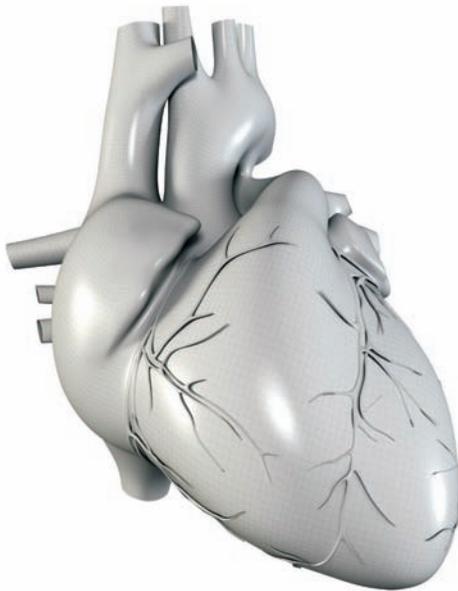


**EINFLUSS VON PLASMAEXPANDERN AUF  
ENDOTHELABHÄNGIGE, VASOAKTIVE FAKTOREN  
AN HERZKRUNZGEFÄßEN VON SCHWEINEN**

**MAITE ANN-KATRIN KLISA**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2011

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Aus dem  
Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Wiederkäuer und Schweine  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner**

**und  
aus dem  
Institut für experimentelle Medizin der Universität zu Köln**

**Betreuer: Prof. Dr. J.H. Fischer**

**Einfluss von Plasmaexpandern  
auf endothelabhängige, vasoaktive Faktoren  
an Herzkranzgefäßen von Schweinen**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**eingereicht von  
Maite Ann-Katrin Klisa  
Tierärztin aus Köln**

**Gießen 2011**

**Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Dekan: Prof. Dr. M. Kramer**

**Gutachter: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner  
Prof. Dr. J.H. Fischer**

**Tag der Disputation: 20.12.2011**

Heribert Schürholz  
Und  
Marianne Ludwig

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen-----	1
Tabellenverzeichnis-----	4
Abbildungsverzeichnis-----	4
Diagrammverzeichnis-----	5
1 Einleitung-----	7
1.1 Historie von Plasmaexpandern -----	7
1.2 Plasmaexpander – die verwendeten Studiensubstanzen-----	7
1.2.1 HES-----	9
1.3 EDHF - Der vom Endothel stammende Hyperpolarisationsfaktor-----	10
1.3.1 EDHF Dilatation an isolierten Arterien und Arteriolen -----	13
1.3.2 Mechanismen der EDHF Dilatation-----	15
1.3.3 Veränderungen und Beeinträchtigung des NO-EDHF-Systems--	16
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit-----	18
2 Material und Methodik -----	19
2.1 Probenmaterial-----	19
2.2 Probenentnahme-----	19
2.3 Feinpräparation und Einspannen-----	21
2.4 Versuchapparatur-----	22
2.5 Versuchsdurchführung-----	24
2.6 Verwendete Substanzen -----	27
2.7 Kontrollversuch-----	28
2.8 Versuchsablauf-----	28
2.9 Darstellung und Vergleich der Testergebnisse -----	29
3 Ergebnisteil -----	30
3.1 Anzahl der Gefäßringe-----	30
3.2 Kontrollversuche-----	30
3.2.1 Mittelwerte-----	33
3.3 Versuche mit Studiensubstanz -----	34
3.3.1 EDR frischer Koronararterien-----	35
3.3.2 EDHF frischer Koronararterien-----	37

3.3.3 EDR nach 24 Stunden Konservierung -----	39
3.3.4 EDHF nach 24 Stunden Konservierung -----	41
3.4 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen-----	44
3.4.1 Ohne Substanz -----	44
3.4.2 HES-----	45
3.4.3 Dextran-----	46
3.4.4 Gelatine-----	47
3.5 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen der auf PGF <sub>2α</sub> erfolgten Kontraktion -----	48
3.5.1 Ohne Substanz -----	48
3.5.2 HES-----	49
3.5.3 Dextran-----	50
3.5.4 Gelatine-----	51
4 Diskussion-----	52
4.1 Kritik der Methodik-----	52
4.1.1 Kaliumchlorid -----	54
4.1.2 Indometacin-----	55
4.1.3 L-Arginin – NO -----	56
4.1.4 L-NNA -----	58
4.1.5 EDHF-----	58
4.1.6 PGF <sub>2α</sub> -----	64
4.1.7 Bradykinin -----	65
4.1.8 Qualitätssicherung -----	67
4.1.9 Natriumnitroprussid-----	68
4.1.10 Papaverin -----	69
4.2 Darstellung und Vergleich der Testergebnisse-----	70
4.3 Plasmaexpander – die verwendeten Studiensubstanzen-----	71

5 Zusammenfassung -----	76
6 Summary -----	77
7 Quellenverzeichnis-----	78
8 Eidesstaatliche Erklärung-----	94
9 Danksagung-----	95

## Abkürzungen

A	Arteria
Abb	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AG	Aktiengesellschaft
AMP	Adenosinmonophosphat
ANH	akute normovolämische Hämodilution
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
BK <sub>Ca</sub>	(“big”) große Kalzium-abhängige Kaliumkanäle
BK	Bradykinin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
CNP	Natriuretisches Peptid vom C-Typ
COX	Cyclooxygenase
Da	Dalton
d.h.	das heißt
Dr.	Doktor
EDHF	Endothelium-derived-hyperpolarizing-factor
EDR	Endothelium-derived-relaxation
EET	Epoxyeicosatrienoic Acid, Epoxyeicosa-triensäuren
et al.	et alii, und andere
Fa.	Firma
g	Gramm
GMP	Guanosinmonophosphat
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
HES	Hydroxyethylstärke
Hg	Quecksilber

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Dihydrogenphosphat
IK <sub>Ca</sub>	intermediäre Kalzium-abhängige Kaliumkanäle
Indo	Indometacin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
i.v.	intravenös
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KG	Kapitalgesellschaft
KH	Krebs-Henseleit
K <sub>ir</sub>	einwärts korrigierender Kaliumkanal (=inwardly rectifying potassium channel)
l	Liter
L-Arg	L-Arginin
L-NNA	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin, L-N <sup>G</sup> -Nitroarginin
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg	Lösung
Ltd.	Limited
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
MHC	major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute/n
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MW	molecular weight = Molekulargewicht; Mittelwert
nM	nanoMol
NO	Stickstoffmonoxid
NOS/ NO-S	NO-Synthase, Stickstoffmonoxid-Synthase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
nNOS	neuronale NO-Synthase
NSCC	nonselective calcium channels, nichtselektive Kalziumkanäle
μl	Mikroliter

$\mu\text{mol}$	Mikromol
$\text{Na}^+$	Natrium-Ion
OP	Operation
p	Wahrscheinlichkeit
Papa	Papaverin
PC	Prostazyklin/ $\text{PGI}_2$
$\text{pCO}_2$	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
$\text{PGF}_{2\alpha}$	Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$
$\text{PGI}_2$	Prostaglandin $\text{I}_2$ /Prostazyklin
$\text{pO}_2$	Sauerstoffpartialdruck
SER	Sarkoendoplasmatisches Retikulum
SERCA	$\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen des Sarkoendoplasmatischen Retikulums
$\text{SK}_{\text{Ca}}$	(„small“) kleine Kalzium-abhängige Kaliumkanäle
$\text{SO}_4^{2-}$	Sulfat-Ion
SNP	Sodiumnitroprussid
Tab	Tabelle
u.a.	unter anderem
vs	versus
W	Waschen
z.T.	zum Teil

## **Tabellenverzeichnis**

- Tabelle 1: Bestandteile der Krebs-Henseleit Lösung
- Tabelle 2: Bestandteile der Custodiol-Lösung
- Tabelle 3: Verwendete Substanzen während des Versuchablaufs
- Tabelle 4: Mittelwerte und Standardabweichung in Prozent der Kontrollversuche ohne Substanz
- Tabelle 5: Mittelwerte und Standardabweichung in Prozent der Versuche mit der Studiensubstanz HES
- Tabelle 6: Mittelwerte und Standardabweichung in Prozent der Versuche mit der Studiensubstanz Dextran
- Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichung in Prozent der Versuche mit der Studiensubstanz Gelatine
- Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung der auf  $\text{PGF}_{2\alpha}$  erfolgten Kontraktion in mm bei den Kontrollversuchen ohne Substanz
- Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichung der auf  $\text{PGF}_{2\alpha}$  erfolgten Kontraktion in mm bei den Versuchen mit der Studiensubstanz HES
- Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung der auf  $\text{PGF}_{2\alpha}$  erfolgten Kontraktion in mm bei den Versuchen mit der Studiensubstanz Dextran
- Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichung der auf  $\text{PGF}_{2\alpha}$  erfolgten Kontraktion in mm bei den Versuchen mit der Studiensubstanz Gelatine

## **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Versuchsanordnung (nach Steinhoff 2004, mit Genehmigung der Autorin reproduziert)
- Abbildung 2: Versuchsanordnung graphische Darstellung: für die EDR setzten wir L-Arginin ein, für die Dilatation durch den EDHF nahmen wir an dieser Stelle statt L-Arg L-NNA.
- Abbildung 3: Schematische Darstellung des Moleküls – Natriumnitroprussid nach Tinker und Michenfelder, 1976

## Diagrammverzeichnis

- Diagramm 1: Mittelwerte der EDR frischer Koronararterienabschnitte im 1. und 2. Messdurchgang, \*  $p \leq 0,05$  im gepaarten t-Test (s. Kapitel 3.3.1 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – ohne Substanz)
- Diagramm 2: Mittelwerte der EDR 24-stündig konservierter Koronararterienabschnitte im 1. und 2. Messdurchgang, \*  $p \leq 0,05$  im gepaarten t-Test (s. Kapitel 3.3.1 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – ohne Substanz)
- Diagramm 3: Mittelwerte der EDHF frischer Koronararterienabschnitte im 1. und 2. Messdurchgang, \*  $p \leq 0,05$  im gepaarten t-Test (s. Kapitel 3.3.1 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – ohne Substanz)
- Diagramm 4: Mittelwerte der EDHF 24-stündig konservierter Koronararterienabschnitte im 1. und 2. Messdurchgang, \*  $p \leq 0,05$  im gepaarten t-Test (s. Kapitel 3.3.1 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – ohne Substanz)
- Diagramm 5: Kontrollversuch - 1. Messdurchgang vs 2. Messdurchgang bei BK  $10^{-7}$  Mol mit  $p=0,002$  im gepaarten t-Test; EDR nach 24h Konservierung
- Diagramm 6: Mittelwerte der EDR frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit HES-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test
- Diagramm 7: Mittelwerte der EDR frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Dextran-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test
- Diagramm 8: Mittelwerte der EDR frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Gelatine-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test
- Diagramm 9: Mittelwerte des EDHF frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit HES-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test
- Diagramm 10: Mittelwerte des EDHF frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Dextran-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test

- Diagramm 11: Mittelwerte des EDHF frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Gelatine-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test
- Diagramm 12: Mittelwerte der EDR 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit HES-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test
- Diagramm 13: Mittelwerte der EDR 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Dextran-Zusätzen im zweiten Messdurchgang im SNK-Test
- Diagramm 14: Mittelwerte der EDR 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Gelatine-Zusätzen im zweiten Messdurchgang im SNK-Test
- Diagramm 15: Mittelwerte des EDHF 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit HES-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test
- Diagramm 16: Mittelwerte des EDHF 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Dextran-Zusätzen im zweiten Messdurchgang im SNK-Test
- Diagramm 17: Mittelwerte des EDHF 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Gelatine-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test

# **1 Einleitung**

## **1.1 Historie von Plasmaexpandern**

Als erstes klinisch verwendetes Kolloid zur intravasalen Volumenexpansion wurde während des ersten Weltkrieges Acacia eingesetzt (Warren und Durieux, 1997). Acacia Gum, auch als „Gummi Arabicum“ bekannt, ist ein neutrales bis schwach saures komplexes Polysaccharid, das aus dem Pflanzensaft von *Acacia senegal* oder verwandten Akazien-Arten gewonnen wird, um als getrocknetes Exudat transportiert und weiterverwendet zu werden (Provisco AG, 2011). Dieses Kolloid wurde mit einfacher Salzlösung vermischt und intravenös verabreicht (Went, 1928). Jedoch ist bekannt, dass Acacia sich nicht als geeignetes Mittel zur Schocktherapie und Behandlung von Patienten mit Blutverlust durchsetzen konnte (Went, 1928). Es folgten viele Kolloide wie z.B. Gelatine, Dextran und auch synthetische Polypeptide (Warren und Durieux, 1997). Immer wieder wurden unerwünschte Nebenwirkungen beobachtet, die sich zum Beispiel in Form von anaphylaktischen Reaktionen oder Störungen der Koagulation zeigten. Einige der Kolloide hatten keine ausreichende Verweildauer oder wurden erst nach einem viel zu großen Zeitraum eliminiert und verblieben unbestimmt lange im Organismus (Warren und Durieux, 1997). Ziel war es, die globuläre Struktur des Albumins zu erreichen, das als natürlicher Träger des kolloidosmotischen Druckes im Serum gilt (Sommermeyer, 2003).

## **1.2 Plasmaexpander – die verwendeten Studiensubstanzen**

Die von uns verwendeten Studiensubstanzen sind die Plasmaexpander: HES (200/0,5), Dextran und Gelatine in Form von Gelatinepolysuccinat. Diese Kolloide können auch als Plasmaersatzstoffe bezeichnet werden; dabei werden Lösungen aus natürlichen oder synthetischen Kolloiden unterschieden und zum raschen Volumenersatz bei Hypovolämie oder Blutverlust eingesetzt. Die in unserem Versuch genutzten Substanzen gehören alle zu der Gruppe der synthetischen Plasmaersatzstoffe und werden heute überwiegend benutzt. Der Begriff der Plasmaexpander erklärt sich anhand ihrer Wirkungsweise: ihre intravasale Volumenwirkung ist größer als das eigentlich infundierte Volumen (Dung et al., 1999). Dieses Phänomen beruht auf dem hohen kolloidosmotischen Druck, der Flüssigkeit aus dem

Interstitium in den intravasalen Raum zieht (Dung et al., 1999). Wichtige Parameter sind das Molekulargewicht sowie die Verweildauer der Kolloide. Die Verweildauer hängt von der Elimination und letztere von dem Molekulargewicht bzw. der Molekülgröße, der Konzentration der Lösung und dem Verzweigungs- bzw. Substitutionsgrad ab. Niedermolekulare Lösungen werden schneller abgebaut als höhermolekulare; ähnlich vermehrt auch ein höherer Substitutionsgrad die Verweildauer. Die von uns verwendeten Kolloide hatten eine mittlere Molare Masse von 200.000 Dalton (Da) (HES), 64.000 bis 76.000 Da (Dextran) und 30.000 Da (Gelatinepolysuccinat). Die Verweildauer der einzelnen von uns verwendeten Kolloide wird in der Literatur wie folgt angegeben HES: 3,5 bis 6 Stunden, Dextran: 4 bis 6 Stunden und Gelatine: 2 bis 4 Stunden. Gelatine wird mit 30.000 Da sehr schnell renal ausgeschieden, weil die Nierenschwelle bei 50.000 Da liegt. Die heutigen Dextrane werden auf Basis einer annähernd isotonen Elektrolytlösung hergestellt. Das im Versuch verwendete weist einen leicht hyperonkotisch bis isoonkotischen Effekt auf. Die eingesetzte Gelatinelösung zeigt isoonkotische Eigenschaften und einen isovolämischen Effekt. Auch bei dem HES nutzen wir eine isotonische Elektrolyt-Konzentration (Adams, 2007; Schmitz, 1995).

Heutzutage liegt die Problematik nach wie vor darin, den idealen Plasmaersatzstoff für die intravasale Volumensubstitution auszuwählen (Vincent, 2007; Bunn und Ashraf, 2008; Salmon und Mythen, 1993). Dabei gilt es immer, den schmalen Grat einzuhalten zwischen der optimalen intravaskulären Volumenauffüllung und einer nicht erforderlichen Akkumulation von Flüssigkeit im interstitiellen bzw. intrazellulären Raum, der zu einer unerwünschten Hypervolämie führen würde (Prough und Kramer, 1994).

Ursprünglich wurden die synthetischen Plasmaexpander zur Behandlung verschiedener hypovolämischer Zustände entwickelt, indem der kolloidosmotische Druck erhalten und das Blutvolumen sowie die Herzfüllung gesteigert wurden (Klotz und Kroemer, 1987). Dadurch verbesserten sich das Herzminutenvolumen, die Durchblutung vitaler Organe und der periphere Blutfluss (Klotz und Kroemer, 1987). Die Anwendungsbereiche wurden darüber hinaus noch erweitert u.a. im Einsatz als antithrombotisches Agens. Die Erythrozytenaggregation wird verhindert, indem Dextran aufgrund seines Coating-Effektes die Gefäßintima und die Thrombozyten mit einer einmolekularen Schicht überzieht und so die Aggregation minimiert, die Freisetzung von Thrombozytenfaktoren hemmt bzw. ihre visköse Metamorphose beeinträchtigt. HES verhindert die kollageninduzierte Thrombozyten-

aggregation über einen dextranähnliche Coating-Effekt. Letztlich werden dadurch Faktor VIII und der von Willebrand Faktor inhibiert und die partielle Thromboplastinzeit erhöht. HES und Dextran erhöhen die Blutungszeit und –tendenz (Adams, 2007; Schmitz, 1995).

Ein weiterer Anwendungsbereich ist die Leukozytapherese, bei der eine extrakorporale Blutzirkulation eingeleitet wird. Das Blut wird von Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten gereinigt und dem Körper wieder zugeführt, dabei kann auch das Blutplasma vom Blut separiert, und teilweise durch kolloidale Lösungen ersetzt werden, bevor die Rückführung in den Körperkreislauf erfolgt (Klingel, 2000). Bei extrakorporaler Blutzirkulation können die Kolloide als extrazellulärer Zellschutz wirken, indem sich Gelatine beispielsweise wegen ihrer elektrostatischen Ladung Erythrozyten aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen beschichten und damit schon in niedriger Konzentration vor mechanischer Belastung schützen (Adams, 2007). Eine typische Indikation ist auch die Hämodilutionstherapie, wobei eine Verdünnungskoagulopathie immer als unerwünschte Nebenwirkung auftreten kann (Hulse und Yacobi, 1983; Mishler, 1984a; Schmitz, 1995).

### **1.2.1 HES**

Thompson und Walton erwähnten HES bereits 1963 als alternativen Plasmaersatzstoff (Thompson und Walton, 1963). Hydroxyethylstärke wurde in den 70er Jahren in den Vereinigten Staaten bedeutend weiterentwickelt und bis heute immer wieder verbessert; dabei wurden v.a. das Molekulargewicht und der Substitutionsgrad herabgesetzt (Vincent, 2007). Hydroxyethylstärke (HES) besteht aus hochverzweigten Stärkemolekülen, dem Amylopektin und dem Zucker Glucose. Im Jahre 1957 schlug Wiedersheim vor, Amylopektin als Rohstoff für die Herstellung von HES zu nutzen (Sommermeyer, 2003). Amylopektin ist eine wachshaltige Stärke, die aus Mais oder Hirse gewonnen wird (Dieterich et al., 1998; Warren und Durieux, 1997). Die fertige HES ähnelt in ihrer Molekularstruktur der des natürlichen Speicherpolysaccharids Glycogen, das im menschlichen Organismus vorkommt. Diese Ähnlichkeit ist der Grund dafür, dass bei HES im Unterschied zu den anderen Plasmaexpandern nur sehr selten anaphylaktische Nebenwirkungen auftreten.

### **1.3 EDHF - Der vom Endothel stammende Hyperpolarisationsfaktor**

Das Endothel besteht auf der luminalen Seite aller Gefäße des vaskulären Systems aus einer einfachen Zellschicht. Vor 1980 ging die Medizin davon aus, dass es lediglich als Barriere zwischen Blut und Gewebe stand bzw. als antithrombotische Oberfläche wirkte, um die Aggregation von Blutbestandteilen zu verhindern. In den 80er Jahren konnte festgestellt werden, dass das Endothel an der Regulation des kontraktiven Status der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt ist. Letztere kann durch die Freisetzung unterschiedlicher Faktoren von Seiten des Endothels entweder kontrahieren oder dilatieren (Bryan et al., 2005; Ge et al., 2000). So ist beispielsweise der Sauerstoffpartialdruck in den meisten Gefäßbetten wie z.B. Leber, Herz oder Lunge einer der Hauptregulatoren der Gefäßweite, indem z.B. im Falle einer Hypoxie vasorelaxierende Faktoren ausgeschüttet werden wie z.B. NO, Prostazyklin oder EDHF (Hellstrand et al., 1977; Smani et al., 2002; Wadsworth, 1994). O<sub>2</sub> kann im koronaren Kreislauf die Myozyten der Arterien in bezug auf ihre Kontraktilität und Erregbarkeit beeinflussen über einen veränderten ATP-Gehalt, der für die K<sub>ATP</sub>-Kanäle von Bedeutung ist (Smani et al., 2002).

Aufgrund dieser Entdeckung ergaben sich neue Wege, in den Blutkreislauf einzugreifen und somit u.a. auf den Blutfluss einwirken zu können (Bryan et al., 2005).

Der sogenannte vom Endothel stammende Relaxierungsfaktor (endothelium-derived relaxing factor - EDRF) konnte als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert werden. [*“On finding the characteristics of NO and EDRF so similar, I had no hesitancy in proposing in the paper which I delivered at the July, 1986, symposium that EDRF is NO”*] (Bryan et al., 2005; Furchgott, 1998). 1998 erhielt Furchgott den Nobelpreis für die Entdeckung des Stickstoffmonoxids. Furchgott erwähnte in seiner Nobelpreisrede, dass Ignarro unabhängig von ihm die gleiche Entdeckung an isolierten Lungenarterien von Rindern gemacht hatte. Über Ignarros Vorstoß schreibt Furchgott: *„Unfortunately, the papers presented at that symposium were delayed in publication until 1988.“*

Ein weiterer Mechanismus zur Dilatation wurde im Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) erkannt, das im Arachidonsäure-Kreislauf synthetisiert und vom Endothel freigesetzt wird (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006; Kietzmann et al., 2002). Das Enzym Cyclooxygenase (COX) produziert innerhalb dieses Arachidonsäure-Kreislaufs Endoperoxide, die von Prostazyklin

Synthese in das beschriebene PGI<sub>2</sub> umgewandelt werden (Ge et al., 2000; Holzmann et al., 1980). Selemidis und Cocks beobachteten, dass Endothelzellen, wurden sie z.B. durch Agonisten oder physische Kräfte wie Scherkräfte, Blutfluss oder Pulsation stimuliert, NO oder PGI<sub>2</sub> ausschütteten (Selemidis und Cocks, 2007). PGI<sub>2</sub> leitet eine Vasodilatation mittels Aktivierung der Adenylatzyklase und somit des zyklischen Adenosin-3':5'-Monophosphate-Systems (cAMP) ein (Ge et al., 2000; Holzmann et al., 1980). Sorop et al. ergänzten, dass die Pulsation die Gefäße im Endokard gegenüber Vasodilatoren bei unveränderter Kalziumkonzentration sensibilisierte und darüberhinaus auch zu einer Ausschüttung eines endothelialen hyperpolarisierenden Faktors führte (2001).

Anfang der 90er Jahre ergaben sich Beweise, dass mindestens noch eine weitere Möglichkeit für einen vom Endothel abhängigen Mechanismus in bezug auf die Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur bestehen müsste (Bauersachs et al., 1996; Félétou und Vanhoutte, 2006; Furchgott, 1989). Bei diesem Mechanismus ließ sich die Hyperpolarisation durch Kaliumkanalinhibitoren blocken (Félétou und Vanhoutte, 2006). Zu Beginn wurde dieser Prozess EDHF genannt. Mitte der 90er Jahre war noch unklar, ob EDHF als ein fester Bestandteil der von Agonisten induzierten Endothel-abhängigen Dilatation gilt oder nur dann seine Wirkung entfaltet, wenn NO bzw. PGI<sub>2</sub> nicht physiologisch arbeiten (Bauersachs et al., 1996). NO unterdrückt die Synthese und/oder die Freisetzung des EDHFs von den Endothelzellen bzw. wird bei einer beeinträchtigten NO-Funktion vermehrt EDHF gebildet, und beide ergänzen sich, um die Gefäßweite zu beeinflussen (Bauersachs et al., 1996; Fleming et al., 2001; Ge und He 1999). Auch heute schließen sich viele Autoren dieser Theorie an. Dabei ist noch unklar, welcher Mechanismus dem EDHF en detail zu Grunde liegt. Mittlerweile ist bekannt, dass hinter dem Akronym EDHF nicht nur ein Stoff bzw. Mechanismus steht sondern verschiedene Wege existieren müssen (Félétou und Vanhoutte, 2006).

Per definitionem müssen laut Bryan et al. folgende Kriterien erfüllt sein, damit ein Mechanismus als EDHF bezeichnet werden kann (2005):

Es handelt sich um einen dilatativen Prozess, bei dem

- Das Endothel miteinbezogen wird;
- Der Stoff von NO bzw. COX-Metaboliten abgrenzbar ist;
- Die Dilatation durch eine Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur stattfindet;
- Kaliumkanäle aktiviert werden, die häufig Kalzium-abhängig sind (Bryan et al., 2005; Zhang et al., 2004).

Es existieren große, intermediäre und kleine Kalzium-abhängige Kaliumkanäle, die durch unterschiedliche Substanzen inhibiert werden können.

Desweiteren wird diskutiert, ob aus dem Terminus EDHF nicht das Wort „Faktor“ gestrichen werden soll, da dieser Begriff verwirrend wirken kann. Félétou und Vanhoutte forderten, dass sobald der Auslöser dieser Reaktion identifiziert wird, ein adäquater Name für die Nicht-NO-Nicht-PGI<sub>2</sub>-vermittelte Antwort formuliert und das Akronym gestrichen werden sollte (Félétou und Vanhoutte, 2006).

Sobald die exakten Mechanismen aufgeklärt und konkrete Faktoren identifiziert sind, könnten sich neue therapeutische Optionen im Bereich der selektiven Regulation der Perfusion vitaler Organe wie z.B. Gehirn, Niere oder Herz bzw. im Feld der Blutdruckregulation ergeben (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006). Bryan et al. berufen sich ähnlich wie Félétou und Vanhoutte auf die Vermutung, dass der dem EDHF zugrunde liegende Mechanismus in unterschiedlichen Gefäßbetten ebenfalls unterschiedlich ist. Sie erhofften sich darüber eine Möglichkeit bestimmte Gefäßbetten wie beispielsweise die Niere oder das Gehirn beeinflussen zu können, ohne den Gesamtkreislauf bzw. Gesamtblutfluss zu verändern (Bryan et al., 2005). Bryan et al. formulierten Visionen, in denen bei Patienten, deren renaler Blutfluss und die Urinausscheidung kritische Werte angenommen haben, selektiv der EDHF in der Niere stimuliert werden könnte, um den Blutfluss in der Niere und ihre Funktion wieder zu steigern. Eine Stimulation des EDHF in Arterien und Arteriolen des Gehirns zur selektiven Reduktion des zerebrovaskulären Widerstandes ohne Veränderung des Widerstandes anderer Gefäßbetten, wäre eine weitere denkwürdige Option für Bryan et al..

### **1.3.1 EDHF Dilatation an isolierten Arterien und Arteriolen**

Bisher wurden zwei Methoden entwickelt, um die Dilatation der Gefäße zu messen. Zum einen wird die isometrische Kraftentwicklung direkt am Gefäß bzw. die Veränderung des Gefäßdurchmessers bestimmt (Bryan et al., 2005).

Je nach Gefäßgröße bzw. Gefäßtyp rufen verschiedene Agonisten eine Dilatation hervor; Acetylcholin, Bradykinin, Substanz P, Adenosintriphosphat, Adenosindiphosphat, Uridintriphosphat, Vasopressin und Histamin sind Beispiele für jene Agonisten. Häufig werden bei ihrer Beteiligung NO, PC (Prostazyklin) oder beide synthetisiert bzw. bereitgestellt (Bryan et al., 2005).

Wird die Synthese oder Bereitstellung von NO und PC inhibiert, kann der EDHF und sein Einfluss auf das Ausmaß der Dilatation der Gefäße erforscht werden. Zum Erreichen dieses Ziels werden L-Arginin-Analoga wie z.B. N<sup>G</sup>-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) oder das im Rahmen der hier zugrunde liegenden Versuchsreihe eingesetzte L-N<sup>G</sup>-Nitroarginin/N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin (L-NNA) und Indometacin verwendet, so dass die NO-Synthase bzw. COX gehemmt werden. Entsprechend der Studien von Bryan et al., Félétoü und Vanhoutte bzw. anderer Dissertationen unter Fischer erwarten wir, dass die danach beobachtete Restdilatation von dem sogenannten EDHF induziert wird (Bryan et al., 2005; Félétoü und Vanhoutte, 2006).

Der EDHF hat bei kleineren Arterien und Arteriolen, die eine fundamentale Rolle im Zusammenhang mit dem Gefäßwiderstand spielen, mehr Bedeutung als bei großen; weil NO gegenüber EDHF bei diesen kleineren Gefäßen einen geringeren Einfluss zeigt (Bryan et al., 2005). Laughlin et al. bewiesen, dass das Protein der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) in Bezug auf das arterielle Gesamtprotein mit kleinerem bzw. abnehmendem Gefäßdurchmesser des koronaren Gefäßbaumes anteilig ebenfalls kleiner war: je mehr der Gefäßdurchmesser abnimmt, desto geringer ist der Gehalt an eNOS Protein im Verhältnis zum Gesamtproteingehalt innerhalb der getesteten Arterienteilstücke (eNOS Protein pro g Totalarterienprotein) (2003). Dementsprechend berichteten Vanheel und Van de Voorde davon, dass mit kleiner werdendem Gefäßdurchmesser der relative Anteil des EDHF an der gesamten endothelabhängigen Relaxation zunahm (2000): wird zusätzlich zu dem Indometacin und dem L-NNA noch der NO-Fänger Oxyhämoglobin (HbO) hinzugegeben,

um durch Bradykininabgaben möglicherweise freigesetztes NO zu fangen, bleibt die EDHF-abhängige Hyperpolarisation in den koronaren Arteriolen trotz des HbOs fast unbeeinträchtigt, während die Hyperpolarisation in den großen Leitungsarterien des Herzens kaum das statistische Signifikanzniveau erreicht (Vanheel und Van de Voorde, 2000).

Dem EDHF kann somit eine ebensolche Wichtigkeit in Bezug auf die Regulation des Gefäßwiderstandes und somit den Blutfluss angerechnet werden.

Darüberhinaus beeinflusst der EDHF auch die sogenannte *weitergeleitete vasomotorische Antwort* (Bryan et al., 2005). Diese beschreibt den Zustand, wenn Arterien oder Arteriolen fokal zur Dilatation stimuliert werden und sich diese Dilatation sowohl in afferente als auch efferente Richtung fortleitet. Die Fortleitung ist ein wichtiger Aspekt für eine koordinierte Antwort, um z.B. die Blutflusskontrolle zu optimieren (Bryan et al., 2005), wodurch wiederum mehr Sauerstoff in der arbeitenden Muskulatur zur Verfügung gestellt werden kann.

Hormone beeinflussen den EDHF und die darauffolgende Reaktion. Östrogen verstärkt die EDHF-Wirkung in peripheren Gefäßen; v.a. bei Ratten können diese Einflüsse im mesenterialen Gefäßbett beobachtet werden (Bryan et al., 2005). Nach Inhibition der NOS verringerte sich die Dilatation bei männlichen Ratten, während sich bei weiblichen Tieren kein Unterschied ergab (Bryan et al., 2005). Ähnlich wurde auch nach Ovariectomie oder im Diöstrus eine abgeschwächte EDHF Dilatation festgestellt (Bryan et al., 2005; Liu et al., 2001). In den zerebralen Gefäßen von Ratten vermindert Östrogen die EDHF-Wirkung: Ovariectomierte und männliche Ratten zeigten identische EDHF-Antworten, die durch Östrogensubstitution an die EDHF-Wirkung weiblicher, nicht ovariectomierter Tiere angeglichen werden konnte. Die weiblichen Ratten hatten im Vergleich zu den männlichen eine deutlich reduzierte EDHF-Dilatation an der mittleren Gehirnarterie (Bryan et al., 2005; Golding und Kepler, 2001).

Testosteron hingegen zeigte an den zerebralen Gefäßen von Ratten in der Studie von Gonzales et al. einen den Gefäßtonus erhöhenden Effekt. Gonzales et al. vermuteten eine zugrunde liegende Unterdrückung des EDHF, weil sich 1. nach einer Testosteron-Behandlung der mittleren Zerebralarterie, isoliert von orchietomierten männlichen Ratten, der Gefäßtonus erhöht; 2. dieser beobachtete Effekt weder von NOS bzw. COX noch von einer

Veränderung der Endothelinproduktion abhängt und 3. dieser durch Testosteron hervorgerufene Effekt durch die  $K_{Ca}$ -Kanal-Blocker Apamin und Charybdotoxin, nach Hemmung von NOS/COX, inhibiert wird (Bryan et al., 2005; Gonzales et al., 2004).

Auch Cortisol kann nach einer Studie von Bauersachs et al. EDHF-Reaktion modifizieren (2002; Bryan et al., 2005). Die EDHF induzierte Dilatation wurde an den Koronararterien von Schweinen nach 24h Cortisolbad verstärkt, nicht aber nach einem 30 minütigen Cortisolbad. Bauersachs folgerte daraus, dass ein chronisch erhöhter Cortisol-Spiegel zu einer potenzierten EDHF-Reaktion führt (2002; Bryan et al., 2005).

### **1.3.2 Mechanismen der EDHF Dilatation**

Ein Agonist wie Acetylcholin oder das in unserem Versuch verwendete Bradykinin binden an auf den Endothelzellen liegende Membranrezeptoren, die dadurch ihre Konformität verändern. Auf der Innenseite der Endothelzellmembran findet daraufhin die Bindung von Guanosin triphosphat an das G-Protein statt. Das veränderte G-Protein aktiviert die Phospholipase C und dadurch auch die Produktion von Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ), so dass  $Ca^{2+}$  aus  $IP_3$ -abhängigen  $Ca^{2+}$ -Speichern freigesetzt werden kann (Bryan et al., 2005; Farmer und Burch, 1992; He, 1998). Im Endothel steigt die Konzentration der intrazellulären, d.h. an im Zytosol-freien Kalziumionen an. Zusätzlich kann  $Ca^{2+}$  auch aus dem Extrazellulärraum über nichtselektive Kationenkanäle (nonselective cation channels, NSCC) in die Endothelzellen strömen (Nilius, 1990). Die intrazelluläre Erhöhung des Kalziums bewirkt die Öffnung  $Ca^{2+}$ -abhängiger Kaliumkanäle. Gleichzeitig sinkt die Konzentration der Kalziumionen in der glatten Gefäßmuskulatur, und eine Dilatation findet statt. Der im Endothel benötigte Schwellenwert von  $Ca^{2+}$ , um eine EDHF-vermittelte Dilatation zu erlangen, liegt ungefähr bei 340nM (Im Vergleich dazu müssen für die Aktivierung der NOS 230nM erreicht werden).

Der Schritt bzw. der exakte Mechanismus nach der Kalziumionen Konzentrationsveränderung wird kontrovers diskutiert:

Laut Selemidis und Cocks bzw. Batenburg et al. kommen für einen EDHF, der in den extrazellulären Raum und von dort aus auf parakrinem Wege in die darunterliegende glatte

Gefäßmuskulatur diffundiert, drei „Kandidaten“ in Frage: Kaliumionen, 11, 12 Epoxyeicosatriensäuren (EETs, ein Cytochrom P450 Metabolit des Arachidonsäure-Stoffwechsels) bzw. Hydrogenperoxid (2007; 2004).

Desweiteren erwähnen Selemidis und Cocks die Möglichkeit einer direkten Übertragung der endothelialen Hyperpolarisation mittels myoendothelialer Gap Junctions - heterologe Verbindungen zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen, die als eine Einheit fungieren und eine direkte elektrische Kopplung ermöglichen (Budell et al., 2001; Selemidis und Cocks, 2007).

Auch Kohlenstoffmonooxid, Sauerstoffradikale, Anandamide – ein Cannabinoid-Derivat der Arachidonsäure, Adenin (AMP, ADP, ATP) sowie Adenosin sogar Ammoniak und Citrullin werden als mögliche EDHF diskutiert (Tomioka et al., 2001; Zhang et al., 2004; Zou et al., 2001).

### **1.3.3 Veränderungen und Beeinträchtigung des NO-EDHF-Systems**

Während krankhafter Zustände des Organismus wird das NO-EDHF-System beeinträchtigt; dabei wird der EDHF in seiner Reaktion entweder verstärkt oder unterdrückt. Pathologische Zustände können beispielsweise die Wirkung von NO u.a. durch Sauerstoffradikale modifizieren, während EDHF diesen Radikalen gegenüber resistent ist (Bryan et al., 2005).

Alters- oder Typ I Diabetes verändern die EDHF Reaktionen und wirken unterdrückend, während Typ II Diabetes sie in beide Richtungen beeinflussen kann (Bryan et al., 2005). Dabei stellten Minami et al. an Ratten fest, dass Typ II Diabetes sowohl den EDHF als auch die EDRF herabsetzt, beide aber durch körperliches Training wieder verbessert werden können (2002).

Auch Bluthochdruck verändert den EDHF; Humanpatienten mit kongestiver Herzinsuffizienz zeigen nach Verabreichung von Acetylcholin in Anwesenheit von Indometacin und L-NMMA keine Veränderung der Unterarmdurchblutung während nach diesen Substanzgaben bei gesunden Patienten ein verminderter Blutfluss gemessen wurde (Katz und Krum, 2001). Chan et al. konnten an isolierten Hundeherzkoronararterien belegen, dass nach Ischämie und Reperfusion zu dem vermindert wirkenden EDRF vom Endothel ein weiterer Faktor,

vermutlich EDHF, freigesetzt wird, der eine Hyperpolarisation und somit Dilatation der Gefäße bewirkt (1999). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass nach Ischämie und Reperfusion ein Reservesystem aktiviert wird, damit die Relaxation und somit Funktion der Gefäße weiterhin auf möglichst der physiologischen Ebene ähnelndem Niveau gehalten werden (Chan und Woodman, 1999).

Kajiya et al. wiesen bei Ratten mit pulmonaler Hypertension nach, dass sich der EDHF bezüglich der Vasodilatation gegenüber NO kaum beeinträchtigt zeigt (2007). Während NO sowohl in Arteriolen (Diameter: 30-100µm) als auch in kleinen Herzkranzgefäßen (Diameter: 100-200µm) aktiv ist, spielt EDHF bei den Arteriolen die predominierende Rolle und hält die Homöostase der koronaren Mikrozirkulation bei Ratten mit pulmonaler Hypertension trotz einer NO-Dysfunktion aufrecht (Kajiya et al., 2007). Die NO-Dysfunktion beruht auf einer erhöhten Bildung von Sauerstoffradikalen entstanden durch die bei der pulmonalen Hypertension hervorgerufenen rechtsventrikuläre Hypertrophie (Kajiya et al., 2007).

Bryan et al. gehen davon aus, dass die Beeinträchtigung von EDHF induzierter Dilatation multifaktoriell ist (2005). Wenn beispielsweise zu wenig NO vorhanden und der EDRF somit insuffizient war, konnte in pathologischen Zuständen wie Bluthochdruck eine Verstärkung des EDHF beobachtet und als Kompensation interpretiert werden (Bryan et al., 2005).

NO und EDHF können sich somit im Körper soweit ergänzen, dass eine Dilatation der Gefäße bzw. die Beeinflussung der Dilatation bei pathologischen Zuständen konstant gehalten wird (Bryan et al., 2005; Chan und Woodman, 1999; Kajiya et al., 2007; Nagao und Vanhoutte, 1992; Selemidis und Cocks, 2007; Zhang et al., 2004).

Anästhetika interagieren ebenfalls mit dem EDHF, so unterdrücken die meisten seine Wirkung. Vor allem Isofluran und Sevofluran gelten innerhalb der Inhalationsnarkotika als sehr potente Inhibitoren, während z.B. Etomidat in geringer Konzentration verstärkend und in höheren Dosen wiederum hemmend wirkt (Bryan et al., 2005). Bryan et al. gehen speziell in Bezug auf die Inhalationsnarkotika von einem inhibitorischen Zusammenhang mittels einer Blockade der Gap Junctions aus (2005).

#### **1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit**

In den folgenden Kapiteln untersuchen wir die Auswirkung der erwähnten Plasmaexpander, HES, Dextran und auch der nur noch selten verwendeten Gelatine, auf die endothelabhängigen, vasoaktiven Substanzen NO bzw. den noch nicht exakt charakterisierten EDHF. Mit der vorliegenden Studie möchten wir u.a. weitere Eigenschaften des EDHFs ergründen und gleichzeitig erfahren, in welcher Beziehung er zu NO steht. Als Referenz nutzen wir die Dilatationsfähigkeit und das Ausmaß dieser Relaxierung an porcinen Herzkranzgefäßen. Wir untersuchen in dieser Studie lediglich das kardiale Gefäßbett von Schweinen, im Speziellen die rechte Koronararterie.

Funktionsstörungen in der endothelabhängigen Dilatation von Koronararterien können durch Erkrankungen des Herzkreislaufsystems oder im Rahmen von Herztransplantationen auftreten. Mit der 24h Konservierung der verwendeten Herzkranzgefäße wird eine Beeinträchtigung der Dilatationsfähigkeit provoziert, um u.a. die Ergebnisse mit denen der frischen Koronarien unter Einfluss der Plasmaexpander zu vergleichen (Dahmen, 2009; Dahnken, 2007; Funcke, 2001; Naglo-Dünner, 2010; Weinand, 2010).

## **2 Material und Methodik**

### **2.1 Probenmaterial**

Als Probenmaterial für die Untersuchungen zum Einfluss von Plasmaexpandern auf die endothelabhängige Dilatation wurden Koronararterien vom Schwein eingesetzt. Die rechte Koronararterie präparierten wir mit dem direkt anliegenden Binde- und Fettgewebe bei gerade geschlachteten Hausschweinen ab. Die Schweine waren zum Zeitpunkt der Herzentnahme 2 min tot. Es handelte sich um fünf bis sieben Monate alte Tiere mit einem Gewicht von 100 bis 120kg, die am Kölner Schlachthof (Fa. Fleischversorgung Köln GmbH) während eines normalen Schlachtvorganges geschlachtet wurden.

### **2.2 Probenentnahme**

Die aus dem zur rechten Semilunarklappe gehörenden Sinus des Bulbus aortae entspringende Arteria coronaria dextra verläuft zuerst im Sulcus coronarius dexter und setzt sich dann auf der Facies atrialis als Ramus interventricularis subsinuus im Sulcus interventricularis subsinuus bis zur Herzspitze fort.

Nach Abtrennung des Herzens vom Geschlinge am Schlachthofband wurde zuerst dieser Ramus interventricularis subsinuus auf der Facies atrialis durchtrennt. Darauffolgend wurde die A. coronaria dextra einmal mit oxygenierter Krebs-Henseleit-Lösung (KH; Zusammensetzung Tab. 1) durchgespült bis kein Blut mehr im Blutgefäß enthalten war. Danach wurde das rechte Herzkranzgefäß samt des direkt anliegenden Fett- und Bindegewebes mit einer „non-touch“-Technik schonend vom Herzen abpräpariert, so dass wir ein sechs bis acht cm langes Teilstück des Koronargefäßes erhielten. Bei dieser „non-touch“-Technik wird das Blutgefäß selbst nur am Ende mit der Pinzette gefasst, um keinerlei Schädigung bzw. negative Beeinträchtigung des Endothels herbeizuführen. Das erhaltene Teilstück des Herzkranzgefäßes wurde nochmals mit der KH-Lösung durchgespült. Wir transportierten die Koronararterienteilstücke in einem Transportgefäß mit 150ml im Mittel 36-37°C warmer, oxygenierter KH-Lösung in das Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln. Der pH-Wert der Lösung lag bei  $7,40 \pm 0,03$ , der Kohlenstoffdioxid-

partialdruck  $p\text{CO}_2$  bei 35-40mmHg und der Sauerstoffpartialdruck  $p\text{O}_2$  bei mindestens 600mmHg.

### Zusammensetzung der Krebs-Henseleit Lösung

Bestandteil	Konzentration
$\text{Na}^+$	143,10 mmol/l
$\text{K}^+$	5,90 mmol/l
$\text{Ca}^{2+}$	1,60 mmol/l
$\text{Mg}^{2+}$	1,20 mmol/l
$\text{Cl}^-$	126,00 mmol/l
$\text{HCO}_3^-$	25,00 mmol/l
$\text{H}_2\text{PO}_4^-$	1,20 mmol/l
$\text{SO}_4^{2-}$	1,20 mmol/l
Glucose	5,10 mmol/l

Tabelle 1: Bestandteile der Krebs-Henseleit Lösung

### **2.3 Feinpräparation und Einspannen**

Im Labor wurden die Koronararterien in eine Nierenschale mit frischer, oxygenierter, 37°C warmer KH-Lösung umgelagert. Das Fett- und Bindegewebe wurde wiederum schonend bis auf die Adventitia von dem Blutgefäß abpräpariert.

Wir schnitten 5mm lange Gefäßringe ab und spannte diese Ringe in die triangelförmigen Haken aus Stahldraht der Versuchsanordnung (Abb. 1) ein. Beim Schneiden der Ringe musste darauf geachtet werden, dass das Endothel nicht mechanisch durch Quetschung oder Überdehnung beschädigt wurde.

Die ringförmigen Teilstücke der Koronararterien waren einerseits über einen Haken an dem Begasungsstab fixiert, der auf dem Boden des Organbad-Versuchsgefäßes stand. Andererseits waren sie an einem Haken eingehängt, der über einen 6-0 Faden (PERMA-HAND® SEIDE, 0,7 metric, Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) mit dem balkenförmigen Wegaufnehmer (Lever Transducer B 40 Type 373; Hugo Sachs Electronic, March, Deutschland) verbunden war und über den eine 2g-Dehnbelastung auf das eingehängte Koronararterienteilstück ausgeübt wurde. Der Wegaufnehmer übertrug die Dilatation bzw. Kontraktion. Diese Reaktion wurde über einen Verstärker (Transducer Amplifier Module, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) auf einem Schreiber (Multi-Pen Recorder, Rikadenki Kogyo Co., Ltd., Tokyo, Japan) festgehalten. Die KH-Lösung wurde kontinuierlich mit Carbogen (Carbogen: 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid; Fa. Linde Gas Therapeutics GmbH & Co KG, Unterschleißheim, Deutschland) oxygeniert. Mittels einer Wärmepumpe (Julabo 26, Typ St-26/11, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland) wurden die Organbäder während des gesamten Versuchs auf 37°C erwärmt.

## 2.4 Versuchapparatur

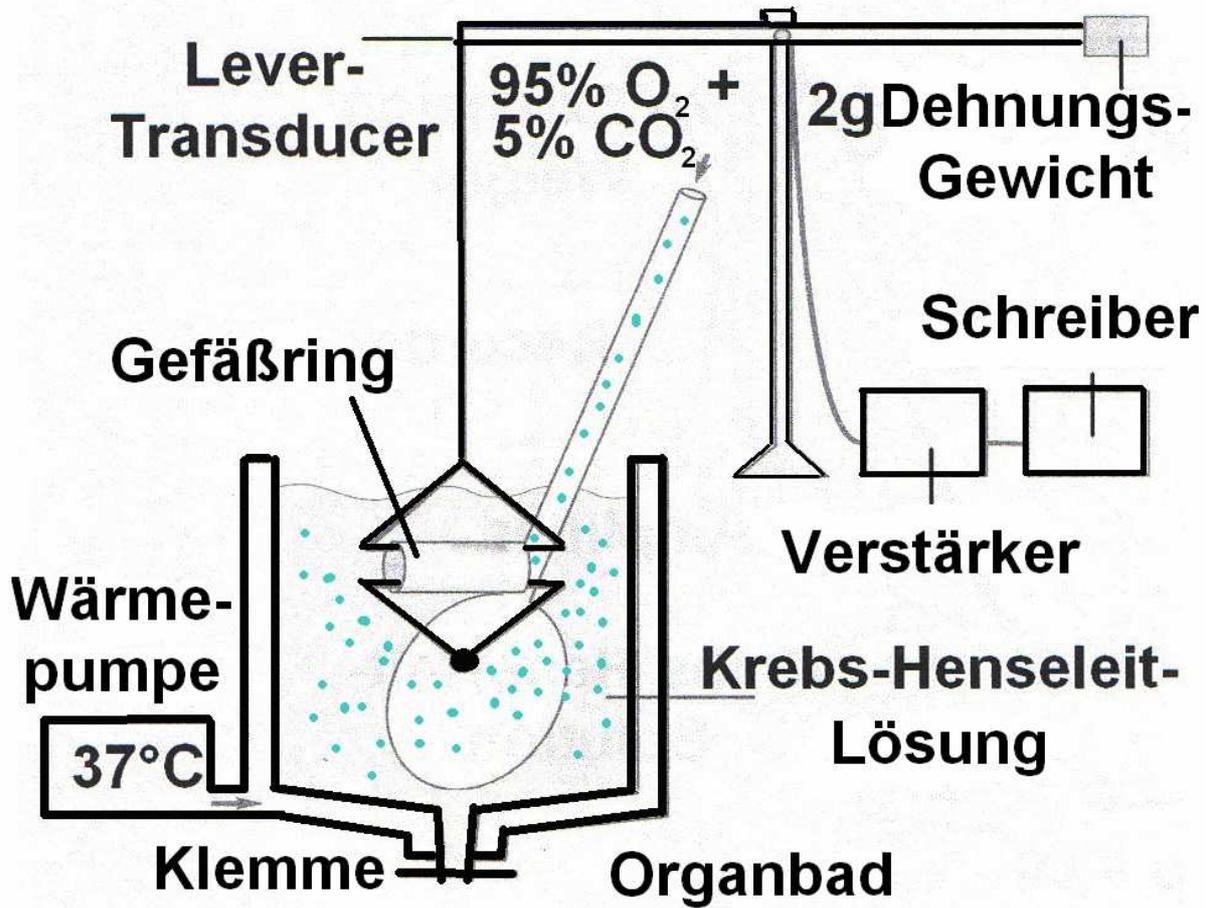


Abbildung 1: Versuchapparatur (nach Steinhoff 2004, mit Genehmigung der Autorin reproduziert)

Nach Abtrennung der in die Versuchsapparatur eingehängten Teilstücke spülten wir die übrig gebliebenen Koronararterien einmal mit HTK-Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung; Custodiol®, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland, s. Tab. 2) durch und lagerte sie dann in einem verschließbaren Behälter mit 150ml HTK-Lösung für 24 Stunden im Kühlschrank bei 4-5°C.

### Zusammensetzung der HTK-Lösung

Arzneilich wirksamer Bestandteil	Konzentration
Na <sup>+</sup>	15 mmol/l
K <sup>+</sup>	10 mmol/l
Mg <sup>2+</sup>	4 mmol/l
Cl <sup>-</sup>	50 mmol/l
Glutarat	1 mmol/l
Histidin	198 mmol/l
Tryptophan	2 mmol/l
Mannit	30 mmol/l

**Tabelle 2:** Bestandteile der Custodiol-Lösung

## 2.5 Versuchsdurchführung

Wir bildeten insgesamt drei Versuchsgruppen mit den Kolloiden HES, Dextran bzw. Gelatine, welche in den Konzentrationen 5, 10 oder 20 g/l eingesetzt wurden.

### Verwendete Studiensubstanzen:

- HES als Pulver (Hydroxyethylstärke, 200/0,5, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)
  - Molgewicht: 200 000
  - Substitutionsgrad 0,5
- Dextran als Pulver (SIGMA, sigma-aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
  - Dextran von Leuconostoc mesenteroides
  - Molgewicht: 64 000 bis 76 000
- Gelatinepolysuccinat (Gelafundin 4%, BRAUN, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
  - 1000ml enthielten:
    - Gelatinepolysuccinat 40g (Molgewicht 30 000)
    - Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Salzsäure, Wasser

Wir konnten die KH-Lösung immer als Stammlösung verwenden außer bei der Gelatine. Hier verwendeten wir für den Ansatz einer jeden Konzentration eine modifizierte KH-Stammlösung, um die Veränderungen durch die Elektrolytbestandteile der Gelafundin-Lösung zu kompensieren.

Die ringförmigen Teilstücke der Koronararterien wurden im frischen Zustand einerseits unter Einsatz von L-Arginin zur Erlangung einer EDR getestet bzw. andererseits unter Einsatz von L-NNA, um eine EDR ohne NO und somit eine Dilatation über den sogenannten EDHF zu erreichen. Weiterhin führten wir diese Versuche nach einer 24-stündigen Konservierung der Herzkranzgefäße an neuen Teilstücken erneut durch.

Bei der Kontrollgruppe wurde keine Studiensubstanz eingesetzt und lediglich im frischen bzw. im konservierten Zustand der Koronararterien der Versuch unter Einsatz von L-Arginin auf der einen Seite und L-NNA auf der anderen durchgeführt.

Nach Einhängen der Gefäßringe in die Apparaturen und nach einer 5 bis 10-minütigen Ruhephase wurde Kaliumchlorid (KCl; Konzentration siehe Tab. 3) in das 10ml KH-Lösung (Tab. 1) enthaltende Organbad gegeben. Durch das KCl wurde eine Kontraktion ausgelöst. Nach etwa 20 min erfolgte ein Auswaschen des KCl. Zum Auswaschen wurde immer die auf 37°C erwärmte, dauerhaft auf ca. 600 mmHg pO<sub>2</sub> oxygenierte KH-Lösung genommen. Nach dreimaliger Waschung wurde bei der einsetzenden Dilatation abgewartet bis sich ein Gleichgewichtszustand eingestellt hatte, den wir im folgenden als „steady state“ bezeichnen werden. Danach wurde der Vorgang von der KCl-Gabe über die Kontraktion, Waschung bis hin zu der Dilatation wiederholt.

Wenn sich ein „steady state“ eingestellt hatte, wurde Indometacin hinzugegeben. Danach wurde zu dem Teilstück der verschiedenen Koronararterien L-Arginin in die Organbäder hinzupipettiert. Nach wenigen Minuten fügten wir PGF<sub>2α</sub> (Dinolytic®, Pfizer, Pharmacia GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei.

Wir warteten die einsetzende Kontraktion bis zu einem „steady state“ ab und begannen dann jeweils von der stärksten Verdünnungsstufe (0,1μmol/l) aus der Bradykinin-Verdünnungsreihe (BK, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) Bradykinin-Lösung hinzuzugeben. Sobald die einsetzende Dilatation auf dem Schreiber stagnierte, fügten wir die nächste Konzentration (1μmol/l) des Bradykinins hinzu. Wenn auch bei der am stärksten konzentrierten Bradykinin-Lösung aus der Verdünnungsreihe über sechs Stufen die Dilatation endete, indem sich eine Kontraktion einstellte, wurde eine erneute Waschung durchgeführt. Die KH-Lösung wurde mindestens dreimal gewechselt, bis sich wieder ein „steady state“ einstellte.

Dann ersetzten wir in jedem Organbad die 10ml KH-Lösung durch 10ml KH-Lösung, in der die Testsubstanz (HES, Dextran, Gelatine) jeweils in einer 5g/l, 10g/l oder 20g/l Konzentration gelöst war. Wiederum pipettierten wir Indometacin, L-Arginin und PGF<sub>2α</sub> in die verschiedenen Versuchsgefäße. Nach Erreichen eines „steady state“ in der Kontraktion wurde eine weitere Testung mit der Verdünnungsreihe des Bradykinins durchgeführt und abschließend dreimal mit KH-Lösung ausgewaschen bis sich erneut ein „steady state“ ablesen ließ.

Danach wurde der gesamte Vorgang ab der Indometacin-Gabe nochmal wiederholt; anstelle KH-Lösung mit gelöster Testsubstanz wurde reine KH-Lösung im Organbad verwendet. Nach Zugabe der am stärksten konzentrierten Bradykinin-Lösung wurde die KH-Lösung nicht mehr ausgetauscht. Stattdessen fügten wir den einzelnen Organbädern Natriumnitroprussid (SNP, SIGMA, sigma-aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) bei. Wenn sich annähernd ein steady state ablesen ließ, d.h. die Dilatation deutlich abgeschwächt war, gaben wir Papaverin (Knoll, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland) hinzu und warteten auf eine eindeutige Basallinie, wodurch die maximale Relaxation der Arterienstücke erreicht wurde.

Das gleiche Verfahren führten wir auch für eine EDR ohne NO-Beteiligung durch und verwendeten anstelle des L-Arginin  $N_{\omega}$ -Nitro-L-Arginin (L-NNA, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland), das die NO-Synthase inhibiert, dadurch die NO-Bildung blockiert und eine Dilatation durch den in der Literatur als EDHF bezeichneten Faktor induziert.

Die endothelabhängige Dilatation während der Messdurchgänge wurde als prozentualer Anteil von der  $PGF_{2\alpha}$ -Kontraktion zum Zeitpunkt der ersten BK-Gabe dargestellt.

Wir wendeten für die Auswertung der Versuche mit Studiensubstanz den Student-Newman-Keuls Test (SNK-Test) an, wobei wir jeweils den zweiten Messdurchgang aus der Kontrollgruppe (siehe unten) den jeweils zweiten Messdurchgängen der drei unterschiedlichen Konzentrationen der getesteten Kolloide gegenüberstellten. Dabei wurde die Signifikanz bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  angenommen.

## 2.6 Verwendete Substanzen

Abkürzung	Substanz	Zugegebene Menge	Konzentration	Konzentration im Organbad	Effekt
KCl	Kaliumchlorid	250 $\mu$ l	2,4 mmol/l	60 mmol/l	Kontraktion
Indo	Indometacin	10 $\mu$ l	10 mmol/l	10 $\mu$ mol/l	Hemmung der Prosta-zyklin-Synthese
L-NNA	N <sub>ω</sub> -Nitro-L-Arginin	60 $\mu$ l	50 mmol/l	300 $\mu$ mol/l	Hemmung der NO-Synthese
L-Arg	L-Arginin	30 $\mu$ l	333 mmol/l	1 mmol/l	Zur Verstärkung des NO-Effektes
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandin F <sub>2α</sub>	7 $\mu$ l	14,3 mmol/l	10 $\mu$ mol/l	Kontraktion
Brady	Bradykinin acetate in fünf Stufen verdünnt	je 10 $\mu$ l	0,0001 mmol/l 0,001 mmol/l 0,01 mmol/l 0,1 mmol/l 1 mmol/l 10 mmol/l	0,0001 $\mu$ mol/l 0,001 $\mu$ mol/l 0,01 $\mu$ mol/l 0,1 $\mu$ mol/l 1 $\mu$ mol/l 10 $\mu$ mol/l	Dilatation
SNP	Sodiumnitroprussid	10 $\mu$ l	1 mmol/l	1 $\mu$ mol/l	Dilatation
Papa	Papaverin	20 $\mu$ l	0,106 mmol/l	0,21 $\mu$ mol/l	Dilatation

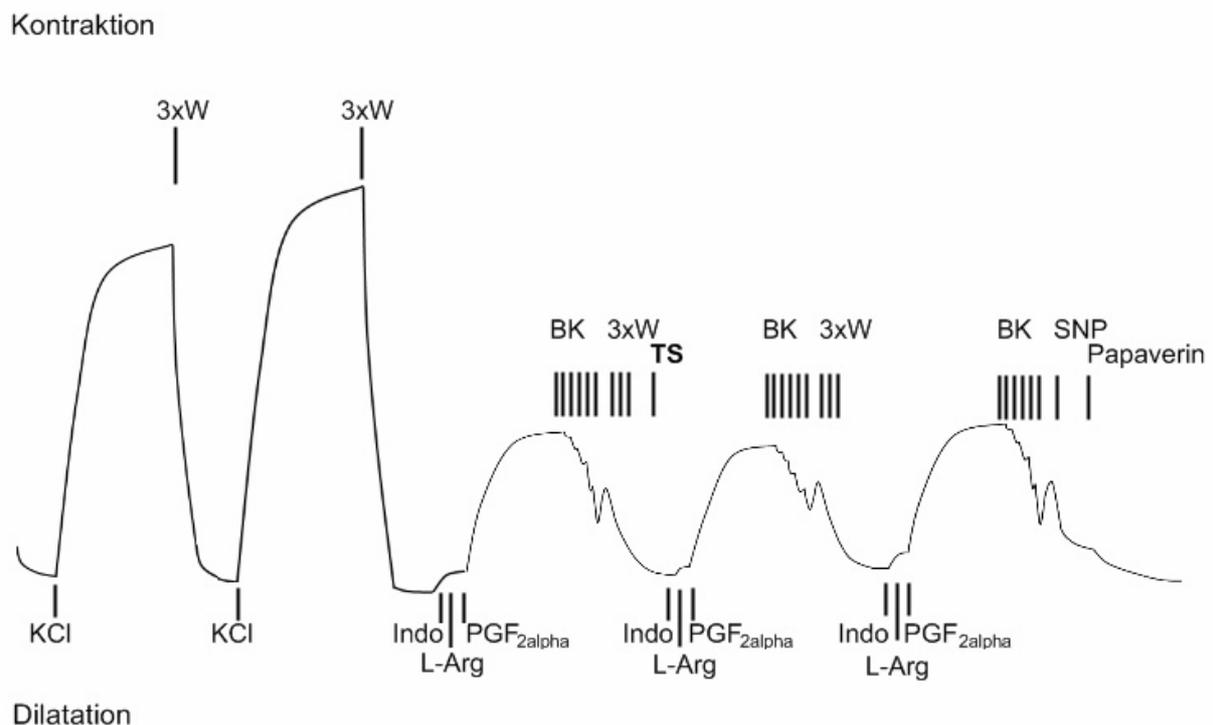
**Tabelle 3:** Verwendete Substanzen während des Versuchablaufs

## 2.7 Kontrollversuch

Als Kontrollversuch führten wir den Versuch wie oben beschrieben durch, verwendeten allerdings statt der in KH-Lösung gelösten Testsubstanz reine KH-Lösung im zweiten Messdurchgang. Dadurch erhielten wir Werte für eine endothelabhängige Dilatation, die je nach Versuchsdurchführung über NO bzw. über EDHF vermittelt wurde.

Wir wandten bei diesen Kontrollversuchen für den ersten Messdurchgang gegenüber dem zweiten Messdurchgang einen gepaarten t-Test an, wobei die Signifikanz ebenfalls bei  $p \leq 0,05$  angenommen wurde.

## 2.8 Versuchsablauf



**Abbildung 2:** Versuchsablauf graphische Darstellung: für die EDR setzten wir L-Arginin ein, für die Dilatation durch den EDHF nahmen wir an dieser Stelle statt L-Arg L-NNA.

KCl je 250µl; Indo je 10µl; L-Arg je 30µl, 1. PGF<sub>2α</sub> 7µl danach je 2,5µl bei L-Arg bzw. 1. PGF<sub>2α</sub> 5µl danach je 1,5µl bei L-NNA; BK je 10µl aus der sechsstufigen Verdünnungsreihe; TS 10ml der in reiner KH-Lösung gelösten Studiensubstanz in den unterschiedlichen Konzentrationen; SNP 10µl; Papaverin 20µl; W = Waschung je 10ml reine KH-Lösung, die jeweiligen Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgeführt.

## **2.9 Darstellung und Vergleich der Testergebnisse**

Die Diagramme und Tabellen wurden mit den Programmen „Excel“, „Word“ und „Paint.NET 3.35“ erstellt.

## **3 Ergebnisteil**

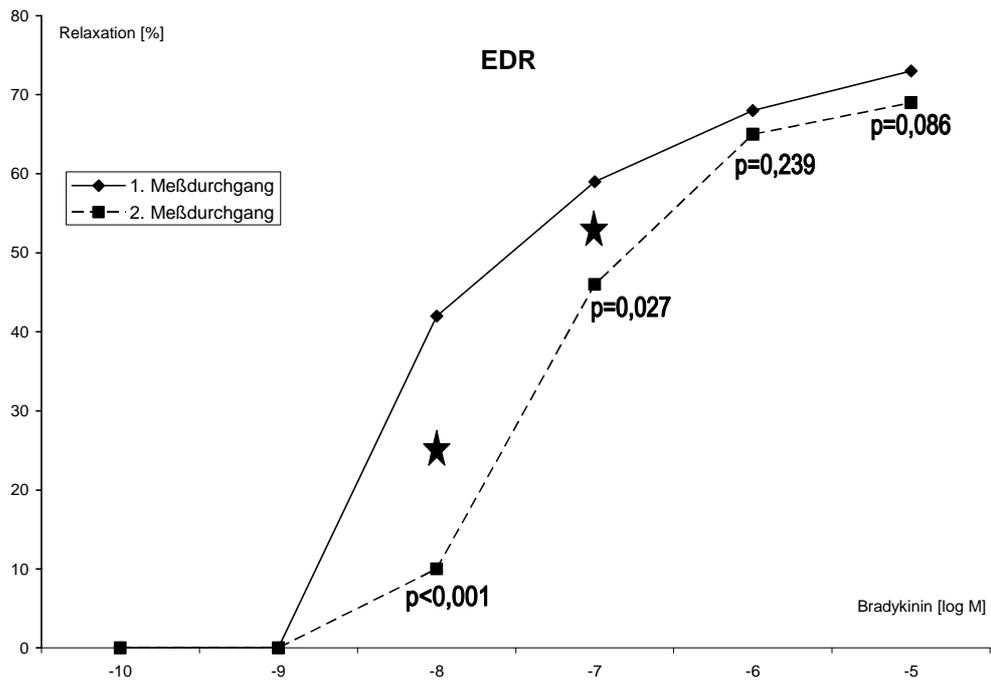
### **3.1 Anzahl der Gefäßringe**

In dieser Studie wurden insgesamt 135 Koronararterien vom Kölner Schlachthof für die Versuche präpariert. Diese Anzahl gliederte sich auf 608 Gefäßringe auf, von denen 426 alle Qualitätskontrollen bestanden und ausgewertet wurden. Bei den frischen Gefäßringen konnten in den Versuchen der EDR-abhängigen Dilatation 112 bzw. in der EDHF-abhängigen Dilatation 115 statistisch interpretiert werden. Von den konservierten Gefäßringen wurden in der EDR-abhängigen Dilatation 101 bzw. in der EDHF-abhängigen Dilatation 98 ausgewertet.

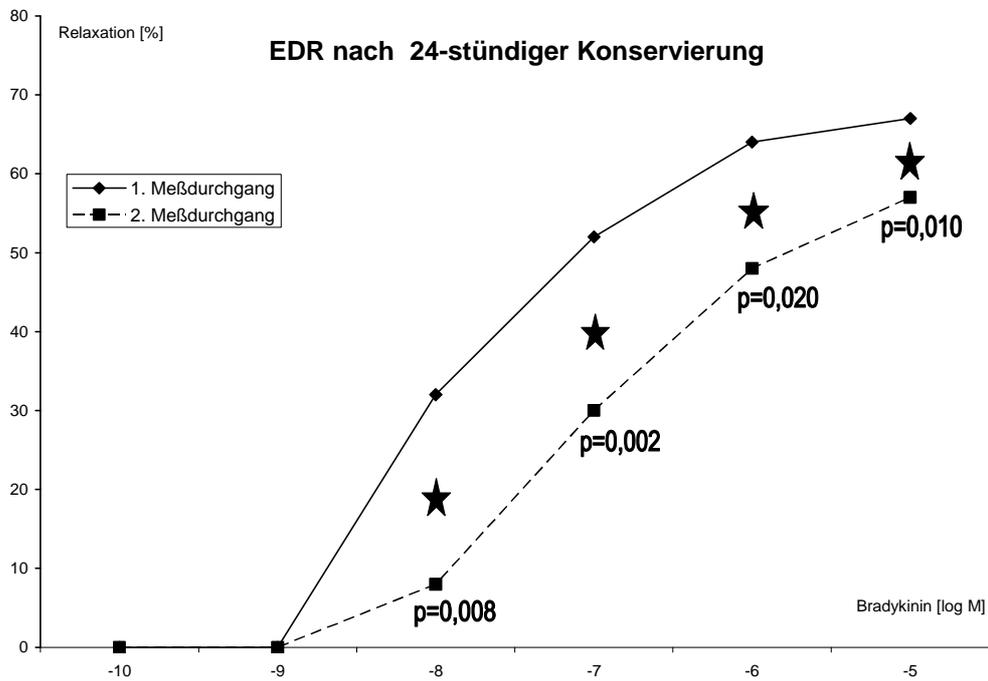
### **3.2 Kontrollversuche**

In dem intraindividuellen Vergleich des ersten Messdurchgangs mit dem zweiten Messdurchgang bei den Kontrollversuchen, die ohne Studiensubstanz durchgeführt wurden, zeigten sich fast ausschließlich signifikante Unterschiede. Die Kurve, die den zweiten Messdurchgang graphisch darstellte, wies in allen Diagrammen tendenziell eine Rechtsverschiebung auf. In der EDR-abhängigen Dilatation der frischen Koronargefäße bzw. in der EDHF-abhängigen Dilatation der konservierten Koronararterien wurde bei BK  $10^{-8}$  und BK  $10^{-7}$  die tendenzielle Verringerung des Dilatationsausmaßes durch das Erreichen des Signifikanzniveaus bestätigt. Die über EDR vermittelte Dilatation erlangte höhere Werte als die EDHF induzierte. Die konservierten Koronararterien zeigten gegenüber den frisch in den Versuch eingegangenen immer einen abgeschwächten Verlauf beim Vergleich der ersten Messdurchgänge.

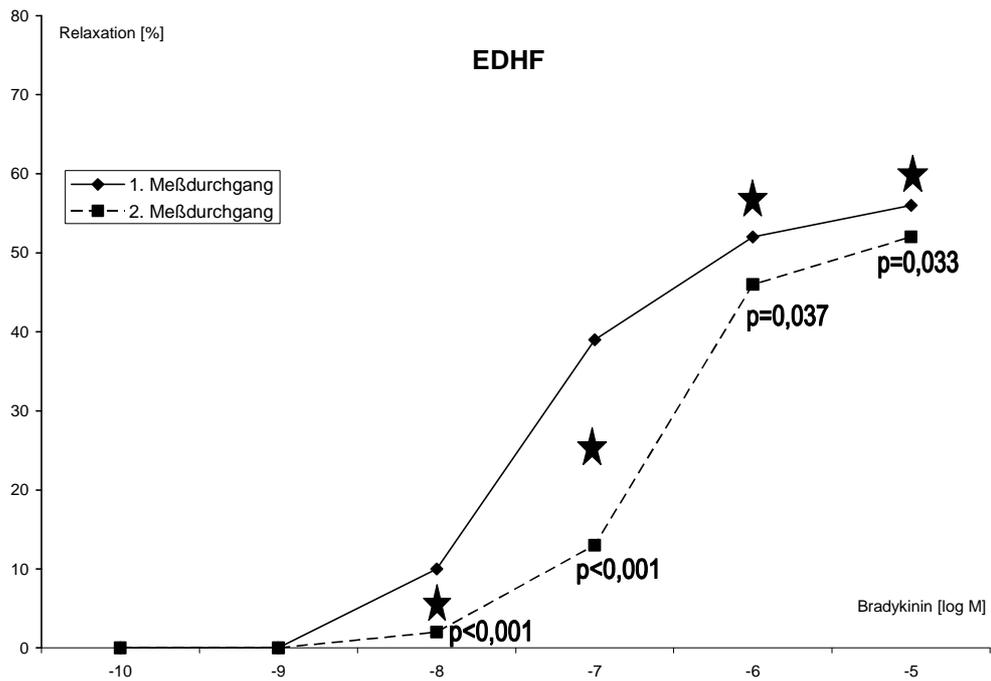
Zur Veranschaulichung sind die Diagramme der Kontrollversuche auf den folgenden Seiten abgebildet.



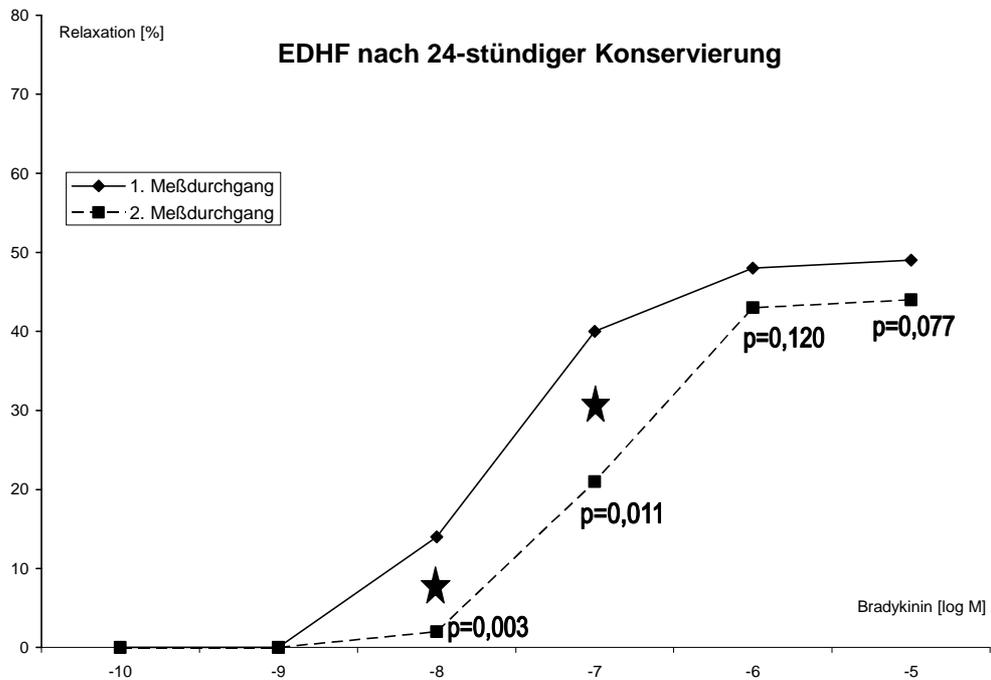
**Diagramm 1:** Mittelwerte der EDR frischer Koronararterienabschnitte im 1. und 2. Messdurchgang, \*  $p \leq 0,05$  im gepaarten t-Test (s. Kapitel 3.3.1 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – ohne Substanz)



**Diagramm 2:** Mittelwerte der EDR 24-stündig konservierter Koronararterienabschnitte im 1. und 2. Messdurchgang, \*  $p \leq 0,05$  im gepaarten t-Test (s. Kapitel 3.3.1 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – ohne Substanz)



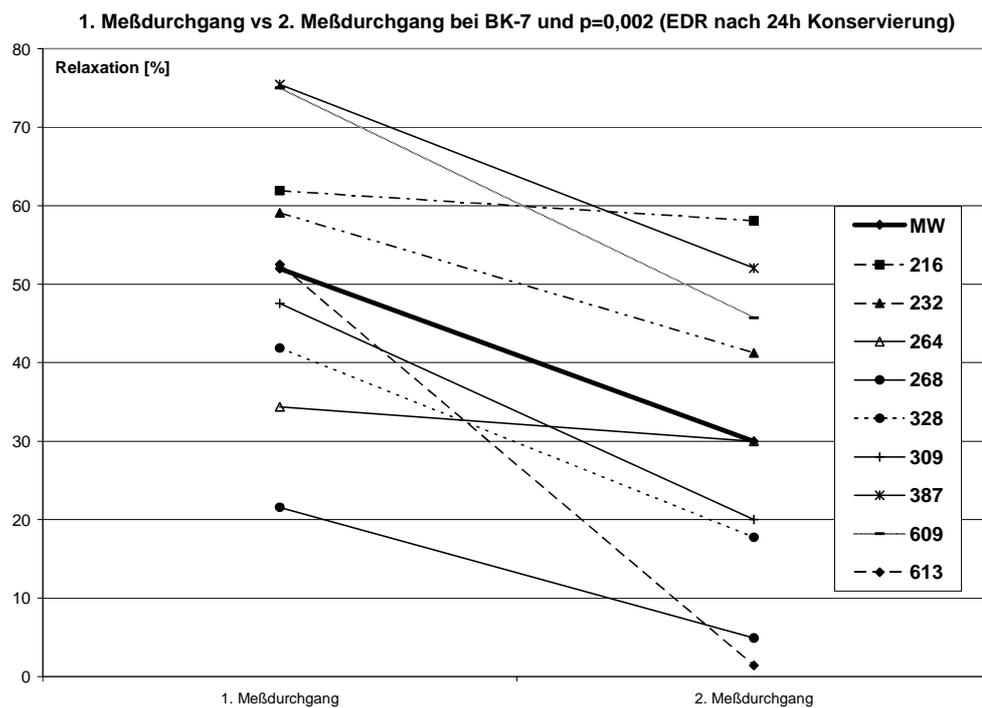
**Diagramm 3:** Mittelwerte der EDHF frischer Koronararterienabschnitte im 1. und 2. Messdurchgang. \*  $p \leq 0,05$  im gepaarten t-Test (s. Kapitel 3.3.1 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – ohne Substanz)



**Diagramm 4:** Mittelwerte der EDHF 24-stündig konservierter Koronararterienabschnitte im 1. und 2. Messdurchgang. \*  $p \leq 0,05$  im gepaarten t-Test (s. Kapitel 3.3.1 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – ohne Substanz)

### 3.2.1 Mittelwerte

Im Diagramm 5 wird die Minimierung des Mittelwertes im zweiten Messdurchgang gegenüber dem ersten dargestellt. Wir sehen für jedes einzelne Gefäßteilstück (Ziffern 216, 232, 264 etc.) die in der Dilatation bei BK  $10^{-7}$  erreichten Prozentwerte in den beiden Messdurchgängen. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,002$  liegt ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten vor.



**Diagramm 5:** Kontrollversuch - 1. Messdurchgang vs 2. Messdurchgang bei BK  $10^{-7}$  Mol mit  $p=0,002$  im gepaarten t-Test; EDR nach 24h Konservierung

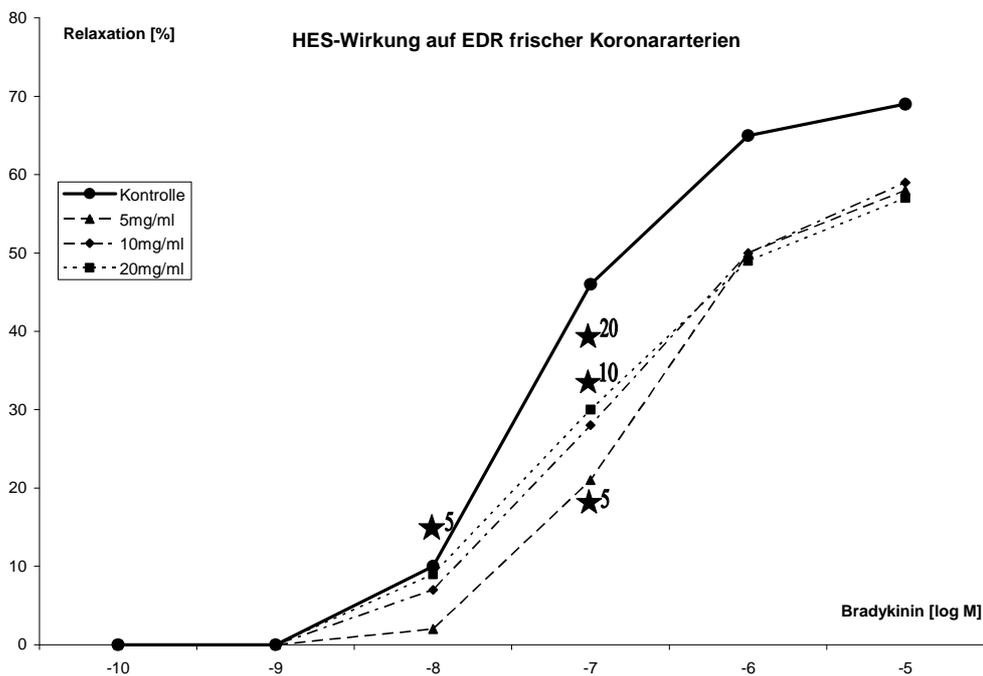
### **3.3 Versuche mit Studiensubstanz**

In der Auswertung der Versuche mit Studiensubstanz stellten wir jeweils den zweiten Messdurchgang aus dem Kontrollversuch den zweiten Messdurchgängen aller Konzentrationen der jeweiligen Kolloide gegenüber.

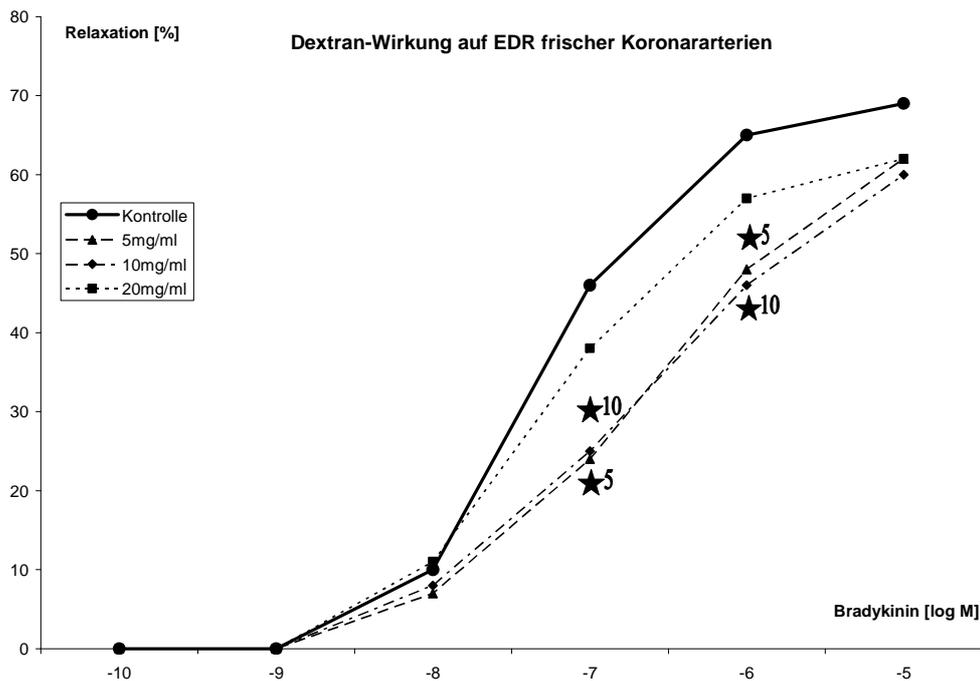
Wenn wir die verschiedenen Mittelwerte betrachten, konnte bei allen exkl. bei der EDR der 24h konservierten Herzkranzgefäßteilstücken eine Tendenz bezüglich einer Abschwächung unter Einfluss der verschiedenen Studiensubstanzen beobachtet werden. Es war für keine der drei Testsubstanzen eine Konzentrationsabhängigkeit in bezug auf die Dilatation und das Ausmaß dieser nachweisbar. Letzteres gilt sowohl für die frischen als auch für die 24 Stunden konservierten Koronararterienabschnitte bzw. bei der EDR- sowie bei der EDHF-vermittelten Dilatation.

### 3.3.1 EDR frischer Koronararterien

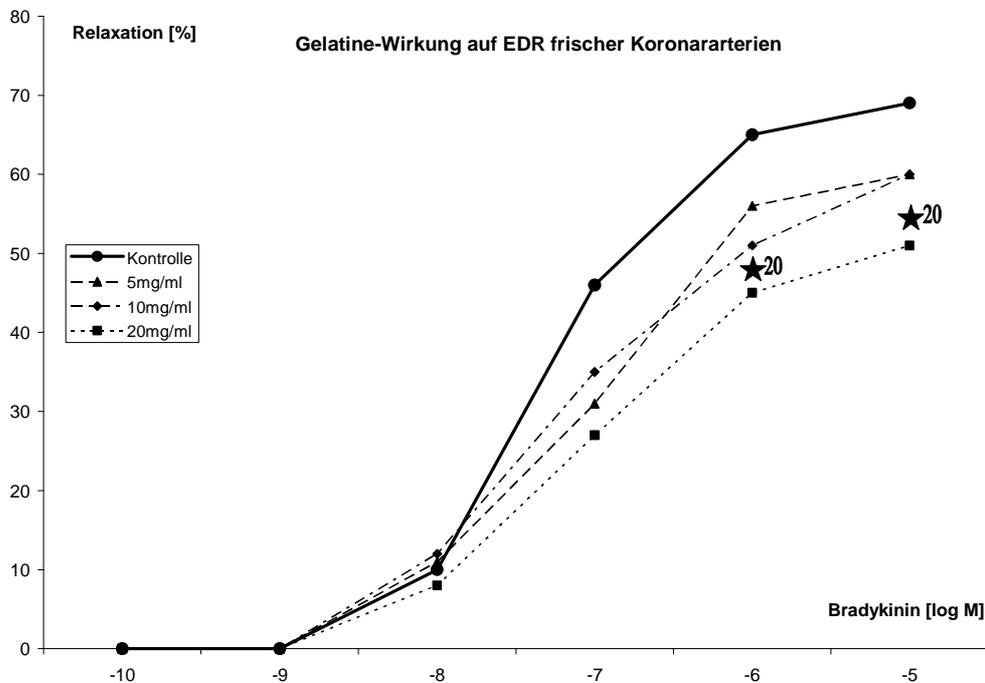
Bei HES liegen für alle drei Konzentrationen signifikante Unterschiede bei BK  $10^{-7}$  vor und für die 5mg/ml Konzentration auch bei BK  $10^{-8}$ . Wir lesen unter Dextran-Wirkung für die 5 und 10mg/ml Konzentration bei BK  $10^{-7}$  und BK  $10^{-6}$  signifikante Unterschiede ab. Diese tendenzielle Rechtsverschiebung der Kurven gegenüber der Kontrollkurve erreicht für die 20mg/ml konzentrierte Gelatine bei BK  $10^{-6}$  und BK  $10^{-5}$  das Signifikanzniveau.



**Diagramm 6:** Mittelwerte der EDR frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit HES-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.2 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – HES)



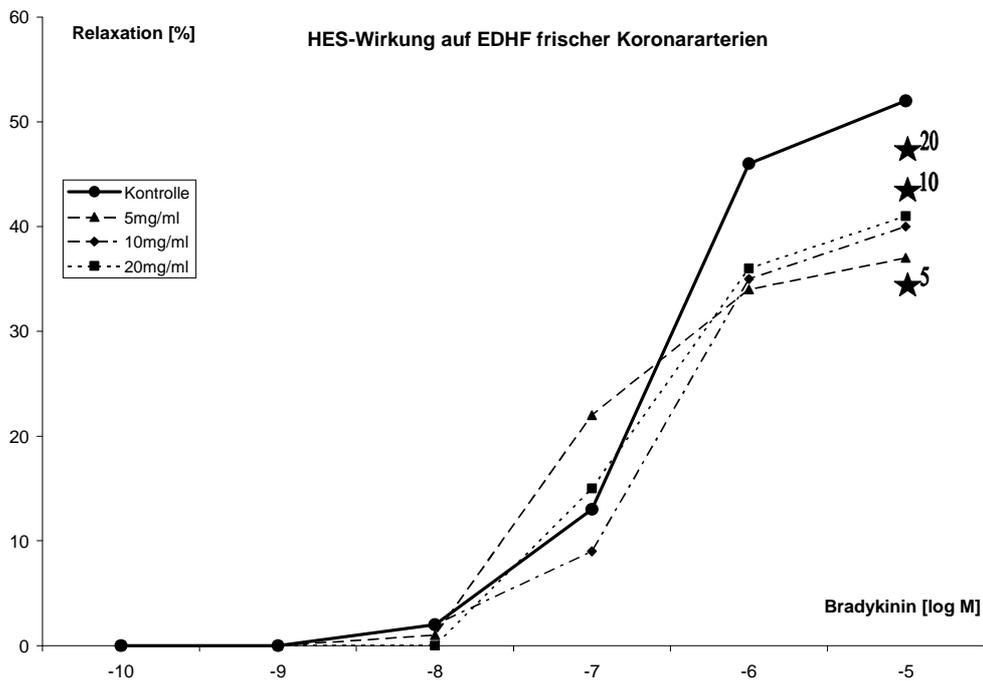
**Diagramm 7:** Mittelwerte der EDR frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Dextran-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.3 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – Dextran)



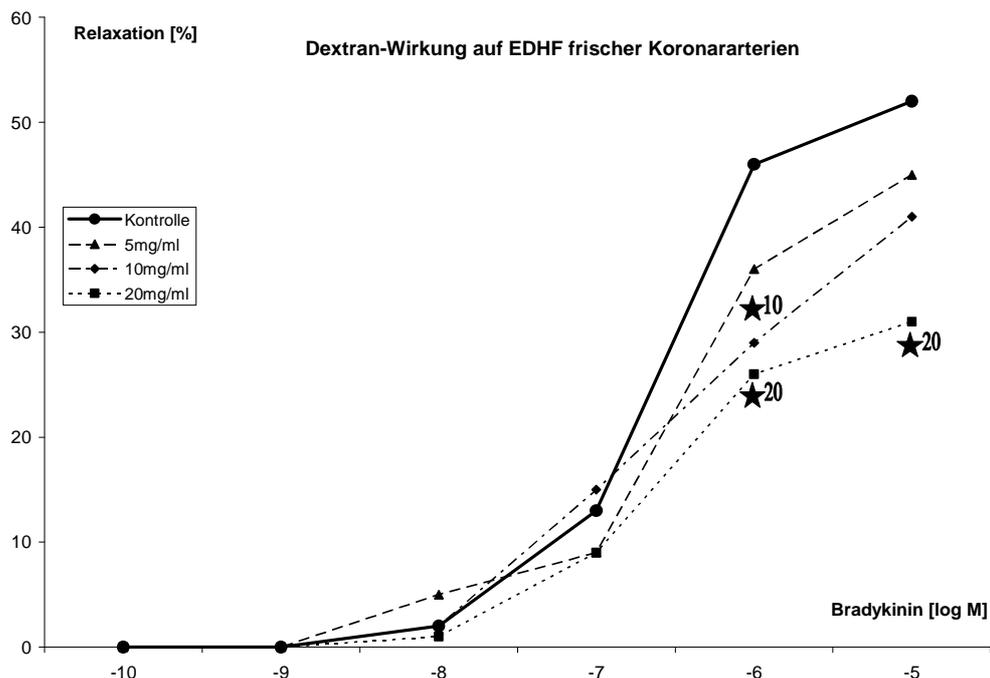
**Diagramm 8:** Mittelwerte der EDR frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Gelatine-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.4 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – Gelatine)

### 3.3.2 EDHF frischer Koronararterien

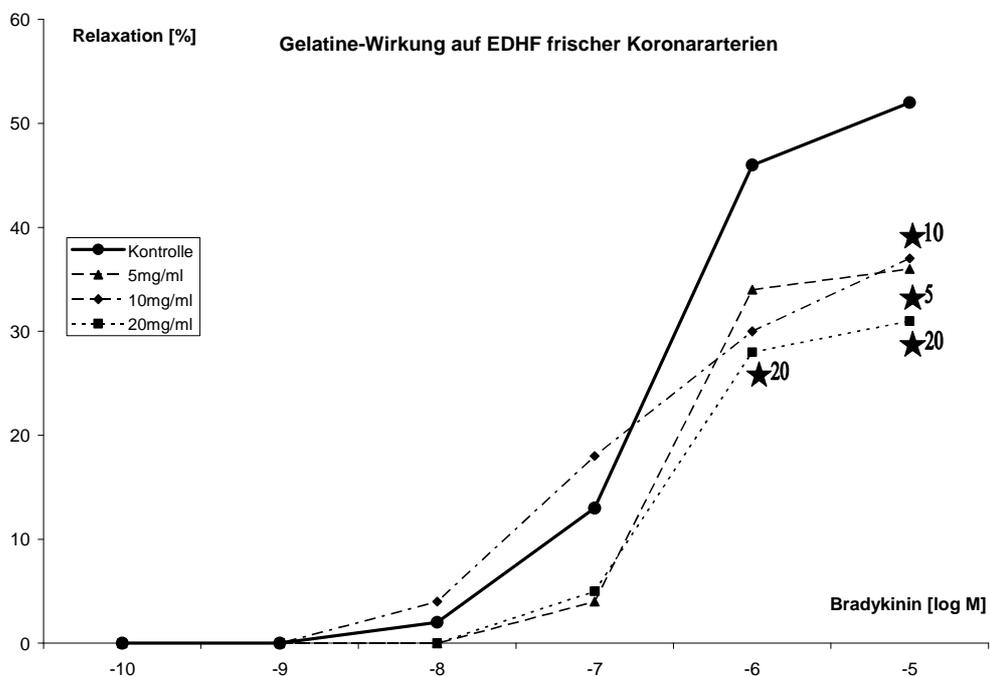
In der EDHF-abhängigen Dilatation werden sowohl in der Kontrolle als auch unter Einwirkung der unterschiedlichen Studiensubstanzen kleinere Maximalwerte erreicht. Die Tendenz einer Verringerung der Mittelwerte gegenüber den Kontrollversuchen wird in den Diagrammen deutlich, v.a. bei den höheren Bradykininkonzentrationen (BK  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$ ) erhalten wir im SNK-Test signifikante Unterschiede.



**Diagramm 9:** Mittelwerte des EDHF frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit HES-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.2 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – HES)



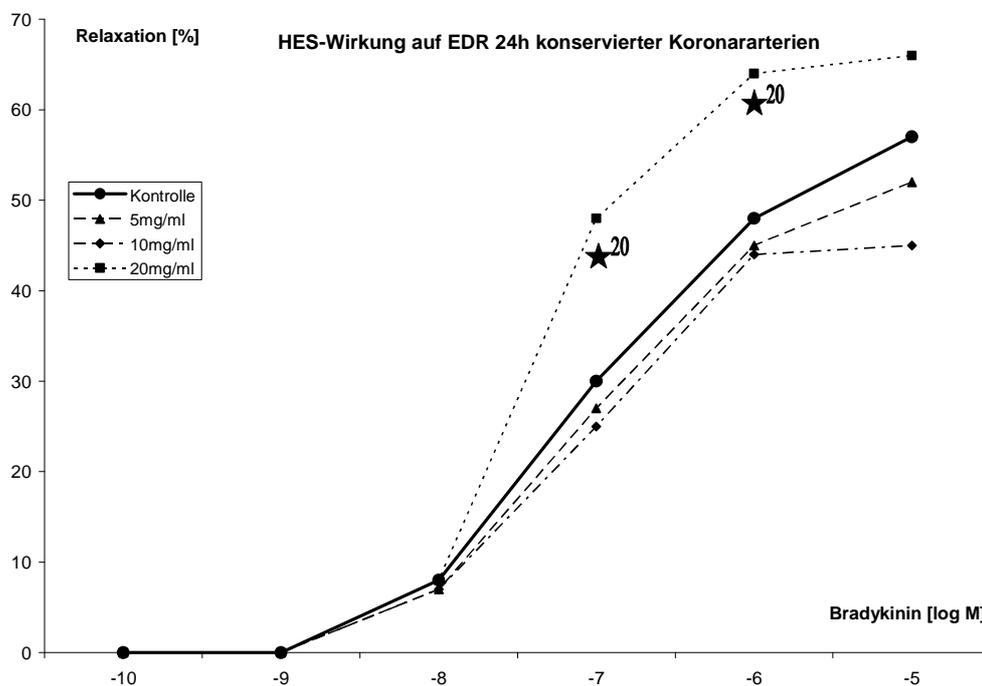
**Diagramm 10:** Mittelwerte des EDHF frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Dextran-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.3 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – Dextran)



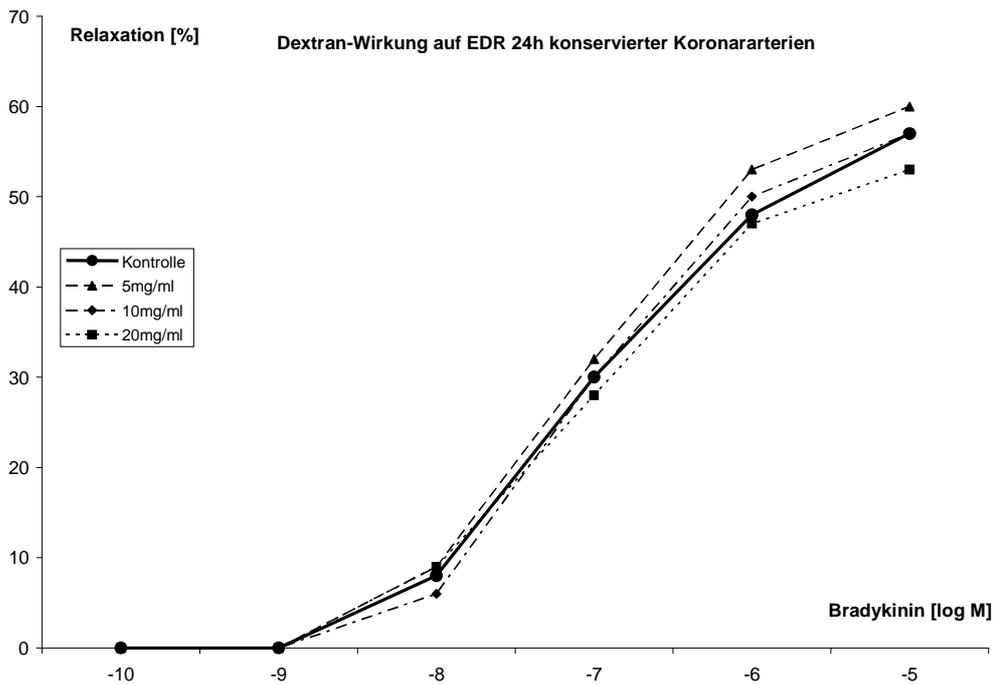
**Diagramm 11:** Mittelwerte des EDHF frischer Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Gelatine-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.4 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – Gelatine)

### 3.3.3 EDR nach 24 Stunden Konservierung

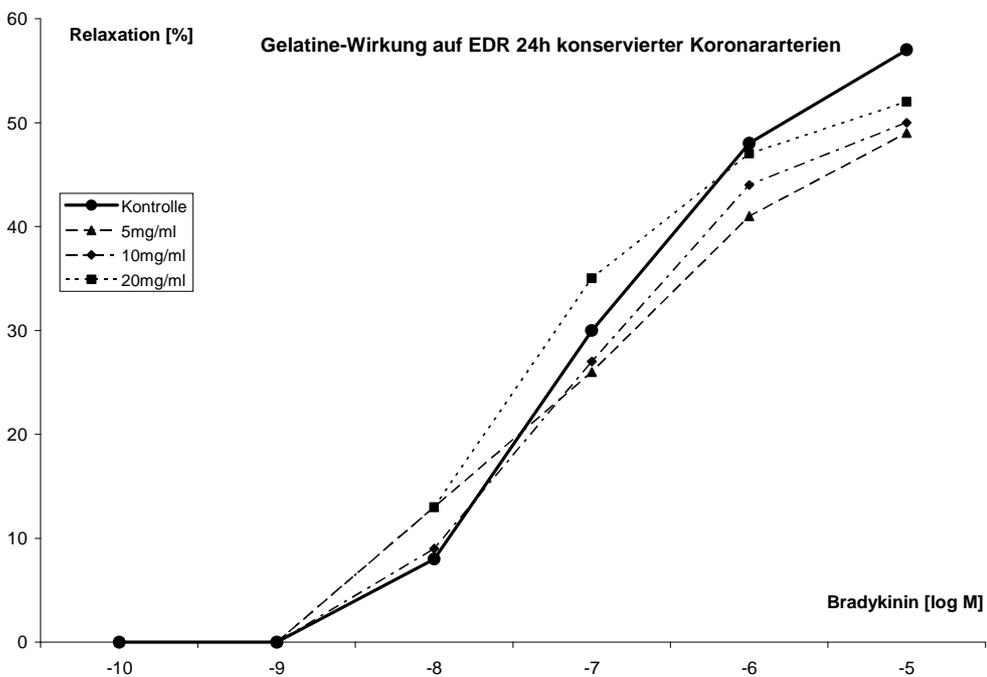
Die Diagramme der EDR mit den 24 Stunden konservierten Koronararterienabschnitte lassen unter Einfluss der Studiensubstanz keine deutlichen Unterschied im Verlauf der Kurven gegenüber der Kontrolle ablesen. Die 20mg/ml Konzentration von HES zeigt bei BK  $10^{-7}$  und BK  $10^{-6}$  eine vermeintliche Erhöhung der Mittelwerte gegenüber der Kontrolle, während sich die beiden geringeren Konzentrationen von HES mit dem Kurvenverlauf der Kontrollkurve anpassen.



**Diagramm 12:** Mittelwerte der EDR 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit HES-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.2 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen –HES)



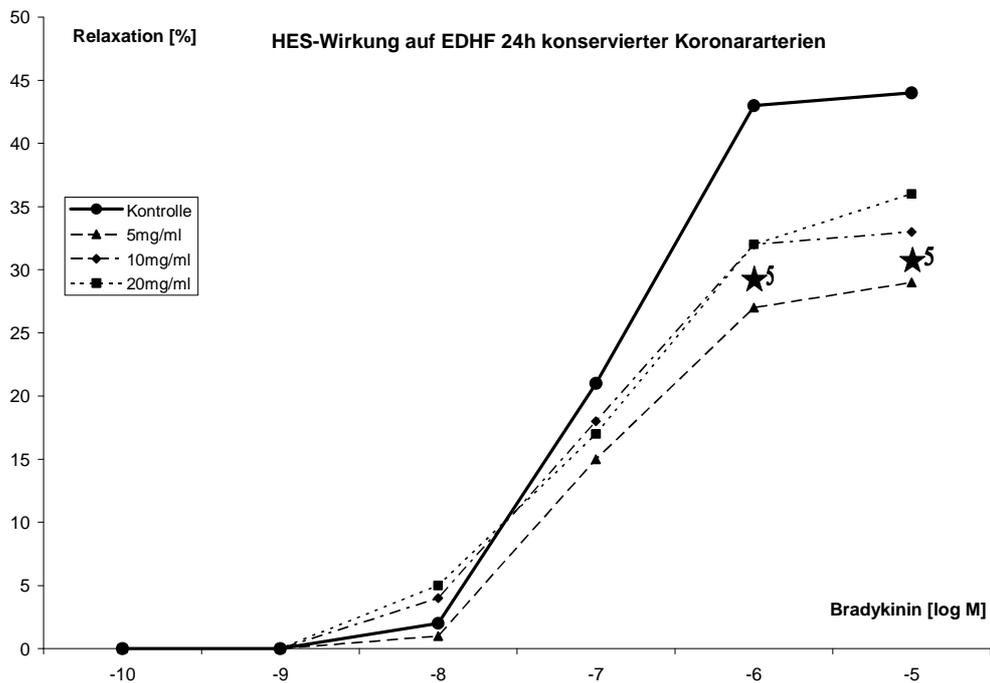
**Diagramm 13:** Mittelwerte der EDR 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Dextran-Zusätzen im zweiten Messdurchgang im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.3 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – Dextran)



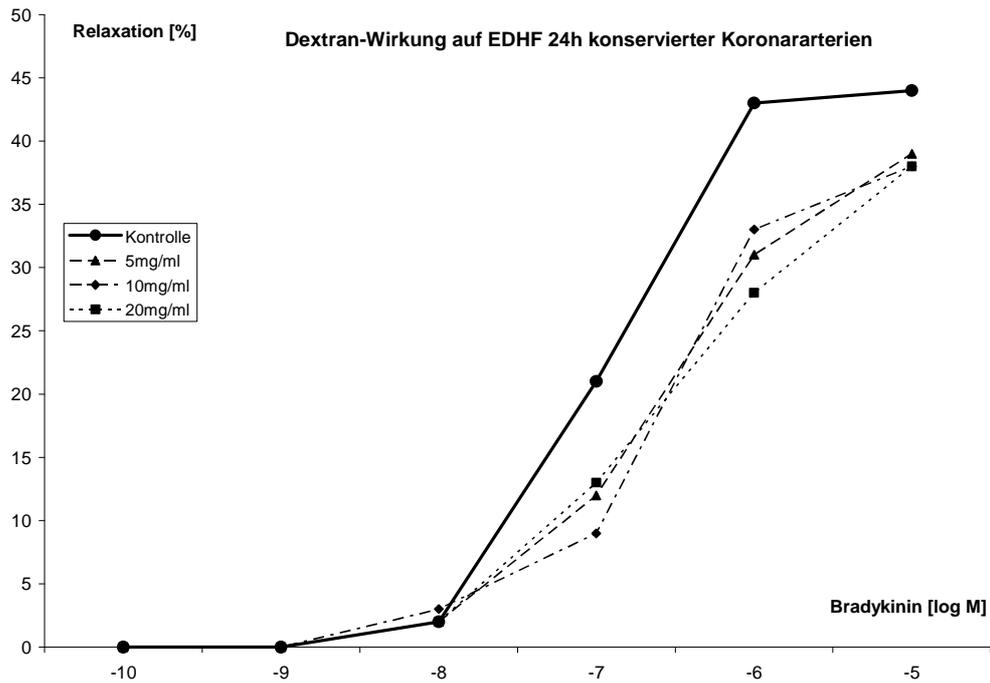
**Diagramm 14:** Mittelwerte der EDR 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Gelatine-Zusätzen im zweiten Messdurchgang im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.4 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – Gelatine)

### 3.3.4 EDHF nach 24 Stunden Konservierung

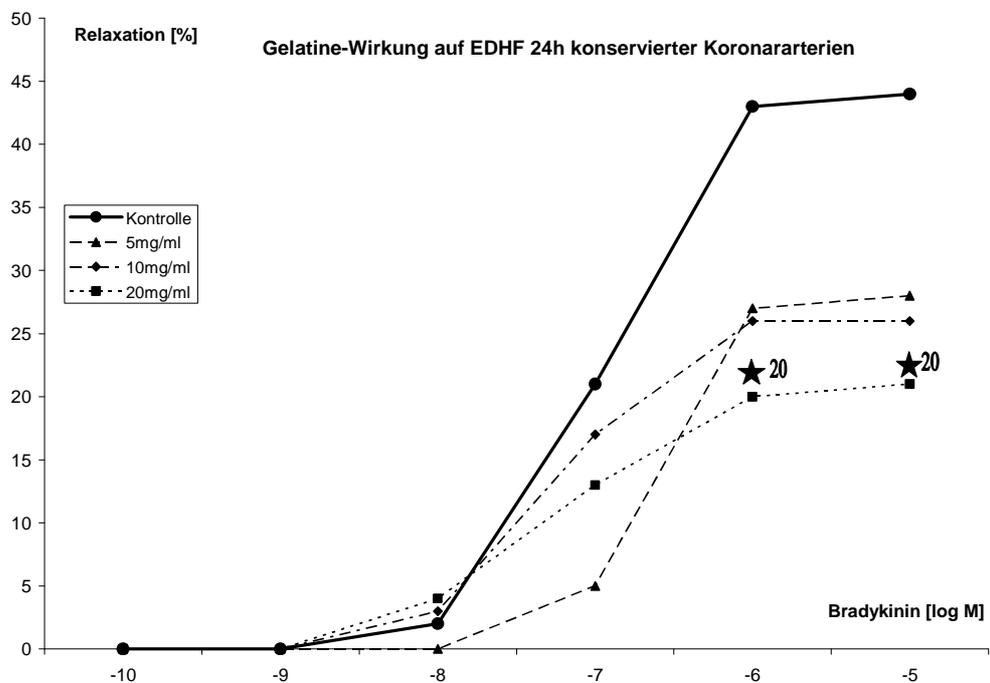
Die 24 Stunden konservierten Koronararterienabschnitte, die über den EDHF dilatieren, erreichen tendenziell unter Einwirkung der Studiensubstanzen konzentrationsunabhängig niedrigere Relaxationswerte als in der Kontrolle. Die 20mg/ml Konzentration der Gelatine weist bei den beiden hohen Bradykinin-Konzentrationen signifikante Unterschiede auf. Letzteres gilt auch für die 5mg/ml Konzentration HES.



**Diagramm 15:** Mittelwerte des EDHF 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit HES-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.2 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – HES)



**Diagramm 16:** Mittelwerte des EDHF 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Dextran-Zusätzen im zweiten Messdurchgang im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.3 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – Dextran)



**Diagramm 17:** Mittelwerte des EDHF 24 Stunden konservierter Koronararterien-Abschnitte ohne (Kontrolle) oder mit Gelatine-Zusätzen im zweiten Messdurchgang \*  $p \leq 0,05$  gegenüber Kontrolle bei den jeweiligen Bradykininkonzentrationen im SNK-Test (s. Kapitel 3.3.4 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen – Gelatine)

Die drei Kolloide führen unabhängig von ihrer jeweiligen Konzentration im zweiten Messdurchgang zu einer Rechtsverschiebung der Kurve im Vergleich zu der Kontrolle, die ohne Zusatz einer der drei Studiensubstanzen gemessen wird.

In der EDR wird die durch die Studiensubstanz verursachte Schwächung nach der Konservierung kompensiert; sichtbar an dem fast deckungsgleichen Verlauf der Kontrolle mit den Kurven aus den Versuchen. Die Mittelwerte der Kontrolle erreichen nach der Konservierung nicht mehr so hohe Werte wie im frischen Zustand der Koronargefäßteilstücke; unter Zusatz der Studiensubstanzen findet tendenziell keine derart massive Verringerung wie durch die Konservierung statt.

In den Diagrammen der EDHF-abhängigen Versuche werden durch Hemmung der NO-Synthese und dadurch hervorgerufener Blockade der NO-Bildung bereits in der Kontrolle weder bei den frisch verwendeten noch den 24 Stunden konservierten Koronararterienabschnitten so hohe Mittelwerte erreicht wie in der EDR, bei der sowohl der EDHF als auch NO an der Dilatation beteiligt sind. Es lässt sich keine Kompensation beobachten. Die Mittelwerte der Kontrolle erreichen nach der Konservierung geringere Werte als im frischen Zustand der Herzkranzgefäße. Die drei Kolloide bewirken unabhängig von der Konservierung eine Rechtsverschiebung der Kurve; tendenziell am deutlichsten unter Gelatine während nach Zugabe von Dextran die geringste Beeinträchtigung abzulesen ist. Letzteres gilt auch für die Diagramme der frisch verwendeten Koronararterienabschnitte.

### 3.4 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen

Zum Nachvollziehen bzw. Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen werden in den aufgelisteten Tabellen alle Werte in Prozent abgebildet.

#### 3.4.1 Ohne Substanz

<b>BK-Konz.</b>	<b>-8</b>	<b>-7</b>	<b>-6</b>	<b>-5</b>	<b>-8</b>	<b>-7</b>	<b>-6</b>	<b>-5</b>
<b>Ohne Substanz</b>	<b>EDR frisch n= 9</b>				<b>EDR 24h konserviert n= 9</b>			
1. Kontrolle	42 ± 13	59 ± 10	68 ± 7	73 ± 7	32 ± 22	52 ± 18	64 ± 16	67 ± 13
Substanz	10 ± 5	46 ± 12	65 ± 7	69 ± 6	8 ± 10	30 ± 20	48 ± 21	57 ± 13
2. Kontrolle	4 ± 3	27 ± 15	59 ± 10	64 ± 10	10 ± 11	30 ± 21	55 ± 14	58 ± 12
	<b>EDHF frisch n=12</b>				<b>EDHF 24h konserviert n= 9</b>			
1. Kontrolle	10 ± 7	39 ± 13	52 ± 8	56 ± 9	14 ± 9	40 ± 9	48 ± 8	49 ± 8
Substanz	2 ± 3	13 ± 13	46 ± 8	52 ± 8	2 ± 3	21 ± 13	43 ± 8	44 ± 8
2. Kontrolle	2 ± 3	14 ± 13	43 ± 14	51 ± 9	1 ± 2	14 ± 14	39 ± 12	40 ± 11

**Tabelle 4:** Mittelwerte und Standardabweichung in Prozent der Kontrollversuche ohne Substanz

### 3.4.2 HES

BK-Konz.	-8	-7	-6	-5	-8	-7	-6	-5
<b>HES 5mg/ml</b>	<b>EDR frisch n=10</b>				<b>EDR 24h konserviert n=10</b>			
1. Kontrolle	18 ± 13	47 ± 15	63 ± 14	69 ± 10	43 ± 20	62 ± 17	72 ± 13	72 ± 12
Substanz	2 ± 3	21 ± 15	50 ± 18	58 ± 15	7 ± 7	27 ± 20	45 ± 19	52 ± 19
2. Kontrolle	1 ± 2	19 ± 15	51 ± 17	57 ± 10	8 ± 9	26 ± 15	42 ± 19	45 ± 20
	<b>EDHF frisch n=11</b>				<b>EDHF 24h konserviert n=10</b>			
1. Kontrolle	8 ± 9	41 ± 13	50 ± 9	51 ± 9	12 ± 11	33 ± 14	40 ± 5	40 ± 5
Substanz	1 ± 3	22 ± 19	34 ± 19	37 ± 14	1 ± 2	15 ± 14	27 ± 9	29 ± 7
2. Kontrolle	2 ± 3	28 ± 16	41 ± 15	42 ± 12	2 ± 2	23 ± 16	32 ± 11	33 ± 8
<b>HES 10mg/ml</b>	<b>EDR frisch n=14</b>				<b>EDR 24h konserviert n= 9</b>			
1. Kontrolle	37 ± 17	61 ± 11	66 ± 10	67 ± 9	31 ± 6	49 ± 7	57 ± 4	58 ± 3
Substanz	7 ± 4	28 ± 13	50 ± 14	59 ± 15	7 ± 6	25 ± 9	44 ± 7	45 ± 5
2. Kontrolle	11 ± 7	35 ± 13	57 ± 14	60 ± 14	9 ± 5	29 ± 7	46 ± 6	47 ± 7
	<b>EDHF frisch n=15</b>				<b>EDHF 24h konserviert n= 9</b>			
1. Kontrolle	12 ± 10	37 ± 13	50 ± 9	51 ± 9	14 ± 11	35 ± 5	42 ± 6	43 ± 6
Substanz	2 ± 4	9 ± 15	35 ± 16	40 ± 13	4 ± 3	18 ± 12	32 ± 14	33 ± 13
2. Kontrolle	2 ± 3	17 ± 14	39 ± 16	42 ± 13	5 ± 7	16 ± 17	34 ± 13	36 ± 10
<b>HES 20mg/ml</b>	<b>EDR frisch n= 9</b>				<b>EDR 24h konserviert n=11</b>			
1. Kontrolle	26 ± 20	47 ± 16	59 ± 9	61 ± 7	40 ± 9	63 ± 14	70 ± 17	71 ± 16
Substanz	9 ± 9	30 ± 17	49 ± 15	57 ± 10	8 ± 9	48 ± 13	64 ± 10	66 ± 10
2. Kontrolle	8 ± 6	24 ± 13	49 ± 11	54 ± 10	3 ± 4	31 ± 15	59 ± 6	60 ± 5
	<b>EDHF frisch n=10</b>				<b>EDHF 24h konserviert n=11</b>			
1. Kontrolle	9 ± 16	30 ± 21	46 ± 18	46 ± 18	14 ± 13	37 ± 8	45 ± 6	46 ± 6
Substanz	0 ± 0	15 ± 19	36 ± 18	41 ± 14	5 ± 13	17 ± 19	32 ± 17	36 ± 12
2. Kontrolle	1 ± 1	12 ± 17	32 ± 19	40 ± 13	0 ± 1	3 ± 3	31 ± 14	35 ± 6

**Tabelle 5:** Mittelwerte und Standardabweichung in Prozent der Versuche mit der Studiensubstanz HES

### 3.4.3 Dextran

BK-Konz.	-8	-7	-6	-5	-8	-7	-6	-5
<b>Dext 5mg/ml</b>	<b>EDR frisch n=12</b>				<b>EDR 24h konserviert n= 9</b>			
1. Kontrolle	20 ± 15	42 ± 17	55 ± 13	61 ± 13	33 ± 18	56 ± 17	64 ± 15	68 ± 15
Substanz	7 ± 6	24 ± 17	48 ± 18	62 ± 12	9 ± 10	32 ± 22	53 ± 16	60 ± 17
2. Kontrolle	13 ± 19	24 ± 18	48 ± 21	57 ± 18	7 ± 6	29 ± 14	46 ± 16	55 ± 12
	<b>EDHF frisch n=11</b>				<b>EDHF 24h konserviert n=10</b>			
1. Kontrolle	10 ± 19	36 ± 22	48 ± 18	53 ± 10	12 ± 17	40 ± 14	49 ± 13	49 ± 13
Substanz	5 ± 14	9 ± 14	36 ± 16	45 ± 15	2 ± 4	12 ± 20	31 ± 19	39 ± 14
2. Kontrolle	4 ± 8	13 ± 11	44 ± 17	50 ± 13	1 ± 1	7 ± 11	31 ± 13	37 ± 11
<b>Dext 10mg/ml</b>	<b>EDR frisch n=10</b>				<b>EDR 24h konserviert n=10</b>			
1. Kontrolle	20 ± 17	49 ± 20	62 ± 16	64 ± 17	24 ± 10	47 ± 7	60 ± 8	61 ± 8
Substanz	8 ± 7	25 ± 19	46 ± 21	60 ± 11	6 ± 8	30 ± 19	50 ± 12	57 ± 10
2. Kontrolle	7 ± 5	18 ± 10	47 ± 14	56 ± 14	5 ± 6	28 ± 19	48 ± 20	53 ± 14
	<b>EDHF frisch n=12</b>				<b>EDHF 24h konserviert n=10</b>			
1. Kontrolle	4 ± 5	26 ± 17	42 ± 13	45 ± 10	13 ± 12	40 ± 11	50 ± 10	50 ± 10
Substanz	2 ± 4	15 ± 21	29 ± 20	41 ± 15	3 ± 3	9 ± 10	33 ± 15	38 ± 10
2. Kontrolle	3 ± 3	15 ± 15	44 ± 13	46 ± 10	5 ± 5	17 ± 14	37 ± 14	39 ± 12
<b>Dext 20mg/ml</b>	<b>EDR frisch n=11</b>				<b>EDR 24h konserviert n=11</b>			
1. Kontrolle	26 ± 19	54 ± 11	64 ± 9	66 ± 9	22 ± 11	49 ± 8	58 ± 7	60 ± 7
Substanz	11 ± 6	38 ± 13	57 ± 10	62 ± 10	9 ± 9	28 ± 15	47 ± 11	53 ± 11
2. Kontrolle	16 ± 6	33 ± 10	51 ± 14	56 ± 15	9 ± 7	25 ± 17	37 ± 16	40 ± 16
	<b>EDHF frisch n= 9</b>				<b>EDHF 24h konserviert n=10</b>			
1. Kontrolle	14 ± 19	35 ± 20	48 ± 13	50 ± 12	5 ± 4	30 ± 6	40 ± 6	41 ± 6
Substanz	1 ± 1	9 ± 16	26 ± 19	31 ± 19	2 ± 2	13 ± 15	28 ± 18	38 ± 11
2. Kontrolle	8 ± 13	15 ± 14	43 ± 16	45 ± 16	5 ± 5	10 ± 11	30 ± 10	36 ± 11

**Tabelle 6:** Mittelwerte und Standardabweichung in Prozent der Versuche mit der Studiensubstanz Dextran

### 3.4.4 Gelatine

BK-Konz.	-8	-7	-6	-5	-8	-7	-6	-5
<b>Gela 5mg/ml</b>	<b>EDR frisch n=14</b>				<b>EDR 24h konserviert n=11</b>			
1. Kontrolle	27 ± 19	47 ± 21	57 ± 17	64 ± 15	18 ± 14	45 ± 14	58 ± 11	61 ± 9
Substanz	11 ± 8	31 ± 20	56 ± 12	60 ± 12	13 ± 19	26 ± 22	41 ± 26	49 ± 21
2. Kontrolle	16 ± 12	39 ± 19	56 ± 16	58 ± 18	14 ± 8	31 ± 9	45 ± 15	50 ± 10
	<b>EDHF frisch n=13</b>				<b>EDHF 24h konserviert n= 9</b>			
1. Kontrolle	7 ± 9	38 ± 13	50 ± 10	50 ± 11	5 ± 8	31 ± 13	41 ± 9	44 ± 8
Substanz	0 ± 1	4 ± 8	34 ± 16	36 ± 17	0 ± 0	5 ± 5	27 ± 16	28 ± 16
2. Kontrolle	1 ± 1	16 ± 17	37 ± 18	40 ± 15	2 ± 3	8 ± 9	34 ± 21	36 ± 18
<b>Gela 10mg/ml</b>	<b>EDR frisch n=11</b>				<b>EDR 24h konserviert n=10</b>			
1. Kontrolle	18 ± 16	40 ± 18	56 ± 12	59 ± 12	26 ± 19	47 ± 21	60 ± 17	68 ± 13
Substanz	12 ± 9	35 ± 19	51 ± 17	60 ± 12	9 ± 9	27 ± 18	44 ± 12	50 ± 10
2. Kontrolle	7 ± 12	20 ± 18	40 ± 22	48 ± 16	13 ± 9	28 ± 19	45 ± 20	51 ± 17
	<b>EDHF frisch n=11</b>				<b>EDHF 24h konserviert n=10</b>			
1. Kontrolle	6 ± 12	32 ± 17	44 ± 20	52 ± 12	14 ± 16	44 ± 10	53 ± 8	54 ± 8
Substanz	4 ± 9	18 ± 21	30 ± 23	37 ± 23	3 ± 3	17 ± 20	26 ± 19	26 ± 18
2. Kontrolle	2 ± 3	14 ± 15	36 ± 24	46 ± 18	3 ± 3	15 ± 14	31 ± 15	34 ± 13
<b>Gela 20mg/ml</b>	<b>EDR frisch n=12</b>				<b>EDR 24h konserviert n=11</b>			
1. Kontrolle	16 ± 20	40 ± 15	54 ± 12	58 ± 9	21 ± 19	41 ± 21	56 ± 10	59 ± 10
Substanz	8 ± 7	27 ± 20	45 ± 22	51 ± 20	13 ± 17	35 ± 25	47 ± 24	52 ± 21
2. Kontrolle	11 ± 8	30 ± 18	43 ± 19	52 ± 16	14 ± 16	31 ± 21	43 ± 19	52 ± 13
	<b>EDHF frisch n=12</b>				<b>EDHF 24h konserviert n=13</b>			
1. Kontrolle	3 ± 7	23 ± 21	37 ± 18	46 ± 11	5 ± 7	28 ± 14	40 ± 14	45 ± 8
Substanz	0 ± 1	5 ± 11	28 ± 16	31 ± 14	4 ± 7	13 ± 17	20 ± 21	21 ± 20
2. Kontrolle	3 ± 3	10 ± 12	24 ± 19	38 ± 11	3 ± 4	10 ± 15	21 ± 18	28 ± 14

Tabelle 7: Mittelwerte und Standardabweichung in Prozent der Versuche mit der Studiensubstanz Gelatine

### **3.5 Tabellen der Mittelwerte und Standardabweichungen der auf PGF<sub>2α</sub> erfolgten Kontraktion**

Nach Zugabe des Prostaglandins PGF<sub>2α</sub> kommt es zu einer Kontraktion des Koronararterien-teilstückes. Die erfolgte Kontraktion wird in mm auf zwei Stellen hinter dem Komma als echte Kontraktion des Gefäßringes dargestellt; sie wird mit Hilfe von Eichkurven aus den auf dem Schreiber und mit Verstärker registrierten Kurven errechnet. Dabei sind die Kurven unter L-NNA immer deutlich stärker ausgeprägt als die Kurven nach der Zugabe von L-Arginin. Zum Nachvollziehen bzw. Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen werden in den aufgelisteten Tabellen alle Werte der auf PGF<sub>2α</sub> erfolgten Kontraktion in mm abgebildet.

#### **3.5.1 Ohne Substanz**

<b>Ohne Substanz</b>					
1. Kontrolle	Substanz	2. Kontrolle	1. Kontrolle	Substanz	2. Kontrolle
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,39 ± 0,12	0,63 ± 0,21	0,62 ± 0,29	0,43 ± 0,12	0,64 ± 0,28	0,68 ± 0,30
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
0,87 ± 0,30	1,20 ± 0,29	1,25 ± 0,29	0,89 ± 0,41	1,29 ± 0,51	1,44 ± 0,61

**Tabelle 8:** Mittelwerte und Standardabweichung der auf PGF<sub>2α</sub> erfolgten Kontraktion in mm bei den Kontrollversuchen ohne Substanz

### 3.5.2 HES

1. Kontrolle	Substanz	2. Kontrolle	1. Kontrolle	Substanz	2. Kontrolle
<b>HES 5mg/ml</b>					
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,46 ± 0,15	0,52 ± 0,21	0,52 ± 0,24	0,61 ± 0,37	0,76 ± 0,41	0,78 ± 0,48
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
1,65 ± 0,56	1,58 ± 0,60	1,80 ± 0,80	1,36 ± 0,71	1,22 ± 0,59	1,48 ± 0,67
<b>HES 10mg/ml</b>					
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,54 ± 0,24	0,71 ± 0,39	0,61 ± 0,46	0,49 ± 0,15	0,84 ± 0,43	0,76 ± 0,64
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
0,94 ± 0,38	1,33 ± 0,21	1,26 ± 0,34	0,86 ± 0,26	1,24 ± 0,22	1,34 ± 0,24
<b>HES 20mg/ml</b>					
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,68 ± 0,46	0,84 ± 0,66	0,94 ± 0,88	0,31 ± 0,10	0,57 ± 0,14	0,75 ± 0,18
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
1,08 ± 0,21	1,18 ± 0,18	1,22 ± 0,23	0,81 ± 0,40	1,34 ± 0,23	1,38 ± 0,22

**Tabelle 9:** Mittelwerte und Standardabweichung der auf PGF<sub>2α</sub> erfolgten Kontraktion in mm bei den Versuchen mit der Studiensubstanz HES

### 3.5.3 Dextran

1. Kontrolle	Substanz	2. Kontrolle	1. Kontrolle	Substanz	2. Kontrolle
<b>Dextran 5mg/ml</b>					
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,46 ± 0,13	0,55 ± 0,17	0,48 ± 0,18	0,44 ± 0,14	0,57 ± 0,23	0,47 ± 0,15
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
0,94 ± 0,33	1,06 ± 0,25	1,11 ± 0,29	1,03 ± 0,21	1,10 ± 0,15	1,35 ± 0,27
<b>Dextran 10mg/ml</b>					
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,64 ± 0,34	0,68 ± 0,26	0,60 ± 0,36	0,46 ± 0,29	0,62 ± 0,32	0,67 ± 0,52
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
0,97 ± 0,32	1,06 ± 0,30	1,17 ± 0,36	1,01 ± 0,34	1,01 ± 0,38	1,22 ± 0,49
<b>Dextran 20mg/ml</b>					
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,48 ± 0,20	0,43 ± 0,15	0,32 ± 0,13	0,49 ± 0,20	0,53 ± 0,27	0,39 ± 0,29
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
0,94 ± 0,20	1,06 ± 0,36	0,99 ± 0,23	0,86 ± 0,31	1,15 ± 0,33	1,30 ± 0,38

**Tabelle 10:** Mittelwerte und Standardabweichung der auf PGF<sub>2α</sub> erfolgten Kontraktion in mm bei den Versuchen mit der Studiensubstanz Dextran

### 3.5.4 Gelatine

1. Kontrolle	Substanz	2. Kontrolle	1. Kontrolle	Substanz	2. Kontrolle
<b>Gelatine 5mg/ml</b>					
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,43 ± 0,16	0,51 ± 0,17	0,44 ± 0,16	0,42 ± 0,13	0,48 ± 0,15	0,34 ± 0,19
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
0,95 ± 0,29	1,00 ± 0,30	1,18 ± 0,41	0,74 ± 0,21	0,96 ± 0,25	1,13 ± 0,22
<b>Gelatine 10mg/ml</b>					
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,49 ± 0,22	0,52 ± 0,23	0,43 ± 0,25	0,43 ± 0,15	0,40 ± 0,15	0,30 ± 0,15
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
1,13 ± 0,32	1,16 ± 0,31	1,07 ± 0,42	0,96 ± 0,36	0,97 ± 0,38	0,94 ± 0,32
<b>Gelatine 20mg/ml</b>					
<b>EDR frisch</b>			<b>EDR nach 24h</b>		
0,50 ± 0,20	0,56 ± 0,24	0,60 ± 0,25	0,44 ± 0,21	0,53 ± 0,23	0,52 ± 0,33
<b>EDHF frisch</b>			<b>EDHF nach 24h</b>		
1,26 ± 0,28	1,13 ± 0,34	1,47 ± 0,25	0,86 ± 0,27	0,93 ± 0,30	1,12 ± 0,38

**Tabelle 11:** Mittelwerte und Standardabweichung der auf  $\text{PGF}_{2\alpha}$  erfolgten Kontraktion in mm bei den Versuchen mit der Studiensubstanz Gelatine

## **4 Diskussion**

### **4.1 Kritik der Methodik**

Wir wählten in dieser Studie das porcine Herz, weil u.a. Größe und pharmakologische Reaktivität porciner Koronararterien sich mehr mit denen des Menschen als beispielsweise mit caninen Herzkranzgefäßen decken (Nakayama et al., 1988). [„Das porcine Herz eignet sich hervorragend als physiologisches und anatomisches Versuchsmodell, weil es eine deutliche Ähnlichkeit zu dem humanen Herz aufweist“] (Ehler, 1985). Auch porcine Blutplättchen zeigen eine hohe Vergleichbarkeit gegenüber denen des menschlichen Körpers, ebenso wie der koronare Blutkreislauf des Schweines in Bezug auf den menschlichen (Serebruany et al., 1998). In einer Studie von Ghanem et al. an Mastzellen aus Herz und Niere bei Mensch und Schwein wird trotz unterschiedlichen Histamingehalts bzw. verschiedener Verteilung eine Analogie bezüglich der Morphologie und Histochemie deutlich (1988). Diese unterschiedlichen Studien und Ansätze zeigen immer wieder eine hohe Organkompatibilität zwischen dem menschlichen und porcinen Herzen einschließlich der koronaren Zellen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit können wir somit die Beobachtungen an porcinen Koronararterien auf humane Herzkranzgefäße übertragen.

Wir verwendeten die Plasmaexpander Hydroxyethylstärke (HES), Dextran und Gelatine in einer 5, 10 bzw. 20 mg/ml Konzentration. Diese Konzentration bezieht sich auf die Inkubationslösung, in der die Ringe während des Versuchs positioniert wurden und spiegelt die klinisch im Blutplasma erreichten Konzentrationen im Rahmen der Volumensubstitution wider. In einer Studie von Dagtekin et al. wurden bereits Daten zu HES in der klinisch relevanten 6 mg/ml Konzentration ermittelt. Interessant war es jetzt, ob mit höheren Konzentrationen dementsprechend deutlichere Effekte beobachtet werden können bzw. welche Wirkungen mit anderen Plasmaexpander wie Dextran und Gelatine erzielt werden.

Das Autakoid Bradykinin bewirkt eine Freisetzung von NO, Prostazyklin und EDHF und wurde im Versuch zur Auslösung der Dilatation genutzt. Bradykinin zeigt bereits in geringen Konzentrationen und bei verschiedenen Spezies eine sichere Wirkung bezüglich der endothel-abhängigen Relaxation (Endothelium-derived-Relaxation=EDR) bzw. bei der Hyperpolarisation durch EDHF (Dagtekin et al., 2008; Félétou und Vanhoutte, 2006; Nakashima et al., 1993). Der Essigsäureester des Cholins – Acetylcholin ruft in den großen epikardialen

Arterien von Hunden ebenfalls eine Dilatation hervor, wobei der Hund eine Sonderrolle einnimmt, da canine Gefäße auf ACh immer nur mit einer dilatativen Antwort reagieren sofern das Endothel intakt ist (Kalsner, 1985). Bei Rindern, Kaninchen und Katzen wurde hingegen eine Konstriktion beobachtet; die beim Menschen immer und auch bei sehr geringen Konzentrationen des Esters als charakteristisch gilt, dargestellt an isolierten humanen Koronargefäßen in Kalsners Studie von 1985 als auch immer wieder erwähnt aber nicht spezifisch belegt im Rahmen von Transplantationen (Kalsner, 1985). In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Kalsner mit Herzkranzgefäßen verstorbener Menschen gearbeitet hat, deren Todesursache von Unfall bzw. Selbstmord, Lungenentzündung über Herzerkrankungen bis hin zu Karzinomatose reichte; auch das Alter variierte stark von 18 bis 87. Letzteres impliziert, dass z.T. Koronargefäße von schwerst geschädigten menschlichen Herzen untersucht wurden, deren Endothel nicht mehr mit dem gesunder Gefäße vergleichbar ist. Die großen Widerstandsgefäße beim Schwein reagieren mit einer Dilatation, während die porcinen, großen Koronargefäße auf ACh eine Konstriktion zeigen (Fischer et al., 2004; Steinhoff, 2004). Acetylcholin bewirkt bei Herzkranzgefäße von Schweinen, Schafen und Rindern sowie teilweise auch beim Affen eine Vasokonstriktion und ist somit ungeeignet für unseren Versuch (Kalsner, 1985). Steinhoff konnte in ihrer Arbeit belegen, dass mit zunehmender Konzentration des Esters die dilatatorische Eigenschaft von ACh schwächer wird und sich schließlich eine konstriktive Wirkung entfaltet (Steinhoff, 2004). Ein weiterer Vorteil für die Verwendung von Bradykinin liegt darin, dass seine Wirkung reversibel und in jedem Versuchsdurchlauf erneut herbeiführbar ist. Im Vergleich zu Natriumnitroprussid oder Papaverin führt das Autakoid weder zu einer langfristigen Veränderung der Reaktion des Endothels noch zu einer Schädigung der Gefäße (siehe Kapitel 4.1.9 und 4.1.10).

### 4.1.1 Kaliumchlorid

Kaliumchlorid (KCl) wurde zu Anfang des Versuchs zweimal hinzugegeben, u.a. um die Kaliumspeicher der Arterienringe aufzufüllen (s. Kap. 2.8, Abb. 2). Die Vorinkubation soll im Rahmen der Vorbehandlung eventuell entstandene Kaliumverluste ausgleichen, damit die Teilstücke der Koronargefäße anschließend die drei Kontraktionen und BK-Messungen durchlaufen können.

Gleichzeitig beobachteten wir als Reaktion auf die KCl Gaben eine Kontraktion der Koronararterienringe, die in Kapitel 2.8. in der Abbildung 2 bildlich dargestellt wird. Letztere dient zum Test der Funktionalität der Koronarringe und wurde angelehnt an vorherige Studien durchgeführt (Dahmen, 2009; Naglo-Dünner, 2010; Steinhoff, 2004). Die herbeigeführte Kontraktion beschrieb die maximale endothelunabhängige Kontraktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur. Auf diesem Weg wurde die Unversehrtheit der glatten Gefäßwandmuskulatur geprüft und bei positiver Reaktion bestätigt.

Durch Hyperkaliämie wird das Ruhemembranpotential vermindert und die Erregbarkeit nimmt zu; in unserem Versuch führten wir durch Zugabe des KCl eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration herbei (Schröder und Schemann, 2000). Unter physiologischen Umständen liegt intrazellulär eine  $K^+$ -Konzentration von 155mmol/l und extrazellulär von 4mmol/l, während sich  $Cl^-$  intrazellulär auf 4mmol/l und extrazellulär auf 103mmol/l konzentriert (Schröder und Diener, 2000). Experimentell konnte gemessen werden, dass die Permeabilität für Kaliumionen an Nerven- oder Muskelzellen im Ruhezustand das 10-25fache der Permeabilität für Natriumionen beträgt. Desweiteren liegt die Permeabilität der Chloridionen etwa 10mal höher als die der Natriumionen, so dass das Membranpotential von der  $K^+$ - und der  $Cl^-$ -Permeabilität geprägt wird (Schröder und Diener, 2000). Generell ist die Zellmembran nicht erregter Nervenzellen und Muskelzellen aufgrund spontan offener Kaliumkanäle hauptsächlich für Kaliumionen durchlässig. Durch die Zugabe des KCl wird das elektrochemische Gleichgewicht erheblich gestört: die extrazelluläre Konzentration von  $K^+$  erhöht sich auf 20-30mmol/l, dadurch wird das Konzentrationsgefälle zwischen intra- und extrazellulärem Bereich verringert und die Ionenströme von intra- nach extrazellulär werden reduziert, so dass der depolarisierende Effekt der Kaliumionen die hyperpolarisierende Kraft u.a. der  $K_{ir}$ -Kanäle ausschaltet (Bryan et al., 2005; Karazi et al.,

1984). Spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle werden geöffnet, extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  strömt in die Zellen und verursacht eine Kontraktion (Karazi et al., 1984).

Wenn eine Kontraktion auf die KCl-Gabe ausblieb, war das Teilstück gewöhnlich vorgeschädigt und würde auch im weiteren Versuchsablauf keine Reaktionen zeigen. Somit nutzten wir die KCl-Gabe wie oben beschrieben nicht nur zur Auffüllung der Kaliumreserven sondern direkt als erste Qualitätskontrolle für die zu testenden Herzkranzgefäßteilstücke.

#### **4.1.2 Indometacin**

Nach der zweimaligen KCl-Verabreichung und anschließendem Auswaschen der Pharmakon enthaltenden Organbadlösung mit der Krebs-Henseleit-Lösung wurde ein stabiles Gleichgewicht der Gefäßdehnung (steady-state) erreicht. Darauffolgend gaben wir wie auch bei jedem folgenden Versuchsdurchlauf Indometacin [ $10\mu\text{mol/l}$ ] für den Kontrollgang hinzu. Diese Substanz ist ein Essigsäure- bzw. Indolderivat, das die Cyclooxygenasen und somit die Synthese der Prostaglandine hemmt. Dieser reversible Enzymhemmer aus der Gruppe der NSAIDs erreichte bei der verwendeten Konzentration im Organbad eine Konzentration von  $10\mu\text{mol/l}$  und diente zur vollständigen Hemmung der eventuell vorkommenden oder synthetisierten Prostaglandine, weil letztere regulierend auf den Gefäßtonus wirken (Kietzmann et al., 2002). Für den Versuch war speziell die Hemmung des Prostazyklins ( $\text{PGI}_2$ ) von Bedeutung, weil es im Vergleich zu den anderen Prostaglandinen (exkl.  $\text{PGE}_2$ ) keine Kontraktion sondern eine Dilatation über EDR bewirkt und den im Endothel vorherrschenden Arachidonsäuremetabolit darstellt (Kietzmann et al., 2002; Nagao und Vanhoutte, 1992). Wir wollten in diesem Versuch ausschließlich die durch NO hervorgerufene EDR und die durch den EDHF hervorgerufene Hyperpolarisation untersuchen und inhibierten andere Wege, die unsere Ergebnisse hätten verzerren können.

Danach wurde entweder durch L-Arginin Gaben die NO-Wirkung verstärkt bzw. eine spätere EDR-Wirkung begünstigt. Hingegen wurde über die L-NNA Gabe die NO-Synthase inhibiert, um eine EDHF-Wirkung zu erhalten.

### 4.1.3 L-Arginin – NO

Mit der Zugabe von L-Arginin sorgten wir aufgrund der besonderen Bedingungen der Messung an isolierten Koronararterienringen für eine ausreichende Grundmenge an NO. L-Arginin wird durch NO-Synthase (NOS) zu dem kleinen, lipophilen und diffusionsfähigen Molekül Stickstoffmonoxid (NO) mit kurzer Halbwertszeit von 3-5 Sekunden umgebaut (Berkels et al., 2000; Ge et al., 2000; Nohl, 2002). NO gilt als der Kalzium-abhängige EDRF (Endothelium derived relaxing factor) (Bryan et al., 2005; Furchgott, 1998; Merkus et al., 2004; Moncada et al., 1989).

Wir unterscheiden die drei Isoenzyme der NO-Synthase: die neuronale NOS (nNOS) in Neuronen, die endotheliale, konstitutive NOS (eNOS) im vaskulären Endothel und die induzierbare NOS (iNOS), die in einer Vielzahl von Zellen induziert werden kann. Letztere wird im Rahmen von inflammatorischen Prozessen durch Endotoxine und Zytokine aktiviert, um dann zu einer schnellen, starken und langanhaltenden Stickstoffmonoxidausschüttung zu führen (Joly et al., 1994).

Die eNOS hängt von einem Kalzium/Calmodulin-Komplex ab (Joly et al., 1994; Müller-Esterl, 2004; Schmidt und Lang, 2007). eNOS bindet an das Membranprotein Caveolin, das auf den Caveolae lokalisiert ist (Shaul et al., 1996). Diese Caveolae sind kleine Invaginationen der Plasmamembran (Shaul et al., 1996). Durch die Bindung an das Caveolin wird die Aktivität der eNOS inhibiert (Ohnishi et al., 2001). Der Anstieg des intrazellulären Kalziums im Endothel aktiviert die  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-abhängige NO-Synthase. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Komplex führt zu einer Dissoziation der eNOS von dem Caveolin, so dass das Enzym wieder die NO-Synthase katalysieren kann und NO ausgeschüttet wird (Michel et al., 1997; Schmidt, 2003).

Die eNOS (im folgenden als NO-Synthase bezeichnet) kann durch verschiedene Stimuli wie z.B. Scherkräfte, oder auch Agonisten wie z.B. Acetylcholin, Substanz P bzw. Bradykinin aktiviert werden (Berkels et al., 1996; Ge et al., 2000; Merkus et al., 2004). Während Acetylcholin wie oben erwähnt bei großen porcinen Koronargefäßen keine zuverlässige Dilatation sondern eine Kontraktion bewirkt, erlaubt das Neuropeptid Substanz P keine Dosis-Wirkungs-Kurve, da es die Rezeptoren auf Dauer besetzt. Letzteres bestätigt u.a. die Wahl von Bradykinin als Substanz zur Auslösung der Dilatation in unserem Versuch.

Das in den Gefäßendothelien gebildete diffusionsfähige Stickstoffmonoxid (NO) führt durch die Bindung an die prosthetische Hämgruppe der löslichen Guanylatzyklase zur Aktivierung derselben, die als second messenger daraufhin in der glatten Gefäßmuskulatur eine Erhöhung des intrazellulären zyklischen GMPs hervorruft (Archer et al., 1994; Ge et al., 2000; Martin et al., 1986; Schmidt et al., 2003). Dabei gilt, dass das Angebot von Stickstoffmonoxid die Enzymaktivität regelt, d.h. je mehr Stickstoffmonoxid vorhanden ist, desto höher ist die Enzymaktivität. Einerseits werden Kaliumkanäle aktiviert und andererseits spannungsabhängige Kalziumkanäle inaktiviert; letzteres wird durch die sich einstellende Hyperpolarisation noch verstärkt (Archer et al., 1994). Durch die inaktivierten Kalziumkanäle wird der Kalziueinstrom in die glatte Gefäßmuskulatur gemindert und eine Verringerung des freien intrazellulären Kalziums entsteht (Archer et al., 1994; Carrier et al., 1997; Forstermann et al., 1994; Ge et al., 2000; Haller, 1997; Komalavilas und Lincoln, 1996; Lincoln und Cornwell, 1993; Martin et al., 1986; Moncada et al., 1989/1991; Nagao und Vanhoutte, 1992; Nohl 2002; Schmidt, 2003). Die Verringerung des freien intrazellulären Kalziums in der glatten Gefäßmuskulatur erfolgt einerseits über die beschriebene Blockade des Kalziuminflux und andererseits über eine inhibierte Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Speichern. Die Phosphorylierung des leichtkettigen Myosins wird herabgesetzt, folglich die Myosin/Aktin-Interaktion verhindert und eine Dilatation der Blutgefäße hervorgerufen (Carrier et al., 1997; Komalavilas und Lincoln, 1996; Lincoln und Cornwell, 1993; Vaandrager und de Jonge, 1996). Somit kann NO über diese Vasodilatation letztendlich die Gefäßweite regulieren und beispielsweise die Durchblutung steigern (Moncada et al., 1989; Nagao und Vanhoutte, 1992; Nohl 2002).

Die NO-Bildung korreliert stark mit dem transmembranalen  $\text{Ca}^{2+}$ -influx und nicht so sehr mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern, während die Prostazyklin-Bildung fast vollständig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus diesen intrazellulären Pools abhängt (Lückhoff et al., 1988).

#### **4.1.4 L-NNA**

Das NO-EDHF-System lässt sich durch das L-Arginin Analogon L-NNA gut voneinander differenzieren, weil das L-N<sup>G</sup>-nitroarginin (L-NNA) ein NO-Synthase-Inhibitor ist (Selemidis und Cocks, 2007). Nach L-NNA Gaben wird die Synthese von NO, das als relaxierender Faktor auf die Gefäßweite wirken würde, kompetitiv gehemmt. Letzteres erklärt die wesentlich stärkere Kontraktion der Gefäßringe auf PGF<sub>2α</sub> unter L-NNA: die dilatierende Wirkung von NO wird aufgehoben und eine stärkere Kontraktion auf die gleiche Menge PGF<sub>2α</sub> erfolgt. L-NNA muss mindestens eine Konzentration von 300μmol/l im Organbad erreichen, um eine ausreichende Inhibition der NOS zu bewirken (Ge et al., 2000). Diese Konzentration reicht aus, um eine sichere NOS-Hemmung zu erzielen und dann eine reine EDHF Wirkung zu beobachten, weil die Dilatation der Herzkranzarterien über EDR verhindert wird (Ge et al., 2000).

Die durch die L-Arginin bzw. L-NNA Gaben ermöglichte, getrennte Betrachtung der durch NO hervorgerufene EDR bzw. durch EDHF induzierte Hyperpolarisation war für den gesamten Versuch vorrangig, um einen Vergleich dieser beiden vasoaktiven Faktoren unter dem Einfluss der Plasmaexpander überhaupt erst zu gewährleisten.

#### **4.1.5 EDHF**

Stickstoffmonoxid und Prostazyklin vermitteln eine endothelabhängige Gefäßdilatation. Félétou und Vanhoutte beschreiben, dass diese Gefäßrelaxation nicht vollständig durch die Freisetzung von NO und PGI<sub>2</sub> erklärt werden kann. Wird die durch NO und PGI<sub>2</sub> induzierte Relaxation mit spezifischen Inhibitoren wie L-NNA und Indometacin inhibiert, bleibt eine Vasodilatation bestehen, die immer mit einer Hyperpolarisation einhergeht (Busse et al., 2002; Félétou und Vanhoutte, 2006). Diese hyperpolarisierenden und relaxierenden Eigenschaften sind nur in Anwesenheit des Endothels zu beobachten, daher wurde dieser Faktor als EDHF (Endothelium Derived Hyperpolarising Factor) bezeichnet (Busse et al., 2002).

Interzelluläre Kanäle, sogenannte Gap Junctions (siehe Möglicher Mechanismus 3) ermöglichen eine einheitliche Membranspannung verbundener Zellen, indem sich elektrische Signale frei und in beide Richtungen zwischen den beteiligten Zellen ausbreiten können

(Busse et al., 2002; Edwards et al., 2000; Félétou und Vanhoutte, 2006). Eine lokal ausgelöste endothelabhängige Hyperpolarisation erreicht nicht nur die darunterliegende glatte Gefäßmuskulatur, sondern besitzt genügend elektrische Kraft, um in die Peripherie über lange Strecken zu entfernten glatten Muskelzellen weitergeleitet zu werden; während NO und somit EDR nur über eine lokale Freisetzung arbeitet (Selemidis und Cocks, 2007). Es ist noch nicht eindeutig geklärt, ob ein Messenger z.B. der EDHF oder vielleicht nur ein elektrochemisches Potential in Form von Ionen zwischen den Zellen wandert (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006; Busse et al., 2002). Die Weiterleitung der Hyperpolarisation innerhalb der glatten Gefäßmuskulatur ist anzunehmen, während die Diffusion eines „Faktors“ als Auslöser bzw. für die Weiterleitung eher unwahrscheinlich scheint (Selemidis und Cocks, 2007).

Die Hyperpolarisation wandert nicht nur peripher sondern auch entlang kleiner Arterien, wird aber mit zunehmender Entfernung abgeschwächt (Selemidis und Cocks, 2007). Insgesamt kann u.a. aufgrund dieser elektrotonischen Eigenschaften der Arterien im Zusammenhang mit EDHF ein konstanter Blutfluss gewährleistet werden, wenn das vom Endothel-stammende NO z.B. durch Gefäßinflammation oder oxidativen Stress nachteilig beeinträchtigt wird (Bryan et al., 2005; Kajiya et al., 2007; Selemidis und Cocks, 2007; Zhang et al., 2004).

Die EDHF-vermittelte Hyperpolarisation und Gefäßrelaxation steht in engem Zusammenhang mit der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Tomioka et al., 2001). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über die NSCC (nicht selektive Kalziumkanäle) zur Auffüllung des entleerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Pools, wird durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschüttung aus intrazellulären Speichern getriggert und nimmt bei der Regulation des EDHF eine Schlüsselrolle ein (Tomioka et al., 2001).

Bei der endothelabhängigen Gefäßrelaxation durch NO und PC dilatiert die glatte Gefäßmuskulatur über auf dieser Muskulatur vorhandene spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Es ist nicht bekannt, ob EDHF diese Kanäle beeinflusst. Jedoch konnte EDHF inhibiert werden, indem Kaliumkanäle blockiert wurden (Bryan et al., 2005). Verschiedene Kalzium-abhängige Kaliumkanäle wurden identifiziert, die durch unterschiedliche Substanzen selektiv inhibiert werden können: Es existieren große, intermediäre und kleine dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanäle. Definitionsgemäß gilt eine Hemmung der EDHF-vermittelten Hyperpolarisation über eine Blockade der beteiligten Kaliumkanäle mittels einer Toxinkombination aus Charybdotoxin und Apamin als charakteristisch (Bryan et al., 2005; Støen et al., 2003). Das dem Skorpion-Gift abstammende Peptid Charybdotoxin hemmt große und intermediäre

Kalzium-abhängige Kaliumkanäle und wird von dem Bienengift Apamin ergänzt, das die kleinen Kalzium-abhängigen Kaliumkanäle inhibiert (Garcia et al., 1991; Sollini et al., 2002). Die Toxine beeinträchtigen nicht die Funktionalität der glatten Gefäßmuskulatur sondern nur die der genannten Kaliumkanäle (Edwards et al., 1998). Burnham et al. fanden heraus, dass die kleinen Kalzium-abhängigen Kaliumkanäle, die durch Apamin blockiert werden können, nur auf Endothelzellen und nicht auf Myozyten vorkommen (2002). Bychkov et al. ergänzen Burnham et al. und beschreiben, dass sowohl die  $SK_{Ca}$  als auch die  $IK_{Ca}$  auf Endothelzellen und vermutlich nicht auf den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur lokalisiert seien (2002; Edwards et al., 2000). Durch die Lokalisation auf dem Endothel kann laut Støen et al. nicht ausgeschlossen werden, ob diese Toxinkombination die NO-Produktion bzw. Freisetzung oder die Aktivität der sogenannten Gap Junctions beeinflusst (2003). Edwards et al. und Bény und Schaad belegen in ihren Versuchen, dass mit ansteigender Kaliumkonzentration im myo-endothelialen Spalt die anliegenden Zellen der glatten Gefäßmuskulatur über die Aktivierung der  $Na^+K^+$ -ATPase hyperpolarisieren und relaxieren (Bény und Schaad, 2000; Edwards et al., 1998).

Selemidis und Cocks benennen einige Unterschiede bezüglich des EDHFs, so haben die kleinen Kalzium-abhängigen Kaliumkanäle beispielsweise in der mittleren Zerebralarterie der Ratte keinerlei Bedeutung, beim Schwein belegen sie hingegen eine Schlüsselfunktion (Selemidis und Cocks, 2007). Um u.a. derartige Gefäß- und Spezies-abhängige Unterschiede möglichst gering zu halten, nahmen wir das Schweineherz als Versuchsobjekt.

EDHF ist bei kleineren Gefäßen wichtiger als bei großen, in denen wiederum hat de novo synthetisiertes NO eine höhere Wertigkeit (Batenburg et al., 2004; Ge und He, 1999; Kajiya et al., 2007). Beim Schwein hat EDHF z.T. sowohl in großen als auch in kleinen Koronararterien eine hervorgehobene Bedeutung (Yang et al., 2003). Der Beitrag des EDHFs als Mechanismus zur endothelabhängigen Relaxation steigt mit abnehmender Gefäßgröße (Busse et al. 2002).

Es ist noch unklar, welcher Mechanismus dem EDHF en detail zu Grunde liegt. Vorgeschlagen wurden bisher die folgenden Mechanismen:

### Möglicher Mechanismus 1:

Epoxygenase, eine Cytochrom P 450 Monooxygenase, kann Arachidonsäure, eine Eikosatetraensäure, in sogenannte EETs (*Epoxyeicosa-trienoic Acids/ Epoxyeicosatriensäuren*) umwandeln; aber auch bei Scherkräften oder pulsatiler Dehnung kann das Endothel EETs ausschütten. Diese EETs diffundieren in die glatte Gefäßmuskulatur und aktivieren die dort befindlichen Kalzium-abhängigen  $BK_{Ca}$ -Kanäle. Es kommt zu einem Kaliumefflux, eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzelle und somit auch eine Dilatation der Arterie folgen (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006; Hernanz et al., 1999).

Alternativ könnten die EETs auch als Schlüsselmessenger, Modulator oder verstärkend im EDHF Mechanismus fungieren, ohne der EDHF selbst zu sein (Bryan et al., 2005; Edwards et al., 2000).

### Möglicher Mechanismus 2:

Auf der glatten Gefäßmuskulatur gibt es verschiedene Kaliumkanaltypen. Einer davon ist der sogenannte „einwärtsgerichtete Kaliumkanal“ (*inwardly rectifying potassium channel*)  $K_{ir}$ .  $K_{ir}$  werden bei einem Anstieg des extrazellulären Kaliums von 4mM auf 8mM aktiviert, und Kalium strömt dem Konzentrationsgradienten folgend aus der glatten Muskelzelle heraus, so dass sich eine Hyperpolarisation und somit Dilatation der Arterie einstellt (Bryan et al., 2005; Busse et al., 2002).

Eine weitere Möglichkeit bezieht die energieabhängigen Ionen-Pumpen: ATPasen mit ein, die unter ATP-Verbrauch drei Natriumionen aus der Zelle heraus und im Gegenzug zwei Kaliumionen in die Zelle hinein transportieren (Bryan et al., 2005; Busse et al., 2002; Hernanz et al., 1999). Aufgrund der Ionenverschiebung entsteht eine Hyperpolarisation. Nicht alle ATPasen können unter physiologischen Bedingungen glatte Gefäßmuskulatur hyperpolarisieren; allerdings existieren zwei ATPase Isoforme, die ausgelöst werden, wenn extrazelluläre Kaliumionen über die Basalkonzentration ansteigen (Bryan et al., 2005; Busse et al., 2002).

### Möglicher Mechanismus 3:

Undurchlässig für Proteine sind Gap Junctions mit ihrer hydrophilen Zentralpore durchgängig für kleine wasserlösliche Moleküle (< 1000 Da), zyklisches AMP (cAMP), zyklisches GMP (cGMP), Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und anorganische Ionen; dabei herrscht gegenüber Kationen eine Selektivität im Vergleich zu Anionen (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006). Die aus Proteinuntereinheiten bestehenden Hemikanäle zweier Zellen verbinden sich miteinander und bilden auf diese Weise eine vollständige Gap Junction. Letztere können über Kalziumionen, Spannung, pH, Phosphorylierung, ATP oder EETs reguliert werden (Bryan et al., 2005). Sie sind sowohl zwischen Endothelzellen, Gefäßmuskelzellen als auch zwischen Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen (*myoendothelial gap junctions*) vorhanden (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006). Die Gap Junctions selbst stellt keinen möglichen EDHF dar, spielen jedoch eine wichtige Rolle bei der Ausbreitung der durch den EDHF hervorgerufenen Hyperpolarisation und somit Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur. Es ist ungeklärt, ob ein bestimmtes Molekül, der EDHF, durch sie hindurch diffundiert oder sich lediglich elektrotonische Ströme in Form von Ionen bzw. eine Hyperpolarisation über diese Kanäle ausbreitet (Bryan et al., 2005; Busse et al., 2002; Félétou und Vanhoutte, 2006). Busse et al. stellen in diesem Zusammenhang die Hypothese eines Kaliumefflux aus der glatten Gefäßmuskulatur durch Gap Junctions in das Endothel und letztlich in den extrazellulären Spalt, wodurch eine ausgeprägte Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur entstehen würde gegenüber einer direkten Diffusion des EDHF vom Endothel in die glatte Gefäßmuskulatur (2002).

### Möglicher Mechanismus 4:

Man geht davon aus, dass bei der Aktivierung von endotheliale NO Superoxid gebildet wird, das entweder spontan oder enzymatisch durch Superoxid-Dismutase zu Hydrogenperoxid reduziert werden kann (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006). Bisher ist nicht definiert, ob H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in die glatten Muskelzellen diffundiert, ob es dort Kalzium- oder ATP-abhängige Kaliumkanäle öffnet, bzw. ob letztere auf Endothelzellen oder auf der glatten Muskulatur lokalisiert sind (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006).

Obwohl die  $H_2O_2$ -Produktion mit zunehmender EDHF-Reaktion ansteigt, wird es als eher schwach relaxierende bzw. hyperpolarisierende Substanz für Arterien und Arteriolen eingestuft (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006). Dabei erhöht Bradykinin die  $H_2O_2$ -Produktion signifikant (Matoba et al., 2003).

$H_2O_2$  kann die durch EDHF hervorgerufene Dilatation nicht immer identisch imitieren (Bryan et al., 2005; Félétou und Vanhoutte, 2006).

#### Möglicher Mechanismus 5:

Das natriuretische Peptid vom C-Typ (CNP) induziert eine Hyperpolarisation und Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur und öffnet Kalzium-abhängige  $BK_{Ca}$ -Kanäle. Obwohl es anfänglich für einen potenten EDHF gehalten wurde, wird es nun eher in Frage gestellt. Die Amplitude und auch Charakteristiken einer Reaktion hervorgerufen durch exogenes CNP an Schweinekoronararterien sind in keiner Weise mit EDHF Dilatationen an diesen Gefäßen vergleichbar (Félétou und Vanhoutte, 2006).

#### **4.1.6 PGF<sub>2α</sub>**

PGF<sub>2α</sub> gehört zu den Prostaglandinen, die durch das Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> aus Arachidonsäure synthetisiert werden und ungesättigte Fettsäuren mit 20 C-Atomen darstellen. Die bedeutendsten Prostaglandine zählen zu den PGF- und zu der PGE-Gruppe. In der Tiermedizin ist PGF<sub>2α</sub> das pharmakologisch wichtigste. Die Prostaglandine spielen v.a. in der Fortpflanzung bei der Luteolyse sowie der Steuerung der Uterusmotilität eine bedeutsame Rolle. Darüberhinaus stellen sie noch Entzündungsmediatoren dar. In diesem Rahmen wirkt PGF<sub>2α</sub> kontrahierend auf den Gefäßtonus (Aurich, 2002).

Endogene Prostaglandine tragen erheblich zur Regulation von Gefäßtonus sowie -widerstand im Koronarkreislauf von wachen Schweinen in Ruhe sowie unter Belastung bei (Merkus et al., 2004). Im Falle einer Hemmung der NO-Synthase Aktivität haben die Prostaglandine eine verstärkte vasodilatative Wirkung im systemischen Kreislauf (Merkus et al., 2004). Daraus ergibt sich, dass die Prostaglandine im systemischen Kreislauf vermutlich ähnlich dem EDHF als eine Art Sicherheitssystem fungieren, falls die Bioverfügbarkeit von NO verringert oder gestört ist (Merkus et al., 2004).

Durch das hinzugefügtes PGF<sub>2α</sub> wurde eine Kontraktion eingeleitet. Wenn die Kurve einen steady state erreichte, d.h. die maximale Kontraktion gemessen wurde, begann die Messung, d.h. die Dilatationsfähigkeit und die prozentuale Größe der Dilatation wurde überprüft, wobei als Referenz die zum Zeitpunkt der ersten Bradykinin-Gabe (BK-Gabe) vorliegende durch PGF<sub>2α</sub> induzierte Kontraktion als 100%-Wert genommen wurde. Die Gefäßweitstellung im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Kurve wurde durch das Hinzufügen von Einzeldosen mit ansteigender BK-Konzentrationen herbeigeführt. Wie in den Untersuchungen von Dagtekin et al., Funcke, Gerbershagen et al., Steinhoff und Weinand wurde nicht die Kontraktionsstärke auf PGF<sub>2α</sub> quantifiziert, sondern als Maß der Dilatationsfähigkeit der Prozentsatz der durch Papaverin ausgelösten maximalen Dilatation ermittelt (Dagtekin et al., 2008 & 2009; Funcke, 2001; Gerbershagen, 2007; Steinhoff, 2004; Weinand, 2010). Diese Vorgehensweise lehnt sich an ein verbreitetes Verfahren an, das schon von Dagtekin et al. als standardisierte Technik beschrieben wird (Dagtekin, 2009).

Die in den Tabellen 8 bis 11 festgehaltenen Werte beschreiben die auf PGF<sub>2α</sub> erfolgte, echte Kontraktion der Koronararterienteilstücke. Sie sind jedoch nicht auf die variable Ringgröße

standardisierbar. Unter L-NNA sind die Kontraktionen deutlich stärker, weil die dilatierende Wirkung von NO aufgehoben wurde und somit eine stärkere Kontraktion auf die gleiche Menge PGF<sub>2α</sub> erfolgt (s. Kap. 4.1.4).

#### **4.1.7 Bradykinin**

Bradykinin ist ein endogenes aus neun Aminosäuren bestehendes Peptid (Kietzmann et al., 2002), das als potenter endogener Vasodilatator u.a. vom ischämischen Myokard freigesetzt wird, und eine bedeutende Rolle innerhalb der Regulierung der koronaren Blutzirkulation bei physiologischen und pathologischen Zuständen einnimmt (Frieden et al., 1999; Zhang et al., 2004). „Roche e Silva entdeckten diese Substanz 1949; einerseits führt sie zu einem systemischen Blutdruckabfall und andererseits ruft sie eine langsame Kontraktion des Darms hervor. Dieser Substanz wurde daher der Name Bradykinin gegeben (griech. *bradys* für langsam, *kinein* für bewegen“ (aus Dahmen, 2009)).

Man unterscheidet B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>-Rezeptoren. Während erstere mit geringerer Bradykininaffinität bei Gewebeschädigung eine Konstriktion von Arterien und Venen auslösen, kann bei durch an G<sub>q</sub>-Protein gekoppelte B<sub>2</sub>-Rezeptoren vermittelte Reaktionen eine konzentrationsabhängige Dilatation beobachtet werden, weil die Bildung von NO durch endotheliale NO-Synthase eingeleitet wird (Batenburg et al., 2004; Malo et al., 2003; Nagao und Vanhoutte, 1992). Bradykinin hat die Fähigkeit, die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur zu hyperpolarisieren (Batenburg et al., 2004). Desweiteren senkt das Autakoid u.a. den peripheren Gefäßwiderstand und erhöht das Minutenvolumen, die Herzfrequenz und das Schlagvolumen (Kietzmann et al., 2002).

NO und/oder NO-enthaltende Faktoren, die konzentrationsabhängig durch BK aus zellulären Depots ausgeschüttet werden, ebenso wie Kalzium-abhängige Kaliumkanäle (BK<sub>Ca</sub><sup>-</sup>, IK<sub>Ca</sub><sup>-</sup>, SK<sub>Ca</sub>-Kanäle) auf den Endothelzellen bzw. die sich auf den glatten Gefäßmuskelzellen befindlichen K<sub>IR</sub>-Kanäle sowie die ebenfalls dort lokalisierte Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase oder auch spannungsabhängige Kaliumkanäle (K<sub>v</sub>) sind an der BK-induzierten Relaxation beteiligt (Batenburg et al., 2004; Berkels et al., 1996; Shimizu und Paul, 1997; Støen et al., 2003).

Durch die BK-Gaben kommt es zu einem Anstieg des NOs, das dann zu der BK-induzierten Relaxierung, d.h. Dilatation und Hyperpolarisation durch den EDHF beiträgt (Ge et al., 2000). Für unseren Versuch gilt, dass wir über das hochdosierte L-NNA die NO-Bildung inhibierten. Zwar kann wohl auch unter diesen Bedingungen durch die BK-Verabreichungen selbst wieder eine geringe Menge NO freigesetzt werden (Ge et al., 2000). Diese ist aber zu klein, um einen Beitrag zur Dilatation zu leisten. Desweiteren agiert bei der Bradykinin induzierten Relaxation vornehmlich EDHF im Vergleich zu NO bzw. Prostazyklin (Matoba et al., 2003).

Nach Gabe aller BK-Konzentrationen während des Messdurchgangs und der dabei maximal erreichten Dilatation beobachteten wir wieder eine Kontraktion. Letzteres erklärt sich durch eine Desensitivierung der B<sub>2</sub>-Rezeptoren. Selbst bei weiteren BK-Gaben hätte die Dilatation nicht gesteigert werden können. Als Folge konnte das noch im Organbad vorhandene PGF<sub>2α</sub> wieder seine Wirkung entfalten, und eine Kontraktion stellte sich erneut ein.

#### **4.1.8 Qualitätssicherung**

Wir verwendeten zur Qualitätssicherung nur Koronarabschnitte, die in der ersten Kontrollmessung mit Bradykinin nicht außerhalb der dreifachen Standardabweichung der Kontrollgruppe lagen, d.h. bei der Messung ohne L-NNA mindestens 50% bzw. bei der Messung mit L-NNA mindestens 30% Dilatation auf eine BK-Konzentration von  $10^{-5}$  aufwiesen. Alle Koronararterienteilstücke, die die beschriebene Mindestdilatation nicht erreichten, gingen nicht in die Auswertung ein. Im zweiten und auch im dritten Messdurchgang fielen die Dilatationswerte bereits in den Versuchen ohne Studiensubstanz kontinuierlich ab. Erreichten die Koronarabschnitte im dritten Messdurchgang eine Dilatation von unter 10%, wurden auch diese Gefäßringe von der Statistik ausgeschlossen, weil das Endothel nicht mehr physiologisch arbeitete. Der erste und dritte Messdurchgang sollten ursprünglich als gemeinsame Kontrolle für den zweiten Messdurchgang, der mit Zusatz von Studiensubstanz erfolgte, verwendet werden. Durch die Beobachtung der kontinuierlich schwächer ausfallenden Dilatation, nahmen wir von dieser ursprünglichen Planung Abstand und entschieden uns, eine statistische Auswertung und Signifikanzberechnung für die Wirkung der Studien-substanzen im zweiten Messdurchgang jeweils nur gegenüber dem zweiten Messdurchgang in der Kontrollgruppe ohne Studiensubstanz durchzuführen, obwohl ein individueller Vergleich besonders attraktiv gewesen wäre. Eine mögliche Ursache für diese abfallende Dilatation könnte in der offensichtlich in vitro stattfindenden Alterung der Gefäßabschnitte liegen.

Eine weitere Stufe zur Qualitätssicherung lag in den beiden KCl-Gaben vor den drei Messdurchgängen, auf die eine massive Kontraktion erfolgte. Wurde letztere nicht beobachtet, konnte von einer Schädigung des Endothels bzw. einer Beeinträchtigung seiner Funktionalität ausgegangen werden, und die betroffene Koronararterie kam nicht in die statistische Auswertung. Nach Bestehen dieser vielen einzelnen „Kontrollpunkte“ zur Sicherung der Qualität des Versuches konnten insgesamt 426 Gefäßringe von 608 Koronararterienteilstücken bzw. aus 135 verschiedenen Herzkranzgefäßen statistisch ausgewertet werden. Die 182 verworfenen Gefäßringe kamen nicht in die Auswertung, weil sie entweder anfänglich nicht auf die KCl-Gabe kontrahierten bzw. keine Kontraktion auf  $\text{PGF}_{2\alpha}$  zeigten, nicht mindestens 50% in der EDR bzw. 30% in der Dilatation unter dem EDHF erreichten oder im letzten Messdurchgang unter 10% Dilatation blieben.

Zur Standardisierung der Messbedingungen wurde zwischen den Messdurchgängen jeweils dreimal mit 10ml KH-Lösung inkubiert, um die im vorhergehenden Lauf zugegebenen Substanzen (Indometacin, L-Arg bzw. L-NNA,  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , BK) zu entfernen; dann wurde die Einstellung eines „steady state“ unter fortwährender Dehnung mit 2g abgewartet.

Nach dem dritten Messdurchgang wurde die nicht auf erhaltener Endothelfunktion beruhende Gefäßdilatation durch Natriumnitroprussid und die nachfolgende muskuläre Relaxation durch Papaverin genutzt, um den maximalen Relaxationsgrad der Koronarabschnitte mit dem Relaxationsniveau zu Beginn der Messdurchgänge vergleichen zu können.

#### **4.1.9 Natriumnitroprussid**

Natriumnitroprussid (auch Nitroprussid-Natrium, Abkürzung: SNP), mit dem Synonym Nitrosylpentacyano-ferrat, ist das Salz, und somit die trockene und feste Form des Nitroprussids, einem direkten Vasodilatator, der zur Blutdrucksenkung eingesetzt wird (Daunerer, 1986; Steinhoff, 2004; Tinker und Michenfelder, 1976). SNP als Wirkstoff aus der Gruppe der Cyanide wird dementsprechend zur Blutdrucksenkung verwendet (Daunerer, 1986; Khot et al., 2003). In unserem Versuch haben wir es nach dem dritten Messdurchgang zur Dilatation verwendet (s. Kap. 2.8, Abb. 2). Die Substanz ist sehr lichtempfindlich und muss als Lösung immer frisch zubereitet werden, weil sie ansonsten durch Lichteinwirkung oxidiert und somit in ihrer Wirkung eingeschränkt wird (Khot et al., 2003; Sponer, 2002). Selbst unter Lichtausschluss ist die frisch angesetzte Lösung nicht länger als vier Stunden haltbar (Löscher und Ungemach, 2006). Letzteres bildet einen weiteren Nachteil für den Einsatz von SNP anstelle des BKs.

SNP wirkt an der glatten Muskulatur der Gefäße und dilatiert Arterien und Venen über einen endothelunabhängigen Weg. Es wird als NO-Donor bezeichnet, da spontan drei NO-Moleküle aus seinem Komplex freigesetzt werden (Mc Gowan et al., 1994; Selemidis und Cocks, 2007; Steinhoff, 2004).

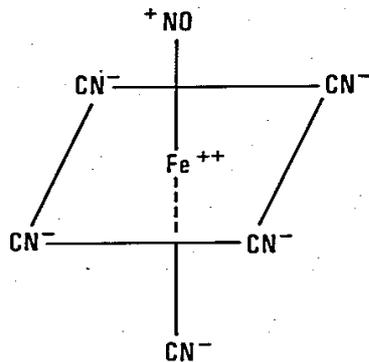


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Moleküls – Natriumnitroprussid nach Tinker und Michenfelder, 1976

Nach Anwendung kommt es zu einer fast-maximalen lokalen Relaxation (Selemidis und Cocks, 2007). Diese endothelunabhängige Dilatation durch SNP ist somit NO vermittelt und dadurch cGMP-abhängig (Doss et al., 1995; Gendron et al., 2004; Mc Gowan et al., 1994; Thollon et al., 2002).

#### **4.1.10 Papaverin**

Wie oben bereits beschrieben, wurde Papaverin zur Erzielung einer maximalen Dilatation am Ende der Messungen eingesetzt (s. Kap. 2.8, Abb. 2), um auf der Basis der maximalen Dilatation vor Beginn und am Ende der Messungen den prozentualen Dilatationsgrad nach der Bradykiningabe in den Messdurchgängen ermitteln zu können. Wir erreichten diesen maximalen Dilatationsgrad des Koronarringes bei der von uns gewählten Konzentration im Organbad von  $0,21\mu\text{mol/l}$ .

Papaverin, das zu den toxischen und betäubenden Alkaloiden zählt, ist zu ca. 1% im Rohopium enthalten und wird als Extrakt aus der Schlafmohnpflanze (*Papaver somniferum*) gewonnen. Die lipophile Substanz gilt als unspezifisches, aber sehr potentes muskulotropes Spasmolytikum, das unabhängig vom Endothel vasodilatativ auf das Koronarsystem wirkt.

Durch Inhibition der Phosphodiesterase führte Papaverin zu einer vollständigen Dilatation der Koronarringe. Phosphodiesterase ist ein intrazelluläres Enzym, das den Abbau von cAMP und cGMP bewirkt, indem es sie hydrolysiert (Martin et al., 1986; Sponer, 2002). Die Phosphodiesterase-Hemmer inhibieren diese Hydrolyse.

## **4.2 Darstellung und Vergleich der Testergebnisse**

Im intraindividuellen Vergleich des ersten mit dem zweiten Messdurchgang bei den Kontrollversuchen kam es immer zu einem signifikanten Abfall des Relaxationsgrades, berechnet mit dem t-Test. Aufgrund dieser systematischen Verschiebung wählten wir für die Auswertung der Ergebnisse nur noch die Werte der zweiten Messdurchgänge unter Einfluss der Kolloide und die aus den zweiten Messdurchgängen der Kontrollgruppe. Da es sich hierbei um den Vergleich mit mehreren Konzentrationsstufen der Kolloide handelte, mussten wir einen Test mit Mehrgruppenvergleich anwenden, den Student-Newman-Keuls Test. In beiden Fällen wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p \leq 0,05$  angenommen.

### **4.3 Plasmaexpander – die verwendeten Studiensubstanzen**

Die von uns in dieser Studie verwendeten Plasmaexpander: HES (200/0,5), Dextran und Gelatine in Form von Gelatinepolysuccinat führten alle zu einer geringer ausgeprägten Vasodilatation gegenüber der Kontrolle. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede bei einer getrennten Betrachtung der EDR bzw. EDHF Dilatationen v.a. unter Hinzunahme der Veränderung nach der Konservierung. Die Ergebnisse der Konservierung erweiterte das aus ähnlichen Arbeiten erlangte Wissen, wie die Studien von Dahmen, Dahnken, Funcke, Gerbershagen, Naglo-Dünner und Weinand, und gibt die Möglichkeit zu neuen Überlegungsansätzen im Rahmen von Herztransplantationen (Dahmen, 2009; Dahnken, 2007; Funcke, 2001; Gerbershagen, 2007; Naglo-Dünner, 2010; Weinand, 2010).

In unserer Studie wurde systematisch die Dilatationsfähigkeit von Koronararterienringen vor und nach Organkonservierung unter dem Einfluss von Pharmaka im Vergleich zu den Kontrollen ohne Pharmaka überprüft. Dabei lehnte sich unser Versuchsablauf u.a. an die Dissertation von Steinhoff an, in der die Dilatationsfähigkeit der großen porcinen Koronarien unter dem Einfluss von Trasyolol überprüft wurde, wobei die endothelabhängige Vasorelaxation aus dem prozentualen Anteil der Substanz P (anstelle der Bradykinin-Verdünnungsreihe) Dilatation an der PGF<sub>2α</sub> Kontraktion errechnet wurde (Steinhoff, 2004). Ähnlich haben auch Dagtekin et al. und Gerbershagen et al. unter dem Einfluss des Pharmakons Pancuronium die EDHF-vermittelte Relaxation von Koronararterien im Vergleich zu der EDR an porcinen und bovinen Gefäßen untersucht, und als Maß ebenfalls den prozentualen Anteil der durch Bradykinin bzw. Acetylcholin hervorgerufenen Dilatation an der PGF<sub>2α</sub> Kontraktion gewählt (Dagtekin, 2008; Gerbershagen, 2007). Fischer und Bosse et al. wendeten zur Überprüfung der Integrität des Endothels, die eine unabdingbare Voraussetzung für die Herztransplantation darstellt, die gleiche Methode an wie wir in unserer Studie mit den Kontrollversuchen (Bosse et al., 2002; Fischer, 2011). In diesem Zusammenhang spielte die Konservierung bzw. der Erhalt der Organfunktionalität nach Konservierung eine bedeutende Rolle, damit beispielsweise ein Spenderherz auch trotz eines erforderlichen Transportes zu dem Empfänger keinen Nachteil bezüglich seiner Physiologie erfährt (Bosse et al., 2002; Fischer, 2011).

Dagtekin et al. untersuchen bereits 2008 den Effekt des Plasmaexpanders HES auf den EDHF und die EDR an porcinen Koronararterien; dabei betonten sie, dass kaum Literatur bezüglich der Wirkungen von HES auf die endotheliale Funktion vorhanden sei, weil die meisten

Autoren die anti-inflammatorischen Eigenschaften des Kolloids untersucht haben (2008). Ähnlich beschreiben sie in ihrer Veröffentlichung 2010, dass keine Daten über die Wirkung von Gelatine auf die EDR publiziert seien und sich Untersuchungen immer auf inflammatorische Veränderungen und endotheliale Dysfunktionen bezögen (2010).

Dagtekin et al. kommen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass HES im Bereich der epikardialen Koronararterien des Schweines eine signifikante Reduktion in der EDR und besonders des EDHF herbeiführt (2008). Sie nutzten für ihre Studien HES in einer 6mg/ml Konzentration, weil diese auch in der Klinik eingesetzt wird.

Die jeweilige Konzentration der Plasmaexpander spielte bezüglich der Verringerung der Gefäßerweiterung mit Erreichen des Signifikanzniveaus in unserer Studie keine bedeutende Rolle. Ähnlich fasst Vincent zusammen, dass die Intensität bzw. die Flüssigkeitssubstitution mit Plasmaersatzstoffen an sich möglicherweise eine viel größere Bedeutung hat als der eigentlich verwendete Plasmaexpander, wenn auch allen voran HES viele wirkungsvolle vaskuläre Effekte aufweist wie beispielsweise die anti-inflammatorische Wirkung von HES-Lösungen (2007). Vincent benennt u.a. die Wiederherstellung der Makrophagenfunktion, die Verhinderung der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an entzündetem Endothel oder die Abschwächung der durch Hypoxie hervorgerufenen Gefäßundichtigkeit bzw. die Milderung akuter Entzündung (Vincent, 2007). Dabei betont er, dass die Ursache der vaskulären Effekte wohlmöglich nicht der Natur von HES zugrunde liegen sondern als Vorteil der Flüssigkeitssubstitution selbst angesehen werden müssen.

In unserer Studie führte Gelatine in allen Konstellationen tendenziell zu der heftigsten Beeinträchtigung während Dextran den geringsten Einfluss hinsichtlich einer Rechtsverschiebung nahm. Obwohl Gelatine einige Vorzüge im Rahmen ökonomischer Gesichtspunkte innehat und auch die Blutgerinnung nicht beeinflusst, werden diesem Kolloid doch vermehrt anaphylaktische Reaktionen nachgesagt als vergleichsweise Stärkelösungen (Bothner et al., 1998; Klotz und Kroemer, 1987). Diese anaphylaktischen Reaktionen und eine kurze intravasale Halbwertszeit limitieren den Einsatz dieses Kolloids erheblich (Klotz und Kroemer, 1987). Wird es dennoch verwendet, kommen drei verschiedene chemisch modifizierte Varianten in Frage u.a. die von uns verwendete Flüssiggelatine in Form des Gelatinepolysuccinats (Klotz und Kroemer, 1987). Gelatine zeigte in der frischen EDR für alle Konzentrationen eine Tendenz zur Verringerung der Dilatation, die v.a. bei der 20mg/ml

Konzentration für die hohen BK-Konzentrationen  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  das Signifikanzniveau erreichten. In den frischen EDHF Versuchen wiederholte sich dieses Bild mit zusätzlichen signifikanten Ergebnissen bei der höchsten BK-Konzentration  $10^{-5}$  für die 5 und 10mg/ml Konzentration. Die Tendenz bezüglich einer Minimierung der Dilatation wurde auch bei HES beobachtet, jedoch konnte das Signifikanzniveau in der frischen EDR bei BK  $10^{-7}$  erreicht werden und für die 5mg/ml Konzentration auch für BK  $10^{-8}$ . In einer Studie an Ratten von Feng et al. konnte nach Verabreichung von HES bzw. Gelatine kein maßgeblicher Unterschied bezüglich der hämodynamischen Stabilität beobachtet werden; eindeutig war der arterielle Blutdruck in beiden Gruppen gleich (2007). In der Dilatation frischer Koronarien über den EDHF konnten ähnlich den Versuchen mit Gelatine für HES nur bei BK  $10^{-5}$  signifikante gegenüber den Kontrolluntersuchungen veränderte Werte ermittelt werden. Die frischen Koronarien wiesen in der EDR unter dem Einfluss von Dextran für die beiden geringeren Konzentrationen nur für BK  $10^{-7}$  und  $10^{-6}$  signifikante gegenüber den Kontrolluntersuchungen veränderte Werte auf und in dem EDHF bei den höheren BK  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  für die 20mg/ml bzw. für die 10mg/ml Konzentration bei BK  $10^{-6}$ . Senken die synthetischen Kolloide die Vasodilatation, würde auf den lebenden Organismus übertragen der Blutfluss nicht in dem Maße steigen wie bei einer reinen Flüssigkeitssubstitution, bei uns vergleichbar mit dem Kontrolldurchgang ohne Substanz, und der Blutdruck würde nicht derart gesenkt sondern könnte unter Einsatz von Dextran eventuell sogar konstant gehalten werden.

In diesem Zusammenhang wurde in der EDR mit konservierten Herzkranzgefäßen eine interessante Beobachtung gemacht: Tendenziell verliefen die Kurven nach Zugabe der unterschiedlichen Kolloide fast deckungsgleich mit der Kurve aus dem Versuch ohne Zugabe einer Studiensubstanz. Die zuvor bei den frischen Koronarien beobachtete Herabsenkung der Dilatation durch die Plasmaexpander wurde durch die Konservierung derart kompensiert, dass nun auch die Werte aus der Kontrolle deutlich geringer ausfielen und der Abschwächung durch die synthetischen Kolloide gleichkam. Aufgrund dieses fast deckungsgleichen Verlaufs der Kurven wurde bei keinem Plasmaexpander das Signifikanzniveau erreicht außer für die 20mg/ml Konzentration von HES für BK  $10^{-7}$  und  $10^{-6}$ . Hier verlief die Kurve tendenziell entlang höherer Dilatationswerte gemessen in Prozent. Der Graph könnte derart interpretiert werden, dass bei der hohen HES-Konzentration das Kolloid die Dilatation nicht, wie sonst immer beobachtet, abschwächte sondern sogar stabilisierte und verstärkte. Diese Überlegungen müssten in einer speziellen Versuchsreihe überprüft werden. Das Molekulargewicht der von uns eingesetzten HES lag bei 200.000 Dalton (200/0,5) (Sommermeyer et al.,

1987; Weidler et al., 1991). HES ähnelt von der Struktur der in der Leber gespeicherten Stärke Glykogen, das aus Glucose aufgebaut ist und im tierischen bzw. menschlichen Organismus zur kurz- bzw. mittelfristigen Speicherung und Bereitstellung dieses Energieträgers dient. Insgesamt zeigt HES aufgrund der glykogenartigen Molekularstruktur ein geringes Risiko unerwünschter Arzneimittelnebenwirkungen, so dass laut Brickman et al. sowie Maurer und Berardinelli HES bei Tier und Mensch nicht bzw. kaum immunogen wirkt (1966; 1968; Dieterich et al., 1998). Laxenaire et al. führten an etwa 20.000 Patienten eine multizentrische Vergleichsstudie durch. Dabei hob sich HES gegenüber anderen Kolloiden als Therapeutikum insofern ab, dass nach Verabreichung nur zu 0,058% anaphylaktische Reaktionen und somit die geringste Anzahl an unerwünschten Nebenwirkungen ausgelöst wurden (Laxenaire et al., 1994). Ring und Messmer hielten fest, dass alle verfügbaren Kolloide immer als Nebenwirkung das Risiko möglicher anaphylaktischer Reaktionen bergen. Gefährliche Beeinträchtigungen wie Schock, Herz- bzw. Atemstillstand konnten zu 0,006% bei HES, zu 0,008% bei Dextran und zu 0,038% bei Gelatinelösungen festgestellt werden (Ring und Messmer, 1977). Wir können somit festhalten, dass schwere anaphylaktische Reaktionen unter HES gefolgt von Dextran deutlich seltener auftreten als unter Gelatine.

Die Dilatation durch den EDHF war auch bei den konservierten Herzkranzgefäßen gegenüber der Kontrollkurve deutlich geringer ausgeprägt. Tendenziell kamen die Gefäßringe unter der Einwirkung der verschiedenen Plasmaexpander etwa auf die Hälfte (Gelatine) der Dilatation gegenüber den Kontrollwerten ohne Studiensubstanz, wobei Gelatine in der hohen Konzentration für BK  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  das Signifikanzniveau gegenüber der Messung ohne Studiensubstanz erlangte. Bei den Messdurchgängen mit HES konnte in der niedrigsten HES Konzentration ebenfalls für BK  $10^{-6}$  und  $10^{-5}$  das Signifikanzniveau gegenüber der Messung aus dem Kontrollversuch erreicht werden. In dieser Versuchskonstellation war unter dem Einfluss von Dextran im Vergleich zu den beiden anderen synthetischen Kolloiden tendenziell die geringste Beeinträchtigung der Dilatation zu erkennen.

Bunn und Ashraf halten fest, dass sich kein Kolloid in Bezug auf eine höhere Wirksamkeit bzw. Sicherheit bezogen auf Tod, Menge an Vollblut-Transfusionen bzw. Vorfälle unerwünschter Nebenwirkungen hervorhebt, und die klinisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kolloiden innerhalb des Konfidenzintervalls liegen (2008).

Abschließend konnten wir von einem deutlichen Einfluss der Plasmaexpander: HES, Dextran und auch Gelatine auf die endotheliale Funktion bzw. auf endothelabhängige, vasoaktive Faktoren an den Herzkranzgefäßen von Schweinen ausgehen. Die Ergebnisse zeigten sowohl für die EDR als auch den EDHF eine eindeutige Tendenz hinsichtlich einer Rechtsverschiebung, die durch signifikante Unterschiede immer wieder betont wurde.

## **5 Zusammenfassung**

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Plasmaexpandern (HES, Dextran, Gelatine) auf die endothelabhängigen, vasoaktiven Faktoren (EDHF/NO) an der rechten Herzkranzgefäßarterie von Schweinen zu untersuchen. Das Endothel ist an der Regulation des kontraktile Status der glatten Gefäßmuskulatur beteiligt und kann u.a. über den vom Endothel stammenden Relaxierungsfaktor (EDRF), Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und den EDHF eine Dilatation herbeiführen. Das Probenmaterial (Herzkranzgefäße) wurde von gerade geschlachteten Hausschweinen während eines normalen Schlachtvorganges entnommen, später im Labor in 5mm lange Gefäßringe geschnitten und dann in der Versuchsanordnung die Kontraktion/Dilatation gemessen und dokumentiert. Jeder Gefäßring durchlief jeweils drei Messdurchgänge: dabei wurde die EDR mit der Relaxation über den EDHF verglichen; einerseits im Kontrollversuch ohne Studiensubstanz und andererseits in den Versuchen mit Zusatz der Studiensubstanzen. Das Gleiche wurde nach einer 24stündigen Konservierung erneut mit neuen Koronararterienteilstücken durchgeführt. In den Kontrollversuchen zeigten sich fast ausschließlich signifikante Unterschiede in dem intraindividuellen Vergleich des ersten Messdurchgangs mit dem zweiten, bei dem tendenziell eine Reduktion der Dilatationsfähigkeit beobachtet wurde. Bei allen Gefäßteilstücken konnten im Rahmen der EDR höhere Werte abgelesen werden als bei der Relaxation über den EDHF, da bei der EDR sowohl NO als auch der EDHF beteiligt sind, und bei der EDHF-abhängigen Dilatation die NO-Synthase inhibiert wurde. In den Versuchen mit den frischen Koronargefäßen war während der ersten Messdurchgänge die Dilatation stärker als bei den konservierten Gefäßringen. Die drei Kolloide führten unabhängig von ihrer jeweiligen Konzentration im zweiten Messdurchgang zu einer geringer ausgeprägten Dilatationskurve gegenüber den Kontrollversuchen; tendenziell war dieser Einfluss am deutlichsten unter Gelatine während mit Dextran die geringste Beeinträchtigung abzulesen war. In der EDR fand durch die Plasmaexpander eine Kompensation statt, deutlich an dem fast deckungsgleichen Kurvenverlauf der Kontrolle mit den Kurven mit Studiensubstanz: Die Mittelwerte der Kontrollversuche erreichten nach der Konservierung nicht mehr so hohe Werte wie bei den frischen Gefäßringen; mit den Studiensubstanzen fand tendenziell keine derart massive Reduktion wie durch die Konservierung statt. Eine ähnliche Kompensation konnte beim EDHF nicht beobachtet werden. Wir können von einem deutlichen Einfluss der Plasmaexpander auf die endotheliale Funktion der porcinen Herzkranzgefäßen ausgehen mit einer eindeutigen Tendenz hinsichtlich einer Reduktion der Dilatationsfähigkeit sowohl für die EDR als auch für den EDHF, immer wieder betont durch signifikante Unterschiede.

## **6 Summary**

The intent of this dissertation was to investigate the effects of plasmaexpanders (Hydroxyethylstarch, Dextran and Gelatine) on endotheliumdependent, vasoactive factors especially EDHF and NO in the right coronary artery of pigs. The endothelium is involved in the regulation of the vascular smooth muscle contractile state and has the ability to cause a dilation by the Endothelium derived relaxing factor (EDRF), Prostacyclin and the EDHF. The organic samples in the form of the coronary arteries were cut out of just slaughtered pigs during a usual slaughter procedure at the slaughterhouse, later on in the laboratory they were cut into 5mm long rings clamped in the organ bath of the experimental set-up and contraction/dilation were measured and documented. Each coronary ring went through three testings in which we compared the EDR with the relaxation by the EDHF; on one hand in the control group without plasmaexpanders and on the other hand in the experiments with added colloids. This experiment procedure was repeated after a 24hour preservation of the coronary arteries with newly cut rings. Almost exclusively significant differences could be observed between the first and second testing within the intraindividual comparison of the control group. Hereby the graph of the second testing tended to a reduction of the ability of dilation. Regarding the dilation of all coronary rings higher results for the EDR could be ascertained in comparison to the relaxation due to the EDHF. The latter depends on a participation of both NO and EDHF in the EDR and because of the NO-synthase inhibition within the EDHF depending dilation. When comparing the first testings of the experiment with the fresh coronary arteries the dilation was more obvious than for the preserved vessel rings. The experiments showed a reduction for all three colloids independent to their particular concentration in the second experiment procedure when compared to the graphs of the control group; by trend this became most obvious for Gelatine while the least impact was obtained under the influence of Dextran. A compensation by the colloids could be detected for the EDR, verified by the almost congruent behaviour of the control group with the graphs with colloids. The averages of the control group were not as high after the preservation as the ones of the fresh coronary artery rings; when applying the colloids the massive impairment due to the preservation tended to be reduced. A similar compensation for the EDHF could not be detected. We can determine a considerable influence of plasmaexpanders on the endothelial function in the coronary arteries of pigs with a distinct tendency in terms of a reduction of the ability to dilate as well for the EDR as for the EDHF emphasized by various significant findings.

## Quellenverzeichnis

Adams HA (2007):

Mythen und Fakten des Volumenersatzes, Deutsche Akademie für Anästhesiologische Fortbildung

Archer SL, Huang JMC, Hampl V, Nelson DP, Shultz, PJ (1994):

Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase, Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 91, Aug 1994: 7583-7587

Aurich JE (2002):

Endokrinpharmakologie, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin; Parey, Stuttgart: 300-302

Batenburg W, Popp R, Fleming I, de Vries R, Garrelds IM, Saxena PR, Danser AHJ (2004):

Bradykinin-induced relaxation of coronary microarteries: S-nitrosothiols as EDHF?, British Journal of Pharmacology (2004) 142: 125-135

Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I, Busse R (1996):

Nitric Oxide Attenuates the Release of Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor, American Heart Association, Circulation. 1996; 94: 3341-3347

Bauersachs J, Christ M, Ertl G, Michaelis UR, Fisslthaler B, Busse R, Fleming I (2002):

Cytochrome P450 2C expression and EDHF-mediated relaxation in porcine coronary arteries is increased by cortisol, Cardiovascular Research 54 (2002): 669-675

Bény JL, Schaad O (2000):

An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries, British Journal of Pharmacology (2000) 131: 965-973

Berkels R, Bertsch A, Breitenbach T, Klaus W, Rösen R (1996):

The calciumantagonist nifedipine stimulates endothelial NO release in therapeutical concentrations, Pharm Pharmacol Lett 6 (1996) 2: 75-78

Berkels R, Suerhoff S, Roesen R, Klaus W (2000):

Nitric Oxide causes a cGMP-independent intracellular Calcium rise in Porcine Endothelial Cells – A Paradox?, *Microvascular Research* 59, (2000): 38-44

Bosse M, Dahnken S, Fischer JH (2002):

Preserved endothelial function of large and small coronary vessels after prolonged storage including coronary oxygen persufflation, *Proceedings 37th Congress ESSR*, Monduzzi Editore, Bolgona 2002: 209-217

Bothner U, Georgieff M, Vogt NH (1998):

Assessment of the safety and Tolerance of 6% Hydroxyethyl Starch (200/0,5) Solution: a randomized, controlled epidemiology study, *Anesth Analg* 1998; 86: 850-5

Brickman RD, Murray GF, Thompson WL, Ballinger FW (1966):

The antigenicity of hydroxyethyl starch in humans. Studies in seven normal volunteers, *JAMA* 198: 139

Bryan RM Jr, You J, Golding EM, Marelli SP (2005):

Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor - A Cousin to Nitric Oxide and Prostacyclin, *Anesthesiology*, V 102, No 6, Jun 2005: 1261-77

Budel S, Schuster A, Stergiopoulos N, Meister JJ, Bény JL (2001):

Role of smooth muscle cells on endothelial cell cytosolic free calcium in porcine coronary arteries, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1156-H1162, 2001

Bunn FTD, Ashraf S (2008):

Colloid solutions for fluid resuscitation, *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2008: CD001319

Burnham MP, Bychkov R, Félétou M, Richard GR, Vanhoutte PM, Weston AH, Edwards G (2002):

Characterization of an apamin-sensitive small-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel in porcine coronary artery endothelium: relevance to EDHF, *British Journal of Pharmacology* (2002) 135:1133-1143

Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH (2002):  
EDHF: bringing the concepts together, *TRENDS in Pharmacological Sciences*, Vol. 23, No. 8, Aug 2002: 374-380

Bychkov R, Burnham MP, Richards GR, Edwards G, Weston AH, Félétou M, Vanhoutte PM (2002):  
Characterization of a charybdotoxin-sensitive intermediate conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in porcine coronary endothelium: relevance to EDHF, *British Journal of Pharmacology* (2002) 137: 1346-1354

Carrier GO, Fuchs LC, Winecoff AP, Giulumian AD, White RE (1997):  
Nitrovasodilators relax mesenteric microvessels by cGMP-induced stimulation of  $Ca$ -activated  $K$  channels, *Am J. Physiol* 27: H76

Chan ECH, Woodman OL (1999):  
Enhanced role for the opening of potassium channels in relaxant responses to acetylcholine after myocardial ischaemia and reperfusion in dog coronary arteries *Br J Pharmacol*, 126(4): 925–932, 1999

Dagtekin O, Gerbershagen HJ, Witzel J, Klisa MAK, Fischer JH (2008):  
Effects of pancuronium on the EDHF relaxation in porcine coronary arteries, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2008; 102 Suppl. 1, P21-57

Dagtekin O, Krep H, Fischer JH (2008):  
Hydroxyethyl Starch inhibits endothelium-derived relaxation in porcine coronary arteries, *Pharmacology* 2008; 81: 241-245

Dagtekin O, Gerbershagen HJ, Özgür E, Gaertner J, Fischer JH (2009):  
Effects of Thiopental on Endothelium-dependent Relaxation in Porcine Coronary Arteries, *The Journal of International Medical Research* 2009; 37: 1011-1017

Dagtekin O, Klisa MAK, Gerbershagen HJ, Hanke M, Krep H, Teschendorf P, Fischer JH (2010):

Effects of Hydroxyethyl Starch, Gelatin and Dextran on Endothelium-Derived Relaxation in Porcine Coronary Arteries, *Pharmacology* 2010; 86: 267-272

Dahmen D (2009):

Auswirkung der Blutreperfusion nach normothermer Ischämie und hypothermer Konservierung auf die endothelabhängige Relaxation der epikardialen Koronararterien des Schweins, Dissertation Gießen

Dahnken S (2007):

Endothelabhängige Dilatation von Kaninchencoronarien nach hypothermen Konservierungsverfahren mit und ohne Sauerstoffpersufflation, Dissertation Hannover

Dauderer (1986):

Klinische Toxikologie-21. Erg.-Lfg. 10/86: 1

Dieterich HJ, Kraft D, Sirtl C, Laubenthal H, Schimetta W, Pölz W, Gerlach E, Peter K (1998):

Hydroxyethyl Starch Antibodies in humans: Incidence and Clinical relevance, *Anesth Analg* 1998; 86: 1123-6

Doss ND, Estafanous FG, Ferrario CM, Brum JM, Murray PA (1995):

Mechanism of Systemic vasodilation during normovolemic Hemodilution, *Anesth Analg* 1995; 81: 30-4

Dung NM, Dy NPJ, Tam DTH, Loan HT, Chau HTT, et al. (1999):

Fluid Replacement in Dengue Shock Syndrome: a randomized, double-blind Comparison of four intravenous-fluid regimens, *Clinical Infectious Diseases* 1999; 29: 787-94

Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, Weston AH (1998):

K<sup>+</sup> is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries, *Nature*, 396: 269-272

Edwards G, Thollon C, Gardener MJ, Félétou M, Vilaine J-P, Vanhoutte PM, Weston AH (2000):

Role of gap junctions and EETs in endothelium-dependent hyperpolarization of porcine coronary artery, *British Journal of Pharmacology* (2000) 129: 1145-1154

Ehler WJ, Mack JW Jr, Brown DL, Davis RF (1985):

Avoidance of malignant hyperthermia in a porcine model for experimental open heart surgery, *Lab Anim Sci* (1985) 35(2): 172-5

Farmer SG, Burch RM (1992):

Biochemical and molecular pharmacology of kinin receptors, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 32: 511-536

Félétou M, Vanhoutte PM (2006):

Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor – Where are we now?, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26: 1215-1225

Feng X, Liu J, Yu M, et al. (2007):

Hydroxyethyl starch, but not modified fluid gelatin, affects inflammatory response in a rat model of Polymicrobial sepsis with capillary leakage, *Anesth Analg* 2007; 104: 624-30

Fischer JH, Funcke C, Yotsumoto G, Jeschkeit-Schubbert S, Kuhn-Régnier F (2004):

Maintenance of physiological coronary endothelial function after 3.3 h of hypothermic oxygen persufflation preservation and orthotopic transplantation of non-heart-beating donor hearts, *Eur J Cardiothorac Surg* 25: 98-104

Fischer JH (2011):

Methods of Cardiac Oxygen Persufflation. In: *Methods of Bioengineering: Organ preservation and reengineering*, Eds. Korkut Uygun and Charles Y. Lee, Artech House Boston, London 2011: 105-126

Fleming I, Fisslthaler B, Michaelis UR, Kiss L, Popp R, Busse R (2001):

The coronary endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) stimulates multiple signaling pathways and proliferation in vascular cells, *Eur J Physiol* (2001), 442: 511-518

Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H (1994): Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions, Hypertension 23: 1121

Frieden M, Sollini M, Bény JL (1999): Substance P and bradykinin activate different types of  $K_{Ca}$  currents to hyperpolarize cultured porcine coronary artery endothelial cells, Journal of Physiology (1999), 519.2: 361-371

Funcke CB (2001): Restitution warmischämisch vorgeschädigter Schweineherzen nach verschiedenen Konservierungsverfahren und orthotoper Transplantation, Dissertation Hannover

Furchgott RF (1998): Endothelium-derived relaxing Factor: Discovery, Early studies, and identification as nitric oxide, Nobel Lecture, Dec 1998

Furchgott RF, Vanhoutte PM (1989): Endothelium-derived relaxing and contracting factors, The FASEB Journal, Vol. 3 July 1989: 2007-2018

Garcia ML, Galvez A, Garcia-Calyo M, King VF, Vasquez J, Kaczorowski GJ (1991): Use of toxins to study potassium channels, J Bioenerg. Biomembr., 23: 615-646

Ge ZD, He GW (1999): Altered endothelium-derived Hyperpolarizing Factor-mediated endothelial function in coronary microarteries by St Thomas' Hospital solution, The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Vol. 118, No 1: 173-180, 1999

Ge ZD, Zhang XH, Fung PCW, He GW (2000): Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation resistance to  $N^G$ -nitro-L-arginine and indomethacin in coronary circulation, Cardiovascular Research 46 (2000): 547-556

Gendron ME, Thorin E, Perrault LP (2004):

Loss of endothelial  $K_{ATP}$  channel-dependent, NO-mediated dilation of endocardial resistance coronary arteries in pigs with left ventricular hypertrophy, *British Journal of Pharmacology* (2004) 143: 285-291

Gerbershagen HJ, Dagtekin O, Witzel J, Fischer JH (2007):

Einfluss von Pancuronium auf die Acetylcholin- und Bradykinin-induzierte EDHF-vermittelte Relaxation von Koronararterien – Untersuchungen an Rindern, 37.. Bayerische Anästhesitage, 5.-6. Oktober 2007 München, Poster 22

Ghanem NS, Assem ES, Leung KB, Pearce FL (1988):

Cardiac and renal mast cells: morphology, distribution, fixation and staining properties in the guinea pig and preliminary comparison with human, *Agents Actions* (1988) 23(3-4): 223-6

Golding EM, Kepler TE (2001):

Role of estrogen in modulating EDHF-mediated dilatations in the female rat middle cerebral artery, *Am J Physiol* 280: H2417-23, 2001

Gonzales RJ, Krause DN, Duckles SP (2004):

Testosterone suppresses endothelium-dependent dilation of rat middle cerebral arteries, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 286: H552-60, 2004

He GW (1998):

Effect and mechanism of cardioplegic arrest on the coronary endothelium-smooth muscle interaction, *Clinical and experimental Pharmacology and Physiology* (1998) 25: 831-835

He GW (1998):

Potassium-Channel Opener in Cardioplegia may restore coronary endothelial function, *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 1318-1322

Hellstrand P, Johansson B, Norberg K (1977):

Mechanical, Electrical, and Biochemical Effects of Hypoxia and Substrate Removal on Spontaneously Active Vascular Smooth Muscle, *Acta Physiologica Scandinavica* 1977, Vol. 100: 69–83

Hernanz R, Alonso MJ, Baena A, Salaices M, Marin, J (1999):

Mechanism of bradykinin-induced relaxation in pig coronary arteries, *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1999, 21(4): 243

Holzmann S, Kukovetz WR, Schmidt K (1980):

Mode of action of coronary arterial relaxation by prostacyclin, *J. Cyclic Nucleotide Protein Res.*, 6: 451-460

Hulse JD, Yacobi A (1983):

Hetastarch: an overview of the colloid and its metabolism, *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy* 17: 334-341, 1983

Joly GA, Ayres M, Chelly F, Kilbourn RF (1994):

Effects of N<sup>G</sup>-Methyl-L-Arginine, N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginine, and Aminoguanidine on constitutive and inducible Nitric Oxide Synthase in rat aorta, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 199, No. 1, 1994: 147-154

Kajiya M, Hirota M, Inai Y, Kiyooka, T, Morimoto T, Iwasaki T, Endo K, Mohri S, Shimizu J, Yada T, Ogasawara Y, Naruse K, Ohe T, Kajiya F (2007):

Impaired NO-mediated vasodilation with increased superoxide but robust EDHF function in right ventricular arterial microvessels of pulmonary hypertensive rats, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292: H2737-H2744

Kalsner S (1985):

Cholinergic mechanisms in human coronary artery preparations: Implications of species differences, *J. Physiol* 358: 509-526, 1985

Karazi H, Urakawa N, Kinsky P (1984):

Potassium-induced contraction in smooth muscle, *Nippon Heikatsukin Zasshi*, Dec 20(6):427-44

Katz SD, Krum H (2001):

Acetylcholine-mediated vasodilation in the forearm circulation of patients with heart failure: indirect evidence for the role of endothelium-derived hyperpolarizing factor, *Am J Cardiol*, 87: 1089-920, 2001

Khot UN, Novaro GM, Popović ZB et al. (2003):

Nitroprussid in critically ill patients with left ventricular dysfunction and aortic stenosis, *The new England Journal of medicine*, 2003, May 1, 348 (18): 1756-1763

Kietzmann M, Scherkl R, Schulz R (2002):

Pharmakologie der Entzündung und der Allergie, *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*: 318-334

Klingel R (2000):

Extrakorporale Blutreinigung und Plasmatherapie (Therapeutische Apherese) in der Nephrologie: fachspezifische Therapie und fachübergreifende Dienstleistung, In: H.E. Franz (Hrsg.), *Dialyse 2001*, 113-149. Pabst Science Publishers, Lengerich, 2002, 137-140

Klotz U, Kroemer H (1987):

Clinical Pharmacokinetic Consideration in the Use of Plasma Expanders, *Clinical Pharmacokinetics* 12: 123-135 (1987)

Komalavilas P, Lincoln TM (1996):

Phosphorylation of the inositol 1,4,5triphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta, *J. Biol. Chem* 271: 21933

Laughlin M.H., Turk J.R., Schrage W.G., Woodman C.R., Price E.M. (2003):

Influence of artery coronary diameter on eNOS protein content., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1307-H1312

Laxenaire MC, Charpentier C, Feldmann L (1994):

Réactions anaphylactoides aux substitutés colloïdaux du plasma: incidence de risqué, mécanismes, *Ann Fr Anesth Réanim*, 13: 301-310

Lincoln TM, Cornwell TL (1993):

Intracellular cyclic GMP receptor proteins, *FASEB J.* 7: 328

Löscher W, Ungemach FR (2006):

Kreislaufwirksame Pharmaka – Blutdrucksenkende Pharmaka, *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, 7. Auflage: 150-155

Lückhoff A, Pohl U, Mulsch A, Busse R (1988):

Differential role of extra- and intracellular calcium in the release of EDRF and prostacyclin from cultured endothelial cells; *British Journal of Pharmacology* 95: 189-196, 1988

Malo O, Desjardins F, Tanguay JF, Tardif JC, Carrier M, Perrault LP (2003):

Tetrahydrobiopterin and antioxidants reverse the coronary endothelial dysfunction associated with left ventricular hypertrophy in a porcine model, *Cardiovascular Research* 59 (2003): 501-511

Martin W, Furchgott RF, Villani GM, Jothianandan D (1986):

Phosphodiesterase Inhibitors induce Endothelium-dependent Relaxation of rat and rabbit aorta by potentiating the effects of spontaneously released Endothelium-Derived Relaxing Factor, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Vol. 237, No. 2, 1986

Matoba T, Shimokawa H, Morikawa K, Kubota H, Kunihiro I et al. (2003):

Electron spin resonance detection of Hydrogen Peroxide as an Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in porcine coronary microvessels, *Arterioscler Thromb Vasc biol.* 2003; 23: 1224-1230

Maurer PH, Berardinelli B (1968):

Immunologic studies with hydroxyethyl starch (HES). A proposes plasma expander, *Transfusion* 8: 265

McGowan FX Jr, Davis PJ, del Nido PJ, Sobek M, Allen JW, Downing SE (1994):

Endothelium-dependent regulation of coronary tone in the neonatal pig, *Anesth Analg*, 1994 Dec; 79(6): 1094-101

Merkus D, Houweling B, Zarbanoui A, Duncker DJ (2004):

Interaction between prostanoids and nitric oxide in regulation of systemic, pulmonary, and coronary vascular tone in exercising swine, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1114-H1123, 2004

Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997):

Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by  $Ca^{2+}$ -calmodulin and caveolin, *J. Biol. Chem.*, 272: 15583-15586

Minami A, Ishimura N, Harada N, Sakamoto S, Niwa Y, Nakaya Y (2002):

Exercise training improves acetylcholine-induced endothelium-dependent hyperpolarization in type 2 diabetic patients, Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats, *Atherosclerosis* 162 (1): 85-92, 2002

Mishler JM (1984a):

Synthetic plasma volume expanders – their pharmacology, safety and clinical efficacy, *Clinics in Haematology* 13: 75-92, 1984a

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1989):

Biosynthesis of Nitric oxide from L-Arginine – A pathway for the regulation of cell function and communication, *Biochemical Pharmacology*, Vol. 38, No. 11: 1709-1715

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991):

Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol Rev.* 43:109

Müller-Esterl W (2004):

Biochemie – Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler, Elsevier GmbH, München, 1. Auflage 2004

Nagao T, Vanhoutte PM (1992):

Characterization of endothelium-dependent relaxations resistant to nitro-L-arginine in the porcine coronary artery, *Br. J. Pharmacol.* (1992), 107: 1102-1107

Naglo-Dünner J(2010):

Einfluss normothermer Ischämie mit nachfolgenden unterschiedlichen hypothermen Konservierungen auf die endothelabhängige Relaxation der epicardialen Coronararterien des Schweins, Dissertation Gießen

Nakashima M, Mombouli JV, Taylor AA, Vanhoutte PM (1993):

Endothelium-dependent Hyperpolarization Caused by Bradykinin in Human Coronary Arteries, J Clin Invest, 92: 2867-2871

Nakayama K, Osol G, Halpern W (1988):

Reactivity of isolated porcine coronary resistance arteries to cholinergic and adrenergic drugs and transmural pressure changes, Circ. Res. 1988;62: 741-748

Nilius B. (1990):

Permeation properties of a non-selective cation channel in human vascular endothelial cells, Pflügers Arch 416: 609-611, 1990

Nohl H (2002):

Anhang: Grundlagen der Radikalbiochemie und –toxikologie, Toxikologie, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin; Enke, Stuttgart: 574-578

Ohnishi Y, Hirano K, Nishimura J, Furue M, Kanaide H (2001):

Inhibitory effects of brefeldin A, a membrane transport blocker, on the bradykinin-induced hyperpolarization-mediated relaxation in the porcine coronary artery, British Journal of Pharmacology (2001), 134: 168-178

Prough DS, Kramer G (1994):

Medium Starch, please, Anesth analg 1994; 79: 1034-5

Provisco AG (download 19.02.2011):

[http://www.provisco.ch/infothek\\_rohstoffe\\_gummiarabicum.html](http://www.provisco.ch/infothek_rohstoffe_gummiarabicum.html)

Ring J, Messmer K (1977):

Incidence and severity of anaphylactoid reactions to colloid volume substitutes, *Lancet* Feb 26; 1 (8009): 466-9

Salmon JB, Mythen MG (1993):

Pharmacology and Physiology of colloids, *Blood Review* 1993; 7: 114-120

Schmidt PM (2003):

Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur NO-unabhängigen Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase, Dissertation Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Schmidt RF, Lang F (2007):

Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 30. Auflage 2007

Schmidt T, Zaib F, Samson SE, Kwan CY, Grover AK (2003):

Peroxy-nitrite resistance of sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump in pig coronary artery endothelium and smooth muscle, *Cell Calcium* 36 (2004): 77-82

Schmitz JE (1995):

Erhaltung der Homöostase, Heterologe kolloidale Volumenersatzmittel, *Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Waren und Dienste*, Kapitel 2: 221-229

Schröder B, Diener M (2000):

Grundlagen der Zellphysiologie, *Physiologie der Haustiere* 2000, 2: 11-17

Schröder B, Schemann M (2000):

Allgemeine Neurophysiologie, *Physiologie der Haustiere* 2000: 3: 31

Selemidis S, Cocks T (2007):

Smooth muscle mediates circumferential conduction of hyperpolarization and relaxation to focal endothelial cell activation in large coronary arteries, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2007) 375: 85-94

Serebruany VL, Ordoñez JV, Yurovsky VV, Gurbel PA (1998):

Crossreactivity of Human versus Swine Platelet Surface Antigens is similar for Glycoproteins Ib and IIIa, but not for the Glycoprotein IIb/IIIa Complex, *J Thromb Thrombolysis* 1998; 5(1): 37-41

Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T (1996):

Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae, *J Biol. Chem.*, 271: 6518-6522

Shimizu S, Paul RJ (1997):

The endothelium-dependent, Substance P relaxation of porcine Coronary arteries resistant to nitric oxide synthesis inhibition is partially mediated by 4-Aminopyridine-sensitive Voltage-dependent  $K^+$  Channels, *Endothelium*, Vol. 5: 287-295

Smani T, Hernández A, Ureña J, Castellano AG, Franco-Obregón A, Ordoñez A, López-Barneo J (2002):

Reduction of  $Ca^{2+}$  channel activity by hypoxia in human and porcine coronary myocytes, *Cardiovascular Research* 53 (2002): 97-104

Sollini M, Frieden M, Bény JL (2002):

Charybdotoxin-sensitive small conductance  $K_{Ca}$  channels activated by bradykinin and substance P in endothelial cells, *British Journal of Pharmacology* (2002), 136: 1201-1209

Sommermeier K (2003):

Hyperverzweigtes Amylopektin zum Einsatz in Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung von Säugern oder in Diagnostizierverfahren, insbesondere zur Verwendung als Plasmavolumenexpander, EP1421120 06.06.2007 oder <http://www.patent-de.com/20070606/EP1421120.htm>

Sorop O, Spaan JAE, Vanvavel E (2001):

Pulsation-induced dilation of subendocardial and subepicardial arterioles: effect on vasodilator sensitivity, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H311-319, 2002

Sponer G (2002):

Pharmakologie des Herz-Kreislauf-Systems, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin: 156-167

Steinhoff M (2004):

Die Wirkung Aprotinins (Trasylo<sup>®</sup>) auf die koronare endothelabhängige Vasorelaxation des Schweines und des Kaninchens, Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover

Thollon C, Fournet-Bourguignon MP, Saboureau D, Lesage L, et al. (2002):

Consequences of reduced production of NO on vascular reactivity of porcine coronary arteries after angioplasty: importance of EDHF, British Journal of Pharmacology (2002) 136: 1153-1161

Thompson WL, Walton RF (1963):

Blood changes, renal function and tissue storage following massive infusion of hydroxyethyl starches, Fed Proc, 22: 640, 1963

Tinker JH, Michenfelder JD (1976):

Sodium Nitroprussid: Pharmacology, Toxicology and Therapeutics, Anesthesiology, V 45, No. 3, 1976: 1-15

Tomioka H, Hattori Y, Fukao M, Watanabe H, Akaishi Y, et al. (2001):

Role of endothelial Ni<sup>2+</sup>-sensitive Ca<sup>2+</sup> entry pathway in regulation of EDHF in porcine coronary artery, Am J Physiol Heart Circ Physiol 28: H730-737, 2001

Vaandrager AB, de Jonge HR (1996):

Signalling by cGMP-dependent protein kinases, Mol. Cell, Biochem. 157: 23

Vanheel B und Van de Voorde J (2000):

EDHF and residual NO: different factors., Cardiovasc Res 46: 370-375

Vincent JL (2007):

The Pros and Cons of Hydroxyethyl Starch Solutions, International Anesthesia Research Society, Vol. 104, No. 3, March 2007: 484-6

Wadsworth RM (1994):

Vasoconstrictor and vasodilator effects of hypoxia, Trends Pharmacol Sci 1994; 15: 47-53

Warren BB, Durieux ME (1997):

Hydroxyethyl Starch: Safe or Not?, Anesth Analg 1997; 84: 206-12

Weidler B, von Bormann B, Sommermeyer K, Lohmann E, Peil J, Hempelmann G (1991):

Pharmakokinetische Merkmale als Kriterien für den Klinischen Einsatz von Hydroxyethylstärke, Arzneimittelforsch/Drug Res 41 (5): 494

Weinand F (2010):

Auswirkungen von Tetrahydrobiopterin sowie den Antioxidantien Glutathion, N-Acetyl-L-Cystin und Superoxid –Dismutase auf die Endothelabhängige Funktion des Koronarsystems nach Vorschädigung, Dissertation Gießen

Went S (1928):

The viscosity of gum-acacia solutions together with a determination of the viscosity constant of such solutions according to the formula of  $\eta = \theta C$ , Am J Physiol 85: 458-467, 1928

Yang Q, Ge ZD, Yang CQ, Huang Y, He GW (2003):

Bioassay of Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor with abolishment of Nitric Oxide and the Role of Gap Junctions in the Porcine Coronary Circulation, Drug Development research 58: 99-110 (2003)

Zhang RZ, Yang Q, Yim APC, Huang Y, He GW (2004):

Different Role of Nitric Oxide and Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Endothelium-Dependent Hyperpolarisation and Relaxation in Porcine Coronary Arterial and Venous System, Journal of Cardiovascular Pharmacology Vol. 43(6), June 2004: 839-850

Zou W, Yang Q, Yim APC, He GW (2001):

Epoxyeicosatrienoic Acids (EET<sub>11,12</sub>) may partially restore endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated function in coronary microarteries, Ann Thorac Surg 2001; 72: 1970-1976

## **8 Eidesstattliche Erklärung**

(§10 Abs.5 der Promotionsordnung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen)

Die beifolgende Dissertation mit dem Titel: „Einfluss von Plasmaexpandern auf endothelabhängige, vasoaktive Faktoren an Herzkranzgefäßen von Schweinen“ habe ich selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ich habe die Dissertation an folgendem Institut angefertigt:  
Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

**Maite Ann-Katrin Klisa**

## **9 Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. H. Fischer für die Überlassung des Themas, für die geduldige und ausdauernde Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung dieser Studie und für die hervorragende Betreuung dieses Projektes bis zur Fertigstellung der Promotionsarbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner danke ich für die freundliche Übernahme und Vertretung dieser Arbeit am Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Für die nette und kollegiale Zusammenarbeit während unserer gemeinsamen Zeit am Institut für experimentelle Medizin der Universität zu Köln bedanke ich mich bei Frau Manuela Lerwe, Frau Iris Wissner, Frau Petra Heid und Frau Greiwe sowie Herrn Poley.

Mein ausgesprochener Dank gilt meinen lieben Eltern Gisela Ludwig-Klisa und Matthias Werner Klisa, die mir den Weg in und durch das Leben gezeigt haben.

Für die immer wieder zugesprochene Motivation und das geduldige Zuhören möchte ich Volker Karl Kloock und Christine Stollenwerk danken.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

ISBN: 978-3-8359-5854-8

Tel: 0641-5599898 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de



Cover photo: © Max Delson Martins Santos