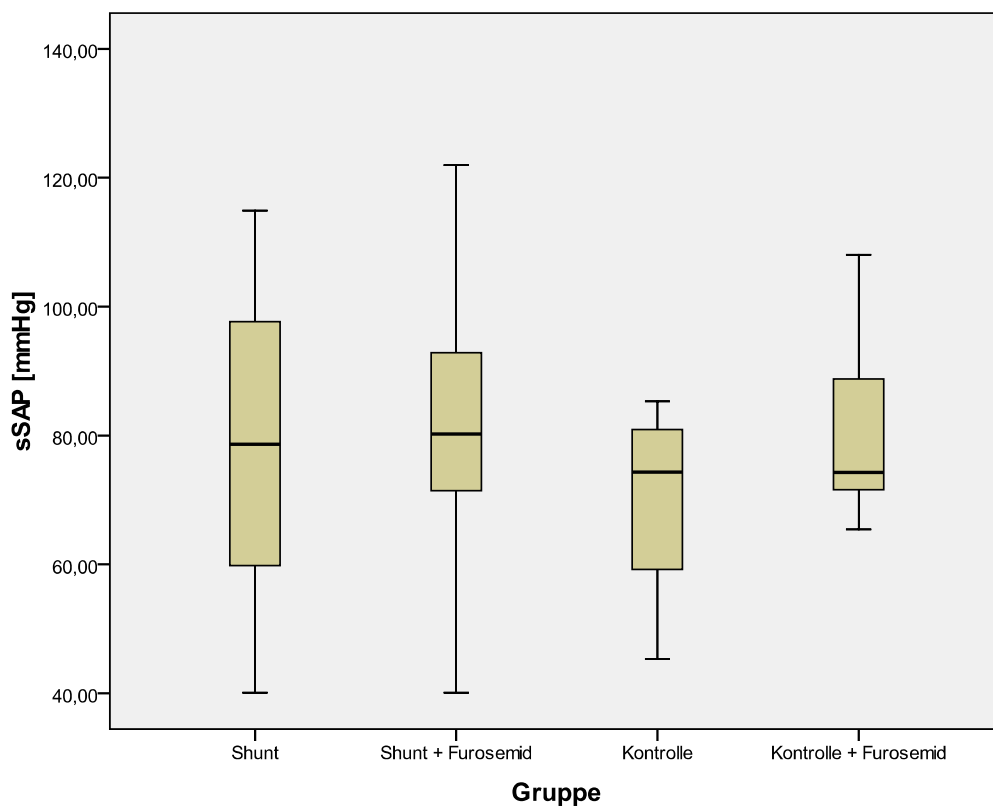


Abbildung 3.15 Systolischer systemarterieller Blutdruck im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,45
Shunt – Shunt + F	0,97
Kontrolle – Kontrolle + F	0,23

3.3.13 Pulsamplitude (sSAP-dSAP)

Bei der Shunt-Gruppe ist im Vergleich zur Kontrollgruppe der pulse pressure signifikant erhöht. Bei dem Vergleich der Shuntgruppe + F mit der Shuntgruppe – F besteht kein signifikanter Unterschied.

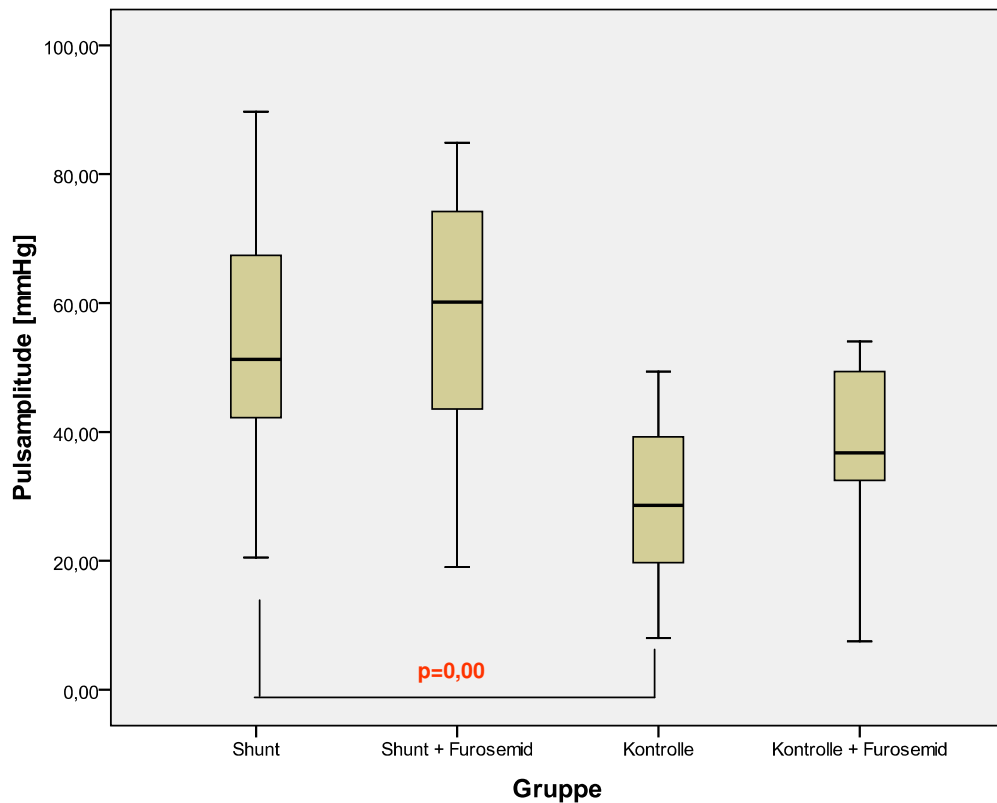


Abbildung 3.16 Pulsamplitude im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	> 0,00
Shunt – Shunt + F	0,55
Kontrolle – Kontrolle + F	0,33

3.3.14 Herzfrequenz (HR)

Die Herzfrequenz ist bei keiner der verglichenen Gruppen signifikant verändert.

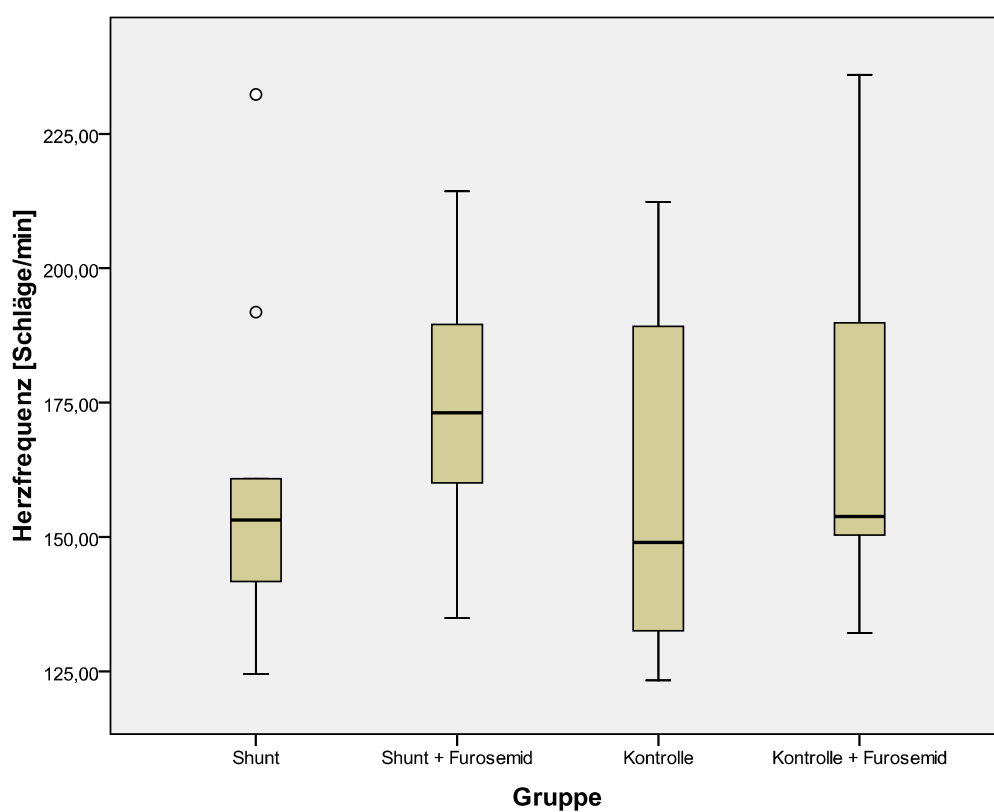


Abbildung 3.17 Herzfrequenz im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,94
Shunt – Shunt + F	0,15
Kontrolle – Kontrolle + F	0,33

3.4 Blutwerte

3.4.1 pH-Wert (pH)

Der pH-Wert der Baseline ist bei der Shunt-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Der pH-Wert ist ebenfalls bei der Kontrollgruppe mit Furosemid im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Diese pH-Werte sind allerdings schon teilweise mit Natrium-Bikarbonat gepuffert. Der pH-Wert vor der hämodynamischen Messung (präOP) ist bei der Shunt-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht. Der pH-Wert bei der Kontrollgruppe mit Furosemid im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ist ebenfalls signifikant erhöht.

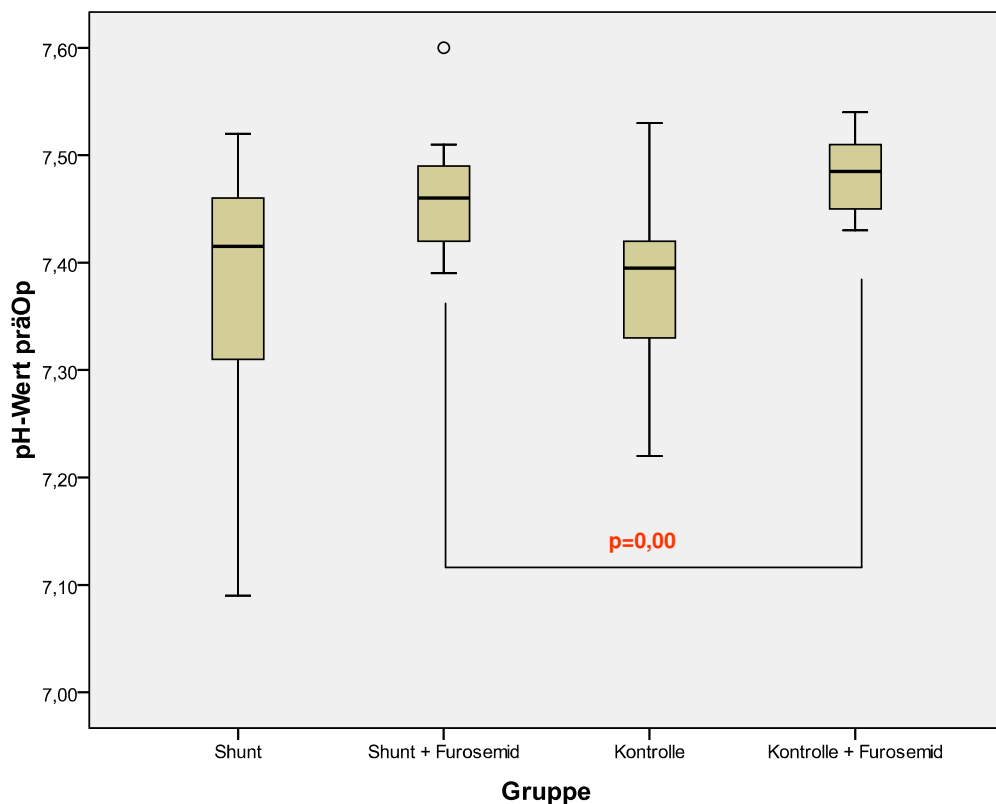


Abbildung 3.18 pH-Wert im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,65
Shunt – Shunt + F	0,17
Kontrolle – Kontrolle + F	0,01

3.4.2 Hämoglobin (Hgb)

Der Hgb-Wert ist bei der mit Furosemid behandelten Shunt-Gruppe im Vergleich zur Shunt-Gruppe aber auch zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Der Hgb-Wert ist aber bei der Kontrollgruppe mit Furosemid im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Furosemid signifikant erhöht.

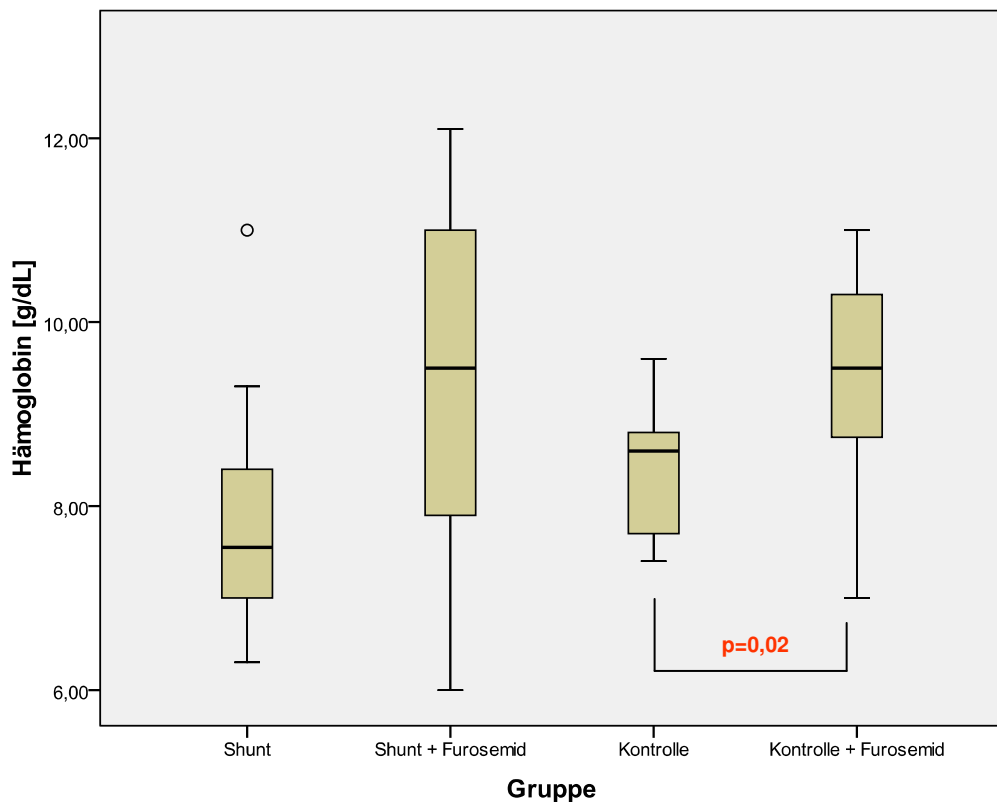


Abbildung 3.19 Hämoglobin im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,10
Shunt – Shunt + F	0,10
Kontrolle – Kontrolle + F	0,02

3.4.3 Kalium (K)

Der Kalium-Wert bei Beginn der hämodynamischen Messung ist bei der mit Furosemid behandelten Shunt-Gruppe im Vergleich zur Shunt-Gruppe aber auch zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert. Der Kalium-Wert ist aber bei der Kontrollgruppe mit Furosemid im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Furosemid signifikant erniedrigt.

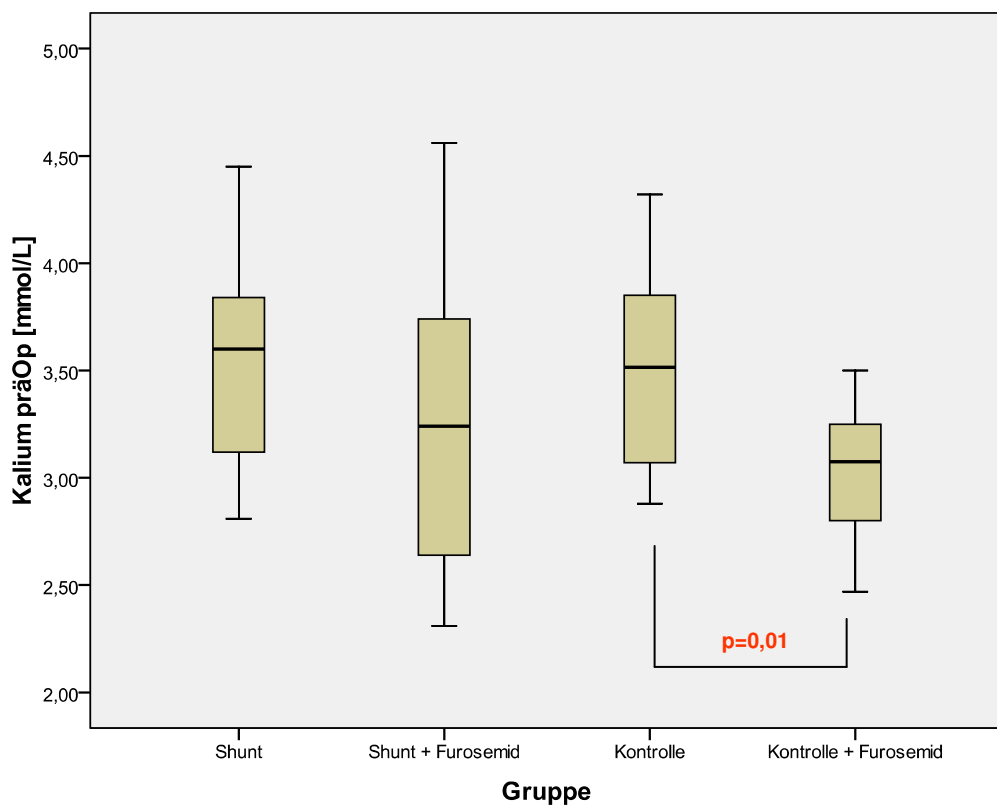


Abbildung 3.20 Kalium im Gruppenvergleich

Gruppenvergleich	p-Werte
Shunt – Kontrolle	0,97
Shunt – Shunt + F	0,41
Kontrolle – Kontrolle + F	0,01

4 DISKUSSION

Ziel der Studie war es, die hämodynamischen Auswirkungen von Furosemid auf das pulmonale Gefäßbett von drei Wochen alten Lämmern, mit intrauteriner Anlage eines großen, aortopulmonalen Shunts darzustellen. Die Beobachtungen vorhergehender Studien mit AP-Shunt-Modellen bei Lämmern geben bereits Hinweise auf eine direkte, vasodilatative Wirkung auf Pulmonalgefäße [27]. Fratz et al. 2004 hat eine Serie von Lämmern mit intrauterin angelegten Ap-Shunt untersucht, bei denen ab dem Tag der Geburt zweimal täglich Furosemid in einer therapeutischen Dosis (1mg/kg) intramuskulär appliziert wurde. Im Vergleich zu historischen Shunt-Kontrollen von Reddy et al. [60] war der pulmonalarterielle Druck erniedrigt, der pH erhöht und das Pulmonary vascular remodeling weniger stark ausgeprägt [27]. Diese Hinweise sollten hier in einer direkten Vergleichsstudie auf eine statistische Signifikanz geprüft werden. Die, unabhängig von der diuretischen Wirkung, vasoaktiven Effekte des Furosemids sollten hier besonders im Zusammenhang mit erhöhten Lungenblutfluss (Q_p), erhöhten Lungenblutdruck (PAP) und beginnendem Pulmonary vascular remodeling dargestellt werden. Die Studie sollte eine Antwort geben, inwieweit Furosemid Einfluss auf die pulmonale Hämodynamik dieser Lämmer und damit der Lungenarterien nimmt.

Furosemid hat keine signifikante Auswirkung auf die Hämodynamik des pulmonalarteriellen Gefäßbetts, weder im Vergleich der Shuntgruppen noch der gesunden Kontroll-Tiere. Es ist kein signifikanter Unterschied bei dem Pulmonalarteriendruck PAP, dem pulmonalen Gradienten, dem Lungenblutfluss ($Q/kgKG$), dem pulmonalen Gefäßwiderstand (PVR), dem Verhältnis des Lungenblutdrucks und des Systemblutdrucks (PAP:SAP), sowie dem Verhältnis von $Q_p:Q_s$ zu sehen. All diese Werte der hämodynamischen Messungen sind in jeglicher Gruppe durch Furosemid-Gabe nicht signifikant beeinflusst worden. Auch der Druck im rechten Vorhof (RAP), der systemarterielle Druck (SAP) und die Herzfrequenz (HR) waren unverändert. Lediglich der Druck im linken Vorhof (LAP) ist durch Furosemid signifikant gesenkt worden.

Diese Ergebnisse der hämodynamischen Messung lassen den Schluss zu, dass Furosemid nicht in der Lage ist, signifikant Einfluss auf die pulmonalarterielle Hämodynamik von Lämmern mit AP-Shunt zu nehmen. Im Rahmen dieses Tiermodells konnte ein direkt dilatativer Effekt an den Pulmonalarterien durch Furosemid nicht beobachtet werden. Deshalb erfolgt die vermutete Dilatation oder Relaxation der Pulmonalarterien nicht. Somit kann der Blutdruck in der Lunge, bei gleich bleibendem Fluss, nicht gesenkt werden. Der Druck im linken Vorhof (LAP) war bei der mit Furosemid behandelten Shunt-Gruppe signifikant gesenkt im Vergleich zu der unbehandelten Shunt-Gruppe. Daraus lässt sich folgern, dass Furosemid eine dilatative Wirkung auf die Lungenvenen hat und so als Vorlastsenker funktioniert.

Bei der Interpretation der Ergebnisse aus der hämodynamischen Untersuchung muss zwischen tatsächlich gemessenen Werten und den aus diesen Messwerten errechneten Ergebnissen unterschieden werden. Den berechneten Werten liegen oft physikalische Gesetze zu Grunde, die nur eingeschränkt direkt auf einen lebenden Organismus übertragen werden können. Genauere und verlässlichere Werte sind demnach die direkt invasiv, mittels Druckwandler ermittelten Drücke und mittels Flusssonde gemessenen Q_p bzw. Q_p/kg .

Der Lungenblutfluss ist bei den Shunt-Tieren aufgrund der Gefäßanastomose erhöht. Über diese künstliche Verbindung fließt durch den Lungenkreislauf ein um ein Vielfaches höheres Blutvolumen als durch den Körperkreislauf. Deshalb ist der Quotient $Q_p:Q_s$ im Vergleich zu den gesunden Tieren signifikant erhöht. Dies ist ein wichtiger Parameter für eine erfolgreiche intrauterine Platzierung der aortopulmonalen Anastomose. Er dient in der Shuntgruppe als Einschlusskriterium. Ein aortopulmonaler Shunt wird in der Klinik als solcher ab einem Wert von $Q_p:Q_s > 1,5$ definiert. Die Intention bei der chirurgischen Applikation ist es, einen funktional möglichst großen Shunt einzubauen. Aufgrund der Komplexität von lebendem Gewebe ist es nicht möglich einen funktional immer gleich großen Shunt einzusetzen, weshalb sich eine Streuung von $Q_p:Q_s$ 2,2-6,0 nicht vermeiden ließ. Trotz eines gut etablierten und standardisierten Operationsverfahren mit einem wenig fluktuierenden

Team und immer dem selben Chirurgen, ergeben sich interindividuell abweichende, anatomische Positionen der Gefäßanastomose. Dies führt zu Unterschieden in der hämodynamischen Situation des Shuntgeschehens. Die intrauterine Lage, die Größe und die Zugänglichkeit des Fötus während des operativen Eingriffs sind entscheidend für die Lage des Shunts und somit für die spätere Hämodynamik. Eine weitere, nicht zu vermeidende Ungenauigkeit, könnte aus den für die Berechnung von $Q_p:Q_s$ gewonnenen Blutproben für die Messung der Sauerstoffsättigung liegen. Die Berechnung ist aber bei Raumluftventilation mit 21% O₂ und exakt gleichzeitiger Probenentnahme, sowie unmittelbarer Aufarbeitung der Proben und täglich geeichten Sättigungsmessgerät, sehr genau.

Der LAP war bei den Shunt-Tieren im Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht. Dies hat seinen Grund in der Überdurchblutung der Lungen durch die Gefäßanastomose. $Q_p:Q_s$ -Werte im Mittel von 3,33 bedeuten, dass die Lungen um ein Vielfaches von 3,33 in Relation zu dem Körper durchblutet werden. Aufgrund dieser erhöhten Durchblutung steigt die Vorlast im linken Ventrikel. Dies stellt sich oft makroskopisch, anatomisch durch einen stark vergrößerten linken Vorhof dar.

Bei den mit Furosemid behandelten Shunt-Tieren war LAP signifikant gesenkt im Vergleich zu den unbehandelten Shunt-Tieren. Das könnte durch eine Volumenreduzierung infolge der Diurese erklärt werden. Wenn es durch die Diurese zu einer allgemeinen Reduzierung des Blutvolumens kommt, wird dadurch auch die Menge an Blut verringert, die durch die Lunge fließt. Eine andere mögliche Erklärung wäre eine Dilatation der Lungenvenen. Diese könnte den Druck in den Lungenvenen sinken lassen und dadurch auch die Vorlast senken. Dies wäre ein direkt dilativer Effekt von Furosemid in den Pulmonalvenen. Dies könnte neben der Volumenreduzierung eine Besserung der klinischen Symptomatik der Patienten mit PAH mit Herzinsuffizienz erklären.

Es ist kein signifikanter Unterschied bei PAP zu sehen im Vergleich der Shunt-Tiere mit Furosemid und der Shunt-Tiere ohne Furosemid. Auch der Lungenblutfluss Q ist in keiner der Gruppen durch die Gabe von Furosemid signifikant geändert worden. Aus den Werten PAP, LAP und Q kann man dann den Gefäßwiderstand mit Hilfe der hydraulischen

Abwandlung des Ohm'schen und des Hagen-Poiseuille'schen Gesetz berechnen.

Formel 4.1 Berechnung des PVR:

$$PVR = \frac{mPAP - mLAP}{Q_{PA} / kg}$$

Wichtig ist im Rahmen dieser mathematisch, physikalischen Herangehensweise, Grenzen in der Übertragbarkeit auf einen lebenden Organismus zu erwähnen. Die genannten Grenzen der Anwendbarkeit der physikalischen Gesetze gelten dabei für die Kontrollgruppe ebenso wie für die Shuntgruppe, was einen Vergleich der Werte untereinander erlaubt. Nach Poiseuille ist in dieser Gleichung die Viskosität konstant und der Fluss laminar und kontinuierlich. Im lebenden Organismus sind diese Parameter nicht konstant. Der Fluss ist pulsatil und nicht laminar. Darüber hinaus gilt das Gesetz nur für newtonsche Flüssigkeiten. Blut ist jedoch eine Suspension korpuskulärer und flüssiger Bestandteile. Die Scherspannung von Blut verhält sich nicht proportional zu seiner Schergeschwindigkeit [62]. Blut kann in seiner Viskosität stark variieren, während die Viskosität einer newtonschen Flüssigkeit nur von deren Temperatur abhängig ist. Im Blut wird sie maßgeblich durch den Hämatokrit-Wert bestimmt. Dieser wiederum unterliegt einer Vielzahl physiologischer Faktoren. So ist dieser beispielsweise beim Säugling oder einer Dehydratation höher. Außerdem beruht die Definition des Gesetzes auf Experimenten an starren Glasrohren [62]. Das Gefäßsystem hingegen ist nicht starr, sondern elastisch und unterliegt zudem starken, bereits genannten, pulsatilen Einflüssen. Der Gefäßdurchmesser ändert sich mit der Pulsation. Das durchschnittliche Ausmaß dieser Veränderung wiederum, wird durch die Compliance der Gefäßwand bestimmt, die ihrerseits zwischen Venen und Arterien und in Abhängigkeit von deren Größe stark variiert [50]. Aus all diesen Gründen ist der errechnete PVR immer kritisch zu betrachten.

Ein weiterer gemessener Parameter ist das Körpergewicht. Hier ist ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen. Der durch die Diurese bewirkte Flüssigkeitsverlust ist somit nicht sichtbar. Da in der Studie Einlingstiere genauso wie Zwillingt看iere

vorhanden sind, ist es schwierig das Gewicht für einen genaueren Vergleich heranzuziehen. Die Einlingstiere sind bei Geburt signifikant schwerer als die Zwillingstiere. Bei den klinischen Untersuchungen gibt es bei den Shunt-Tieren Hinweise darauf, dass diese zwar häufig mit einem höheren Geburtsgewicht als ihre Geschwister auf die Welt kamen, aber dann oft bis zur hämodynamischen Messung mit drei Wochen weniger an Gewicht zugelegt hatten als die gesunden Geschwister. Das höhere Geburtsgewicht könnte auf die intraabdominale Lage des operierten Tieres zurück zu führen sein. Der leichter für die Operation zugängliche Fötus könnte in seiner Entwicklung von der freieren Lage im Abdomen der Mutter profitiert haben. Möglich ist auch, dass das schwerere Geschwister durch die Gravitationskräfte weiter ventral im Abdomen liegt und dadurch dem Operateur besser zugänglich ist. Wegen dieser vielen Variablen sieht man beim Körpergewicht statistisch keinen signifikanten Unterschied zwischen den vier Gruppen. Zusätzlich sind bei einer Tierzahl von 10 in jeder Gruppe die Unterschiede vermutlich nicht groß genug, um statistisch signifikante Werte zu sehen. Bei der täglichen klinischen Untersuchung der Tiere ist es offensichtlich, dass sich die Shunt-Tiere schlechter entwickeln als ihre gesunden Geschwister. Der AP-Shunt ist deutlich als systolisches Herzgeräusch wahrzunehmen und die Atemfrequenz sowie die Herzfrequenz sind bei den Shunt-Gruppen signifikant erhöht. Der Brustkorb der Shunt-Tiere vibriert deutlich spürbar und es kommt in einigen Fällen zu einer leichten Fassbildung des Thorax. Auch die Mortalität der Shunt-Tiere (29%) ist deutlich höher als die Kontroll-Tiere (13%). Die Shunt-Tiere müssen mehr Energie aufwenden um die Sauerstoffversorgung zu gewährleisten und haben somit einen höheren Grundumsatz. Sie sind zudem sehr anfällig für Infektionen. Interessant ist, dass es durch die Furosemidbehandlung sowohl bei den Shunt-Gruppen als auch bei den gesunden Kontrollen zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz kam. Das bedeutet die Herzfrequenz der Kontrollen mit Furosemid ist höher als die der Kontrollen ohne Furosemid. Auch bei den Shunt-Tieren ist die Herzfrequenz mit Furosemid höher als bei den Shunt-Tieren ohne Furosemid. Eine Erklärung für den Anstieg der Herzfrequenz durch das Furosemid könnte der Verlust an Kalium sein. Bei einer Hypokaliämie kann es zu Herzrhythmusstörungen, wie zum Beispiel

Extrasystolen, kommen und in selteneren Fällen tritt Vorhof- und Kammerflimmern auf. Die Kaliumwerte der Tiere mit Furosemid Behandlung sind zumindest bei den Kontroll-Tieren mit Furosemid im Vergleich zu den gesunden Kontroll-Tieren ohne Furosemid signifikant erniedrigt. Trotzdem ist es fraglich ob die Herzfrequenzerhöhung durch diesen Kaliumverlust zu erklären ist, denn bei einem signifikanten Kalium-Mangel sind Herzrhythmusstörungen als Nebenwirkung beschrieben, nicht aber ein Herzfrequenzanstieg. Eine andere mögliche Erklärung könnte eine Dehydratation durch das Furosemid sein. Gerade bei Neugeborenen kommt es durch einen Volumenmangel zu einem Herzfrequenzanstieg und auch zu einer Steigerung der Atemfrequenz.

Bei der Messung von Hämoglobin zeigt sich ein signifikanter Anstieg durch die Furosemidgabe bei den gesunden Kontrollen. Dies lässt sich auch durch die dehydrierende Wirkung von Furosemid erklären.

Bei der Blutgasanalyse der drei Wochen alten Tiere ergaben sich durch die Furosemidbehandlung beim Vergleich der gesunden Kontroll-Tiere signifikante Elektrolytverschiebungen. So war durch die Applikation von Furosemid bei den Kontroll-Tieren der pH-Wert signifikant erhöht. Auch im Vergleich der Shunt-Gruppen mit und ohne Furosemid konnte man einen höheren pH-Wert durch das Furosemid sehen, was statistisch aber nicht signifikant war. Furosemid ist ein Schleifendiuretikum, welches im aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife in der Niere ein Transportprotein (einen Ionenkanal, den Natrium-Kalium-Chlorid-Cotransporter) hemmt, und so zur Ausscheidung großer Mengen von Gewebeflüssigkeit führt, die mit einem Verlust von Kalium, Natrium und Chlorid einhergehen. Als Folge der Elektrolyt- und Flüssigkeitsverluste kann sich so eine metabolische Alkalose (Anstieg des pH-Wertes im Blut) entwickeln. Dieser Elektrolytverlust zeigt sich auch in einem statistisch signifikanten Verlust an Kalium. Auch hier ist durch das Furosemid das Kalium im Vergleich der gesunden Kontroll-Gruppen gesenkt.

Die veränderten Elektrolyt-Werte (pH-Wert, Kalium, Hämoglobin) zeigten deutlich die Wirkung von Furosemid. Dies ist auch eine Positiv-Kontrolle beziehungsweise Qualitätskontrolle dieser Studie, die gemeinsam mit den Werten der hämodynamischen Messungen (Q_p/kg und $Q_p:Q_s$ -Werte) für

eine korrekte Ausführung des kompletten, sehr komplexen und aufwändigen Protokolls des Versuchsaufbaus sprechen. So ist klar ersichtlich, dass die Op-Techniken, die Applikation der Medikamente, die veterinärmedizinische Versorgung der Tiere und die hämodynamischen Messungen korrekt durchgeführt wurden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war es die extrarenalen hämodynamischen Effekte von Furosemid in einem aortopulmonalen Shunt-Modell bei Lämmern im Alter von drei Wochen zu untersuchen und statistisch darzustellen, um im Wesentlichen folgende Frage zu beantworten:

Hat Furosemid eine dilatative Wirkung auf das pulmonalarterielle Gefäßbett bei drei Wochen alten Lämmern mit aortopulmonalem Shunt?

Zusammenfassend zeigte diese Studie, dass Furosemid nicht in der Lage war signifikant auf die pulmonalarterielle Hämodynamik von Lämmern mit AP-Shunt Einfluss zu nehmen. Bei den Shunt-Gruppen sowie bei den gesunden Kontroll-Tieren konnte im Vergleich kein signifikanter Unterschied durch die Behandlung mit Furosemid festgestellt werden. Der PAP, Q/kgKG, PAP:SAP, PVR sowie der pulmonale Gradient waren nicht signifikant verändert. So lässt sich als Beantwortung zu der oben genannten Frage zusammenfassend sagen:

Im Rahmen dieses Tiermodells konnte ein dilatativer Effekt an den Pulmonalarterien durch Furosemid nicht beobachtet werden. Furosemid hat keinen signifikanten Einfluss auf die pulmonalarterielle Hämodynamik der untersuchten Lämmer. Es ist somit unwahrscheinlich, dass Furosemid in den Prozess des Pulmonary vascular remodeling eingreifen kann. Auch in der Behandlung der herzinsuffizienten Patienten mit PAH dürfte Furosemid weiterhin keine große Rolle spielen.

Die Pulmonalvenen bei den Shunt-Tieren schienen auf das Furosemid zu reagieren. Die dilatative Wirkung von Furosemid an den Pulmonalvenen könnte neben der Volumenreduzierung eine Senkung der Vorlast bewirken und damit ein sinnvoller Schutz für den linken Vorhof und den linken Ventrikel sein. Durch die geringere Vorlast kann sich der Vorhof und auch der Ventrikel besser füllen und somit auch eine effektive Auswurfleistung des linken Ventrikels gewährleistet werden und langfristig das Herz geschont werden.

6 SUMMARY

After systemic administration of furosemide in humans, haemodynamic changes, besides the diuretic effect are observed and often referred to a direct vasoactive effect. Previous in vivo and in vitro studies show that furosemide is able to relax pulmonic veins [65] and even pulmonic arteries [2, 49, 75]. In an anterior study of Fratz et al 2004 [27] shunt lambs with a daily administration of furosemide showed a decrease of PA pressure, the pH-value was increased and the pulmonic vascular remodeling seemed to be inhibited, compared to historical shunt lambs and control lambs of Reddy et al [60]. The diuretic effect of furosemide via blocking the NaKCl-cotransporter in the thick ascending limb of the loop of Henle at the luminal membrane is very well known. It makes it a strong and fast diuretic with a loss of potassium as side effect. However, the assumed direct and indirect venodilative and arteriodilative mechanisms of furosemide and its clinical relevance are still unknown. The aim of the study was to show:

Haemodynamic, vasodilative effects of furosemide in the lungs of lambs, with persisting aortopulmonary shunt with increased pulmonary bloodflow and pulmonary vascular remodeling, after three weeks.

20 fetal lambs underwent in utero placement of an aortopulmonary vascular Gore-Tex® graft (shunt lambs). To ten of those shunt lambs furosemide (1mg/kg) was administered every 12 hours for three weeks via intramuscular injection (shunt lambs with furosemide). The other ten shunt lambs were used as shunt controls (shunt lambs). After three weeks blood pressure of pulmonary artery (PAP), right atrium (RAP), left atrium (LAP), aorta (SAP) and the bloodflow of the left pulmonary artery (Q) was measured. O₂-Saturation of pulmonary artery, right ventricle, aorta and left atrium was measured. All the data was compared to ten healthy control lambs as well as ten healthy control lambs with furosemide (1mg/kg/12hrs). The result of the study is that furosemide does not have a significant effect on the pulmonary haemodynamics of lambs with persisting aortopulmonary shunt. Neither blood pressure, blood flow in the pulmonary artery, nor the pulmonary vascular resistance was significantly changed.

These data suggest, that furosemide is not able to avoid the pulmonal vascular remodeling in the lungs of children with pulmonal haemodynamic stress. The pulmonal vascular remodeling was not significantly influenced by furosemide.

7 LITERATURVERZEICHNISS

- [1] Abman, S.H., Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Neonatology*, 2007. 91(4): p. 283-90.
- [2] Abrahams, Z., Demonstration of an in vitro direct vascular relaxant effect of diuretics in the presence of plasma. *Journal of Hypertension* 1996; 14 (3):381-8.
- [3] Bancalari, E., N. Claure, und A. Gonzalez, Patent ductus arteriosus and respiratory outcome in premature infants. *Biol Neonate*, 2005. 88(3): p. 192-201.
- [4] Barthelmebs, M., Vascular effects of loop diuretics: an in vivo and in vitro study in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1994
- [5] Beghetti, M., *Pulmonary Arterial Hypertension Related to Congenital Heart Disease*, Urban & Fischer, Elsevier GmbH, München, 2006
- [6] Berrazueta, JR., Vasodilatory action of loop diuretics: A plathysmography study of endothelial function in forearm arteries and dorsal hand veins in hypertensive patients and controls. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007
- [7] Black, S.M., Alterations in nitric oxide production in 8-week-old lambs with increased pulmonary blood flow. *Pediatr Res*, 2002. 52(2): p. 233-44.
- [8] Black, S.M., Altered regulation of the ET-1 cascade in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertensive. *Pediatr Res*, 2000. 47(1): p. 97-106.
- [9] Black, S.M., Emergence of smooth muscle cell endothelin B mediated vasoconstriction in lambs with experimental congenital heart disease and increased pulmonary blood flow. *Circulation*, 2003. 108(13): p. 1646-54.
- [10] Black, S.M., Increased endothelial NOS in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertensive. *Am J Physiol*, 1998. 275(5 Pt 2): p. H1643-51.
- [11] Black, S.M., sGC and PDE5 are elevated in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertensive. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 281(5): p. L1051-7.
- [12] Black, S.M., Ventilation and oxygenation induce endothelial nitric oxide synthase gene expression in the lungs of fetal lambs. *J Clin Invest*, 1997. 100(6): p. 1448-58.
- [13] Burt, C., *Pulmonary Arterial Hypertension*. *Curr Vasc Pharmacol*. 2010 Jan 1.
- [14] Chesney, C.F., Animal model: pulmonary hypertension, cor pulmonale and endocardial fibroelastosis in monocrotaline intoxicated

- nonhuman primates. *Am J Pathol*, 1973. 70(3): p. 489-92.
- [15] Chin, K.M., Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 51(16): p. 1527-38.
- [16] Corboz, R., Dilatory Effect of Furosemide on Rat Tracheal Arterioles and Venules. *Am J Respir Crit Care Med* 1997 Aug;156(2 Pt1):478-83.
- [17] Dakshinamurti, S., Pathophysiologic mechanisms of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Pulmonol*, 2005. 39(6): p. 492-503.
- [18] Dawes, G.S., Changes in the lungs of the new-born lamb. *J Physiol*, 1953. 121(1): p. 141-62.
- [19] Dawes, G.S., J.C. Mott, und J.G. Widdicombe, The foetal circulation in the lamb. *J Physiol*, 1954. 126(3): p. 563-87.
- [20] Dawes, G.S., Pulmonary circulation in the foetus and new-born. *Br Med Bull*, 1966. 22(1): p. 61-5.
- [21] Dormans, TPJ., Vascular effects of loop diuretics, Review Cardiovascular research. American Heart Association, Inc 1996
- [22] Eisenmenger, V., Die angeborenen Defekte der Kammerscheidewand des Herzens. *Z Klin Med.*, 1897. 32(Suppl): p. 1-28.
- [23] Enhorning, G., F.H. Adams, und A. Norman, Effect of lung expansion on the fetal lamb circulation. *Acta Paediatr Scand*, 1966. 55(5): p. 441-51.
- [24] Fineman, J.R., S.J. Soifer, und M.A. Heymann, Regulation of pulmonary vascular tone in the perinatal period. *Annu Rev Physiol*, 1995. 57: p. 115-34. 7
- [25] Fishman, N.H., Models of congenital heart disease in fetal lambs. *Circulation*, 1978. 58(2): p. 354-64.
- [26] Franklin, K.J., A.E. Barclay, und M.M. Prichard, Some observations on the cardio-vascular system in the viable foetal lamb. *J Anat*, 1940. 75(Pt 1): p. 75-87.
- [27] Fratz, S., Chronic endothelin A receptor blockade in lambs with increased pulmonary blood flow and pressure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L592–L597, 2004
- [28] Galiè, N., Management of pulmonary arterial hypertension associated with congenital systemic-to-pulmonary shunts and Eisenmenger's syndrome. *Drugs*, 2008
- [29] Galie, N., Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2005. 353(20): p. 2148-57.
- [30] Garne, E., Atrial and ventricular septal defects - epidemiology and spontaneous closure. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2006.19(5): p. 271- 6.

- [31] Ghorishi, Z., et al., 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*, 2007. 292(6): p. H3006-18.
- [32] Gorenflo, M., Pulmonary vascular changes in piglets with increased pulmonary blood flow and pressure. *Virchows Arch*, 2007. 450(6): p. 643-52.
- [33] Greenberg, S., Selective pulmonary and venous smooth muscle relaxation by Furosemide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Sep; 270(3): 1077-85., 1994
- [34] Hagen, P.T., D.G. Scholz, und W.D. Edwards, Incidence and size of patent foramen ovale during the first 10 decades of life: an autopsy study of 965 normal hearts. *Mayo Clin Proc*, 1984. 59(1): p. 17-20.
- [35] Hall, S.M. und S.G. Haworth, Normal adaptation of pulmonary arterial intima to extrauterine life in the pig: ultrastructural studies. *J Pathol*, 1986. 149(1): p. 55-66.
- [36] Harada, K., No Evidence of a direct venodilatory effect of Furosemide in healthy human subjects. *J Clin Pharmacol* 1996 Mar;36(3):271-3.
- [37] Haworth, S.G., Role of the endothelium in pulmonary arterial hypertonie. *Vascul Pharmacol*, 2006. 45(5): p. 317-25.
- [38] Heath, D. und J.E. Edwards, The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation*, 1958. 18(4 Part 1): p. 533-47.
- [39] Herget, J. und F. Palecek, Experimental chronic pulmonary hypertension. *Int Rev Exp Pathol*, 1978. 18: p. 347-406.
- [40] Hess, J., The serum- and glucocorticoid-inducible kinase Sgk-1 is involved in pulmonary vascular remodeling: role in redox-sensitive regulation of tissue factor by thrombin. *Circ Res*. 2006 Mar 31; 98(6): 828-36. Epub 2006 Feb 16.
- [41] Heymann, M.A. und A.M. Rudolph, Effect of exteriorization of the sheep fetus on its cardiovascular function. *Circ Res*, 1967. 21(5): p. 741-5.
- [42] 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*, 1999. 84(2): p. 127-32.
- [43] Hislop, A. und L. Reid, Pulmonary arterial development during childhood: branching pattern and structure. *Thorax*, 1973. 28(2): p. 129-
- [44] Huang, W., Morphometry of the human pulmonary vasculature. *J Appl Physiol*, 1996. 81(5): p. 2123-33.
- [45] Kiely, DG., Effects of frusemide and hypoxia on the pulmonary

- vascular bed in man. *Br J Clin Pharmacol* 1997 Mar;43(3):309-13.
- [46] Leffler, C.W., J.R. Hessler, und R.S. Green, The onset of breathing at birth stimulates pulmonary vascular prostacyclin synthesis. *Pediatr Res*, 1984. 18(10): p. 938-42.
- [47] Lemons, J.A., Very low birth weight outcomes of the National Institute of Child health and human development neonatal research network, January 1995 through December 1996. NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, 2001. 107(1): p. E1.
- [48] Leschke, M., Diagnostics in pulmonary, *Internist (Berl.)*, 2009 Sep;50(9):1086, 1088-90, 1092-100.
- [49] Lungergan, CF., Effect of cyclooxygenase inhibition on the pulmonary vasodilator response to Furosemide. *J Pharmacol Exp Ther.* 1988 Jul;246(1):102-6.
- [50] Mandegar, M., Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res*, 2004. 68(2): p. 75-103.
- [51] Marcus, R., On closed testing procedures with special reference to ordered analysis of variance. *Biometrika* 1976, 63, 3, pp. 655-60.
- [52] McMullan, D.M., Alterations in endogenous nitric oxide production after cardiopulmonary bypass in lambs with normal and increased pulmonary blood flow. *Circulation*, 2000. 102(19 Suppl 3): p. III172-8.
- [53] Mühlen, B., Effects of Digoxin, Furosemide, Enalaprilat and Metoprolol on Endothelial function in young normotensive subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001 May-Jun;28(5-6):381-5.
- [54] Nikolei, T., *Pediatrische Notfall- und Intensivmedizin.* Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007
- [55] Ovadia, B., Alterations in ET-1, not nitric oxide, in 1-week-old lambs with increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003. 284(2): p. H480-90.
- [56] Pikkers, P., *Direct vascular effect of Furosemide in humans.* American Heart Association, Inc 1997
- [57] Plestina, R. und H.B. Stoner, Pulmonary oedema in rats given monocrotaline pyrrole. *J Pathol*, 1972. 106(4): p. 235-49.
- [58] Pourageoud, F., Role of EDHF in the vasodilatory effect of loop diureticd in guinea-pic mesenteric resistance arteries. *Br J Pharmacol* 2000 Nov;131(6):1211-9.
- [59] Reddy, V.M., Altered endothelium-dependent responses in lambs with pulmonary hypertension and increased pulmonary blood flow. *Am J Physiol*, 1996. 271(2 Pt 2): p. H562-70.
- [60] Reddy, V.M., In utero placement of aortopulmonary shunts. A model of postnatal pulmonary hypertension with increased pulmonary blood flow in lambs. *Circulation*, 1995. 92(3): p. 606-13.

- [61] Reller, M.D., M.J. Rice, und R.W. McDonald, Review of studies evaluating ductal patency in the premature infant. *J Pediatr*, 1993.122(6): p. S59-62.
- [62] Roos, A., Poiseuille's law and its limitations in vascular systems. *Med Thorac*, 1962. 19: p. 224-38.
- [63] Rosenkrantz, J.G., Ligation of a single pulmonary artery in the pig: a model of chronic pulmonary hypertension. *J Surg Res*, 1973. 15(1): p. 67-73.
- [64] Rosenkranz, S., Pulmonary hypertension: current diagnosis and treatment. *Clin Res Cardiol*, 2007. 96(8): p. 527-41.
- [65] Rudolph, A., *Congenital Diseases of the Heart*. Vol. 1. 1975: Year Bk. Med. Pub. 646.
- [66] Rudolph, A.M. und M.A. Heymann, Circulatory changes during growth in the fetal lamb. *Circ Res*, 1970. 26(3): p. 289-99.
- [67] Rudolph, A.M., *Congenital Diseases of the Heart: Clinical-Physiological Considerations*, ed. A. Rudolph. Vol. 2. 2001: Futura Publishing Company, New York.
- [68] Rudolph, A.M., Fetal and neonatal pulmonary circulation. *Annu Rev Physiol*, 1979. 41: p. 383-95.
- [69] Rudolph, A.M., The changes in the circulation after birth. Their importance in congenital heart disease. *Circulation*, 1970. 41(2): p. 343-
- [70] Ruiz, U., An experimental model for fetal pulmonary hypertonie. A preliminary report. *Am J Surg*, 1972. 123(4): p. 468-71.
- [71] Sadowski, S.L., Congenital cardiac disease in the newborn infant: past, present, and future. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 2009. 21(1): p. 37-48, vi.
- [72] Simonneau, G., Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2009;54: S43-54.
- [73] Stanke, F., Furosemide inhibits angiotensin II-induced contraction on human vascular smooth muscle. *Clin Pharmacol* 199
- [74] Stenmark, K.R., Vascular remodeling in neonatal pulmonary hypertension. Role of the smooth muscle cell. *Chest*, 1988. 93(3 Suppl): p. 127S-133S.
- [75] Stevens, EL., Furosemide differentially relaxes airway and vascular smooth muscle in fetal, newborn, and adult guinea pigs. *Am Rev Respir Dis* 1992 Nov;146(5 Pt 1):1192-7.
- [76] Tian, R., Mechanisms behind the relaxing effect of Furosemide in the isolated rabbit ear artery. *Pharmacol Toxicol*. 1990 Nov;67(5):406-10
- [77] Tiktinsky, M.H. und F.C. Morin, 3rd, Increasing oxygen tension dilates fetal pulmonary circulation via endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 1993. 265(1 Pt 2): p. H376-80.

- [78] van Albada, M.E. und R.M. Berger, Pulmonary arterial hypertension in congenital cardiac disease - the need for refinement of the Evian-Venice classification. *Cardiol Young*, 2008 Feb;18(1):10-7. Epub 2008 Jan 21.
- [79] Vongpatanasin, W., The Eisenmenger syndrome in adults. *Ann Intern Med*, 1998. 128(9): p. 745-55.
- [80] Voswinckel, R., Therapy of pulmonary arterial hypertension. *Internist (Berl)*. 2009 Sep;50(9):1101-2, 1104-9.
- [81] Wood, P., The Eisenmenger syndrome or pulmonary hypertonie with reversed central shunt. *Br Med J*, 1958. 2(5099): p. 755-62.

8 DANKSAGUNG

Allem Voraus möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schmahl danken. Er gab mir die Möglichkeit an der Klinik für Kinderkardiologie und angeborene Herzfehler im Deutschen Herzzentrum München diese Arbeit als Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde für das Institut für Tierpathologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München anzufertigen.

Besonderer Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Sohrab Fratz für die umfangreiche Unterstützung über mehrere Jahre. Durch seine fürsorgliche Art und hervorragende Menschenführung hat er unsere Arbeitsgruppe auf ein besonderes berufliches, wie auch zwischenmenschliches Niveau gebracht.

Großen Dank und persönliche Verbundenheit möchte ich der stellvertretenden Projektleiterin Frau Susanne Naumann aussprechen. Ich habe durch sie beruflich, wie auch privat, sehr viel lernen können.

Darüber hinaus danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Judith Reiser, für die intensive, immer positive und fröhliche, tägliche Zusammenarbeit.

Weiterer Dank gilt den kooperierenden Kliniken und Instituten und deren Leitern Herrn Prof. Dr. Rüdiger Lange (Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie am DHM), Herrn Dr. Thomas Brill (Zentrum für präklinische Forschung am Klinikum Rechts der Isar der TUM) sowie all deren Mitarbeiter, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders hervorzuheben ist dabei die ausgezeichnete Zusammenarbeit mit den Herzchirurgen Herrn PD Dr. Christian Schreiber und Herrn Dr. Zsolt Prodan, deren chirurgisches Geschick und zeitliche Flexibilität dieses Experiment erst möglich gemacht haben.

Persönlicher Dank gilt meinem Vater Peter Haag. Er hat es mir ermöglicht Tiermedizin zu studieren und schließlich meine Doktorarbeit fertig zu stellen. Er hat mich mein Leben lang unterstützt und mir geholfen allzu große Steine, die in meinem Weg lagen auf die Seite zu schaffen.