

**Auswirkung der Blutreprfusion nach normothermer  
Ischämie und hypothermer Konservierung auf die  
endothelabhängige Relaxation der epikardialen  
Koronararterien des Schweins**

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

**Dorothee Dahmen**

**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**

**Auswirkung der Blutperfusion nach normothermer  
Ischämie und hypothermer Konservierung auf die  
endothelabhängige Relaxation der epikardialen  
Koronararterien des Schweins**

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

**Eingereicht von  
Dorothee Dahmen  
Tierärztin aus Düren**

**Gießen 2009**

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

**Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer**

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

**Tag der Disputation: 20. Oktober 2009**



# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 NO (Stickstoffmonoxid).....	3
1.2 PGI2 (Prostazyklin).....	4
1.3 EDHF (endothelium-derived-hyperpolarization-factor) .....	5
1.4 Vasokonstriktoren.....	5
1.5 Konservierung .....	6
1.6 COP.....	7
1.7 Reperfusion .....	8
1.8 Ziel dieser Versuchsreihe .....	10
2 Material und Methoden .....	11
2.1 Versuchsmaterial.....	11
2.2 Gruppeneinteilung .....	11
2.3 Blutreperfusion .....	14
2.4 Versuchsaufbau .....	15
2.5 Funktionsmessung der Koronarien.....	17
2.6 Histologie.....	21
2.7 Versuchsauswertung .....	22
3 Ergebnisse.....	23
3.1 Herzentnahme .....	23
3.2 Aufteilung der Koronarien.....	23
3.3 Koronarfunktion nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ...	24
3.4 Koronarfunktion nach 180 Minuten normothermer Ischämie und einer Stunde Blutreperfusion ohne Konservierung .....	29
3.5 Koronarfunktion nach normothermer Ischämie, 24 h Konservierung und einer Stunde Blutreperfusion .....	32
3.5.1 Gruppe 60 Minuten normotherme Ischämie, 24 h Konservierung und eine Stunde Blutreperfusion .....	32
3.5.2 Gruppe 120 Minuten normotherme Ischämie, 24 h Konservierung und einer Stunde Blutreperfusion .....	36
3.5.3 Gruppe 180 Minuten normotherme Ischämie, 24 Stunden Konservierung und eine Stunde Blutreperfusion .....	37
3.6 Histologie.....	43

4	Diskussion .....	49
4.1	Versuchstier Schwein .....	49
4.2	Diskussion der Methodik .....	50
4.3	Verwendete Lösungen.....	51
4.3.1	Krebs-Henseleit-Lösung .....	51
4.3.2	Konservierungslösungen .....	51
4.3.2.1	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) nach Bretschneider (Custodiol®) .....	51
4.3.2.2	modifizierte HTK-Lösung und COP (coronary oxygen persufflation). 53	
4.3.2.3	University of Wisconsin-Lösung (UW, Viaspan®) .....	56
4.4	Mechanismen der Endothelabhängigen Relaxation .....	57
4.4.1	Stickstoffmonoxid.....	57
4.4.2	Prostazyklin (PGI <sub>2</sub> ).....	59
4.4.3	Endothelialer Hyperpolarisierender Faktor (endothelium-derived- hypopolarizing-factor, EDHF) .....	60
4.4.4	Substanz P.....	61
4.4.5	Bradykinin .....	62
4.4.6	Serotonin (5-Hydroxytryptamin) .....	63
4.4.7	Natriumnitroprussid (SNP) .....	64
4.4.8	Papaverin.....	65
4.5	Diskussion der Ergebnisse .....	66
4.5.1	Blut als Reperfusat.....	66
5	Zusammenfassung .....	74
6	Literaturverzeichnis.....	78
7	Eidesstattliche Erklärung .....	91
8	Danksagung.....	92



## Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Einteilung der Koronarringe
- Tabelle 2: Zusammensetzung der Konservierungslösungen (mmol/l)
- Tabelle 3: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung
- Tabelle 4: Verwendete Substanzen zur Messung der Koronarfunktion
- Tabelle 5: Aufteilung und Anzahl der getesteten Koronarringe
- Tabelle 6: EDR-Werte nach verschiedenen Ischämiezeiten
- Tabelle 7: Kontroll- und Reperfusionswerte der Dilatationen von Koronarringen aus gleichen Koronargefäßen nach 180` normothermer Ischämie ohne Reperfusion (a) und mit Reperfusion (b)
- Tabelle 8: EDR-Werte nach 180 Minuten normothermer Ischämie und einer Stunde Blutreperfusion
- Tabelle 9: EDR-Werte nach 60 Minuten normothermer Ischämie, 24 h Konservierung und einer Stunde Blutreperfusion
- Tabelle 10: EDR-Werte nach 120 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung und einer Stunde Blutreperfusion
- Tabelle 11: EDR-Werte nach 180 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung und einer Stunde Blutreperfusion
- Tabelle 12: Anzahl der Gesamtzellkerne sowie der apoptotischen Kerne

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Blutreperfusion
- Abbildung 2: Versuchsaufbau zur Messung der Koronargefäße
- Abbildung 3: Aufzeichnung der koronaren Kontraktionen und Dilatationen
- Abbildung 4: Endothelabhängige Relaxation der Koronararterien des Schweins nach Zugabe von Substanz P in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion durch Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie
- Abbildung 5: Endothelabhängige Relaxation der Koronararterien des Schweins nach Zugabe der Verdünnungsreihe von Bradykinin ( $10^{-10}$  bis  $5 \times 10^{-6}$ ) in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion durch Prostaglandin $_{2\alpha}$ , nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie
- Abbildung 6: Dilatation nach Zugabe der Konzentration  $10^{-7}$  von Serotonin in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion durch Prostaglandin $_{2\alpha}$ , nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie
- Abbildung 7: Negative Dilatation, d.h. Kontraktion nach Zugabe der Konzentration  $10^{-6}$  von Serotonin in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion durch Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , nach 60, 120 und 180 Minuten
- Abbildung 8: Endothelabhängige Relaxation der Koronararterien des Schweins nach Zugabe von Substanz P in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion, die mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ausgelöst wurde, nach Hemmung der NO-Produktion mit L-NNA
- Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der endothelabhängigen Relaxation nach den verschiedenen Ischämiezeiten
- Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der EDR nach 180 Minuten normothermer Ischämie mit und ohne Blutreperfusion
- Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurve von Bradykinin nach Vorkonzentration mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie mit und ohne Blutreperfusion ohne Konservierung

- Abbildung 12: Vergleichende Darstellung der EDR nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von SP
- Abbildung 13: Vergleichende Darstellung der EDR nach 60,120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von Bradykinin  $5 \times 10^{-6}$  M
- Abbildung 14: Vergleichende Darstellung der EDR nach 60,120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von Serotonin  $10^{-7}$  M
- Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der EDR nach 60,120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von Serotonin  $10^{-7}$  M
- Abbildung 16: Vergleichende Darstellung der EDR nach 60,120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von L-NNA und SP
- Abbildung 17: EDR nach 60 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung in HTK-; mHTK+COP; bzw. UW-Lösung und einer Stunde Blutreperfusion
- Abbildung 18: EDR nach 120 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung in HTK-; mHTK+COP; bzw. UW-Lösung und einer Stunde Blutreperfusion
- Abbildung 19: EDR nach 180 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung in HTK-; mHTK-; bzw. UW-Lösung und einer Stunde Blutreperfusion

- Abbildung 20: Dosis-Wirkungskurve von Bradykinin nach Vorkonzentration mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutreperfusion und nach 24 h Konservierung in HTK mit Blutreperfusion
- Abbildung 21: Dosis-Wirkungskurve von Bradykinin nach Vorkonzentration mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie o ohne Konservierung und ohne Blutreperfusion und nach 24h Konservierung in mHTK+COP mit Blutreperfusion
- Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurve von Bradykinin nach Vorkonzentration mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutreperfusion und nach 24 h Konservierung in UW mit Blutreperfusion
- Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurve von Serotonin nach Vorkonzentration mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutreperfusion und nach 24 h Konservierung in HTK mit Blutreperfusion
- Abbildung 24: Dosis-Wirkungskurve von Serotonin nach Vorkonzentration mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutreperfusion und nach 24 h Konservierung in mHTK + COP mit Blutreperfusion
- Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurve von Serotonin nach Vorkonzentration mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutreperfusion und nach 24 h Konservierung in UW mit Blutreperfusion
- Abbildung 26: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines nach dem Schlachtvorgang entnommenen Koronargefäßes des Schweins ohne Ischämieschaden, HE-Färbung
- Abbildung 27: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines Koronargefäßes des Schweins nach 180 Minuten normothermer Ischämie, HE-Färbung
- Abbildung 28: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines Koronargefäß des Schweins nach 180 Minuten normothermer Ischämie und 24ständiger Konservierung in HTK-Lösung, HE-Färbung

- Abbildung 29: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines Koronargefäß des Schweins nach 180 Minuten normothermer Ischämie, 24stündiger Konservierung in HTK-Lösung und einer Stunde Blutreperfusion, HE-Färbung
- Abbildung 30: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines Koronargefäßes des Schweins ohne Ischämie nach 24 Stunden Blutreperfusion, HE-Färbung
- Abbildung 31: Apoptotischer Zellkern im Endothel nach 180 Minuten normothermer Ischämie und 24 Stunden Konservierung in HTK
- Abbildung 32: Apoptotischer Zellkern im Endothel nach 180 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung in UW und einer Stunde Blutreperfusion
- Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der EDR mit und ohne Blutreperfusion nach Konservierung in HTK-Lösung nach verschiedenen Ischämiezeiten
- Abbildung 34: Vergleichende Darstellung der EDR mit und ohne Blutreperfusion nach Konservierung in mHTK-Lösung + COP nach verschiedenen Ischämiezeiten
- Abbildung 35: Vergleichende Darstellung der EDR mit und ohne Blutreperfusion nach Konservierung in UW-Lösung nach verschiedenen Ischämiezeiten

## Abkürzungsverzeichnis

ADP:	Adenosindiphosphat
ATP:	Adenosintriphosphat
cAMP:	Cyclo-Adenosinmonophosphat
cGMP:	Cyclo-Guanosinmonophosphat
COP:	koronare Sauerstoffpersufflation (coronary oxygen persufflation)
DSO:	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EDHF:	endothelium-derived-hyperpolarization-factor
EDRF:	endothelium-derived-relaxing-factor
EDR:	endothelabhängige Relaxation
GTP:	Guanosintriphosphat
HE- Färbung:	Hämalaun-Eosinfärbung
HTK:	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung nach Bretschneider
Indo:	Indomethacin
KCL:	Kaliumchlorid
Kons.:	Konservierung
KH:	Krebs-Henseleit-Lösung
L-NNA:	N-Nitro-L-Arginin
mHTK:	modifizierte Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung nach Bretschneider
NHBD:	Organspender mit Herzstillstand (non-heart-beating-donors)
n.l.:	normotherme Ischämie
NO:	Stickstoffmonoxid
NOS:	Stickstoffmonoxid-Synthetase
PGF <sub>2α</sub> :	Prostaglandin F <sub>2α</sub>
PGI <sub>2</sub> :	Prostazyklin
SNP:	Sodium-Nitroprussid
SP:	Substanz P
UW:	University of Wisconsin-Lösung



# 1 Einleitung

Die Knappheit von Spenderorganen ist eines der zentralen Probleme der Transplantationsmedizin. Das Ungleichgewicht zwischen der Anzahl von Spendern und möglichen Empfängern steigt ständig. Im Durchschnitt sterben täglich drei Menschen weil für sie nicht rechtzeitig ein Spenderorgan zur Verfügung steht (Deutsches Ärzteblatt 2008). In Deutschland wächst die Warteliste der Menschen, die ein neues Herz benötigen jährlich um etwa 900; es stehen allerdings nur circa 400 bis 500 Spenderherzen jedes Jahr zur Verfügung. Im Jahr 2006 wurden in Deutschland 412 Herzen transplantiert (Deutsche Stiftung Organtransplantation). Nach Angaben von Eurotransplant, einer niederländischen Vermittlungsstelle von Spenderorganen, wurden im Jahr 2007 366 Herzen in Deutschland transplantiert, bei einer Warteliste von 774 Patienten. Zur Aufrechterhaltung, bzw. zur Steigerung der Transplantationsrate wäre eine Optimierung der Organprotektion hilfreich, mit der der Spenderpool vergrößert werden könnte.

Eine gute Möglichkeit zur Erweiterung möglicher Spender wäre die Verwendung von Organen, so genannten non-heart-beating-donors (NHBD), zu Deutsch: „Organspender ohne schlagende Herzen“ (Fischer et al. 2003).

Dies sind stark vorgeschädigte Organe, von Spendern mit Kreislaufstillstand, deren Herz also nicht mehr schlägt. Der Gebrauch von NHBD-Organen könnte die Zahl der möglichen Spender erheblich vergrößern. Es gibt heute allerdings nur wenige Länder, in denen der Gebrauch solcher Organe möglich ist. In Deutschland dürfen Organe von NHBD zurzeit nicht verwendet werden, im Gegensatz z.B. zu der Schweiz, den Niederlanden, Großbritannien, Spanien und den USA. Dort wurden erfolgreich Nieren solcher „herztoter“ Spender transplantiert. Nach dem deutschen Transplantationsgesetz dürfen Organe erst entnommen werden, wenn der Verlust jeglicher Hirnstammtätigkeit zweifelsfrei festgestellt und dokumentiert wurde. Eine Organentnahme ohne vorherige Hirntod-Diagnose ist gemäß dem Transplantationsgesetz nur dann zulässig, wenn der endgültige, nicht behebbare Stillstand von Herz und Kreislauf eingetreten ist, und seit dem mehr als drei Stunden vergangen sind. In der Praxis hat dies zur Folge, dass „Herztote“ für die Spende innerer Organe nicht genutzt werden können, da es technisch nicht möglich ist, die Organe länger als drei Stunden transplantabel zu erhalten. Bei Transplantationen hirntoter Spender wird der Herzstillstand durch die Gabe kardioplegischer Lösungen

indiziert und das Organ unmittelbar danach entnommen. Für die Funktionsaufnahme des Spenderorgans nach der Transplantation sind die Länge der normothermen Ischämie, die Konservierungstechnik und die Konservierungslösung entscheidend.

Bei der Herztransplantation muss dem Erhalt der Koronargefäße besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Eine möglichst geringe Beeinträchtigung ist essentiell für die funktionelle Wiederherstellung der gesamten Herzmuskulatur. Die Koronararterien können aber nur mit intaktem Endothel zuverlässig die Durchblutung gewährleisten. Das Endothel wurde seit seiner Entdeckung bis Anfang der 80er Jahre als passive Barriere zwischen Blut und Gewebe betrachtet, welche als einlagige Zellschicht die Innenfläche der Blutgefäße auskleidet und ohne besondere Funktion ist. Heute weiß man, dass dem Endothel eine Reihe extrem wichtiger Funktionen obliegen, wie die Regulation des lokalen Gefäßtonus, die Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie der Thrombozyten- bzw. Leukozytenadhäsion an die luminale Gefäßoberfläche, die Beeinflussung akuter und chronischer Entzündungsreaktionen, die Regulation plasmatischer Fibrinolysefaktoren sowie die Hemmung des Wachstums glatter Gefäßmuskelzellen (Busse und Fleming 1995). Es stellt ein eigenständiges, stark differenziertes und metabolisch hochaktives Organ dar. Das Endothel setzt kontrolliert Autakoide frei, eine Gruppe chemisch heterogener kurzlebiger, vasoaktiver Substanzen mit parakriner Wirkung. Besonders wichtig ist die Balance zwischen vasodilatierenden und vasokonstriktorisches Einflüssen. Eine Verschiebung dieses Gleichgewichtes würde die Gefäße für Atherosklerose, Thrombosen, Leukozytenadhäsion und entzündliche Prozesse anfällig machen. Eine physiologische Endothelfunktion ist somit die Voraussetzung einer normalen Organfunktion. Die Restitution der Endothelfunktion ist daher von besonderer Bedeutung bei der Konservierung von Herzen, die für eine Transplantation vorgesehen sind.

Das Endothel moduliert den Gefäßtonus der Koronararterien also durch die Freisetzung verschiedener endothelabhängiger Substanzen, die entweder eine Dilatation oder aber eine Kontraktion herbeiführen (Lüscher et al. 1990). Kardiale Ischämie schädigt vorwiegend die Myozyten, das Endothel wird aber in nahezu gleicher Weise geschädigt (Seccombe & Schaff 1995). Betrachtet man als wichtigste Rolle des Endothels die Regulation des Gefäßtonus, so steigern gravierende Schäden daran das Risiko von Gefäßspasmen, Thrombose und Atherosklerose.

Weitere physiologische Funktionen des Endothels sind die Regulation des Wachstums der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand und der Interaktion mit Thrombozyten und Leukozyten. Eine Dysfunktion des koronaren Endothels trägt also entscheidend mit zur Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen bei.

Das Endothel produziert verschiedene Substanzen, die bei entsprechenden Stimuli produziert bzw. freigesetzt werden. In der Hauptsache unterscheiden sich Dilatatoren und Konstriktoren, allerdings beruht die Regulation des Tonus auf einer ausgeglichenen Produktion beider.

Hauptverantwortlich für vasodilatatorische Reaktionen sind drei verschiedene Mediatoren: Stickstoffmonoxid (NO), Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) und endothelium-derived-hyperpolarization-factor (EDHF).

### **1.1 NO (Stickstoffmonoxid)**

NO ist ein potenter, endogener Vasodilatator, der von den Endothelzellen produziert und freigesetzt wird. 1980 von R. Furchtgott als EDRF (endothelium-derived-relaxing-factor) entdeckt, wurde diese Substanz dann allerdings als NO identifiziert (Palmer et al. 1987). Es gehört zu den nitrosen Gasen und wird in der Zelle aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Eine NO-Synthetase (NOS) katalysiert enzymatisch aus dem Arginin die Bildung von Citrullin unter der Abspaltung von NO. Man unterteilt die NO-Synthetase in drei Isoenzyme:

- die nNOS, die in Nervengewebe zu finden ist
- die induzierbare iNOS, die nur vorübergehend gebildet wird, z.B. bei Entzündungsprozessen.
- die endotheliale eNOS, die vorwiegend in den Endothelzellen vorhanden ist

Die eNOS wird durch Calcium aktiviert und reguliert somit die endotheliale NO-Bildung.

NO ist eine sehr labile Verbindung mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden. Dies erschwerte zunächst auch seine Entdeckung. Es ist lipophil und kann sehr leicht aus der Endothelzelle hinaus und in die Zielzelle hinein diffundieren. Seine Wirkung in der glatten Muskelzelle wird über cGMP als second-messenger induziert. Die zytosolische Form der Guanylatcyclase wird durch NO aktiviert und bildet vermehrt

cGMP. Der dadurch ausgelöste Ca-Ausstrom löst an der glatten Muskulatur eine Erschlaffung aus. Es kommt zur Gefäßdilatation (Ignarro et al.1999).

Ausgelöst wird die Produktion von NO in den Endothelzellen durch verschiedene Stimulatoren.

Zum einen wirken hier die Scherkräfte des Blutes; durch die mechanische Auslenkung von Makromolekülen kommt es zu einer Öffnung von Ca-Kanälen und somit zu einer Aktivierung der eNOS. So kann der Tonus der Gefäße angepasst werden.

Rezeptorvermittelte NO-Freisetzung erfolgt durch verschiedene Autakoide (Lüscher et al. 1990), wie zum Beispiel Acetylcholin, Bradykinin oder Substanz P, und durch Thrombozytenstoffe wie Serotonin, Thrombin, ADP und ATP. Nach Bindung dieser Signalstoffe stimulieren diese Rezeptoren durch einen Anstieg der zytosolischen Ca-Konzentration die Bildung von NO.

## **1.2 PGI<sub>2</sub> (Prostazyklin)**

Das PGI<sub>2</sub> stellt einen Agonisten zu NO dar und wirkt synergistisch. Es wird ebenfalls von den Endothelzellen synthetisiert und freigesetzt. Das Enzym Cyclooxygenase bildet aus der Arachidonsäure verschiedene Prostaglandine, wie das PGI<sub>2</sub>. Neben seiner dilatierenden Funktion wirkt es hemmend auf die Thrombozytenaggregation und als Thromboxanantagonist.

Neben physikalischen Einflüssen wie den Scherkräften des Blutes oder hypoxischen Zuständen erfolgt eine Stimulation, ebenfalls wie bei NO, durch Stoffe wie Acetylcholin, Bradykinin oder ATP. In der glatten Muskelzelle wirkt PGI<sub>2</sub> über den second-messenger cAMP.

Der Beitrag des Prostazyklin zur Gefäßmodulation ist im Vergleich zu NO jedoch sehr viel geringer, es unterstützt bzw. vergrößert dessen Wirkung (Lüscher et al. 1990).

### **1.3 EDHF (endothelium-derived-hyperpolarization-factor)**

Unabhängig von NO und PGI<sub>2</sub> wurde noch ein weiterer Faktor für eine endothelabhängige Dilatation gefunden. Diese Substanz – möglicherweise sind es auch mehrere Substanzen, deren genaue chemische Struktur noch unklar ist - führt zu einer Hyperpolarisation des Gefäßendothels und der darunter liegenden glatten Gefäßmuskulatur, und verursacht somit eine Vasodilatation. Der Beitrag der EDHF-regulierten Wirkung nimmt mit abnehmender Gefäßgröße zu (Busse et al. 2002).

Durch eine Zunahme der intrazellulären Ca-Konzentration werden K-Kanäle geöffnet, die eine Hyperpolarisation der Endothelzellen auslösen. Diese Hyperpolarisation kann sich über myoendotheliale Gap-Junctions zu den benachbarten glatten Muskelzellen ausbreiten. An den Muskelzellen selbst werden K-Kanäle aktiviert und die Na-K-ATPase.

Funktionell stellt EDHF ein „back-up“-System bei Ausfall von NO und PGI<sub>2</sub> dar, das heißt es steht auch bei endothelialer Dysfunktion zur Verfügung.

### **1.4 Vasokonstriktoren**

Zu den wichtigsten Vasokonstriktoren zählt das Peptid Endothelin. Im Organismus kommt es in mindestens drei Isoformen vor, für die kontraktile Wirkung ist jedoch das Endothelin-1 verantwortlich. Es wird von den Endothelzellen gebildet und bei verschiedenen Stimuli ausgeschüttet. Dazu zählen Hypoxie, mechanische Scherkräfte sowie z.B. Thrombin, Angiotensin II und Noradrenalin. An der glatten Muskelzelle bindet Endothelin-1 an spezifische Membranrezeptoren und induziert dort den Anstieg von intrazellulärem Calcium und somit eine andauernde Kontraktion. Endothelin-1 ist ein sehr potenter Vasokonstriktor, es wirkt bis zu 100mal stärker als z.B. Angiotensin II. Bei Endothelläsionen bzw. -defekten können Agonisten wie Thrombin oder Angiotensin II über den Endothelinrezeptor eine Freisetzung von Endothelin bewirken, oder aber sofort an den Rezeptoren der glatten Muskelzellen binden und eine Kontraktion herbeiführen. Die Wirkung des Endothelin-1 wird auf diese Weise unterstützt.

## **1.5 Konservierung**

Einen großen Einfluss auf den Erhalt der Koronargefäße hat auch die Wahl der Konservierungslösung; denn während der Dauer der Aufbewahrung ist das Gefäßendothel der Konservierungslösung direkt ausgesetzt. Die HTK-Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat) nach Bretschneider ist die in Deutschland überwiegend zur Organkonservierung eingesetzte Lösung. Die HTK-Konservierungslösung ähnelt in ihrer ionalen Zusammensetzung den intrazellulären Verhältnissen und wird deshalb auch als protektive Konservierungslösung vom „intrazellulären Typ“ bezeichnet. Mit einem Natriumgehalt von 15 mmol/l und einem Kaliumgehalt von 10 mmol/l hat sie den Vorteil, dass sie ein unter Hypothermie und Ischämie entstehendes Ödem vermeidet. Unter physiologischen Bedingungen sind im Intrazellularraum eine hohe Kaliumkonzentration und eine geringe Natriumkonzentration vorhanden. Im Extrazellularraum verhält es sich umgekehrt. Diese ungleiche Ionenverteilung wird durch Ionenpumpen aufrechterhalten. Diese Ionenpumpen sind energieabhängig, d.h. ATP wird von den Mitochondrien zur Verfügung gestellt und durch die ATPase nutzbar gemacht. Kommt diese Ionenpumpe nun durch einen hypothermisch und ischämisch bedingten Energiemangel zum Erliegen, entsteht ein Ionenkonzentrationsgefälle. Natrium- und Chloridionen strömen ins Zellinnere ebenso wie Wasser, welches den osmotischen Gesetzen folgend ebenfalls ins Zytosol strömt. Es kommt zur Ödembildung. Durch die Ähnlichkeit der ionalen Zusammensetzung von intrazellulären Konservierungslösungen und dem Zytosol wird dieses Problem vermieden.

Eine Modifikation dieser als Kardioplegielösung und für Kurzzeitkonservierung bewährten HTK-Lösung hat in Versuchen besonders günstige Effekte gezeigt. Durch die Zugabe von Hyaluronidase und Calcium konnte die zeitlich begrenzte Dauer der Konservierung deutlich ausgedehnt werden. Fischer et al. zeigten in ihrer Studie, dass durch diese Modifikation der Gewebewasseranteil reduziert werden konnte und eine verbesserte Funktionsrestitution der Koronargefäße erreicht werden konnte. Die hinzugegebene Hyaluronidase spaltet die intrazelluläre Hyaluronsäure, welche durch ihre hohe Wasserbindungsfähigkeit Verursacher von interstitiellen Ödemen ist.

Die Erhöhung des Calciumgehaltes um zusätzlich 50 mmol/l dient der Vermeidung des „Calciumparadox“. Durch die Perfusion mit calciumarmer Lösung kommt es zu einer Calciumverarmung in der Zelle, so dass das Sarkolemm zerstört wird. Wird nun

mit einer calciumhaltigen Lösung reperfundiert, kommt es zu einem erhöhten Einstrom von Calciumionen und folglich zu einer Kontraktur. Die so entstandene Schädigung wird als „Calciumparadox“ bezeichnet (Zimmermann und Hülsmann 1966).

Eine ebenfalls vielfach verwendete Konservierungslösung ist die University of Wisconsin-Lösung (UW). Die Komponenten ihrer Zusammensetzung unterscheiden sich erheblich von den vorangegangenen Lösungen. Kalium ist hier in sehr hohen Konzentrationen vorhanden. Es ist ein starker Vasokonstriktor und wirkt depolarisierend auf die Zellmembran. Versuche mit UW-Lösung zeigten, dass die Lagerung in dieser Konservierungslösung durchaus die endothelabhängige Relaxation beeinträchtigt oder sogar endotheliale Dysfunktionen auslösen kann (He & Yang 1997). Die Hyperkaliämie der UW-Lösung beeinflusst die EDHF-vermittelte Hyperpolarisation erstens durch eine verlängerte Membranhyperpolarisation der glatten Muskelzellen und zweitens durch eine Hemmung der Calcium-abhängigen Kalium-Kanäle.

## **1.6 COP**

Zur optimalen Wiederherstellung des Gefäßendothels nach Ischämie werden verschiedene Konservierungsmöglichkeiten diskutiert. Eine dieser Möglichkeiten ist die COP (coronary oxygen persufflation). Hierbei handelt es sich um eine Sauerstoffpersufflation während der gesamten Konservierungsdauer, die sich sofort an die normotherme Ischämiephase anschließt. Der Hauptgrund für die Beeinträchtigungen der Organe ist der Mangel an Sauerstoff im Gewebe. Eine Sauerstoffzuführung während der bei den meisten Organtransplantationen für den Transport und die Empfängervorbereitung notwendigen Konservierungsphase wäre also bedeutsam. Ein Vorteil der koronaren Sauerstoffpersufflation ist, dass sie sehr einfach und zudem auch sehr kostengünstig gegenüber der alternativen Oxygenierungsmethode mit einer Dauerperfusion unter Verwendung oxygenierter Lösungen ist. Experimente, die eine Lagerung mit COP testeten, haben eine gute funktionelle und metabolische Wiederherstellung der Organe gezeigt (Fischer et al. 2003). An Lebern und Nieren mit ischämischer Vorschädigung wurden mit gutem Erfolg retrograde Sauerstoffpersufflationen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch die Zellschäden reduziert wurden (Yotsumoto et al. 2003).

Die koronare Sauerstoffpersufflation wird orthograd durchgeführt, so dass der Sauerstoff alle Regionen gut erreichen kann. Eines der denkbaren Risiken dieser Methode ist die potentielle Schädigung der Endothelzellen. Zwar wirkt sich die Oxygenierung grundsätzlich positiv auf den Zellmetabolismus aus, es bleibt allerdings die mögliche Gefahr der Schädigung der Zellen durch den direkten Kontakt zum Gas.

Versuche an isolierten Schweinekoronarien und Kaninchenherzen haben allerdings gezeigt, dass bei einer 18-stündigen Lagerung in modifizierter HTK-Lösung bei gleichzeitiger COP eine optimale Wiederherstellung des Endothels erreicht werden konnte. Diese Versuche wurden mit ganzen Schweineherzen erweitert, um die Effektivität der COP zu testen. Nach normothermer Ischämie von 16 Minuten wurden die besten Ergebnisse mit Herzen erreicht, die vor der orthotopen Transplantation in mHTK mit COP konserviert wurden. An diesen Herzen wurden keine funktionellen Schäden am Endothel festgestellt, ebenso wenig wie myokardiale Ödeme (Fischer et al. 2003).

Diese Technik wurde dann experimentell auf Herzen von NHBD übertragen, in der Hoffnung, dass COP den vorhandenen Ca-Überschuss nach normothermer Ischämie modifiziert und die Tendenz zur Kontraktur während der Reoxygenierung senkt. In der Klinik wurde die COP am Herzen noch nicht eingesetzt, jedoch testeten Rolles et al. 1989 die retrograde Sauerstoffpersufflation der Niere in einer klinischen Studie erfolgreich in einer großen Zahl von Nierentransplantationen.

Die koronare Sauerstoffpersufflation besitzt somit alle Eigenschaften einer kostengünstigen und effektiven Konservierungsmethode bei hypothermer Lagerung.

## **1.7 Reperfusion**

Bei jeder Organtransplantation kommt es natürlich zu einem Anschluss an den Blutkreislauf, d.h. zu einer Reperfusion mit Blut. Auch bei experimentellen Herzkonservierungen sollte deshalb unbedingt eine Reperfusion angeschlossen werden. Bei Reperfusionsbeginn werden Blutzellen ins ischämische Gewebe transportiert und es kommt zur Wiederaufnahme der Gewebe versorgenden Transportfunktionen wie Nährstoff- und Sauerstofftransport, Schadstoffabtransport und endokriner Signalvermittlung. Blut als Reperfusionslösung hat den Vorteil, dass es physiologisch ist, d.h. den Gefäßen des Transplantats nicht fremd. Durch den

Hämoglobingehalt ist es ein guter Sauerstoffträger und kann so für eine ausreichende Oxygenierung des Gewebes sorgen.

1997 setzten von Bayer et al. statt der bisher üblichen kristalloiden Lösungen körperwarmes Vollblut zur Perfusion ein. Dieser Einsatz von Blut reduzierte die Ödematisierung des Gewebes erheblich und es wurden somit längere Perfusionszeiten ermöglicht. Podesser et al. verglichen 1999 isolierte Kaninchenherzen, die einer fünfminütigen Ischämie ausgesetzt waren und anschließend 45 Minuten reperfundiert wurden. Eine Gruppe wurde mit normaler Krebs-Henseleit-Lösung reperfundiert, die andere mit Erythrozyten angereicherter KH-Lösung. Alle hämodynamischen und biochemischen Parameter zeigten bei der angereicherten KH-Lösung signifikant bessere Werte und auch der Gewebewasseranteil war deutlich geringer.

Dennoch hat die Reperfusion nicht nur positive Aspekte. Sie sollte in Hinblick auf den Erhalt der Koronarendothelien genauer betrachtet werden. Braunwald und Kloner bezeichneten die Reperfusion 1985 als „zweischneidiges Schwert“. Der Nutzen früher Reperfusion nach akuter myokardialer Ischämie ist unbestreitbar, allerdings wird dabei auch das Endothel geschädigt und es kann zu Funktionseinbußen kommen. Für derartige Schädigungen wurde die Bezeichnung „Reperfusionsschaden“ geprägt. Ischämie und nachfolgende Reperfusion führt zu Ödemen in den Endothelzellen und im Interstitium, und zu Obstruktionen der Kapillaren mit Neutrophilen Granulozyten. Diese regionalen Defekte führen zum so genannten „no reflow phenomenon“ (Seccombe & Schaff 1995). Es beschreibt die reduzierte myokardiale Durchblutung nachdem ein kurzzeitiger Verschluss des Gefäßes wieder gelöst wurde. Nach Ischämie und Reperfusion kommt es zu Abnormitäten des Koronarflusses und das Risiko von Gefäßspasmen und Thrombosen steigt. Reperfundierte Gefäße behalten je nach Ischämiedauer ihre normale Funktion der glatten Gefäßmuskulatur, sie büßen jedoch viel ihrer Kapazität der endothelialen Relaxation ein. Versuche deuten darauf hin, dass Ischämie und Reperfusion selektiv eine Komponente im Rezeptor/G-Protein-Komplex schädigen und somit eine Aktivierung von NO vermindert.

Andere Untersuchungen an Schweineherzen zeigten, dass durch Ischämie und Konservierungsdauer vorgeschädigte Koronargefäße nach Reperfusion noch größere Endothelschäden aufwiesen (Seccombe & Schaff 1995). Die Reperfusion ischämischer Gefäße aktiviert Leukozytenadhäsionsmoleküle und vasokonstriktive

Substanzen, die das Endothel zusätzlich schädigen. Neutrophile Adhäsion ist ein Hauptgrund für die Endothelbeeinträchtigung während der Reperfusion.

Es ist möglich, die Reperfusion zunächst mit kristalloiden Lösungen durchzuführen. Hierbei gelangen keine unkontrollierten Substanzen in das Gefäßlumen, welche die Autoregulation beeinflussen könnten. Dennoch bleibt in der Klinik keine Wahl, als das transplantierte Organ zu reperfundieren und über kurz oder lang dem körpereigenen Kreislauf zugänglich zu machen.

Um die Funktionsfähigkeit von Herzen nach Transplantationen zu optimieren, muss der genaue Einfluss von normothermer Ischämiephase, Konservierungsdauer, Konservierungsart und Reperfusion untersucht werden.

Dabei gilt es, auch eine gute Funktions- und Stoffwechselerholung der Koronarien bei erhaltener Endothelfunktion zu erreichen, und die Grenzen für die Ischämiedauer und die jeweiligen Konservierungsmöglichkeiten zu ermitteln.

### **1.8 Ziel dieser Versuchsreihe**

Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Auswirkungen der Blutreperfusion auf die endothelabhängige Relaxation von Koronarien zu untersuchen, welche einer normothermen Ischämie ausgesetzt waren, um die Organprotektion im Rahmen der Herzkonservierung bzw. –transplantation nach normothermer Ischämie und Konservierung zu optimieren.

Wir entschieden uns für die Spezies Schwein, da sowohl die Herzgröße und Herzfunktion als auch die Koronarversorgung dem Menschen vergleichbar sind und somit Prognosen zur Anwendung beim Menschen zulassen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsmaterial**

Die verwendeten Koronargefäße wurden freundlicherweise vom Schlachthof Köln (Fa. FVK GmbH) zur Verfügung gestellt. Sie stammen von frisch geschlachteten Schlachtschweinen, Deutsche Landrasse-Hybride, mit einem Gewicht von durchschnittlich 100 kg. Die Tiere waren zum Schlachtzeitpunkt im Mittel 6 Monate alt. Die Schweineherzen wurden am Schlachtband bei der Ausweidung entnommen und vom Geschlinge abgesetzt. An den einzelnen Herzen erfolgte von der Aorta aus das Freipräparieren der Arteria coronaria dextra in einem Gewebebett von ca. 2 cm Durchmesser. Für die Ischämiezeit erfolgte die Lagerung bei 38°C. Nach Ablauf der vorgesehenen Ischämie wurde sämtliches Restgewebe, unter Vermeidung jeglicher mechanischer Beeinträchtigung des Gefäßendothels, stumpf entfernt. Von den Arterien wurden, wie für den Versuch benötigt, 5 mm lange Ringe geschnitten. Der Rest der Gefäße wurde dann in die jeweilige Konservierungslösung verbracht.

### **2.2 Gruppeneinteilung**

Für den Versuch wurden verschiedene Gruppen erstellt, hinsichtlich Ischämiezeit und Art der Konservierung. Die verschiedenen Ischämiezeiten betragen 60, 120 oder 180 Minuten bei einer Temperatur von 38°C. Nach abgelaufener Ischämiezeit wurde für Versuchstag 1 von jedem Gefäß ein Ring geschnitten und ins Organbad verbracht

(s. Abb.2), um als erste Kontrolle die Funktion des jeweiligen Gefäßes zu testen. Die verbleibenden Koronarien wurden dann in die jeweilige Konservierungslösung verbracht und für 24 Stunden bei 0-1°C gelagert. Hierzu wurde das Lagerungsgefäß in einen Behälter mit einem Eis-Wasser Gemisch gestellt und im Kühlschrank aufbewahrt.

Am zweiten Versuchstag wurden von den gleichen, jetzt konservierten Gefäßen wieder Ringe geschnitten und in das Organbad verbracht.

Bei den verwendeten Konservierungslösungen handelt es sich um

- Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) nach Bretschneider (Custodiol® ; Dr. F. Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland)
- University of Wisconsin-Lösung (UW) (Viaspan®; Bristol-Myers Squibb GmbH, München)
- modifizierte HTK-Lösung mit Hyaluronidase (mHTK)

Tabelle1: Einteilung der Koronarringe

<u>Versuchstag</u>	<u>Normotherme Ischämiezeit in Minuten</u>	<u>24h Konservierung bei 0-1°C</u>	<u>Blutreperfusion</u>
1	60,120, 180	keine	keine
1	180	keine	1 h
2	60, 120, 180	HTK	1 h
2	60, 120, 180	UW	1 h
2	60, 120, 180	mHTK + COP	1 h

Tabelle 2: Zusammensetzung der Konservierungslösungen (mmol/l)

	HTK	mHTK	UW
Na <sup>+</sup>	15	15	30
K <sup>+</sup>	10	10	125
Ca <sup>++</sup>	0,015	0,015	-
Mg <sup>++</sup>	4	4	5
Cl <sup>-</sup>	50	50	-
SO <sub>4</sub> <sup>--</sup>	-	-	5
Phosphat	-	-	25
Glutatarat	1	1	-
Histidin	198	198	-
Lactobionsäure	-	-	100
Tryptophan	2	2	-
Mannit	30	30	-
Raffinose	-	-	30
Adenosin	-	-	5
Allopurinol	-	-	1
Glutathion	-	-	3
Hydroxyethylstärke	-	-	50 g/l
BDM		30 mmol/l	

zusätzlich frisch vor

Gebrauch hinzu gegeben:

Hyaluronidase, 40 mg/l

CaCl<sub>2</sub> 50 µmol/l

Zusätzlich wurde eine Gruppe von Koronargefäßen während der 24-stündigen Konservierung in mHTK-Lösung mit Sauerstoff (Carbogen für medizinische Zwecke, 5 Vol.% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>, Linde Gas Therapeutics GmbH & CoKG, Unterschleißheim), persuffliert (COP, coronary oxygen persufflation). Die Persufflation erfolgte anterograd und der Gasfluss betrug im Mittel 4 ml/min. Die Lagerung der Arterien

erfolgte hier bei einer Temperatur von 1°C (Kühlgerät Messgerätewerk Lauda Dr. R. Wobsea KG, Lauda-Königshofen/Typ RM 3 S, Lauda mgw RM3).

Die Funktion aller Koronarien wurde also zunächst an Versuchstag 1 unmittelbar nach der abgelaufenen Ischämiezeit getestet. In der Gruppe der Gefäße mit 180minütiger normothermer Ischämie wurden sieben Ringe einer einstündigen Blutperfusion unterzogen. An Versuchstag 2 wurden die Ringe nach 24-stündiger Konservierung und einer einstündigen Blutperfusion getestet.

### 2.3 Blutperfusion

Die Blutperfusion erfolgte bei allen Gefäßen mit frischem, oxygeniertem Schweineblut bei 38°C. Das Schweineblut wurde den Schlachttieren beim Entblutungsverfahren durch das Hohlmesser entnommen und in Glasflaschen

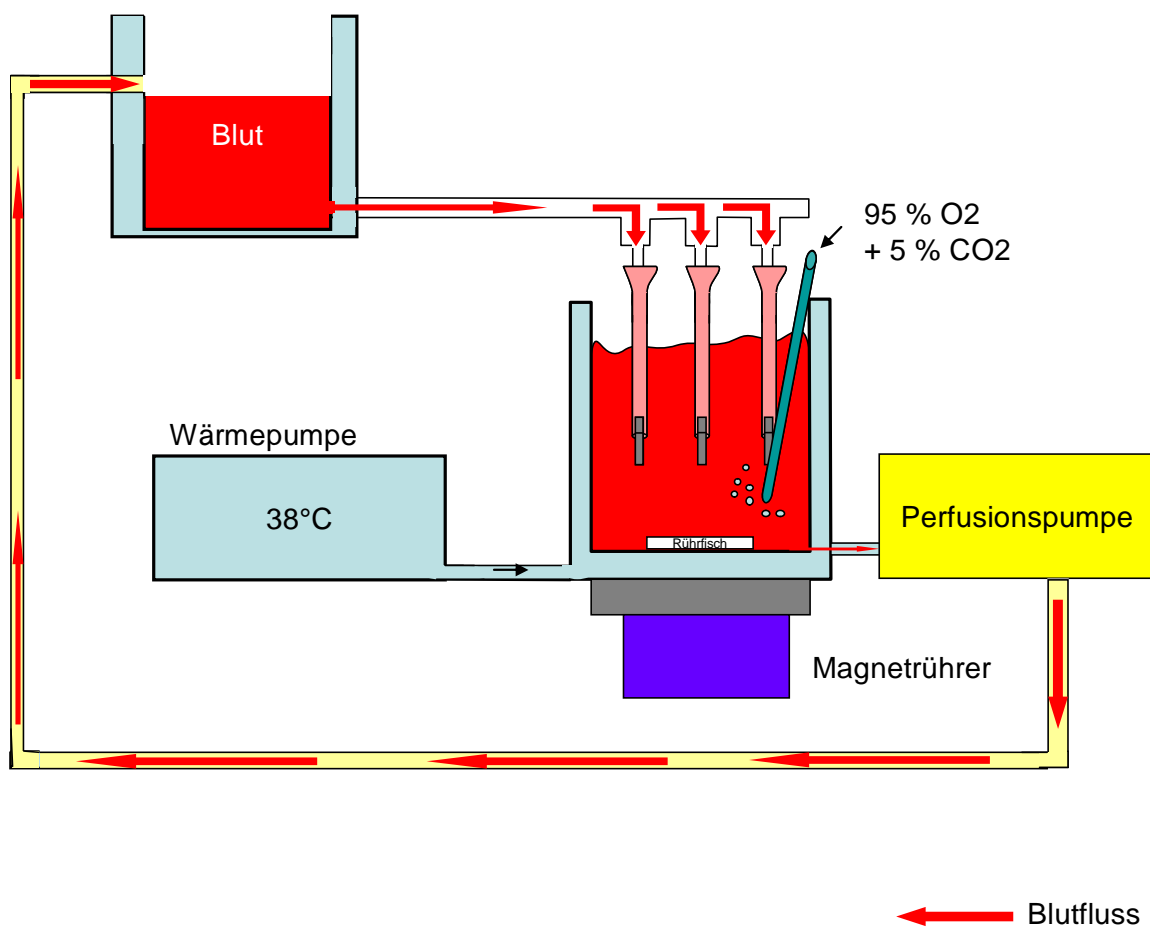


Abbildung 1: Blutperfusion

aufgefangen. Zum Schutz vor Gerinnung wurde es mit Liquemin® heparinisiert (Liquemin® N 25.000, Roche, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach), (1ml/l Blut).

Die Koronargefäße wurden mit ihrem herznahen Ende über eine Kunststoffkanüle (Medtronic, INC, Minneapolis; 30005; Spitzendurchmesser 2 mm) gestülpt und mit einem Seidenfaden daran befestigt.

Das Ende der Koronarien wurde mit einem kleinen Katheterstück versehen, welches als Ausflussverengung mit einem Seidenfaden im Lumen des Gefäßes befestigt wurde. Das Lumen des Katheters betrug 1 mm im Durchmesser.

Die Reperfusion erfolgte nun über eine Dreiwegehahnbank (Discofix® Braun, Meisungen) durch die Gefäßkanülen mit einer Perfusionspumpe (Masterflex easy-load model 7518-60 Microprocessor pump drive Cole-Parmer Instrument Company Chicago, Illinois 60648) unter einem Druck von 20 mmHg mit einem Flow von 7 ml/Minute. Während der Reperfusion wurde das Blut in einem doppelwandigen Glasgefäß, dessen Wand von warmem Wasser durchströmt wurde, von einer Wärmepumpe konstant auf einer Temperatur von 38 °C gehalten. Die Zuführung von Sauerstoff erfolgte mit einem Katheterschlauch (Vygon GmbH & Co.KG, Aachen) und sorgte für die Oxygenierung des Blutes. Damit sich keine festen Blutbestandteile am Boden absetzen konnten wurde das Blut mit einem Magnetrührgerät (Heidolph Typ MR 82) permanent leicht umgerührt (s. Abb.1).

Zur Vorbereitung für die Blutreperfusion und die Persufflation mussten die abgehenden Gefäße an den Koronararterien mit Nahtmaterial (Ethicon Prolene 0,4 metric, 8-0) ligiert werden, um einen Druckverlust ausschließen zu können. Der pH-Wert des Blutes, sowie der O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>-Gehalt wurden an jedem Versuchstag mehrfach mit einem Blutgasanalysegerät (ABL 510 / EML 105, Fa. Radiometer, Kopenhagen) überprüft.

## **2.4 Versuchsaufbau**

Für die Messung der Koronarfunktion wurden die Gefäßringe in ein oxygeniertes Organbad in eine spezielle Apparatur verbracht (siehe Abb. 2). Hier konnten die Kontraktions- und Dilatationsbewegungen der Ringe, die durch Applikation verschiedener Substanzen in das Organbad hervorgerufen wurden, genau verfolgt und aufgezeichnet werden. Die Kontraktionen und Relaxationen wurden mit einem balkenförmigen Wegaufnehmer (Lever Transducer B 40 Type 373; Hugo Sachs

Elektronik, March Deutschland) über einen Verstärker (Transducer-Amplifier Module Type 705/1; Hugo Sachs Elektronik, March Deutschland) auf einen Kompensationsschreiber (Kipp & Zonen, BD 9 two channel, Vertriebs GmbH, Kronberg) übertragen, der den Gefäßdurchmesser aufzeichnete.

Die Koronarringe wurden zwischen zwei triangelförmige Gefäßhalter aus Stahldraht unter einer Dehnbelastung von 2 g in dem Organbad eingespannt. Das Organbad enthielt 10 ml Krebs-Henseleit-Lösung, welche mit Carbogen (für medizinischen Zwecke, 5 Vol.% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>; Linde Gas Therapeutics GmbH+Co.KG) begast wurde. Eine Wärmepumpe (Typ ST-26/11; Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) hielt die Temperatur konstant auf 38°C. Die Krebs-Henseleit-Lösung wurde bei jedem Versuch auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Nach Kolb (1988) beträgt der Ph-Wert des Blutes bei allen Haussäugetieren 7,35 – 7,45. Der Sauerstoffgehalt wurde auf mindestens 600 mmHg pO<sub>2</sub> eingestellt und auf die Zusammensetzung seiner Elektrolyte (vgl. Tab.3) mit den Analysegeräten Acid-Base-Laborator und Electrolyt-Metabolit-Laboratory (ABL 510 / EML 105, Fa. Radiometer, Kopenhagen) überprüft.

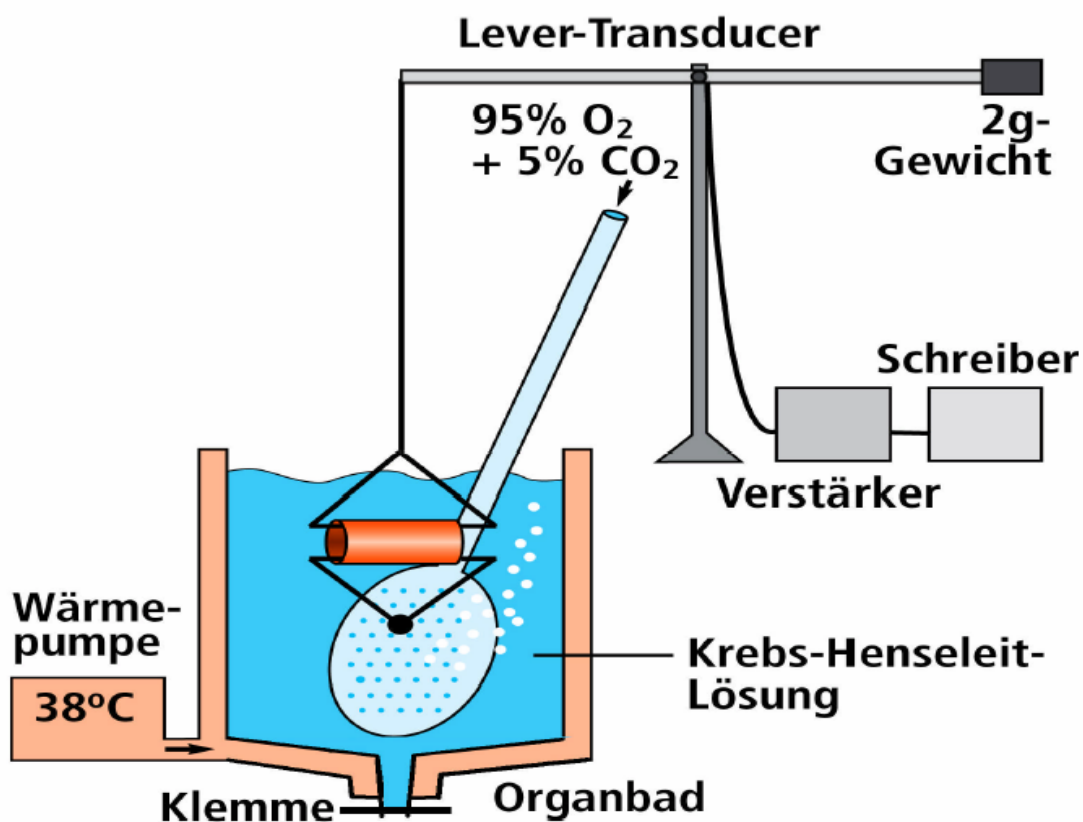


Abbildung 2: Versuchsaufbau zur Messung der Koronargefäße (aus Steinhoff 2004)

Tabelle 3: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung

Substanz	Krebs-Henseleit-Lösung (mmol/l)
Na <sup>+</sup>	143,10
K <sup>+</sup>	5,90
Ca <sup>2+</sup>	1,60
Mg <sup>2+</sup>	1,20
Cl <sup>-</sup>	126,00
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	25,00
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,20
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1,20
Glucose	5,10

## **2.5 Funktionsmessung der Koronarien**

Die Messung der Funktionalität des koronaren Endothels basiert auf einer chemischen Stimulation, die endothelabhängige bzw. –unabhängige Kontraktionen oder Dilatationen hervorruft.

Nach dem Einspannen der Koronarringe in diese Apparatur musste zunächst die, infolge der Dehnbelastung von 2 g eintretende Dilatation der Ringe abgewartet werden, da diese durch die mechanischen Berührungen beim Einspannen spontan kontrahierten. Nachdem ein gleich bleibender Dilatationszustand eingetreten war, wurde mit der Zugabe von Kaliumchlorid das maximale, endothelunabhängige Kontraktionsvermögen der glatten Muskelzellen der Koronarien getestet. Nach Erreichen eines stabilen Kontraktionszustandes erfolgte ein dreimaliges Auswaschen des Organbades mit warmer, oxygenierter Krebs-Henseleit-Lösung, um das zugegebene Pharmakon restlos zu entfernen. Das Erreichen des stabilen Gleichgewichtszustands und das Auswaschen mussten bei jedem Durchgang, bzw. bei jeder Zugabe der verschiedenen Pharmaka erfolgen.

In der Folge wurden dann verschiedene Pharmaka in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Grundsätzlich wurde in jeder Testung Indomethacin (10  $\mu\text{mol/l}$ , I-7378, Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim) gegeben, um den Cyclooxygenaseweg zu hemmen. Dann erfolgte der nächste Durchgang mit Prostaglandin F<sub>2alpha</sub> (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , Dinolytic®, Fa. Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland), um einen kontrahierten Zustand zu erreichen. Mit PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  konnte in den meisten Versuchen eine Kontraktion der Ringe provoziert werden. War dies nicht möglich, so erfolgte die Zugabe U46619-Lösung (125 nmol/l, Fa. Sigma-Alderich GmbH, Steinheim, Deutschland), einem Thromboxanmimetikum.

Nachdem die Kontraktion ihren höchsten Punkt erreicht hatte und ein gleich bleibendes Plateau darstellte, wurde Substanz P (10  $\mu\text{mol/l}$ , Fluka Chemie AG, Buchs Schweiz) hinzugegeben, um eine endothelabhängige Dilatation herbeizuführen. Substanz P induziert eine Dilatation durch NO-Produktion und durch Hyperpolarisation (EDHF). Im folgenden Durchgang wurde nach der Kontraktion durch PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  eine Verdünnungsreihe von Bradykinin (B-3259, Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim) zugegeben, zunächst in vier, dann in sechs Schritten; und im nächsten Durchgang Serotonin in vier Verdünnungsstufen. Zur vollkommenen Hemmung der NO-Synthese wurde im nächsten Durchgang N-Nitro-L-Arginin (L-NNA) vor der PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Gabe hinzugegeben. Um den Versuch abzuschließen, wurden SNP (Sodium-Nitroprussid) und das Zellgift Papaverin (P-3510, Sigma-Alderich Chemie GmbH, Steinheim) verabreicht, um die maximale, endothelunabhängige Dilatation zu erreichen.

Tabelle 4: Verwendete Substanzen zur Messung der Koronarfunktion

Substanz	Abkürzung	Konzentration der Stammlösung	Zugabe in 10 ml KH-Lösung	Konzentration im Organbad
Kaliumchlorid	KCl	2,4 mol/l	250 µl	$6 \times 10^{-2}$ M
Indomethacin	Indo	10 mmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-5}$ M
Prostaglandin	PGF	14,3 mmol/l	10 µl	$1,43 \times 10^{-5}$ M
U46619		125 µmol/l	10 µl	$1,25 \times 10^{-7}$ M
Substanz P	SP	10 µmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-8}$ M
Bradykinin	Brady $10^{-10}$	0,1 µmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-10}$ M
	Brady $10^{-9}$	1 µmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-9}$ M
	Brady $10^{-8}$	10 µmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-8}$ M
	Brady $10^{-7}$	100 µmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-7}$ M
	Brady $10^{-6}$	1 mmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-6}$ M
	Brady $5 \times 10^{-6}$	5 mmol/l	10 µl	$5 \times 10^{-6}$ M
Serotonin	Sero $10^{-9}$	1 µmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-9}$ M
	Sero $10^{-8}$	10 µmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-8}$ M
	Sero $10^{-7}$	100 µmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-7}$ M
	Sero $10^{-6}$	1 mmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-6}$ M
N-Nitro-l-Arginin	L-NNA	50 mmol/l	60 µl	$3 \times 10^{-4}$ M
Sodium-Nitroprussid	SNP	1 mmol/l	10 µl	$1 \times 10^{-6}$ M
Papaverin	Papa	100 µmol/l	20µl	$2 \times 10^{-7}$ M

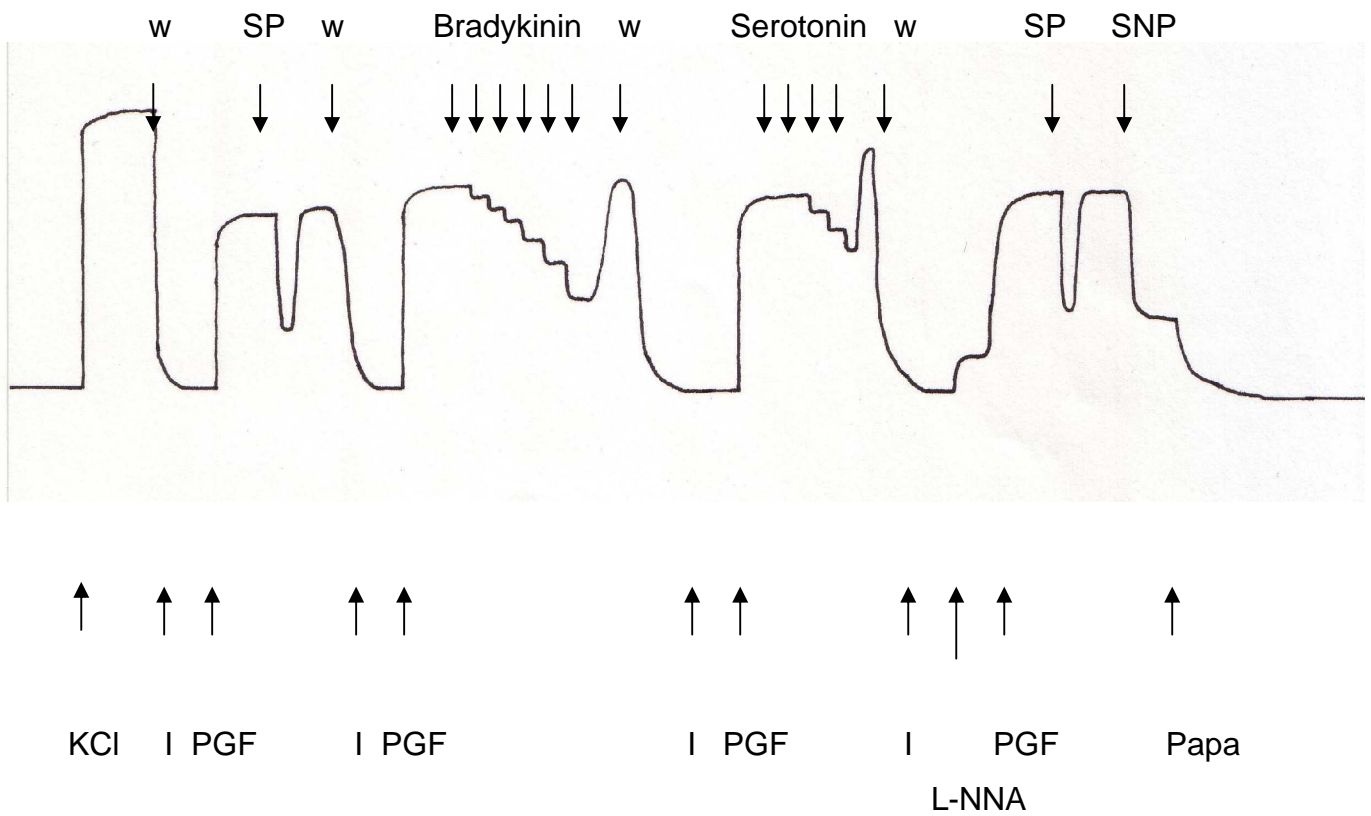


Abbildung 3: Aufzeichnung der koronaren Kontraktionen und Dilatationen

↑: Substanzgabe

KCl: Kaliumchlorid; W: dreimaliges Auswaschen; I. Indomethacin; PGF: Prostaglandin F<sub>2α</sub>; SP: Substanz P, L-NNA: N-Nitro-L-Arginin; SNP: Sodium-Nitroprussid; Papa: Papaverin

## **2.6 Histologie**

Um die Endothelien der Schweinekoronarien auch mikroskopisch untersuchen zu können, wurden histologische Präparate angefertigt. Hierzu verwendeten wir insgesamt 19 Koronargefäße, davon wurden fünf sofort nach Entnahme am Schlachtband mit Krebs-Henseleit-Lösung durchspült und fixiert. Zwei Gefäße wurden nach 180 Minuten normothermer Ischämie untersucht, zwei weitere nach 180` n.l. und jeweils 24 h Konservierung in HTK, bzw. in UW. Des Weiteren wurden vier Gefäße nach 24 h Blutreperfusion untersucht, zwei davon ohne Ischämieschaden und nach 180minütiger normothermer Ischämie. Ebenfalls untersucht wurden vier Koronargefäße nach 180 Minuten Ischämiezeit und 24 h Konservierung, zwei Gefäße in HTK und zwei in UW-Lösung, plus einer einstündigen Blutreperfusion. Die Gefäße wurden im Ganzen mit Papaverin durchspült um eine maximale Dilatation zu erreichen. Zur Fixierung wurde dann ein Gemisch aus 2% Agarose in PBS gepuffertem 4%igem Formalin hergestellt, welches zunächst aufgeköcht wurde. Nach dem Abkühlen auf 40 °C konnte die Lösung vorsichtig in die Koronargefäße eingespritzt werden und dort gelieren. Zur Lagerung wurden die Gefäße in 4%igem Formalin aufbewahrt, bis das Schneiden der Querschnitte erfolgte. Im Institut für Pathologie der Universität zu Köln erfolgte dann das Anfertigen der Histologischen Präparate.

Die Hälfte dieser histologischen Schnitte wurde mit einer Hämalaun-Eosinfärbung gefärbt, die andere Hälfte auf apoptotische Endothelzellen hin untersucht. Dies erfolgte mit einem Apoptose-Test-Kit der Firma Chemicon (ApopTag Peroxidase In Situ Oligo Ligation (ISOL) Apoptosis Detection Kit, Chemicon International). ApopTag benutzt einen eigenen Haarnadel-Oligonukleotid-bezeichnenden Prozess um die Apoptose zu entdecken. Die Technik dieses Test-Kits basiert auf der biochemischen Spezifität des Enzyms T4 DNA-Ligase. Dieses Enzym geht eine kovalente Bindung mit freien, komplementären Enden der DNA-Moleküle der zu untersuchenden Zelle und denen der synthetischen Oligonukleotide des ISOL-Kits ein (blunt-end detection). Die mikroskopische Sichtbarmachung erfolgt über eine Bindung der Peroxidase. Diese verursacht eine Deposition des Substrates Diaminobenzadine (DAB), welche für das Mikroskop visualisiert wird. Das apoptotische Chromatin wird nun sichtbar. Die Kerne dieser Endothelzellen unterscheiden sich im lichtmikroskopischen Bild durch ihre starke braune Anfärbung.

Die Endothelzellen wurden nun unter dem Lichtmikroskop untersucht und ausgezählt. Die Anzahl der gesamten Zellkerne des Endothels eines Schnittes wurde ins Verhältnis gesetzt zu den angefärbten apoptotischen Zellkernen und in Prozent ausgedrückt.

## **2.7 Versuchsauswertung**

Alle ermittelten Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm „Framework“ bearbeitet, sowie Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm „Primer of Biostatistics“ (3. Edition, Glantz SA, McGraw-Hill, Singapore 1992) genutzt. Aus diesem Programm wurde der gepaarte t-Test verwendet. Eine Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.

Die Erstellung von Grafiken und Tabellen erfolgte mit dem Programm „Excel“.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Herzentnahme**

Die Entnahme der Schweineherzen erfolgte am Schlachthof während des Schlachtvorgangs. Die Koronararterien wurden unmittelbar nach Absetzen des Herzens frei präpariert und zum Labor verbracht. Der Transport vom Schlachthof zum Institut dauerte im Mittel 20 Minuten und erfolgte für die freigespülten Koronarien ohne warme Ischämie in begaster Krebs-Henseleit-Lösung bei 37 °C. Die warme Ischämiezeit definierten wir als den Zeitraum zwischen der Herzentnahme am Schlachtband und dem Freipräparieren und Freispülen von Blut und Verbringen in die Testanlage, bzw. in die entsprechende Konservierungslösung.

### **3.2 Aufteilung der Koronarien**

Es wurden Ringe von 155 Koronargefäßen getestet. 87 Ringe wurden sofort an Tag 1 nach der abgelaufenen Ischämiezeit getestet, Nach 24stündiger Konservierung, also an Versuchstag 2, wurden 68 Koronarringe getestet.

Für Versuchstag 2 wurden die Ringe mit den unterschiedlichen Ischämiezeiten in den verschiedenen Konservierungslösungen gelagert.

Die genaue Anzahl der getesteten Koronarringe und die Aufteilung der Testläufe ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Die Versuchsdauer betrug im Mittel 390 Minuten (n=87). Vor der Zugabe des ersten Pharmakon verging eine Äquilibrierungszeit von 45 Minuten (n=324).

Tabelle 5: Aufteilung und Anzahl der getesteten Koronarringe

normotherme Ischämie	0 h Konservierung		24h Konservierung		
		Blutperfusion			Blutperfusion
60'	24	---	20	HTK	7
				mHTK + COP	5
				UW	8
120	24	---	20	HTK	7
				mHTK + COP	6
				UW	7
180	39	7	28	HTK	8
				mHTK + COP	12
				UW	8
	n=87	n=7	n=68		n=68

### 3.3 Koronarfunktion nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie

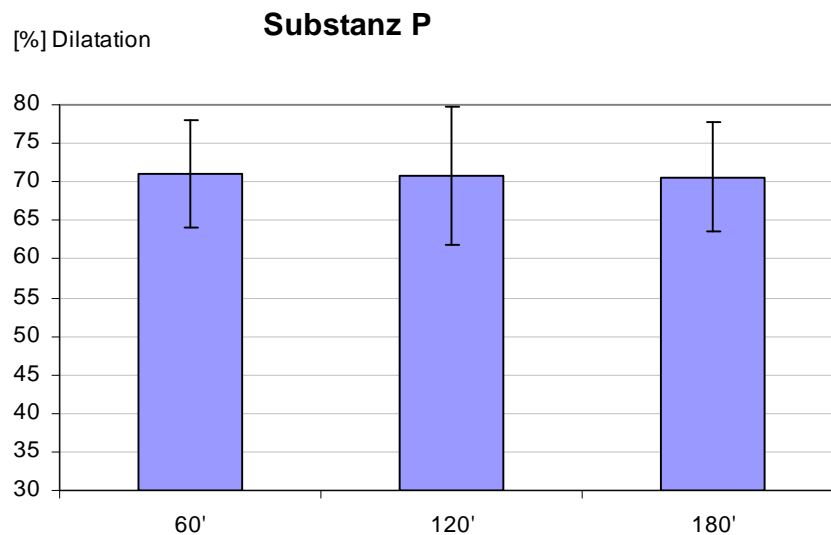
In der Kontrollgruppe von Versuchstag 1, also vor Konservierung und Blutperfusion, erreichte die endothelabhängige Relaxation (EDR) der Ringe durch Substanz P nach vorausgegangener Kontraktion mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  bei allen Gruppen den gleichen Wert (Abb.4). Nach 60 Minuten normothermer Ischämie betrug dieser Wert 71% ( $\pm 7$ , n=43), nach 120 Minuten 71% ( $\pm 11$ , n=45) und nach 180minütiger normothermer Ischämie 71% ( $\pm 9$ , n=64). Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert sowie die Standardabweichung; n stellt die Anzahl der getesteten Ringe dar.

Auch bei der durch die Verdünnungsreihe mit Bradykinin ausgelösten Dilatationen nach Vorkontraktion mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  unterschied sich die EDR nach der höchsten Bradykininkonzentration  $5 \times 10^{-6}$  in den einzelnen Gruppen nicht signifikant ( $p= 0,579$ ). Sie stieg nach stärkster Konzentration in der Gruppe  $\text{nl}_{60}$  auf  $73\% \pm 13$  ( $n=24$ ), in Gruppe  $\text{nl}_{120}$  auf  $74\% \pm 15$  ( $n=22$ ) und in Gruppe  $\text{nl}_{180}$  auf  $76\% \pm 14$  ( $n=36$ ) (Abb.5).

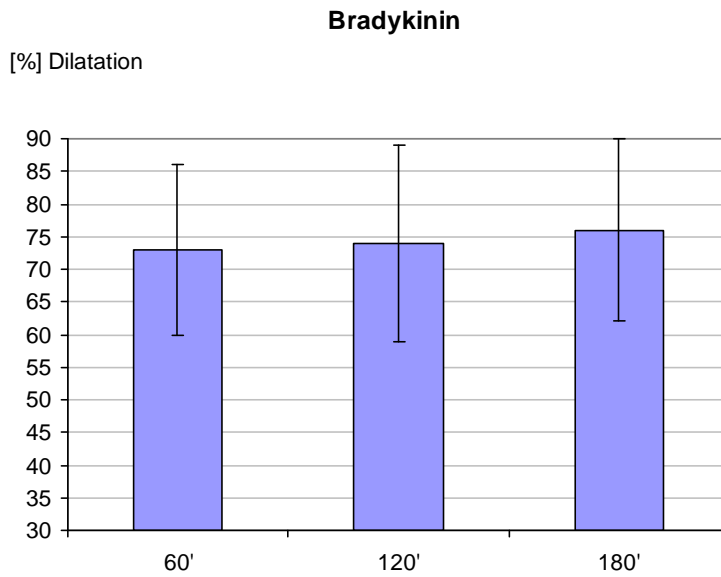
In den grafischen Darstellungen wird jeweils nur die höchste Bradykininkonzentration  $5 \times 10^{-6}$  als Säule dargestellt.

Eine nur geringe Dilatation konnte nach der Zugabe von Serotonin erreicht werden (Abb.6). Bei der Verdünnungsstufe mit der Konzentration  $10^{-6}$  M kam es in allen Gruppen zu einer Kontraktion der Ringe (Abb.7).

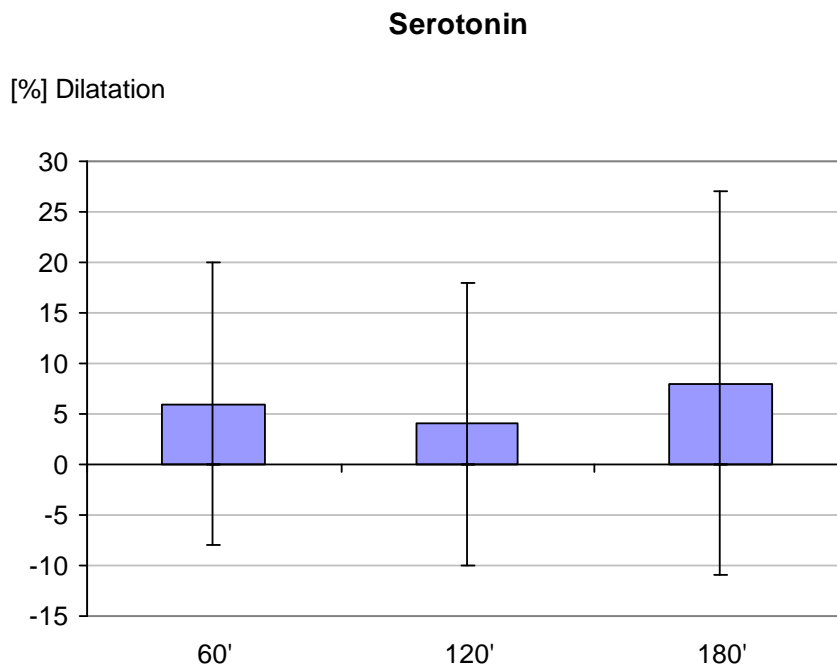
Nach Hemmung der NO-Produktion durch L-NNA sank die Substanz P induzierte Dilatation auf  $57\% \pm 13$  ( $n=40$ ) in der 60-Minutengruppe. Die NO-unabhängige Relaxation des Endothels nach 120minütiger Ischämie lag bei  $51\% \pm 11$  ( $n=43$ ) und nach 180 Minuten ebenfalls bei  $52\% \pm 12$  ( $n=61$ ) (Abb.8).



**Abbildung 4:** Endothelabhängige Relaxation der Koronararterien des Schweins nach Zugabe von Substanz P in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion durch Prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$ , nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie

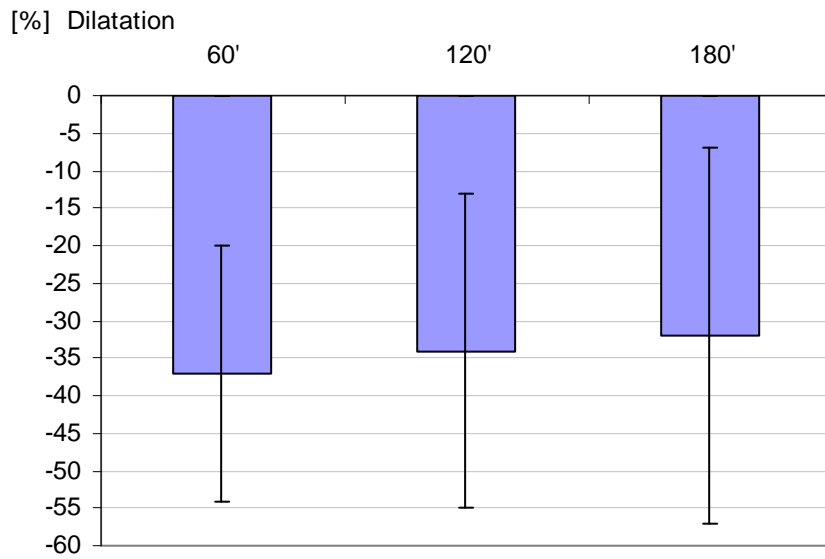


**Abbildung 5:** Endothelabhängige Relaxation der Koronararterien des Schweins nach Zugabe der Verdünnungsreihe von Bradykinin ( $10^{-10}$  bis  $5 \times 10^{-6}$ ) in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion durch Prostaglandin<sub>2α</sub>, nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie



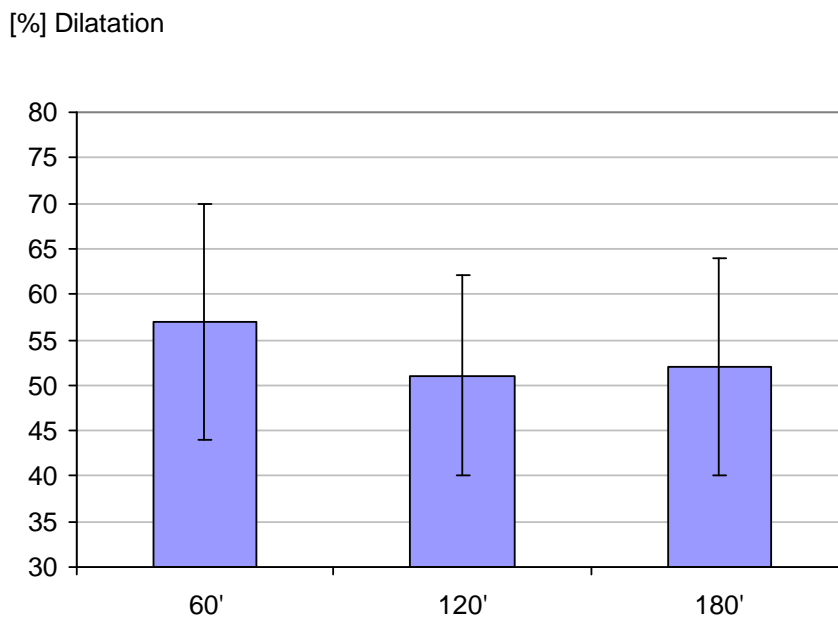
**Abbildung 6:** Dilatation nach Zugabe der Konzentration  $10^{-7}$  von Serotonin in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion durch Prostaglandin<sub>2α</sub>, nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie

### Serotonin



**Abbildung 7:** Negative Dilatation, d.h. Kontraktion nach Zugabe der Konzentration  $10^{-6}$  von Serotonin in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion durch Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ , nach 60, 120 und 180 Minuten

### Substanz P nach L-NNA



**Abbildung 8:** Endothelabhängige Relaxation der Koronararterien des Schweins nach Zugabe von Substanz P in Prozent, bezogen auf die vorherige Kontraktion, die mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ausgelöst wurde, nach Hemmung der NO-Produktion mit L-NNA.

Tabelle 6: EDR-Werte nach verschiedenen Ischämiezeiten

	60 Minuten	120 Minuten	180 Minuten
SP	71 ±7 (n=43)	71 ±11 (n=45)	71±9 (n=64)
Bradykinin 5 x 10 <sup>-6</sup>	73 ±13 (n=24)	74 ±15 (n=22)	76 ±14 (n=36)
Serotonin 10 <sup>-7</sup>	6 ±14 (n=43)	4 ±14 (n=45)	8 ±10 (n=60)
Serotonin 10 <sup>-6</sup>	-37 ±17 (n=38)	-34 ±21 (n=42)	-32 ±25 (n=63)
L-NNA/SP	57±13 (n=40)	51 ±11 (n=43)	52 ±12 (n=61)

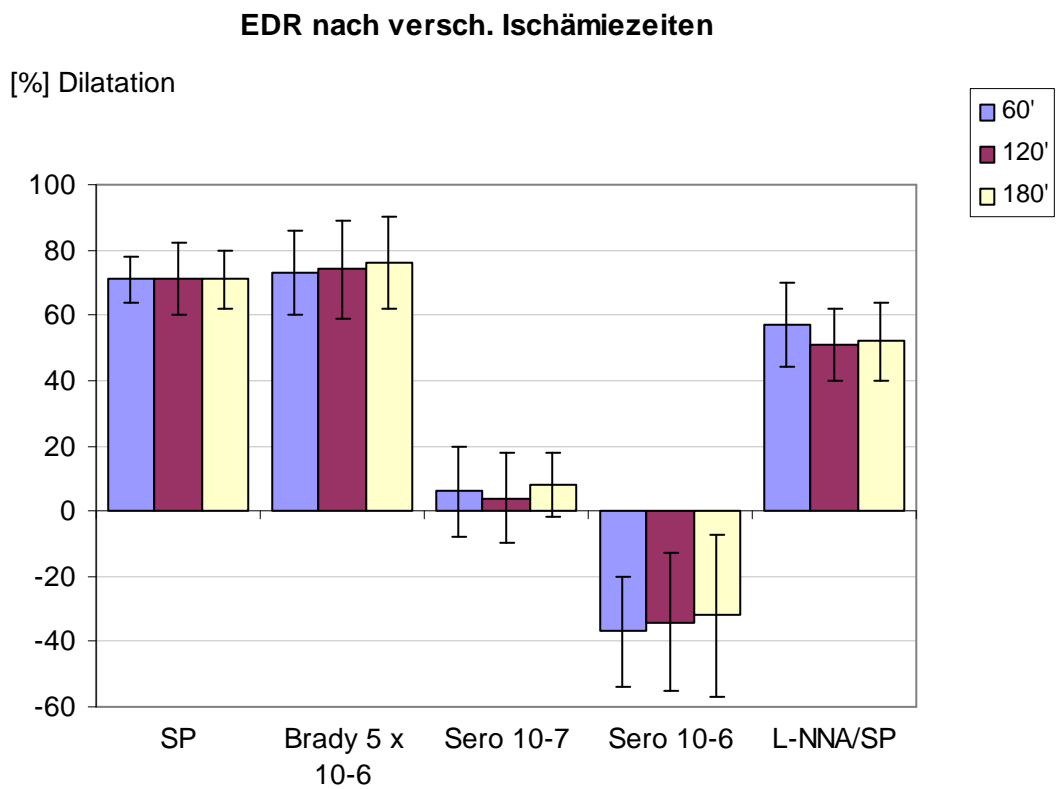


Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der endothelabhängigen Relaxation nach den verschiedenen Ischämiezeiten

### 3.4 Koronarfunktion nach 180 Minuten normothermer Ischämie und einer Stunde Blutreperfusion ohne Konservierung

Die Ringe, die nach 180 Minuten normothermer Ischämie eine Stunde lang mit Blut reperfundiert wurden, erreichten alle höhere Dilatationswerte als die Ringe der Gruppe ohne Reperfusion (Abb. 10). Nach Substanz P-Gabe kam ein Dilatationswert von  $80\% \pm 10$  (n=7) zustande, nach stärkster Bradykininkonzentration, das heißt  $5 \times 10^{-6}$ ,  $92\% \pm 3$  (n=6) und nach Zugabe der Serotoninverdünnungsreihe  $10^{-9}$  bis  $10^{-7}$   $10\% \pm 8$  (n=7), die Kontraktion nach der letzten Serotoningabe  $10^{-6}$  erreichte einen Wert von  $34\% \pm 20$  (n=7). Nach Hemmung der NO-Produktion betrug die durch EDHF ausgelöste Relaxation  $53\% \pm 5$  (n=7) (vgl.Tab.8).

Im gepaarten t-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied nach der SP-Messung ( $p=0,014$ ) und nach der Bradykininverdünnungsreihe ( $p=0,028$ ). Die höheren Dilatationswerte nach Serotonin und nach NO-Hemmung wiesen gegenüber den nicht reperfundierten keine Signifikanz auf ( $p=0,808$ ;  $p=0,085$ ;  $p=0,730$ ).

#### 180`normotherme Ischämie mit und ohne Blutreperfusion

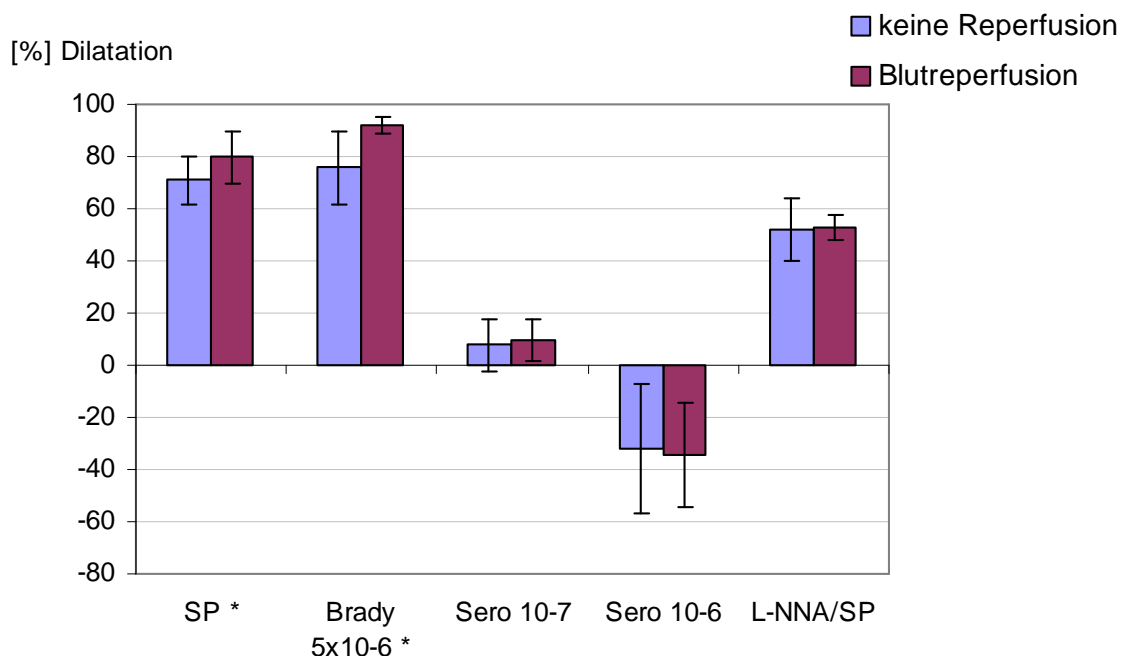


Abbildung 10: Vergleichende Darstellung der EDR nach 180 Minuten normothermer Ischämie mit und ohne Blutreperfusion

Tabelle 7: Kontroll- und Reperfusionswerte der Dilatationen von Koronarringen aus gleichen Koronargefäßen nach 180` normothermer Ischämie ohne Reperfusion (a) und mit Reperfusion (b). Die Signifikanzen beziehen sich auf die Gruppe der Kontroll- bzw. Reperfusionswerte.

Koronarien	SP	Bradykinin $5 \times 10^{-6}$	Serotonin $10^{-7}$	Serotonin $10^{-6}$	L-NNA
92a/b	72/85		7/6	-18/-21	47/57
104a/b	63/78	55/93	0/10	-23/-14	31/61
112a/b	85/96	86/96	62/18	-4/-32	64/52
116a/b	69/75	68/90	0/23	3/-15	62/49
155a/b	59/82	68/94	0/0	-20/-40	43/54
156a/b	62/63	82/90	0/5	-47/-71	49/46
157a/b	81/83	89/89	17/10	-42/-71	60/52
p	0,014 *	0,028 *	0,808	0,085	0,730

**Dosis-Wirkungskurve Bradykinin nach 180 Minuten  
n. I. mit und ohne Blutreperfusion**

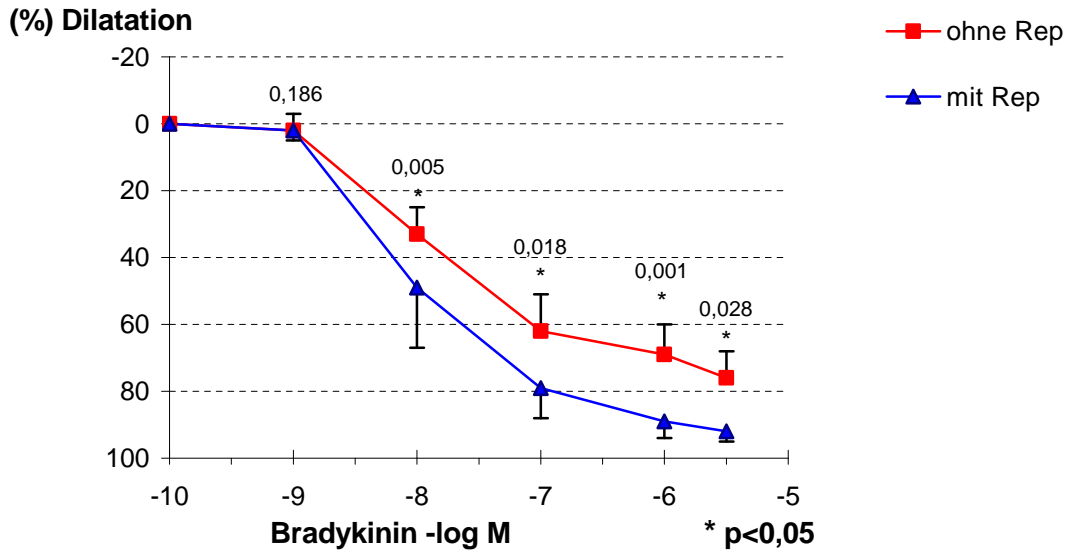


Abbildung 11: Dosis-Wirkungskurve von Bradykinin nach Vorkontraktion mit Prostaglandin F<sub>2α</sub> nach 180 Minuten normothermer Ischämie mit und ohne Blutreperfusion ohne Konservierung

Tabelle 8: EDR-Werte nach 180 Minuten normothermer Ischämie und einer Stunde Blutreperfusion

	180 Minuten + Blutreperfusion	Kontrollgruppe
SP	80 ±10 (n=7)	71± 9 (n=64)
Bradykinin 5 x 10 <sup>-6</sup>	92 ±3 (n=6)	76 ± 14 (n=14)
Serotonin 10 <sup>-7</sup>	10 ±8 (n=7)	8 ± 10 (n=60)
Serotonin 10 <sup>-6</sup>	-34 ±20 (n=7)	-32 ± 25 (n=63)
L-NNA/SP	53 ±5 (n=7)	52 ± 12 (n=61)

### **3.5 Koronarfunktion nach normothermer Ischämie, 24 h Konservierung und einer Stunde Blutreperfusion**

Nach 24 Stunden Konservierung wurden die Koronarringe aus jeder Gruppe eine Stunde lang mit Blut reperfundiert. Danach wurde ihre Funktion im Organbad getestet.

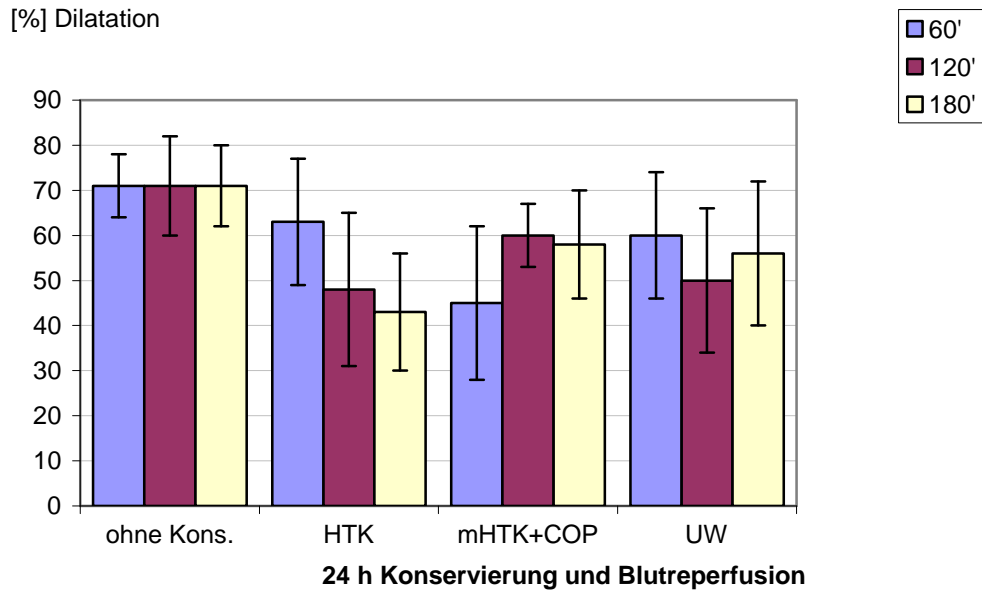
#### **3.5.1 Gruppe 60 Minuten normotherme Ischämie, 24 h Konservierung und eine Stunde Blutreperfusion**

Nach Konservierung in HTK-Lösung und nachfolgender Blutreperfusion sank die endotheliale Relaxation der Koronarringe im Gegensatz zu den nicht konservierten Ringen von Versuchstag 1 um durchschnittlich 7%. Die EDR der SP-Werte (Abb. 12) war signifikant verringert ( $p=0,035$ ). Ebenfalls signifikant verändert zeigten sich die Werte der Bradykinin-Dilatation (Abb. 13) bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  ( $p=0,001$ ).

Nach Konservierung in mHTK+COP und nachfolgender Blutreperfusion sanken die Dilatationswerte merklich; die Sensibilität der Gefäße gegenüber dilatationsauslösender Pharmaka wurde deutlich weniger, im Durchschnitt verringerten sich die Dilatationswerte um 16,8%. Auch hier zeigte sich eine signifikante Verringerung der SP-Werte ( $p=0,040$ ) ebenso wie bei den Bradykininwerten bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  ( $p=0,013$ ).

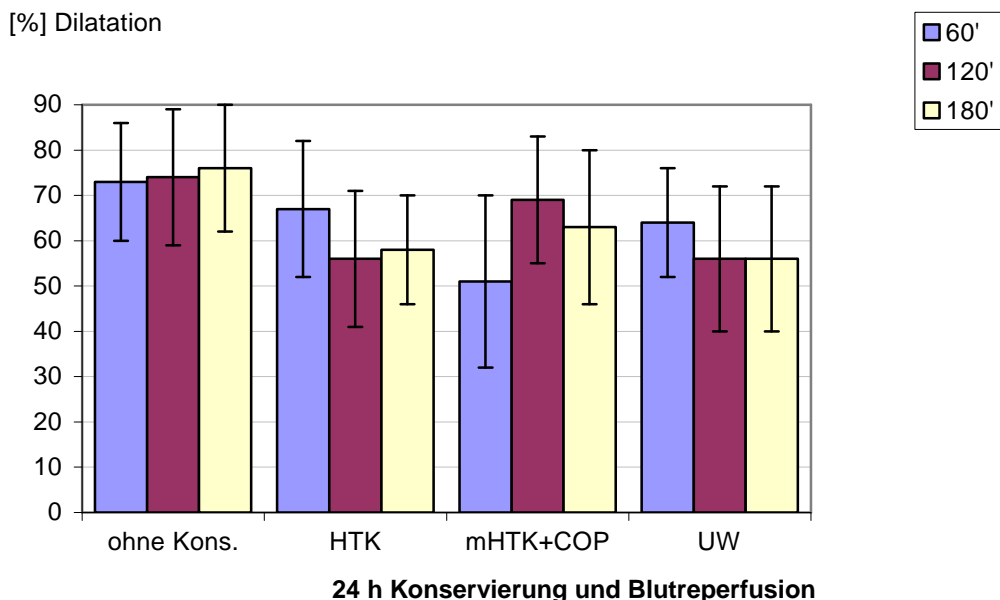
Keine signifikante Änderung zeigte sich nach 24stündiger Konservierung in UW-Lösung und Blutreperfusion nach Dilatation mit SP ( $p=0,323$ ). Die Werte nach Bradykininkonzentration  $5 \times 10^{-6}$  verringerten sich hingegen signifikant ( $p= 0,047$ ). Hier war die endotheliale Dilatation der Ringe um 8 % verringert.

### SP nach Blutreperfusion



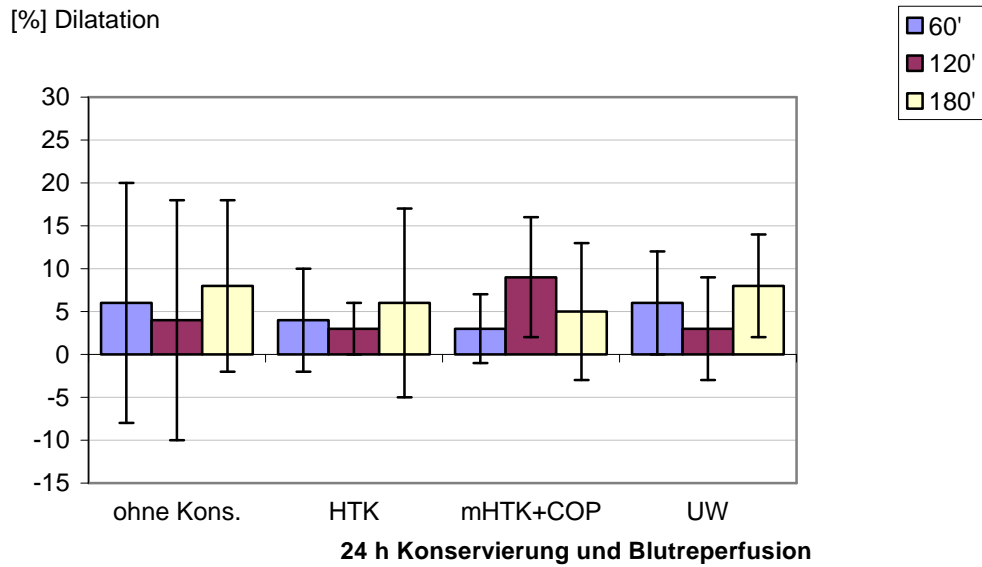
**Abbildung 12:** Vergleichende Darstellung der EDR nach 60,120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von SP

### Bradykinin nach Blutreperfusion



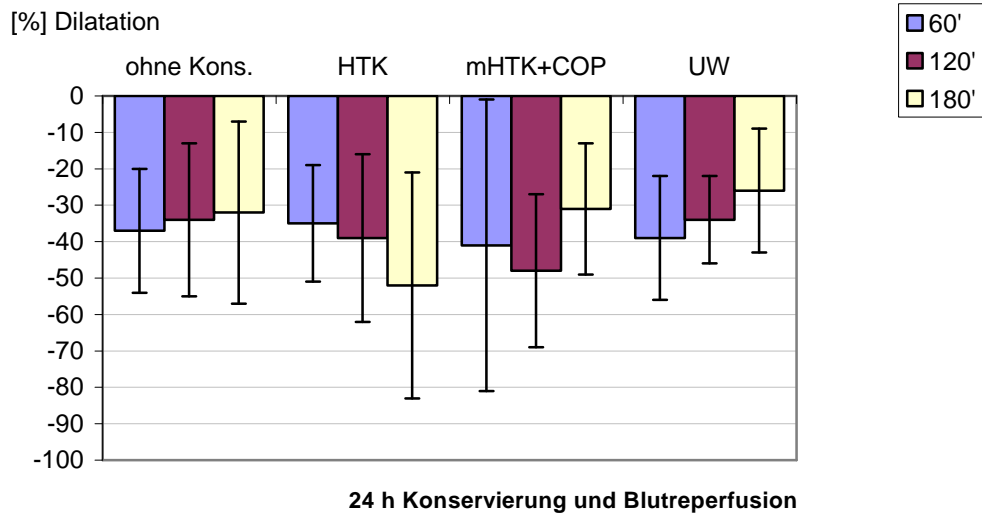
**Abbildung 13:** Vergleichende Darstellung der EDR nach 60,120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von Bradykinin  $5 \times 10^{-6}$  M

### Serotonin nach Blutreperfusion



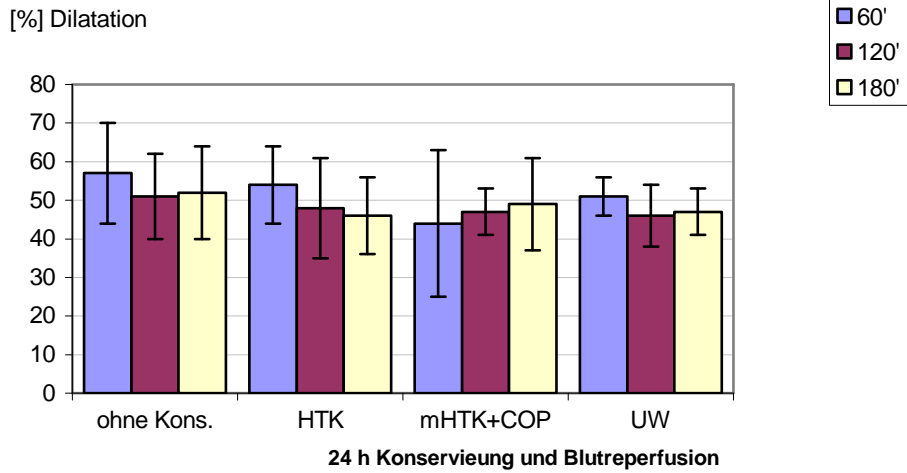
**Abbildung 14:** Vergleichende Darstellung der EDR nach 60,120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von Serotonin  $10^{-7}$  M

### Serotonin nach Blutreperfusion



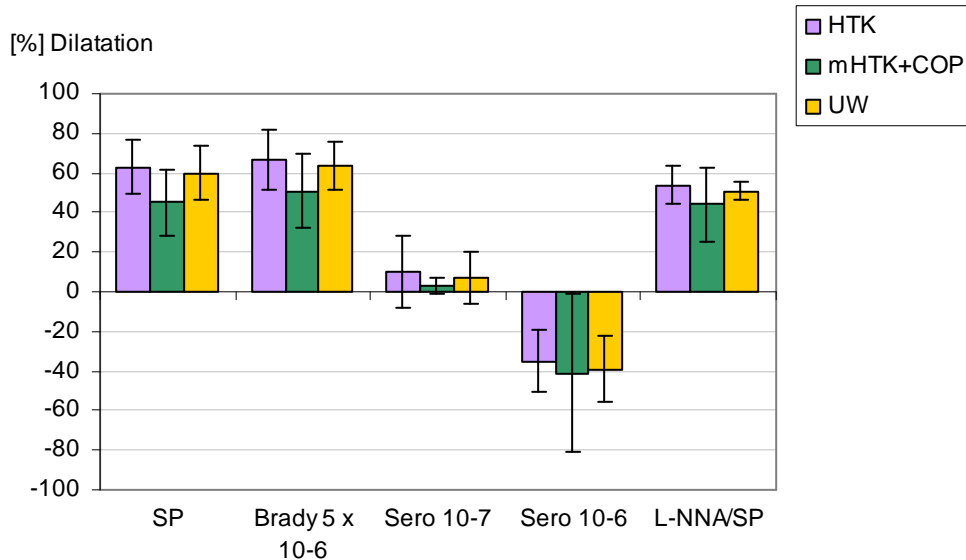
**Abbildung 15:** Vergleichende Darstellung der EDR nach 60,120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von Serotonin  $10^{-7}$  M

### L-NNA/SP nach Blutreperfusion



**Abbildung 16:** Vergleichende Darstellung der EDR nach 60,120 und 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung, sowie nach 24 h Konservierung in den jeweiligen Konservierungslösungen und Blutreperfusion nach Zugabe von L-NNA und SP

### 60' n. I. + 24h Kons. + 1 h Blutreperfusion



**Abbildung 17:** EDR nach 60 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung in HTK-; mHTK+COP; bzw. UW-Lösung und einer Stunde Blutreperfusion

### 3.5.2 Gruppe 120 Minuten normotherme Ischämie, 24 h Konservierung und einer Stunde Blutreperfusion

Die EDR der Gruppe 120 Minuten normotherme Ischämie nach 24stündiger Konservierung in HTK-Lösung und anschließender Blutreperfusion sank nach SP und Bradykinin  $5 \times 10^{-6}$  um 11%, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ( $p= 0,248$ ). Die Dilatationen nach Serotonin und auch nach NO-Hemmung unterschieden sich kaum, bzw. gar nicht von den Kontrollringen. Auch nach einer Konservierung mit mHTK+COP verringerte sich die Dilatation der Koronarringe nicht signifikant ( $p= 0,143$ ) um im Mittel lediglich 4,5%, d.h. noch geringer als nach Konservierung mit HTK.

Nach 24stündiger Konservierung in UW-Lösung verringerte sich die Dilatation ebenfalls nur geringfügig und nicht signifikant um im Mittel 4% ( $p= 0,085$ ).

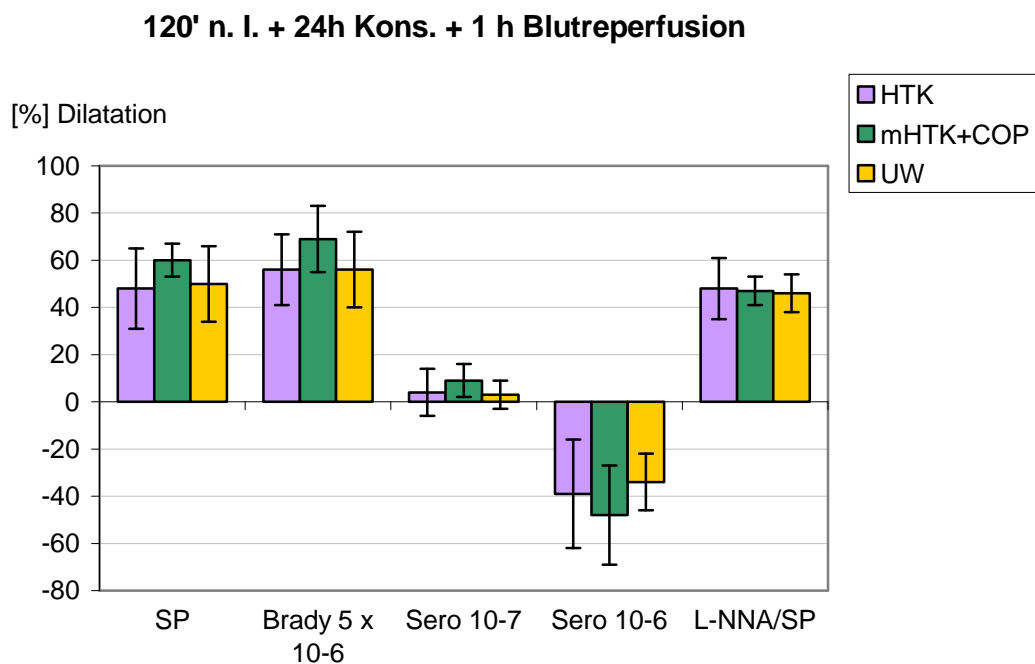


Abbildung 18: EDR nach 120 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung in HTK-; mHTK+COP; bzw. UW-Lösung und einer Stunde Blutreperfusion

### 3.5.3 Gruppe 180 Minuten normotherme Ischämie, 24 Stunden Konservierung und eine Stunde Blutreperfusion

In dieser Gruppe betrug die endotheliale Relaxation der Koronarringe nach Konservierung mit HTK-Lösung und nach einstündiger Blutreperfusion 13,5% weniger als bei der Kontrollgruppe, dieser Unterschied erwies sich im t-Test als signifikant ( $p=0,004$ ).

In der Gruppe mit einer Konservierung in mHTK+COP sank die EDR ebenfalls signifikant ( $p=0,028$ ) um 8%.

Am wenigsten reduzierte sich die Dilatationsfähigkeit der Ringe nach einer Konservierung in UW-Lösung. Hier sanken die Werte um 4%, signifikante Unterschiede zeigten sich allerdings nur nach SP und Bradykinin  $5 \times 10^{-6}$  ( $p=0,020$ ), nach Serotonin blieben die Dilatationswerte gleich und die NO-unabhängige EDR verringerte sich nur geringfügig.

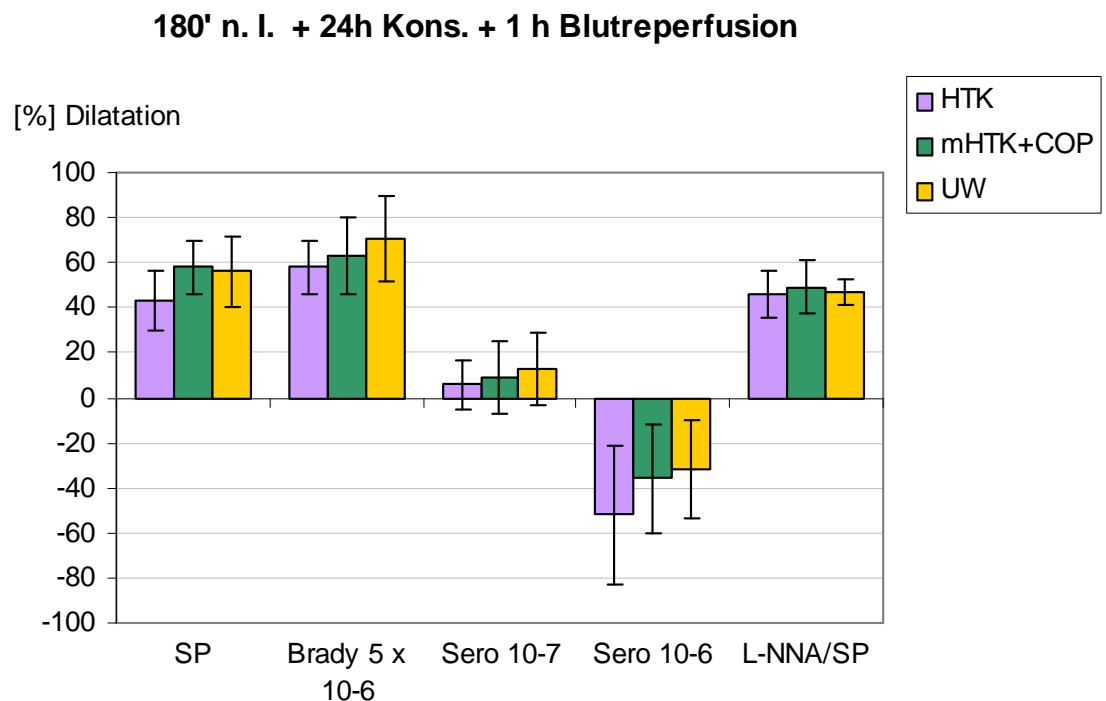


Abbildung 19: EDR nach 180 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung in HTK-; mHTK-; bzw. UW-Lösung und einer Stunde Blutreperfusion

Die Dosis-Wirkungskurven, die im Folgenden dargestellt sind, zeigen die Abhängigkeit der endothelialen Relaxation von der unterschiedlichen Konzentration des Bradykinins, bzw. Serotonins bei den Gefäßen, welche eine normotherme Ischämie von 180 Minuten durchmachten, mit unterschiedlicher Konservierung und Blutperfusion bzw. ohne.

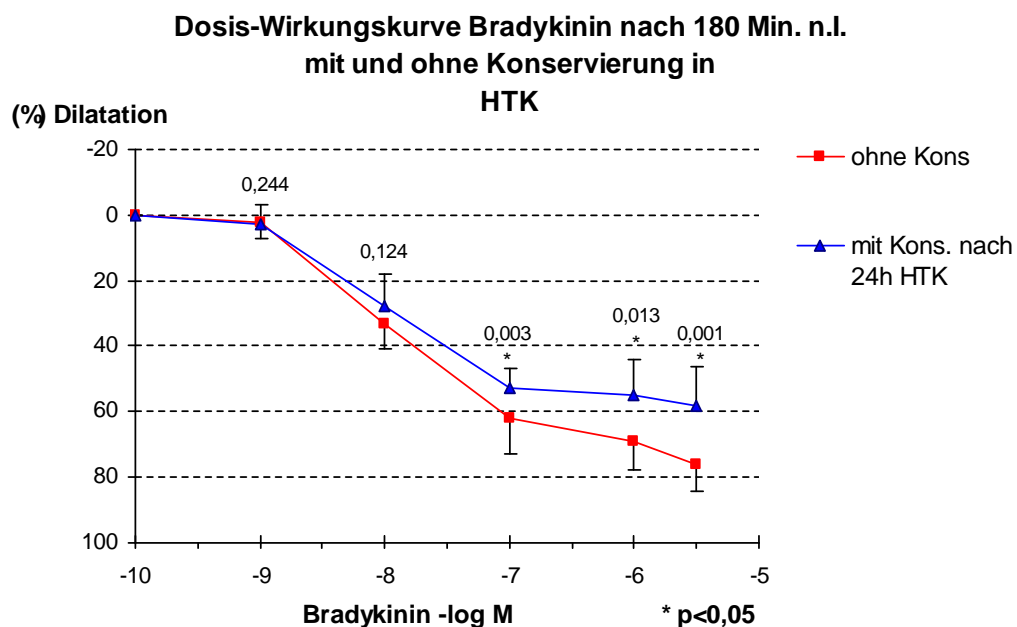


Abbildung 20: Dosis-Wirkungskurve von Bradykinin nach Vorkontraktion mit Prostaglandin F<sub>2α</sub> nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutperfusion und nach 24 h Konservierung in HTK mit Blutperfusion

**Dosis-Wirkungskurve Bradykinin nach 180 Minuten n. I.  
mit und ohne Konservierung in  
mHTK+COP**

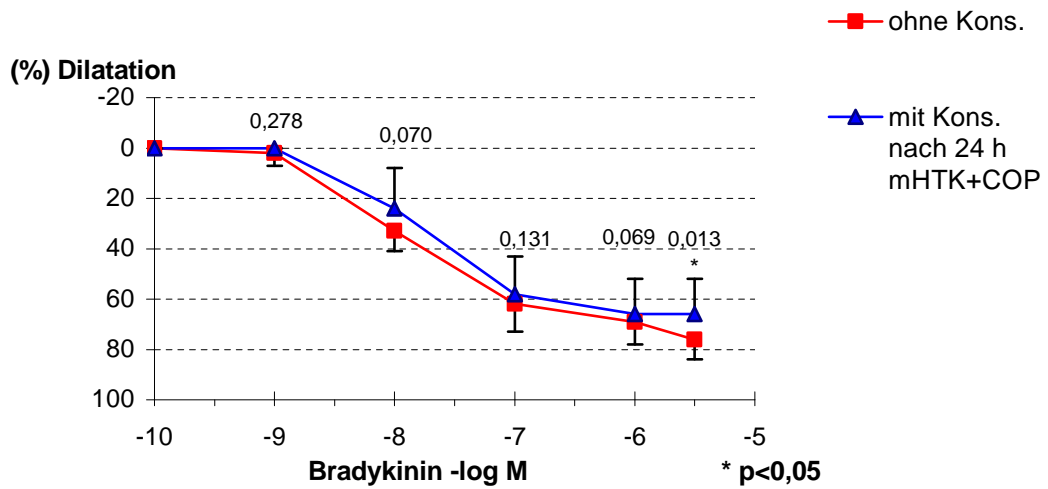


Abbildung 21: Dosis-Wirkungskurve von Bradykinin nach Vorkontraktion mit Prostaglandin F<sub>2α</sub> nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutperfusion und nach 24h Konservierung in mHTK+COP mit Blutperfusion

**Dosis-Wirkungskurve Bradykinin nach 180 Minuten n. I.  
mit und ohne Konservierung in  
UW**

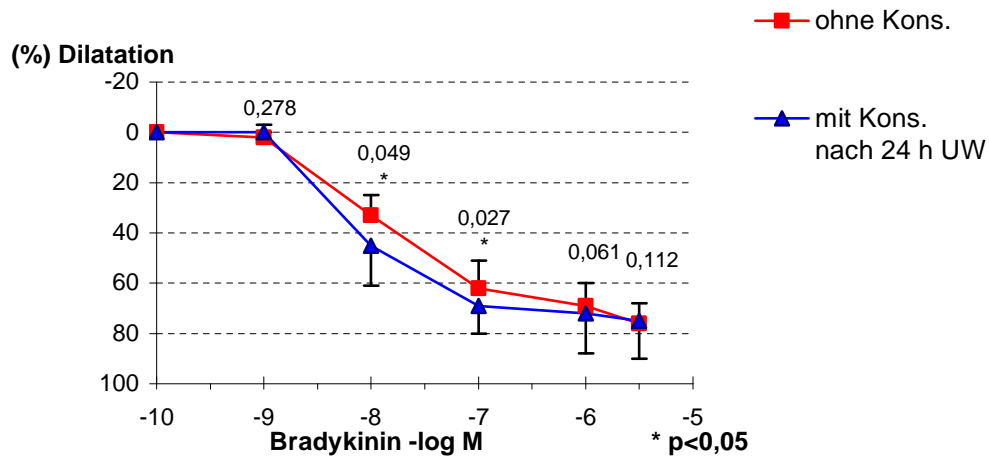


Abbildung 22: Dosis-Wirkungskurve von Bradykinin nach Vorkontraktion mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutperfusion und nach 24 h Konservierung in UW mit Blutperfusion

**Dosis-Wirkungskurve Serotonin  
HTK**

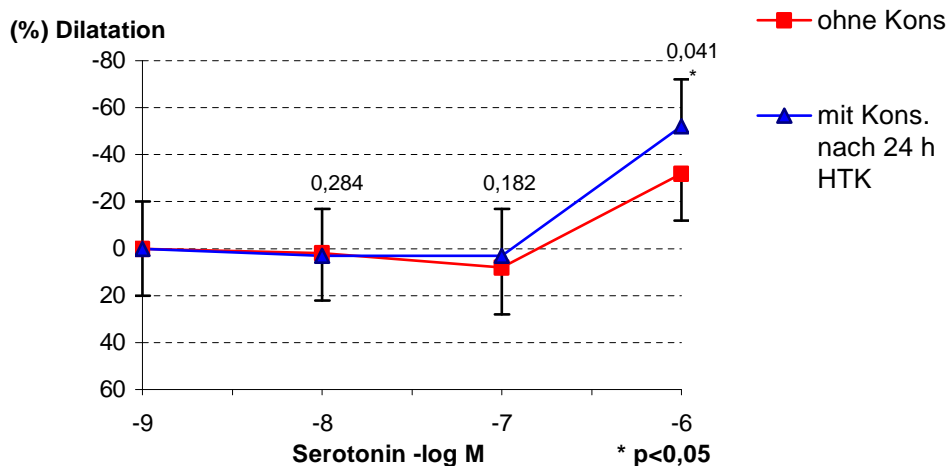


Abbildung 23: Dosis-Wirkungskurve von Serotonin nach Vorkontraktion mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutperfusion und nach 24 h Konservierung in HTK mit Blutperfusion

### Dosis-Wirkungskurve Serotonin mHTK + COP

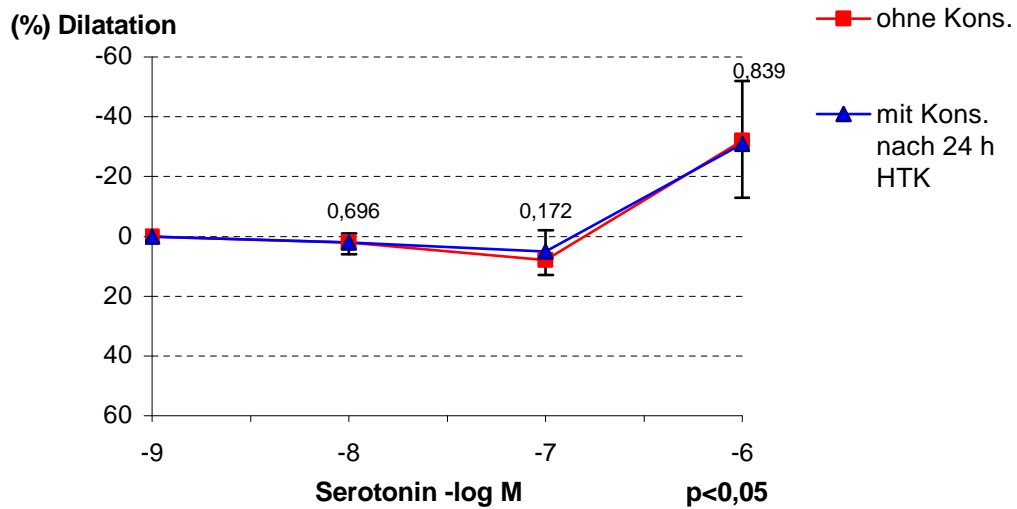


Abbildung 24: Dosis-Wirkungskurve von Serotonin nach Vorkontraktion mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutreperfusion und nach 24 h Konservierung in mHTK + COP mit Blutreperfusion

### Dosis-Wirkungskurve Serotonin UW

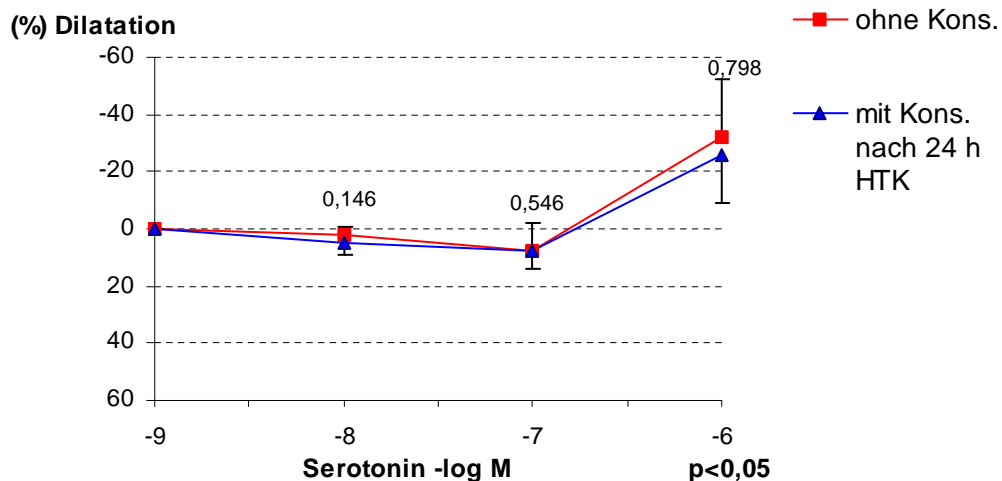


Abbildung 25: Dosis-Wirkungskurve von Serotonin nach Vorkontraktion mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  nach 180 Minuten normothermer Ischämie ohne Konservierung und ohne Blutreperfusion und nach 24 h Konservierung in UW mit Blutreperfusion

Tabelle 9: EDR-Werte nach 60 Minuten normothermer Ischämie, 24 h Konservierung und einer Stunde Blutperfusion

	HTK	mHTK+COP	UW
SP	48 ±17 (n=7)	60 ±7 (n=6)	50 ±16 (n=6)
Bradykinin (5x10 <sup>-6</sup> )	56 ±15 (n=6)	69 ±14 (n=6)	56 ±16 (n=6)
Serotonin (10 <sup>-7</sup> )	3 ±3 (n=5)	9 ±7 (n=6)	3 ±6 (n=7)
Serotonin (10 <sup>-6</sup> )	-39 ±23 (n=7)	-48 ±21 (n=6)	-34 ±12 (n=6)
L-NNA/SP	48 ±13 (n=7)	47 ±6 (n=6)	46 ±8 (n=7)
Differenz L-NNA/SP	0 (n=7)	13 (n=6)	4 (n=6)

Tabelle 10: EDR-Werte nach 120 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung und einer Stunde Blutperfusion

	HTK	mHTK+COP	UW
SP	63 ±14 (n=7)	45 ±17 (n=4)	60 ±14 (n=8)
Bradykinin (5x10 <sup>-6</sup> )	67 ±15 (n=6)	51 ±19 (n=5)	64 ±12 (n=7)
Serotonin (10 <sup>-7</sup> )	4 ±6 (n=6)	3 ±4 (n=5)	6 ±6 (n=8)
Serotonin (10 <sup>-6</sup> )	-35 ±16(n=7)	-41 ±40 (n=4)	-39 ±17 (n=8)
L-NNA/SP	54 ±10(n=7)	44 ±19 (n=5)	51 ±5 (n=8)
Differenz L-NNA/SP	9 (n=7)	1 (n=4)	9 (n=8)

Tabelle 11: EDR-Werte nach 180 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung und einer Stunde Blutreperfusion

	HTK	mHTK+COP	UW
SP	43 ±13 (n=8)	58 ±12 (n=12)	56 ±16 (n=8)
Bradykinin ( $5 \times 10^{-6}$ )	58 ±12 (n=6)	63 ±17 (n=11)	71 ±19 (n=8)
Serotonin ( $10^{-7}$ )	6 ±11 (n=8)	5 ±8 (n=11)	8 ±6 (n=7)
Serotonin ( $10^{-6}$ )	-52 ±31 (n=6)	-31 ±18 (n=11)	-26 ±17 (n=7)
L-NNA/SP	46 ±10 (n=8)	49 ±12 (n=12)	47 ±6 (n=8)
Differenz L-NNA/SP	3 (n=8)	3 (n=12)	9 (n=8)

Die Tabellen 9-11 zeigen die tatsächlich erreichten Werte der endothelabhängigen Relaxation nach der erfolgten Koronarmessung. Zusätzlich angegeben ist hier die Differenz zwischen dem NO-Weg und der EDHF-bedingten Relaxation.

### **3.6 Histologie**

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung zeigte sich bei allen Gefäßen ein nahezu intaktes Endothel mit unbeschädigten Zellkernen. Nur wenige Zellen waren durch die Präparation von der Endothelschicht abgelöst. Dieser Zustand war bei allen Präparaten zu finden, unabhängig von der vorangegangenen Ischämiedauer oder der Konservierungsart bzw. -dauer. Sowohl nach sofortiger Präparation nach Entnahme am Schlachtband, als auch nach 180 Minuten normothermer Ischämie und 1 bzw. 24 Stunden Blutreperfusion war eine intakte Endothelschicht zu erkennen.

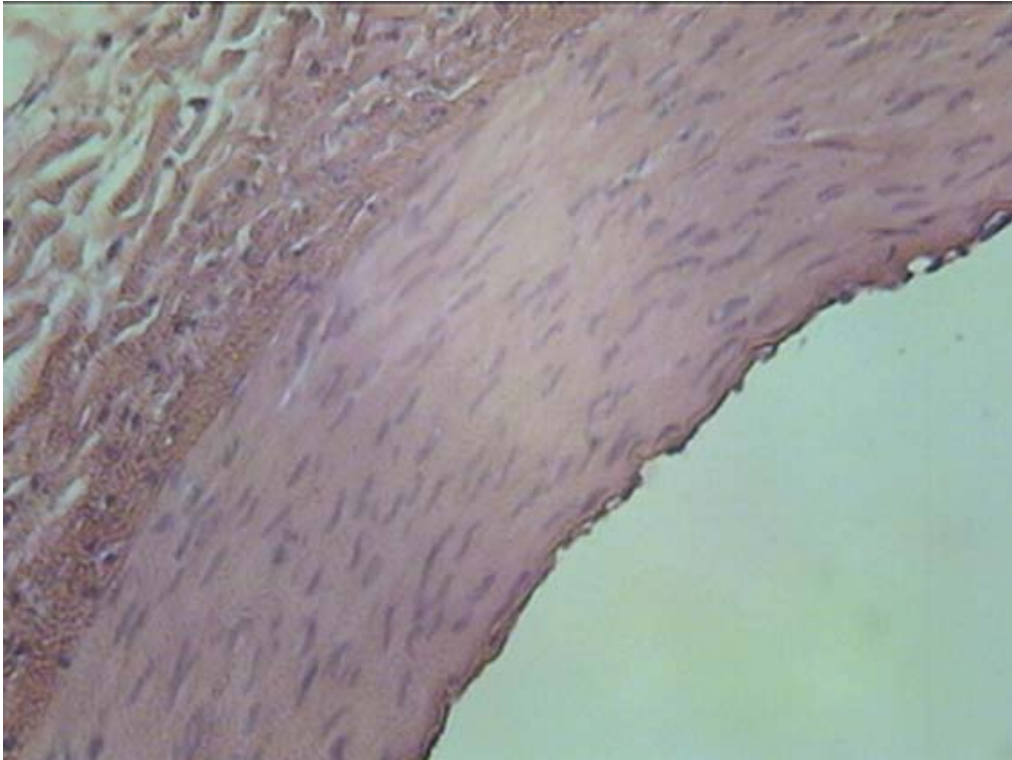


Abbildung 26: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines nach dem Schlachtvorgang entnommenen Koronargefäß des Schweins ohne Ischämieschaden, HE-Färbung

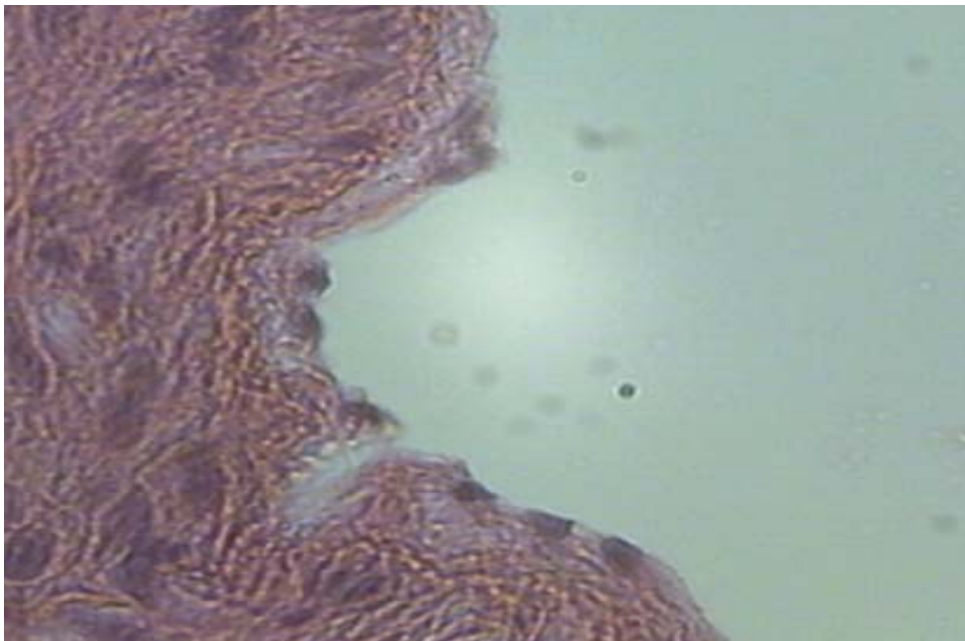


Abbildung 27: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines Koronargefäß des Schweins nach 180 Minuten normothermer Ischämie, HE-Färbung

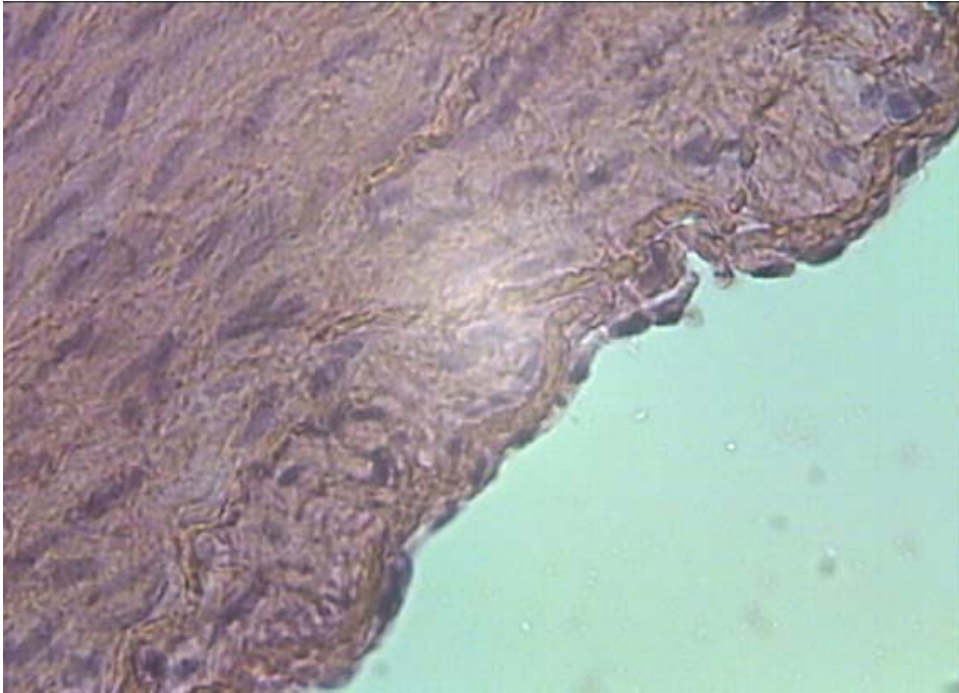


Abbildung 28: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines Koronargefäß des Schweins nach 180 Minuten normothermer Ischämie und 24stündiger Konservierung in HTK-Lösung, HE-Färbung

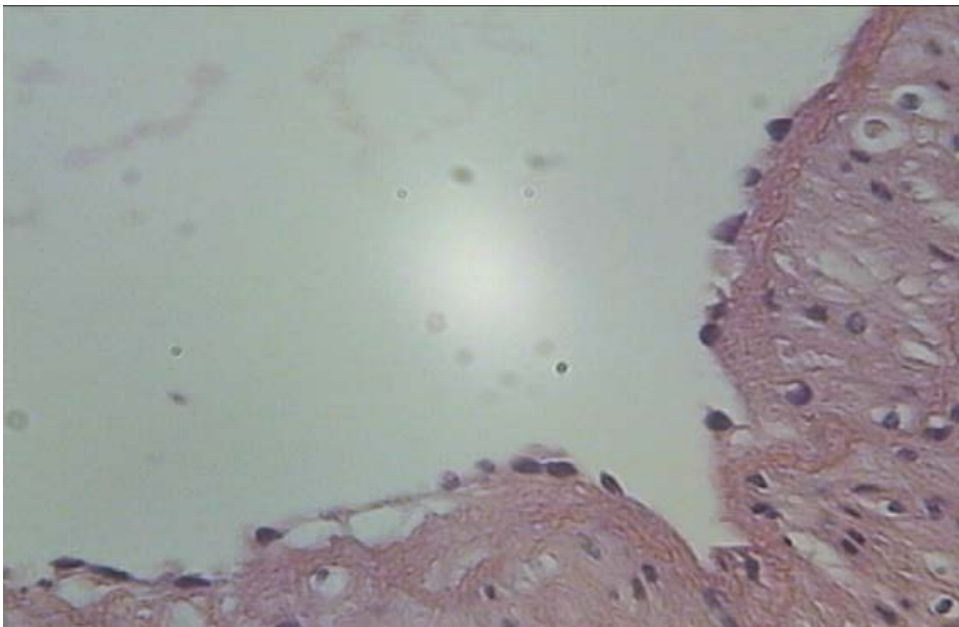


Abbildung 29: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines Koronargefäß des Schweins nach 180 Minuten normothermer Ischämie, 24stündiger Konservierung in HTK-Lösung und einer Stunde Blutperfusion, HE-Färbung

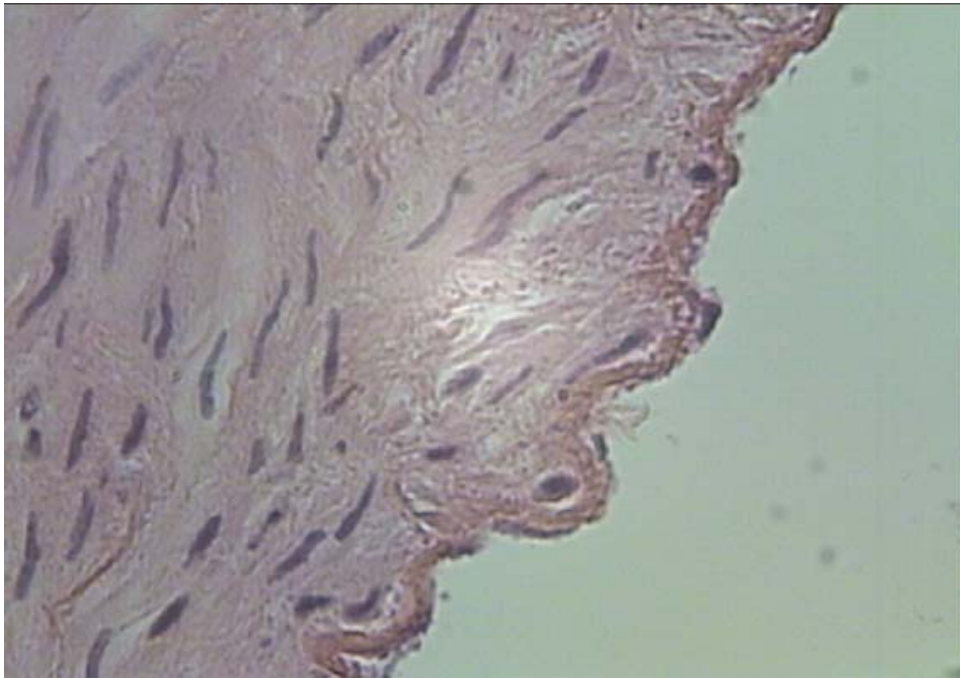


Abbildung 30: Histologische Darstellung des Gefäßendothels eines Koronargefäß des Schweins ohne Ischämie nach 24 Stunden Blutreperfusion, HE-Färbung

Mit dem Apoptose-Test-Kit konnten nur wenige angefärbte, d.h. apoptotische Zellkerne entdeckt werden. Dieser Zustand zeigte sich unabhängig von der Schädigung durch die normotherme Ischämie. Nach Auszählen der einzelnen Schnitte konnten nie mehr als 3,5 % apoptotische Zellen gefunden werden.

Tabelle12: Anzahl der Gesamtzellkerne sowie der apoptotischen Kerne

Gefäß	Gesamtzahl der Zellkerne in einem Gefäßschnitt	Anzahl der apoptotischen Zellkerne	Anteil der apoptotischen Zellkerne in %
180`n.l.	157	3	1,9
180`n.l. + 24h HTK + 1h Blut	203	7	3,4
180`n.l. + 24h UW + 1h Blut	193	4	2,0
180`n.l. + 24h Blut	226	8	3,5
180`n.l. + 24h HTK	168	5	2,9
keine Ischämie + 24 h Blut	212	6	2.8

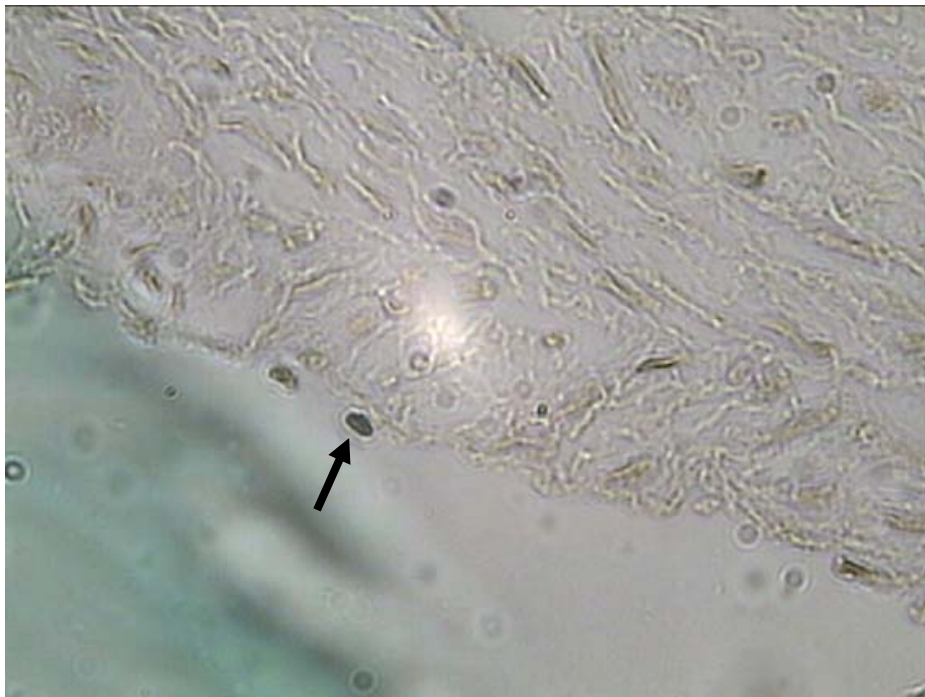


Abbildung 31: Apoptotischer Zellkern im Endothel nach 180 Minuten normothermer Ischämie und 24 Stunden Konservierung in HTK

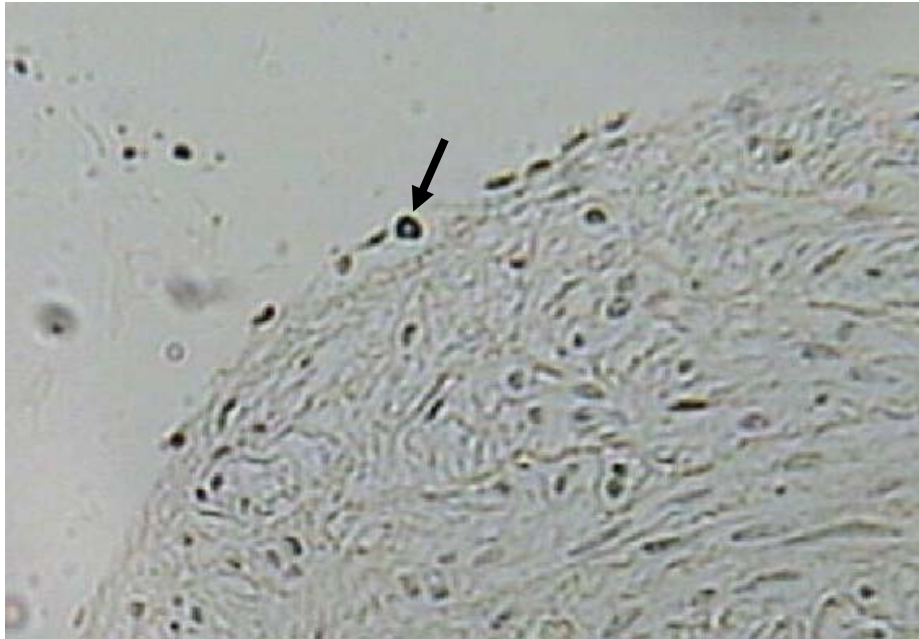


Abbildung 32: Apoptotischer Zellkern im Endothel nach 180 Minuten normothermer Ischämie, 24 Stunden Konservierung in UW und einer Stunde Blutreperfusion

## **4 Diskussion**

### **4.1 Versuchstier Schwein**

Um den Einfluss der Blutperfusion auf die endothelabhängige Relaxation des Koronarsystems zu untersuchen, war eine genaue Betrachtung der epikardialen Koronargefäße des Herzens von Nöten. Dazu entschieden wir uns für die Nutzung von Schweineherzen vom Schlachthof. Das Herz des Schweins und das menschliche Herz weisen in Aufbau und Physiologie viele vergleichbare Merkmale auf (Crick et al., 1998). Beim Menschen beträgt die Ruhefrequenz des Herzens durchschnittlich 75 Schläge pro Minute, beim Schwein sind es 80 Schläge pro Minute (Engelhard und Breves 2000). Der mittlere arterielle Blutdruck liegt beim Schwein bei 70 bis 90 mm Hg (Scheunert und Trautmann 1987), beim Mensch zwischen 75 und 95 mm Hg. Auch die Größenverhältnisse des Herzens und der Koronargefäße bei Mensch und Schwein ähneln sich sehr, ebenso wie die Koronaranatomie und die geringgradige Ausbildung von myokardialen Kollateralen (O`Konski et al. 1987). Kollateralen am Herzen sind sowohl beim Mensch, als auch beim Schwein bereits zum Zeitpunkt der Geburt angelegt, aber noch nicht ausgebildet. Bei länger andauernder Ischämie entstehen sie aus den bereits existierenden Gefäßen (Meyer 2000).

White et al. ermittelten eine maximale Koronarkapazität beim Schwein, welche der eines erwachsenen Mannes entspricht. Messungen an isolierten Koronargefäßen des Schweins sind unter Laborbedingungen gut durchführbar.

Die ähnlichen Verhältnisse ermöglichen eine Übertragung der angewandten Methoden und somit der gewonnenen Erkenntnisse auf das menschliche Herz.

Da für die Versuche eine in-situ-Situation, vergleichbar der einer normothermen Ischämie simuliert wurde, eigneten sich von Schlachtschweinen frisch entnommene Herzen für diese Messreihe.

## **4.2 Diskussion der Methodik**

Für die Simulation der normothermen Ischämie wurden die Koronargefäße noch am Schlachthof in einem ausreichend dicken Myokardstreifen von circa einem Zentimeter belassen. Durch den Transport vom Schlachthof zum Labor entstand keine nachteilige Beeinflussung der Gefäße. Eine Tötung von Tieren nur für dieses Projekt war nicht von Nöten, da ausschließlich Herzen von frisch geschlachteten Schweinen verwendet wurden.

Die angewandte Technik der Funktionstestung der Koronarringe wurde wie in vorherigen Studien durchgeführt (Fischer et al. 1998, Steinhoff et al. 2004). Das Modell der isolierten Gefäßringe wurde von vielen Autoren bei der Überprüfung der Endothelfunktion isolierter Koronarien genutzt (Stevens et al. 2006, Fischer et al. 2004, Kuhn-Régnier et al. 2004, Yotsumoto et al. 2003, Kuhn-Régnier et al. 2000, Fischer et al. 1996, Fischer et al. 1998, Fischer et al. 1994).

Durch eine herbeigeführte Kontraktion mit Kaliumchlorid zu Beginn der Testreihe wird das maximale endothelunabhängige Kontraktionsvermögen der glatten Muskelzellen der Koronarien überprüft und somit sichergestellt, dass die glatte Gefäßwandmuskulatur unbeschädigt ist, unabhängig vom Zustand des Endothels.

Mit Hilfe einer Aktivierung verschiedener Mechanismen und Signal-Transduktionswege, welche den Kontraktionszustand in funktionsfähigen Koronargefäßen regulieren, können Schäden an den Koronararterien diagnostiziert werden. Diese Technik ermöglicht eine Aussage über den Zustand, bzw. die Funktionsfähigkeit des jeweiligen Koronargefäßes, sowie des Endothels. Beeinträchtigungen an der endothelabhängigen Relaxation der Muskulatur der Koronarsegmente können durch die Aktivierung verschiedener Mechanismen, welche die Kontraktion bzw. Dilatation der Gefäße regulieren, gemessen und beurteilt werden. Das Ausmaß solcher möglicher Endothelbeeinträchtigungen kann durch den Vergleich endothelunabhängiger und endothelabhängiger Substanzen und daraus resultierender veränderter Dilatationsfähigkeit genau beurteilt werden. In dieser Studie wurde die Funktionsprüfung der Koronararterien insbesondere in Hinblick auf eine eventuelle Schädigung des Endothels durch Ischämie, Konservierung und Blutperfusion durchgeführt.

## **4.3 Verwendete Lösungen**

### **4.3.1 Krebs-Henseleit-Lösung**

Bei der Krebs-Henseleit-Lösung handelt es sich um eine zellfreie, isotonische Elektrolytlösung, die in der extrazellulären Flüssigkeit vorhandene Elektrolyte und Puffersubstanzen enthält. In Versuchen mit Organbädern wird sie allgemein verwendet (Döring und Dehnert 1985).

Während des Versuches wurde die Lösung auf physiologische 37°C erwärmt und oxygeniert. Die Oxygenierung dieser salinen Elektrolytlösung ist nötig, da spezielle Sauerstoffträger wie die Erythrozyten im Blut fehlen. Der Sauerstoff ist physikalisch gelöst und ist somit nur in geringer Menge vorhanden. Um den gewünschten pH-Wert und einen ausreichenden Sauerstoffgehalt zu erreichen, verwendeten wir eine Begasung mit Carbogen, welches 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> enthält. Der Sauerstoffpartialdruck ist hier mit > 600 mmHg unphysiologisch hoch gewählt, da der Krebs-Henseleit-Lösung Hämoglobin zum Sauerstofftransport fehlt (Poizat et al. 1994).

Aufgrund der fehlenden Erythrozyten kann der Sauerstoff nicht in chemischer Bindung transportiert werden. Um dennoch eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff zu gewährleisten, musste der Sauerstoff physikalisch gelöst und mit ausreichend hohem Partialdruck angeboten werden, um so das Gewebe ausreichend zu oxygenieren.

### **4.3.2 Konservierungslösungen**

#### **4.3.2.1 Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) nach Bretschneider (Custodiol®)**

HTK-Lösung nach Bretschneider als Konservierungslösung bei Herztransplantationen ist in Deutschland die überwiegend verwendete Konservierungslösung (Reichenspurner et al. 1993). 1964 entwickelte Hans Jürgen Bretschneider diese kardioplegische Lösung und setzte sie nach dreijähriger Erprobungszeit im Labor erstmalig klinisch ein. Sie wird als gebrauchsfertige Lösung angeboten und neben der Kardioplegie zur Langzeitkonservierung von Herzen eingesetzt. Außer zur

Herzkonservierung dient sie auch als protektive Lösung für andere Transplantate, wie z.B. Leber, Niere und Pankreas.

Nach Burgmann et al. (1990) wird sie aufgrund der ionalen Zusammensetzung auch als intrazelluläre Kardioplegielösung bezeichnet. Der geringe Anteil von Natrium und Calcium (vgl. Seite 13 Tab.2) in dieser Lösung entspricht den Verhältnissen innerhalb der Zelle. Der Vorteil solcher intrazellulären Lösungen besteht unter anderem darin, ein intrazelluläres Ödem während eines hypothermen Zustands des Gewebes zu vermeiden. Der protektive Effekt der Bretschneider-HTK-Lösung basiert nach Troisi et al. (2000) auf der Erniedrigung des Energiebedarfs des Gewebes durch eine Reduktion des Natriumgehaltes und einer Erhöhung des Kalium- und Magnesiumgehaltes im Vergleich zum Blutserum. Unter physiologischen Bedingungen ist im Extrazellularraum eine hohe Natrium- und geringe Kaliumkonzentration vorhanden, wohingegen im intrazellulären Raum umgekehrte Verhältnisse vorliegen. Diese Bedingungen werden von der Natrium-Kalium-Pumpe aufrechterhalten. Diese Ionenpumpe ist allerdings energieabhängig. Bei hypothermen und anaeroben Verhältnissen fehlt ihr die Energiebereitstellung in Form von ATP. Natrium- und Chloridionen können entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle einströmen. Durch den nun folgenden Wassereinstrom ins Zellinnere kommt es zur Ödembildung. Die HTK-Konservierungslösung ähnelt in ihrer ionalen Zusammensetzung den intrazellulären Verhältnissen und beugt so dem beschriebenen Problem vor (Jahania et al. 1999). Die Kaliumkonzentration von 9 mmol/l und die Natriumkonzentration von 15 mmol/l lassen das Membranpotential zusammenbrechen, so dass die elektrophysiologischen Prozesse des Herzens unterbrochen werden. Das Magnesium dient der Stabilisierung der Zellmembran und als Calciumantagonist, indem es die Calciumkanäle hemmt (Bretschneider 1992). So wird der Calciumeinstrom ins Sarkoplasma und somit die mechanische Kopplung unterbunden.

Der hohe Gehalt an Histidin- und Histidinchlorid dient als hochwirksamer pH-Puffer und optimiert die Bedingungen für die anaerobe Energiegewinnung. So soll die durch die Ischämie entstehende Azidose abgeschwächt und Gewebeschäden vermieden werden. Das gleiche gilt für Tryptophan, welches ebenfalls eine Pufferung der Lösung bewirkt und das Histidin kompetitiv an der Diffusion nach intrazellulär hindert. Das enthaltene Ketoglutarat dient als Substrat für den Energiestoffwechsel in der

Anaerobiose. Magnesium hemmt kompetitiv die Calciumwirkung, während Mannitol den Wassereinstrom in die Zellen und somit mögliche Ödeme reduzieren soll.

#### 4.3.2.2 modifizierte HTK-Lösung und COP (coronary oxygen persufflation)

Die kommerziell erhältliche HTK-Lösung nach Bretschneider (Custodiol®) wurde für diese Versuchsreihe als zweite Konservierungslösung modifiziert und zusammen mit einer Sauerstoffpersufflation als Konservierungsmethode eingesetzt.

Da die HTK-Lösung den Nachteil hat, bei hypothermer Konservierung von Herzen die Funktionsfähigkeit des Herzens nach Transplantation nur drei bis vier Stunden zu erhalten, hat sich eine Modifizierung dieser Konservierungslösung in vorherigen Studien als sinnvoll erwiesen. Vorangegangene Studien im Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln zeigten, dass durch die Zugabe von 40 mg/l Hyaluronidase zu herkömmlicher HTK-Lösung bei der Konservierung von ganzen Herzen und auch bei isolierten Koronargefäßen der Gewebewasseranteil herabgesetzt war. Es konnte ebenfalls eine verbesserte Funktionsrestitution erreicht werden (Fischer et al. 1994, Fischer und Jeschkeit 1996, Kuhn-Régnier et al. 2000).

Der Entstehung von Ödemen nach längerer Konservierung in HTK-Lösung kann durch die Zugabe von Hyaluronidase entgegengewirkt werden (Fischer und Jeschkeit 1998). Hyaluronidase ist ein lysosomales Enzym, welches glykosidische Bindungen katalysiert, es kann also Hyaluronsäure spalten, welche im kardialen Interstitium enthalten ist. Die interstitielle Hyaluronsäure hat eine sehr hohe Wasserbindungsfähigkeit und ist somit Verursacher interstitieller Ödeme (Löscher und Ungemach 2002). Als Inhalt der Konservierungslösung reduziert die Hyaluronidase den Gehalt an Hyaluronsäure im Gewebe und somit das während der Reperfusion entstehende interstitielle Ödem. So verringert der Zusatz von Hyaluronidase Gewebsödeme und Zellschwellungen, so dass eine verbesserte Reperfusion daraus resultiert. Die Permeabilität des Gewebes wird hingegen nicht beeinflusst.

Hyaluronidase besitzt also einen protektiven Einfluss bei ischämischen Zuständen des Gewebes, wo es durch Sauerstoffmangel zu Zellödemen kommt; der gleiche schützende Effekt zeigt sich bei transplantierten Herzen, welche im Begriff sind, vom Körper abgestoßen zu werden (Johnsson et al. 2000).

Auch die Erhaltung des Myokards steht in engem Zusammenhang mit der koronaren Perfusion, weshalb der Calciumgehalt der HTK-Lösung in dieser Studie um 50  $\mu\text{mol/l}$  auf insgesamt 65  $\mu\text{mol/l}$  erhöht wurde, um das so genannte Calciumparadox zu vermeiden, welches bei einem Calciumgehalt unter 50  $\mu\text{mol/l}$  ausgelöst werden kann. Bei einer Perfusion mit calciumfreier Lösung werden Calciumionen aus dem Gewebe herausgewaschen. Dadurch werden die zwischengeschalteten disc junctions zwischen den glatten Muskelzellen geschwächt und das Sarkolemm wird zerstört (Altschuld et al. 1991). Es kommt zu einer Calciumverarmung, die den Zerfall ultrazellulärer Strukturen mit sich bringt. Bei einer nun erfolgenden Reperfusion mit calciumhaltiger Lösung kommt es zu einem erhöhten Einstrom von Calciumionen und infolge dessen zu einer Kontraktur. Zimmermann und Hülsmann berichteten 1966 erstmals von der Entstehung einer solchen Schädigung und nannten sie das Calciumparadox. Eine optimale Konservierungslösung besteht demzufolge aus einer Zusammensetzung, welche die Calciumkonzentration soweit absenken kann, dass keine energieverbrauchenden Prozesse stattfinden können, jedoch auch kein Zelluntergang provoziert wird (Reybeka et al. 1990). Durch das Absenken der Temperatur während der Konservierung auf 0 bis 1°C kann die Entstehung des Calciumparadoxes verhindert werden, allerdings besteht dann die Gefahr, dass bei Wiedererwärmung des Gewebes das Calciumparadox doch auftritt. Deswegen sind Konservierungslösungen mit einem Gehalt von weniger als 50  $\mu\text{mol/l}$  als kritisch zu betrachten.

Die koronare Sauerstoffpersufflation hat sich in vorangegangenen Studien als geeignete Methode mit positiver Beeinflussung auf das konservierte Gewebe herausgestellt (Dahnken et al. 2007, Fischer et al. 2004, Bosse, Dahnken und Fischer 2002, Fischer 1998). So zeigten Fischer und Jeschkeit 1998 an Schweineherzen eine funktionelle und metabolische Wiederherstellung nach 14 Stunden hypothermer Lagerung in mHTK-Lösung und COP. Auch bei Versuchen an warmischämischen Schweineherzen zeigte diese Art der Konservierung Erfolg. Hier wurden die Herzen einer 16minütigen normothermen Ischämie ausgesetzt und danach 3,3 Stunden hypotherm in mHTK und COP gelagert. Die EDR dieser Koronarien war unverändert gegenüber physiologischer EDR-Werte (Fischer 2003). Viele Versuche mit ischämischen Transplantationsorganen haben gezeigt, dass die sofortige Sauerstoffzufuhr nach der ischämischen Phase von immenser Wichtigkeit ist; insbesondere in Hinblick darauf, dass das Herz eines der sensibelsten

Transplantationsorgane darstellt. In der Vergangenheit wurden einige Möglichkeiten einer erfolgreichen Sauerstoffzuführung untersucht und getestet. So kann diese Oxygenierung z.B. aus einer Dauerperfusion in Form einer Herz-Lungen-Maschine bestehen, welche das Transplantat mit normothermem Blut reperfundiert. Eine weitere Möglichkeit der Sauerstoffzuführung ist die hypotherme hyperbare Oxygenierung. Hier wird ischämisches Gewebe einem Sauerstoffdruck von 2-2,5 ata ausgesetzt, was zu einer Oxygenierung des hypoxischen Gewebes führt.

Man versuchte außerdem Herzen durch eine hypotherme Dauerperfusion ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Dazu wurde während der hypothermen Lagerung eine oxygenierte Konservierungslösung durch die Gefäße geleitet. Nach anfänglichen Erfolgen (Wicomb et al. 1986, Cooper et al. 1983) zeigte eine Untersuchung von Ferrera et al. 1994 eine unbefriedigende myokardiale Restitution nach 24 Stunden hypothermer Dauerperfusion mit St.Thomas-Hospital-Lösung. Beide Methoden sind zudem sehr kostenintensiv und technisch zu komplex, so dass sie klinisch nur schwer eingesetzt werden können.

Eine ebenso kostengünstige wie einfache Variante der Sauerstoffzufuhr ist die von Fischer et al. 1998 vorgestellte koronare Sauerstoffpersufflation. An Hundenieren (1978) und Rattenlebern (1980) wurde eine ähnliche Methode mit gutem Erfolg durchgeführt. Allerdings erfolgte die Persufflation hier retrograd, d.h. dem physiologischen Blutfluss entgegen gesetzt, im Gegensatz zur COP, welche eine anterograde Persufflationstechnik darstellt, d.h. entsprechend dem physiologischen Blutfluss. Die Koronargefäße werden während der Konservierung kontinuierlich persuffliert. Das oxygenierte Gas kommt also nur mit dem Gefäßlumen und dort mit dem Endothel in Kontakt. Die Sauerstoffpersufflation sorgt mit einem guten  $O_2$ -Partialdruck in der Zelle für eine Energieproduktion auf hohem Niveau. So kann über den Zitratzyklus und die Atmungskette der Vorrat an energiereichen Phosphaten aufrechterhalten und Zellschäden vermieden werden. Daraus resultiert eine verbesserte Restitution der Organe.

Eine mögliche Schädigung des persufflierten Gewebes kann allerdings nicht ganz ausgeschlossen werden. Durch den direkten Kontakt des Gases mit dem Endothel könnten theoretisch dort Zellschädigungen entstehen, die zu Funktionsausfällen des Gefäßendothels und Vasospasmen führen können.

Allerdings zeigten Fischer et al. 2002, dass eine kombinierte Konservierung in mHTK-Lösung (vgl. S.11 Tab.2) und gleichzeitiger COP bei isolierten

Schweinekoronarien unverändert gute Endothelfunktion ermöglicht. Sie transplantierten Schweineherzen nach 14-stündiger Lagerung in mHTK-Lösung mit COP; diese Herzen wurden nach sieben Tagen Genesung auf die Endothelfunktion ihrer Koronargefäße hin untersucht und ihre Endothelfunktion erwies sich als voll funktionstüchtig.

Yotsumoto et al. transplantierten 2003 Schweineherzen, welche zuvor einer 16minütigen normothermen Ischämie ausgesetzt waren. Die Koronargefäße dieser Herzen wurden während der Konservierung für drei Stunden persuffliert und dann erfolgreich orthotop transplantiert. Auch hier zeigten die Gefäße nach der Persufflation keine Abweichung ihrer normalen physiologischen Endothelfunktion.

#### 4.3.2.3 University of Wisconsin-Lösung (UW, Viaspan®)

Die UW-Lösung wurde in den 70er Jahren von Folkert O. Belzer als Konservierungslösung entwickelt. Erstmals getestet wurde sie an Lebern von Hunden. Heute wird sie weltweit zur Leber-, Nieren- und Pankreaskonservierung eingesetzt. Ihre Komponenten dienen der Ödemvermeidung und der reversiblen Inaktivierung der Zellaktivitäten. Ihre Zusammensetzung unterscheidet sich sehr stark von der HTK-Lösung.

Raffinose, Lactobionat und Hydroxyethylstärke reduzieren die endotheliale Zellschwellung und interstitielle Ödeme. Raffinose und Lactobionat können aufgrund ihrer Molekülgröße nur langsam in die Zelle diffundieren, Hydroxyethylstärke überhaupt nicht.

Glutathion ist ein Antioxidans und dient zum Abfangen freier Radikale. Allopurinol hemmt kompetitiv die Xanthinoxidase (He und Yang 1998), diese bildet während der Oxidation von Xanthin zu Harnsäure Sauerstoffradikale. Nach einer Ischämie ist dies bedeutend, da das Endothel daraufhin eine deutlich verstärkte Xanthinoxidase-Aktivität zeigt (Bertsch et al. 1998). Adenosin dient dem Wiederaufbau energiereicher Phosphate zur Energiebereitstellung.

He und Yang untersuchten 1998 den Einfluss der UW-Lösung auf die endothelabhängige Relaxation der Koronararterien sowohl nach normothermer Konservierung, als auch nach hypothermer Ischämie. Ihre Versuche zeigten, dass die hohe Kaliumkonzentration von 125 mmol/l in der Konservierungslösung nach Gabe von Indomethacin keinen negativen Einfluss auf die NO- und PGI<sub>2</sub>-abhängige

Relaxation des Endothels ergab. Nach Hemmung dieser beiden Komponenten war die EDHF-bedingte Relaxation allerdings erheblich verringert. He und Yang machten für dieses Phänomen den hohen Kaliumgehalt in dieser Lösung verantwortlich. Sie erklären die reduzierte EDHF-vermittelte Relaxation mit einer Inhibition von calciumabhängigen Kaliumkanälen. Sind diese Kaliumkanäle blockiert, wird der Calciumeinstrom erhöht und es kommt zur Konstriktion der glatten Gefäßwandmuskulatur. Hinsichtlich der Erhaltung des Endothels während der Konservierung ist eine Lagerung in UW-Lösung also mit gewisser Skepsis zu betrachten.

#### **4.4 Mechanismen der Endothelabhängigen Relaxation**

Ein gut erhaltenes, voll funktionsfähiges Koronarendothel ist die Voraussetzung für ein leistungsfähiges Herz. Die Restitution der Endothelfunktion ist somit von besonderer Bedeutung bei der Konservierung von Herzen, die für eine Transplantation vorgesehen sind.

Die Endothelabhängige Relaxation (EDR) ist von drei Faktoren abhängig: Stickstoffmonoxid, Prostazyklin und dem endothelabhängigen Hyperpolarisierendem Faktor (Lüscher et al. 1989).

##### **4.4.1 Stickstoffmonoxid**

Als Schlüsselmolekül für die Aufrechterhaltung der Endothelfunktion gilt Stickstoffmonoxid (NO). Es ist der potenteste Vasodilatator. NO ist ein zu den nitrosen Gasen gehörendes farbloses Gas, mit einer kurzen Halbwertszeit von 3-5 Sekunden. Es reagiert schnell mit anderen Radikalen wie Sauerstoff und Superoxidanionen oder mit Wasserstoffperoxid (Tschudi und Lüscher, 1996). NO ist ein kleines, lipophiles, gut diffusibles Molekül.

R. Furchtgott beschrieb 1980 erstmals einen *endothelialen vasodilatierenden Faktor* (endothelium-derived-relaxing-factor, EDRF). 1987 wurde dieser Faktor als NO identifiziert (Palmer et al.). Man wusste nun, dass Endothelzellen NO produzieren und gezielt freisetzen können. Durch die geringe Molekülgröße und den lipophilen Charakter ist eine schnelle Diffusion durch die Membranen und so das Erreichen der

an die Endothelzelle angrenzenden glatten Muskelzelle möglich, (Ignarro et al. 1999). Als Substrat für die zelluläre Produktion des NO dient die Aminosäure L-Arginin. Die NO-Synthase (NOS) konvertiert die terminale Guanidgruppe von L-Arginin. Diese Reaktion benötigt NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) und nutzt molekularen Sauerstoff zur Oxygenierung. So entsteht enzymatisch aus dem Arginin Citrullin unter der Abspaltung von NO. Dieses wird sehr schnell zu Nitrit und Nitrat oxidiert (Tschudi und Lüscher 1996).

Die NO-Synthase wird in drei Isoenzyme unterteilt, die konstitutiv exprimierte neuronale NO-Synthase (nNOS oder NOS 1), die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS 3) und die induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS 2), die im Rahmen von inflammatorischen Prozessen in einer Vielzahl von Zellen induziert werden kann. Im neuronalen Gewebe wird also vorwiegend die konstitutive NOS 1 exprimiert, im vaskulären Endothel befindet sich die NOS 3. Beide bewirken eine kontinuierliche Synthese geringer Mengen von NO. Ihre Aktivität wird von Calcium/Calmodulin als Cofaktor gesteuert. Die dritte NO-Synthase ist eine calciumunabhängige, induzierbare Synthase. Sie wurde zunächst in Makrophagen identifiziert. Bei Entzündungsprozessen wird sie nur vorübergehend gebildet und ist durch bakterielle Lipopolysaccharide, Tumor-Nekrose-Faktor und Interleukin-1 induzierbar.

Die Regulation der endothelialen NO-Bildung verläuft über eine Steuerung der Aktivität der eNOS durch Calciumionen, die mit Calmodulin einen enzymaktivierenden Komplex bilden. Mehrere Stimuli führen zu einer endothelialen Freisetzung von NO. Einer dieser Stimuli erfolgt hämodynamisch über die blutströmungsabhängige Aktivierung, die so genannten Scherkräfte. Durch die mechanische Auslenkung von Makromolekülen an der Endotheloberfläche kommt es zu einer Öffnung von Calciumkanälen und so zur Aktivierung der NO-Synthase. So kann der Gefäßtonus in Form einer Autoregulation angepasst werden. Eben solche physikalischen Reize zur NO-Produktion sind neben den Scherkräften Dehnungskräfte und Hypoxie (Pohl und Busse 1989).

Andere Stimuli sind zirkulierende oder rezeptorvermittelte Mediatoren wie Substanz P, Bradykinin, Serotonin und Acetylcholin, die über eine Aktivierung der Phospholipase A zu einer Erhöhung der freien Calciumkonzentration in der Zelle führen. Infolge des erhöhten Calciumspiegels kommt es zur Aktivierung der NO-Synthase.

Nach Erreichen der Zielzelle, also der glatten Muskelzelle, verursacht NO dort die Relaxation. Dies geschieht über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase, die die Bildung von zyklischem Guanosin-Monophosphat (cGMP) aus Guanosin-Triphosphat (GTP) bewirkt. cGMP ist dann wiederum in der Lage, Ionenkanäle, Proteinkinasen und Phosphodiesterasen zu regulieren (Tschudi und Lüscher, 1996). Es kommt zu einer Dephosphorylierung der leichten Myosinketten, was die Myosin/Aktin-Interaktion verhindert und zur Vasodilatation führt (Dendorfer 1996). Eine Hemmung der NO-Aktivität kann durch verschiedene Substanzen erreicht werden, welche entweder Menge, Aktivität oder Substrat der NO-Synthase beeinflussen. Alle Formen der Stickoxidsynthase können kompetitiv mit L-Arginin-Analoga gehemmt werden. Als intrazelluläre kompetitive Substrate gelten zum Beispiel L-NMMA (L-Nitroarginin-Methylester) oder das im Rahmen dieser Versuchsreihe eingesetzte L-NNA (N-Nitro-L-Arginin).

#### **4.4.2 Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>)**

Prostazyklin ist der zweite wichtige Faktor der endothelialen Relaxation. Es ist ein bizyklisches Prostaglandin, welches nach Umwandlung von Arachidonsäure durch Cyclooxygenase und Prostazyklinsynthetase aus Endoperoxiden entsteht (Lüscher und Ungemach 2002). Die Halbwertszeit beträgt etwa 3-5 Minuten. Im Koronarendothel ist Prostazyklin der dominierende Arachidonsäuremetabolit. Es wird dort produziert und freigesetzt.

Für die Produktion und Ausschüttung von Prostazyklin gelten vergleichbare Freisetzungsmechanismen wie für Stickstoffmonoxid. Neben den physikalischen Einflüssen wie den Scherkräften oder Hypoxie erfolgt eine Stimulation ebenfalls durch verschiedene Autakoide wie zum Beispiel Bradykinin. Für die Freisetzung aus dem Endothel ist ein erhöhter intrazellulärer Calciumgehalt notwendig. In der glatten Muskelzelle wird die Relaxation über eine rezeptorvermittelte Aktivierung der Adenylatcyclase, welche zu einer cAMP-Zunahme führt, ausgelöst (Tschudi und Lüscher 1996).

Neben seiner vasodilatierenden Funktion ist Prostazyklin ein funktioneller Antagonist der Thromboxane und ein endogener Thrombozytenaggregationshemmer.

#### **4.4.3 Endothelialer Hyperpolarisierender Faktor (endothelium-derived-hypopolarizing-factor, EDHF)**

EDHF ist ein dilatationsauslösender Faktor, der unabhängig von NO und Prostazyklin endothelvermittelte Relaxationen auslöst. 1999 beschrieben Feletou und Vanhoutte, dass die vom Endothel abhängige Gefäßrelaxation nicht vollständig durch die Freisetzung von NO und Prostazyklin erklärt werden kann. Trotz einer Hemmung der durch NO und PGI induzierten Relaxation mit spezifischen Inhibitoren wie L-NNA und Indomethacin blieb eine Vasodilatation bestehen, die immer mit einer Hyperpolarisation einherging. So wurde ein zusätzlicher Faktor vermutet, welcher über die Hyperpolarisation der glatten Muskulatur wirkt (Chen et al. 1998). Da diese dilatierenden hyperpolarisierende Effekte nur bei vorhandenem und intaktem Endothel auftraten, nannte man diesen Faktor Endothelium-Derived-Hyperpolarisation-Faktor (EDHF) (Busse et al. 2000).

Durch die Freisetzung von EDHF werden in den glatten Muskelzellen kalziumabhängige Kaliumkanäle aktiviert; über einen Kaliumausstrom wird dann die Hyperpolarisation hervorgerufen. Dies führt zur Inaktivierung spannungsabhängiger Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, das intrazelluläre Calcium sinkt und die Gefäßmuskulatur relaxiert (Walsh et al. 1995). Die Hyperpolarisation breitet sich über die myokardialen gap-junctions zu den benachbarten glatten Muskelzellen aus.

Der Beitrag von EDHF als Mechanismus zur endothelabhängigen Relaxation steigt mit abnehmender Gefäßgröße (Busse et al. 2002).

Die genaue chemische Struktur des EDHF wird bis heute noch kontrovers diskutiert. Man nimmt aber an, dass die nach rezeptorabhängiger Aktivierung aus dem Endothel freigesetzten Kaliumionen sowie Epoxyeicosatriensäuren (EETs; ein Cytochrom P<sub>450</sub> Metabolit des Arachidonsäurestoffwechsels) bei diesem Mechanismus eine Rolle spielen (Wu et al. 2005).

#### **4.4.4 Substanz P**

Substanz P ist ein Neuropeptid, welches aus 11 Aminosäuren besteht. Sein Name entstand in Ermangelung geeigneter Alternativen aus dem englischen Begriff für „powder“, zunächst lag Substanz P nämlich nur in Pulverform vor.

Zusammen mit Bradykinin spielt es eine wichtige Rolle als humoraler Mediator der endothelialen Vasodilatation, indem es sowohl die NO- und PGI-Freisetzung stimuliert, als auch den EDHF-Mechanismus (Frieden et al. 1999). Die Stimulation des Endothels führt im Zusammenhang mit einem Anstieg der intrazellulären Calciumionen zur Aktivierung endothelialer Ionenkanäle. Substanz P besetzt die vorherrschenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren, es kommt zu einer inositoltriphosphatvermittelten Kalziumfreisetzung aus den Speichern des endoplasmatischen Reticulums (Nilius et al. 1997). Die Vasodilatation geht also einher mit einem intrazellulären cGMP-Anstieg. Diese koronare Relaxation ist allerdings an ein intaktes Gefäßendothel gebunden (Accili et al. 1994). Cocks zeigte 1983 in seinen Versuchen, dass bei fehlendem Endothel keine Dilatation durch Substanz P ausgelöst werden konnte, obwohl die Gefäßmuskulatur durch Papaverin relaxiert werden konnte. Dies zeigte, dass die durch Substanz P hervorgerufene Dilatation endothelabhängig sein musste.

Substanz P bewirkt am Gefäßendothel also eine rezeptorvermittelte Stickstoffmonoxid- und PGI-Freisetzung, es wirkt aber auch über den EDHF-Weg (Mechiche et al. 2001, Moncada et al. 1999).

In dieser Versuchsreihe konnte also Substanz P verwendet werden, um die endotheliale Relaxation auszulösen bzw. um eventuelle Schäden am koronaren Endothel zu ermitteln und zu bewerten. In unseren Versuchen erreichten die unbeschädigten Gefäßringe nach Vorkontraktion mit Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  SP-induzierte Dilatationen von 71 % (Mittelwert bei einer SP-Gabe von 10  $\mu\text{mol/l}$ ).

Durch die Gabe eines Stickoxidsynthase-Inhibitors kann die Substanz-P-bedingte Dilatation deutlich reduziert werden. In unserer Versuchsreihe benutzten wir dazu L-NNA (N-Nitro-L-Arginin), welches in einer Konzentration von mindestens 300  $\mu\text{mol/l}$  gegeben werden muss, um eine ausreichende NO-Synthase-Hemmung zu erreichen (Ge et al. 2000). Es handelt sich hierbei um eine kompetitive Hemmung, die deshalb auch gut reversibel ist.

Wird nun die NO-Freisetzung blockiert, verbleibt eine Dilatation bedingt durch PGI und EDHF. Beny und Schaad (2000) zeigten eine Beteiligung des EDHF an der Substanz-P-vermittelten Dilatation. Durch den Einsatz des Cyclooxygenasehemmers Indomethacin wird jegliche Beteiligung von PGI ausgeschlossen und es kommt zu einer EDHF-vermittelten Dilatation. Das Indolessigsäurederivat Indomethacin hat keinen Einfluss auf das Endothel der Koronararterien (Kurowai et al. 1995). Dieses konnte in unseren Versuchen dahingehend bestätigt werden, als dass nach der Zugabe des Indomethacins keinerlei Kontraktionen oder Dilatationen eintraten. Der Zustand der Koronarringe blieb also unverändert und ohne Reaktion (vgl. Abb.3 M&M).

Frieden et al. untersuchten die SP-induzierte Vasorelaxation von Schweinekoronarien auf den EDHF-Mechanismus. Die Hyperpolarisation an den Koronargefäßen resultiert ihrer Auffassung nach aus der Aktivierung verschiedener calciumabhängiger Kaliumkanäle.

#### **4.4.5 Bradykinin**

Roche e Silva entdeckten 1949 eine Substanz, welche einerseits zu einem systemischen Blutdruckabfall führte und andererseits eine langsame Kontraktion des Darms hervorrief. Dieser Substanz wurde daher der Name Bradykinin gegeben (griech. *bradys* für langsam, *kinein* für bewegen). 1960 identifizierte Elliot das Gewebehormon als Nonapeptid mit einer sehr kurzen Halbwertszeit. Bradykinin spielt als potenter Vasodilatator eine wichtige Rolle im kardialen und peripheren Gefäßsystem. Ist das Herz ischämischem Stress ausgesetzt, kann Bradykinin auch vom Herz spontan ausgeschüttet werden (Sato et al. 1999). Bradykinin bewirkt über eine Signalkaskade die Freisetzung von NO, Prostacyclin und EDHF. Diese Signalkaskade beginnt mit der Aktivierung eines spezifischen Bradykinin-Rezeptors, des B<sub>2</sub>-Rezeptors. Dieser Rezeptor ist G-Protein gekoppelt und bis auf wenige Ausnahmen konstitutiv auf der endothelialen Zelloberfläche positioniert (Prado et al. 2002, Feng et al. 2000). Über die Anbindung an die G-Untereinheit des B<sub>2</sub>-Rezeptors kommt es zu einer Phospholipase-C-abhängigen Freisetzung von Inositolphosphat (IP) und einem Anstieg von intrazellulärem Kalzium durch die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern und Einstrom durch die Plasmamembran

(Prado et al. 2002). Durch die aktivierte Phospholipase wird Arachidonsäure freigesetzt, welche als Substrat für die Prostazyklinbildung dient. Es werden allerdings auch die Epoxyeicosatriensäuren als Substanzen diskutiert, die die chemische Form der EDHF darstellen könnten (Busse et al. 2000). Durch die Erhöhung des intrazellulären Kalziums werden zudem die kalziumabhängigen NO-Synthetasen aktiviert und es kommt zur NO-Freisetzung (Bae et al. 2003).

Ebenfalls an der vasodilatativen Wirkung von Bradykinin beteiligt ist EDHF (Frieden et al 1999). Die Hyperpolarisation wird hier durch eine Aktivierung der Kalziumkanäle herbeigeführt.

#### **4.4.6 Serotonin (5-Hydroxytryptamin)**

Serotonin ist ein Monoamin, welches im Organismus natürlich als Gewebehormon bzw. als Neurotransmitter vorkommt. Es zählt zu den biogenen Aminen. Seine Bildung erfolgt durch Decarboxylierung des 5-Hydroxytryptophans. Vittorio Ersparmer isolierte 1930 einen Stoff, der die glatte Muskulatur kontrahierte, er nannte ihn *Enteramin*. 1952 stellte man fest, dass *Enteramin* identisch war mit Serotonin, dessen endogenes Vorkommen Irving Page 1948 erstmalig beschrieb.

Serotonin wird hauptsächlich in den Zellen des Gastrointestinaltraktes gebildet und von dort in das Blut freigesetzt.

Das Hauptvorkommen von Serotonin ist im Gehirn, in den enterochromaffinen Zellen und in den Thrombozyten. 95% des Serotoningehalts im Blut sind in den Thrombozyten enthalten, die es binden und in sich lagern.

Das Serotonin hat verschiedene kardiophysiologische Effekte, es dilatiert und kontrahiert Blutgefäße abhängig von der Gefäßgröße und dem Zustand der Gefäßwand.

Die vasoaktive Wirkung des Serotonins ist rezeptorvermittelt, es existieren 14 Serotoninrezeptor-Subtypen, die in sieben Unterfamilien eingeteilt werden (Frishman et al. 1995). Kardiovaskulär relevant sind dabei insbesondere 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> und 5-HT<sub>7</sub>. In den Gefäßmuskelzellen sorgen 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> und 5-HT<sub>2B</sub> für eine Kontraktion dieser. Eine Stimulation des 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptors bewirkt indes eine Vasodilatation. Im Endothel hingegen bewirkt der 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptor eine NO-

Freisetzung und damit eine Vasodilatation (Pertz et al. 2004). Serotonin ist allerdings auch in der Lage vasokonstriktorisches Substanzen zu stimulieren. Dazu gehören Histamin, Angiotensin II, Prostaglandin F<sub>2a</sub> und Noradrenalin (Frishman und Grewall 2000). Bei einem intakten Endothel bewirkt Serotonin die Bildung vasodilatatorischer Mediatoren und kann die konstriktorische Wirkung der anderen Substanzen antagonisieren. Es überwiegt also die gefäßerweiternde Wirkung des Serotonins. Bei einer Schädigung der Endothelzellen kommt es folglich zu einer Vasokonstriktion (Frishman und Grewall 2000). Dass die vasodilatierende Wirkung des Serotonins beim Schwein hauptsächlich über NO-Bildung vermittelt wird, zeigten Park et al., da sie die Vasorelaxation zu einem hohen Prozentsatz mit N-Nitro-L-Arginin verringerten.

#### **4.4.7 Natriumnitroprussid (SNP)**

Bei dieser Substanz handelt es sich um ein vasodilatatorisches Pharmakon aus der Gruppe der Cyanide. Es ist die feste Form des Nitroprussids, d.h. es liegt in Kristallform vor. Es ist wasserlöslich, lichtempfindlich und sehr instabil mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Minuten im Plasma. Bei einem alkalischen pH-Wert zerfällt es (Löscher, Ungemach 2002). Seine vasodilatierende Wirkung führt zum Absinken des peripheren Gefäßwiderstandes durch eine Tonusabnahme der glatten Muskelzellen der arteriolen Widerstandgefäße. Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin wird dieser Vasodilatator bei akuter Herzinsuffizienz und bei hypertensiver Krise eingesetzt, sowie zur kontrollierten Blutdrucksenkung bei chirurgischen Eingriffen (Hunter et al. 2003). Aufgrund der geringen Halbwertszeit ist eine Verabreichung als Dauertropfinfusion erforderlich.

Natriumnitroprussid, auch als „Nitrovasodilatator“ bezeichnet, bewirkt eine endothelunabhängige Gefäßerweiterung. Es führt zu einer Erhöhung der Konzentration von NO in den glatten Muskelzellen, was über eine vermehrte Bildung von cGMP und den dadurch ausgelösten Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom die Dilatation der Gefäßmuskulatur bewirkt. SNP ist eine sehr labile Verbindung und kann NO spontan freisetzen, aus einem SNP-Molekül werden drei NO-Moleküle frei (Tschudi et al. 1996). Die NO-Moleküle erreichen dann per Diffusion die glatten Muskelzellen der Gefäße und wirken hier dilatierend. In Gefäßen ohne Endothel wirkt SNP stärker

vasodilatatorisch als bei Gefäßen mit intaktem Endothel (Tschudi et al. 1996). Dies liegt an der geringeren Diffusionsstrecke, welche das SNP zu bewältigen hat. In unserer Versuchsreihe wurde Natriumnitroprussid in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-9}$  M in das Organbad gegeben.

#### **4.4.8 Papaverin**

Das Papaverin zählt zu den Alkaloiden des Opiums und ist zu circa 1% im Rohopium enthalten. Da es direkt an der glatten Muskulatur angreift, gilt es als unspezifisches, aber sehr potentes muskulotropes Spasmolytikum (Kukovetz und Pösch 1970). Im Koronarsystem wirkt es stark vasodilatatorisch unabhängig vom Endothel. Es wirkt in der Zelle der Hydrolyse von cAMP und cGMP entgegen indem es zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen unspezifisch hemmt (Merrill et al. 1956). Diese Eigenschaft konnte von Pösch und Kukovetz an verschiedenen Säugetiergeweben nachgewiesen werden.

Papaverin reduziert den Kaliumausstrom, verschiebt das Ruhepotential in Richtung positiverer Werte und verlängert so das Aktionspotential (Nawrath 1980). Bei der durch Papaverin vermittelten Gefäßrelaxation existiert neben einer endothelunabhängigen auch eine endothelabhängige Komponente, deren Ausmaß durch freigesetztes NO bestimmt wird (Martin et al. 1986).

In der Koronarchirurgie wird Papaverin zur pharmakologischen Vasodilatation eingesetzt, um zum Beispiel an arteriellen Spendertransplantaten die Entstehung von Gefäßspasmen zu verhindern (Scheld et al. 1995).

Auch nutzt man die vasodilatatorischen Eigenschaften des Papaverins wie in unserer Studie zur Erzeugung einer maximalen Gefäßweiterung zur Bestimmung des basalen Dilatationsgrades der Koronarringe.

## **4.5 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.5.1 Blut als Reperfusat**

Grundsätzlich ist es möglich die Gefäße mit salinen Lösungen zu reperfundieren. Hier besteht der Vorteil darin, dass keine unkontrollierten endogenen Substanzen vorhanden sind, welche die Vasoregulation beeinflussen. Meist wird jedoch Blut als Reperfusat bevorzugt, da es physiologisch ist, und außerdem geeigneter für die Erfassung von Ischämie-Reperfusionsschäden scheint. Podesser et al. verglichen 1999 in ihren Versuchen die Reperfusion von Kaninchenherzen mit Erythrozyten-angereicherter Krebs-Henseleit-Lösung gegenüber normaler Krebs-Henseleit-Lösung. Die im Versuch verwendeten Herzen wurden einer fünfminütigen globalen Ischämie ausgesetzt und danach 45 Minuten lang reperfundiert. Die Autoren stellten fest, dass die mit Erythrozyten angereicherte KH-Lösung deutlich bessere Ergebnisse nach der Reperfusion hinsichtlich hämodynamischer und metabolischer Prozesse ergab. Das Herzminutenvolumen zeigte ebenso höhere Werte, wie die Aortendurchflussrate und der ATP-Gehalt gegenüber den mit nicht angereicherter Krebs-Henseleit-Lösung reperfundierten Herzen.

In einer Studie von Walters et al. wurden blutreprfundierte Rattenherzen verglichen mit Rattenherzen, welche mit KH-Lösung reperfundiert wurden. Auch hier zeigten die blutreprfundierten Herzen ein deutlich besseres Herzminutenvolumen sowie eine höhere Aortendurchflußrate.

Blut ist durch seinen Hämoglobingehalt ein guter O<sub>2</sub>-Träger, der auch bei niedrigem Flow für eine ausreichende Oxygenierung des Gewebes sorgt. Auch seine gute Pufferkapazität kommt den reprfundierten Gefäßen zugute.

Kritisch zu betrachten ist der Gehalt von Thrombozyten im Reperfusat. Unter physiologischen Bedingungen interagieren Endothel und Thrombozyten nicht miteinander (May et al. 1999) damit es nicht unerwünscht zu Thrombozytenaggregation bzw. –adhäsion und so zur Thrombenbildung kommt.

Ein intaktes Endothel wirkt antithrombozytär, weil es luminal eine hohe negative Membranladung besitzt, die das Adhären der Thrombozyten an das Endothel erschwert (Gimbrone, Jr., 1999). Die Thrombozyten besitzen ebenfalls eine negative Ladung, und werden so von den Endothelzellen auf Distanz gehalten. Auch das von

der Endothelzelle sezernierte  $\text{PGI}_2$  und NO inaktivieren die Thrombozyten indem sie die cAMP- bzw. die cGMP-Konzentration in den Thrombozyten erhöhen, und so das intrazelluläre Calcium reduzieren.

Es besteht also ein Gleichgewicht zwischen den Endothelzellen und den Thrombozyten. Ist dieses Gleichgewicht nun durch Verletzungen oder Stimulation des Endothels gestört, kommt es zur Freisetzung von koagulatorischen Faktoren, die zu einer erhöhten Adhäsivität des Endothels führen und so zur Thrombozytenaktivierung. Geschieht dies, kommt es weiter zur Anheftung von Thrombozyten an die Gefäßwand und zur Thrombozytenaggregation. Die aktivierten Thrombozyten setzen nun ihrerseits diverse Substanzen frei, wie das Thromboxan $\text{A}_2$ , welches über die Bildung von Arachidonsäure entsteht (Brody 1996). Thromboxan $\text{A}_2$  ist ein starker Vasokonstriktor und fördert so die Thrombenbildung.

Auch Neutrophile Granulozyten sind nach Reperfusion für Endothelschäden verantwortlich (Weissmann 1989). Nach der Reperfusion steigt die Affinität der Neutrophilen zur Endothelzelloberfläche. Die aktivierten Neutrophilen geben zytotoxische Enzyme und Sauerstoffradikale ab, die dann die Endothelzellen schädigen (Seccombe und Schaff 1995). Martorana et al. untersuchten 1998 Hundeherzen, die 60 Minuten Ischämie und 180 Minuten Reperfusion ausgesetzt waren. Das Endothel dieser Gefäße zeigte eine stark vermehrte Leukozytenadhäsion und eine verminderte Dilatationsfähigkeit.

In unseren Versuchen zeigten die Koronargefäße, welche nach 180minütiger Ischämie eine Stunde lang mit Blut reperfundiert wurden, signifikant bessere EDR-Werte als solche Gefäße ohne Reperfusion. Braunwald und Kloner beschreiben die Blutreperfusion als „zweischneidiges Schwert“, wobei sie den Nutzen der Reperfusion nach Ischämie hervorheben. Dennoch reagieren reperfundierte Herzen sensibler auf metabolische Regulation. Sowohl im Modell des Hundeherzens, als auch beim isolierten Kaninchenherz zeigte sich nach Reperfusion eine verminderte Relaxationskapazität des Endothels, bei gleichbleibender Muskelzellfunktion der Gefäße. Seccombe und Schaff erklären dies mit einer verminderten NO-Freisetzung; ausgelöst durch Ischämie und Reperfusion wird eine Komponente im Rezeptor/G-Protein-Komplex selektiv geschädigt und somit fehlt der Stimulus für die Auslösung der NO-Synthese.

Nach unterschiedlichen Ischämiezeiten, jedoch ohne Konservierung, ergaben sich in dieser Studie zwischen keiner der Gruppen signifikante Unterschiede (Abb. 9). Die

Koronargefäße erreichten durchweg physiologische Dilatationswerte. Das Endothel der Gefäße kann als intakt angesehen werden, wenn die EDR über 70 % liegt (Fischer et al. 2002). Diese Gruppe der Koronarringe mit Ischämiezeiten von 60, 120 und 180 Minuten konnte also als Vergleichsgruppe zu den konservierten und reperfundierten Ringen herangezogen werden.

Die Koronarien, welche eine normotherme Ischämie von 180 Minuten durchmachten und danach mit Blut reperfundiert wurden, konnten nochmals verbesserte Werte aufweisen. Nach Substanz P und nach Bradykiningabe erreichten diese Ringe signifikant höhere Dilatationswerte als die nicht reperfundierten Ringe (Abb.10).

Dieser Umstand lässt darauf schließen, dass das Gefäßendothel dieser Koronarringe intakt sein musste, so dass die positiven Einflüsse der Blutreperfusion hier überwogen. Dennoch wiesen Laude et al. 2000 in ihrer Studie an Rattenherzen auch auf negative Einflüsse der Blutreperfusion mit verminderten Dilatationswerten hin. Sie zeigten allerdings, dass diese abgeschwächte Endothelreaktion in Zusammenhang mit Mikrotraumata der Endothelzellen einherging. Die Unversehrtheit des Endothels ist also von äußerster Wichtigkeit für die Aussagekraft dieser in-vivo-Versuche.

Bei den konservierten reperfundierten Ringen sank die EDR signifikant gegenüber den nicht konservierten und reperfundierten Ringen. Hinsichtlich der Ischämiezeiten konnten allerdings keine nennenswerten Differenzen erkannt werden.

Die normotherme Ischämie wurde von allen Gruppen gleich gut verkraftet (vgl. Abb. 9). Auch nach Konservierung und Reperfusion konnte keine Abhängigkeit der Endothelfunktion von der Ischämiezeit ausgemacht werden (vgl. Abb. 12-16).

Allerdings machten sich Unterschiede hinsichtlich der Art der Konservierung bemerkbar. Obwohl die Ischämiezeiten bei den nicht konservierten Ringen der Kontrollgruppe keine negativen Einflüsse auf die Funktion des Endothels hatten, ist doch von einer geringen Endothelschädigung auszugehen, die nach der Konservierung nicht mehr zu kompensieren ist und sich erst dann in vollem Umfang zeigt.

Eine kontinuierliche Verschlechterung der EDR in Abhängigkeit von der Ischämiedauer stellte sich nur bei der HTK-Konservierung dar (vgl. Abb. 12). Die Ringe nach 60 Minuten normothermer Ischämie tolerierten die Konservierung und nachfolgende Blutreperfusion am besten, die Ringe mit der längsten Ischämie am

schlechtesten. Nach Konservierung mit HTK-Lösung bewirkte die Blutreperfusion bei einer Ischämiedauer von 60 Minuten mit 63% sehr gute Ergebnisse.

Die Koronarringe, welche eine Konservierung in mHTK + COP durchgemacht hatten, zeigten nach 60minütiger Ischämie die schlechtesten Werte, aber bei 120 Minuten Ischämie die besten, wenn auch vermindert gegenüber den nicht konservierten Ringen (vgl. Abb. 12-16). Hier scheint die Abhängigkeit von der Ischämiedauer völlig aufgehoben zu sein. Dies könnte dadurch erklärbar sein, dass durch die COP eine sehr gute Oxygenierung direkt im Anschluss an die normotherme Ischämie und über die gesamte Konservierungsdauer gewährleistet war. Yotsumoto et al. testeten 2003 Schweinekoronarien die eine 16minütige normotherme Ischämie durchmachten und danach 3,3 Stunden in mHTK und COP gelagert wurden. Sie erreichten sehr gute Ergebnisse mit dieser Technik, obwohl die Persufflation belastend für das Endothel ist.

In UW-Lösung gelagerte Ringe zeigten nach der Konservierung allgemein schlechtere Werte lediglich bei 120 Minuten normothermer Ischämie. Wir können somit nicht die Studien von He und Yang bestätigen, welche die hohe Kaliumkonzentration der UW-Lösung für Endothelschäden verantwortlich machen. Bei ihren Versuchen reduzierte eine Konservierung in UW-Lösung die EDR der Koronargefäße signifikant. Erhard et al. verglichen 1993 Lebertransplantate die nach 15 Stunden hypothermer Ischämie sowohl in UW-Lösung, als auch in HTK-Lösung konserviert wurden. In ihren Ergebnissen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach der Transplantation, jedoch gab es in der UW-Gruppe einen leicht höheren Anteil von späteren Komplikationen an den biliaren Anastomosen. Nach einer 60minütigen Ischämiezeit führt die Konservierung in UW-Lösung zu günstigeren bzw. gleich guten Werten wie die beiden anderen Lösungen. Nach 180 Minuten normothermer Ischämie könnte sie sich eventuell besser eignen als HTK-Lösung, da diese bei längerer Ischämiezeit deutlich schlechtere Ergebnisse aufweist. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass die genannten Unterschiede nicht signifikant sind.

In einer parallel laufenden Studie zur Konservierung von Koronargefäßen wurden Gefäßringe auf ihre Dilatationsfähigkeit hin untersucht (Naglo-Dünner; in Vorbereitung). Diese Koronargefäße waren einer normothermen Ischämie ausgesetzt und wurden wie in unserer Studie in verschiedenen Lösungen 24

Stunden konserviert. Die Ischämiezeiten betragen hier ebenfalls 60, 120 und 180 Minuten. Nach der Konservierung wurde hier die EDR dieser Gefäße getestet.

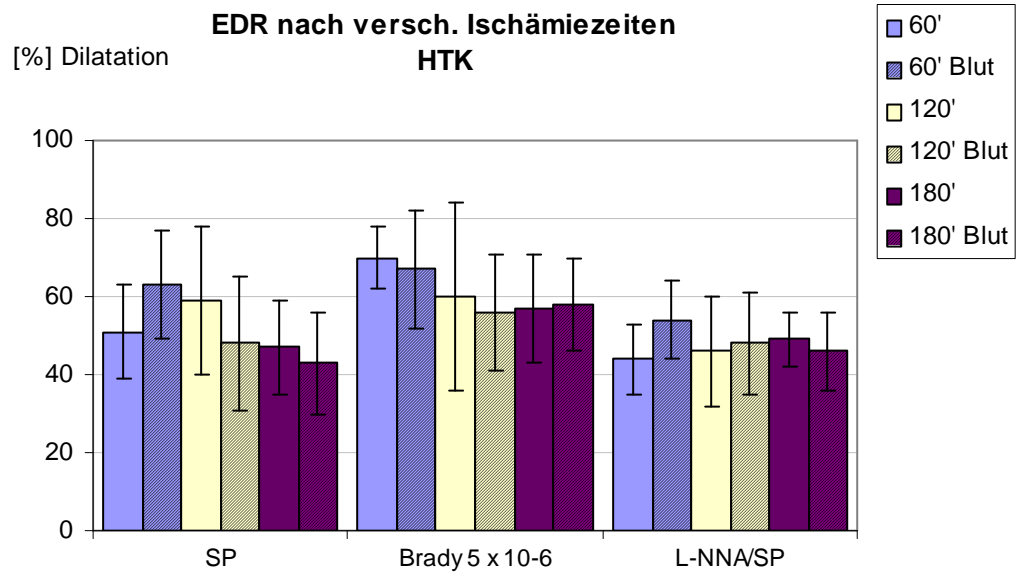
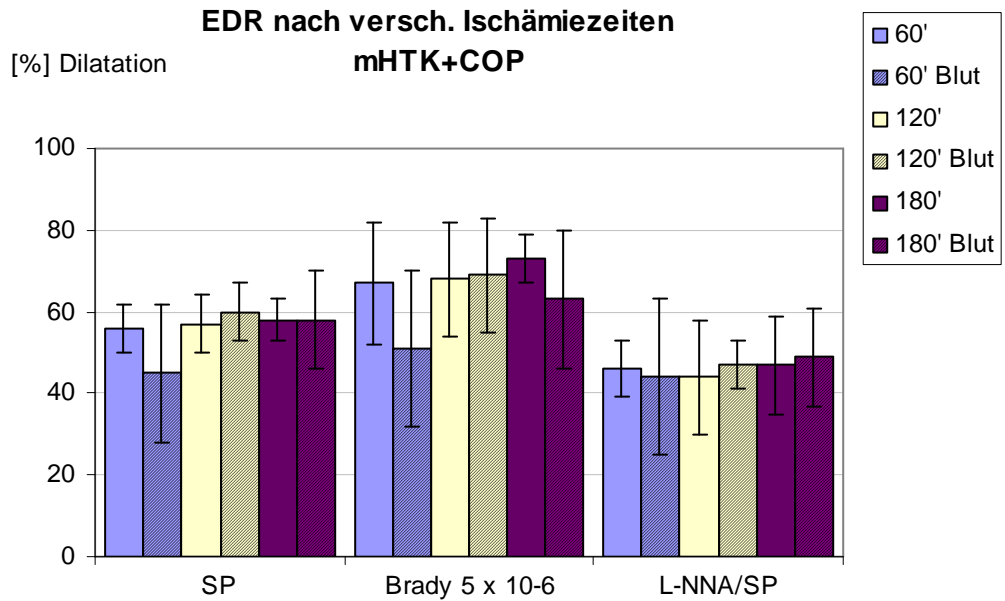
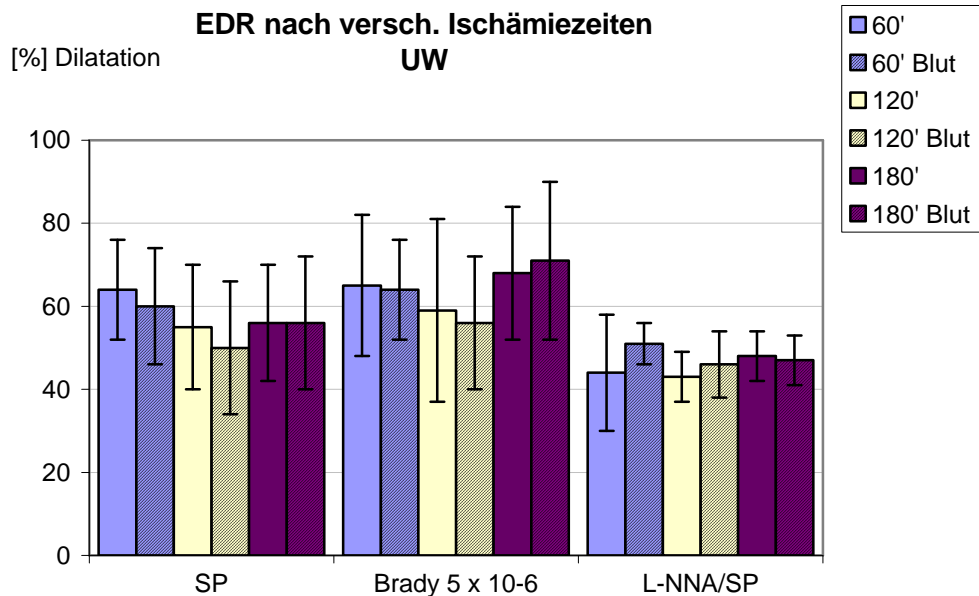


Abbildung 33: Vergleichende Darstellung der EDR mit und ohne Blutreperfusion nach Konservierung in HTK-Lösung nach verschiedenen Ischämiezeiten



**Abbildung 34:** Vergleichende Darstellung der EDR mit und ohne Blutperfusion nach Konservierung in mHTK-Lösung + COP nach verschiedenen Ischämiezeiten



**Abbildung 35:** Vergleichende Darstellung der EDR mit und ohne Blutperfusion nach Konservierung in UW-Lösung nach verschiedenen Ischämiezeiten.

Diese nicht reperfundierten, aber 24 Stunden konservierten Koronarringe erlangten nur teilweise bessere Dilatationswerte als unsere blutreperfundierten Ringe nach Ischämie und Konservierung. Diese Unterschiede waren jedoch alle nicht signifikant. Der NO-Weg scheint bei allen Gruppen deutlicher belastet zu sein, als die EDHF-Freisetzung (vgl. Abb. 33-35). Die Ischämiedauer führt nicht zu signifikanten Unterschieden der EDR.

Die Blutreperfusion ist also eine geeignete Maßnahme zur Restitution von Koronargefäßen nach normothermer Ischämie. Nach einer Stunde Blutreperfusion fand sich eine Tendenz zur Verbesserungen der EDR. Nach Konservierung und Blutreperfusion ist keine völlige Restitution möglich, jedoch finden sich auch keine Anzeichen für zusätzliche Schäden an den Koronarien.

In der histologischen Untersuchung zeigte sich das Endothel weitgehend intakt. Es waren keine Nekrosen erkennbar. Nur wenige Zellen hatten einen apoptotischen Zellkern. Die verminderte Dilatationsfähigkeit kann also nicht auf einen Zelluntergang im Endothel zurückgeführt werden. Vielmehr scheinen andere Funktionsbeeinträchtigungen die Ursache hierfür zu sein. Möglicherweise kommt es nur vorübergehend zu einer verminderten Freisetzung von Substraten, da schon nach einer Stunde Blutreperfusion Verbesserungen sichtbar sind.

Aussagen zur Qualität der verschiedenen Konservierungen sind nur begrenzt möglich, wenn auch nach längerer Ischämiezeit das Endothel bei mHTK + COP oder UW-Lösung am besten in seiner Funktion erhalten bleibt. Eine gute Erhaltung der endothelialen Koronarfunktion ist aber eine wichtige Voraussetzung für eine optimale Erholung der Myokardfunktion. Aus unseren Untersuchungen geht weiterhin hervor, dass an den mit mHTK + COP persufflierten Gefäßen keine zusätzlichen Schäden entstehen, das Verfahren im Hinblick auf die gute Funktionserhaltung der Gefäßendothelien gerade nach längeren Ischämiezeiten und der in früheren Untersuchungen gezeigten guten Myokarderholung also besonders für die Konservierung des Herzens geeignet ist.



## **5 Zusammenfassung**

**Dorothee Dahmen**

### **Auswirkung der Blutreperfusion nach normothermer Ischämie und hypothermer Konservierung auf die endothelabhängige Relaxation der epikardialen Koronararterien des Schweins**

Bei Herztransplantationen spielt der Erhalt der Koronargefäße eine entscheidende Rolle. Besonderes Augenmerk muss hier auf das koronare Endothel und dessen besonderen Schutz gerichtet werden. Das koronare Endothel moduliert den Gefäßtonus der großen und kleinen Koronararterien durch die Freisetzung verschiedener endothelabhängiger Substanzen, die entweder Dilatationen oder aber Kontraktionen herbeiführen. Nur bei gut erhaltener Funktion des Endothels kann das Spenderorgan auch nach der Verpflanzung seine physiologischen Aufgaben erfüllen. Die mögliche Lagerzeit der Spenderorgane zu verlängern und trotzdem eine optimale funktionelle Wiederherstellung zu erreichen, wäre ein großer Fortschritt.

In dieser Studie wird der Einfluss einer Blutreperfusion nach normothermer Ischämie und verschiedenen Konservierungsmethoden und -zeiten auf das Endothel der großen Koronargefäße des Schweins getestet.

Dazu wurde die rechte Koronararterie von frisch geschlachteten Schweinen am Schlachthof entnommen und mit umgebendem Myokard bei 38°C für 60, 120 und 180 Minuten gelagert, um eine normotherme Ischämie zu simulieren. Während dieser Zeit wurden die Arterien ins Labor transportiert, anschließend von Myokard und Bindegewebe befreit und in verschiedenen Konservierungslösungen für 24 Stunden bei 1°C gelagert. Die unterschiedlichen Konservierungsarten waren die Lagerung in HTK-Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung), in mHTK-Lösung (modifizierte HTK-Lsg) bei gleichzeitiger COP (coronary oxygen persufflation) sowie die Lagerung in UW-Lösung (University of Wisconsin solution). In einigen Versuchen schloss sich nach der 24-stündigen Konservierung noch eine Reperfusion mit warmem, oxygeniertem und heparinisiertem Schweineblut an.

Für die anschließende Untersuchung der Funktionalität der Gefäßendothelien wurden isolierte Ringpräparate der Koronararterien in Organbäder mit oxygenierter normothermer Krebs-Henseleit-Lösung verbracht und dort zwischen zwei Gefäßhaltern unter der Belastung von 2 g eingespannt. Mit KCl wurde die maximale

Kontraktion ermittelt. Nach einer Vorkontraktion mit  $\text{PGF}_{2\alpha}$  konnte mit Substanz P die endothelabhängige Dilatation ausgelöst werden. Ein vergleichbares Verfahren wurde mit einer Verdünnungsreihe von Bradykinin oder Serotonin durchgeführt. In einer weiteren Messreihe wurde L-NNA hinzu gegeben, um die Entstehung von NO zu unterdrücken. Bei allen Messungen war Indomethacin anwesend, um einen eventuellen Einfluss von Prostaglandinen auf die Gefäßweite auszuschalten. Zur Bestimmung der maximalen, endothelunabhängigen Dilatation, wurden SNP (sodium nitroprussid) und danach das Zellgift Papaverin hinzu gegeben.

Die endothelabhängige Vasorelaxation errechneten wir aus dem prozentualen Anteil der Dilatation nach SP, Bradykinin oder Serotonin an der PGF-Kontraktion.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Endothelfunktion in allen Gruppen voll erhalten war. Die Blutreperfusion wirkte sich nach 180minütiger normothermer Ischämie positiv auf die Endothelfunktion aus. Hier wurden signifikant bessere Ergebnisse erreicht als bei den nicht reperfundierten Gefäßen.

Bei den nicht konservierten Gefäßen konnten hinsichtlich der unterschiedlichen Ischämiezeiten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Alle Koronarringe erreichten hier physiologische Dilatationswerte.

Die konservierten und reperfundierten Ringe zeigten signifikant schlechtere Werte als die nicht konservierten Koronarringe.

Allerdings konnten Unterschiede bei den verwendeten Konservierungsarten festgestellt werden. So zeigten sich bei der Konservierung in HTK-Lösung eine kontinuierliche Verschlechterung in Abhängigkeit zur Ischämiedauer und ein ähnlicher Effekt nach den längeren Konservierungszeiten bei Konservierung in UW-Lösung.

Bei der Konservierung in mHTK + COP konnte eine solche Abhängigkeit von der Ischämiedauer nicht registriert werden.

Die Studie zeigt, dass die Blutreperfusion nach normothermer Ischämie und hypothermer Konservierung keine negativen Auswirkungen auf die endothelabhängige Relaxation der epikardialen Koronararterien des Schweins hat.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Blutreperfusion sogar nach 180 Minuten normothermer Ischämie und nachfolgender 24-stündiger hypothermer Konservierung noch zu sehr guten Ergebnissen hinsichtlich der funktionellen Restitution des Endothels führt, insbesondere bei Verwendung eines oxygenierten Konservierungsverfahrens.

# Summary

**Dorothee Dahmen**

**Effects of blood reperfusion after normothermic ischemia and hypothermic preservation on the endothelium-derived relaxation of the epicardial coronary arteries of the pig**

In heart transplantation the preservation of the coronary vessels plays a crucial role. Particular attention should be paid here to the coronary endothelium and its special protection is addressed. The coronary endothelium modulates the vascular tone of large and small coronary arteries through the release of various endothelium-derived substances that cause either dilations or contractions. Only with well-preserved function of the endothelium, the graft will be able to work physiologically after transplantation.

To prolong the possible storage time of grafts and nevertheless reach a good functional restitution would be a great progress.

In this study the influence of blood reperfusion after normothermic ischemia and various preservation methods and times on the endothelium of large coronary vessels of the pig is tested.

Therefore the right coronary artery from freshly slaughtered pigs at the slaughterhouse was taken and stored with the surrounding myocardium for 60, 120 and 180 minutes at 38°C to simulate a normothermic ischemia. During this time the vessels were transported to the laboratory and the myocardium and connective tissue were removed and the arteries were stored in different preservation solutions for 24 hours at 1°C. The different types of preservation were the storage in HTK-solution (histidine-tryptophan-ketoglutarate), in mHTK-solution (modified HTK) combined with COP (coronary oxygen persufflation) and UW-solution (University of Wisconsin solution). A reperfusion with warm, oxygenated and heparinized full pig blood followed in some experiments.

Measurements of coronary function were carried out by means of a lever transducer system; the isolated rings were fixed between two triangular steel-wire holders under a load of 2g and placed in an oxygenated organ bath of Krebs-Henseleit-solution.

First KCL was applied to trigger a maximum contraction. After a precontraction with PGF<sub>2α</sub> substance P was added to stimulate endothelium dependent dilation.

A comparable procedure was followed by a dilution line of Bradykinin or Serotonin. Another run was performed by blocking all NO production by using L-NNA. Indomethacin was administered at the begin of each run to rule out any possible endothelial prostacyclin effect. To determine the maximum endothelium-independent dilation SNP (sodium nitroprussid) and after that the cell poison papaverine were added.

The endothelium-dependent dilation was calculated from the percentage of SP-Bradykinin- or Serotonin-dilation to PGF-contraction.

The results show that the endothelial function in all groups was fully maintained. The blood reperfusion after 180min of normothermic ischemia had positive effects on the endothelial function. There were significantly better results than in the non-reperfused vessels.

The non preserved vessels did not differ significantly with regard to the different times of ischemia. All rings reached physiological dilation values.

The preserved and reperfused rings showed significantly lower values than the not preserved vessels.

Indeed differences in the types of preservation were found. The preservation with HTK-solution showed a steady deterioration in dependence to duration of ischemia and a similar effect after longer storage times during preservation with UW-solution. The preservation in mHTK + COP did not show such dependence.

The study shows that the blood reperfusion after normothermic ischemia and hypothermic preservation has no negative impact on the endothelium-derived relaxation of the epicardial coronary arteries of the pig.

In addition it was shown that blood reperfusion even after 180 minutes normothermic ischemia followed by 24 hours of hypothermic preservation still leads to excellent results with regard to functional restitution of the coronary endothelium, particularly if an oxygenated preservation is used.

## **6 Literaturverzeichnis**

- **Accili E.A., Buchan A.M.J., Kwok Y.N., Ledsoe J.R., Brown J.C. (1994):**  
Presence and actions of vasoactive intestinal peptide in the isolated rabbit heart.  
Can J Physiol Pharmacol 73: 134139
- **Alit A., Montgomery W.D., Santamore W.P., Spence P.A. (1997):**  
Preventing gastroepiploic artery spasm: papaverine vs. calcium channel blockade.  
J Surg Res 71:41-48
- **Altschuld R.A., Hostetler J.R. and Brierley G.P. (1981):**  
Response of isolated rat heart cells to hypoxia, re-oxygenation, and acidosis.  
Circ Res 49: 307-316
- **Bae S.W., Kim H.S., Cha Y.N., Park Y.S., Jo S.A., Jo I. (2003):**  
Rapid increase in endothelial nitric oxide production by bradykinin is mediated by protein kinase. A signaling pathway.  
Biochem Biophys Res Commun 306: 981-987.
- **Belzer F.O., Southard J.H. (1988):**  
Principles of solidorgan preservation of cold storage.  
Transplant 45: 673-676
- **Beny J.L. und Schaad O., (2000):**  
An evaluation of potassium ions as endothelium-derived hyperpolarizing factor in porcine coronary arteries.  
Br J Pharmacol 131: 965-973
- **Bertsch T., Janke C., Denz C., Luiz T., Ellinger K., Hannak D., Bartelt U., Krieter H. (1998):**  
Cardiac troponin I and cardiac troponin T increases in pigs during ischemia-reperfusion damage.  
Exp Toxic Pathol 52: 57-159
- **Bosse M., Dahnken S., Fischer J.H. (2002):**  
Preserved Endothelial Function of Large and Small Coronary Vessels after Prolonged Storage Including Coronary Oxygen Persufflation  
Europ Society surg Res, Monduzzi Editore 209-217

- **Braunwald E. und Kloner RA. (1985):**  
Myocardial reperfusion: a double-edged sword?  
J Clin Invest 76:1713-9.
- **Bretschneider H.J. (1992):** Organübergreifende Prinzipien zur Verlängerung der Ischämietoleranz  
Leopoldina (R. 3) 37: 161-174
- **Brody J.P., Osborn T.D., Forster F.K., Yager P. (1996):**  
A Planar Microfabricated Fluid Filter. In: Sensors and Actuators  
A 54: 704–708
- **Budrikis A., Liao Q., Bolys R., Westerlaken B., Steen S. (1998):**  
Effects of cardioplegic Flushing, storage, and reperfusion on coronary circulation in the pig.  
Ann Thorac Surg 76:1345-9
- **Burgmann H., Reckendorfer H., Sperlich M., Spieckermann P.G. (1996):**  
Comparison of Bretschneider's-HTK and Euro-Collins solution using an in vitro small bowel perfusion model.  
Transplant Proc 28(5): 2636
- **Busse, R., Fisslthaler B., Fleming I. (2000):**  
NO ist nicht alles; EDHF: Renaissance der endothelialen Eicosanoide  
Physiol 14: 13-23
- **Busse R., Edwards G., Félétou M., Fleming I., Vanhoutte PM., Weston A. (2002):**  
EDHF: bringing the concepts together.  
Trends Pharmacol Science 23: 374-380.
- **Chen G., Suzuki H., Weston A.H. (1988):**  
Acetylcholine releases endothelium derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels.  
Br J Pharmacol 95: 1165 1174.
- **Cocks T.M. und Angus J.A. (1983):**  
Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenaline and serotonin.  
Nature 305 (5935): 627-630

- **Cooper D.K.C., Wicomb W.N., Barnard C.N. (1983):**  
Storage of the donor heart by a portable hypothermic perfusion system:  
Experimental development and clinical experience.  
J Heart Transplant 2: 104-110
- **Crick S.J., Sheppard M.N., Ho S.Y., Gebstein L., Anderson R.H. (1998):**  
Anatomy of the pig heart; comparison with normal human heart structure.  
J Anat 139: 105-119
- **Dahnken S. (2007):**  
Endothelabhängige Dilatation von Kaninchencoronarien nach hypothermen  
Konservierungsverfahren mit und ohne Sauerstoffpersufflation.
- **Dendorfer A. (1996):**  
Pharmakologie der Nitrate und anderer NO-Donatoren.  
Herz 21, Suppl I:38-49
- **Deutsche Stiftung Organtransplantation, Stiftung bürgerlichen Rechts**  
Deutscherherrnufer 55, 60594 Frankfurt am Main
- **Deutsche Transplantationsgesellschaft e.V.**  
Universität Rostock, Schillingallee 35, 18057 Rostock
- **Deutsches Transplantationsgesetz - TPG**  
Gesetz über die Spende, Entnahme und Übertragung von Organen  
vom 05. November 1997 (BGBl. I S.2631)
- **Döring H.J. und Dehnert H. (1985):**  
Das isolierte perfundierte Herz nach Langendorff.  
Biomesstechnik Verlag March GmbH, March bei Freiburg i. Br.
- **Edwards G., Feletou M., Gardener M.J., Glen C.D., Richards G.R.,  
Vanhoutte P.M., Weston A.H. (2001):**  
Further investigations into the endothelium-dependent hyperpolarizing effects  
of bradykinin and substance P in porcine coronary artery.  
Br J Pharmacol 133:1145-1153
- **Eikens E. und Wilcken D.E.L.(1960):**  
Myocardial reactive hyperemia and coronar vascular reactivity in the dog.  
Circ Res 33: 267-274

- **Elliot R.J., Heap B. R. (1960):**  
Equivalence of the Critical Concentrations in the Ising and Heisenberg Models of Ferromagnetism.  
Phys Rev Lett 5, 366 – 367
- **Engelhardt v. W. und Breves G.(2000):**  
Physiologie der Haustiere,  
1. Auflage, Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart
- **Erhard J., Lange R., Scherer R., Kox W.J., Bretschneider H.J., Gebhard M.M. and Eigler F.W.(1994):**  
Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation.  
Transplant Internat 0934-0874; Vol 7 Nr 3; 177-181
- **Erspamer V. und Asero B., (1952):**  
Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine.  
Nature (London) 169, 800 – 801.
- **Erspamer V. (1954):**  
Pharmacology of indole-alkylamines.  
Pharmacol Rev 6, 425 – 487.
- **Félétou M. und Vanhoutte P.M. (2000):**  
Endothelium dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells.  
Acta Pharmacol Sin 21: 118.
- **Feng J., Li H., Rosenkranz E.R. (2000):**  
Bradykinin protects the rabbit heart after cardioplegic ischemia via NO-dependent pathways.  
Ann Thorac Surg 70: 2119-2124
- **Ferrera R., Larese A., Marcsek P., Guidollet J., Verdys M., Dittmar A., Dureau G. (1994):**  
Comparison of different techniques of hypothermic pig heart preservation.  
Ann Thorac Surg 57: 1233

- **Fischer J.H., und Jeschkeit S. (1996):**  
Minimal amounts of hyaluronidase in HTK or UW solution substantially improve the recovery of preserved hearts.  
Transpl Int S442-S446
- **Fischer J.H., Kuhn-Regnier F., Jeschkeit S., Switkowski R. (1998):**  
Excellent Recovery After Prolonged Heart Storage By Preservation With Coronary Oxygen Persufflation.  
Transplantation, Vol. 66, 1450-1459
- **Fischer J.H., Funcke C., Yotsumoto G., Jeschkeit-Schubbert S., Kuhn-Régnier F. (2003):**  
Maintenance of physiological coronary endothelial function after 3.3 h of hypothermic oxygen persufflation preservation and orthotopic transplantation of non-heart-beating donor hearts.  
Europ J Cardio-thorac Surg 25: 98-104
- **Fischer J.H., Steinhoff M. (2005):**  
Effects of aprotinin on endothelium-dependent relaxation of large coronary arteries.  
Europ J Cardio-thorac Surg 28: 801-804
- **Frieden M., Sollini M., Beny J.L. (1999):**  
Substance P and bradykinin activate different types of K<sub>Ca</sub> currents to hyperpolarize cultured porcine coronary endothelial cells.  
J Physiol 519:361371.
- **Frishman W.H. und Grewall P. (2000):**  
Serotonin and the heart.  
Ann Med 32: 195-209
- **Frishman W.H., Huberfeld S., Okin S., Wang Y.H., Kumar A., Shareef B. (1995):**  
Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular disease.  
J Clin Pharmacol. 35: 541

- **Furchtgott R.F. und Zawadzki J.V.(1980):**  
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.  
Nature 288: 323-40
- **Ge Z., Zhang X., Fung P.C., He G. (2000):**  
Endothelium dependent hyperpolarisation and relaxation resistance to N-nitro-Larginine and indomethacin in coronary circulation.  
Cardiovasc Res 46: 547556.
- **Gimbrone M.A.Jr. (1999):**  
Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis.  
Am J Pathol v. 155, 1-5
- **Goodman K. und Gilman A. (1984):**  
The pharmacological basis of Therapeutics.  
McGraw-Hill Education – Europe, 11. Auflage, 0-07-142280-3
- **He G.W. und Yang C.Q. (1998):**  
Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in coronary arteries by cold storage with University of Wisconsin solution.  
J Thorac Cardiovasc Surg 116:122-30
- **Hunter S.L., Culp L.B., Muir W.W., Lerche P., Birchard S,J., Smeak D.D., McLoughlin M.A. (2003):**  
Sodium nitroprussideinduced deliberate hypotension to facilitate patent ductus arteriosus ligation in dogs. [In Process Citation]  
Vet Surg 32: 336340.
- **Icking A., Oess S., Müller-Esterl W. (2006):**  
Zelluläre Signaltransduktion – Intrazelluläre Navigation von NO-Synthasen.  
BIOspektrum 04.06: 342-345
- **Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C., (1999):**  
Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview.  
J cardiovasc Pharm 34:879-886
- **Jahania S., Sanchez J.A., Narayan P., Lasley R.D., Mentzner R.M. (1999) :**  
Heart preservation for transplantation: principles and strategies.  
Ann Thorac Surg 68: 1983-1987

- **Johnsson C., Tufveson G., Hallgren J. (2000):**  
Monitoring of intragraft pressure of rejecting organs: increase tissue pressure can be reduced by hyaluronidase therapy.  
Transplantation 70 (11): 1575-1580
- **Jones J.W., Payne W.E., Matas A.J. (1993):**  
The living donor: risks, benefits, and related concerns.  
Transplantation Rev 7:115-128
- **Klockgether-Radke A.P., Gravemann J., Kettler D., Hellige G. (2000):**  
Influence of opioids on the vascular tone of isolated porcine coronary artery segments.  
Acta Anaesth Scand, 44(9): 1134-7.
- **Klockgether-Radke A.P., Haemmerle A., Kettler D., Hellige G. (2000):**  
Do muscle relaxants influence vascular tone in isolated coronary artery segments?  
Eur J Anaesth 17(8): 481-4.
- **Klinke R. und Silbernagel S. (1996):**  
Lehrbuch der Physiologie  
2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart
- **Kolb E. (1988):**  
Lehrbuch der Physiologie der Haustiere  
3.Auflage, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- **Kuhn-Regnier F., Fischer J.H., Jeschkeit S., Switkowski R., Bardakcioglu Ö., Sobottke R., de Vivie E.R. (2000):**  
Coronary oxygen persufflation combined with HTK cardioplegia prolongs the preservation time in heart transplantation.  
Eur J Cardio-Thorac Surg 17: 71-76
- **Kukovetz W.R. und Pösch G. (1970):**  
Inhibition of cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase as a possible mode of action of papaverine and similarly acting drugs.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 267: 189-194
- **Kurowai M., Aoki H., Kobayashi S., Nishimura J., Kanaide H. (1995):**  
Mechanism of endothelium-dependent relaxation induced by substance p in the coronary artery of the pig.  
Brit J Pharmacol 116: 2040-2047

- **Laude K., Thuillez C., Richard V. (2001):**  
Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion: a new therapeutic target ?  
Braz J Medical-Biolog Res 34:1-7
- **Löscher W., Ungemach F.R., Kroker R. (2002):**  
Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren  
5. Auflage Parey Buchverlag im Blackwell Verlag, Berlin, Wien
- **Lüscher T. F., Richard V., Tschudi M., Yang Z., Boulanger C. (1990):**  
Endothelial Control of Vascular Tone in Large and Small Coronary Arteries.  
J Am Coll Cardiol 15:519-27
- **Martorana P.A., Goebel B., Ruetten H., Koehl D., Keil M. (1998):**  
Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion in the dog: A functional and morphological investigation.  
Basic research in Cardiology 93:257-263
- **Martin W., Furchgott R.F., Villani G.M., 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.  
J Pharmacol Exp Ther 237: 539-547
- **May A.E., Neumann F.J., Preissner K.T. (1999):**  
The relevance of blood cell-vessel wall adhesive interactions for vascular thrombotic disease.  
Thromb Haemost v. 82: 962-970.
- **Mechiche H., Koroglu A., Elaerts J., Devillier P. (2001):**  
Vascular effects of neurokinins in humans (Effets vasculaires des neurokinines chez l'homme).  
Therapie 56: 20511.
- **Merrill J.P., Murray J.E., Harrison J.H., Guild W.R.(1956):**  
Successful homotransplantations of the human kidney between identical twins.  
JAMA 160:277-282

- **Meyer F.B. und Hallett J.W. (2000):**  
Redefined duplex ultrasonographic criteria for diagnosis of carotid artery stenosis.  
Mayo Clin Proc 75: 1133-1140
- **Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. (1991):**  
Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.  
Pharmacol Rev 43: 109-42
- **Nawrath H. (1980):**  
Papaverine decreases the efflux of <sup>42</sup>K in guinea-pig atrial heart muscle.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 312: 183-185
- **Nawrath H. und Meinertz T. (1977):**  
Electrical and Mechanical Activity of Mammalian Heart Muscle Fibres Treated with Papaverine.  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 299: 253-258
- **Nilius B., Viana F., Droogmans G. (1997):**  
Ion channels in vascular endothelium.  
Annu Rev Physiol 59: 145-170
- **O'Konski M.S., White F.C., Longhurst J.C., Roth D.M., Bloor C.M. (1987):**  
Atherosclerotic constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine.  
Am J Cardiovasc Pathol 1: 69-77
- **Page I.H. und Bumpus F.M. (1948) :**  
Serotonin  
Physiol Rev 41: 331-390
- **Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S. (1987):**  
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.  
Nature 327:524-6
- **Park S. J., Nakashima M., Nagao T., Vanhoutte P.M. (1999):**  
Hyperpolarization caused by serotonin contributes to endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery.  
Acta Pharmacol Sin 20: 1093 – 1097.
- **Pertz H.H., Elz S., Schunack W. (2004):**  
Structure-activity relationships of histamine H<sub>1</sub>-receptor agonists.  
Mini Rev Med Chem. 4: 935-940

- **Podesser B.K., Hallström S., Schima H., Huber L., Weisser J., Kroner A., Furst W., Wolner E. (1999):**  
 The erythrocyte-perfused “working heart” model: hemodynamic and metabolic performance in comparison to crystalloid perfused hearts.  
 J Pharmacol Toxicol Methods 41(1):9-15
- **Pohl U. und Busse R. (1989):**  
 Hypoxia stimulates the endothelium-derived-relaxation-factor (EDRF).  
 Am J Physiol 256:H1595-H1600
- **Poizat C., Keriél C., Cuchet P. (1994):**  
 Is oxygen supply sufficient to induce normotoxic conditions in isolated rat heart?  
 Basic Res Cardiol 89: 535544.
- **Prado G.N., Taylor L., Zhou X., Ricupero D., Mierke D.F., Polgar P. (2002):**  
 Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin bradykinin<sub>2</sub> and bradykinin<sub>1</sub> receptors.  
 J Cell Physiol 193: 175-186
- **Pschyrembel (1998):**  
 Klinisches Wörterbuch  
 258. Auflage, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York
- **Rebeyka I.M., Axford-Gatley R.A., Bush B.G. (1990):**  
 Calcium paradox in an in vivo model of multidose cardioplegia and moderate hypothermia. Prevention with diltiazem or trace calcium levels.  
 J Thorac Cardiovasc Surg 99: 475-483
- **Reichenspurner H., Russ C., Überfuhr P., Nollert G., Schlüter A.(1993):**  
 Myocardial Preservation using HTK Solution for Heart Transplantation.  
 Eur J Cardio-thorac Surg 7: 414-419
- **Roche e Silva M., Beraldo W. T., Rosenfeld G., Amer J. (1949):**  
 Bradykinin, hypotensive and smooth muscle stimulator released from plasma globulin by snake.  
 Physiol 156, 261
- **Rolles K., Foreman J., Pegg D.E. (1989):**  
 A pilot clinical study of retrograde oxygen persufflation in renal preservation.  
 Transplantation 48 (2): 339-357

- **Sato M., Das D.K. u. Engelmann R.M. (1999):**  
Interaction of bradykinin with angiotensin, prostacyclin, and nitric oxide in myocardial preservation.  
Ann N Y Acad Sci 874, 286-294
- **Scheld H.H., Deiwick M., Rötter J. (1995):**  
Arterielle Grafts.  
In: Interventionen am Herzen (Unger F, Mörl H, Dieterich HA, Hrsg.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 128-146
- **Scheunert A;Trautmann A. (1987):**  
Lehrbuch der Veterinär-Physiologie  
7. Auflage, Verlag Blackwell Wissensch., Bln;
- **Seccombe J.F., Schaff Hartzell V. (1995):**  
Coronary artery endothelial function after myocardial ischemia and reperfusion.  
Ann Thorac Surg 60:778-88
- **Steinhoff M. (2004):**  
Die Wirkung Aprotinins (Trasylol) auf die koronare endothelabhängige Vasorelaxation des Schweines und des Kaninchens.
- **Stevens L.M., Fortier S., Aubin M.C., El-Hamamsy I., Maltais S., Carrier M., Perrault L.P. (2006):**  
Effect of tetrahydrobiopterin on selective endothelial dysfunction of epicardial porcine arteries induced by cardiopulmonal bypass.  
Europ J Cardio-thorac Surg 30: 464-471
- **Tschudi M.R. und Lüscher T.F. (1996):**  
Stickstoffmonoxid: Das endogene Nitrat im Kreislauf.  
Herz 21 Suppl I: 50-60.
- **von Bayer H., Stahl K., Häusler M., Meissler M., Unger V.: (1997)**  
Eine Methode zur Ex-vivo-Vollblut-Perfusion isolierter Warmblüterorgane, dargestellt an der Niere von Schweinen.  
Biomed Technik 42: 61-68
- **Walsh J.T., Gray D., Keating N.A., Cowley A.J, Hampton J.R. (1995):**  
ACE for whom? Implications for clinical practice of post-infarct trials.  
Br Heart J 73: 470-474; doi:10.1136/hrt.73.5.470

- **Walters HL 3<sup>rd</sup>, Digerness SB, Naftel DC, Waggoner JR 3<sup>rd</sup>, Blackstone EH, Kirklin JW. (1992):**  
The response to ischemia in blood perfused vs. crystalloid perfused isolated rat heart preparations.  
J Mol Cell Cardiol 24 (10): 1063-77
- **Weissmann G.(1989):**  
The role of neutrophils in vascular injury: a summary of signal transduction mechanisms in cell/cell interactions.  
Springer Semin Immunopathol 11:235-58.
- **Wicomb W.N., Novitzky D.K.C., Cooper und Rose A.G. (1986):**  
Forty-eight hours hypothermic perfusion storage of pig and baboon hearts.  
J Surg Res 40: 276
- **White F.C., Roth D.M., Bloor C.M. (1986):**  
The Pig as a model for myocardial ischemia and exercise.  
Lab Anim Sci 36(4):351-6
- **Wu M., Dong Y., Yang Q., Yim A., He G.(2005):**  
Cellular electrophysiological and mechanical effects of celsior solution on endothelial function in resistance coronary arteries.  
Transplant 80. 1765-1772
- **Yotsumoto G., Jeschkeit-Schubbert S., Funcke C., Kuhn-Regnier F., Fischer J.H. (2003):**  
Total recovery of heart grafts of non-heart-beating donors after 3 hours of hypothermic coronary oxygen Persufflation preservation in an orthotopic pig transplantation model.  
Transplant 75: 750-756
- **Zimmermann A.N. und Hülsmann, W.C.(1966):**  
Paradoxical influence of calciumions on the permeability of the cell membranes in the isolated rat heart.  
Nature 211, 646-647



## **7 Eidesstattliche Erklärung**

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

Die beifolgende Dissertation mit dem Titel:

„Auswirkung der Blutreperfusion nach normothermer Ischämie und hypothermer Konservierung auf die endothelabhängige Relaxation der epikardialen Koronararterien des Schweins“

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.

Zu dieser Arbeit hat mich Herr Professor Dr. J.H. Fischer aus dem Institut für experimentelle Medizin der Universität zu Köln angeregt.

Beihilfe habe ich erfahren von Herrn PD Dr. J. Fries aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Köln. Dort wurden die histologischen Schnitte der Koronargefäße angefertigt.

Die beifolgende Dissertation habe ich noch nirgends eingereicht.

---

Dorothee Dahmen

## **8 Danksagung**

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

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

PD Dr. J. Fries aus dem Institut für Pathologie der Universität zu Köln danke ich für die Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Gefäßschnitte.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für experimentelle Medizin, Frau Lerwe, Frau Greiwe, Frau Carozzo, Frau Wisser und Herr Poley.

Maria und Frank danke ich für ihre Hilfe bei der Erstellung der Computergrafiken und ein stets offenes Ohr bei allen Problemen.

Meinem Mann Axel danke ich fürs Korrekturlesen und für seinen Rückhalt und aufmunternden Zuspruch.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern!

