

Hemolysis, microcirculatory changes and organ injury induced by cardiovascular surgery

Citation for published version (APA):

Hanssen, S. J. P. (2011). *Hemolysis, microcirculatory changes and organ injury induced by cardiovascular surgery*. Datawyse / Universitaire Pers Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20110930sh>

Document status and date:

Published: 01/01/2011

DOI:

[10.26481/dis.20110930sh](https://doi.org/10.26481/dis.20110930sh)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Chapter 8

Summary and Discussion



Summary and Discussion

This thesis is entitled '*Hemolysis, Microcirculatory Changes and Organ Injury Induced by Cardiovascular Surgery*'. Recently, studies addressing the effect of hemolysis in chronic hereditary or acquired hemolytic diseases, such as sickle-cell disease or falciparum malaria infection, have started gaining extensive interest among scholars. These studies evaluate the effect of hemolysis, in particular the release of the enzyme arginase-1 and the release of hemoglobin from the red blood cell in the circulation. The putative effect of both substances on vascular endothelial nitric oxide metabolism and consequently their effect on microcirculatory (organ) perfusion and induction of organ injury are described extensively. However, while these studies address chronic hemolytic disorders, little information is available about the effect of hemolysis in an acute setting such as cardiovascular surgery. The precise role of hemolysis in this patient population remained largely unknown. The major aim of the studies presented in this thesis was to evaluate whether hemolysis is merely an innocent bystander effect of cardiovascular surgery or exhibits a more important role in this patient population. The focus laid on alleged disturbances in microcirculatory perfusion and induction of visceral injury, since the development of visceral injury remains a major determinant of patient outcome, translated in morbidity and mortality rates compliant with this kind of surgery.

Open surgical repair of thoracic aortic aneurysms (TAA) and thoracoabdominal aortic aneurysms (TAAA) are extensive, complex cardiovascular surgical procedures that are associated with significant post-operative morbidity and mortality.¹⁻³ Experimental studies of major surgery and trauma suggest that hypoperfusion of visceral organs leads to the initiation of a systemic pro-inflammatory response.^{4,5} Visceral protection during aortic surgery is thus warranted.^{6,7} The extracorporeal circulation (ECC) technique, also known as cardiopulmonary bypass (CPB) system, has been implemented to provide visceral arteries directly with blood in a retrograde or antegrade manner to preserve organ integrity and function during cardiovascular surgery.^{8,9} The first aim of this thesis was to evaluate to what extent visceral organ injury and inflammation occurred in patients undergoing open TAA or TAAA repair (**Chapter 2**). Fatty acid binding proteins (FABP), cytosolic proteins abundantly expressed in visceral tissue, have been used as sensitive plasma markers to detect early cellular injury.¹⁰ Two types of FABP, intestinal-type FABP (I-FABP) and liver-type (L-FABP), are expressed at the tips of the villi of intestinal mucosal epithelial cells.¹¹ The displayed data show intestinal mucosal cell injury in patients undergoing elective open TAA or TAAA repair. In addition, plasma levels of the cytokines IL-6 and IL-8 were assayed to determine the systemic inflammatory response following TAA or TAAA repair. These cytokines, commonly used as general inflammatory markers, are amongst others produced by stimulated monocytes and activated

endothelium and are considered as key players in the development of systemic inflammatory response after major trauma and surgical stress.¹²⁻¹⁴ To investigate whether intestinal injury was related to the systemic inflammatory response, correlations of AUC_{I-FABP} with AUC_{IL-6} and AUC_{IL-8} (Figure 2.5) were analyzed in all patients undergoing ECC. AUC_{I-FABP} correlated significantly with both AUC_{IL-6} ($r = 0.64$, $P < 0.001$) and AUC_{IL-8} ($r = 0.54$, $P < 0.01$), indicating an association between the extent of intestinal organ injury and systemic inflammation.

Despite the intended protective effect of artificial visceral perfusion by means of ECC, development of intestinal injury was imminent. The arteriovenous concentration differences measured over the intestines demonstrated significant release of I-FABP and L-FABP. Interestingly, during reperfusion the systemic plasma concentration of both I-FABP and L-FABP initially continued to increase, suggesting either continued wash-out of these proteins from the injured gut mucosa or sustained hypoperfusion injury leading to continued enhanced release of both proteins. These data are in line with low flow states in patients with hypovolemic or cardiogenic shock and inherent blood flow redistribution towards the heart and central nervous system at the expense of visceral organs. However, this phenomenon might also represent another pathophysiologic process, as outlined hereafter. Red blood cell injury resulting in hemolysis is unwanted, but not uncommon in cardiovascular patients undergoing extracorporeal circulation as was recently reviewed by Vercaemst.¹⁵ Hemolysis is associated with disturbances in vascular endothelial nitric oxide (NO) metabolism, the key system in regulating vascular tone and microcirculatory blood flow.¹⁶⁻¹⁸ The hemolytic products arginase-1 and free oxyhemoglobin (FHb) might reduce NO bioavailability by degrading the NO precursor arginine to ornithine or by scavenging of NO respectively, thereby compromising microcirculatory (organ) blood flow and inducing organ injury. As stated before, development of visceral injury remains a major determinant of patient outcome after cardiovascular surgery.

To establish the putative relevance of plasma arginase-1 release on arginine plasma levels, the substrate for NO metabolism, **Chapter 3** describes the effects of arginase-1 release on arginine metabolism, both in vivo as well as in vitro. Arginase-1 is, besides being expressed in mononuclear cells and red blood cells, largely present in the liver as an enzyme in the urea cycle.¹⁹⁻²¹ Therefore liver surgery patients, both resection and transplantation patients with anticipated elevated arginase-1 levels, were used as a model of intravascular arginase-1 release and to establish the potential significance of circulating arginase-1 for arginine metabolism. Arginase-1 was released from the liver into the plasma in patients undergoing liver resection. Since arginase-1 catalyzes the breakdown of arginine to ornithine and urea, it was expected that increasing levels of circulating arginase-1 would lead to decreased plasma arginine levels.

Roth et al. were the first to show that liver transplantation leads to an immediate decrease of plasma arginine to virtually zero with a stoichiometric increase of plasma ornithine.^{22, 23} In such patients we found arginase-1 concentrations in plasma that were 100-fold higher than those in patients undergoing liver resection. Incubation of post-transplantation plasma samples confirmed that plasma arginase-1 activity contributed to the in vivo changes in arginine and ornithine levels following liver transplantation and that these changes were not predominantly caused by other arginine regulating processes. From these studies it was concluded that in response to a liver transplantation arginase-1 activity in plasma may become clinically relevant.

However, we could find no effect of an 8-fold increase versus preoperative values of circulating arginase-1 concentration on plasma arginine and ornithine levels in patients undergoing liver resection. In agreement with these in vivo observations we found no significant ornithine formation and arginine consumption when plasma samples with a mean arginase-1 concentration of 185 ng/mL, comparable to levels found during cardiovascular surgery (see Chapter 5), were incubated at 37°C. To explore whether plasma arginase-1 activity was dependent on factors that were present in whole blood but not in plasma, whole blood samples were incubated in a similar manner. Significant arginine consumption with stoichiometric ornithine production was observed in these samples, but actual arginase-1 activity was independent of the amount of extracellular arginase-1. From these experiments it is clear that arginase-1 plasma levels above 2,000 ng/mL were necessary to reduce plasma arginine. Moreover, the data show that increased arginase-1 activity in the circulation may be ascribed to increased arginase-1 activity in the intact red blood cells rather than to circulating plasma arginase-1.

In conclusion, it was found that increased plasma levels of arginase-1, as seen in TAA and TAAA surgery, do not lead to arginine breakdown. The threshold beyond which the plasma level of arginase-1 significantly affects plasma arginine concentration is probably rarely reached in clinical practice, with the exception of liver transplantation. Plasma levels arginase-1 reached around cardiovascular surgery, as described and depicted in Chapter 5, remain far below this threshold.

Reiter et al. suggested hemolysis and concomitant release of Fhb to be an important factor in the pathogenesis of compromised microcirculation in hereditary and acquired hemolytic disorders.²⁴ They showed that plasma from patients with sickle-cell disease contains cell-free oxyhemoglobin (Fhb) which is capable of scavenging NO, seen by disturbances in forearm blood flow responses to nitric oxide donor infusions. Their insight, however indirect, was the first step into understanding the vascular complications shared by acute and chronic hemolytic disorders and triggered various research groups to study the deleterious effects of Fhb in acute, chronic hereditary or acquired hemolytic disorders.^{17, 18, 25-29} Hemolysis during car-

diovascular surgery is acknowledged, but the potential consequences of Fhb in the light of the findings by Reiter and et al. are unknown, although elevated Fhb levels can be anticipated.¹⁵ The sources of hemolysis, its possible effects and therapies in cardiovascular surgery are reviewed in **Chapter 4**.

Hemolysis can be attributed to three sources during cardiovascular surgery; (i) the ECC or CPB,^{15, 30} (ii) the cell saver system³¹ and (iii) (massive) red blood cell transfusion.^{32, 33} The increase in plasma Fhb may contribute to organ injury development through scavenging of NO, inducing perturbations in microcirculatory blood flow and subsequent hypoperfusion or even ischemic injury to organ systems. The reaction between Fhb and NO is rapid and irreversible. By donating an electron and its oxygen molecule, Fhb ($\text{HbFe}^{2+}\text{-O}_2$) is transformed into bioinactive methemoglobin (HbFe^{3+}) and NO to nitrate (NO_3^-).¹⁶ Because of intravascular NO scavenging, which potentially impairs microcirculatory blood flow resulting in organ injury, we therefore consider Fhb more than an innocent bystander effect of cardiopulmonary bypass assisted surgery, with or without cell salvage and red blood cell transfusion. Interventional studies using haptoglobin infusion or NO inhalation to inactivate Fhb, or using nitrite administration to increase NO bioavailability are suggested to establish the causal role between plasma Fhb, NO bioavailability, and organ injury in the cardiovascular surgical setting.

As described above, hemolysis is recognized to potentially decrease NO bioavailability leading to compromised microcirculatory blood flow. The relevance of hemolysis to the microcirculation in cardiovascular surgical patients remained largely unknown. The aim of the work presented in **Chapter 5** was first to investigate the extent of hemolysis and the concomitant release of Fhb and arginase-1 in patients undergoing cardiovascular surgery with extracorporeal circulation and massive transfusion including cell-salvage. Next, forearm vascular smooth muscle responses to exogenous NO in the presence of plasma Fhb were evaluated. Lastly, the effect of elevated plasma arginase-1 on plasma arginine and ornithine levels was evaluated.

Hemolysis, represented by elevated plasma Fhb and arginase-1 levels, was observed in cardiovascular patients, revealing a significant association between Fhb and arginase-1 release (Spearman $r = 0.83$, $P = 0.005$). Since elevated plasma concentrations of Fhb may limit NO-mediated vasodilatation, forearm blood flow was measured using venous occlusion plethysmography in patients undergoing open TAA or TAAA surgery. Forearm blood flow measurements were used as a model to study the effect of an intra-arterially infused NO-donor (sodium nitroprusside, accumulating dosages) during high levels and low levels of circulating Fhb. Interestingly, forearm blood flow was negatively correlated with plasma Fhb concentrations, indicating NO scavenging during high levels of circulating Fhb. This suggests, however indirect, that elevated circulating levels of Fhb during cardiovascular sur-

gery might compromise organ perfusion as well and potentially induce organ injury. Despite increasing plasma levels of arginase-1 no significant changes in plasma arginine / ornithine ratio, as a surrogate marker for arginase-1 plasma activity, were observed during the studied period. This suggests arginase-1 release during cardiovascular surgery does not hamper arginine bioavailability, the surrogate for NO synthesis. Moreover, correlation analysis between the increase of plasma arginase-1 and the decrease of plasma arginine levels revealed no association between both parameters (Spearman $r = 0.55$; $P = 0.105$). These results do not support increased plasma arginase-1 activity in cardiovascular patients as was anticipated based on the previous results in Chapter 3.

Next, we hypothesized that intravascular Fhb release compromises intestinal blood flow and consequently induces intestinal injury. Gastrointestinal complications following cardiovascular surgery are feared as these complications are associated with high patient morbidity and mortality rates.^{3, 7, 34-37} Aim of the work presented in **Chapter 6** was to evaluate intestinal blood flow and epithelial cell injury in an animal model enduring elevated circulating Fhb levels. In order to do this, we developed an animal model that yields elevated plasma levels of Fhb, similar to levels found during cardiovascular surgery. Subsequently, the potential influence of circulating Fhb on intestinal microcirculation was studied using fluorescent microspheres. Also, both biochemical and histological parameters of intestinal injury were evaluated.

Three groups were included in the study. To induce intravascular hemolysis and yield circulating Fhb the first group received sterile pyrogene-free water infusion, as described previously in a canine model,¹⁷ adjusted after pilot experiments to our rodent model; the second group received Fhb infusion, while the control group received saline infusion. Water and Fhb infusion resulted, when compared to the saline infusion, in a reduced intestinal microcirculation. Interestingly, circulating Fhb levels correlated significantly with plasmatic release of ileal lipid binding protein (iLBP), a protein solely present in mature epithelial cells of the gut (Spearman $r = 0.70$, $P = 0.0017$). The protein is a member of the fatty acid binding protein family, which can be used to measure early epithelial cell injury in plasma, as well as in urine samples, and visualize injury of the intestinal villi using immunohistochemistry.³⁸ Epithelial cell injury of the villi was observed in response to the water and Fhb infusion and verified by histological analysis of the ileum.

This work shows for the first time the deleterious effect of elevated circulating levels of Fhb on intestinal mucosal integrity. We suggest that intravascular hemolysis could contribute to visceral injury during cardiovascular surgery. Intestinal damage, assessed by intestinal fatty acid binding proteins such as iLBP, has been reported in cardiovascular surgical patients.^{7, 13} Furthermore, Chapter 2 shows that intestinal epithelial cell injury occurring during and after major cardiovascular sur-

gery is associated with a systemic inflammatory response.³⁹ It is tempting to speculate that Fhb plays a role in the development of intestinal injury in such patients. As stated above, acute gastrointestinal complications after cardiovascular surgery are known to result in a complicated postoperative period and are associated with high mortality rates.

Acute kidney injury (AKI) after cardiovascular surgery is the longest known and most feared complication as it is associated with high patient morbidity and mortality rates.^{40, 41} We hypothesized that intravascular Fhb release compromises renal blood flow and consequently induces AKI. The work presented in **Chapter 7** aimed at evaluating renal blood flow, renal oxygenation and renal tubular epithelial cell injury in an animal model enduring elevated circulating Fhb levels with or without inhalation of NO-gas. To this end, the animal model that yields plasma levels of Fhb, similar to levels found during cardiovascular surgery and discussed above (see Chapter 6) was used. The potential influence of circulating Fhb on renal microcirculation was studied using fluorescent microspheres. Fhb-induced changes in renal oxygenation were evaluated using Blood Oxygen Level Dependent-Magnetic Resonance Imaging (BOLD-MRI). AKI was assessed by measuring urinary tubular epithelial cell injury marker N-acetyl glucosaminidase (NAG). Histological parameters of AKI were evaluated as well.

A significant reduction in renal microcirculatory blood flow was observed already after fifteen minutes of Fhb infusion, while the microcirculatory blood flow in the control group (saline infusion) remained unaltered. The effect of reduced renal microcirculation could still be observed after thirty and sixty minutes of Fhb infusion, indicating that elevated circulating levels of Fhb lead to a reduction in renal microcirculatory blood flow. BOLD-MRI measurements showed a decrease in renal tissue oxygenation during Fhb infusion. Furthermore, urinary NAG and histological evaluation showed the development of AKI, at the level of proximal tubular epithelial cells. Moreover, the development of AKI, as measured by NAG release, was associated with the levels of circulating Fhb (Spearman $r = 0.78$, $P = 0.0026$). In order to assess the NO scavenging capacities of Fhb, NO-ventilation was used as therapeutic option to abrogate the deleterious effects of Fhb. Interestingly the reduction in microcirculation as well as the development of AKI were attenuated by Fhb-inactivating NO-ventilation. These data reveal a new mechanism of AKI development dependent on elevated circulating Fhb levels, which are levels also seen during cardiovascular surgery, and provide a therapeutic option as well.

As a whole this thesis implicates that circulating Fhb is not only a health risk in chronic diseases such as sickle-cell anemia and malaria, but may rather be a cause for concern in cardiovascular surgical patients subject to extracorporeal circulation, blood transfusion and cell salvage devices resulting in substantial hemolysis. Fhb

might induce organ injury during and after cardiovascular surgery. Therefore, circulating Fhb levels should be closely monitored in clinical practice when operating on these patients. Future patient studies are needed to develop means to reduce hemolysis and to counteract the deleterious effects of circulating Fhb around cardiovascular surgery.

References

1. Rectenwald JE, Huber TS, Martin TD, et al. Functional outcome after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2002; 35:640–7.
2. Gloviczki P. Surgical repair of thoracoabdominal aneurysms: patient selection, techniques and results. *Cardiovasc Surg* 2002; 10:434–41.
3. Achouh PE, Madsen K, Miller CC, 3rd, et al. Gastrointestinal complications after descending thoracic and thoracoabdominal aortic repairs: a 14-year experience. *J Vasc Surg* 2006; 44:442–6.
4. Fink MP. Gastrointestinal mucosal injury in experimental models of shock, trauma, and sepsis. *Crit Care Med* 1991; 19:627–41.
5. Moore FA. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1999; 178:449–53.
6. MacArthur RG, Carter SA, Coselli JS, LeMaire SA. Organ protection during thoracoabdominal aortic surgery: rationale for a multimodality approach. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2005; 9:143–9.
7. Welborn MB, Oldenburg HS, Hess PJ, et al. The relationship between visceral ischemia, proinflammatory cytokines, and organ injury in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Crit Care Med* 2000; 28:3191–7.
8. Jacobs MJ, de Mol BA, Legemate DA, et al. Retrograde aortic and selective organ perfusion during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14:360–6.
9. Jacobs MJ, Mommertz G, Koepfel TA, et al. Surgical repair of thoracoabdominal aortic aneurysms. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2007; 48:49–58.
10. Lieberman JM, Sacchetti J, Marks C, Marks WH. Human intestinal fatty acid binding protein: report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia. *Surgery* 1997; 121:335–42.
11. Pelsers MM, Hermens WT, Glatz JF. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 2005; 352:15–35.
12. Ytting H, Christensen IJ, Basse L, et al. Influence of major surgery on the mannan-binding lectin pathway of innate immunity. *Clin Exp Immunol* 2006; 144:239–46.
13. Morariu AM, Loef BG, Aarts LP, et al. Dexamethasone: benefit and prejudice for patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting: a study on myocardial, pulmonary, renal, intestinal, and hepatic injury. *Chest* 2005; 128:2677–87.
14. Fiene AE, Videm V, Lingaas PS, et al. Mechanism of complement activation and its role in the inflammatory response after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Circulation* 2003; 108:849–56.
15. Vercaemst L. Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: a review in search of a treatment algorithm. *J Extra Corpor Technol* 2008; 40:257–67.
16. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama* 2005; 293:1653–62.
17. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, et al. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 2005; 115:3409–3417.
18. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, et al. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood* 2007; 110:2166–72.
19. Ochoa JB, Bernard AC, O'Brien WE, et al. Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Ann Surg* 2001; 233:393–9.
20. Prins HA, Houdijk AP, Nijveldt RJ, et al. Arginase release from red blood cells: possible link in transfusion induced immune suppression? *Shock* 2001; 16:113–5.
21. Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RA. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev* 1990; 70:701–48.
22. Langle F, Steininger R, Roth R, et al. L-arginine deficiency and hemodynamic changes as a result of arginase efflux following orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1995; 27:2872–3.
23. Roth E, Steininger R, Winkler S, et al. L-arginine deficiency after liver transplantation as an effect of arginase efflux from the graft. *Transplantation* 1994; 57:665–9.

24. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002; 8:1383–9.
25. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *Jama* 2005; 294:81–90.
26. Kato GJ, Hsieh M, Machado R, et al. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. *Am J Hematol* 2006; 81:503–10.
27. Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica* 2008; 93:20–6.
28. Lewis DA, Nyska A, Potti A, et al. Hemostatic activation in a chemically induced rat model of severe hemolysis and thrombosis. *Thromb Res* 2006; 118:747–53.
29. Yeo TW, Lampah DA, Gitawati R, et al. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *J Exp Med* 2007; 204:2693–704.
30. Franssen EJ, Ganushchak YM, Vijay V, et al. Evaluation of a new condensed extra-corporeal circuit for cardiac surgery: a prospective randomized clinical pilot study. *Perfusion* 2005; 20:91–9.
31. Serrick CJ, Scholz M, Melo A, et al. Quality of red blood cells using autotransfusion devices: a comparative analysis. *J Extra Corpor Technol* 2003; 35:28–34.
32. Karkouti K, Wijeyesundera DN, Yau TM, et al. The independent association of massive blood loss with mortality in cardiac surgery. *Transfusion* 2004; 44:1453–62.
33. Koch CG, Li L, Sessler DI, et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med* 2008; 358:1229–39.
34. Halm MA. Acute gastrointestinal complications after cardiac surgery. *Am J Crit Care* 1996; 5:109–18; quiz 119–20.
35. Hessel EA, 2nd. Abdominal organ injury after cardiac surgery. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2004; 8:243–63.
36. Geissler HJ, Fischer UM, Grunert S, et al. Incidence and outcome of gastrointestinal complications after cardiopulmonary bypass. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2006; 5:239–42.
37. Filsoufi F, Rahmanian PB, Castillo JG, et al. Predictors and outcome of gastrointestinal complications in patients undergoing cardiac surgery. *Ann Surg* 2007; 246:323–9.
38. Derikx JP, Matthijsen RA, de Bruine AP, et al. Rapid reversal of human intestinal ischemia-reperfusion induced damage by shedding of injured enterocytes and reepithelialisation. *PLoS ONE* 2008; 3:e3428.
39. Hanssen SJ, Derikx JP, Vermeulen Windsant IC, et al. Visceral injury and systemic inflammation in patients undergoing extracorporeal circulation during aortic surgery. *Ann Surg* 2008; 248:117–25.
40. Chertow GM, Levy EM, Hammermeister KE, et al. Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. *Am J Med* 1998; 104:343–8.
41. Schepens MA, Heijmen RH, Ranschaert W, et al. Thoracoabdominal aortic aneurysm repair: results of conventional open surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 37:640–5.

Samenvatting

Samenvatting

Dit proefschrift is getiteld *'Hemolysis, Microcirculatory Changes and Organ Injury Induced by Cardiovascular Surgery'*, oftewel vertaald naar het Nederlands 'Hemolyse, veranderingen in de microcirculatie en orgaan schade geïnduceerd door cardiovasculaire chirurgie'. Hemolyse is het uit elkaar vallen van rode bloedcellen, wat dagelijks in kleine hoeveelheden gereguleerd gebeurt. Deze kapotte rode bloedcellen worden in de milt weggevangen en de inhoud wordt afgebroken in de lever; echter, hemolyse kan ook ongecontroleerd en ongewenst optreden waarbij de inhoud van de rode bloedcel in de bloedbaan vrijkomt.

In de afgelopen jaren zijn er studies verschenen waarin het effect van hemolyse bestudeerd werd in patiënten met chronische aangeboren of verworven hemolytische ziekten, zoals sikkelcel ziekte of malaria. Deze studies keken naar het effect van hemolyse, en in het bijzonder het vrijkomen van het enzym arginase-1 en de stof hemoglobine uit de rode bloedcel. De mogelijke effecten van beide stoffen op de doorbloeding van organen op het kleinste niveau (microcirculatie) en dientengevolge mogelijke orgaanschade, is uitgebreid beschreven.

Terwijl deze studies zich gericht hebben op patiënten met chronische hemolytische ziektebeelden, is het onduidelijk wat de effecten zijn van hemolyse in acute situaties zoals tijdens cardiovasculaire chirurgie. Het hoofddoel van de studies beschreven in dit proefschrift was derhalve het evalueren of hemolyse rondom cardiovasculaire chirurgie slechts een onschuldige bijkomstigheid is, of dat het een belangrijke rol speelt bij deze patiëntenpopulatie. De focus van de studies ligt op het onderzoeken van mogelijke verstoringen in de microcirculatie en het ontstaan van orgaanschade tijdens hemolyse. Het optreden van orgaanschade speelt een belangrijke rol in de postoperatieve fase; immers orgaanschade, met name darm- en nier-schade na cardiovasculaire chirurgie, betekent een gecompliceerd postoperatief beloop en een langere herstelfase, met een verhoogde kans op overlijden van de patiënt. In dit hoofdstuk worden de resultaten van de studies uit dit proefschrift samengevat.

Aorta aneurysmas zijn verwijdingen van de grote lichaamsslagader (aorta) die zich in de borstholte, het zogeheten thoracaal aorta aneurysma (TAA), of zowel in de borst- alsook in de buikholte bevinden, het thoraco-abdominaal aorta aneurysma (TAAA). Een herstel van deze aneurysmas is een grote, complexe cardiovasculaire procedure die gepaard gaat met een groot postoperatief risico op het ontstaan van complicaties en overlijden.¹⁻³

Experimentele studies over grote chirurgische ingrepen en trauma patiënten hebben laten zien dat hypoperfusie (te weinig bloeddorstrooming) van de buikorganen leidt tot een algehele ontstekingsreactie (systemische inflammatoire reactie);^{4,5} daarom is het beschermen van de buikorganen die voor hun bloedvoorziening af-

hankelijk zijn van de aorta, zoals het maag-, darm- en leverstelsel en beide nieren, tijdens cardiovasculaire chirurgie van groot belang.^{6, 7} De extracorporeale circulatie (ECC), ook wel cardiopulmonale bypass of hart-longmachine genoemd, wordt tijdens grote cardiovasculaire chirurgie gebruikt om de buikorganen van zuurstofrijk bloed te voorzien en deze zo te beschermen.^{8, 9}

Het eerste doel beschreven in dit proefschrift was het evalueren van vroege schade aan de darm, lever en nieren alsook de ontstekingsreactie in kaart te brengen in patiënten die een open chirurgisch herstel van een TAA of TAAA ondergingen met behulp van een ECC (**Hoofdstuk 2**). Fatty acid binding proteïnen (FABP), zijn kleine eiwitten die in de cellen van verscheidene organen voorkomen. Ze kunnen gebruikt worden als gevoelige marker in het bloed om snel cellulaire schade te ontdekken in verschillende organen.¹⁰ Twee types FABP, I-FABP en L-FABP, komen in de darm tot expressie.¹¹ De resultaten van de studie laten zien dat er darmschade optreedt tijdens en vlak nadat patiënten een geplande open herstel van een TAA of TAAA ondergingen. Daarnaast werden ontstekingswaarden in het bloed van deze patiënten gemeten (IL-6 en IL-8) om de algehele ontstekingsreactie in kaart te brengen. Om te onderzoeken of darmschade geassocieerd is met de ontstekingsreactie werden bij alle patiënten correlatie analyses uitgevoerd tussen de AUC_{I-FABP} met AUC_{IL-6} en AUC_{IL-8} (Figuur 2.5). De AUC_{I-FABP} , de hoeveelheid darmschade die in de gemeten tijd is opgetreden, correleerde significant met de totale vrijgekomen ontstekingsparameters IL-6 (AUC_{IL-6} , $r = 0.64$, $P < 0.001$) en IL-8 (AUC_{IL-8} , $r = 0.54$, $P < 0.01$), wat indicatief is voor een sterke associatie tussen de hoeveelheid darmschade en de daarop volgende systemische inflammatoire reactie.

Ondanks het vermeende beschermende effect van ECC was het ontstaan van darmschade overduidelijk. Er werden naast systemische metingen ook orgaanspecifieke metingen verricht die het vrijkomen van I-FABP en L-FABP uit de darm bevestigde. Als interessante bevinding werd gezien dat niet alleen tijdens ECC perfusie van de buikorganen darmschade optrad, maar ook na de ECC procedure, in de zogeheten reperfusie fase. Dit suggereert dat er nog steeds cellen van de darm kapot gaan, of dat er nog steeds sprake is van hypoperfusie met continuerende darmschade als gevolg. Deze bevindingen zijn in lijn met eerdere studies naar reperfusie-effecten in patiënten met hypovolemische- of cardiogene shock, waarbij bloed herverdeling optreedt en bloed bij voorkeur naar de vitale organen gaat (het hart en de hersenen) wat ten koste gaat van de buikorganen. Echter, dit fenomeen zou bij cardiovasculaire chirurgie ook een ander pathofysiologisch proces kunnen herbergen, zoals hieronder beschreven staat.

Rode bloedcel schade resulteert in hemolyse wat ongewenst, maar onvermijdelijk is in patiënten die cardiovasculaire chirurgie met behulp van ECC ondergaan.¹² Hemolyse is geassocieerd met verstoringen in de stikstofmonoxide (NO) huishouding van de vaatwand; NO geproduceerd in de vaatwand is voor het merendeel

verantwoordelijk voor de vaatweerstand en vaatdiameter van arteriën en zodoende verantwoordelijk voor de bloeddorstrooming van organen.¹³⁻¹⁵ Het enzym arginase-1 en het molecuul vrij oxyhemoglobine (FHb) zijn stoffen die vrijkomen in de bloedbaan tijdens hemolyse. Beide kunnen de NO beschikbaarheid verminderen, enerzijds door het substraat voor NO arginine om te zetten in ornithine, of anderzijds door NO weg te vangen; hierdoor verstoren ze de microcirculatie van organen en induceren orgaanschade. Zoals reeds hierboven beschreven is orgaanschade een belangrijke determinant voor het herstel van patiënten na cardiovasculair chirurgie.

Teneinde de mogelijke relatie te bestuderen tussen het vrijkomen van arginase-1 en het substraat voor NO (arginine) in het plasma van het bloed, wordt in de studie beschreven in **Hoofdstuk 3** het effect van arginase-1 op de beschikbaarheid van arginine onderzocht, zowel in vivo als in vitro. Arginase-1 wordt, naast rode bloedcellen en mononucleaire cellen, vooral in de lever tot expressie gebracht waar het een belangrijke rol speelt als enzym in de ureum-cyclus.¹⁶⁻¹⁸ Daarom werden in deze studie patiënten bestudeerd die leverchirurgie ondergingen, in de vorm van leverresectie of levertransplantatie; deze patiënten dienden als model voor intravasaal vrijkomen van arginase-1 waarbij het mogelijke effect van circulerend arginase-1 op het aminozuur arginine in het plasma van het bloed onderzocht werd. We vonden dat patiënten met leverresectie een significante stijging van circulerend arginase-1 lieten zien; omdat arginase-1 de afbraak van arginine naar ornithine en ureum katalyseert, werd verwacht dat toenemende arginase-1 concentraties in het bloed een daling van de arginine concentratie teweeg zou brengen, wat echter in vivo niet het geval bleek.

Roth et al. waren de eerste die lieten zien dat levertransplantatie tot een acute daling in de arginine concentratie leidt met een gelijktijdige toename in de ornithine concentratie.¹⁹ Bij patiënten na lever transplantatie vonden we een arginase-1 concentratie in het bloed dat gemiddeld 100x hoger ligt dan bij patiënten die leverresectie ondergaan. Incubatie in vitro van plasma monsters die na levertransplantatie afgenomen werden, bevestigden dat plasma arginase-1 activiteit bijdraagt aan de in vivo veranderingen in arginine en ornithine concentraties die na levertransplantaties in onze patiënten gevonden werden.

Uit deze studies kon worden geconcludeerd dat arginase-1 activiteit in het plasma klinisch relevant kan zijn na levertransplantatie. We hebben echter geen effect van een achtvoudige toename (versus preoperatief) van circulerende arginase-1 concentraties op arginine en ornithine plasma concentraties gevonden in patiënten die leverresectie ondergingen. In overeenstemming met deze in vivo data hebben we geen toename in ornithine formatie en arginine consumptie in vitro gevonden in monsters met een gemiddelde arginase-1 concentratie van 185 ng /mL, welke vergelijkbaar zijn met plasma concentraties in patiënten die cardiovasculaire chirurgie ondergingen (zie Hoofdstuk 5). Daarnaast laten we in vitro zien dat argina-

se-1 activiteit in volbloed onafhankelijk is van de extracellulaire arginase-1 concentratie, maar vooral door intracellulair arginase-1 in de rode bloedcel bepaald wordt. Bovendien laten de in vivo en in vitro studies zien dat een arginase-1 plasma concentratie boven 2000 ng/mL nodig is om een significante daling in het plasma arginine te bewerkstelligen.

Concluderend, een toename in plasma arginase-1 concentratie zoals gevonden wordt in cardiovasculaire chirurgie zal niet tot een daling in de arginine plasma concentratie leiden. De drempel waarboven arginase-1 een significante invloed op arginine plasma concentraties zal hebben en mogelijk NO productie in de vaatwand zou kunnen beperken, wordt zelden in de klinische setting bereikt, met uitzondering van levertransplantatie. Arginase-1 plasma concentraties rondom cardiovasculaire chirurgie, zoals wordt beschreven in Hoofdstuk 5, blijven ver beneden deze drempel.

Reiter et al. suggereerden dat hemolyse en het daaropvolgend vrijkomen van zuurstofrijk hemoglobine (FHb) een belangrijke rol speelt in de pathogenese van verstoorde microcirculatie bij patiënten met een aangeboren of verkregen hemolytische ziekte.²⁰ Zij lieten als eerste zien dat plasma van patiënten met sikkelcel ziekte dat FHb bevat, in staat is om NO weg te vangen; zij beschreven veranderingen in de bloeddoorstroming van de onderarm als reactie op NO-donor infusies in de arteriële bloedtoevoer. Dit inzicht, hoewel indirect, was de eerste stap in het begrijpen van vasculaire complicaties die zowel in acute als chronische hemolytische ziekten optreden. Hun bevinding stimuleerde tot het verder in kaart brengen van de schadelijke effecten van FHb in acute, chronische en verworven hemolytische stoornissen.^{14,}

^{15, 21-25} Hemolyse tijdens cardiovasculaire chirurgie wordt weliswaar beschreven in de literatuur, echter de consequenties van FHb in het kader van de bevindingen van Reiter et al. zijn onbekend, terwijl verhoogde plasma FHb waarden rondom cardiovasculaire chirurgie wel verwacht mogen worden.¹² De mogelijke bronnen van hemolyse tijdens cardiovasculaire chirurgie en de mogelijke effecten en therapieën worden in een literatuurstudie in dit proefschrift beschreven (**Hoofdstuk 4**).

Hemolyse tijdens cardiovasculaire chirurgie kan voortkomen uit drie bronnen; (i) de ECC,^{12, 26} (ii) het cell-saver systeem, waarmee rode bloed cellen uit het operatiegebied opgevangen worden en aan de patiënt terug gegeven kunnen worden,²⁷ en (iii) het gebruik van (massale) bloed transfusie.^{28, 29} De toename van plasma FHb zou middels het wegvangen van NO tot orgaanschade kunnen leiden, dit door verstoringen in de microcirculatie en vervolgens hypoperfusie en ischemische schade aan organen te induceren. De reactie tussen FHb en NO is snel en onomkeerbaar. Doordat een elektron en het zuurstofmolecuul van FHb ($\text{HbFe}^{2+}\text{-O}_2$) aan NO gebonden worden, ontstaat het inactieve methemoglobine (HbFe^{3+}) en als bijproduct nitraat (NO_3^-).¹³ Doordat NO door FHb in de bloedbaan weggevangen kan worden en zodoende de microcirculatie mogelijk beïnvloed wordt en orgaanschade op-

treedt, beschouwen we Fhb als meer dan een onschuldige bijkomstigheid tijdens cardiovasculaire chirurgie met ECC, met of zonder cell-saver systeem en (massale) bloed transfusie. We suggereren verder in deze literatuurstudie dat studies met haptoglobine infusie of inhalatie met NO nodig zijn, om Fhb onschadelijk te maken of studies met nitriet infusies om de NO beschikbaarheid te vergroten nodig zijn, om een causaal verband tussen plasma Fhb, NO beschikbaarheid en orgaanschade binnen de cardiovasculaire chirurgie verder te bestuderen.

Zoals hierboven beschreven wordt is hemolyse een potentieel gevaar om de beschikbaarheid van NO te reduceren wat kan leiden tot een verminderde microcirculatie. De relevantie van hemolyse op de microcirculatie bij cardiovasculaire chirurgie is tot dusver onbekend. Het doel van de studie beschreven in **Hoofdstuk 5** was allereerst om de mate van hemolyse te evalueren en de hoeveelheid vrijgekomen arginase-1 en Fhb te kwantificeren bij patiënten die cardiovasculaire chirurgie met behulp van een ECC en bloedtransfusie, inclusief cell-saver systeem ondergingen. Vervolgens werd de doorbloeding van de onderarm van deze patiënten gemeten in reactie op een NO-donor, zowel tijdens hoge en lage plasma Fhb waarden. Tevens werd het effect van plasma arginase-1 op de plasma concentraties van arginine en ornithine bestudeerd.

Hemolyse trad op en werd tijdens cardiovasculaire chirurgie gemeten middels toegenomen Fhb en arginase-1 concentraties in het plasma waarbij beide parameters significant aan elkaar gecorreleerd waren (Spearman $r = 0.83$, $P = 0.005$). Daar verhoogde Fhb plasma concentraties de NO-gemedieerde vasodilatatie zou kunnen beperken, werd de NO-afhankelijke onderarm doorbloeding gemeten bij patiënten die een herstel van een TAA of TAAA ondergingen. Daarnaast werd als positieve controle voor het functioneren van de vaatwand NO-onafhankelijke vasodilatatie gemeten. Metingen van de onderarm doorbloeding werden gebruikt als model om de effecten van een intra-arterieel toegediende NO-donor (natrium nitroprusside, in toenemende dosering) te bestuderen tijdens zowel hoge als lage circulerende concentraties Fhb. Als belangrijke bevinding bleek de doorbloeding van de onderarm negatief gecorreleerd met de plasma Fhb waarden, wat inhoudt dat er NO weggevangen werd tijdens hoge concentraties circulerend Fhb. Dit suggereert, hoewel indirect, dat verhoogde concentraties circulerend Fhb gedurende cardiovasculaire chirurgie de orgaanperfusie eveneens kan compromitteren en mogelijk orgaanschade kan induceren. Ondanks toename in de arginase-1 plasma concentratie, werd er geen verandering in de plasma arginine / ornithine ratio, welke gebruikt werd als surrogaat marker voor arginase-1 activiteit, gevonden tijdens de bestudeerde periode. Dit suggereert dat het vrijkomen van arginase-1 gedurende cardiovasculaire chirurgie de beschikbaarheid van arginine, het substraat voor NO synthese, niet beperkt. Daarnaast liet de correlatie analyse tussen het vrijkomen van arginase-1 in het plasma en de daling van de arginine plasma concentratie geen associatie zien

tussen beide parameters (Spearman $r = 0.55$; $P = 0.105$). Deze resultaten ondersteunen een toegenomen arginase-1 activiteit in het plasma niet, wat naar aanleiding van de studie in Hoofdstuk 3 beschreven ook niet te verwachten viel.

Onze volgende hypothese was dat intravasaal vrijgekomen Fhb de microcirculatie van de darm kan verminderen en vervolgens tot darmschade zal leiden. Gastro-intestinale complicaties na cardiovasculaire chirurgie worden gevreesd, omdat deze complicaties gepaard gaan met hoge morbiditeit en mortaliteit cijfers in deze patiëntenpopulatie.^{3, 7, 30, 31} Doel van het werk beschreven in **Hoofdstuk 6** was het evalueren van de darmdoorbloeding en darmschade in een diermodel met toegenomen circulerende Fhb plasma concentraties. Om dit te bewerkstelligen hebben we een diermodel ontwikkeld waarbij plasma Fhb waarden bereikt werden die vergelijkbaar zijn aan de waarden die we in de kliniek bij patiënten tijdens cardiovasculaire chirurgie gevonden hebben. Vervolgens werd de invloed van circulerend Fhb op de microcirculatie van de darm bestudeerd door gebruik te maken van fluorescerende microsferen. Daarnaast werden biochemische en histologische parameters van darmschade geëvalueerd.

Drie groepen werden in de studie geïnccludeerd. Om intravasale hemolyse en verhoogde circulerend Fhb concentraties te bewerkstelligen kreeg de eerste groep steriel pyrogeen-vrij water geïnfundeerd, op een manier zoals eerder in een honden proefdiermodel beschreven is,¹⁴ aangepast aan ons ratten proefdiermodel; de tweede groep onderging Fhb infusie, en de controle groep onderging infusie met een fysiologische zoutoplossing. Zowel water als Fhb infusie leidde in vergelijking met de controle groep tot een verminderde microcirculatie van de darm. Bovendien correleerden circulerende Fhb waarden significant met plasma ileal lipid binding protein (iLBP) waarden, een eiwit dat alleen in mature epitheliale darmcellen voorkomt (Spearman $r = 0.70$, $P = 0.0017$). Het eiwit iLBP is een lid van de FABP familie en is een snelle sensitieve marker waarmee intestinale epitheliale darmschade in plasma en urine gemeten kan worden en tevens epitheliale schade op het niveau van de villus, middels immunohistochemie, gevisualiseerd kan worden.³² Epitheliale cel schade aan de villus van de darm werd gemeten na water infusie en Fhb infusie en middels histologische analyse van de darm bevestigd.

Deze studie laat voor het eerst de schadelijke effecten van verhoogde circulerende Fhb concentratie op de microcirculatie en weefselintegriteit van de darm zien. We suggereren hieruit dat intravasale hemolyse en toegenomen circulerende Fhb waarden tijdens cardiovasculaire chirurgie kan bijdragen aan orgaanschade. Darmschade, gemeten middels FABP eiwitten zoals iLBP, is in de literatuur beschreven rondom cardiovasculaire chirurgie.^{7, 33} Bovendien, Hoofdstuk 2 laat zien dat epitheliale darmschade die optreedt rondom cardiovasculaire chirurgie geassocieerd is met een systemische inflammatoire reactie.³⁴ Het is verleidelijk om te speculeren dat Fhb een rol speelt in het ontstaan van darmschade binnen deze patiën-

tenpopulatie. Zoals hierboven aangegeven is bekend dat acute gastrointestinale complicaties na cardiovasculaire chirurgie een groot risico op een gecompliceerd postoperatief verloop met hoge mortaliteitscijfers als gevolg hebben.

Acute nierschade (acute kidney injury, AKI) is de meest voorkomende en meest gevreesde complicatie na cardiovasculaire chirurgie, daar het geassocieerd is met hoge morbiditeit en mortaliteit cijfers.^{35, 36} Naar aanleiding van deze gegevens hebben we de hypothese gesteld dat intravasaal vrijgekomen Fhb de nierdoorbloeding vermindert en AKI veroorzaakt. De studie die in **Hoofdstuk 7** gepresenteerd wordt had als doel om de nierdoorbloeding en renale tubulaire epitheelcel schade te evalueren in een proefdiermodel dat verhoogde circulerende Fhb waarden onderging. Hiertoe werd hetzelfde proefdiermodel gebruikt als gepresenteerd in Hoofdstuk 6, dat Fhb waarden bereikte die vergelijkbaar zijn aan de waarden die we bij patiënten rondom cardiovasculaire chirurgie gevonden hebben. In de studie beschreven in Hoofdstuk 7 werden de mogelijke effecten van circulerend Fhb, met en zonder inhalatie van NO-gas als Fhb-inactiverende therapie, op de renale microcirculatie middels fluorescente microsferen bepaald. Daarnaast werd de tubulaire epitheelcel schademarkers N-acetyl glucosaminidase (NAG) in de urine bepaald, alsmede werden histologische parameters van AKI bestudeerd.

Teneinde het Fhb onschadelijk te maken, werd ventilatie met NO-gas gebruikt als therapie om de schadelijke effecten van Fhb tegen te gaan. De door Fhb-infusie geïnduceerde veranderingen in het zuurstofgehalte van de nieren werd gemeten middels 'Blood Oxygen Level Dependent Magnetic Resonance Imaging' (BOLD-MRI). Een significante reductie in de microcirculatie van de nier werd gevonden na 15 minuten Fhb infusie, vergeleken met de controle groep die alleen een infusie met fysiologisch zout onderging; het effect van gereduceerde microcirculatie van de nier werd na 60 minuten nog steeds gezien, indicatief voor een door verhoogde circulerende Fhb concentratie veroorzaakte daling in de microcirculatie van de nieren. Daarnaast toonden urine NAG en histologische evaluatie van de nier de ontwikkeling van AKI aan, op het niveau van de proximale tubulaire epitheelcel van de nier. Tevens was de ontwikkeling van AKI, gemeten naar NAG concentratie in de urine, geassocieerd met de circulerende Fhb waarden (Spearman $r = 0.78$, $P = 0.0026$). Opmerkelijk is dat de microcirculatie van de nieren verbeterde en de ontwikkeling van AKI teruggedrongen werd door het Fhb-inactiverende NO-gas. BOLD-MRI data toonden een afname van het zuurstofgehalte van de nieren tijdens de periode van Fhb infusie. Deze data onthullen een nieuw mechanisme van AKI ontwikkeling afhankelijk van verhoogde circulerende Fhb concentraties, zoals die ook tijdens cardiovasculaire chirurgie voorkomen, en bieden tevens een therapeutische optie om het Fhb onschadelijk te maken.

Concluderend laat dit proefschrift zien dat verhoogde circulerende Fhb waarden niet alleen een gezondheidsrisico vormen in chronische ziekten zoals sikkelcel ziekte of malaria. Verhoogde Fhb waarden zijn wel degelijk een reden voor aandacht bij patiënten die cardiovasculaire chirurgie ondergaan, met behulp van extracorporale circulatie, bloed transfusies en een cell-saver systeem; deze patiënten zijn onderhevig aan substantiële hemolyse. Fhb kan orgaanschade induceren gedurende en na cardiovasculaire chirurgie, waarbij inhalatie van NO-gas een mogelijkheid biedt het circulerende Fhb onschadelijk te maken. Daarom dienen circulerende Fhb waarden in de kliniek nauwlettend in de gaten gehouden te worden wanneer deze patiënten geopereerd worden. Er zullen in de toekomst meer studies gedaan moeten worden met patiënten om interventies te ontwikkelen teneinde hemolyse te reduceren en de schadelijke effecten van Fhb rondom cardiovasculaire chirurgie tegen te gaan.

Voor referenties zie pagina 148.

Zusammenfassung

Zusammenfassung

Der Titel dieser Dissertation lautet „*Hemolysis, Microcirculatory Changes and Organ Injury Induced by Cardiovascular Surgery*“, ins Deutsche übersetzt „Hämolyse, Veränderungen der Mikrozirkulation und Organschäden induziert durch kardiovaskuläre Chirurgie“. Hämolyse ist der Zerfall von roten Blutkörperchen, das täglich in kleinen Mengen kontrolliert stattfindet. Die beschädigten roten Blutkörperchen werden in der Milz abgefangen, und ihr Inhalt wird in der Leber abgebaut. Hämolyse kann jedoch auch in unkontrollierter Form stattfinden, wobei der Inhalt der roten Blutkörperchen in den Blutkreislauf freigesetzt wird.

In den letzten Jahren wurden Studien veröffentlicht, in denen die Wirkung der Hämolyse bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen chronischen hämolytischen Erkrankungen wie Sichelzellanämie und Malaria erforscht wurden. In diesen Studien werden insbesondere die Freisetzung von Hämoglobin und dem Enzym Arginase-1 aus den roten Blutkörperchen unter die Lupe genommen. Die möglichen Auswirkungen der beiden Substanzen auf den Blutfluss auf der kleinsten Ebene (die sogenannte Mikrozirkulation) und somit mögliche Organschäden werden im Detail beschrieben. Während sich diese Studien auf Patienten mit chronischen hämolytischen Krankheiten konzentrieren, sind die Auswirkungen der Hämolyse in akuten Situationen wie bei kardiovaskulären Operationen unklar.

Das Hauptziel der Studien, die in dieser Dissertation beschrieben werden, war daher die Erforschung von Hämolyse während kardiovaskulärer Eingriffe. Bewertet werden sollte, ob Hämolyse bei den betroffenen Patienten nur ein harmloser Nebeneffekt ist oder ob sie eine wichtige Rolle während und nach der Operation spielt. Der Schwerpunkt der Studien lag darin, mögliche Störungen in der Mikrozirkulation und die Entwicklung von Organschäden aufgrund von Hämolyse zu untersuchen. Das Auftreten von Organschäden spielt besonders in der postoperativen Phase eine extrem wichtige Rolle. Nach kardiovaskulären Operationen führen insbesondere intestinale Schäden und Nierenschäden zu einem komplizierten postoperativen Verlauf, einer längeren Erholungsphase und einer erhöhten Sterberate bei den Patienten. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Studien zusammengefasst.

Aortenaneurysmen sind Erweiterungen der Hauptschlagader (Aorta), deren genauere Bezeichnung abhängig ist von der anatomischen Lokalisation des Aneurysmas. Ein in der Brusthöhle gelegenes Aneurysma wird als thorakales Aortenaneurysma (TAA) bezeichnet. Befindet sich ein Aneurysma in der Brust- und Bauchhöhle, so spricht man von einem thorako-abdominalen Aortenaneurysma (TAAA). Die Operation eines Aneurysmas ist ein sehr komplexer kardiovaskulärer Eingriff, der mit hohen postoperativen Risiken für Komplikationen und Mortalität einhergeht.¹⁻³ Experimentelle Studien während großer Operationen und bei Traumapatienten haben gezeigt, dass Hypoperfusion (verminderter Blutfluss) der Bauchorgane zu einer

ganzheitlichen entzündlichen Reaktion (systemische inflammatorische Reaktion) führt.^{4, 5} Der Schutz der Bauchorgane wie Magen, Darm, Leber und Nieren, die in ihrer Blutversorgung abhängig sind von der Aorta, ist daher während großer kardiovaskulärer Eingriffe sehr wichtig.^{6, 7} Die extrakorporale Zirkulation (EKZ), auch Herz-Lungen-Maschine genannt, versorgt die Bauchorgane während großer kardiovaskulärer Operationen zu ihrem Schutz mit sauerstoffreichem Blut.^{8, 9}

Das erste Ziel der vorliegenden Dissertation war es, früh auftretende Schäden an Darm, Leber und Nieren und entzündliche Reaktionen bei Patienten mit offenen TAA- und offenen TAAA-Operationen zu vergleichen. Alle Operationen wurden unter Einsatz einer EKZ durchgeführt (**Kapitel 2**). Fettsäurebindende Proteine (FABP) sind kleine Eiweiße, die in den Zellen verschiedener Organe vorkommen. Diese Proteine können als sensibler Marker im Blut genutzt werden, um Zellschäden früh zu erkennen und den verschiedenen Organen zuzuordnen.¹⁰ I-FABP und L-FABP sind zwei Arten von FABP, die im menschlichen Darm häufig vorhanden sind.¹¹ Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Darmverletzungen bei Patienten entweder während oder unmittelbar nach einer offenen TAA- oder TAAA-Operation auftreten. Zur Bewertung der allgemeinen Entzündungsreaktion wurden die Entzündungsparameter (IL-6 und IL-8) im Blut dieser Patienten gemessen. Um bei allen Patienten den Zusammenhang zwischen Darmschädigungen und der entzündlichen Reaktion zu untersuchen, wurden Korrelationsanalysen zwischen AUC_{I-FABP} mit AUC_{IL-6} und AUC_{IL-8} durchgeführt (Abbildung 2.5). AUC_{I-FABP} steht für das Ausmaß der Darmschädigung in der gemessenen Zeit. Da diese statistisch signifikant mit den freigegebenen Entzündungsmarkern IL-6 (AUC_{IL-6} , $r = 0,64$, $P < 0,001$) und IL-8 (AUC_{IL-8} , $r = 0,54$, $P < 0,01$) korreliert, deutet dies auf eine starke Assoziation zwischen der Höhe der Darmschädigung und der anschließenden systemischen, inflammatorischen Reaktion hin. Trotz der vermeintlichen Schutzwirkung der EKZ ist die Entstehung von Darmverletzungen offensichtlich. Zusätzlich zu den systemischen Untersuchungen wurden organspezifische Messungen durchgeführt, welche die Freisetzung von I-FABP und L-FABP im Darm bestätigten. Erstaunlicherweise kam es nicht nur während der Durchblutung der Bauchorgane mit Hilfe der EKZ, sondern auch in der sogenannten Reperfusionphase, nachdem das EKZ-Verfahren beendet war, zu Darmverletzungen. Dies legt nahe, dass entweder weiterhin Darmzellen beschädigt werden oder die Hypoperfusion, mit Darmschäden als Folge, fortbesteht. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse von früheren Studien, in denen der Reperfusionseffekt bei Patienten mit Hypovolämie oder kardiogenem Schock untersucht wurde. In diesen Fällen kommt es zu einer Umverteilung des Blutes, wobei lebenswichtige Organe (z.B. Herz und Hirn) zulasten der Bauchorgane bevorzugt versorgt werden. Dieses Phänomen könnte allerdings, wie im folgenden Abschnitt beschrieben wird, in der kardiovaskulären Chirurgie auch durch einen anderen pathophysiologischen Prozess erklärt werden.

Bei Patienten mit kardiovaskulären Operationen unter Einsatz einer EKZ führen Schäden an roten Blutkörperchen zur unerwünschten, aber unvermeidlichen Hämolyse.¹² Hämolyse wiederum führt zu Störungen des Stickstoffmonoxid (NO)-Stoffwechsels in der Gefäßwand. NO, das in der Gefäßwand produziert wird, spielt eine große Rolle bei der Regulierung des Widerstandes und des Durchmessers der Arterien und ist somit hauptsächlich für den Blutfluss in den Organen zuständig.¹³⁻¹⁵ Das Enzym Arginase-1 und das Molekül freies oxygeniertes Hämoglobin (FHb) sind Stoffe, die während der Hämolyse in die Blutbahn freigesetzt werden. Beide können die Verfügbarkeit von NO vermindern: einerseits indem Arginase-1 das Substrat für NO, Arginin, in Ornithin umwandelt, und andererseits indem FHb NO abfängt und somit die NO-Verfügbarkeit reduziert. Hierdurch wird die Mikrozirkulation in den Organen gestört, was wiederum Organschäden zur Folge hat. Wie bereits oben beschrieben, sind die Organschäden ein wichtiger Faktor für die Rehabilitation von Patienten nach kardiovaskulären Operationen.

Um den möglichen Zusammenhang zwischen der Freisetzung von Arginase-1 und dem Substrat für NO (Arginin) im Blutplasma zu erforschen, wird wie in **Kapitel 3** beschrieben, die Wirkung von Arginase-1 auf die Verfügbarkeit von Arginin sowohl in vivo als auch in vitro getestet. Arginase-1 ist außer in roten Blutkörperchen und in mononukleären Zellen vor allem in der Leber vorhanden, wo es als Enzym eine wichtige Rolle im Harnstoffzyklus spielt.¹⁶⁻¹⁸ Aus diesem Grund nahmen an dieser Studie Patienten mit leberchirurgischen Operationen in Form einer Leberresektion oder Lebertransplantation teil. Diese Patienten dienten als Modell für die intravaskuläre Freisetzung von Arginase-1, wobei die potenziellen Auswirkungen der zirkulierenden Arginase-1 auf die Aminosäure Arginin im Plasma des Blutes untersucht wurden. Wir stellten fest, dass diese Patienten eine deutliche Zunahme von zirkulierender Arginase-1 aufwiesen. Da Arginase-1 den Abbau von Arginin zu Ornithin und Harnstoff katalysiert, wurde erwartet, dass ein erhöhter Arginase-1-Spiegel im Blut eine Abnahme der Arginin-Konzentration verursacht, was in vivo nicht der Fall zu sein schien.

Roth et al. zeigten erstmals im Jahr 1994, dass eine Lebertransplantation zu einer akuten Abnahme von Arginin und einem gleichzeitigen Anstieg der Ornithin-Konzentration führt.¹⁹ Wir fanden heraus, dass bei Patienten nach Lebertransplantationen die Arginase-1-Konzentration im Blut durchschnittlich 100x höher war als bei Patienten, die einer Leberresektion unterzogen wurden. In vitro Inkubation von Plasma-Proben, die Patienten nach Lebertransplantationen entnommen wurden, bestätigten, dass die Arginase-1-Plasma-Aktivität zu in vivo Veränderungen in Arginin und Ornithin-Konzentrationen beiträgt, welche nach Lebertransplantationen bei unseren Patienten gefunden wurden.

Diese Studien zeigen, dass die Arginase-1-Aktivität im Plasma nach Lebertransplantationen klinisch relevant sein kann. Wir haben jedoch keinen Einfluss der (im

Vergleich zu präoperativ) achtfach erhöhten zirkulierenden Arginase-1-Konzentration auf die Arginin und Ornithin-Konzentrationen im Plasma bei Patienten von Leberresektionen festgestellt. In Einklang mit diesen in vivo Daten haben wir in vitro bei Proben mit einer durchschnittlichen Arginase-1-Konzentration von 185 ng/ml, welche vergleichbar ist mit Plasmakonzentrationen von Patienten mit kardiovaskulären Eingriffen (siehe Kapitel 5), keine Zunahme in der Bildung von Ornithin oder dem Verbrauch von Arginin gefunden. Darüber hinaus zeigten wir in vitro, dass die Aktivität von Arginase-1 im Vollblut unabhängig ist von der Konzentration von extrazellulärem Arginase-1 und vor allem durch intrazelluläre Arginase-1 in den roten Blutkörperchen bestimmt wird. Zusätzlich beweisen die in vivo und in vitro Studien, dass eine Arginase-1-Plasmakonzentration über dem Schwellenwert von 2000 ng/ml nötig ist, um eine signifikante Abnahme von Plasma-Arginin zu induzieren.

Abschließend zeigt die Studie, dass eine Zunahme der Arginase-1-Plasmakonzentration, so wie sie in der kardiovaskulären Chirurgie gefunden wird, nicht zu einer Abnahme der Arginin-Plasmakonzentration führt. Der Schwellenwert, ab dem Arginase-1 einen erheblichen Einfluss auf die Arginin-Plasmakonzentration hat und möglicherweise die NO-Produktion in der Gefäßwand eingeschränkt wird, wird außer bei Lebertransplantationen, selten erreicht. Arginase-1-Plasmakonzentrationen bei kardiovaskulären Eingriffen, wie in Kapitel 5 beschrieben, bleiben weit unter diesem Schwellenwert.

Reiter et al. suggerierten, dass Hämolyse und die anschließende Freisetzung des oxygenierten Hämoglobins (FHb) eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Mikrozirkulation bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen hämolytischen Erkrankungen spielt.²⁰ Sie zeigten erstmals, dass das Plasma von Patienten mit Sichelzellanämie, welches FHb beinhaltet, in der Lage ist, NO aufzunehmen. Sie beschrieben Veränderungen des Blutflusses in den Unterarmen als Reaktion auf NO-Donor-Infusionen in die arterielle Blutbahn. Diese Ergebnisse stimulierten, wenn auch indirekt, die weitere Erforschung der schädlichen Auswirkungen von FHb bei akuten, chronischen und erworbenen hämolytischen Erkrankungen.^{14, 15, 21-25} Obwohl erhöhte FHb-Werte während kardiovaskulärer Eingriffe durchaus zu erwarten sind und Hämolyse während dieser Operationen in der Literatur beschrieben wird, sind die Konsequenzen von FHb unter Berücksichtigung der Erkenntnisse von Reiter et al. weiterhin unbekannt.¹² Die möglichen Quellen von Hämolyse während kardiovaskulärer Chirurgie, sowie die möglichen Auswirkungen und Therapien werden in dieser Dissertation in Form einer Literaturstudie beschrieben (**Kapitel 4**).

Es gibt drei Faktoren, die Hämolyse während kardiovaskulärer Operationen verursachen können: i) die EKZ^{12, 26}, ii) das Zell-Bewahrungs-System, mit dem rote Blutkörperchen aus dem Operationsgebiet gesammelt und an den Patienten zurückgegeben werden können²⁷ und iii) die Verwendung von (Massen-) Bluttransfu-

sionen.^{28, 29} Der Anstieg von Fhb im Plasma kann durch das Abfangen von NO die Mikrozirkulation stören, was wiederum zu einer Hypoperfusion und schlussendlich zu ischämischen Schäden an den Organen führen kann. Die Reaktion zwischen NO und Fhb ist schnell und irreversibel. Durch die Bindung eines Elektrons und des Sauerstoff-Moleküls von Fhb ($\text{HbFe}^{2+}\text{-O}_2$) an NO, entsteht das inaktive Methämoglobin (HbFe^{3+}) und als Nebenprodukt Nitrat (NO_3^-).¹³ Da NO durch Fhb in der Blutbahn abgefangen werden kann, somit die Mikrozirkulation beeinflusst wird und Organschäden entstehen, betrachten wir Fhb nicht nur als einen harmlosen Nebeneffekt während kardiovaskulärer Operationen mit EKZ, mit oder ohne Zell-Bewahrungs-System und (Massen-)Bluttransfusion. In unserer Literaturstudie suggerieren wir, dass Studien notwendig sind, in denen mit Haptoglobin-Infusion oder Inhalation von NO das Fhb unschädlich gemacht oder mit Nitrit-Infusion die NO Verfügbarkeit erhöht wird. Nur so kann ein kausaler Zusammenhang zwischen Plasma-Fhb, NO-Verfügbarkeit und Organschäden während kardiovaskulärer Operationen verstanden werden.

Wie bereits oben beschrieben, ist die Hämolyse eine potenzielle Gefahr, welche die Verfügbarkeit von NO reduzieren und somit zu einer Mikrozirkulationsstörung führen kann. Die Relevanz der Hämolyse bei der Mikrozirkulation in der kardiovaskulären Chirurgie ist bisher unbekannt. Das Ziel der in **Kapitel 5** beschriebenen Studie war zunächst, den Grad der Hämolyse und die Menge von freigegebenen Arginase-1 und Fhb bei Patienten mit kardiovaskulären Operationen unter Einsatz einer EKZ einschließlich Zell-Bewahrungs-System und Bluttransfusion zu quantifizieren. Im Anschluss daran wurde der Blutfluss in den Unterarmen der Patienten als Reaktion auf eine NO-Donor-Infusion, sowohl bei hohen, als auch bei niedrigen Fhb-Plasmakonzentrationen gemessen. Außerdem wurde die Wirkung von Arginase-1 im Plasma auf die Plasmakonzentrationen von Arginin und Ornithin untersucht.

Hämolyse trat auf und wurde während kardiovaskulärer Operationen mittels einer erhöhten Fhb- und Arginase-1-Plasmakonzentration gemessen, wobei beide Parameter signifikant miteinander korrelierten (Spearman $r = 0,83$, $P = 0,005$). Da eine erhöhte Fhb-Plasmakonzentration die durch NO verursachte Gefäßerweiterung einschränken könnte, wurde der NO-abhängige Unterarmblutfluss bei Patienten mit einer TAA- oder TAAA-Operation gemessen. Darüber hinaus wurde als positive Kontrolle für die Funktionstüchtigkeit der Gefäßwand, die NO-unabhängige Gefäßerweiterung gemessen. Messungen des Blutflusses am Unterarm wurden als Modell angewandt, um die Auswirkungen intraarteriell verabreichter NO-Donor (Nitroprussidnatrium in zunehmender Dosierung) bei sowohl hohen als auch niedrigen Fhb-Konzentrationen zu untersuchen. Als wesentliches Ergebnis stellte sich heraus, dass die Durchblutung des Unterarms negativ mit den Fhb-Plasmawerten korrelierte, was darauf hinweist, dass NO bei hoher Konzentration von zirkulierendem Fhb abgefangen wurde. Dies zeigt, wenn auch indirekt, dass die Konzentration von zirku-

lierendem Fhb während kardiovaskulärer Chirurgie die Organperfusion einschränkt und somit unter Umständen Organschäden verursachen kann. Trotz der Zunahme der Arginase-1-Plasmakonzentration wurde keine Veränderung im Plasma Arginin / Ornithin-Verhältnis, welches als Surrogat-Marker für Arginase-1-Aktivität verwendet wurde, festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die Freisetzung von Arginase-1 während kardiovaskulärer Eingriffe die Verfügbarkeit von Arginin, das Substrat für die NO-Synthese, nicht einschränkt. Darüber hinaus zeigte die Korrelationsanalyse zwischen der Freisetzung von Arginase-1 im Plasma und der Abnahme der Plasma-Arginin-Konzentration keinen Zusammenhang zwischen beiden Parametern (Spearman $r = 0,55$, $P = 0,105$). Diese Ergebnisse bestätigen die Studie in Kapitel 3, wobei eine erhöhte Arginase-1-Aktivität im Plasma nicht erwartet wurde.

Unsere folgende Hypothese war, dass intravasal freigesetztes Fhb die intestinale Mikrozirkulation beeinflusst und infolgedessen zu Darmschäden führen kann. Gastrointestinale Komplikationen werden nach kardiovaskulären Operationen gefürchtet, da sie mit einer hohen Morbidität und Mortalitätsrate einhergehen.^{3, 7, 30, 31} Ziel der Studie in **Kapitel 6** war es, die Darmdurchblutung und Darmschäden in einem Tiermodell mit erhöhter Konzentration von zirkulierendem Fhb im Plasma zu bewerten. Zu diesem Zweck haben wir ein Tiermodell entwickelt, in dem erhöhte Fhb-Plasmakonzentrationen hervorgerufen wurden, die mit denen von Patienten vergleichbar waren, die sich kardiovaskulären Operationen unterziehen. Mit Hilfe von fluoreszierenden Mikrobeads wurde anschließend der Einfluss von zirkulierendem Fhb auf die Mikrozirkulation des Darms untersucht. Darüber hinaus wurden biochemische und histologische Parameter, die Darmschäden signalisieren, ausgewertet.

Drei Gruppen wurden in die Studie einbezogen. Um intravaskuläre Hämolyse und eine Erhöhung der Konzentration von zirkulierendem Fhb zu erreichen, wurde bei der ersten Gruppe unseres Ratten-Versuchsmodells steriles pyrogenfreies Wasser injiziert, so wie es in früheren Studien mit Hunde-Versuchsmodellen beschrieben wurde. Bei der zweiten Gruppe wurden Fhb-Infusionen und bei der Kontrollgruppe Infusionen mit Kochsalzlösung verwendet. Sowohl die Wasser- als auch die Fhb-Infusionen führten im Vergleich zu der Infusion bei der Kontrollgruppe zu einer verminderten Mikrozirkulation. Außerdem kam es zu einer signifikanten Korrelation zwischen den Werten des zirkulierenden Fhb und dem Ileum-lipid-binding-protein (ILBP) - Werten im Plasma, ein Eiweiß, das nur in reifen intestinalen Epithelzellen vorkommt (Spearman $r = 0,70$, $P = 0,0017$). Das Eiweiß ILBP gehört zu der Familie der FABP und ist ein schneller und sensibler Marker, der das Messen von Darmschäden in Plasma und Urin ermöglicht und epitheliale Schäden auf der Ebene der Zotten, immunhistochemisch sichtbar macht.³² Epitheliale Zellschäden der Zotten des Darmes wurden nach der Infusion mit Wasser und Fhb gemessen und durch histologische Analysen des Darms bestätigt.

Diese Studie weist erstmalig die schädliche Auswirkung einer erhöhten Konzentration von zirkulierendem Fhb auf die Mikrozirkulation und Gewebeintegrität des Darmes nach. Wir suggerieren daher, dass intravasale Hämolyse und somit erhöhte Mengen von zirkulierendem Fhb während kardiovaskulärer Eingriffe zu Organschäden führen können. In der Literatur über kardiovaskuläre Chirurgie werden Darm-schäden, die anhand von FABP-Eiweißen wie zum Beispiel ILPB gemessen werden können, beschrieben.^{7, 33} In Kapitel 2 wird außerdem beschrieben, dass Darmpithelzellschäden, die während kardiovaskulärer Operationen entstehen, mit systemischen inflammatorischen Reaktionen einhergehen.³⁴ An dieser Stelle ist es verlockend zu spekulieren, dass Fhb in dieser Patientenpopulation bei der Entstehung von Darmschäden eine Rolle spielt. Wie bereits beschrieben, ist bekannt, dass akute gastrointestinale Komplikationen nach kardiovaskulären Operationen mit einem hohen Risiko auf einen komplizierten postoperativen Verlauf mit hoher Mortalitätsrate einhergehen.

Akutes Nierenversagen (acute kidney injury, AKI) ist die häufigste und gefürchtetste Komplikation nach kardiovaskulären Eingriffen, da es mit einer hohen Morbidität und Mortalitätsrate assoziiert wird.^{35, 36} Aufgrund dieser Assoziation stellten wir die Hypothese auf, dass intravasal freigegebenes Fhb die Nierendurchblutung vermindert und AKI verursachen kann. Das Ziel der Studie in **Kapitel 7** war es in einem Tiermodell mit erhöhten Werten von zirkulierendem Fhb, die Nierendurchblutung und renale tubuläre Epithelzellschäden zu bewerten. Zu diesem Zweck haben wir das gleiche Ratten-Modell, das in Kapitel 6 beschrieben wurde, verwendet, da dieses Fhb-Werte erreichte, die vergleichbar waren mit denen von Patienten mit kardiovaskulären Eingriffen. In Kapitel 7 werden die möglichen Auswirkungen von zirkulierendem Fhb sowohl mit als auch ohne Inhalation von NO-Gas als Fhb-inaktivierende Therapie auf die renale Mikrozirkulation unter Verwendung von fluoreszierenden Mikrobeads bestimmt. Darüber hinaus wurde der Marker für Schäden an der tubulären Epithelzelle, N-Acetyl Glucosaminidase (NAG), im Urin bestimmt und histologische Parameter von AKI untersucht. Die durch Fhb-Infusionen verursachten Veränderungen im Sauerstoffgehalt der Nieren wurden mit "Blood Oxygen Level Dependent Magnetic Resonance Imaging" (BOLD-MRI) untersucht.

Im Gegensatz zu der Kontrollgruppe, die lediglich eine Infusion mit Kochsalzlösung bekam, trat 15 Minuten nach Beginn der Fhb-Infusion eine signifikante Abnahme in der Mikrozirkulation der Nieren ein. Da nach 60 Minuten noch immer eine Verringerung in der Mikrozirkulation der Nieren sichtbar war, lässt dies darauf schließen, dass eine erhöhte Konzentration von zirkulierendem Fhb grundsätzlich eine Abnahme der Mikrozirkulation in den Nieren zur Folge hat. Zusätzlich wies NAG im Urin und die histologische Untersuchung der Nieren auf die Entwicklung von AKI auf der Ebene der proximalen Epithelzellen der Nieren hin. Außerdem war die Ent-

wicklung von AKI, gemessen anhand der NAG-Konzentration im Urin, mit den zirkulierenden Fhb-Werten assoziiert (Spearman $r = 0,78$, $P = 0,0026$). Bemerkenswert ist, dass sich durch das Inhalieren von Fhb-inaktivierendem NO-Gas die Mikrozirkulation der Nieren verbesserte und die Entwicklung von AKI abnahm. Während der Fhb-Infusionen wiesen BOLD-MRI-Daten eine Abnahme des Sauerstoffgehaltes in den Nieren auf. Diese Daten offenbaren einen neuen Mechanismus für die Entstehung von AKI, welcher abhängig ist von einer erhöhten Konzentration von zirkulierendem Fhb, wie sie bei kardiovaskulären Eingriffen vorkommt und bietet außerdem eine therapeutische Möglichkeit Fhb unschädlich zu machen.

Auf Basis dieser Dissertation lässt sich schlussfolgernd sagen, dass erhöhte Werte zirkulierenden FHbs nicht nur ein gesundheitliches Risiko bei chronischen Krankheiten wie Sichelzellanämie und Malaria darstellen. Auch bei Patienten mit kardiovaskulären Eingriffen, mit EKZ, Zellbewahrungs-Systemen und Bluttransfusionen muss durchaus auf erhöhte Werte Fhb-Werte geachtet werden. Fhb kann Organschäden während und nach kardiovaskulären Eingriffen verursachen, wobei die Inhalation von NO-Gas eine Möglichkeit bietet, das zirkulierende Fhb unschädlich zu machen. Daher müssen die Werte von zirkulierendem Fhb bei Patienten, die sich dieser Operationen unterziehen müssen, gut überwacht werden. In der Zukunft sind weitere Studien bei Patienten mit kardiovaskulären Eingriffen nötig, um Methoden zu entwickeln, die helfen, Hämolyse bei diesen Patienten zu reduzieren und dem schädlichen Einfluss von Fhb entgegenzuwirken.

Referenties / Literaturverzeichnis

1. Rectenwald JE, Huber TS, Martin TD, et al. Functional outcome after thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2002; 35:640–7.
2. Gloviczki P. Surgical repair of thoracoabdominal aneurysms: patient selection, techniques and results. *Cardiovasc Surg* 2002; 10:434–41.
3. Achouh PE, Madsen K, Miller CC, 3rd, et al. Gastrointestinal complications after descending thoracic and thoracoabdominal aortic repairs: a 14-year experience. *J Vasc Surg* 2006; 44:442–6.
4. Fink MP. Gastrointestinal mucosal injury in experimental models of shock, trauma, and sepsis. *Crit Care Med* 1991; 19:627–41.
5. Moore FA. The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 1999; 178:449–53.
6. MacArthur RG, Carter SA, Coselli JS, LeMaire SA. Organ protection during thoracoabdominal aortic surgery: rationale for a multimodality approach. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth* 2005; 9:143–9.
7. Welborn MB, Oldenburg HS, Hess PJ, et al. The relationship between visceral ischemia, proinflammatory cytokines, and organ injury in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Crit Care Med* 2000; 28:3191–7.
8. Jacobs MJ, de Mol BA, Legemate DA, et al. Retrograde aortic and selective organ perfusion during thoracoabdominal aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14:360–6.
9. Jacobs MJ, Mommertz G, Koepfel TA, et al. Surgical repair of thoracoabdominal aortic aneurysms. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 2007; 48:49–58.
10. Lieberman JM, Sacchetti J, Marks C, Marks WH. Human intestinal fatty acid binding protein: report of an assay with studies in normal volunteers and intestinal ischemia. *Surgery* 1997; 121:335–42.
11. Pelsers MM, Hermens WT, Glatz JF. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta* 2005; 352:15–35.
12. Vercaemst L. Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: a review in search of a treatment algorithm. *J Extra Corpor Technol* 2008; 40:257–67.
13. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *Jama* 2005; 293:1653–62.
14. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, et al. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. *J Clin Invest* 2005; 115:3409–3417.
15. Villagra J, Shiva S, Hunter LA, et al. Platelet activation in patients with sickle disease, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin. *Blood* 2007; 110:2166–72.
16. Ochoa JB, Bernard AC, O'Brien WE, et al. Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Ann Surg* 2001; 233:393–9.
17. Prins HA, Houdijk AP, Nijveldt RJ, et al. Arginase release from red blood cells: possible link in transfusion induced immune suppression? *Shock* 2001; 16:113–5.
18. Meijer AJ, Lamers WH, Chamuleau RA. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiol Rev* 1990; 70:701–48.
19. Roth E, Steininger R, Winkler S, et al. L-arginine deficiency after liver transplantation as an effect of arginase efflux from the graft. *Transplantation* 1994; 57:665–9.
20. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, et al. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 2002; 8:1383–9.
21. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *Jama* 2005; 294:81–90.
22. Kato GJ, Hsieh M, Machado R, et al. Cerebrovascular disease associated with sickle cell pulmonary hypertension. *Am J Hematol* 2006; 81:503–10.
23. Ataga KI, Moore CG, Hillery CA, et al. Coagulation activation and inflammation in sickle cell disease-associated pulmonary hypertension. *Haematologica* 2008; 93:20–6.

24. Lewis DA, Nyska A, Potti A, et al. Hemostatic activation in a chemically induced rat model of severe hemolysis and thrombosis. *Thromb Res* 2006; 118:747–53.
25. Yeo TW, Lampah DA, Gitawati R, et al. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *J Exp Med* 2007; 204:2693–704.
26. Franssen EJ, Ganushchak YM, Vijay V, et al. Evaluation of a new condensed extra-corporeal circuit for cardiac surgery: a prospective randomized clinical pilot study. *Perfusion* 2005; 20:91–9.
27. Serrick CJ, Scholz M, Melo A, et al. Quality of red blood cells using autotransfusion devices: a comparative analysis. *J Extra Corpor Technol* 2003; 35:28–34.
28. Karkouti K, Wijeyesundera DN, Yau TM, et al. The independent association of massive blood loss with mortality in cardiac surgery. *Transfusion* 2004; 44:1453–62.
29. Koch CG, Li L, Sessler DI, et al. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. *N Engl J Med* 2008; 358:1229–39.
30. Halm MA. Acute gastrointestinal complications after cardiac surgery. *Am J Crit Care* 1996; 5:109–18; quiz 119–20.
31. Filsoufi F, Rahmanian PB, Castillo JG, et al. Predictors and outcome of gastrointestinal complications in patients undergoing cardiac surgery. *Ann Surg* 2007; 246:323–9.
32. Derikx JP, Matthijsen RA, de Bruine AP, et al. Rapid reversal of human intestinal ischemia-reperfusion induced damage by shedding of injured enterocytes and reepithelialisation. *PLoS ONE* 2008; 3:e3428.
33. Morariu AM, Loeff BG, Aarts LP, et al. Dexamethasone: benefit and prejudice for patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting: a study on myocardial, pulmonary, renal, intestinal, and hepatic injury. *Chest* 2005; 128:2677–87.
34. Hanssen SJ, Derikx JP, Vermeulen Windsant IC, et al. Visceral injury and systemic inflammation in patients undergoing extracorporeal circulation during aortic surgery. *Ann Surg* 2008; 248:117–25.
35. Chertow GM, Levy EM, Hammermeister KE, et al. Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. *Am J Med* 1998; 104:343–8.
36. Schepens MA, Heijmen RH, Ranschaert W, et al. Thoracoabdominal aortic aneurysm repair: results of conventional open surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2009; 37:640–5.