An anatomical illustration of a pig's heart and its coronary arteries. The heart is shown in a reddish-pink color, with several major coronary arteries branching out. The arteries are depicted with a realistic texture, showing the vessel walls and the branching pattern. The background is dark, making the heart and arteries stand out.

EINFLUß NORMOTHERMER ISCHÄMIE MIT
NACHFOLGENDEN UNTERSCHIEDLICHEN
HYPOTHERMEN KONSERVIERUNGEN AUF DIE
ENDOTHELABHÄNGIGE RELAXATION DER
EPICARDIALEN CORONARARTERIEN
DES SCHWEINS

JULIA NAGLO-DÜNNER

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2010

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

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine
(Innere Medizin und Chirurgie) der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner
und dem
Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln
Betreuer: Prof. Dr. Jürgen H. Fischer

**Einfluß normothermer Ischämie
mit nachfolgenden unterschiedlichen hypothermen
Konservierungen auf die endothelabhängige Relaxation
der epicardialen Coronararterien des Schweins**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

eingereicht von

Julia Naglo-Dünner

Tierärztin aus Koblenz

Gießen 2010

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner

Prof. Dr. Jürgen H. Fischer

Tag der Disputation:

02.02.2010

Meinen Eltern

Marie-Louise und Joachim Naglo

Carlo und Feli

Inhaltsverzeichnis

1.	<i>Einleitung</i>	1
1.1.	Bedeutung der Konservierung von Spenderherzen	1
1.2.	Historischer Überblick	2
1.3.	Die Verwendung von NHBD und die Bedeutsamkeit der Konservierungslösungen und der Konservierungstechnik	2
1.4.	Funktionsfähigkeit des Coronaren Endothels	4
1.5.	Myocardiale Ischämie und ihre Folgen	5
1.6.	Endotheleigene Relaxationsfaktoren und Substanzen mit direkter Endothelwirkung	6
1.7.	Zielsetzung	9
2.	<i>Material und Methoden</i>	10
2.1.	Organgewinnung und Transport	10
2.2.	Gruppeneinteilung	11
2.3.	Verwendete Lösungen	12
2.4.	Konservierungen	14
2.5.	Versuchsaufbau, zeitlicher Ablauf und Funktionsmessungen	14
2.6.	Immunhistochemische Untersuchung humaner Coronararterien	17
	2.6.1. Vorbereitung der Endothelzellen	17
	2.6.2. Argonbegasung	19
	2.6.3. Fixierung und Konservierung der humanen Endothelzellen	19
2.7.	Bearbeitung der Zellen mit den Antikörpern	20
	2.7.1. Färbung der Coronarendothelien mit dem ersten Antikörper	20
	2.7.2. Färbung der Coronarendothelien mit dem zweiten und dritten Antikörper	21

2.8.	Versuchsauswertung	22
3.	<i>Ergebnisse</i>	23
3.1.	Anzahl der Präparate	23
3.2.	Anzahl der Präparate der Immunhistochemie	24
3.3.	Funktionsprüfung der Schweinecoronararterien	25
3.3.1.	Funktion der Coronararterien aus den Kontrollgruppe mit 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie	25
3.3.2.	Funktion der Coronararterien nach Konservierung in hypothermer HTK-Lösung für 24 Stunden	26
3.3.3.	Funktion der Coronararterien nach Konservierung in hypothermer m- HTK- Lösung bei gleichzeitiger Sauerstoffpersufflation für 24 Stunden	37
3.3.4.	Funktion der Coronararterien nach Konservierung in hypothermer UW-Lösung für 24 Stunden	46
3.3.5.	Auswertung der Immunhistochemischen Untersuchungen	57
4.	<i>Diskussion</i>	60
4.1.	Diskussion der Methodik	60
4.1.1.	Das Schweineherz als Versuchsorgan	60
4.1.2.	Krebs-Henseleit-Lösung (KH-Lösung)	60
4.2.	Diskussion der verwendeten Substanzen zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Coronararterien	61
4.2.1.	Substanz P (SP)	61
4.2.2.	Bradykinin	63
4.2.3.	Serotonin	65

4.2.4.	Sodiumnitroprussid (SNP)	66
4.2.5.	Papaverin	67
4.3.	Die endothelvermittelten Dilatationsfaktoren	67
4.3.1.	Stickstoffmonoxid (NO)	68
4.3.2.	Prostazyklin (PGI ₂)	69
4.3.3.	„EDHF“ (Hyperpolarisierender Faktor)	70
4.4.	Die verwendeten Konservierungs-Lösungen	71
4.4.1.	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) nach Bretschneider (Custodiol®)	72
4.4.2.	University of Wisconsin-Lösung (UW, Viaspan®)	74
4.4.3.	Modifizierte HTK-Lösung (m-HTK) und Sauerstoffpersufflation (COP, coronary oxygen persufflation)	76
4.5.	Diskussion der Immunhistochemischen Untersuchung	79
5.	<i>Zusammenfassung</i>	82
6.	<i>Summary</i>	84
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>	86
8.	<i>Erklärung</i>	102
9.	<i>Danksagung</i>	103

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACH	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BDM	2,3-Butandion Monoxim
Bk	Bradykinin
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosintriphosphat
cGMP	zyklisches Guanosintriphosphat
COP	coronary oxygen persufflation/koronare Sauerstoffpersufflation
CO ₂	Kohlendioxid
CP	Creatininphosphat
ECP	energy charge potential = (ATP+0,5xADP) /SAN SAN= Summe der Adeninnukleotide ATP+ADP+AMP
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	endothelium-derived relaxing factors
EET	Epoxyeicosatriensäure
eNOS	endotheliale Stickoxydsynthetase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HTK	Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat Lösung
IP ₃	Inositoltriphosphat
KH	Krebs-Henseleit Lösung
L-NNA	N ^G -Nitro-L-Arginin
m-HTK	modifizierte Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat Lösung

Min	Minuten
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Na ⁺	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid/Kochsalz
NHBD	Non-Heart-Beating-Donors (Organspender mit Herzstillstand)
NO	Nitric oxide/ Stickoxyd
NOS	Stickoxydsynthetase
PGF _{2α}	Prostaglandin _{2α}
PGI ₂	Prostazyklin
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
SNP	Sodium-Nitroprussid/Natrium Nitroprussid
SP	Substanz P
UW	University of Wisconsin-Lösung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung der Konservierung von Spenderherzen

In dieser Studie spielte die funktionelle Erhaltung der coronaren Endothelien nach unterschiedlich langen Ischämie-Phasen und unterschiedlichen Konservierungslösungen- und Methoden die zentrale Rolle.

Ziel der durchgeführten Versuche ist es, Möglichkeiten zu erforschen, welche die Konservierung von Spenderherzen verbessern. Die Herztransplantation ist trotz intensiver Forschung in den vergangenen Jahren weiterhin mit zahlreichen Komplikationen behaftet.

Die Anzahl der Spenderherzen ist bis heute bedeutend kleiner als die Zahl der Patienten, die auf ein Spenderherz warten. So standen im Jahr 2005 mehr als 700 herzkranken Patienten auf der Warteliste. Allerdings können mangels Spenderorganen nur 400 Herzen transplantiert werden. Der Bedarf an Spenderorganen steigt stetig, jedoch stagniert die Anzahl der Transplantationen pro Jahr. Nach Untersuchungen von Hosenpud sind weltweit über 56.000 Herzen transplantiert worden (Hosenpud et al., 2000). Bis heute wird eine Lagerung von 4 bis maximal 6 Stunden der zur Transplantation bestimmten Herzen praktiziert. Eine Verlängerung dieser Zeitspanne scheitert unter anderem an den fehlenden Konservierungstechniken.

Um den Sauerstoff- und Energiebedarf des Herzens während seiner Lagerung zu minimieren macht man sich das Prinzip der Hypothermie zunutze. Die durch die Hypothermie verlangsamten zellulären Prozesse sind zum einen sehr vorteilhaft für die steigende Ischämietoleranz des Herzens, zum anderen legen sie aber auch essentiell wichtige Transportmechanismen für die Aufrechterhaltung des ionalen Konzentrationsverhältnisses zwischen dem Intra- und Extrazellularraum lahm. Deshalb ist die Zusammensetzung der unterschiedlichen Konservierungslösungen, mit denen heutzutage die Kühlung per Perfusion stattfindet nach Notwendigkeit und Bedarf den metabolischen Vorgängen während einer hypothermen Konservierung angepasst.

1.2 Historischer Überblick

Im Jahre 1960 führten Lower und Shumway die erste erfolgreiche tierexperimentelle Studie an Hunden über orthotope Herztransplantation durch. Noch heute wird die Technik nach Lower und Shumway in vielen Transplantationszentren angewendet (Loebe 1992, Radovancevic und Frazier, 1999). Hardy et al. führten 1964 in Mississippi die erste xenogene Herztransplantation eines Schimpansenherzens am Menschen durch. Der Patient verstarb unter anderem aufgrund der akuten Abstoßungsreaktionen. Lower et al. verzeichneten 1965 erste Erfolge gegen die gefürchteten Abstoßungsreaktionen mit Hilfe einer immunsuppressiven Therapie nach orthotopen Herztransplantationen an Hunden. Im Jahre 1967 erfolgte in Kapstadt durch Barnard die erste allogene Herztransplantation am Menschen. Barnard handelte sehr verantwortungslos, da nach den seinerzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnissen bereits ein Scheitern dieser Transplantation vorherzusehen war. Der Patient verstarb aufgrund der ineffektiven immunsuppressiven Therapie, die eine Abstoßungsreaktion nicht verhindern konnte. Borel veröffentlichte 1977 seine Entdeckung des Cyclosporin A, welches die Bildung der T-Lymphocyten hemmt. Die T-Lymphocyten sind für den Vorgang der Abstoßung von entscheidender Bedeutung. Cyclosporin A hemmt deren Bildung, ohne das gesamte Immunsystem zu supprimieren.

Die Einjahresüberlebensrate stieg von 22 % im Jahre 1968 bis heute auf 81 % (Jamieson et al., 1979, Hosenpud et al., 2000). Die mit 25% häufigste Todesursache ist auch heute noch die gefürchtete Abstoßungsreaktion.

Die vorliegenden Zahlen zeigen, daß nach wie vor Anstrengungen unternommen werden müssen, um mehr Menschen ein transplantationsfähiges Herz zur Verfügung stellen zu können und die Komplikationsrate weiter zu senken.

1.3 Die Verwendung sogenannter Non-Heart-Beating-Donors (NHBD) und die Bedeutsamkeit der Konservierungslösungen und der Konservierungstechnik

Eine Möglichkeit die Anzahl der verfügbaren Spenderherzen zu erhöhen besteht in der Verwendung von Organen sogenannter Non-Heart-Beating-Donors. Den Spendern werden nach kurzzeitigem Herzstillstand das Herz bzw. die zur Transplantation benötigten Organe entnommen. Technisch gesehen ist es nicht möglich die Herzen länger als 3-4 Stunden

transplantabel zu erhalten. Durch den nicht sofort eintretenden Herzstillstand und die anhaltende warme Ischämie erfolgt die nötige Energiegewinnung fürs Herz über die anaerobe Glycolyse. Diese ist allerdings nicht in der Lage den anfallenden Energiebedarf zu decken, so dass es zu einem hochgradigen Energiemangel mit ATP-Abfall kommt und die Aktin-Myosin-Brücken nicht mehr gespalten werden können. Desweiteren kommt es durch die Laktatanhäufung zu einer schädigenden Acidose der Zellen. Die vorgeschädigten Organe von NHBD benötigen eine sofortige Oxygenierung im Rahmen einer Konservierung um irreversible Schäden zu verhindern bzw. um reversible Schäden teilweise aufzuheben. Dazu bietet sich die Reperfusion mittels Herz-Lungen-Maschine oder die Sauerstoffpersufflation unter der Konservierung an. Allerdings besteht auch hier eine zeitliche Limitierung der Lagerungskonservierung. Im Falle des Herzens ist die Oxygenierung oder Sauerstoffpersufflation (COP, coronary oxygen persufflation) von besonderer Bedeutung, um die Funktionsfähigkeit des Myokards und des Endothels zu erhalten. 1978 wurde erstmals bei Lagerungskonservierungen von Nieren eine Sauerstoffpersufflation während der gesamten Konservierungsdauer eingesetzt (Fischer et al., 1978). Die Sauerstoffpersufflation wurde während der hypothermen Lagerungskonservierung retrograd über das Venensystem der Niere durchgeführt. Hierdurch wurde eine verbesserte Funktionsrestitution einer durch 30-minütige normotherme Ischämie vorgeschädigten Niere erreicht. Ebenso gute Erfolge zeigte dieses Verfahren in der Weiterentwicklung mit der hypothermen Lagerungstechnik bei der Konservierung von Leber und Herz (Fischer et al. 1980, 1998). Durch die Hypothermie wird der Sauerstoff- und Energiehaushalt des Herzens während der Lagerung verringert. Somit kann die Stoffwechselaktivität eines Organs soweit reduziert werden, dass für eine definierte Zeit eine Ischämietoleranz möglich ist. Versuche an isolierten Schweineherzen aus dem Jahr 1998 (Fischer et al.) haben gezeigt, dass nach einer 14-stündigen hypothermen Lagerung in m-HTK-Lösung (0- 1°C) bei gleichzeitiger Sauerstoffpersufflation (COP, coronary- oxygenpersufflation) die Herzen hervorragende kardiovaskuläre und metabolische Funktionen wiedererlangten.

Desweiteren fanden auch die UW (University of Wisconsin)-Lösung und HTK (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat)-Lösung in einigen experimentellen Studien zur Konservierung von NHBD-Organen Verwendung. Seit Anfang der 60er Jahre beschäftigte sich Bretschneider mit der Suche nach einer kardioplegischen Lösung (Bretschneider, 1980). Nach der Entdeckung der Pufferwirkung der Aminosäure Histidin wurde die HTK-Lösung entwickelt, klinisch eingeführt und erstmals während einer Operation am offenen Herzen zur Kardioplegie verwandt. In den nachfolgenden Jahren fand die Konservierungslösung Anwendung bei Herz-

und Nierentransplantationen. Die University of Wisconsin-Konservierungslösung wurde 1986 von der Arbeitsgruppe um Belzer und Southard entwickelt. Nach tierexperimenteller Erprobung fand sie zuerst Anwendung bei der Nieren- und Pankreastransplantation (D'Alessandro, 1989). Die UW-Lösung wird hauptsächlich für die Konservierung von Lebern und Nieren, deren Empfänger auf ihre Transplantation warten, verwendet.

Die Organtransplantation von NHBD ist in einigen Staaten in Europa und Amerika weit verbreitet. In Deutschland dürfen bis zum heutigen Zeitpunkt Organtransplantationen von NHBD nur in Tierversuchen durchgeführt werden. Dies hat 2 Gründe: Zum einen erlaubt das Transplantationsgesetz eine Entnahme der Organe erst nach endgültigem, nicht behebbarem Ausfall des Großhirns, des Kleinhirns und des Hirnstammes nach Verfahrensregeln, die dem Stand der Erkenntnisse der medizinischen Wissenschaft entsprechen (§ 3, Absatz 1, 2 TPG). Abweichend von diesem Satz ist, dass die Untersuchung und Feststellung eines irreversiblen Stillstands von Herz- und Kreislauf ausreicht, der wiederum mindestens vor 3 Stunden eingetreten ist (§ 5, Absatz 1 TPG). Dies ist eine Dauer, bei der die ischämische Schädigung bereits irreversibel ist. Würde man allerdings im Transplantationsgesetz kürzere Ischämiezeiten festlegen, so ergäbe sich hier das Problem, dass die Irreversibilität des Herzstillstandes nicht wie der Hirntod eines Menschen exakt definiert werden kann, sowie die emotionale Situation oder religiöse Bindung der Politiker bzw. die Positionierung der Kirchen. Desweiteren fehlen Erkenntnisse über Konservierungstechniken- und Lösungen, die für die Funktionsaufnahme nach der Transplantation von entscheidender Bedeutung sind. Herztransplantationen von NHBD konnten bis heute nur in Tierversuchen durchgeführt werden.

1.4 Funktionsfähigkeit des Coronaren Endothels

Die endotheliale Unversehrtheit von Coronararterien ist eine wichtige Voraussetzung für eine gute Blutversorgung des Myocards. Aus diesem Grunde spielt der Funktionserhalt des Endothels eine wichtige Rolle für eine erfolgreiche Transplantation.

Die Endothelzellen nehmen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus im kardiovaskulären Bereich ein. Ebenso sind sie an der Wachstumsregulation der Zellen der glatten Muskulatur (Myozyten) in den Gefäßen beteiligt. Das Endothel löst über die Freisetzung von endotheleigenen vasoaktiven Substanzen eine Gefäßdilatation (EDR-Faktoren, endothelium-derived-relaxation-factors) oder eine Gefäßkontraktion (EDK-

Faktoren, endothelium-derived-contraction-factors) aus. Es besteht ein ausbalanciertes System zwischen dem Ist- und dem Soll-Zustand des Gefäßtonus, der im physiologischen Zustand den angemessenen Coronarfluß sichert und so Schutz bietet vor Thrombose, Gefäßspasmus und Arteriosklerose. Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des coronaren Endothels gibt es bereits zahlreiche Studien. In der Versuchsreihe von Bosse, Dahnken und Fischer (2002), zeigten nicht vorgeschädigte Coronararterien von Schweinen keine Leistungseinbußen, nachdem sie für 16-18 Stunden in einer m-HTK-Lösung konserviert und sauerstoffpersuffliert wurden. Weitere Versuche von Fischer et al. aus dem Jahr 2004, die sich mit der Funktion der Coronarendothelien von Schweineherzen befassten, zeigten trotz 16-minütiger warmer Ischämie keine Einbußen der endothelialen Funktion. Auf diese Ischämiephase folgte eine 3,3 stündige Sauerstoffpersufflation bei 0-1°C in verschiedenen Konservierungslösungen (Bretschneider's kardioplegische Lösung Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung und die modifizierte Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung). Nach der orthotopen Transplantation der Schweineherzen konnte eine gut erhaltene Endothelfunktion der Coronararterien gemessen werden. Die Technik der Sauerstoffpersufflation stellt also eine sehr gute und übertragbare Konservierungsmethode für Herzen von NHBD dar.

Mit der HTK (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat)-Lösung und der UW (University of Wisconsin)-Lösung haben sich Ku et al. (1997) befasst. Sie untersuchten den myocardialen Erhalt an einem isolierten Rattenherzmodell nach hypothermer Lagerung in der UW-Lösung im Vergleich zur HTK-Lösung. Sie fanden heraus, dass aufgrund des niedrigeren Kaliumgehaltes in der HTK-Lösung es zu einem besseren Funktionserhalt des coronaren Endothels kam.

1.5 Myocardiale Ischämie und ihre Folgen

Die Funktionen des Endothels verändern sich unter pathologischen Bedingungen, wie Hypertonie, Diabetes mellitus oder Hypercholesterinämie. Solche Dysfunktionen zeigen sich in der Abnahme der NO-Freisetzung aus dem Endothel, verbunden mit einer Zunahme der freien Radikale wie Superoxid-Anionen. Durch Ischämie kann ein Teil des Rezeptor-G-Protein-Komplexes geschädigt und damit die Aktivierung der eNOS (endotheliale NO-Synthase) unterbunden werden. Es kommt zur verminderten Bildung von NO mit all ihren schwerwiegenden Konsequenzen. Durch Ischämie vermehrt freigesetzte Sauerstoffradikale

sind zudem in der Lage NO zu inaktivieren. Es kommt zu starken Entzündungsreaktionen, aufgrund des Wegfalls der inhibitorischen Eigenschaft des NO auf die Neutrophilenaktivität- und Adhäsion. Durch die Zerreißung von Zellverbänden, bedingt durch die Enzyme der Neutrophilen, haben plättcheneigene Mediatoren wie Serotonin oder Thromboxan A₂ die Möglichkeit direkt an der glatten Muskulatur eine Konstriktion auszulösen. Im Rahmen der zunehmenden Hypoxie wird der vaskuläre Tonus weiterhin durch vasoaktive Substanzen wie Endothelin 1 erhöht. Aus Interaktionen zwischen NO und Superoxid-Anionen resultieren Peroxynitrate. Diese Verbindungen sind sehr instabil, toxisch und reaktiv. Entweder werden sie zum EDCF (endothelium-derived-contraction-factor) metabolisiert oder sie lösen die Synthese eines solchen aus. Neutrophile Granulozyten sind in der Lage NO indirekt zu inaktivieren und Superoxid-Anionen zu aktivieren, d.h. sie tragen ebenfalls zur Peroxynitritbildung mit bei. Es besteht eine erhöhte Gefahr der Thrombusbildung und der Vasospasmus ist vorprogrammiert.

1.6 Endotheleigene Relaxationsfaktoren und Substanzen mit direkter Endothelwirkung

Funktionsfähige Endothelzellen nehmen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus im kardiovaskulären Bereich ein. Eine gut erhaltene Funktionsrestitution ist das Ziel einer jeden Konservierung und gilt als Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation.

Zu den endotheleigenen Relaxationsfaktoren gehören:

1. Stickstoffmonoxid (NO)
2. Prostacyclin (PGI₂)
3. „Hyperpolarisierender Faktor“ (EDHF)

Furchgott und Zawadzki wiesen 1980 nach, daß ACH (Acetylcholin) in den Endothelzellen zur Freisetzung einer bis dahin unbekannt Substanz führt, welche für die Dilatation der glatten Muskulatur verantwortlich ist. Desweiteren fanden sie heraus, daß die Voraussetzung dieser Dilatation ein intaktes Endothel ist. Der von ihnen postulierte „endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) wurde 1987 von Palmer und Mitarbeitern als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert, also einem anorganischen Gas (Palmer et al., 1987). Diese Erkenntnis war von fundamentaler Bedeutung für das Verständnis der Gefäßbiologie und stellte neben der Charakterisierung der am L-Arginin/NO-Stoffwechsel beteiligten Enzymsysteme einen

Meilenstein der sich rasch entwickelnden Vorstellungen zum molekularen Wirkmechanismus von EDRF dar.

Das Prostazyklin ist ein Produkt aus dem Arachidonsäurestoffwechsel. Moncada und Vane berichteten bereits 1979, dass Prostazyklin in der Lage ist, über eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels die NO-Synthase zu aktivieren und somit eine Relaxation der glatten Muskulatur zu bewirken (Moncada et al., 1979).

Die endothelvermittelte Vasodilatation kann nicht allein durch die Freisetzung von NO und PGI₂ erklärt werden (Triggle und Ding, 2002). Es wird eine weitere endothelvermittelte Relaxation, die mit einer Hyperpolarisation einhergeht beschrieben (He, 2003). Trotz der Hemmung der durch Stickstoffmonoxid- oder Prostazyklin-medierte Relaxation mit spezifischen Inhibitoren wie N^G-Nitro-L-Arginin und Indomethacin blieb laut He (2003) eine Vasodilatation bestehen, die stets mit einer Hyperpolarisation der glatten Muskelzellmembran einherging. Dieser hyperpolarisierende Faktor wurde als „EDHF“ (endothelium-derived-hyperpolarisation-factor) bezeichnet, dessen relaxierende Eigenschaften nur in Anwesenheit eines Endothels zu beobachten sind (Busse et al., 2000). Dieser Begriff ist allerdings eher irreführend, da es sich nicht um einen einzigen Faktor, sondern um verschiedene Faktoren handelt, die über verschiedene Mechanismen calciumabhängige Kaliumkanäle aktivieren, was insbesondere in kleinen Arterien eine Hyperpolarisation der glatten Muskelzellen auslöst. In einer Versuchsreihe von Edwards et al. (2001) konnte an den linken Coronararterien des Schweins durch die Hemmung der Cyclooxygenase und NO-Synthase eine Beteiligung von Bradykinin und SP durch Aktivierung unterschiedlicher Kanäle an der Vasodilatation durch den EDHF-Mechanismus bewiesen werden.

Bis heute weiß man noch nicht in welchem Maße der EDHF-Mechanismus an der endothelabhängigen Vasodilatation beteiligt ist. Dies scheint von der Art des Stimulus, der Spezies und dem Typ des Gefäßbettes abzuhängen.

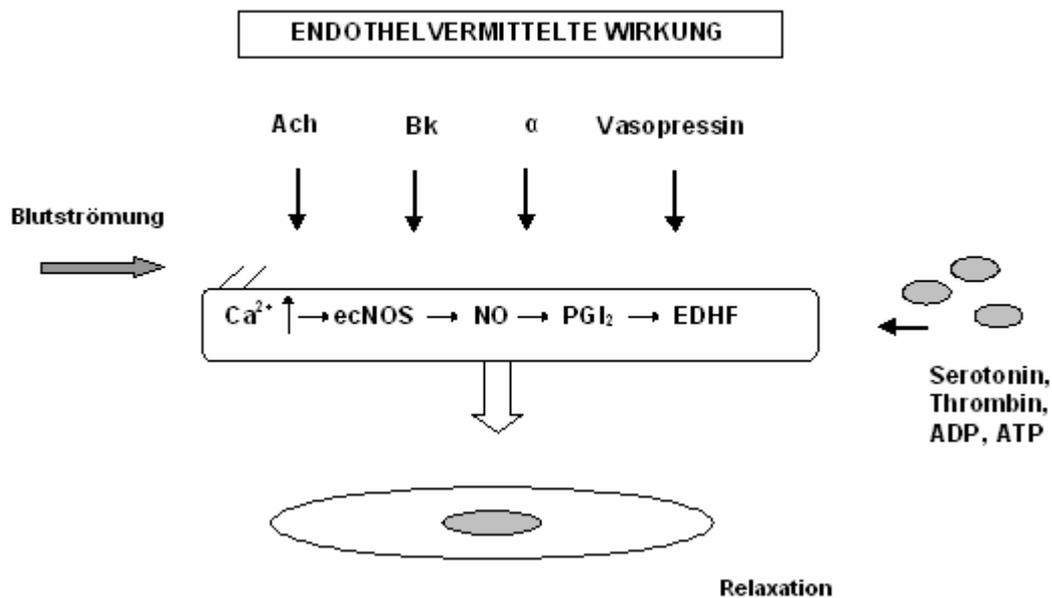


Abbildung 1: Endothelvermittelte und direkte Wirkung von Mediatoren auf die Dilatation der Gefäßmuskulatur

Durch die Blutströmung (/ /) kommt es zur Auslenkung der Makromoleküle an der luminalen Oberfläche und damit zur Öffnung der Calciumkanäle. Die NO- und PGI₂-Produktion wird unter anderem durch Acetylcholin, Bradykinin, α₂-Agonisten und Vasopressin induziert. Serotonin, Thrombin, ADP und ATP werden von den Plättchen abgegeben und wirken als Mediator auf das Endothel.

// = Blutfluß/Scherkraft, Ach = Acetylcholin; führt allerdings nicht bei der Spezies Schwein zu einer Vasodilatation der großen Coronararterien, wohl aber der Widerstandsgefäße, Bk = Bradykinin, α = α₂-Agonisten, ecNOS = endotheliale konstitutive NO-Synthase, NO = Stickoxid, PGI₂ = Prostazyklin

(modifiziert nach Gavras et al., 1996)

1.7 Zielsetzung

Diese Studie soll eine mögliche Schädigung der epicardialen Coronararterien des Schweins nach unterschiedlich langer normothermer Ischämie und nachfolgender 24-stündiger hypothermen Konservierungen untersuchen.

Unsere Versuchsreihe soll dazu beitragen weitere Konservierungsmethoden für NHBD- Herzen aufzuzeigen, die einen Erfolg der Transplantation nachhaltig verbessern können. Die Versuche wurden aufgrund der vergleichbaren Organgröße und Ischämieempfindlichkeit des menschlichen Herzens an Schweineherzen aus dem Kölner Schlachthof durchgeführt.

2. *Material und Methoden*

2.1 *Organgewinnung und Transport*

Zur Untersuchung des Einflusses der normothermen Ischämie mit nachfolgenden unterschiedlichen Konservierungen auf die endothelabhängige Relaxation der epicardialen Coronararterien des Schweins wurden 249 Ringe der linken Herzkranzarterien verwendet.

Die Coronararterien bezogen wir von frisch geschlachteten Schweinen des Kölner Schlachthofes. Dabei handelt es sich um männliche und weibliche Hybridschweine, ca. 100-120 kg schwer und 7-8 Monate alt. Die Tiere waren bei Entnahme des Herzens ca. 10 Minuten tot. Die Entnahme der Rami interventricularii der linken Herzkranzarterien fand am Schlachthof statt. Die Coronararterien wurden in einem sie umgebenden Myokardstreifen von mindestens 1 cm gelagert. Lagerung und Transport der Coronararterien ins Labor der Experimentellen Medizin erfolgte in einem dünnwandigen, wasserdichten Kunststoffbeutel, in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 38°C. Der Transport zum Labor der Experimentellen Medizin dauerte ca. 20 Minuten (18-22 Minuten). Die normotherme Ischämie wurde mit der Entnahme des Herzens der geschlachteten Tiere initiiert und endete jeweils nach 60, 120 und 180 Minuten mit dem Durchspülen der einzelnen Coronarien mit einer 38°C warmen oxygenierten Krebs-Henseleit Lösung (siehe Tabelle 3). Mittels einer Stoppuhr wurden Start und Ende der normothermen Ischämie gemessen. Das während der Lagerung belassene Myokard wurde im Labor, unter Vermeidung mechanischer Schädigung des Gefäßendothels, von den Coronararterien entfernt (siehe Abbildung 2). Anschließend erfolgte die Abtrennung eines 3-4 mm großen Ringes vom Herzkranzgefäß, welches zur Untersuchung in die Versuchsanlage eingehängt wurde. Der Rest des Gefäßes wurde für 24 Stunden in geschlossenen Glasbehältern in der jeweils für ihn bestimmten, Konservierungslösung bei 0-1°C gelagert.

Ein Versuchsdurchlauf nahm im Mittel 390 Minuten \pm 9 Minuten (n=249) in Anspruch.

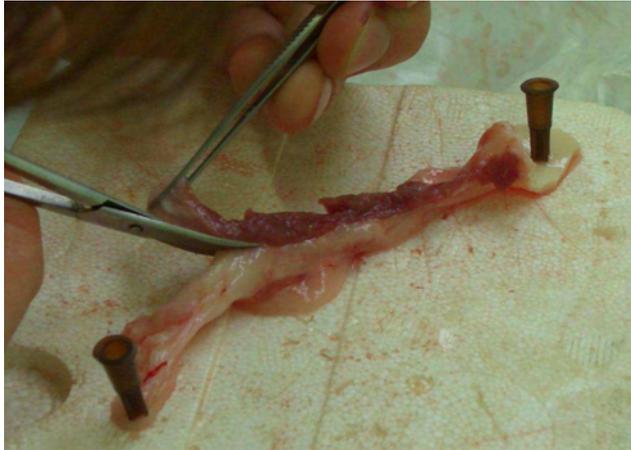


Abbildung 2: Entfernung des Myokardstreifens von der linken Coronarie des Schweineherzens

2.2 Gruppeneinteilung

Der Versuchsaufbau bestand aus zwei Versuchsgruppen: (a) die Kontrollgruppen vom Tag eins der Versuchsreihe mit Coronarringen, die lediglich eine 60-,120- und 180-minütige normotherme Ischämie erfuhren, sowie (b) die Gruppen der Coronarringe vom zweiten Versuchstag, die aus denselben Coronararterien wie am Vortag stammen und für 24 Stunden bei 0-1°C in der jeweiligen Konservierungslösung gelagert wurden.

Tabelle 1: Kontrollgruppen Tag eins

Versuchsgruppe	Dauer der normothermen Ischämie
1 a	60 Minuten
2 a	120 Minuten
3 a	180 Minuten

Tabelle 2: Versuchsgruppen Tag zwei

Versuchsgruppe	Dauer der normothermen Ischämie	Konservierung	Dauer der Konservierung
1 b	60 Minuten	UW- Lösung	24 Stunden
1 b	60 Minuten	HTK- Lösung	24 Stunden
1 b	60 Minuten	mHTK+ COP	24 Stunden
2 b	120 Minuten	UW- Lösung	24 Stunden
2 b	120 Minuten	HTK- Lösung	24 Stunden
2 b	120 Minuten	mHTK+ COP	24 Stunden
3 b	180 Minuten	UW- Lösung	24 Stunden
3 b	180 Minuten	HTK- Lösung	24 Stunden
3 b	180 Minuten	mHTK+ COP	24 Stunden

2.3 Verwendete Lösungen

Zu den verwendeten Konservierungslösungen zählen: (Inhaltsstoffe und Konzentrationen siehe Tabelle 3)

1, Die ***Krebs-Henseleit-Lösung*** wurde als Inkubationslösung im Organbad verwendet. Die Temperatur der Lösung betrug stets 38°C. Es wurde durch die Begasung mit Carbogen über eine Glasfritte ein Sauerstoff- und CO₂ - Partialdruck eingestellt, welcher beim Sauerstoff über 550 mmHg lag und beim CO₂ der pH-Einstellung auf 7,4 diente (für medizinische Zwecke, 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid; Firma Linde AG, TC, Höllriegelskreuth, Deutschland). Mit Hilfe des Radiometers (ABL 510, EML 105, Radiometer Copenhagen, Dänemark) wurden der pH-Wert sowie der Sauerstoffpartialdruck und die Elektrolytkonzentration überwacht.

2, ***UW- Lösung (University of Wisconsin-Lösung)*** (Viaspan®; Bristol-Myers Squibb GmbH, München)

3, **HTK- Lösung (Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung)** nach Bretschneider (Custodiol®; Dr. F. Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland)

4, **m-HTK- Lösung (modifizierte Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat- Lösung)**

Tabelle 3: Inhaltsstoffe und Konzentrationen der verwendeten Lösungen

Bestandteile	Krebs-Henseleit Lösung	HTK- Lösung	m- HTK- Lösung	UW- Lösung
Na ²⁺	143,10 mmol/l	15,00 mmol/l	15,00 mmol/l	30 mmol/l
K ⁺	5,90 mmol/l	10,00 mmol/l	10,00 mmol/l	125 mmol/l
Ca ²⁺	1,60 mmol/l	0,015 mmol/l	0,015 mmol/l	
Mg ²⁺	1,20 mmol/l	4,00 mmol/l	4,00 mmol/l	5 mmol/l
Cl ⁻	126,00 mmol/l	50,00 mmol/l	50,00 mmol/l	
HCO ₃ ⁻	25,00 mmol/l			
CaCl ₂			50,00 µmol/l	
H ₂ PO ₄ ⁻	1,20 mmol/l			
SO ₄ ²⁻	1,20 mmol/l			5 mmol/l
Glucose	5,10 mmol/l			
Phosphat				25 mmol/l
Lactobionat				100 mmol/l
Raffinose				30 mmol/l
Adenosin				5 mmol/l
Allopurinol				1 mmol/l
Glutathion				3 mmol/l
Pentastarch				50 g/l
αKetoglutarat		1,00 mmol/l	1,00 mmol/l	
Histidin		198,00 mmol/l	198,00 mmol/l	
Tryptophan		2,00 mmol/l	2,00 mmol/l	
Mannit		30,00 mmol/l	30,00 mmol/l	
BDM			30,00 mmol/l	
Hyaluronidase			40 mg/l	

2.4 Konservierung

Die Konservierung der Coronarien erfolgte mit Hilfe der kardioplegischen UW- bzw. HTK-Lösung und einer m-HTK-Lösung über eine Dauer von 24 Stunden. Hierzu wurden die Coronarien in einem mit der UW- bzw. HTK-Lösung gefülltem Schraubglasgefäß in einer Eiswanne bei 0-1°C im Kühlschrank gelagert.

Die für die Persufflation verwendete m-HTK-Lösung wurde in ein doppelwandiges Glasgefäß verbracht und mit Hilfe einer Wasserpumpe (Kühlgerät Messgerätwerk Lauda Dr. R. Wobsea KG, Lauda-Königshofen/Typ RM 3 S, Lauda mgw RM 3) für die gesamte Konservierungsdauer konstant auf 1°C gehalten. Der trichterförmige obere Teil des Herzkranzgefäßes wurde über die Olive einer Kunststoffkanüle (2mm Durchmesser, Medtronic DLP 30005) gezogen und mit einem geflochtenen Faden (1,5 metric, weiß, 4-0, Ethicon) befestigt. Die mit der Coronarie versehene Kunststoffkanüle stand über eine Dreiwegehahnbank (Discofix, Braun, Meissungen) und einer Führstenberg'schen Verlängerung mit dem Sauerstoff (Medizinischer Sauerstoff, Linde, München) in Verbindung. Über einen zwischengeschalteten Strömungsmesser mit Nadelventil konnte der Gasfluss auf 4 ml/min reguliert werden.

2.5 Versuchsaufbau, zeitlicher Ablauf und Funktionsmessungen

Zur Funktionsmessung wurden die einzelnen Coronarringe in zwei vorgefertigte triangelförmige Gefäßhalter aus Stahldraht unter einer Dehnbelastung von 2 g in eine Apparatur (siehe Abb. 3) eingespannt und in ein doppelwandiges Organbad, mit 10 ml Carbogen begaster Krebs-Henseleit-Lösung eingetaucht. Die Inkubationslösung wurde mittels Durchströmung der Wand des Inkubationsgefäßes mit warmem Wasser über eine Wärmepumpe (Typ ST-26/11; Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach) auf konstante 38°C gehalten. Der Versuchsaufbau bestand aus insgesamt 6 Organbädern. Die Kontraktion und Relaxation der Coronarien wurden isotonisch mit einem balkenförmigen Wegaufnehmer (Lever Transducer B 40 Type 373; Hugo Sachs Electronic, March, Deutschland) über einen Verstärker (Transducer-Amplifier Module Type 705/1; Hugo Sachs Electronic, March, Deutschland) auf einen Kompensationsschreiber (Multi-Pen Recorder; Rikadenki Kogyo Co. Tokyo, Japan) übertragen, der wiederum die Veränderungen des Gefäßdurchmesser kontinuierlich aufzeichnete.

Nachdem der Coronarring in die Apparatur eingehängt wurde, mußte zunächst ein Gleichgewichtszustand (steady state) der Gefäßdehnung erreicht werden, bevor der Inkubationslösung verschiedene vasoaktive Substanzen zugefügt werden konnten. Diese führten je nach Wirkungsweise zu einer isotonischen Kontraktion oder Dilatation der Coronarringe. Zwecks Prüfung der endothelialen Funktion wurden folgende Substanzen in chronologischer Reihenfolge eingesetzt (Konzentrationen siehe Tabelle 4): zur Erlangung einer maximalen endothelunabhängigen Kontraktion der glatten Muskelzellen erfolgte die Zugabe von 250 µl Kaliumchlorid bis sich ein Kontraktionsplateau eingestellt hatte. Daraufhin wurde das Organbad mit 38°C warmer, oxygenierter Krebs-Henseleit-Lösung dreimalig ausgewaschen. Nach dem Erreichen eines Dilatationsgleichgewichts folgte die Zugabe von 10 µl Indomethacin. Die Zugabe von Indomethacin in jeweils gleicher Konzentration erfolgte vor jeder Zugabe von Prostaglandin $F_{2\alpha}$. Das $PGF_{2\alpha}$ diente zur Auslösung einer Kontraktion der Coronarie. In wenigen Fällen, in denen hierdurch keine Kontraktion auslösbar war, kam es zum Einsatz von 10 µl der stärker wirksamen Substanz U 46619 (Thromboxanmimetikum). Dann wurde ein Kontraktionsplateau abgewartet und durch Zugabe von 10 µl Substanz P eine endothelabhängige Dilatation hervorgerufen. Nach dreimaligem Auswaschen mit der Krebs-Henseleit-Lösung, sowie der Indomethacin- und $PGF_{2\alpha}$ -Gabe in gleicher Konzentration wie im Schritt zuvor, wurde Bradykinin in aufsteigender Konzentrationsreihe mit je 10 µl hinzugefügt. Hieraus resultierte eine endothelabhängige Gefäßdilatation. Nach dem Auswaschen und Eintritt des Gleichgewichtszustandes, sowie der erneuten Indomethacin- und $PGF_{2\alpha}$ -Gabe erfolgte die Zugabe von Serotonin in aufsteigender Konzentrationsreihe mit je 10 µl. Die anschließende Reaktion zeigte bei gutem Erhalt der Endothelzellen eine Dilatation des Ringes.

Bei den nächsten Schritten bestand der Unterschied in der Gabe von L-NNA zu 60 µl, und zwar nach der Zugabe von Indomethacin bzw. vor der Zugabe von $PGF_{2\alpha}$, wodurch die für die NO-Bildung notwendige L-Arginin vollständig kompetitiv gehemmt wurde. Nach Erreichen des Kontraktionsgleichgewichts von $PGF_{2\alpha}$ führte die Zugabe von SP zu einer Dilatation. Im Anschluß wurde durch Natriumnitropussid eine endothelunabhängige Dilatation verursacht. Der Versuch endete mit der Beigabe von 20 µl Papaverin, das als Zellgift zu einer Lähmung der glatten Muskelzellen und somit zur maximalen endothelunabhängigen Gefäßdilatation führte.

Nach der 24-stündigen Konservierung wurden erneut Coronarringe von den Coronararterien abgetrennt. Diese stammten aus jeweils denselben Coronararterien wie in der Kontrollgruppe vom Vortag. Die Funktionsrestitution wurde durch dieselbe beschriebene Methode getestet.

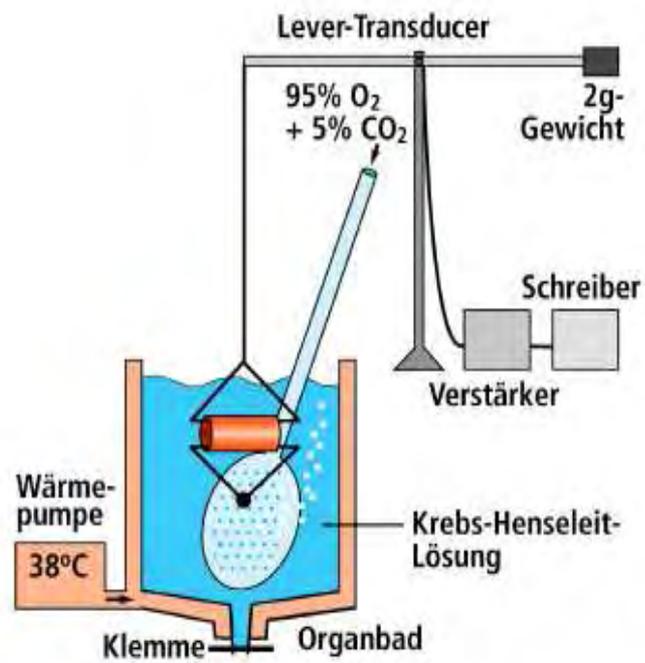


Abbildung 3: Versuchsaufbau zur Messung der Funktionsfähigkeit der Schweinecoronarien
(Modifizierte Abbildung nach Fischer et.al, 2004)

Tabelle 4: Verwendete vasoaktive Substanzen zur Messung der Funktion der Coronararterien

Wirkung	Substanzen	Abkürzung	Hersteller	Zugaben ins Organbad	Konzentration im Organbad
Kontraktion der glatten Muskelzellen	Kalium-Chlorid	KCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)	250 µl	6×10^{-2} M
Hemmung der Cyclooxygenase	Indomethacin	Indo	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)	10 µl	1×10^{-5} M
Vasokontraktion	Prostaglandin F _{2 alpha}	PGF _{2α}	Pharmacia GmbH (Erlangen, Deutschland)	10 µl	$1,43 \times 10^{-5}$ M
endothelabhängige Dilatation	Substanz P	SP	Fluka Chemie GmbH (Neu- Ulm, Deutschland)	10 µl	1×10^{-8} M
endothelabhängige Dilatation	Bradykinin	Brady 10^{-10} Brady 10^{-9} Brady 10^{-8} Brady 10^{-7} Brady 10^{-6} Brady 5×10^{-6}	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)	10 µl 10 µl 10 µl 10 µl 10 µl 10 µl	1×10^{-10} M 1×10^{-9} M 1×10^{-8} M 1×10^{-7} M 1×10^{-6} M 5×10^{-6} M
endothelabhängige Dilatation	Serotonin	Sero 10^{-9} Sero 10^{-8} Sero 10^{-7} Sero 10^{-6}	Fluka Chemie GmbH (Neu-Ulm, Deutschland)	10 µl 10 µl 10 µl 10 µl	1×10^{-9} M 1×10^{-8} M 1×10^{-7} M 1×10^{-6} M
Vasokontraktion	NG-Nitro-L-Arginin	LNNA	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)	60 µl	3×10^{-4} M
endothelunabhängige Dilatation	Sodiumnitropussid	SNP	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)	10 µl	1×10^{-6} M
Dilatation durch Lähmung der glatten Muskelzellen	Papaverin	Pap	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)	20 µl	2×10^{-7} M
Vasokontraktion	U 46619	U	Sigma- Aldrich GmbH (Steinheim, Deutschland)	10 µl	$1,25 \times 10^{-7}$ M

2.6 Immunhistochemische Untersuchung humaner Coronararterien

2.6.1 Vorbereitung der Endothelzellen

Mithilfe der immunhistochemischen Untersuchung humaner Coronararterien konnte der Einfluß endothelialer Ischämie mikroskopisch dargestellt werden. Die endotheliale Ischämie wurde durch eine 180-minütige Argonbegasung hervorgerufen. Zudem wurden Zellen die mit Argon begast wurden für 24 Stunden bei 0-1°C in eine HTK-Lösung verbracht. Hierzu wurden an der Sporthochschule zu Köln insgesamt 4 Versuchsreihen an humanen Coronarendothelzellen (Human Coronar Arterio Endothelial Cells, HCAEC, der Firma Promocell, Heidelberg) durchgeführt wobei jede dieser Reihen 5 Tage in Anspruch nahm. Pro Versuch wurden 8 Platten (Multidish four Wells, der Firma Nunc, Dänemark, Roskild) mit je 4 Wells benötigt. In jedes der Wells wurde wiederum ein Deckglas mit 15 mm Durchmesser der Firma Carl Roth- GmbH & CO., Karlsruhe verbracht.

Am ersten Tag wurden die Endothelzellen aus der Kultur vereinzelt, was 10.000 bis 20.000 Zellen pro Well ergab. Zur Förderung der Zellanheftung an das Medium (Endothelial Cell Growth Medium) ruhten diese über Nacht im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂-Anteil von 5 %.

Am zweiten Tag erfolgte die Fixierung und Argonbegasung (Argon 4,8 der Firma Linde, Höllriegelskreuth) der Endothelzellen. Ebenso wurden mit Argon begaste Zellen für 24 Stunden bei einer Temperatur von 0-1°C in HTK-Lösung konserviert.

Für die Platten wurde diesbezüglich folgende Einteilung festgelegt:

1. **IHC Nativ:** Zellen, die nicht mit Argon begast wurden.
IHC- Kontrolle erhielt bei der Immunhistochemie keinen ersten Antikörper zum Ausschluß falsch positiver Färbungen
2. **Nativ:** Zellen, die nicht mit Argon begast wurden und in dieser Zeit im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubierten.
3. **IHC Argon:** Zellen, die 180 Minuten mit Argon begast wurden und in der Immunhistochemie keinen ersten Antikörper erhielten.
4. **180 Argon:** Zellen wurden 180 Minuten mit Argon begast.

5. 180 Argon+HTK: Zellen wurden mit Argon begast und für 24 Stunden in einer HTK-Lösung bei einer Temperatur von 0-1°C auf Eis im Kühlschrank gelagert.

2.6.2 Argonbegasung

Zur Begasung wurde eine 30x30x40 cm große Styroporbox verwendet. Ein Schlauchsystem am Boden dieser Kiste, wurde mithilfe eines Thermostatbades mit Wasser von 38°C durchströmt. Die Box wurde hermetisch verschlossen. Mithilfe einer Fürstenberg'schen Verlängerung, die über ein Ventil mit der Argonflasche verbunden war, und einer in die Kiste eintretenden Strauss- Kanüle konnte das Gas eingeleitet werden. Zur Vermeidung eines Sauerstoffeintritts wurde in der Lagerungsbox ein leichter Überdruck von 5 mm HG eingestellt. Hierzu erfolgte der Gasabfluß über eine austretende Straußkanüle und eine Fürstenberg-Verlängerung, deren Endstück sich in einem mit Wasser gefüllten Behälter 6,5 cm unter der Wasseroberfläche befand. Aus Sicherheitsgründen fand die Begasung unter dem Abzug statt.

2.6.3 Fixierung und Konservierung der humanen Endothelzellen

Nach Ablauf der 180-minütigen Argonbegasung wurden die Zellen (IHC Argon, 180 Argon) aus der Styroporkiste und die Zellen aus dem Brutschrank, welche nicht mit Argon begast wurden (IHC Nativ, Nativ) genommen. Anschließend wurden diese Zellen für 20 Minuten mit einer 4%-igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert und dann mehrmals mit einem 0,1 M Phosphatpuffer (PBS) gespült.

Bei der Gruppe der Zellen 180 Argon+HTK wurde das Medium durch die HTK-Lösung ersetzt und über Nacht auf Eis im Kühlschrank gelagert.

Am darauffolgenden dritten Tag der Versuchsreihe erfolgte die Abnahme der HTK-Lösung von den Zellen die eine 180-minütige Argonbegasung und eine 24-stündige Lagerung in der HTK-Lösung erfahren hatten (180 Argon+HTK). Im Anschluß erfolgte die Fixierung mit einer 4%-igen PFA- Lösung. Daraufhin wurde die Platte mehrmals mit einem 0,1 M Phosphatpuffer gespült.

Verwendete Lösungen zur Pufferung der Zellen

Phosphatpuffer (PBS) 0,1 mol, [pH 7,4]

- Dinatriumhydrogenphosphat 14,4 g/l
- Natrium-Dihydrogenphosphat-Monohydrat 2,6g/l
- Natriumchlorid 8,766 g/l

Trispuffer (TBS) 0,05 mol, [pH 7,6]

- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
in 250 ml A.dest. gelöst 6,057 g
- Natriumchlorid (150 mmol) dazugeben 8,766 g
- mit 80 ml HCl auf pH 7,6 einstellen
- mit A.dest.auf 1000 ml auffüllen

2.7 Bearbeitung der Zellen mit den Antikörpern

2.7.1 Färbung der Coronarendothelien mit dem ersten Antikörper

Am vierten Tag der Versuchsreihe wurden die Zellen (exklusiv der IHC-Kontrollen) aus dem Kühlschrank genommen und auf Raumtemperatur gebracht. Nach einmaliger Waschung mit dem Phosphatpuffer PBS 0,1 M und dreimaligem Waschen mit einem Trispuffer 0,05 M erfolgte die 20-minütige Blockierung der endogenen Peroxidase mithilfe von 20 ml Methanol und 5 ml 3%-iges Wasserstoffperoxid. Nach 2-maliger Waschung mit dem Trispuffer 0,05 M im Abstand von jeweils 10 Minuten wurden den Zellen 0,5 M Ammoniumchlorid und 0,25% (50 µl) Triton X für weitere 10 Minuten zugeführt. Dies trug zur Auflösung der Aldehydvernetzung und Demaskierung des Gewebes sowie zur Erhöhung der Durchlässigkeit der Zellmembran für den ersten Antikörper bei. Es folgte wiederum eine 2-malige TBS-Waschung. Vor dem Aufbringen des ersten Antikörpers (Tabelle 5), wurden durch eine 5%-ige BSA-Lösung (Bovine serum albumine) alle Antigen-Bindungsstellen der Zellen blockiert. Anschließend wurden pro Well 300 µl des Antikörper-BSA-Gemisches auf alle Zellen, exklusiv der Zellen der IHC-Kontrollen aufgebracht, so dass der erste Antikörper über Nacht bei 4°C verdünnt in 0,8 % BSA spezifisch binden konnte. Die jeweilige Verdünnung hing von der Wahl des ersten Antikörpers ab (s. Tab. 5).

Tabelle 5: Verwendeter erster Antikörper

Erster Antikörper	Wirkung	Hersteller	Verdünnung in 0,8% BSA
Anti-phospho-eNOS	weist phosphoryliertes Phosphoserin in No-Synthase nach	Biomol, International, LP, USA	1 : 500
Anti-eNOS	weist NO-Synthase nach	Biomol, international, LP, USA	1 : 1500
Anti-8-Iso Prostan	weist PGF 2 α nach	Oxford Biomedical Research, USA	1 : 1500
Anti-Nitrotyrosine	weist Nitrierung von Tyrosin durch NO nach	upstate, cell signaling solutions, USA	1 : 400

2.7.2 Färbung der Coronarendothelien mit dem zweiten und dritten Antikörper

Am fünften Tag wurden die Zellen erneut aus dem Kühlschrank genommen und auf Raumtemperatur gebracht. Nach 4-maliger Waschung im Abstand von 10 Minuten mit TBS 0,05 M konnte der jeweils gegen den ersten gerichtete zweite Antikörper (Tab. 6) mit 300 μ l pro Well für 60 Minuten aufgetragen werden. Im Anschluß erfolgte eine viermalige TBS-Waschung bevor nun 300 μ l pro Well des dritten Antikörpers für 60 Minuten auf die Zellen gebracht wurde. Bei dem dritten Antikörper handelte es sich um eine Meerrettichperoxidase (Horseradish-Peroxidase-Komplex, HRP) mit einer 1:150 Verdünnung in TBS. Nach wiederholter TBS-Waschung wurden die Zellen mit je 300 μ l DAB (Diaminobenzidine) versehen. Das Reaktionsprodukt des HRP und der DAB war ein sichtbarer brauner Niederschlag, der unter dem Mikroskop beobachtet und beim Eintritt mit TBS abgestoppt wurde. Nach erneuter TBS-Waschung und Behandlung der Zellen mit einer aufsteigenden alkoholischen Reihe wurden sie mit Deckgläsern in Entellan eingedeckt.

Die Auswertung der Coronarendothelzellen erfolgte mit dem Image J-Programm der NHI. Bei 30 Zellen pro Well wurde der Grauwert des Hintergrundes gemessen und anschließend vom Wert der unmittelbar hintereinander gemessenen Färbungen des Zytoplasmas 1, des Zytoplasmas 2, des Zellkerns und der gesamten Zelle abgezogen.

Tabelle 6: Verwendeter zweiter und dritter Antikörper

Zweiter Antikörper	gerichtet gegen 1.AK	Hersteller	Verdünnung in TBS
goat -anti -rabbit	Anti-eNOS, Anti-Nitrotyrosin	Biomol International, LP,USA	1 : 400
goat- anti- mouse	Anti-phospho-eNOS	Biomol International, LP,USA	1 : 400
rabbit- anti- goat	Anti-8- Iso Prostan	Oxford, Biomedical Researc	1 : 400

2.8 Versuchsauswertung

Die Bearbeitung der ermittelten Daten der Versuchsreihen aus dem Labor der Experimentellen Medizin und die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung erfolgten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm „Framework“.

Für die statistische Auswertung wurde das Programm „Primer of Biostatistics“ (3. Edition, Glantz SA, Mc Graw-Hill, Singapore 1992) benutzt. Aus diesem Programm fand der gepaarte T-Test seine Verwendung. Eine Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

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

3. *Ergebnisse*

3.1 **Anzahl der Präparate**

In dieser Arbeit wurden insgesamt 152 Coronarien von Schweineherzen aus dem Kölner Schlachthof getestet. Aus diesen 152 Coronarien wurden 249 Coronarringe für die verschiedenen Versuchskonzeptionen gewonnen. Am ersten Tag wurden 152 Ringe nach Ablauf der unterschiedlichen Ischämiezeiten (60, 120, 180 Minuten) getestet.

Bei den Kontrollversuchen am ersten Tag durchliefen jeweils 43 Ringe eine 60-minütige normotherme Ischämie (nI_{60}), 45 Ringe eine 120-minütige normotherme Ischämie (nI_{120}) und 64 Coronarringe eine 180-minütige normotherme Ischämie (nI_{180}). Aufgrund von Abweichungen vom Standardversuchsprotokoll wurden insgesamt 55 Ringe und deren zugehörigen Coronararterien von der weiteren Verwendung ausgeschlossen (z.B. erhielt die Coronararterie 15a nach der Serotoninreihe keine L-NNA,- $PGF_{2\alpha}$ - und SP-Gabe und schied aus diesem Grunde aus. Als weiteres Beispiel dient die Coronararterie 96a, welche bereits nach der ersten SP-Gabe weder auf $PGF_{2\alpha}$ noch auf U 46619 reagierte).

Nach 24-stündiger Konservierung mit unterschiedlichen Konservierungslösungen (HTK, UW, m-HTK) wurden am zweiten Versuchstag demnach 97 Ringe getestet. Die am zweiten Versuchstag getesteten Ringe stammten jeweils von denselben Coronarien, aus denen die Ringe für den ersten Versuchstag genommen wurden. Die Versuchsaufteilung am zweiten Tag stellt sich wie folgt dar:

die Anzahl der Coronarringe in der Gruppe nI_{60} belief sich auf insgesamt 30 Ringe. Weitere 35 Coronarringe konnten für die Gruppe nI_{120} ausgemacht werden und insgesamt 32 Ringe wurden in der Gruppe nI_{180} getestet.

Somit ergibt sich eine Einteilung, die in den Tabellen 7 und 8 dargestellt ist.

Tabelle 7: Anzahl der Versuche in der Kontrollgruppe (nI_{60} , nI_{120} , nI_{180})

Versuchstag 1	Dauer der normothermen Ischämie	Anzahl der Coronarringe	Anzahl der Coronarringe für die weitere Verwendung
Kontrolle	60 Minuten	43	30
Kontrolle	120 Minuten	45	35
Kontrolle	180 Minuten	64	32

Tabelle 8: Anzahl der Versuche nach 24-stündiger Konservierung

Versuchstag 2	Dauer der normothermen Ischämie in Minuten	Konservierung	Anzahl der Coronarringe
24 h Konservierung	60	UW-Lösung	12
24 h Konservierung	60	HTK-Lösung	9
24 h Konservierung	60	m-HTK+COP	9
24 h Konservierung	120	UW-Lösung	11
24 h Konservierung	120	HTK-Lösung	12
24 h Konservierung	120	m-HTK+COP	12
24 h Konservierung	180	UW-Lösung	12
24 h Konservierung	180	HTK-Lösung	9
24 h Konservierung	180	m-HTK+COP	11

3.2 Anzahl der Präparate in der Immunhistochemie

Hinsichtlich der immunhistochemischen Untersuchungen wurden 4 Versuchsreihen mit je 8 Platten à 4 Löchern durchgeführt, wobei sich in jedem Loch 10.000 bis 20.000 Endothelzellen befanden, was in einer Gesamtzahl von 40 Platten, 160 Löchern und circa 1.600.000 bis 3.200.000 Endothelzellen resultiert.

3.3 Funktionsprüfung der Schweinecoronararterien

3.3.1 Funktion der Coronararterien aus den Kontrollgruppen 60, 120 und 180 Minuten normotherme Ischämie (nI₆₀, nI₁₂₀, nI₁₈₀)

In den Kontrollgruppen vom ersten Versuchstag wurde die Dilatation nach der Gabe von SP durch die unterschiedlichen normothermen Ischämiezeiten nicht beeinflusst. Somit betrug die Dilatation durch SP bezogen auf die Vorkontraktion durch PGF_{2α} nach 60 Minuten Ischämie 71 ± 7 % (n=43), nach 120 Minuten 71 ± 11% (n=45) und nach 180 Minuten ebenso 71 ± 9 % (n=64) (Abb. 7). Auch unter Bradykiningabe unterschieden sich die drei Gruppen in ihrer Dilatation nur kaum. Nach Zugabe von Serotonin in einer Konzentration von 1x10⁻⁷ mol/l konnte in allen drei Kontrollgruppen nur eine geringe Dilatation gemessen werden (Abb. 4). Signifikante Unterschiede ergaben sich hierbei nicht; bei einer Verdünnungsstufe von 1x10⁻⁶ Mol/l Serotonin reagierten die Ringe aller Gruppen mit einer Kontraktion (Abb. 4). Nach vorheriger Gabe von L-NNA wurde eine Verminderung der Dilatationsfähigkeit der Coronararterien durch Substanz P gegenüber der Dilatation ohne vorherige Gabe von L-NNA bei allen Gruppen festgestellt (Abb.4). In der Gruppe nI₆₀ ergab sich hierbei ein signifikanter Unterschied (p=0,004). Nach 120 Minuten lag die NO-unabhängige Relaxation bei 51 ± 11 % (n=43) und nach 180 Minuten normothermer Ischämie fand ein nicht signifikanter Abfall auf 52 ± 12 % (n=61) statt.

Alle angegebenen Werte zeigen den Mittelwert, die Standardabweichung und die Anzahl n der getesteten Ringe dieser Versuchsreihe.

Tabelle 9: Endothelabhängige Relaxation bezogen auf die Vorkontraktion durch PGF_{2α} nach verschiedenen Ischämiezeiten (Bradykinin und Serotonin = mol/l)

	60 Minuten	120 Minuten	180 Minuten
SP	71% ±7% (n=43)	71% ±11% (n=45)	71%±9% (n=64)
Bradykinin 5x10 ⁻⁶	73% ±13% (n=24)	74% ±15% (n=22)	76% ±14% (n=36)
Serotonin 1x10 ⁻⁷	6% ±14% (n=43)	4% ±14% (n=45)	8% ±10% (n=60)
Serotonin 1x10 ⁻⁶	-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)

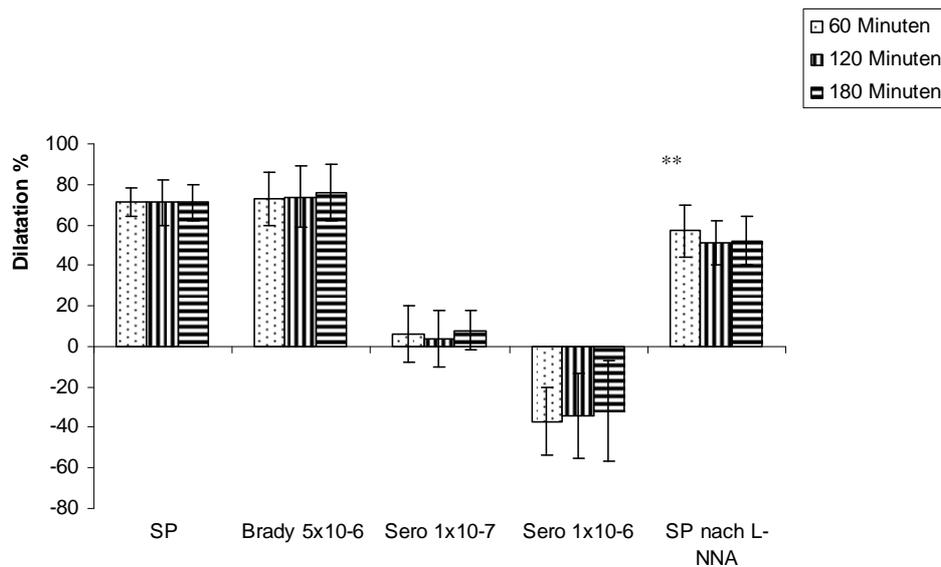


Abbildung 4: Endothelabhängige Relaxation nach verschiedenen Ischämiezeiten

Mittelwert \pm Standardabweichung

** $p < 0,01$ gegenüber der Dilatation ohne vorherige Gabe von L-NNA

3.3.2 Funktion der Coronararterien nach Konservierung in hypothermer HTK-Lösung für 24 Stunden (60, 120 und 180 Minuten normotherme Ischämie)

Am folgenden Tag wurden von den jeweils über 24 Stunden in die Konservierungslösung verbrachten Coronararterien neue Ringe gewonnen und in die Anlage eingehängt.

Nach der 24-stündigen Konservierung in der HTK-Lösung konnte man im Vergleich zum Kontrolldurchlauf am Vortag eine deutliche Verminderung der Dilatation durch SP bezogen auf die Vorkontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ feststellen. In der 60 Minuten-Gruppe sank die endotheliale Dilatation signifikant um 20% ($p=0,005$). Einen ebenso signifikanten Abfall um 29 % zur Kontrolle wies die 180 Minuten-Gruppe auf ($p=0,006$) (Abb. 5). In der Gruppe n_{120} ergab sich im Vergleich zur Kontrolle am Vortag kein signifikanter Unterschied. Nach der Zugabe von Bradykinin in einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l konnte in der Gruppe n_{180} ein signifikanter Abfall zur Kontrollgruppe am Vortag ausgemacht werden ($p=0,02$) (Tab. 10, Abb. 7). Zwischen den Gruppen wiesen die Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied auf. Eine Dilatation durch die Serotoninzugabe mit einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l bezogen auf die vorherige Kontraktion, die durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ provoziert wurde, konnte in allen drei

Gruppen erreicht werden. Nach 180 Minuten Ischämie verursachte die Gabe von Serotonin in einer Konzentration von 1×10^{-6} mol/l einen signifikanten Anstieg der Kontraktion zur Kontrollgruppe ($p=0,048$) (Tab. 11, Abb. 15). Die anderen Resultate unterschieden sich nicht signifikant von den Ergebnissen am Tag vor der Konservierung.

Alle auf die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Vorkontraktion ermittelten Dilatationswerte durch L-NNA/SP-Gabe unterschieden sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Dennoch konnte eine Verminderung der Dilatation in den Gruppen nI_{60} und nI_{120} und beobachtet werden. Die Dilatation durch den Hyperpolarisierenden Faktor stieg lediglich in der Gruppe nI_{180} um 2% gegenüber der Dilatation durch SP bezogen auf die Vorkontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$. (Abb. 6).

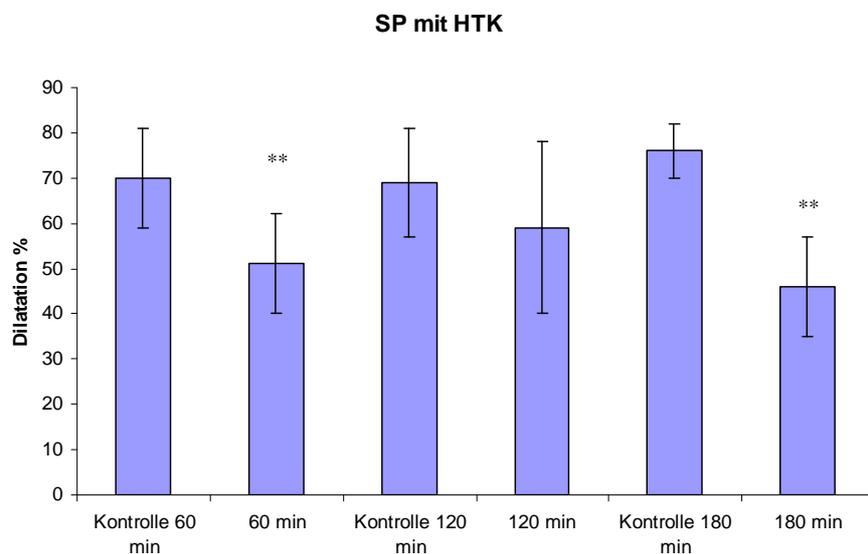


Abbildung 5: Funktionsfähigkeit der verschiedenen Coronararterien des Schweins mit jeweils 60, 120, und 180 Minuten normothermer Ischämie sowie nach der 24-stündigen hypothermen Lagerung in HTK-Lösung, bezogen auf die Kontrollgruppe vom Vortag.

Die Dilatationsergebnisse ergeben sich aus der Applikation von SP bezogen auf die Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Mittelwert \pm Standardabweichung

** $p < 0,01$ gegenüber der Kontrollgruppe

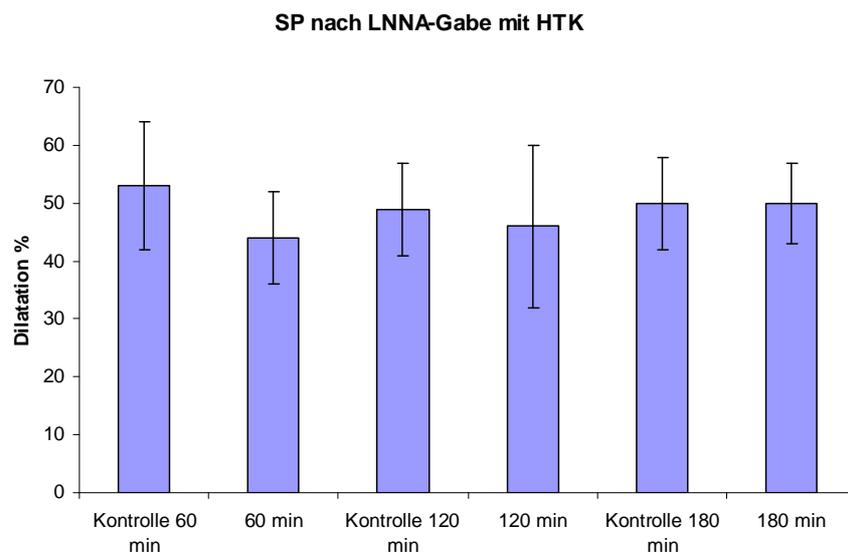


Abbildung 6: Funktionsfähigkeit der verschiedenen Coronararterien des Schweins mit jeweils 60, 120, und 180 Minuten normothermer Ischämie und anschließender 24-stündiger hypothermen Lagerung in HTK-Lösung, bezogen auf die Kontrollgruppe vom Vortag.

Die Dilatationsergebnisse ergeben sich aus der Applikation von SP mit vorangestellter Gabe von L-NNA bezogen auf die Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$.
Mittelwert \pm Standardabweichung

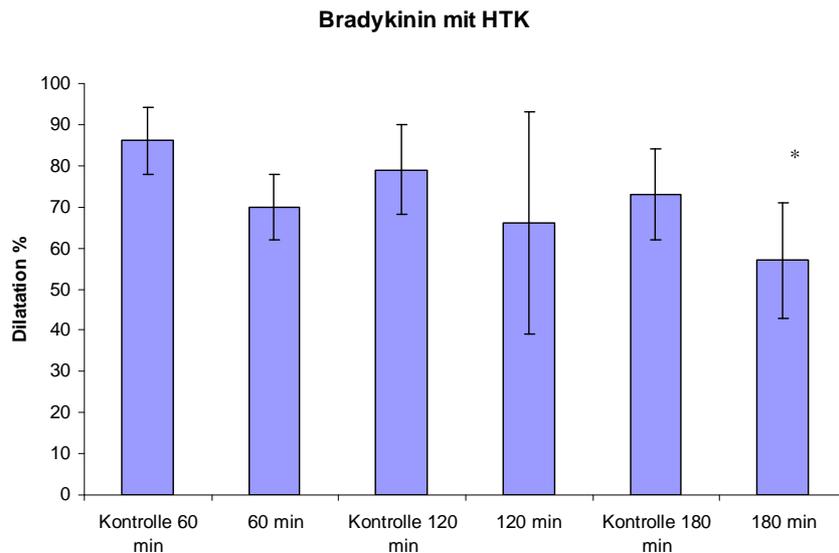


Abbildung 7: Funktionsfähigkeit der verschiedenen Coronararterien mit jeweils 60, 120, und 180 Minuten normothermer Ischämie sowie nach der 24-stündigen hypothermen Lagerung in HTK-Lösung, bezogen auf die Kontrollgruppe vom Vortag.

Die jeweiligen Dilatationswerte für die Gruppen nI₆₀, nI₁₂₀ und nI₁₈₀ ergeben sich aus der Konzentration von 5×10^{-6} mol/l einer aufsteigenden Bradykininreihe in Relation zur Vorkontraktion von PGF_{2 α} .

Mittelwert \pm Standardabweichung

* $p < 0,05$ gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe

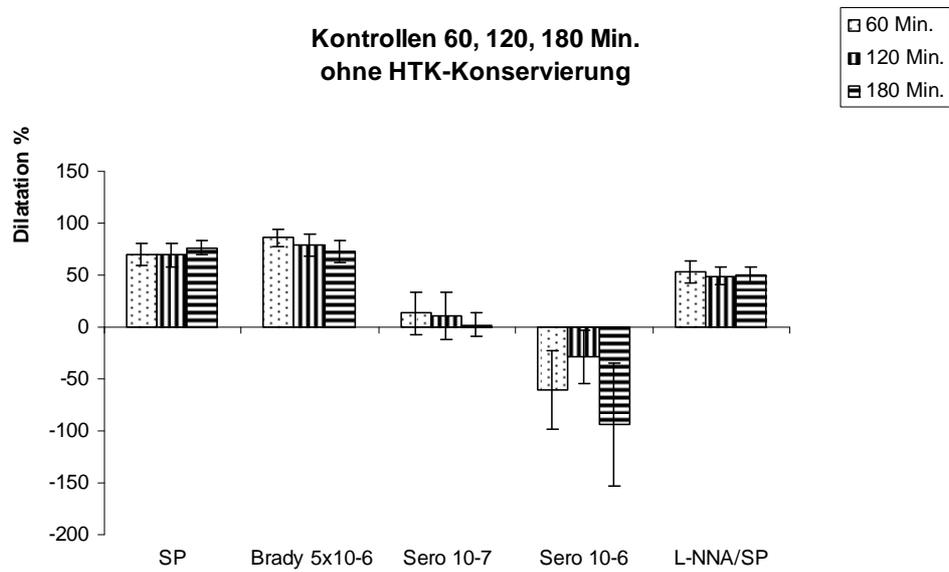
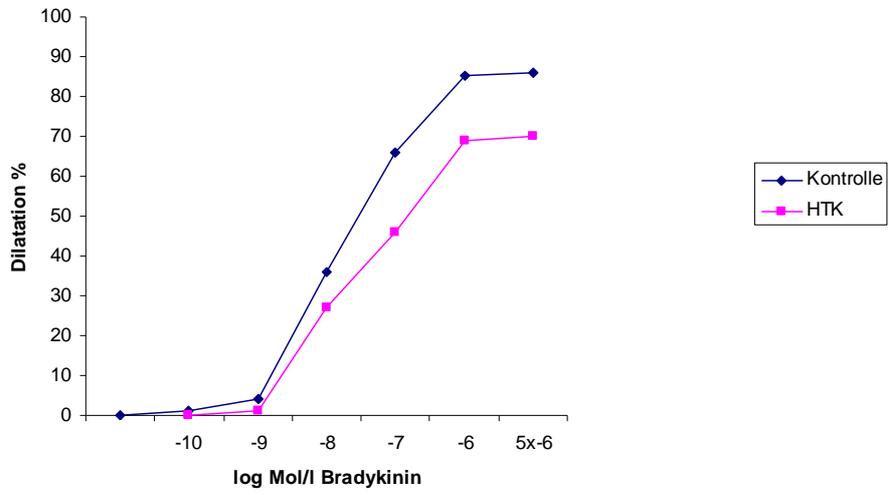


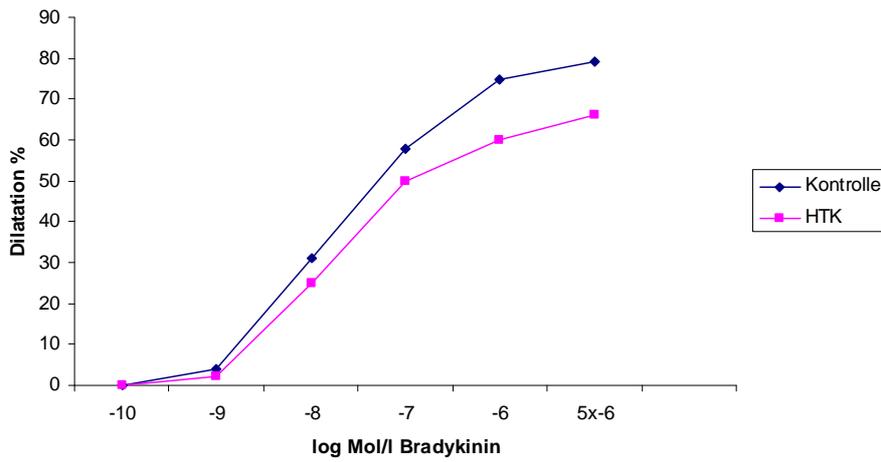
Abbildung 8: Kontrollen nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie der HTK-Gruppe.

Mittelwert ± Standardabweichung

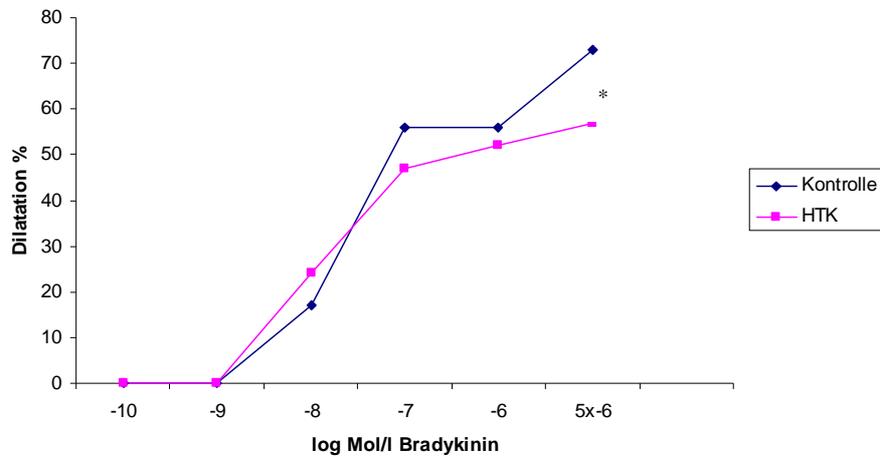
Bradykinin, Kontrolle 60 min und
24 h Konservierung in HTK



Bradykinin, Kontrolle 120 min und
24 h Konservierung in HTK



**Bradykinin, Kontrolle 180 min und
24 h Konservierung in HTK**



Abbildungen 9-11: Funktionsfähigkeit der Coronararterien mit 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie und anschließender 24-stündiger hypothermen Konservierung in HTK-Lösung im Vergleich zur Kontrollgruppe vom Vortag.

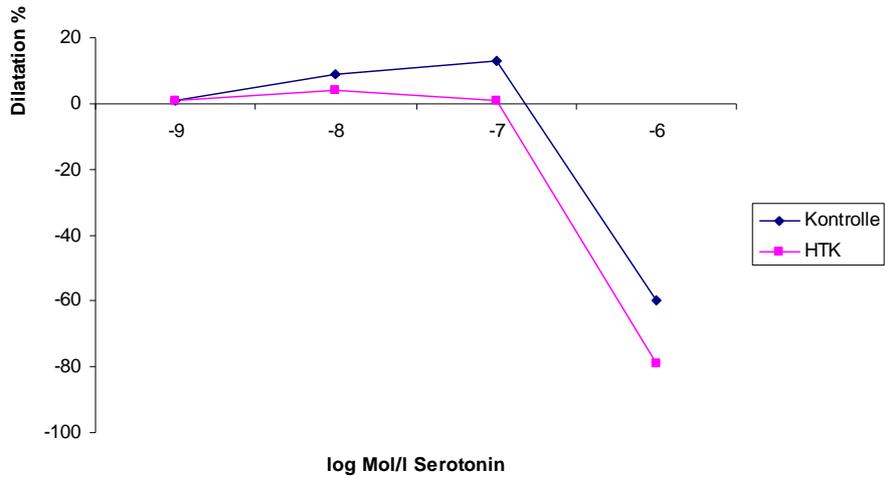
Die Dilatationskurven zeigen die aufsteigende Bradykininreihe von 1×10^{-10} – 1×10^{-6} und 5×10^{-6} mol/l in Bezug auf die Vorkontraktion durch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation.

* $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe

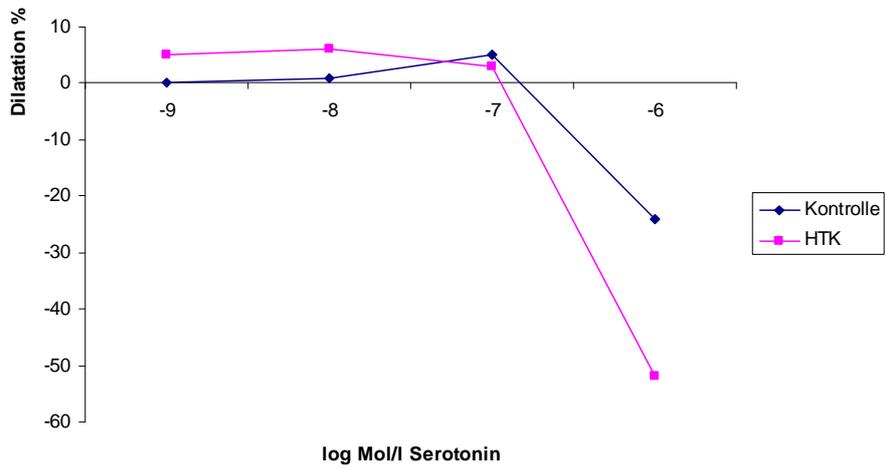
Tabelle 10: Konzentrationsabhängige Darstellung der Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der aufsteigenden Bradykininreihe

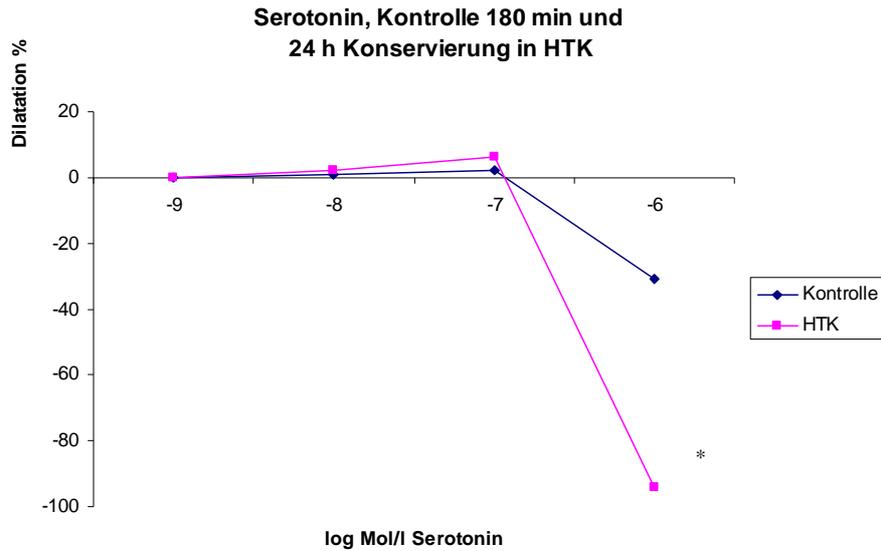
Konzentrationsreihe Bradykinin mol/l	1x10⁻¹⁰	1x10⁻⁹	1x10⁻⁸	1x10⁻⁷	1x10⁻⁶	5x10⁻⁶
60 Min Ischämie (Kontrolle)	1 ± 3	4 ± 8	36 ± 28	66 ± 15	85 ± 9	86 ± 8
60 Min Ischämie + 24 Std. HTK-Konservierung	0 ± 0	1 ± 2	27 ± 20	46 ± 17	69 ± 6	70 ± 8
120 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	4 ± 12	31 ± 24	58 ± 18	75 ± 10	79 ± 11
120 Min Ischämie + 24 Std. HTK-Konservierung	0 ± 0	2 ± 7	25 ± 24	50 ± 22	60 ± 27	66 ± 27
180 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	0 ± 0	17 ± 15	56 ± 18	55 ± 24	73 ± 11
180 Min Ischämie + 24 Std. HTK-Konservierung	0 ± 0	0 ± 0	24 ± 15	47 ± 13	52 ± 14	57 ± 14

**Serotonin, Kontrolle 60 min und
24 h Konservierung in HTK**



**Serotonin, Kontrolle 120 min und
24 h Konservierung in HTK**





Abbildungen 12-14: Funktionsfähigkeit der Coronararterien mit 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie und anschließender 24-stündiger hypothermen Konservierung in HTK-Lösung im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Die Dosis-Wirkungskurve stellt die Dilatation und die Kontraktion durch die aufsteigende Serotoninreihe von 1×10^{-9} auf 1×10^{-6} mol/l dar, in Bezug auf die Vorkontraktion durch die $PGF_{2\alpha}$ -Applikation.

* $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe

Tabelle 11: Konzentrationsabhängige Darstellung der Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung für die aufsteigende Serotoninreihe

Konzentrationsreihe Serotonin mol/l	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}
60 Min Ischämie (Kontrolle)	1 ± 4	9 ± 20	13 ± 20	-60 ± 38
60 Min Ischämie + 24 Std. HTK-Konservierung	1 ± 4	4 ± 10	1 ± 17	-79 ± 56
120 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 1	0 ± 0	11 ± 23	-29 ± 26
120 Min Ischämie + 24 Std. HTK-Konservierung	4 ± 14	6 ± 18	4 ± 15	-58 ± 35
180 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	1 ± 2	2 ± 11	-31 ± 28
180 Min Ischämie + 24 Std. HTK-Konservierung	0 ± 0	2 ± 5	6 ± 10	-94 ± 59

Tabelle 12: Endothelabhängige Relaxation nach verschiedenen Ischämiezeiten und nach 24 h Konservierung in HTK

	60 Minuten	120 Minuten	180 Minuten
SP	51 ± 12 (n=9)	59 ± 19 (n=12)	47 ± 12 (n=9)
L-NNA/SP	44 ± 9 (n=7)	46 ± 15 (n=10)	49 ± 7 (n=9)

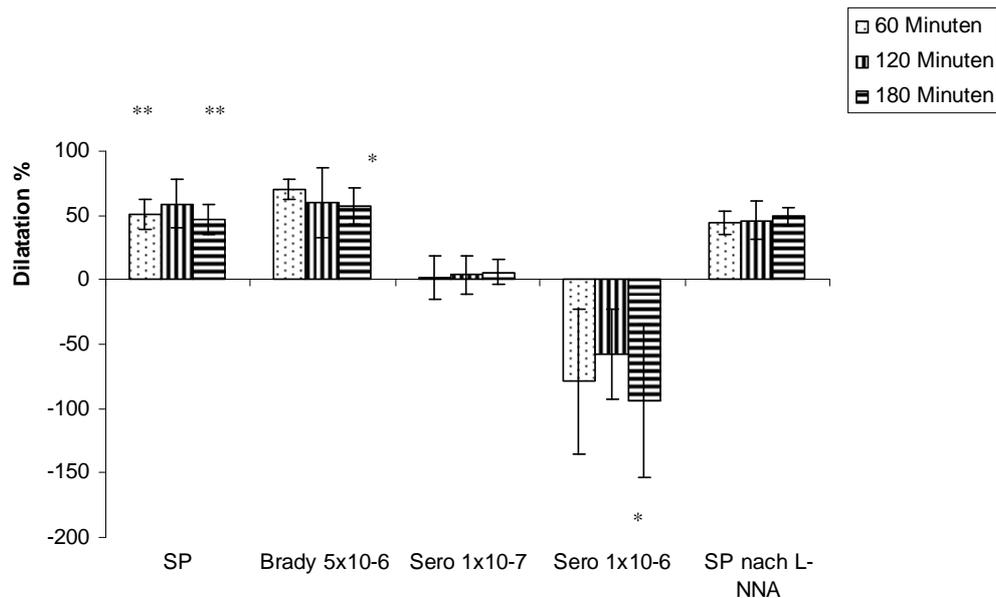


Abbildung 15: Endothelabhängige Relaxation nach verschiedenen Ischämiezeiten und anschließender 24-stündiger hypothermen Lagerung in HTK-Lösung

Mittelwert \pm Standardabweichung

** $p < 0,01$ gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe

* $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe

3.3.3 Funktion der Coronararterien nach Konservierung in hypothermer m-HTK-Lösung bei gleichzeitiger Sauerstoffpersufflation (COP) für 24 Stunden (60, 120 und 180 Minuten normotherme Ischämie)

Nach der 24-stündigen Konservierung bei gleichzeitiger Sauerstoffpersufflation der Ringe wurden folgende Ergebnisse der drei Gruppen ermittelt:

In der Gruppe n_{I60} betrug die endotheliale Relaxation der Coronarringe 56 ± 6 % ($n=9$), in Gruppe n_{I120} 57 ± 7 % ($n=12$) und in Gruppe n_{I180} 58 ± 5 % ($n=11$). Ein signifikanter Abfall der Dilatation durch SP im Vergleich zum Kontrolldurchlauf bestand in der 60-Minuten Gruppe ($p=0,002$) und in der 180-Minuten Gruppe ($p=0,035$) (Abb. 16).

Bei den Dilatationswerten durch Zugabe von Bradykinin in einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l konnte lediglich ein geringfügiger Abfall aller drei Gruppen zur jeweiligen Kontrolle gemessen werden. Signifikante Unterschiede ergaben sich hierbei nicht (Abb. 18).

Bei der maximalen Dilatation durch die Zugabe von Serotonin (1×10^{-7} mol/l) in Bezug auf die Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ schnitt die Gruppe 60 Minuten normothermer Ischämie mit 1 ± 4 % (n=8) gegenüber den Gruppen nI₁₂₀ mit 12 ± 11 % (n=12) und nI₁₈₀ mit den Werten 15 ± 17 % (n=10) am schlechtesten ab. In der 120 und 180 Minuten-Gruppe konnte eine deutliche Verbesserung um 7% bzw. um 6% der Dilatation zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Tab.14). Der Dilatationswert der letztgenannten Gruppe stieg signifikant (p=0,024) zur entsprechenden Kontrollgruppe am Vortag (Abb. 25).

In der Gruppe der 120 Minuten normotherme Ischämie konnte ein signifikanter Anstieg (p=0,006) der Kontraktion durch Serotonin (1×10^{-6} mol/l) im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden (Abb. 24).

Ebenso wies die NO-unabhängige Relaxation des Endothels nach 60-minütiger normothermer Ischämie einen signifikanten Abfall (p=0,007) zur Kontrollgruppe auf (Abb. 17). Nach der Hemmung der NO-Produktion durch L-NNA kam es bei allen drei Gruppen zu einem nicht signifikanten Abfall der Dilatation durch SP im Vergleich zu der induzierten Dilatation durch SP.

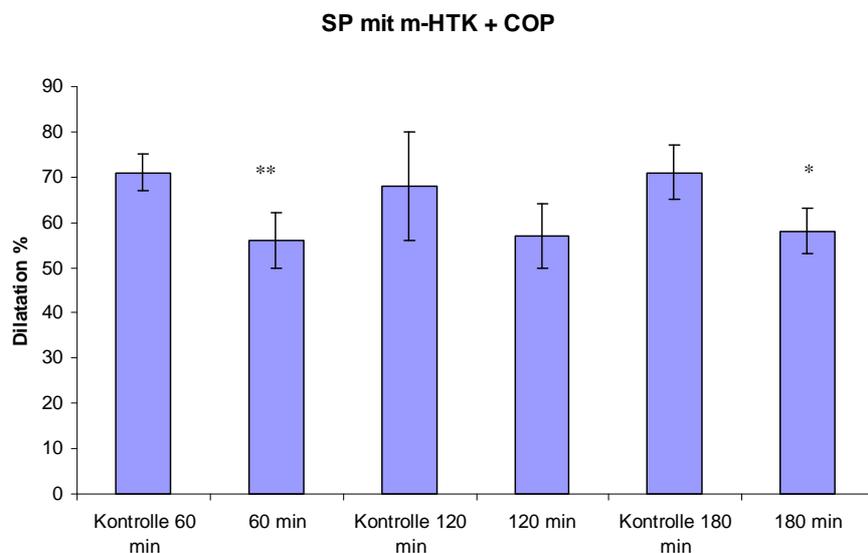


Abbildung 16: Funktionsfähigkeit der verschiedenen Coronararterien des Schweins mit jeweils 60, 120, und 180 Minuten normothermer Ischämie sowie nach der 24-stündigen Sauerstoffpersufflation (COP) in hypothermer m-HTK-Lösung bezogen auf die Kontrollgruppen vom Vortag.

Die Dilatationsergebnisse ergeben sich aus der Applikation von SP bezogen auf die Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Mittelwert \pm Standardabweichung

** p < 0,01 gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe

* p < 0,05 gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe

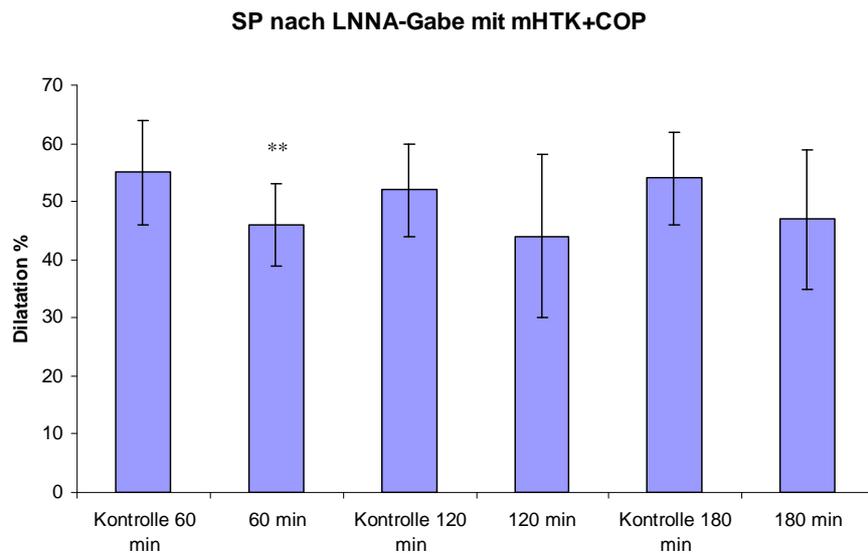


Abbildung 17: Funktionsfähigkeit der verschiedenen Coronararterien des Schweins mit jeweils 60, 120, und 180 Minuten normothermer Ischämie und anschließender 24-stündiger Sauerstoffpersufflation (COP) in hypothermer m-HTK Lösung bezogen auf die Kontrollgruppe vom Vortag.

Die Dilatationsergebnisse ergeben sich aus der Applikation von SP mit vorangehender Gabe von L-NNA bezogen auf die Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Mittelwert \pm Standardabweichung

** $p < 0,01$ gegenüber der Kontrollgruppe

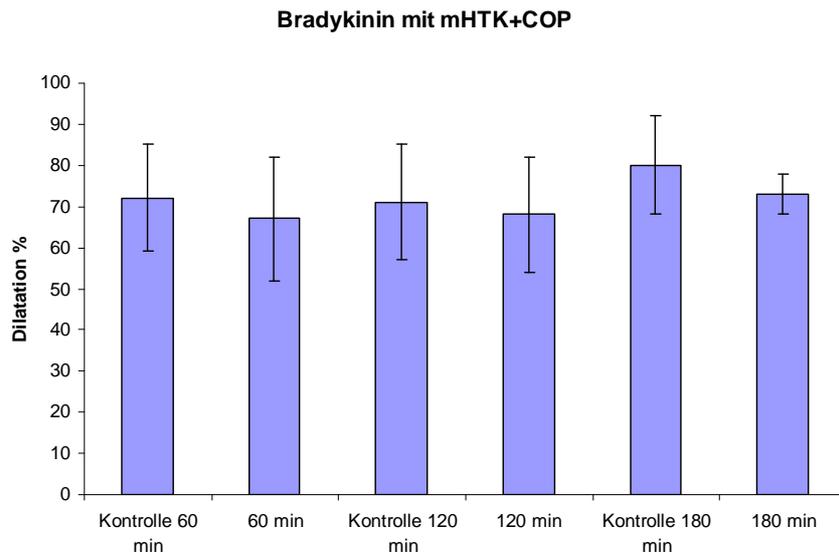


Abbildung 18: Funktionsfähigkeit der verschiedenen Coronararterien des Schweins mit jeweils 60, 120, und 180 Minuten normothermer Ischämie sowie nach der 24-stündigen Sauerstoffpersufflation (COP) in hypothermer m-HTK-Lösung, bezogen auf die Kontrollgruppe vom Vortag.

Die Dilatationswerte ergeben sich für die 60- und 120 Minuten Gruppe aus der Konzentration von 5×10^{-6} mol/l einer aufsteigenden Bradykininreihe in Relation zur Vorkontraktion von $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Mittelwert \pm Standardabweichung

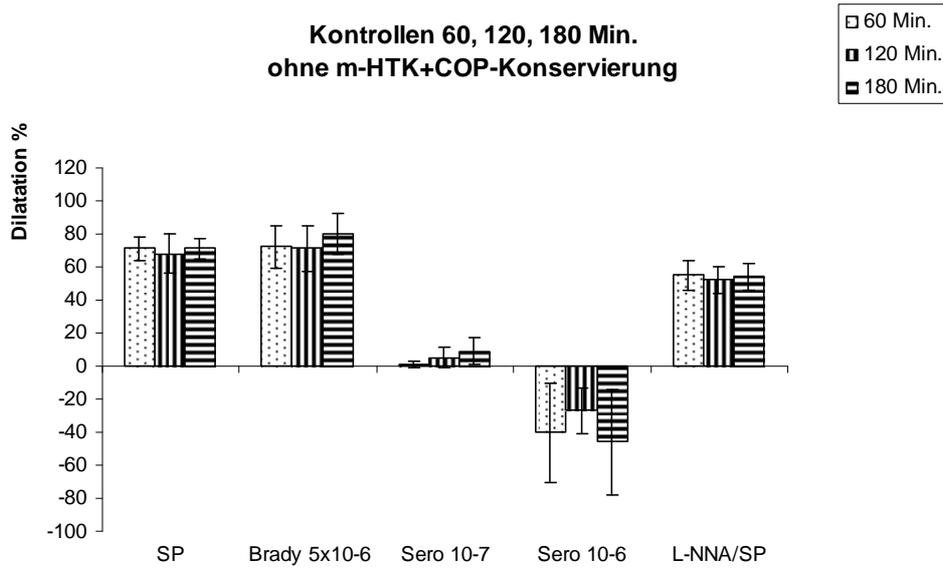
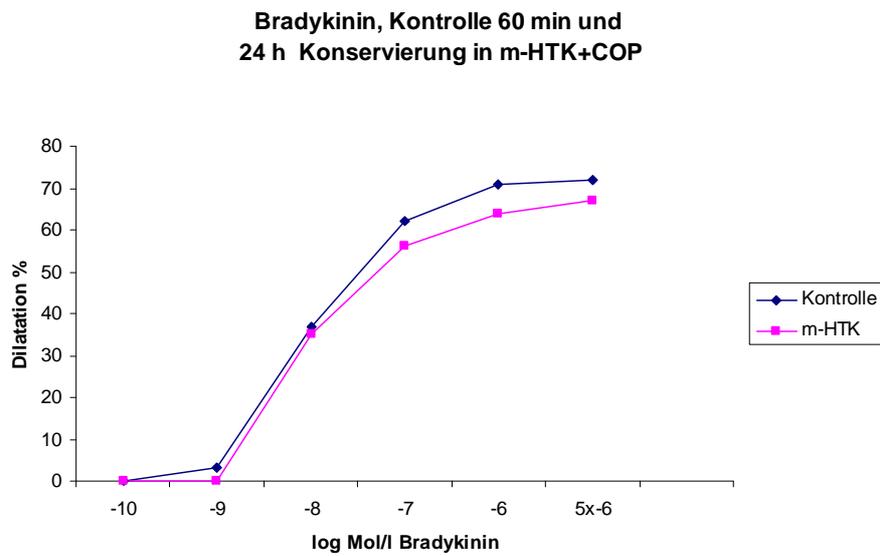
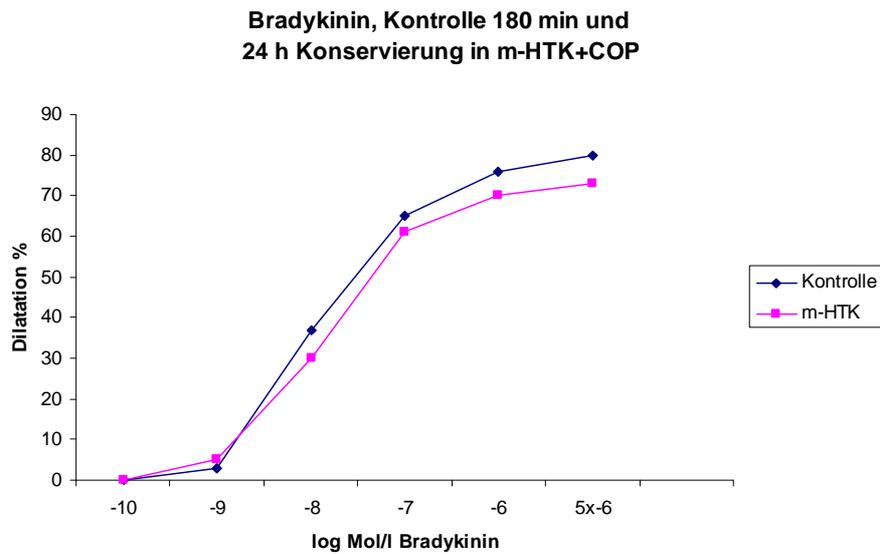
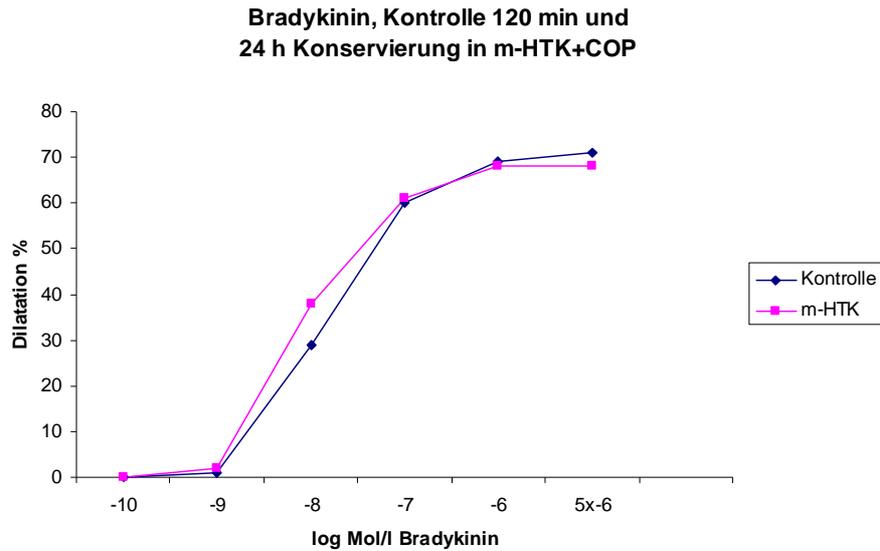


Abbildung 19: Kontrollen nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie der m-HTK-Gruppe
Mittelwert \pm Standardabweichung



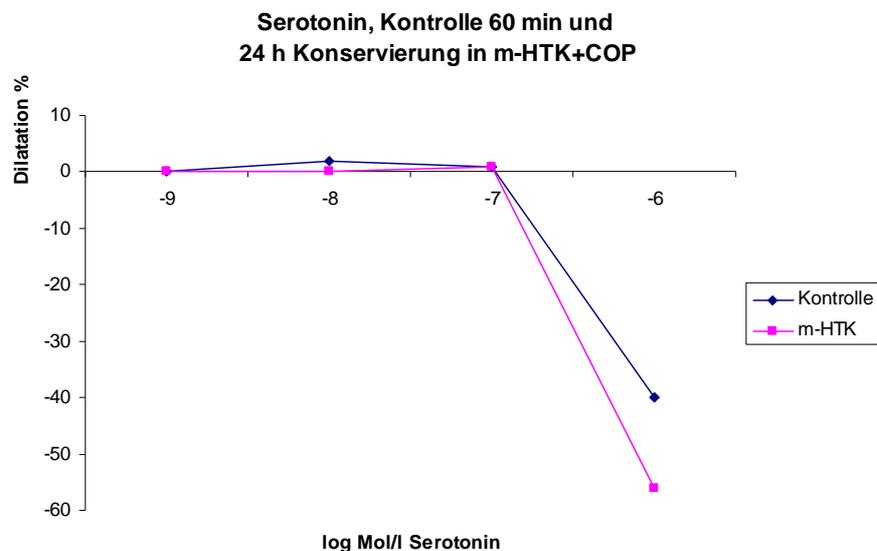


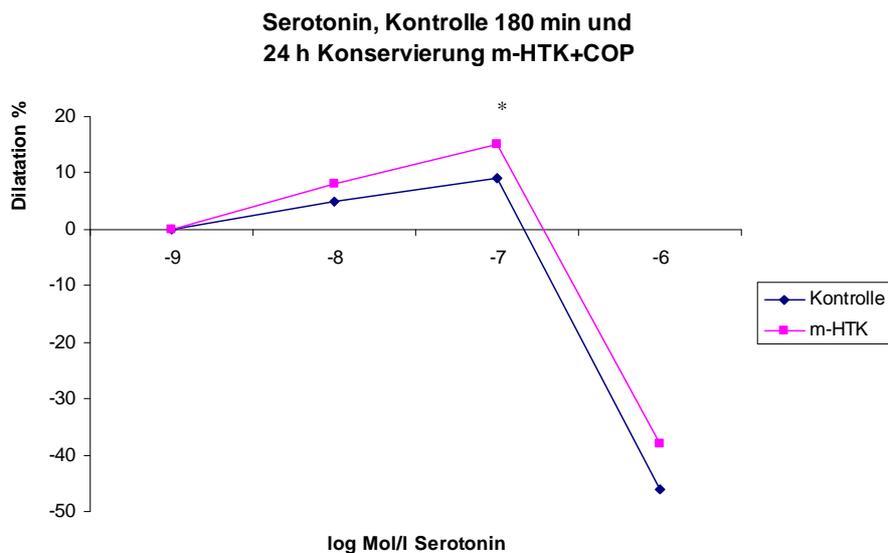
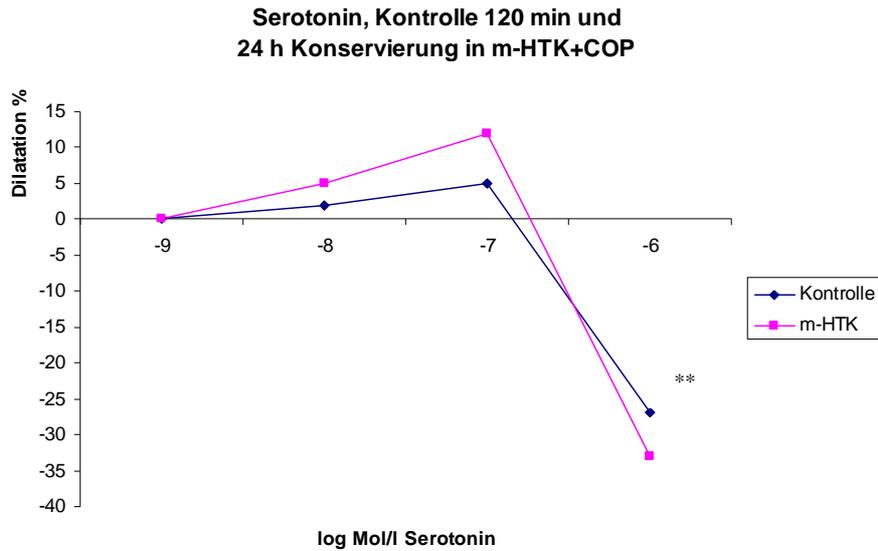
Abbildungen 20-22: Funktionsfähigkeit der Coronararterien mit 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie und anschließender 24-stündiger Sauerstoffpersufflation (COP) in hypothermer m-HTK-Lösung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Dilatationskurven zeigen die aufsteigende Bradykininreihe von 1×10^{-10} – 1×10^{-6} und 5×10^{-6} mol/l in Bezug auf die Vorkontraktion durch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation.

Tabelle 13: Konzentrationsabhängige Darstellung der Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen der aufsteigenden Bradykininreihe

Konzentrationsreihe Bradykinin mol/l	1×10^{-10}	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	5×10^{-6}
60 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	3 ± 6	37 ± 22	62 ± 15	71 ± 12	72 ± 13
60 Min Ischämie + 24 Std. m-HTK+COP- Konservierung	0 ± 0	0 ± 1	34 ± 16	56 ± 15	64 ± 14	67 ± 15
120 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	1 ± 3	29 ± 18	60 ± 15	69 ± 16	71 ± 14
120 Min Ischämie + 24 Std. m-HTK+COP- Konservierung	0 ± 0	3 ± 3	38 ± 16	61 ± 13	68 ± 14	68 ± 14
180 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	3 ± 5	37 ± 25	65 ± 15	76 ± 14	80 ± 12
180 Min Ischämie + 24 Std. m-HTK+COP- Konservierung	0 ± 0	5 ± 10	30 ± 24	61 ± 14	70 ± 11	73 ± 5





Abbildungen 23-25: Funktionsfähigkeit der Coronararterien mit 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie und anschließender 24-stündiger Sauerstoffpersufflation (COP) in hypothermer m-HTK-Lösung im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Die Dosis-Wirkungskurven zeigen die Dilatation und Kontraktion durch die aufsteigende Serotoninreihe von 1×10^{-9} auf 1×10^{-6} mol/l, in Bezug auf die Vorkontraktion durch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Applikation.

** $p < 0,01$ gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe

* $p < 0,05$ gegenüber der zugehörigen Kontrollgruppe

Tabelle 14: Konzentrationsabhängige Darstellung der Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung für die aufsteigende Serotoninreihe

Konzentrationsreihe Serotonin mol/l	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}
60 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	2 ± 2	1 ± 2	-40 ± 30
60 Min Ischämie + 24 Std. m-HTK+COP- Konservierung	0 ± 0	0 ± 1	1 ± 4	-56 ± 37
120 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	2 ± 3	5 ± 6	-27 ± 14
120 Min Ischämie + 24 Std. m-HTK+COP- Konservierung	0 ± 0	5 ± 5	12 ± 11	-33 ± 11
180 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	5 ± 8	9 ± 8	-46 ± 32
180 Min Ischämie + 24 Std. m-HTK+COP- Konservierung	0 ± 1	8 ± 12	15 ± 17	-38 ± 16

Tabelle 15: Endothelabhängige Relaxation nach verschiedenen Ischämiezeiten und 24 h m-HTK+COP

	60 Minuten	120 Minuten	180 Minuten
SP	56 ± 6 (n=9)	57 ± 7 (n=12)	58 ± 5 (n=11)
L-NNA/SP	46 ± 7 (n=9)	44 ± 14 (n=12)	49 ± 12 (n=11)

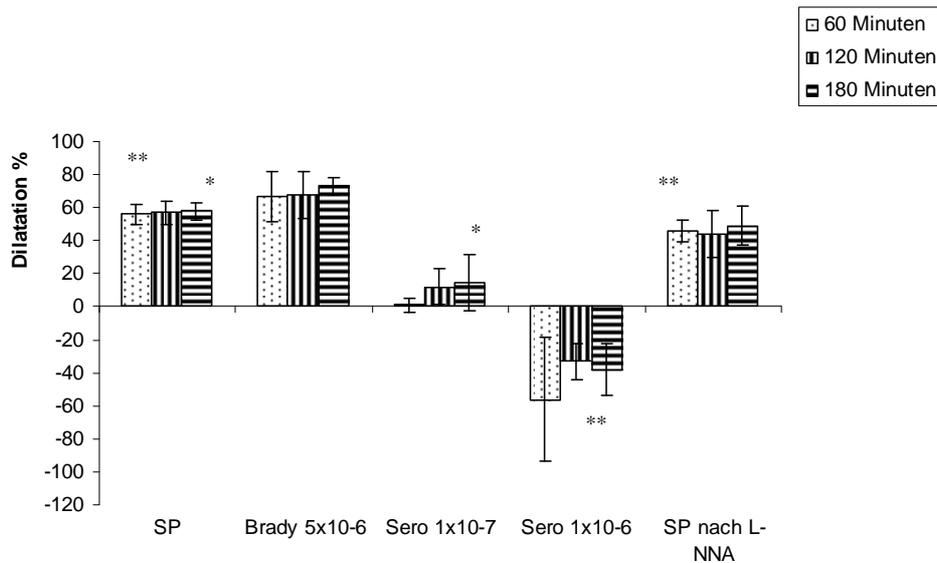


Abbildung 26: Endothelabhängige Relaxation nach verschiedenen Ischämiezeiten und anschließender 24-stündiger Sauerstoffpersufflation (COP) in hypothermer m-HTK Lösung

Mittelwert ± Standardabweichung

* $p < 0,05$ gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe

** $p < 0,01$ gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe

3.3.4 Funktion der Coronararterien nach Konservierung in hypothermer UW-Lösung für 24 Stunden (60, 120 und 180 Minuten normotherme Ischämie)

Nach der 24-stündigen Konservierung der Coronarringe in der UW-Lösung wurden in der Funktionsprüfung folgende Dilatationswerte ermittelt:

Hinsichtlich der Gruppen 120 und 180 Minuten normotherme Ischämie sank die endotheliale Dilatation durch SP in Relation zur Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ um deutliche 16 % ab. Dieser Unterschied erwies sich allerdings im gepaarten t-Test als nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 27).

Der Dilatationswert durch die Bradykininzugabe in der Konzentration von 5×10^{-6} log Mol/l, bezogen auf die Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ sank nach 60-minütiger Ischämie um 3% zur Kontrollgruppe ab. Hingegen konnte in der Gruppe nI_{120} ein Dilatationsverlust von 16% und in der Gruppe nI_{180} von 13% verzeichnet werden (Abb. 29 und Tab. 16).

Die Dilatation durch Serotonin mit einer Konzentration von 1×10^{-7} log Mol/l, bezogen auf die Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ ergab in allen drei Gruppen eine mäßige Verbesserung, wobei die Gruppe nI_{120} mit 6% Unterschied zur Kontrolle am besten abschnitt (Tab. 17). Ein signifikanter Abfall ($p=0,042$) zur Kontrollgruppe zeigte sich bei der Kontraktion durch Serotonin mit einer Konzentration von 1×10^{-6} log Mol/l in der 60-Minuten-Gruppe (Abb. 34). Nach Hemmung der NO-Synthese durch vorherige Gabe von L-NNA konnte in allen drei Gruppen ein deutliches Dilatationsdefizit im Vergleich zu den SP-Werten ausgemacht werden (Abb.37).

Mit Ausnahme des signifikanten Abfalls des Kontraktionswertes der Gruppe nI_{60} durch Serotonin, wies keiner der übrigen Funktionsergebnisse der Gruppen einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollergebnissen am Tag vor der Konservierung auf.

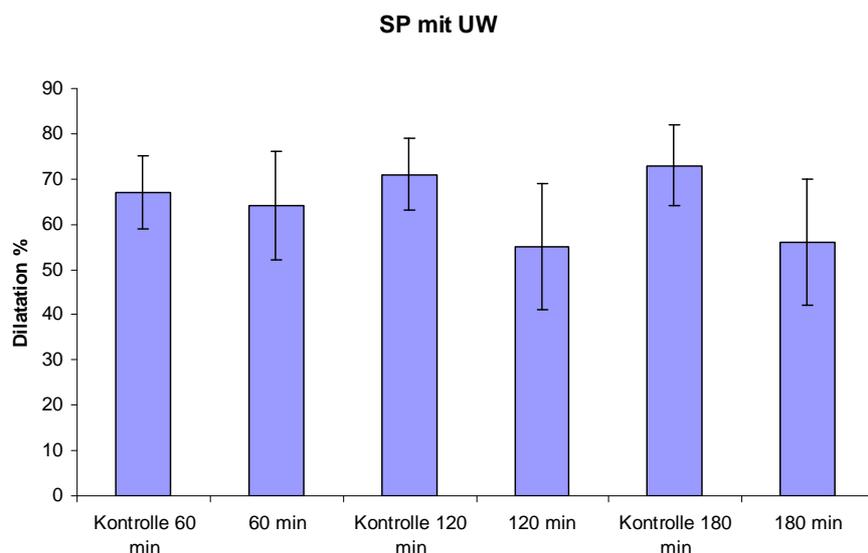


Abbildung 27: Funktionsfähigkeit der verschiedenen Coronararterien des Schweins mit jeweils 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie sowie nach der 24- stündiger Lagerung in hypothermer UW-Lösung, bezogen auf die Kontrollgruppe vom Vortag.

Die Dilatationsergebnisse ergeben sich aus der Applikation von SP bezogen auf die Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Mittelwert \pm Standardabweichung

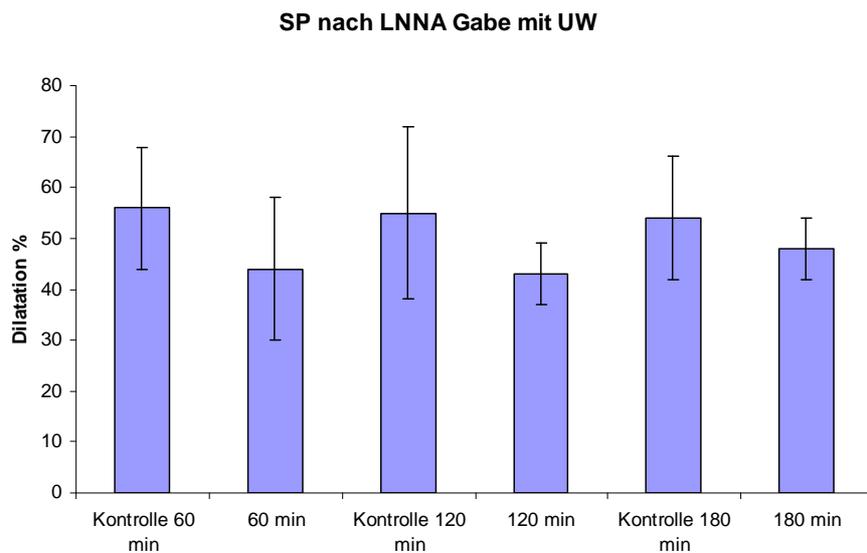


Abbildung 28: Funktionsfähigkeit der verschiedenen Coronararterien des Schweins mit jeweils 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie und anschließender 24-stündiger Lagerung in hypothermer UW-Lösung, bezogen auf die Kontrollgruppe vom Vortag.

Die Dilatationsergebnisse ergeben sich aus der Applikation von SP mit vorangestellter Gabe von L-NNA bezogen auf die Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$.
Mittelwert \pm Standardabweichung

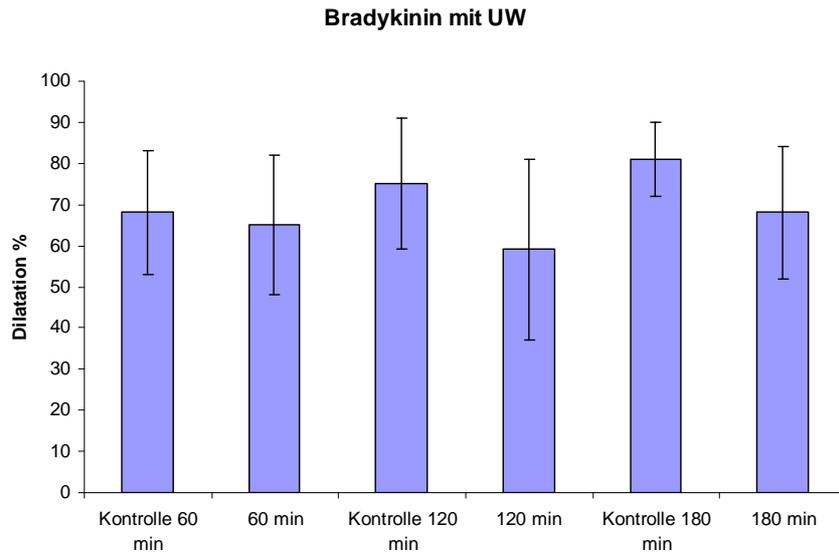


Abbildung 29: Funktionsfähigkeit der verschiedenen Coronararterien des Schweins mit jeweils 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie sowie nach der 24-stündigen Lagerung in hypothermer UW-Lösung, bezogen auf die Kontrollgruppe vom Vortag.

Die Dilatationswerte ergeben sich aus der Konzentration von 5×10^{-6} mol/l einer aufsteigenden Bradykininreihe, in Relation zur Kontraktion von $\text{PGF}_{2\alpha}$.
Mittelwert \pm Standardabweichung

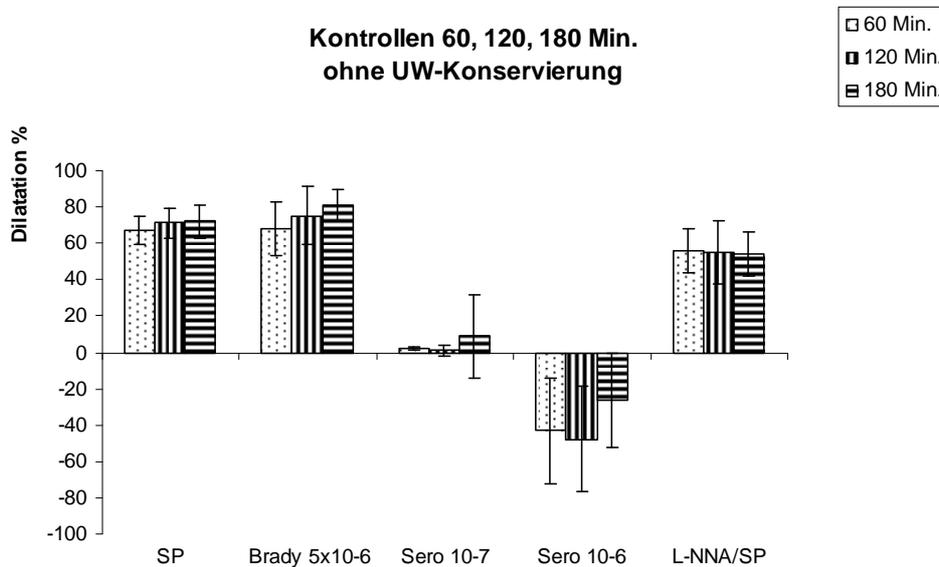
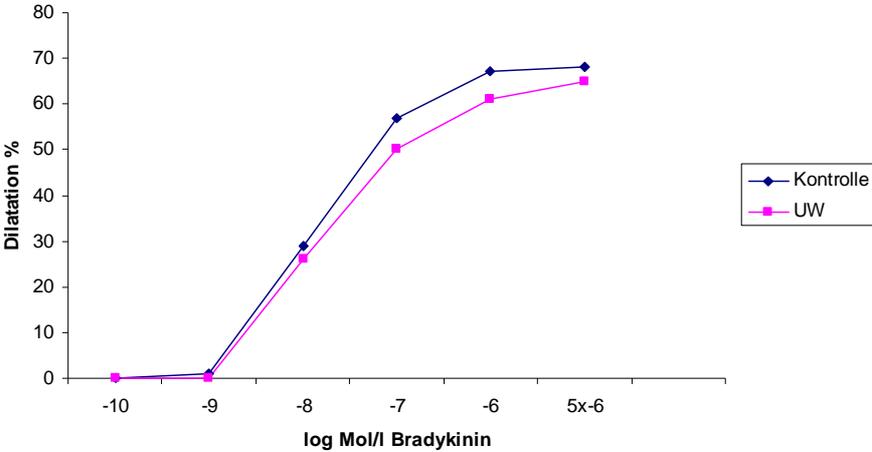


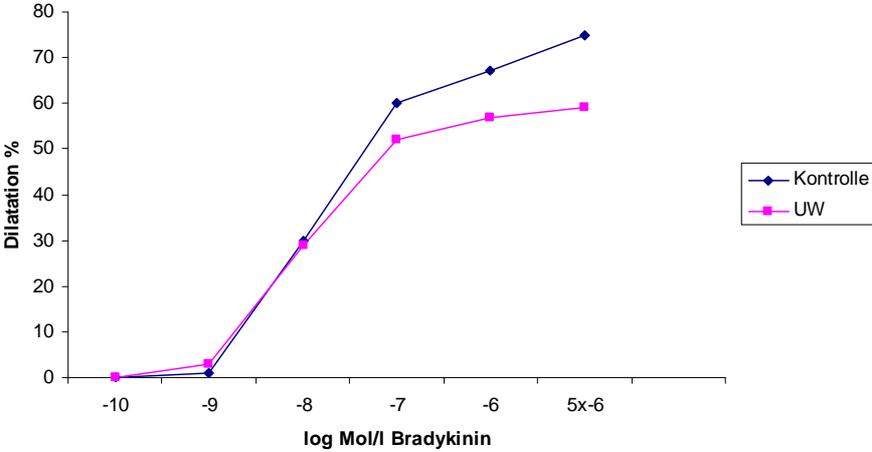
Abbildung 30: Kontrollen nach 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie der UW-Gruppe.

Mittelwert \pm Standardabweichung

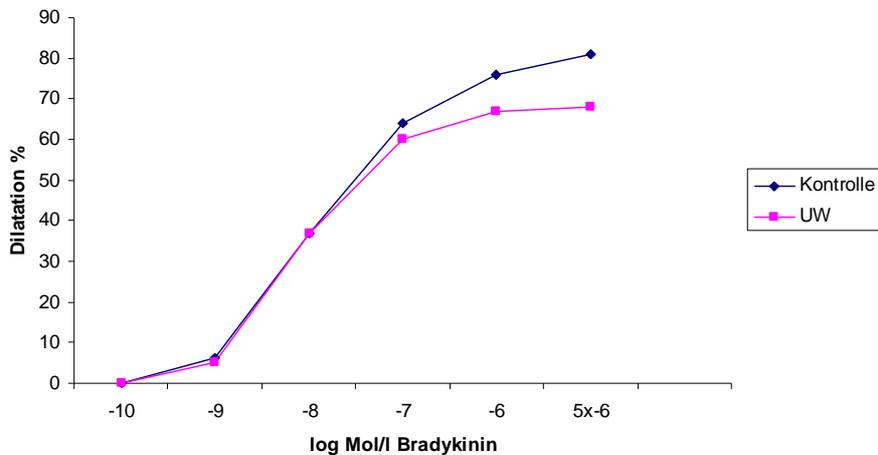
**Bradykinin, Kontrolle 60 min und
24 h Konservierung in UW**



**Bradykinin, Kontrolle 120 min und
24 h Konservierung in UW**



**Bradykinin, Kontrolle 180 min und
24 h Konservierung in UW**



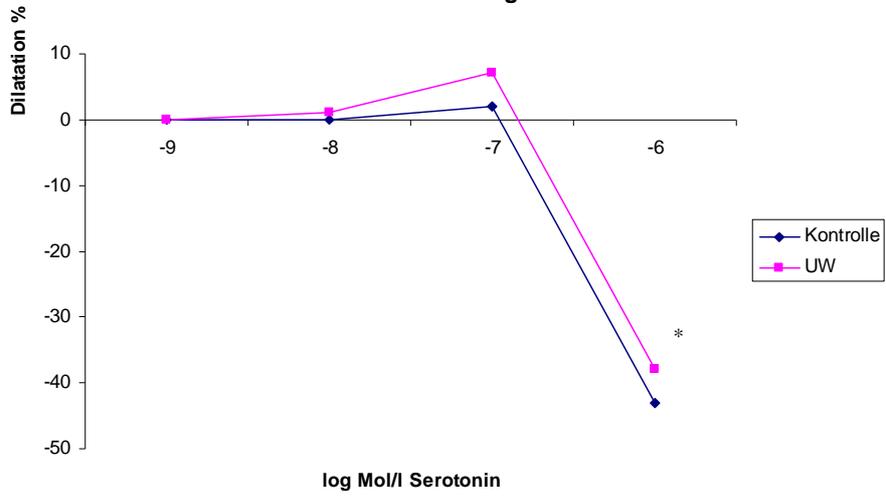
Abbildungen 31-33: Funktionsfähigkeit der Coronararterien mit 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie und anschließender 24-stündiger Lagerung in hypothermer UW-Lösung im Vergleich zu den Kontrollgruppen

Die Dilatationskurven zeigen die aufsteigende Bradykininreihe von 1×10^{-10} auf 1×10^{-6} und 1×10^{-6} mol/l in Bezug auf die Vorkontraktion durch die $PGF_{2\alpha}$ -Applikation.

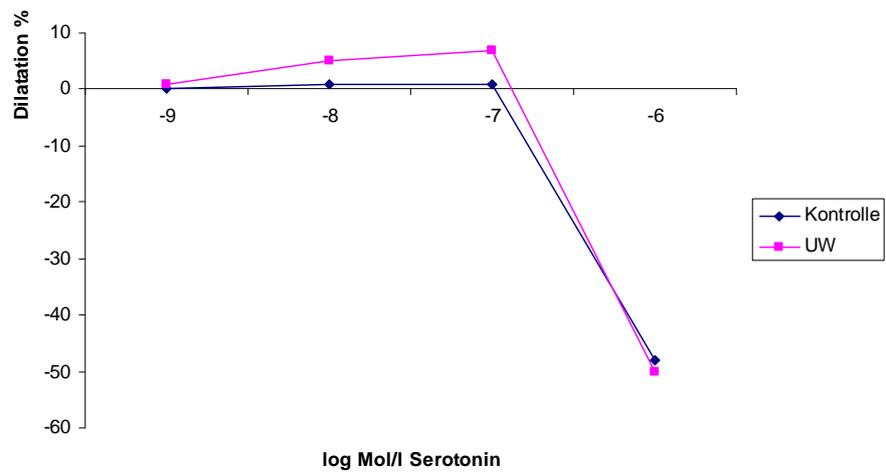
Tabelle 16: Konzentrationsabhängige Darstellung der Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung und für die aufsteigende Bradykininreihe

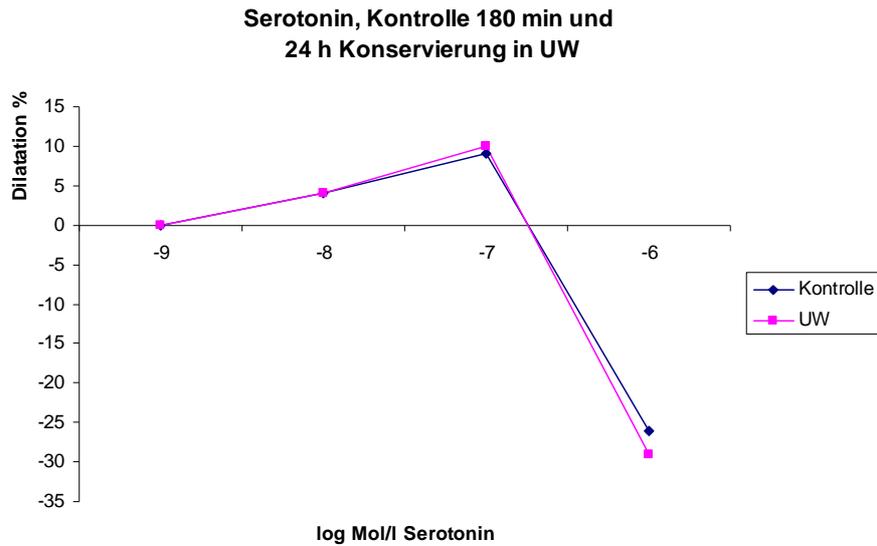
Konzentrationsreihe Bradykinin mol/l	1×10^{-10}	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	5×10^{-6}
60 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	1 ± 1	29 ± 17	57 ± 16	67 ± 14	68 ± 15
60 Min Ischämie + 24 Std. UW-Konservierung	0 ± 0	0 ± 0	26 ± 20	50 ± 24	61 ± 19	65 ± 17
120 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	1 ± 2	30 ± 24	60 ± 24	67 ± 27	75 ± 16
120 Min Ischämie + 24 Std. UW-Konservierung	0 ± 0	3 ± 5	29 ± 17	52 ± 16	57 ± 27	59 ± 22
180 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	6 ± 9	37 ± 26	64 ± 19	76 ± 9	81 ± 9
180 Min Ischämie + 24 Std. UW-Konservierung	0 ± 0	5 ± 8	37 ± 19	60 ± 15	67 ± 15	68 ± 17

**Serotonin, Kontrolle 60 min und
24 h Konservierung in UW**



**Serotonin, Kontrolle 120 min und
24 h Konservierung in UW**





Abbildungen 34-36: Funktionsfähigkeit der Coronararterien mit 60, 120 und 180 Minuten normothermer Ischämie und anschließender 24-stündiger Lagerung in hypothermer UW- Lösung im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Die Dosis-Wirkungskurven zeigen die aufsteigende Serotoninreihe von 1×10^{-9} auf 1×10^{-6} mol/l in Bezug auf die Vorkontraktion durch die $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Applikation.

* $p < 0,05$ gegenüber der Kontrollgruppe

Tabelle 17: Konzentrationsabhängige Darstellung der Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung für die aufsteigende Serotoninreihe

Konzentrationsreihe Serotonin mol/l	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}
60 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	0 ± 1	2 ± 1	-43 ± 29
60 Min Ischämie + 24 Std. UW-Konservierung	0 ± 0	1 ± 3	7 ± 9	-38 ± 38
120 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	1 ± 3	1 ± 3	-48 ± 29
120 Min Ischämie + 24 Std. UW-Konservierung	1 ± 2	5 ± 12	7 ± 21	-50 ± 47
180 Min Ischämie (Kontrolle)	0 ± 0	4 ± 11	9 ± 23	-26 ± 26
180 Min Ischämie + 24 Std. UW-Konservierung	0 ± 0	4 ± 5	10 ± 12	-29 ± 14

Tabelle 18: Endothelabhängige Relaxation nach verschiedenen Ischämiezeiten

	60 Minuten	120 Minuten	180 Minuten
SP	64 ± 12 (n=12)	55 ± 15 (n=11)	56 ± 14 (n=12)
L-NNA/SP	44 ± 14 (n=11)	43 ± 6 (n=11)	48 ± 7 (n=12)

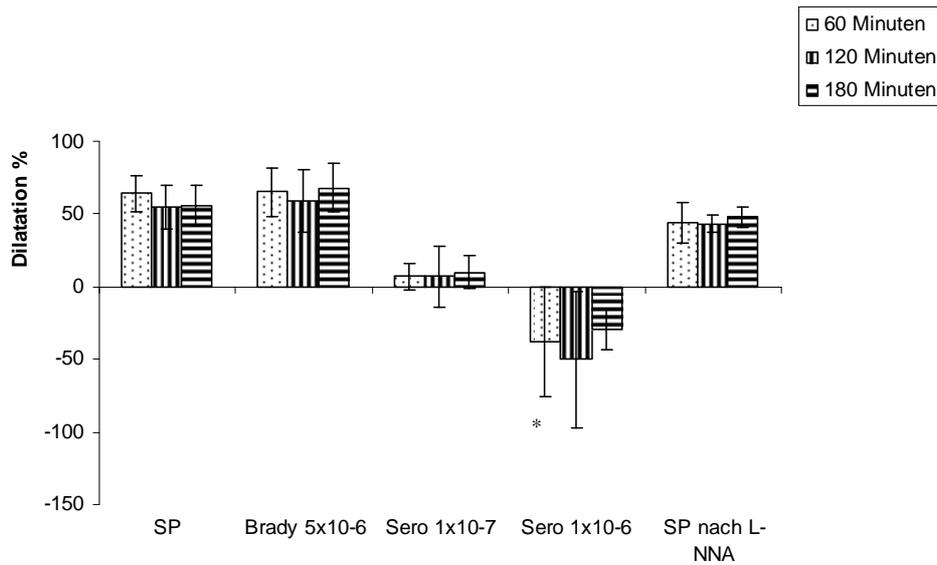


Abbildung 37: Endothelabhängige Relaxation nach verschiedenen Ischämiezeiten und anschließender 24-stündiger Lagerung in hypothermer UW-Lösung

Mittelwert ± Standardabweichung

* $p < 0,05$

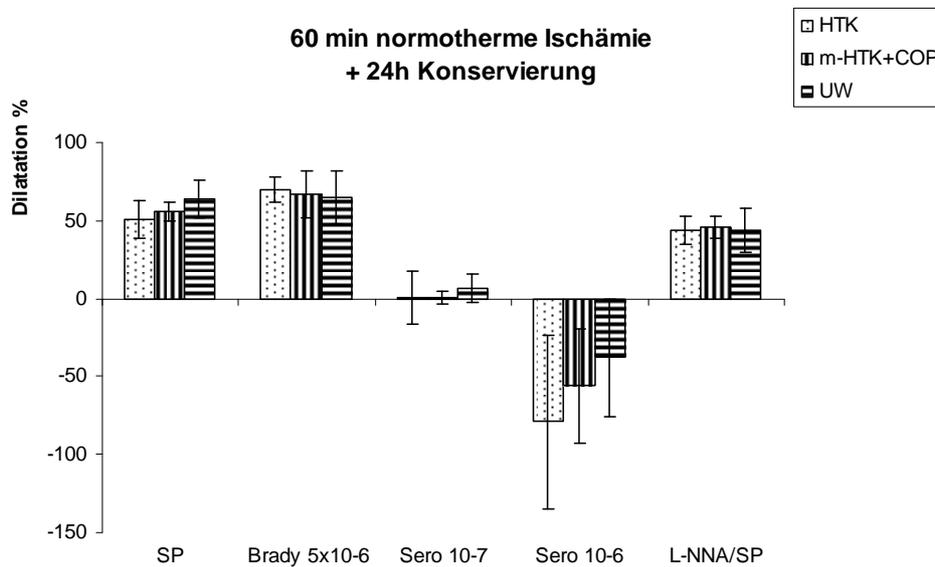


Abbildung 38: Vergleichende Darstellung der endothelialen Relaxation nach 60 Minuten normothermer Ischämie und 24-stündiger Konservierung in HTK-, m-HTK+COP und UW-Lösung

Mittelwert ± Standardabweichung

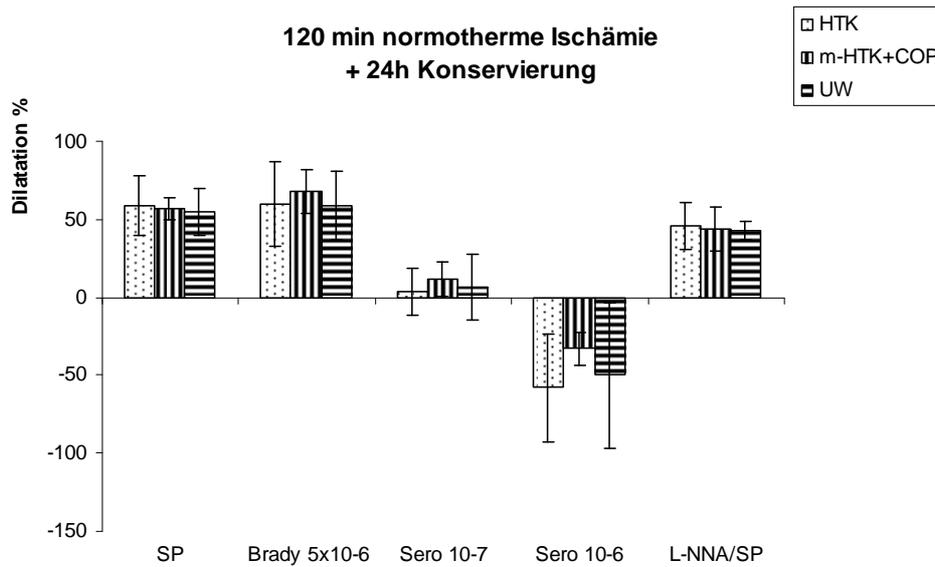


Abbildung 39: Vergleichende Darstellung der endothelialen Relaxation nach 120 Minuten normothermer Ischämie und 24-stündiger Konservierung in HTK, m-HTK+COP und UW-Lösung
Mittelwert ± Standardabweichung

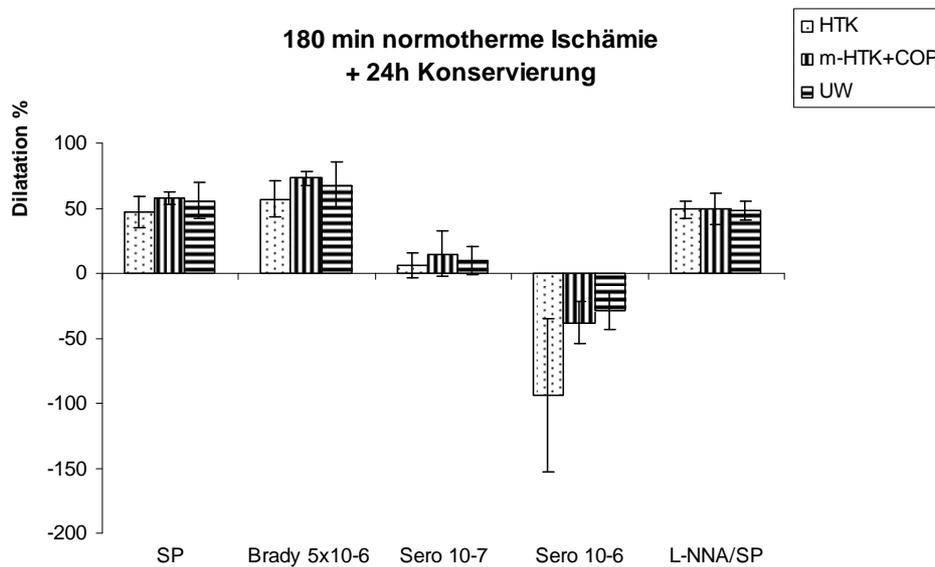


Abbildung 40: Vergleichende Darstellung der endothelialen Relaxation nach 180 Minuten normothermer Ischämie und 24-stündiger Konservierung in HTK, m-HTK+COP und UW-Lösung
Mittelwert ± Standardabweichung

3.3.5 Auswertung der Immunhistochemischen Untersuchungen

Die Ergebnisse der Immunhistochemischen Kontrollen (IHC-Kontrollen) für eNOS, PeNOS, 8-Iso und Nitrotyrosin wiesen in allen 4 Versuchsdurchläufen eine geringere Anfärbung der Endothelzellen auf, als die der darauffolgenden behandelten coronaren Endothelzellen (Abb.41).

Die Zellen der Gruppe Argon eNOS unterschieden sich in der Färbung bezüglich der gesamten Endothelzelle, des Zellkerns und des Zytoplasmas nur geringfügig von den Endothelzellen aus der Kontrollgruppe (Nativ) (Abb.42-45). Die Zellen der Gruppen Argon 8-Iso und Argon Nitrotyrosin hingegen wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich stärkere Färbung auf. Mit Ausnahme des Nitrotyrosinwertes, der den Färbegrad der gesamten Zelle angibt (gesamte Zelle, $p=0,048$), erwiesen sich alle Werte bezüglich der stärkeren Färbung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle als nicht signifikant (Abb. 42).

In der Argon HTK eNOS-Gruppe konnte eine signifikant stärkere Färbung der gesamten Zelle ($p=0,03$) (Abb.42) und des erstgemessenen Zytoplasmawertes ($p=0,02$) (Abb.43) beobachtet werden. Die Ergebnisse der Gruppen Argon HTK PeNOS, Argon HTK 8-Iso und Argon HTK Nitrotyrosin zeigten einen nicht signifikanten Anstieg der Färbung der gesamten Zelle, des Zellkerns und des Zytoplasmas im Vergleich zur Kontrollgruppe.

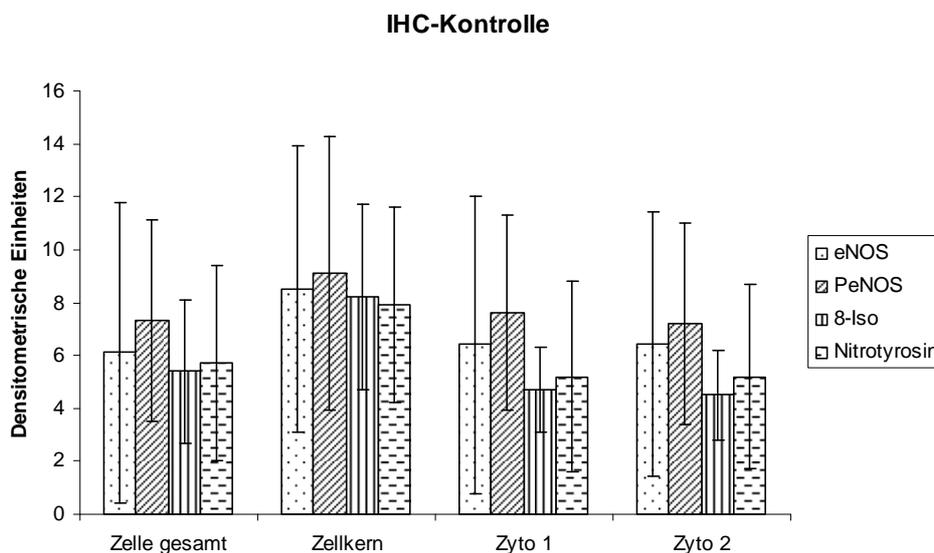


Abbildung 41: Vergleichende Darstellung der densitometrischen Einheiten der Zellen der IHC-Kontrolle

Mittelwert \pm Standardabweichung

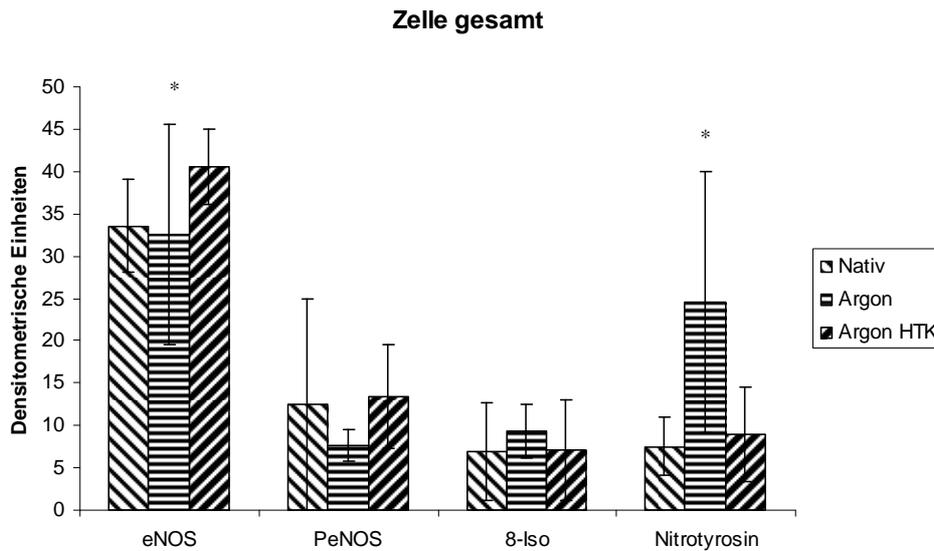


Abbildung 42: Vergleichende Darstellung der densitometrischen Einheiten der Endothelzelle der Nativ(Kontroll)-Gruppe, sowie nach 180-minütiger Argonbegasung und nach 180-minütiger Argonbegasung mit anschließender Konservierung in HTK für 24 Stunden.

Mittelwert ± Standardabweichung

* $p < 0,05$ jeweils gegenüber der Nativ-Gruppe

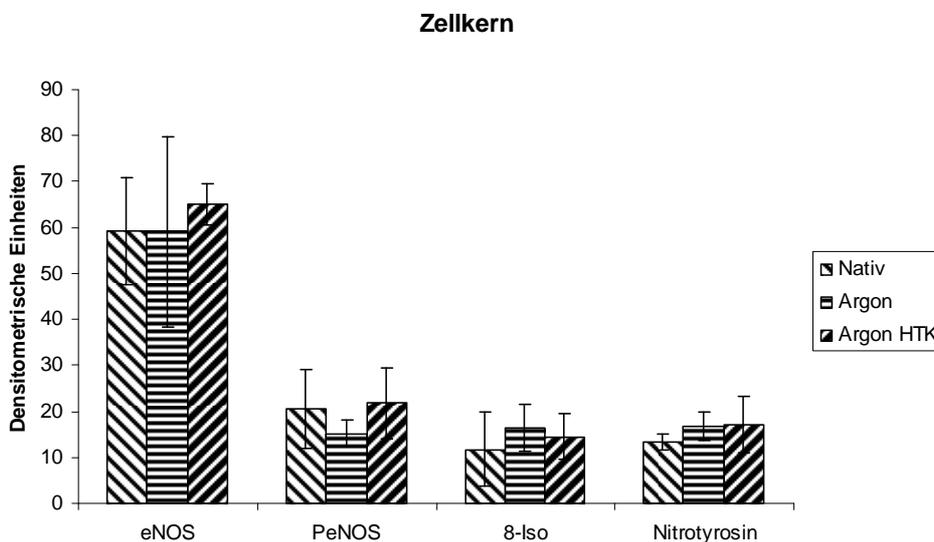


Abbildung 43: Vergleichende Darstellung densitometrischen Einheiten des Zellkerns der Nativ(Kontroll)-Gruppe, sowie nach 180-minütiger Argonbegasung und nach 180-minütiger Argonbegasung mit anschließender Konservierung in HTK für 24 Stunden.

Mittelwert ± Standardabweichung

Zytoplasma 1

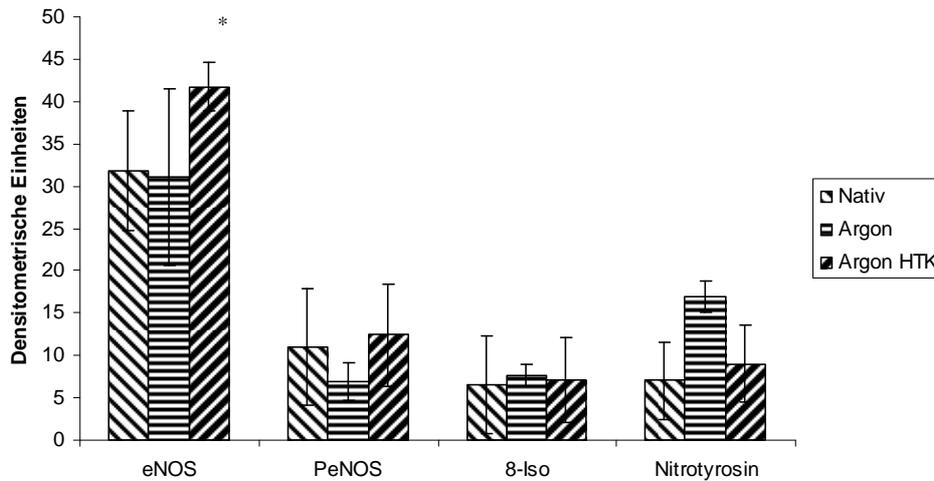


Abbildung 44: Vergleichende Darstellung der densitometrischen Einheiten des erstgemessenen Zytoplasmas der Endothelzelle der Nativ(Kontroll)-Gruppe, sowie nach 180-minütiger Argonbegasung und nach 180-minütiger Argonbegasung mit anschließender Konservierung in HTK für 24 Stunden.

Mittelwert ± Standardabweichung

* $p < 0,05$ gegenüber der Nativ-Gruppe

Zytoplasma 2

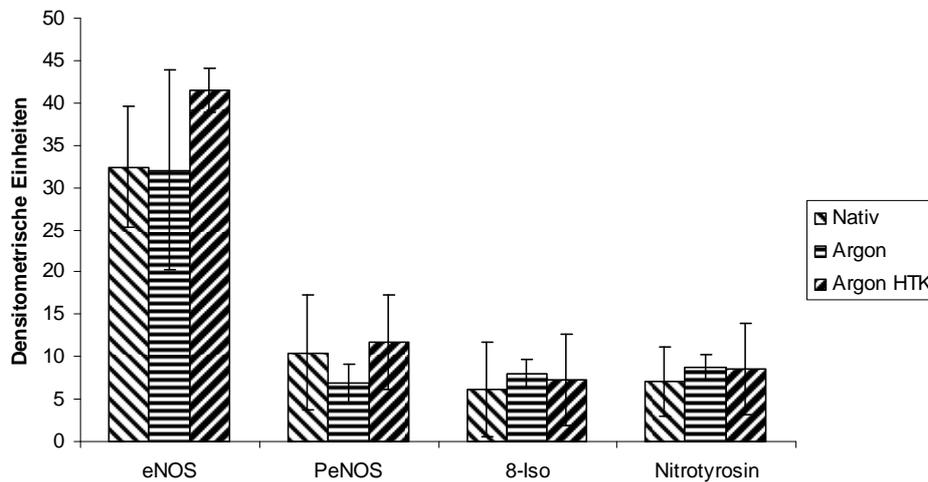


Abbildung 45: Vergleichende Darstellung der densitometrischen Einheiten des zweitgemessenen Zytoplasmas der Endothelzelle der Nativ(Kontroll)-Gruppe, sowie nach 180-minütiger Argonbegasung und nach 180-minütiger Argonbegasung mit anschließender Konservierung in HTK für 24 Stunden.

Mittelwert ± Standardabweichung

4. *Diskussion*

4.1 **Diskussion der Methodik**

4.1.1 **Das Schweineherz als Versuchsorgan**

Das Schweineherz und das menschliche Herz weisen bezüglich ihres Aufbaus und ihrer Physiologie vergleichbare Merkmale auf (Crick et al., 1998). Aufgrund der ähnlichen Größe des Herzens und deren Gefäße sind die Messungen an den Coronararterien gut durchführbar.

Die Versuchsergebnisse des Einflusses normothermer Ischämie mit nachfolgenden unterschiedlichen hypothermen Konservierungen auf die endothelabhängige Relaxation und NO-Freisetzung der epicardialen Coronararterien des Schweins lassen sich wegen des nahezu identischen coronaren Versorgungstyps des Schweineherzens im Vergleich zum humanen coronaren Versorgungstyp gut übertragen. Ein Hauptunterschied besteht in der 90 Grad Mündung der V. cava cranialis und der Vena cava caudalis in den rechten Vorhof, die beim Menschen in einer Linie liegen (Crick et al., 1998), sowie in der Lage der V.azygos sinistra, die beim Schweineherz in den Sinus coronarius mündet (Nickel et al., 1984).

Herzen für diese Versuchsreihe bezogen wir aus dem Kölner Schlachthof von dort frisch geschlachteten Schweinen. Nach der Entnahme der Coronararterien in der Schlachthalle, dem Transport ins Labor, der sich dort anschließenden Präparation und der jeweils 60, 120 oder 180-minütigen Ischämiedauer konnten wir keine Einbußen der Normalfunktion des Endothels der Coronararterien im Standardverfahren (Kontrolldurchlauf) feststellen.

4.1.2 **Krebs-Henseleit-Lösung (KH)**

Wir verwendeten die KH-Lösung als Inkubationslösung im Organbad. In unserer Versuchsreihe erfolgte die Oxygenierung der Coronarringe über die Carbogenzufuhr (95% O₂ + 5%CO₂), was gleichzeitig der Einstellung eines physiologischen pH-Wertes diente, da die KH-Lösung einen Bicarbonatpuffer besitzt. Durch einen CO₂-Partialdruck von 40 mmHg konnte der pH auf einen konstanten Wert von 7,4-7,45 eingestellt werden. Um eine vollständige Sättigung des Gewebes mit Sauerstoff zu erreichen, entschieden wir uns für einen unphysiologisch hohen Sauerstoffpartialdruck von 600 mmHg, so dass der physikalisch

gelöste Sauerstoff per diffusionem zu einer ausreichenden Oxygenierung der Endothelien und der glatten Muskulatur der Gefäßringe führte.

Bei der KH-Lösung handelt es sich um eine saline isotonische Elektrolytlösung, deren Ionenzusammensetzung der des Blutes gleicht. Sie wird standardmäßig als Perfusionslösung in Versuchen mit isolierten Herzen in der Langendorffapparatur eingesetzt. Sie ist kostengünstig und einfach in ihrer Herstellung, sowie für Versuche unterschiedlicher Tierspezies nutzbar. Bei der Verwendung dieser Lösung muß stets auf eine ausreichende Sauerstoffzufuhr geachtet werden, da die KH-Lösung aufgrund des Fehlens von Sauerstoffträgern (Erythrocyten) eine niedrige Sauerstoffkapazität aufweist.

4.2. Diskussion der verwendeten Substanzen zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der Coronararterien

Ein Maßstab für den Funktionserhalt der Coronararterien ist die Fähigkeit der Gefäßdilatation, die sich mittels einiger Substanzen provozieren und deren Wirkung sich messen läßt. In unserer Studie wurde die Funktion des Endothels von Schweinecoronararterien getestet, die nach unterschiedlich langer normothermer Ischämie in verschiedenen Konservierungslösungen gelagert wurden. Durch die Zugabe von SP, Bradykinin, Serotonin und L-NNA in Verbindung mit SP konnte ein Dilatationswert, der in Relation zur Präkontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ stand ermittelt werden. Anhand dieser Ergebnisse konnte das Ausmaß der Endothelschäden beurteilt werden.

4.2.1 Substanz P (SP)

In unserer Versuchsreihe verwendeten wir SP zur Untersuchung der endothelialen Funktion der Coronararterien. Die Dilatationsfähigkeit durch die Freisetzung von endothelalem Stickstoffmonoxid galt u.a. als Maß für ein funktionsfähiges Endothel. In unserer Studie unterschieden sich die Ergebnisse von im Mittel 71% der endothelabhängigen Dilatation auf SP zwischen den Kontrollgruppen (60, 120, 180 Minuten normotherme Ischämie) kaum. Dies schließt eine endotheliale Schädigung als Folge der unterschiedlich lang andauernden Ischämie-Phasen aus. In Experimenten von Cocks et al. (1983) konnte gezeigt werden, dass die relaxierenden Eigenschaften von SP auf das Vorhandensein eines intakten Endothels

zurückzuführen ist. Er zeigte, dass bei Abwesenheit eines Endothels SP nicht in der Lage war eine vorher erzielte Kontraktion des Gefäßes wieder aufzuheben. Durch Papaverin, einem endothelunabhängigen Vasodilatator konnte allerdings eine 90 %ige Dilatation erreicht werden. In unseren Versuchen erreichten intakte Ringe von Schweinecoronararterien der Kontrollgruppen ($n_{60, 120, 180}$) Werte von $71\% \pm 9\%$ der SP-Dilatation nach einer Vorkontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$. Furchgott konnte bereits 1980 als Voraussetzung für die Wirksamkeit verschiedener Vasodilatoren ein intaktes Endothel identifizieren (Furchgott 1980).

SP ist ein Neuropeptid der Tachykinin-Familie und wurde erstmals 1931 durch Von Euler und Gaddum entdeckt. SP wird aus dem Vorläufermolekül Preprotachykinin A in den sensiblen Nervenfasern gebildet. Diese kommen in den Gefäßwänden von Arterien und Venen, insbesondere der Coronararterien vor (Mechiche et al., 2001), wo SP eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus und der myokardialen Perfusion spielt. Desweiteren wirkt SP als Neurotransmitter und Neuromodulator im zentralen Nervensystem (Otsuka und Yoshioka, 1993). Darüberhinaus stellt SP einen potenten endothelabhängigen Dilatator der glatten Muskulatur der Gefäße dar (Accili et al., 1994). Es gibt drei G-gekoppelte Neurokinin-Rezeptoren, NK-1, NK-2 und NK-3. Der vorherrschende Neurokinin-Rezeptor in den Coronararterien ist der NK-1-Rezeptor, zu dem SP die größte Affinität besitzt (Accili et al., 1994). Bei der Kopplung von SP an diesen Rezeptor kommt es über einen Anstieg des intracellulären cGMP-Spiegels zu einem erhöhten intracellulären Calciumgehalt. Dieser wiederum führt zur Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Stickoxidsynthase und so zur Freisetzung von NO, was eine Dilatation zur Folge hat. Ebenso führt dieser Calciumanstieg in den Endothelzellen zur Stimulation der Phospholipase A_2 und somit zur Aktivierung des Arachidonsäure-Metabolismus und zur Bildung von Prostazyklin. Um zu beweisen, dass SP ein Mediator der endothelialen NO-Produktion ist, hemmte Mitchell et al. (1997) mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors (L-NAME) die Stickoxidsynthase am isolierten Kaninchenherzen und konnte zeigen, dass sich die Vasodilatation durch den Inhibitor reduzieren ließ. Edwards et al. (2001) kam zu der Schlußfolgerung, dass SP in den großen Koronararterien von Schweinen nur unter Anwesenheit eines NO-Synthase- und Cyclooxygenase-Hemmers in der Lage sei, eine Hyperpolarisation am Endothel auszulösen. Desweiteren waren sie der Meinung, dass ein HEPES-Zusatz (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) zur KH-Inkubationslösung, die durch SP hervorgerufene Hyperpolarisation verschwindet. Dagegen soll die durch Bradykinin unter gleichen Bedingungen hervorgerufene Hyperpolarisation bestehen bleiben. Erst durch den Zusatz von

Iberitoxin, einem spezifischen Inhibitor der großen calciumabhängigen Kaliumkanäle und 17-Octodecansäure, einem Blocker der Cytochrom P 450 Epoxygenase ließ sich die Hyperpolarisation bedingt durch Bradykinin aufheben. Ergebnisse der Versuchsreihe von Frieden et al. (1999) hingegen zeigten, daß eine Hyperpolarisation des Endothels bei Zugabe von SP und Bradykinin die Folge der Aktivität unterschiedlicher calciumabhängiger K-Kanäle ist. SP aktiviert somit kleine calciumabhängige SK-Kanäle mit einer geringeren Kaliumleitfähigkeit, während Bradykinin große calciumabhängige BK-Kanäle mit einer großen Kaliumleitfähigkeit aktiviert. Mit Untersuchungen der durch SP induzierten prostazyklinabhängigen Vasodilatation setzte sich Mechiche et al. (2001) auseinander. Durch die Hemmung mit einem Cyclooxygenase-Inhibitors (Indomethacin) konnte die Beteiligung von PGI₂ an der Vasodilatation von humanen pulmonalen, umbilikalen und gastroepiloikalen Arterien ausgeschlossen werden. In unseren Versuchen wurden die Prostaglandine ausschließlich durch Indomethacin blockiert. Hier kam es nach der Indomethacin-Gabe zu keinen nennenswerten Veränderungen. Desweiteren fanden Mechiche und seine Mitarbeiter heraus, dass mit Hemmung der Stickstoffmonoxidsynthese durch Inhibitoren, wie L-NMMA, L-NAME oder L-NNA die Relaxation der Arterien durch SP signifikant vermindert wurde (Mechiche et al., 2001). Wir benutzten in unserer Versuchsreihe L-NNA in einer Konzentration von 300 µmol/l. Diese Konzentration reicht aus, um eine sichere NO-Synthase-Hemmung durch einen Inhibitor (N^G-Nitro-L-Arginin) zu bewirken (Ge et al., 2000).

4.2.2 Bradykinin

Die in unserer Versuchsreihe verwendeten Bradykininkonzentrationen betragen 1×10^{-10} - 1×10^{-6} und 5×10^{-6} mol/l. Alle drei Kontrollgruppen wiesen ähnliche Dilatationswerte bezüglich des Maximalwertes auf (im Mittel 73 % nach 60 Min. normoth. Ischämie, 74 % nach 120 Min. normoth. Ischämie und 76 % nach 180 Min. normoth. Ischämie), der mit der Konzentration 5×10^{-6} mol/l erreicht wurde. Es konnte hier ein Dilatationsanstieg in allen drei Gruppen gegenüber der Dilatation durch SP beobachtet werden. Dies könnte an der Beteiligung von Bradykinin am EDHF-Weg liegen, der eine vasodilatative Wirkung mit sich führt (Frieden et al., 1999). Dabei scheint Bradykinin im Unterschied zu SP eine Hyperpolarisation über die Aktivierung von großen K_{Ca}-Kanälen und nicht wie SP über die Aktivierung kleiner K_{Ca}-Kanäle in porcinen Coronararterien zu bewirken (vgl. Kap. 4.2.1,

Frieden et al., 1999). Die Stimulation der großen K_{Ca} -Kanäle durch Bradykinin erfordert eine höhere Calciumkonzentration. Somit ist die intracelluläre Calciумаusschüttung bei Bradykininanwesenheit um 30 % höher als bei SP. Dementsprechend öffnen sich mehr calciumabhängige Kaliumkanäle wodurch es zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur des Gefäßendothels kommt und eine stärkere endothelabhängige Vasodilatation ausgelöst wird (vgl. Kap. 4.3.3, Frieden et al., 1999). Desweiteren muß die jeweils genutzte Konzentration von SP und Bradykinin im Organbad berücksichtigt werden. Während mit der Konzentration von SP eine definierte Dilatation erreicht wird, die mit höheren Konzentrationen nicht steigerbar ist, kann mit einer steigenden Konzentration von Bradykinin im Organbad eine höhere Dilatation erreicht werden, vorausgesetzt es sind noch freie Rezeptoren vorhanden, die ausschließlich von Bradykinin besetzt werden können.

Bradykinin gehört zu den Kininen und entsteht aus der Kininkaskade des Kallikrein-Kinin-Systems. Ende der 60er Jahre gelang es den Forschern Piper und Vane zu zeigen, daß Bradykinin in der Lage ist, vasoaktive Substanzen sowohl in der Lunge als auch im Gefäßsystem freizusetzen. Bradykinin ist ein potenter Vasodilatator, der an den Arteriolen des großen Gefäßkreislaufs eine sofortige Vasodilatation bewirkt. Verantwortlich für die Endothel-induzierte Vasodilatation durch Bradykinin sind folgende, bereits besprochene Mediatoren: NO, PGI_2 und EDHF (Edwards et al., 2001). Die direkte Wirkung des Bradykinins auf die glatte Gefäßmuskulatur ist eine Kontraktion (Altura und Chand, 1981). In den meisten Fällen überwiegt jedoch die endothelvermittelte Dilatation. Wie Hall (1992) zeigte, konnten bisher zwei verschiedene Bradykinin-Rezeptoren identifiziert werden. Dazu gehören der B_1 -Rezeptor, der hauptsächlich infolge pathophysiologischer Reize hochreguliert wird und der B_2 -Rezeptor, der in den meisten Geweben existent ist. Verbinden sich die Rezeptoren mit ihren Liganden kommt es bei beiden zur Phospholipase C-abhängigen Freisetzung von IP (Inositolphosphat), sowie zu einem Anstieg des intracellulären Calciums. Einerseits führt dieser Calciumanstieg in den Endothelzellen zur Stimulation der Phospholipase A_2 und somit zur Aktivierung des Arachidonsäure-Metabolismus. Andererseits kommt es durch den erhöhten intracellulären Calciumgehalt zur Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Stickoxydsynthase und so zur Freisetzung von NO, was wiederum eine Dilatation zur Folge hat. Die vasodilatierenden Effekte des Bradykinins im coronaren Gefäßsystem werden maßgeblich durch NO vermittelt, während das Prostazyklin überwiegend metabolische Effekte übernimmt (Bönner und Chrosch, 1994). Linz et al. vermuteten in einer 1990 veröffentlichten Arbeit, dass Kinine über PGI_2 den raschen Abbau von energiereichen Phosphaten in den Myokardzellen verhindern und dies zu einer besseren

Überlebensrate des Myokards nach einer Ischämie führt. Über die Beteiligung des EDHF-Weges an der vasodilatativen Wirkung des Bradykinins wurden bereits mehrere Untersuchungen angestellt (Frieden et al., 1999, Edwards et al., 2001). Bradykinin bewirkt eine Hyperpolarisation durch die Aktivierung großer calciumabhängiger Kalium-Kanäle, SP hingegen aktiviert kleine calciumabhängige Kalium-Kanäle (vgl. Kap.4.2.1, S. 62, 63).

4.2.3. Serotonin

Die Verwendung von Serotonin in einer Konzentration von 1×10^{-7} mol/l bewirkte in dieser Versuchsreihe eine endothelabhängige Dilatation von im Mittel 6 %, 4 % und 8 % in den Kontrollgruppen 60, 120 und 180 Minuten normotherme Ischämie. Eine Kontraktion von im Mittel -37 %, -34 % und -32 % wurde in den drei Kontrollgruppen durch die Verwendung von Serotonin in einer Konzentration von 1×10^{-6} mol/l hervorgerufen. Mit diesen Ergebnissen kann man eine endotheliale Schädigung als Folge der unterschiedlich lang andauernden Ischämie-Phasen ausschließen.

Serotonin (5-hydroxytryptamin) ist ein biogenes Amin und entsteht aus der essentiellen Aminosäure Tryptophan. Es ist beim Menschen und den meisten Säugetieren in den enterochromaffinen Zellen (90%) des Magen-Darm-Trakts lokalisiert. Bei den verschiedenen Tierarten sind in den Mastzellen (besonders Gewebemastzellen bei Ratten und Mäusen), sowie in den Thrombocyten hohe Konzentrationen an Serotonin nachweisbar. Neuronal gespeichertes 5-HT (5-hydroxytryptamin) ist ebenso in großen Teilen des Gehirns vorhanden. Die vasoaktive Wirkung des Serotonins ist rezeptorvermittelt. Unter physiologischen Bedingungen vermitteln die zahlreichen Serotoninrezeptoren mit ihren vielen Untergruppen unterschiedliche Wirkungen. In der von Frishman et al. (1995) beschriebenen Arbeit, erfolgt eine grobe Einteilung: die Stimulation des Rezeptors vom Typ 1 (5-HT₁) führt zu einer Vasodilatation und die Kopplung an Rezeptor Typ 2 (5-HT₂) zur Vasokonstriktion. Wie Ellwood und seine Mitarbeiter (1997) in ihrer Arbeit an endothelbefreiten epicardialen Gefäßen von Kaninchenherzen beschrieben, konnten sie über die Zugabe von Serotonin eine Stimulation der Rezeptoren 5-HT_{2A}, 5-HT_{1D} und 5-HT_{1B} bewirken. Hieraus resultierte eine Vasokonstriktion, die Folge einer direkten Rezeptorstimulation an den glatten Gefäßmuskelzellen war. Die durch Serotonin entstehende Vasodilatation hingegen ist endothelabhängig und setzt ein funktionell intaktes Endothel voraus. Wie bereits erwähnt antworten endothelial geschädigte Gefäße auf die Zugabe von Serotonin nicht mehr mit einer

Vasodilatation, sondern mit einer Vasokonstriktion (Ishida et al., 2001; Vrints et al., 1992; Golino et al., 1991). Unter physiologischen Bedingungen sind die freigesetzten Serotoninkonzentrationen so gering, dass die gefäßrelaxierende Wirkung des Serotonins überwiegt. Den größten Anteil trägt dabei die Dilatation durch die NO-Freisetzung (Lamontagne et al., 1991).

4.2.4 Natriumnitroprussid (SNP)

In unserer Versuchsreihe wurde SNP eingesetzt, um eine direkte und endothelunabhängige Vasodilatation der Coronararterien zu provozieren. Die hier erreichte Dilatation in den Kontrollgruppen 60 und 120 Minuten normoth. Ischämie lag im Mittel bei 71 %. In der Kontrolle 180 Min. normoth. Ischämie konnten im Mittel 67 % Dilatation durch SNP gemessen werden. In unseren Versuchen konnte durch SP eine gleiche (60 und 120 Minuten) bzw. stärkere Dilatation (180 Minuten) als mit SNP ausgelöst werden. Durch Bradykinin hingegen wurde in allen drei Kontrollgruppen eine stärkere Dilatation provoziert. Dies kann man anhand der Erkenntnisse von Tschudi und Lüscher (1996) erklären: Sie stellten 1996 fest, daß SNP trotz gleicher Konzentration in Gefäßen ohne Endothel zu einer stärkeren Vasodilatation führte, als in Gefäßen mit einem intakten Endothel. Sie kamen zu dem Schluß, dass das von SNP freigesetzte NO zuerst von luminal durch die intakte Endothelzelle bis zur glatten Muskelzelle diffundieren muß und somit eine längere Diffusionsstrecke zu überwinden hat als das Stickstoffmonoxid, welches durch endothelabhängige Vasodilatoren im Endothel selbst entstand.

Sodiumnitroprussid gehört zur Gruppe der Stickoxid-Donatoren und ist ein endothelunabhängiger Nitrovasodilatator. Seine chemische Verbindung ist sehr labil, zerfällt im alkalischen Milieu und seine Wirkdauer beträgt weniger als drei Minuten (Dendorfer, 1996). Seine gefäßrelaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur venöser und arterieller Gefäße erlangt es durch die spontane Freisetzung von drei Stickoxid-Molekülen aus dem eigenen Komplex (Mitchel et al., 1997; Tschudi und Lüscher, 1996).

4.2.5 Papaverin

In unserer Versuchsreihe wurde Papaverin als letzte Substanz den Coronarringen zugeführt, um eine maximale Dilatation hervorzurufen. Diese galt der Bestimmung des basalen Dilatationsgrades. Mit der verwendeten Konzentration von 20 µl/10 ml KH wird eine maximale Dilatation des Gefäßes erreicht, welche auch durch den Einsatz höherer Konzentrationen nicht stärker wird (Fischer et al., 2004).

Papaverin wird als Extract des Rohopiums aus der Schlafmohnpflanze gewonnen (Papaver somniferum). Heutzutage wird es synthetisch hergestellt. Es gehört zu den toxischen und betäubenden Alkaloiden. Aufgrund seiner chemischen Struktur ist es lipophil und verteilt sich schnell im Fettgewebe. Papaverin wirkt relaxierend auf glatte Muskelzellen, da es in der Lage ist eine Hemmung des transmembranösen Calciumeinstroms zu bewirken. Wegen seiner gefäßerweiternden Wirkung findet es in der Humanmedizin bei einigen chirurgischen Herzeingriffen Verwendung. Papaverin hemmt die zyklische Nucleotidphosphodiesterase der Gefäßmuskelzelle und gilt als einer der potentesten PDE-Hemmer. Seine relaxierende Wirkung verursacht einen intrazellulären Anstieg der zyklischen Nucleotide cAMP und cGMP, sowie die Hemmung des Calciumeinstroms in die Zelle (Maggi et al., 2000). Bereits 1964 stellten Harsing und seine Mitarbeiter fest, daß durch eine Papaverin-Infusion in die A. renalis der Niere die strömende Blutmenge in der Niere zunimmt, jedoch die abnehmende PAH-Clearance- und Extraction, sowie die verminderte Na-Rückresorption auf die toxischen Nebenwirkungen zurückzuführen sind.

4.3 Die endothelvermittelten Dilatationsfaktoren

Funktionsfähige Endothelzellen nehmen eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus im kardiovaskulären Bereich ein. Eine gut erhaltene Funktionsrestitution ist das Ziel einer jeden Konservierung und gilt als Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation.

Zu den wichtigsten endothelialen Vasodilatoren gehören NO, PGI₂ und der „EDHF“ (He, 1999).

4.3.1 NO (Stickstoffmonoxid)

NO ist ein potenter, endogener Vasodilatator (Palmer et al., 1987), der von den Endothelzellen in den Gefäßstrombahnen produziert und freigesetzt wird. Es ist zu charakterisieren als ein kleines lipophiles Molekül, welches ungehindert durch die Zellmembran diffundieren kann (Tschudi und Lüscher, 1996). NO interagiert schnell mit Sauerstoffradikalen, Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen. Aus Interaktionen zwischen NO und Superoxid-Anionen entstehen Peroxynitrate (Seccombe et al., 1995). Solche Verbindungen sind sehr instabil, toxisch und reaktiv. Entweder werden sie zum EDCF (endothelium-derived-contraction-factor) metabolisiert oder sie lösen dessen Synthese aus.

Die zelluläre NO-Produktion erfolgt mit Hilfe der Stickstoffsynthase die enzymatisch aus der Aminosäure L-Arginin die Bildung von Citrullin, unter Abspaltung von Stickstoffmonoxid katalysiert (Rodeberg et al., 1995). Dieser Reaktionsschritt benötigt NADP (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) als Cofaktor und benutzt molekularen Sauerstoff für die Oxygenierung zu Nitrit und Nitrat. Die NO-Synthase kann grundsätzlich in drei Isoenzyme unterteilt werden:

- die konstitutive ncNOS, die sich hauptsächlich im Nervengewebe befindet
- die konstitutive ecNOS, die sich vorwiegend im Endothel befindet
- die induzierbare iNOS, die nur vorübergehend durch bakterielle Lipopolysaccharide, Tumor-Nekrose-Faktor und Interleukin-1 gebildet wird

Über die Konzentration von Calciumionen erfolgt die Regulation der endothelialen NO-Bildung. Diese bilden mit Calmodulin und der NO-Synthase einen enzymaktivierenden Komplex.

Nach Lüscher et al. (1986) wird die Aktivierung der eNOS und die Freisetzung von endotheliale Stickstoffmonoxid durch folgende Faktoren beeinflusst:

1. durch den Blutstrom (die mechanische Auslenkung von Makromolekülen an der Endotheloberfläche öffnet Calciumkanäle und aktiviert die eNOS. Der Basaltonus der Gefäße wird so über eine Autoregulation den vom Blutfluß ausgeübten Scherkräften angepasst)
2. durch Autacoide, neurohumorale Substanzen (ACH, Bradykinin, Histamine, SP, Vasopressin, Alpha₂-Agonisten)
3. durch von Plättchen freigesetzte Produkte (Serotonin, Thrombin, ADP, ATP)

4. durch Auto- bzw. parakrine Funktionen der Endothelzellen (selbstständige Bradykininproduktion mit Abgabe in den Extrazellularraum)

NO ist in der Lage durch die Membran der Endothelzelle zu diffundieren, angrenzende glatte Gefäßmuskelzellen zu erreichen und eine Relaxation hervorzurufen. Dies geschieht über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase, was zur Bildung von cGMP aus cGTP in der Muskelzelle führt (Tschudi und Lüscher, 1996). Durch den intracellulären cGMP-Anstieg kommt es zu einem Absinken der intracellulären Calciumkonzentration und in der Folge zu einer verminderten Phosphorylierung des Myosins. Dies wiederum zieht die Lösung der Brückenverbindung zwischen Myosin und Actin nach sich. Letztendlich kommt es dadurch zu einer messbaren Dilatation der Gefäßwand.

Für die kompetitive Hemmung der NO-Aktivität stehen mehrere Substanzen zur Verfügung, die entweder die Menge, die Aktivität oder die Substrate der Stickoxydsynthese negativ beeinflussen können. Als kompetitive Substrate zum L-Arginin stehen Analoga wie L-NMMA (L-Nitroarginin-Methylester), L-NAME (N_ω-Nitro-L-Arginin-Methylester) oder das im Rahmen der hier zugrundeliegenden Versuchsreihe eingesetzte L-NNA (N^G-Nitro-L-Arginin) zur Verfügung. Mittels Hemmung der NO-Synthese durch L-NNA konnten wir die Endothelfunktion anhand der NO-unabhängigen Dilatation, welche von den meisten Untersuchern auf den Hyperpolarisierenden Faktor zurückgeführt wird beurteilen (vgl. Kap. 4.3.3)

4.3.2 PGI₂ (Prostazyklin)

Das Prostazyklin gehört zur Gruppe der Prostanoiden und wird in den Endothelzellen über den Cyclooxygenase-Weg im Arachidonsäure-System gebildet. Die aus der Arachidonsäure gebildeten Signalstoffe werden unter dem Sammelbegriff Eicosanoide geführt. Sie entfalten in der Nähe ihrer Produktionsstätte ihre größte Wirksamkeit, wo sie in vivo schnell abgebaut werden. Zur Synthese der verschiedenen Eicosanoide wird die Arachidonsäure durch eine spezifische, regulierbare Phospholipase A₂ aus den Membranphospholipiden abgespalten. In einem weiteren Schritt erfolgt über die Cyclooxygenase und Peroxygenase sauerstoffabhängig die Synthese des Prostaglandins H₂ als Muttersubstanz der Prostaglandine (PG) I₂, E₂, F_{2α} sowie das Thromboxan A₂.

Das Prostazyklin bindet g-Protein-gekoppelt an IP-Rezeptoren und aktiviert als second-messenger die Adenylatzyklase mit konsekutiver Steigerung des cAMP. Es kommt folglich

zur Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration und somit zur Aktivierung der NO-Synthase, was wiederum eine Vasodilatation zur Folge hat.

Endothelzellen sind sehr reich an Prostazyklinsynthasen (Moncada et al., 1979). Eine stimulierende Bildung von Prostazyklinen in den Endothelzellen werden über die Scherkräfte des Blutstroms, durch hypoxische Zustände und durch Pharmaka, wie Acetylcholin, ATP und Bradykinin hervorgerufen (Baenziger et al., 1981; Busse et al., 1984; Lüscher et al., 1986).

PGI₂ spielt bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Der Arachidonsäuremetabolit hemmt sehr wirkungsvoll die Thrombozytenaggregation und führt darüber hinaus zur Relaxation großer coronarer Arterien und verstärkt den coronaren Fluß (Moncada, 1979). In unseren Versuchen wurde die Prostazyklinbildung stets mit Indomethacin blockiert.

4.3.3 „EDHF“ (Hyperpolarisierender Faktor)

Zur endothelabhängigen Gefäßdilatation gibt es neben der Freisetzung von NO und Prostazyklin weitere Mediatoren zur Regulation des Gefäßtonus im kardiovaskulären System. Popp et al. (1998) wiesen in ihrer Studie an isolierten Schweinecoronararterien durch die Zugabe von NO-Synthase- und Cyclooxygenase-Hemmstoffen in Form von L-NNA und Diclofenac nach, dass neben den vasoaktiven Mediatoren NO und Prostazyklin noch ein weiterer Faktor anwesend sein muß, der über eine Hyperpolarisation die glatte Muskulatur zur Dilatation bringt. Dieser hyperpolarisierende Faktor oder besser „EDR (endothelium-derived-relaxation) nach Blockade der NO-Bildung“ bewirkt über verschiedene Mechanismen die Öffnung calciumabhängiger K-Kanäle, wodurch es in kleinen Arterien zu einer Hyperpolarisation der glatten Muskulatur kommt (Félétou und Vanhoutte, 1999). Vanhoutte diskutierte in seiner Veröffentlichung von 2003 die Existenz und den Begriff des sog. „EDHF“ und war der Meinung, dass der Ausdruck „EDHF-vermittelte Antwort“ eingeschränkt werden sollte. Es handelt sich eher um verschiedene Faktoren, die überwiegend zu einer endothelabhängigen Hyperpolarisation führen bei voller Blockade der NO-Synthase und Cyclooxygenase. Diese Faktoren können durchaus über unterschiedliche Mechanismen funktionieren. So lösen beispielsweise Agonisten wie Substanz P (SP) und Bradykinin durch Aktivierung unterschiedlicher Kanäle eine endothelabhängige Hyperpolarisation der glatten Muskulatur aus (Edwards et al., 2001). Sowohl SP als auch Bradykinin bedienen sich dabei eines second-messenger-Systems und beide binden an Membranrezeptoren, die anschließend

ihre Konformation ändern. Es folgt die Bindung von GTP an das G-Protein der Innenseite der Membran. Das so aktivierte G-Protein setzt nun die Phospholipase C und die Produktion von IP₃ (Inositol 1,4,5- triphosphat) in Gang, was einen intrazellulären Calciumanstieg und die Öffnung Ca-abhängiger K-Kanäle bewirkt. Da SP und Bradykinin über den gleichen second-messenger reagieren und daraus unterschiedliche Werte bezüglich der Hyperpolarisation resultieren, muß es zwangsläufig zur Aktivierung unterschiedlicher Ca-abhängiger K-Kanäle kommen (Frieden et.al., 1999). In Versuchen von Frieden et al. (1999) mit spezifischen K-Kanal-Inhibitoren, wie Apamin und Iberitoxin wurde gezeigt, daß Bradykinin den so genannten Iberitoxin-sensitiven Ca-abhängigen BK-Kanal stimuliert. Da die Stimulation dieser Kanäle eine höhere Calciumkonzentration erfordert, ist die intracelluläre Ausschüttung bei Bradykininanwesenheit um 30 % höher als bei SP. Gleichzeitig aktiviert Bradykinin die Cytochrom P 450-Epoxygenase, die wiederum die Bildung von Epoxyeicosatriensäure (EETs) in den Endothelzellen veranlaßt. EET erhöht die Relaxation und steigert die Offenwahrscheinlichkeit der Ca-abhängigen BK-Kanäle. Zudem ist es in der Lage, über die Gap-Junctions die Hyperpolarisation an die Nachbarzelle weiterzuleiten. Früher nahm man an, daß dies der vermeintliche hyperpolarisierende Faktor sei (Hecker et al., 1994). Heutzutage weiß man, dass die EETs und/oder eine zunehmende Konzentration an extrazellulärem Kalium, sowie die myoendothelialen gap junctions lediglich eine Rolle in diesem Mechanismus spielen (Triggle und Ding, 2002). Da SP jedoch keine EET-Synthese induziert und auch nur einen kleinen Anstieg von intracellulärem Calcium verursacht, ist es nicht in der Lage, die BK-Kanäle zu öffnen. Substanz P stimuliert den sogenannten Apamin-sensitiven Ca-abhängigen SK- Kanal.

4.4 Die verwendeten Konservierungs-Lösungen

Da die Lösungen mit dem Endothel in direktem Kontakt stehen, sind sie und ihre Inhaltsstoffe von eminenter Bedeutung für die Versuche. Zu den Lösungen, die in unserer Versuchsreihe verwendet wurden, zählen die kardioplegische HTK-Lösung (Histidin- Tryptophan- Ketoglutarat), die UW-Lösung (University of Wisconsin) und die modifizierte HTK-Lösung. Die Konservierung der Coronararterien mit der modifizierten HTK-Lösung wurde zusammen mit einer Sauerstoffpersufflation als Konservierungsmethode eingesetzt.

4.4.1 Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) nach Bretschneider (Custodiol®)

Nach der hypothermen Konservierung der Coronararterien in der HTK-Lösung über 24 Stunden kam es in unseren Versuchen zu einer signifikanten Abnahme der Dilatation durch SP bezogen auf die Vorkontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ in den Gruppen, deren Coronarringe eine 60- und 180 Minuten andauernde normotherme Ischämie erfahren haben. SP löst über die NO-Synthese und den EDHF eine endothelabhängige Dilatation aus (Frieden et al. 1999). Da in diesen beiden Gruppen die Vasodilatation auf SP im Mittel 49 % betrug, mit L-NNA aber immer noch 46 % kann man davon ausgehen, daß die NO-Synthese nach der HTK-Konservierung im Endothel dieser beiden Gruppen gestört war. Die durch SP induzierte NO-Produktion stellt einen Maßstab für ungeschädigtes Endothel dar (vgl. Kap. 4.2.1), so daß man die Behauptung aufstellen kann, daß in den Gruppen nI_{60} und nI_{180} das coronare Endothel durch die 24-stündige Konservierung in der HTK-Lösung Schaden davongetragen hat. Furchgott et al. konnten bereits 1980 als Voraussetzung für die Wirksamkeit verschiedener Vasodilatoren ein intaktes Endothel identifizieren (Furchgott et al., 1980). Ein signifikanter Abfall der EDR im Vergleich zur Kontrollgruppe stellte sich in der 180-Minuten-Gruppe nach HTK-Konservierung bezüglich der Bradykinin-Gabe (5×10^{-6} mol/l) heraus. Da Bradykinin als Indikator für ein intaktes Endothel weniger sensibel ist wie beispielsweise SP (Edwards et al., 2001), läßt dieser Wert nur in Verbindung mit den anderen signifikanten Abfällen der EDRF bzgl. der 180 Minuten-Gruppe Rückschlüsse auf ein durch die HTK-Konservierung geschädigtes Endothel zu. Im Vergleich zur Gruppe nI_{60} die, wie bereits erwähnt, lediglich einen signifikanten Abfall der Dilatation nach SP-Gabe aufwies, kam es in der Gruppe nI_{180} zu einem signifikanten Abfall nach SP und Bradykinin, sowie zu einem signifikanten Anstieg der Kontraktion nach Serotonin (1×10^{-6} mmol/l). In der 120 Minuten-Gruppe ließ sich bezüglich der Kontraktion durch Serotonin (1×10^{-6} mmol/l) ein deutlicher Trend zur Verstärkung der Kontraktion von im Mittel -34 % in der Kontrolle auf -58 % nach HTK-Konservierung erkennen. Diese Werte lassen laut Ishida et al. darauf schließen, dass die Funktion des Endothels unter der Konservierung mit der HTK-Lösung negativ beeinflusst wurde. Nach seiner Ansicht ist für das Auslösen einer vasodilatatorischen Wirkung ein nur geringer Prozentsatz an funktionellem Endothel nötig, allerdings führt ein ebenso geringer Prozentsatz funktionell untergegangener Endothelzellen zu einer Vasokontraktion, der dieses Verhältnis zu dominieren in der Lage ist (Ishida et al. 2001).

Aufgrund der Tatsache, daß sich die Funktionsrestitution der Coronararterien der 180 Minuten-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe am häufigsten signifikant (SP, Bradykinin, Serotonin 1×10^{-6} mmol/l) und tendenziell (Serotonin 1×10^{-7} mmol/l, SP/L-NNA) verschlechterte, stellt sich eine Abhängigkeit der Ischämiedauer bei der HTK-Konservierung heraus.

Die HTK-Lösung, wie auch die UW-Lösung gehören aufgrund ihres niedrigen Natriumgehaltes zu den intrazellulären Konservierungslösungen. Der Vorteil der Natriumkonzentration bei den intrazellulären Konservierungslösungen (< 70 mmol/l, Jahania et al. 1999) liegt darin, dass das unter Hypothermie entstehende Risiko eines intrazellulären Ödems gesenkt wird. Dies lässt sich wie folgt erklären: unter physiologischen Bedingungen stellt die energieabhängige Natrium-Kalium-Pumpe die intrazellulär niedrige Natriumkonzentration und die hohe Kalium-Konzentration sicher. Die Kompensation des Natriumeinstroms und des Kalium-Ausstroms durch die Pumpe hat u.a. zur Folge, dass der osmotische Druck in der Zelle stabil und das Zellvolumen konstant bleiben. Als mehrstufige chemische Reaktion ist die Natrium-Kalium-Pumpe stark temperaturabhängig. Unter hypothermen/hypoxischen Bedingungen fällt das Membranpotential nach Blockade der Natrium-Kalium-Pumpe ab und die Barriere gegen die Chloridionen bricht zusammen, was eine Erhöhung der intrazellulären Chloridkonzentration zur Folge hat. Zum Ladungsausgleich strömen Natriumionen in die Zelle ein und die intrazelluläre Gesamtionenkonzentration steigt an. Folglich steigt auch der osmotische Druck, Wasser strömt ein und die Zelle schwillt an.

Der Kaliumgehalt in der HTK-Lösung mit 9 mmol/l ist extrem niedrig verglichen mit dem Kaliumgehalt von 125 mmol/l in der UW-Lösung. Ku et al. untersuchten 1997 an einem isolierten Rattenherzmodell den myocardialen Erhalt nach hypothermer HTK-Konservierung gegenüber der hypothermen Konservierung in der UW-Lösung. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass u.a. der geringere Kaliumgehalt in der HTK-Lösung zu einem besseren Erhalt der Endothelfunktion der Rattenherzen führte. Der geringe Natriumgehalt von 15 mmol/l und eine leichte Erhöhung des Kaliumgehaltes von 10 mmol/l in der HTK-Lösung führt zusammen mit einer schnellen Abkühlung zur Aufhebung der Erregbarkeit, wodurch der Zustand der Kardioplegie erreicht wird (Bretschneider et al., 1992).

Eine Reduktion der extrazellulären Natriumionenkonzentration auf intrazelluläre Konzentrationswerte (15 mmol/l) bei gleichzeitiger Absenkung der extrazellulären Kalziumionenkonzentration (10 μ mol/l) führt nach Bretschneider et al. (1980) zur Fixierung des Membranruhepotentials im polarisierten oder gering depolarisierten Zustand. Die so

konstant gehaltene Konzentration beider Ionen bewirkt eine Reduktion der elektrischen und mechanischen Aktivität und somit die Induktion der Kardioplegie.

Es bestehen weitere wesentliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung gegenüber der UW-Lösung. Eine protektive Rolle übernimmt das Histidin und das Histidinchlorid. Deren Pufferfähigkeit wird in zahlreichen Studien bestätigt (Sumimoto und Kamada, 1991; Beauvieux, 1993). Ein Zustand des Energiemangels durch zu geringe Sauerstoffzufuhr, wie er bei der normothermen Ischämie vorliegt, führt zu einer Steigerung der anaeroben Glykolyse und somit zu einer Laktatanhäufung, die wiederum eine Acidose nach sich zieht. Insbesondere durch die Pufferung der Metaboliten der anaeroben Glykolyse erhöht die Aminosäure Histidin die Aktivität der Phosphorylase-Enzyme und erreicht damit eine erhöhte ATP-Konzentration im Gewebe (Takeuchi und Takashima, 1995). Mannit, als weiterer Bestandteil der HTK-Lösung, dient zum einen als Radikalfänger und zum anderen schützt es die Zelle vor einer Zellschwellung. Es trägt zur Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichts zwischen dem Intra- und Extrazellularraum bei und reduziert so den Wassereinstrom in die Zelle (Bretschneider, 1992).

Tryptophan ist ein physiologischer Baustoff der Zellmembran. Aufgrund seiner amphophilen und dipolaren Eigenschaft tritt er vorzugsweise an Membranschnittstellen auf und erfüllt damit eine wichtige Funktion der Membranstabilisierung. Ketoglutarat dient seinerseits als Substrat für den Energiestoffwechsel unter anaeroben Bedingungen.

4.4.2 University of Wisconsin-Lösung (UW, Viaspan®)

Zu den in unseren Versuchen eingesetzten kardioplegischen Konservierungslösungen gehörte neben der HTK-Lösung auch die UW-Lösung. Anhand der verschiedenen gemessenen Parameter konnten wir nachweisen, daß die endotheliale Funktion nach 24-stündiger UW-Konservierung sowohl nach 60 Minuten, als auch nach 180 Minuten normothermer Ischämie tendenziell bessere Ergebnisse vorzuweisen hatte, als nach der Konservierung in der HTK-Lösung. Dies kann man anhand der unterschiedlichen Dilatationswerte, bezogen auf die Präkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$, durch SP und der Serotoninindilatation und -kontraktion (1×10^{-7} mol/l, 1×10^{-6} mol/l) erkennen (vgl. Kapitel 3.3.2, Abb. 5, 12-14 und Kap. 3.3.4, Abb. 27, 34-36). Abweichend von dieser Tendenz ist der Dilatationswert, der durch Bradykinin (5×10^{-6} mol/l) in der Gruppe 60 Minuten normotherme Ischämie hervorgerufen wurde. Hier spricht die Tendenz eher für eine bessere Funktion nach Konservierung in der HTK-Lösung (vgl.

Kap. 3.3.2, Abb. 9 und Kap. 3.3.4, Abb.31). Zu einem signifikanten Abfall der Kontraktion durch Serotonin (1×10^{-6} mol/l) im Vergleich zur Kontrolle, kam es bei den Coronarringen mit 60 Minuten normothermer Ischämie und anschließender Lagerung in der UW-Lösung. Vergleicht man hier allerdings das Kurvendiagramm der 60-Minuten Gruppe mit dem Kurvendiagramm der 120- und 180-Min. Gruppe (vgl. Kap. 3.3.4, Abb. 34-36), so erkennt man den nur geringen Unterschied zu den Werten innerhalb dieser Gruppen. Von daher kann man hier eher von einem Zufallsbefund ausgehen, der aber einen weiteren Hinweis auf eine bessere Endothelfunktion nach der Konservierung in der UW-Lösung im Vergleich zur HTK-Konservierung gibt. Eine Abhängigkeit der Endothelfunktion von der Ischämiedauer konnte bei dieser Konservierungslösung nicht ausgemacht werden. Abschließend kann man festhalten, daß die UW-Konservierung für Coronararterien mit 180-minütiger normothermer Ischämie besser geeignet ist, als die Konservierung in der HTK-Lösung, da diese bei steigender Ischämiezeit schlechtere Ergebnisse aufweist, auch wenn diese nur Tendenzen und keine Signifikanzen angeben.

Die UW-Lösung weist eine Hyperkaliämie mit einer Konzentration von 125 mmol/l auf. Durch die unphysiologische Erhöhung des Gehaltes an extrazellulären Kaliumionen kommt es zur Blockade der schnellen Natriumkanäle und langsamen Kalziumkanäle. Mit dem Ausgleich des Innen-Außengradienten des Membranruhepotentials reduziert sich die Erregbarkeit der Myokardzelle. Dies führt zum einen zu einem schnellen Herzstillstand und einem damit verbundenen niedrigen Energieverlust, zum anderen führt es aber auch zu einer Beeinträchtigung der Funktion des Endothels. In einer Studie von He und Yang (1998), in der die Lagerung der Coronararterien von Schweinen unter hypothermen (4°C) und hypoxischen und unter normothermen (37°C) und normoxischen Bedingungen in einer UW-Lösung erfolgte, kam es bereits nach einer Stunde sowohl unter Normo-, als auch Hypothermie zu einer drastischen Abnahme der durch den hyperpolarisierenden Faktor bedingten Relaxation. He und Yang zufolge lag dies an der hohen Kaliumkonzentration in der UW-Lösung, die eine Hemmung der K-Kanäle mit sich führt. Daraus resultiert eine länger anhaltende Depolarisation des Membranpotentials der glatten Muskulatur, woraufhin die Vasodilatation durch den EDHF (Hyperpolarisierender Faktor) beeinträchtigt wird (He und Yang, 1998). Eine ödemhemmende Wirkung der UW-Lösung ergibt sich aus dem Zusatz von Laktobionaten und Raffinose, die aufgrund ihrer Molekülgröße nur langsam in die Zelle diffundieren. Desweiteren wurde zur Vermeidung eines Zellödems der Natriumgehalt auf 30 mmol/l festgelegt (vgl. Kap. 4.4.1). Darüberhinaus enthält die UW-Lösung verschiedene Phosphationen, die der Pufferung von Hydroxoniumionen dienen. Als reduzierendes

Antioxidans wurde der Lösung Glutathion beigefügt, welches man physiologisch auch als Bestandteil in Zellmembranen wiederfindet und dort hauptsächlich der Entgiftung von Peroxiden dient. Glutathion reduziert Oxidantien, wie freie Radikale, Lipidperoxidasen und Wasserstoffperoxide (Freeman et al., 1982). Der Inhaltsstoff Allopurinol hemmt die Xanthinoxidase (He und Yang, 1998). Besonders nach Ischämie beobachtet man eine starke Zunahme der Xanthinoxidase-Aktivität (Udilova, 1999). Diese oxidiert unter Bildung eines Superoxidradikals Xanthin zu Harnsäure.

4.4.3 Modifizierte HTK-Lösung (m-HTK) und Sauerstoffpersufflation (COP, coronary oxygen persufflation)

Die in unserer Versuchsreihe erzielten Ergebnisse der Endothelfunktionen nach der Konservierung in m-HTK-Lösung mit der coronaren Sauerstoffpersufflation fielen tendenziell besser aus, als die mit der Konservierung in der HTK- und der UW-Lösung. Dies galt hauptsächlich für die Coronararterien, die vor der Konservierung einer 120- und 180-minütigen Ischämie ausgesetzt waren. Bei den Coronarringen, die vor der m-HTK+COP-Konservierung eine 180-minütige Ischämiedauer erfuhren, konnte bei der Serotoningabe (1×10^{-7} mol/l) ein signifikanter Dilatationsanstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen werden. In der 120 Minuten-Gruppe konnte bei gleicher Konservierung ein signifikanter Anstieg der Kontraktion durch Serotonin (1×10^{-6} mol/l) gegenüber der Kontrolle gemessen werden (vgl. Ishida et al. 2001, Kap.4.4.1). Zieht man Rückschlüsse aus der Betrachtung der signifikanten Unterschiede, so zeigen diese Werte keine Abhängigkeit von der unterschiedlich langen Vorschädigung der Coronararterien durch die normotherme Ischämie. Allerdings liegt hier der Trend zu besseren Mittelwerten, ausgenommen der Serotoninkontraktion in der 60-Minuten Gruppe, bei den steigenden Ischämiezeiten (s. Kap.3.3.3, Abb. 26). Im Vergleich hierzu geben die nach der HTK-Konservierung hohen Kontraktions- und niedrigen Dilatationswerte (Serotonin 1×10^{-7} mol/l und 1×10^{-6} mol/l) aller drei Gruppen (60, 120 und 180 Min. normotherme Ischämie) Grund zur Annahme, daß eine Endothelschädigung im Vergleich zur UW- und m-HTK+COP-Konservierung stattgefunden hat.

In unserer Studie hat sich bestätigt (s. Kap.3.3.3, Abb. 38-40), dass im Falle steigender Ischämiezeiten die Oxygenierung durch die Sauerstoffpersufflation während der hypothermen Konservierung in der m-HTK-Lösung von besonders großer Bedeutung ist. Mithilfe dieser

Konservierungstechnik lässt sich die Funktionsfähigkeit des coronaren Endothels erhalten, sowie die Endothelfunktion vorgeschädigter Coronararterien verbessern.

Die Modifikation der HTK-Lösung besteht aus dem Zusatz der Substanzen Hyaluronidase, Adenosin, Calciumchlorid und 2,3-Butandion Monoxim (BDM).

Die Hyaluronidase gehört zu den lysosomalen Hydrolasen und ist in der Lage Glycosaminoglycane, wie die Hyaluronsäure, zu spalten. Durch die Trennung der Verbindung der Hyaluronsäuremoleküle mit den Proteoglycanen wirkt sie dessen hydrophilem Charakter entgegen und verhindert so die Ödembildung im cardialen Interstitium. In einem Versuch von Fischer und Jeschkeit (1996), in dem der Einfluß der Hyaluronidase als Zusatz in die HTK- oder UW-Lösung untersucht wurde, konnte eine Verbesserung der coronaren Durchblutung während der Blutreperfusion von Rattenherzen erreicht werden, nachdem sie für 18 Stunden bei 0-1°C in einer mit 40 mg/l Hyaluronidase angereicherten HTK- oder UW-Lösung gelagert wurden.

Die kardioprotektive Eigenschaft des Nucleosids Adenosin kommt hauptsächlich in der Reperfusion zum Tragen. Aus Adenosin werden durch die Enzyme der Nucleotid-Neosynthese bei Vorliegen von ausreichend Energie Adeninnucleotide wie ATP aufgebaut. Somit trägt Adenosin zu einem vermehrten Energieaufbau im Myocard mit bei. Daraus würde eine bessere Kontraktion der Gefäßmuskulatur resultieren, was sich in unseren Versuchen aber eher als Nachteil erweisen würde. Adenosin ist zudem ein potenter Vasodilatator. Mit dem Zusatz von Calciumchlorid in die modifizierte HTK-Lösung soll ein sogenanntes Calciumparadox verhindert werden, welches seinen Namen durch Zimmermann und Hülsmann nach ersten Forschungsergebnissen aus dem Jahr 1966 erhielt. Das Calciumparadox stellt ein gefürchtetes Phänomen nach der Reperfusion mit calciumfreier normothermer Lösung dar, welches den Zerfall intrazellulärer Strukturen durch Herauslösung von Calciumionen aus diesen zur Folge hat. Durch eine erste calciumfreie Perfusion wird das vorhandene Calcium aus dem Extracellularraum herausgespült, was zu einer enormen Schwächung der Zellverbände führt. Eine anschließende calciumhaltige Reperfusion bewirkt eine Kontraktion, die die vorher geschwächten Zellverbände sowie die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums zerstört. Zudem findet aufgrund der Ischämie im Gewebe eine Elektrolytverteilung statt. Durch die Reperfusion kommt es zur Resynthese von ATP und Erhöhung des intracellulären Calciums, was wiederum eine schädigende Kontraktion nach sich zieht. Um einem Calciumparadox zu entgehen sollte ein Zusatz von 50 µmol/l Calcium nicht unterschritten werden (Altschuld et al., 1991).

BDM (2,3-Butandion-Momoxim) gehört zur Gruppe der Oxime und trägt durch eine reversible Desensitivierung des myokardialen kontraktile Apparates für Calcium zu einer verbesserten Funktionsrestitution von Herzen nach Kardioplegie bei (Vahl et al., 1995). BDM hemmt die Aktomyosin-ATP-ase-Aktivität sowie die mitochondriale oxydative Phosphorylierung in der Zelle als Folge der Kalziumwirkung, so dass es zu keiner Ausbildung von Aktin-Myosinbrücken kommt und entsprechend eine Kraftentwicklung verhindert wird (Gwathmey et al., 1991). Der kardioprotektive Effekt des BDM kommt hauptsächlich in der Reperfusion zum Tragen. Wie bereits erwähnt kann sich zu Beginn der Reperfusion -dem Wiedereinsetzen des Coronarflusses- eine Kontraktur der Myofibrillen mit anschließender Zytolyse der Myocardzellen entwickeln. Diese Zellschädigung beruht auf einer Re-Energetisierung der Zelle und wird als „oxygen paradox“ bezeichnet (Schlüter et al., 1991). Durch den Zusatz von BDM in der Kardioplegie-Lösung kann dieses Phänomen verhindert werden.

Von entscheidender Bedeutung hinsichtlich der Verwendung der m-HTK-Lösung dieser Versuchsreihe ist die Coronare Sauerstoffpersufflation (COP). Bei ischämisch vorgeschädigten Organen ist der Sauerstoffvorrat schnell aufgebraucht. Durch die Sauerstoffpersufflation kann der Energiebedarf während der hypothermen Lagerung jedoch soweit gedeckt werden, dass die Schädigung durch die hypotherme Ischämie reduziert und eine verbesserte Funktionsrestitution erreicht werden kann (Isselhard und Minor, 1999). Die Verbesserung der Funktionsrestitution durch coronare Sauerstoffpersufflation konnte bereits in einigen Versuchen gezeigt werden. So untersuchten Fischer et al. (1978) erstmals die Funktionsrestitution 30 Minuten warmischämisch vorgeschädigter Nieren nach einer 24-stündigen hypothermen Konservierung mit Sauerstoffpersufflation. Die retrograd über das Venensystem durchgeführte Sauerstoffpersufflation (retrograde oxygen persufflation = ROP) erfolgte während der gesamten Konservierungsdauer. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich dieses Verfahren positiv auf die Funktionsrestitution der Nieren auswirkte.

Die Sauerstoffpersufflation der Coronararterien während der hypothermen Lagerung in der m-HTK-Lösung stellt einen wichtigen Aspekt für den Funktionserhalt eines Organs dar. Die Fähigkeit eines Organs, trotz Hypothermie die Konzentration an energiereichen Phosphaten (ATP, CP, ECP) aufrechtzuerhalten, zeigten die Erfolge in Versuchen von Fischer et al. (1998). Es konnte gezeigt werden, dass die Endothelfunktion isolierter Schweineherzen nach einer 14-stündigen hypothermen Lagerung in der m-HTK-Lösung (0-1°C) bei gleichzeitiger Sauerstoffpersufflation keine Einbußen erlitten und sich als voll funktionstüchtig erwiesen. Im Jahr 2003 kam die Arbeitsgruppe um Fischer zu ähnlichen Ergebnissen. Sie setzten die

Schweineherzen einer 16-minütigen normothermen Ischämie aus, um sie anschließend für 3,3 Stunden in hypothermer m-HTK-Lösung zu persufflieren. Hieraus resultierte nach orthotoper Transplantation der Schweineherzen eine optimale Wiedererlangung der Endothelfunktion (Yotsumoto et al., 2003).

Die ermittelten Daten (vgl. Kap.3.3.4, Abb.38-40) sprechen dafür, daß nach einer 24-stündigen, hypothermen m-HTK+COP-Konservierung die endotheliale Funktion der Coronararterien von Schweinen tendenziell besser erhalten bleibt als nach einer 24-stündigen, hypothermen Konservierung in HTK- und UW-Lösung, besonders nach längerer Dauer der Vorschädigung durch die normotherme Ischämie. Die Lagerung der Coronararterien in der HTK-Lösung weist nach längerer Ischämiedauer die schlechtesten Funktionsergebnisse gegenüber den beiden anderen Lagerungsgruppen auf. Jedoch erweist sich die UW-Lösung bezogen auf die endotheliale Funktion gegenüber der Lagerung in der HTK-Lösung besonders nach längeren Ischämiezeiten trendmäßig als besser geeignet. Die genannten Unterschiede weisen allerdings keine Signifikanzen auf, sondern stützen sich auf den Trend der besseren Mittelwerte.

4.5 Diskussion der Immunhistochemischen Untersuchung

In unserer Versuchsreihe konnte in der Gruppe Argon HTK eNOS, d.h. coronare Endothelzellen die eine 180-minütige Ischämie durch Argonbegasung und eine anschließende 24-stündige Lagerung in HTK-Lösung erfahren haben, in der immunhistochemischen Untersuchung eine signifikant stärkere Färbung der gesamten Endothelzelle gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden (vgl. Kap. 3.3.5, Abb.42). Anhand dieser Färbung lässt sich die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase-Aktivität nachweisen. Da ein Antikörper verwendet wurde, der die translokierte und aktivierte eNOS nachweist (Bloch et al., 2000), kann man davon ausgehen, dass die 24-stündige Konservierung in der HTK-Lösung zu einer verstärkten eNOS-Aktivierung geführt hat. Dies kann laut Bloch et al. (2000) ein Hinweis für die ischämische Schädigung eines Gewebes sein. Dieses Ergebnis stimmt mit den bisher ermittelten Erkenntnissen überein, dass eine längere Ischämiedauer und eine anschließende 24-stündige HTK-Konservierung zu einer stärkeren Schädigung des Endothels führen. Die Beurteilung, ob die eNOS-Aktivierung eher ein Schädigungszeichen oder eine notwendige physiologische Reaktion ist, hängt sehr stark vom Gewebe und der Ausgangssituation ab.

Daher ist dies kein Widerspruch zu den bisher erlangten Ergebnissen in der Funktionsprüfung des coronaren Endothels mittels unterschiedlicher Pharmaka. Hier galt der Nachweis von NO als Zeichen einer guten Funktionsrestitution und damit für einen guten Erhalt des Endothels. Bloch et al. veröffentlichten 2000 eine Studie über den Zusammenhang myocardialer Ischämie/Reperfusion und der damit veränderten endothelialen NO-Synthase-Aktivität an einem isolierten und perfundierten Rattenherzmodell sowie am humanen, linksventrikulären Myocard. Ziel obiger Studie war es herauszufinden, ob der alleinige Nachweis von eNOS von ihrer Aktivität abhängt. Es erfolgte der Nachweis der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase u.a. durch die Immunhistochemie mit Antikörpern, die jeweils spezifisch für die endotheliale NO-Synthase waren. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichten, dass myocardiale Ischämie/Reperfusion einen Stimulus für die Zunahme der eNOS-Aktivität darstellt, die wiederum eine Zunahme der NO-Bildung mit sich führt. Es wurde bewiesen, dass der immunhistochemische Nachweis der eNOS ein nutzbarer Hinweis zur Erkennung von vorgeschädigtem Myocard darstellt (Bloch et al., 2000).

Die Expression der NO-Synthase ist in der Literatur für verschiedene Organe belegt. In der Versuchsreihe von Vossoughi et al. (2006) wurde am Modell der gallengangsligierten Ratte untersucht, in welcher Weise bzw. in welchem Ausmaß die NOS-Expression aller NO-Synthase-Isoformen unter den Bedingungen einer obstruktiven Cholestase verändert wurde.

In unseren Versuchen konnten wir durch die immunhistochemische Färbung der Endothelzellen mit spezifischen Antikörpern die Anwesenheit der NO-Synthase am stärksten in der Gruppe Argon HTK PeNOS^{Ser 1177} nachweisen (vgl. Kap.3.3.5, Abb.42-45). Es ist zu erwähnen, dass diese Ergebnisse keinerlei Signifikanzen sondern lediglich einen Trend aufweisen. Der Phospho-eNOS-Antikörper bindet an die Phosphoserine auf Position 1177 der eNOS, wobei die Phosphorylierung am Ser 1177 zu einer Veränderung der Aktivität der NO-Synthase führt und daher Hinweis auf die Aktivität der eNOS gibt.

Weiterhin wurden in unseren Versuchen zum Nachweis von oxidativem Stress geeignete Reaktionsprodukte freier Radikale, wie Nitrotyrosin und 8-Isoprostan immunhistochemisch nachgewiesen. Werden Zellen durch freie Radikale geschädigt, so nennt man dies oxidativen Stress. Freie Radikale sind sehr reaktive, instabile Atome oder Moleküle. Der Begriff „Reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) stellt einen Sammelbegriff solcher freien Radikale dar. Sie wirken stark zytotoxisch und können die Zellen auf vielfältige Weise schädigen. Der direkte Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit nicht möglich. Allerdings kann man durch die Bestimmung der Abbauprodukte wie Nitrotyrosin und 8-Isoprostan einen oxidativen Status erheben. Tossios et al. (2004) konnten in ihren

Untersuchungen zeigen, dass Nitrotyrosin und 8-Isoprostaglandin-F_{2α} geeignet sind, ROS-bedingte myocardiale Schäden nach Ischämie/Reperfusion bei herzchirurgischen Patienten nachzuweisen.

Die in unserer Studie immunhistochemisch ermittelten Nitrotyrosinerhöhungen fanden sich in der Gruppe Argon Nitrotyrosin am stärksten wieder, was sich in einer signifikant stärkeren Färbung der Endothelzellen gegenüber der Kontrollgruppe zeigte (vgl. Kap. 3.3.5, Abb.42). Die Nitrierung von Tyrosinresten in Proteinen wird von freien Radikalen wie Peroxynitrit verursacht und führt zur Bildung von 3-Nitrotyrosin. Nitrotyrosin kann, wie schon erwähnt als stabiles Produkt nachgewiesen werden und wird deshalb als Marker für oxidativen Stress angesehen. In einer experimentellen Studie der Arbeitsgruppe Kalns et al. (2000) konnte in einem Rattenversuch nach einer Mikrowellen-Exposition systemisch oxidativer Stress durch die 3-Nitrotyrosin Anreicherung im Gewebe der Organe nachgewiesen werden.

In unserer Studie wurde die Anwesenheit von 8-Isoprostan ebenfalls mittels der Immunhistochemie nachgewiesen. In der Gruppe Argon 8-Iso konnten wir im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutlich stärkere immunhistochemische Färbung der Endothelzellen ermitteln als in den anderen beiden Gruppen (vgl. Kap. 3.3.5, Abb.42-45). Allerdings wiesen keine dieser Ergebnisse Signifikanzen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Morrow et al. berichteten 1990 zum ersten Mal über Prostaglandin ähnliche Verbindungen, die in vivo unabhängig von der Prostaglandin H Synthase (PGHS) hergestellt werden. Stattdessen erfolgt die Herstellung über eine nicht-enzymatisch katalysierte Lipidperoxidation der Arachidonsäure mittels freier Radikale und reaktiven Sauerstoffspezies. Durch die Zugabe von Aspirin und Indomethacin bewiesen Dworski et al. (1999) den nicht PGHS-katalysierten Syntheseweg dieser Verbindung, da die Synthese nicht gehemmt werden konnte.

Durch den Nachweis der signifikanten Nitrotyrosinerhöhung und der Tendenz zur 8-Isoprostanerhöhung in der Argongruppe ist anzunehmen, dass die coronaren Endothelzellen durch die 180-minütige Argonbegasung oxidativen Stress und damit einhergehende Zellschädigung erlitten.

Die IHC-Kontrollen (siehe Kap. 3.3.5, Abb. 41), die in dieser Studie der Negativkontrolle entsprachen, galten dem Ausschluss falsch positiver Ergebnisse und waren für deren Interpretation unverzichtbar.

5. Zusammenfassung

Julia Naglo-Dünner

Einfluß normothermer Ischämie mit nachfolgenden unterschiedlichen hypothermen Konservierungen auf die endothelabhängige Relaxation der epicardialen Coronararterien des Schweins.

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen der hypothermen Konservierung mit unterschiedlichen Konservierungslösungen und nach unterschiedlich langer Vorschädigung der Coronararterien durch normotherme Ischämie auf die Funktionsrestitution des Endothels zu untersuchen.

Als Konservierungslösungen wurden für diese Studie die weit verbreitete kardioplegische HTK-Lösung, die UW-Lösung sowie die modifizierte HTK-Lösung (m-HTK) verwendet. Die Modifikation der m-HTK-Lösung bestand aus dem Zusatz der Substanzen Hyaluronidase, Adenosin, Calciumchlorid und 2,3-Butandion Monoxim (BDM). Die m-HTK-Lösung wurde bei gleichzeitiger Anwendung der coronaren Sauerstoffpersufflation (m-HTK+COP) eingesetzt. Die getesteten Coronargefäßringe wurden vor Beginn der Konservierung einer normothermen Ischämie ausgesetzt. Die Ischämiezeiten betragen 60, 120 und 180 Minuten. Die anschließende Konservierung erfolgte unter hypothermen Bedingungen (0-1°C) über den protrahierten Zeitraum von 24 Stunden.

Die endotheliale Funktionsrestitution wurde anhand der Stimulation des Endothels zur Produktion vasodilatatorischer Stoffe überprüft. Hierzu wurden folgende Substanzen eingesetzt: Substanz P, Bradykinin und Serotonin. Zu Beginn der Testung wurde eine Schädigung der glatten Gefäßwandmuskulatur aller Coronararterien unabhängig vom Zustand des Endothels dadurch ausgeschlossen, dass durch Kaliumchlorid eine gute Kontraktion hervorgerufen werden konnte. Die Testsubstanzen bewirkten auf unterschiedlichem Wege die endotheliale Freisetzung vasodilatativer Substanzen (NO, Prostazyklin und EDHF). Als Maß für die Überprüfung der Funktionsrestitution des Endothels diente die Dilatation der Coronararterien durch die jeweils verabreichte Substanz, in Relation zur Präkontraktion durch Prostaglandin F_{2α}. Das Ausmaß des endothelialen Schadens wurde anhand der unterschiedlichen Dilatationsstärken ausgemacht. Vergleichend wurden Gefäßdilatationen durch direkt auf die

Gefäßmuskulatur relaxierend wirkende Substanzen (Sodiumnitroprussid und Papaverin) provoziert.

Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Untersuchung an humanen coronaren Endothelzellen durchgeführt. Durch die immunhistochemische Färbung der Endothelzellen mit spezifischen Antikörpern konnten die Anwesenheit der NO-Synthase, sowie die Reaktionsprodukte freier Radikale, wie Nitrotyrosin und 8-Isoprostan nachgewiesen werden. Die endotheliale Ischämie wurde durch eine 180-minütige Argonbegasung hervorgerufen. Zudem wurden Zellen die mit Argon begast wurden für 24 Stunden bei 0-1°C in eine HTK-Lösung verbracht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die endotheliale Funktionalität der Coronararterien der Kontrollgruppen nach 60, 120 und 180-minütiger normothermer Ischämie gut erhalten war. Jedoch zeigten sich bezüglich der endothelialen Funktionsrestitution deutliche Unterschiede in den verschiedenen Konservierungslösungen nach 24-stündiger hypothermer Lagerung. Die signifikant schlechtesten Funktionsergebnisse, insbesondere nach längeren Ischämiezeiten wiesen die Coronararterien nach Konservierung in der HTK-Lösung auf. Ein tendenziell besserer Erhalt der endothelialen Coronararterienfunktion zeigte sich nach der Konservierung mit der UW-Lösung. Im Falle steigender Ischämiezeiten stellte sich, wenn auch nur als Trend zu besseren Mittelwerten die Konservierung der Coronararterien mittels m-HTK+COP als am besten geeignet dar.

Durch die immunhistochemische Färbung der humanen coronaren Endothelzellen konnte eine ischämische Schädigung des Endothels durch die alleinige 180-minütige Argonbegasung und durch die 180-minütige Argonbegasung mit anschließender 24-stündiger Konservierung in der HTK-Lösung festgestellt werden.

Diese Studie zeigt, dass bei steigenden Ischämiezeiten die 24-stündige hypotherme Lagerung in der modifizierten HTK-Lösung zusammen mit der coronaren Sauerstoffpersufflationstechnik im Vergleich zur HTK- und UW-Lösung die Funktionsfähigkeit des coronaren Endothels am besten erhält, sowie die Endothelfunktion nach 180-minütiger Vorschädigung mittels normothermer Ischämie zu verbessern in der Lage ist. Die UW-Lösung erweist sich, bezogen auf die endotheliale Funktion gegenüber der Lagerung in der HTK-Lösung besonders nach längeren Ischämiezeiten als besser geeignet.

6. *Summary*

Julia Naglo-Dünner

The influence of normothermic ischemia with subsequent variable hypothermic preservations on the endothelium-dependent relaxation of the epicardial coronary arteries of the pig.

The aim of this study was to examine the effects of hypothermic preservation on the restitution of endothelial function of the coronary arteries using different types of preservation with a preceding damage by normothermic ischemia of 1-3 hours.

In this study, the widely-used cardioplegic HTK solution, the UW solution as well as modified HTK solution (m-HTK) were used as preservation solutions.

The modification of the m-HTK solution consisted in adding the substances hyaluronidase, adenosine, calcium chloride and 2,3-Butanedione monoxime (BDM). The m-HTK solution was used in combination with coronary oxygen persufflation (m-HTK+COP). The coronary artery rings tested were exposed to normothermic ischemia prior to preservation. The duration of ischemia was 60, 120 and 180 minutes. The subsequent preservation was performed under hypothermic conditions (0-1°C) over a protracted time span of 24 hours.

Endothelial restitution of function was then examined by provoking endothelial production of vasodilatory substances. The following substances were used for that purpose: Substance P, bradykinin and serotonin. At the beginning of the examination, damage of the smooth muscle tissue of all coronary arteries was ruled out by proving a contraction caused by potassium chloride. The test substances caused the endothelial release of vasodilative substances (NO, prostacyclin and EDHF) in various ways. The dilatation of the coronary arteries induced by the test substances relative to the precontraction caused by $\text{PGF}_{2\alpha}$ was used as the measure of restitution of coronary endothelial function. The degree of dilatation served as measure of endothelial damage. For comparison specific smooth muscle relaxing substances like sodium nitroprusside and papaverine were used to provoke vasodilatation.

In addition an immunohistochemical examination of human coronary arterial endothelial cells (HCAECs) was carried out. Through immunohistochemical staining of the endothelial cells with antibodies against specific epitopes it was possible to confirm the presence of nitric oxide synthase (eNOS) as well as the reaction products of free radicals such as nitrotyrosine and 8-isoprostane. Endothelial ischemia was induced by exposure to argon for 180 minutes.

Furthermore, cells that had been exposed to argon were preserved in a 0-1°C HTK solution for 24 hours.

The results show that the endothelial functionality of the coronary arteries of the control group after normothermic ischemia lasting 60, 120 and 180 minutes was well-preserved. However, large differences in endothelial restitution of function could be observed across the various preservation solutions after hypothermic storage lasting 24 hours. The significantly worst results, especially after ischemia of longer duration, were shown by the coronary arteries preserved in HTK solution. A tendency towards better preservation of endothelial coronary function was shown after preservation in UW solution. In case of longer ischemia periods, preservation of the coronary arteries via m-HTK+COP proved to be the best method, although only as a trend towards better arithmetic means.

Through the immunohistochemical staining of the human coronary arterial endothelial cells it was possible to detect ischemic damage to the endothelium caused by 180-minute exposure to argon alone as well as 180-minute exposure to argon plus subsequent 24-hour storage in HTK solution.

This study shows that, with increasing periods of ischemia, the 24 hour hypothermic preservation in modified HTK solution in combination with the coronary oxygen persufflation technique is more effective for the preservation of functionality of the coronary endothelium than the HTK and UW solution, and that it is also able to improve endothelium functionality after coronary damage following 180 minutes of normothermic ischemia. The UW solution proves to be the more effective one with respect to endothelial functionality when compared to simple ischemic storage in HTK solution, especially after prolonged periods of ischemia.

7. *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: 134-139.

Altschuld R. A., Ganote C. E., Nayler W. G., Piper H. M. (1991):

What constitutes the calcium-paradox?

J. Mol. Cell. Cardiol. 23: 765-767

Altura B. M. und Chand N. (1981):

Bradykinin-induced relaxation of renal and pulmonary arteries is dependent upon intact endothelial cells.

Br J Pharmacol 74(1): 10-11

Baenziger N. L., Fogerty F. J., Mertz L. F., Chernuta L. F. (1981):

Regulation of histamine-mediated prostacyclin synthesis in cultured humanvascular endothelial cells.

Cell 1981; 24: 915-923

Barnard C. N. (1967):

A human cardiac transplant: an interim report of successful operation performed at Groote Schuur Hospital, Capetown.

S. Afr. Med. J. 4, 127-135

Belzer F. O. und Southard J. H. (1988):

Principles of solid-organ preservation by cold storage.

Transplantation 45: 673-676

Belzer F. O., D'Alessandro A. M., Hoffmann R. M., Knechtle S. J., Reed A., Pirsch J. D.,

Kalayoglu M., Sollinger H. W. (1992):

The use of UW-solution in clinical transplantation. A 4-year experience.

Ann Surg. 215 (6): 579-585

Bloch W., Mehlhorn U., Krahwinkel A., Reiner M., Dittrich M., Schmidt A., Addicks C. (2000):

Ischemia Increase Detectable Endothelial Nitric Oxide Synthase in Rat and Human Myocardium.

Biology and Chemistry Vol. 5, No. 4, pp. 317-333 (2001)

Bretschneider H. J. (1980):

Myocardial protection.

Thorac. Cardiovasc. Surgeon 28, 295-302

Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Bretschneider H. J. (1992):

Organübergreifende Prinzipien zur Verlängerung der Ischämietoleranz.

Jahrbuch der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina (R.3) 37, 161-174

Bönner G. und Chrosch R. (1994):

Kinine und ACE-Hemmer.

München, Arcis Verlag: 1-51

Borel J. F., Feurer C., Magnee C., Stähelin H. (1977):

Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals.

Immunology 32, 1017-1025

Bosse M., Dahnken S., Fischer J. H. (2002):

Preserved endothelial function of large and small coronary vessels after prolonged storage including coronary oxygen persufflation.

Eur Surg Res 34 (Suppl. 1), 21 and

Proceedings 37th Congress ESSR, Monduzzi Editore, Bologna, 209-217

Busse R., Foerstermann U., Matsuda H., Pohl U. (1984):

The role of prostaglandins in the endothelium-mediated vasodilatory response to hypoxia.

Pflügers Arch 1984; 401: 77-83

Busse R., Fisslthaler B., Fleming I. (2000):

NO ist nicht alles; EDHF: Renaissance der endothelialen Eicosanoide.
Physiol. 14, 13-23

Cleveland R. J. und Lower R. R. (1967):

Transplantation of canine cadaver hearts after short-term preservation.
Transplantation 5, No. 4: 904-908

Cocks T. und Angus J. (1983):

Endothelium-dependent relaxation of coronary arteries by noradrenalin and serotonin.
Nature 305: 627-630

Crick S. J., Sheppard M. N., Ho S. Y., Gebstein L., Anderson J. H. (1998):

Anatomy of the pig heart; comparison with normal human cardiac structure.
J. Anat. 139 (Pt 1), 105-119

D'Alessandro A. M., Hoffmann R. M., Knechtle S. J., Odorico Y. T., Becker A., Musat J., Pfirsch D., Sollinger H. W., Kalayoglu M. (2000):

Liver Transplantation from controlled non-heart-beating donors.
Surgery 128, 579-588

Dendorfer A. (1996):

Pharmakologie der Nitrate und anderer NO-Donatoren.
(Pharmacology of nitrates and other NO donors.)
Herz 21, (Suppl 1): 38-49.

Dusting G. J., Moncada S., Vane J. R. (1977):

Prostacyclin (PGX) is the endogenous metabolite responsible for relaxation of coronary arteries induced by arachidonic acid.
Prostaglandins 13, No. 1, 3-15

Dworski R., Murray J. J., Roberts L. J., Oates J. A., Morrow J. D., Fisher L., Sheller J. R. (1999):

Allergen-induced synthesis of F₂-isoprostanes in atopic asthmatics.

Am. J. Respir. Crit.Care Med. 160: 1947-1951

Edwards G., Félétou M., Gardener M. J., Glen C. D., Richards G. R., Vanhoutte P. M., Weston A. H. (2001):

Further investigations into the endotheliumdependent hyperpolarizing effects of bradykinin and substance P in porcine coronary artery.

Br J Pharmacol 133: 1145-1153.

Ellwood A. J. und Curtis M. J. (1997):

Involvement of 5-HTA (Bradykinin 1/1D) and 5-HTA2A-receptors in 5-HTA-induced contraction of endothelium-denuded rabbit epicardial coronary arteries.

Br. J Pharmacol 122: 875-884

Félétou M. und Vanhoutte P. M. (1999):

The alternative: EDHF.

J Mol Cell Cardiol 31 (1): 15-22

Fischer J. H., Czerniak A., Hauer U., Isselhard W. (1978):

A new simple method for optimal storage of ischemically damaged kidneys.

Transplantation 25, No. 2, 43-49

Fischer J. H., Fuhs M., Miyata M., Isselhard W. (1980):

Hypothermic liver preservation using different flush solutions and retrograde oxygen persufflation technique.

Eur. Surg. Res. 12 (Suppl 1), 19-20

Fischer J. H., Jeschkeit S., Klein P. (1994):

Adding new principle to hypothermic storage preservation- reduction of edema formation by hyaluronidase.

Transplantation 58 (6), 748-753

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. 9 (Suppl 1), 442-446

Fischer J. H., Kuhn-Régnier F., Jeschkeit S., Switkowski R., Bardakcioglu Ö., Sobottke R., de Vivie E. R. (1998):

Excellent recovery after prolonged heart storage by preservation with coronary oxygen persufflation.

Transplantation 66, 1450-1459

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

Maintenance of physiological coronary endothelial function after 3.3 h of hypothermic oxagen persufflation preservation and orthotopic transplantation of non-heart-beating donor hearts.

Eur J Cardiothorac surg 25: 98-104.

Fisslthaler B., Hinsch N., Chataigneau T., Popp R., Kiss L., Busse R., Fleming I. (2000):

Nifedipine increases cytochrome P4502C expression and endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in coronary arteries.

Hypertension, 36, 270-275

Freeman B. A. (1982):

Biology of disease:Free radicals and tissue injury.

Lab Invest 47: 412-426

Frieden M., Sollini M., Beny J. L. (1999):

Substance P and bradykinin activate different types of K_{Ca} currents to hyperpolarize cultured porcine coronary artery endothelial cells.

J. Physiol. 519: 361-371

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: 541-572

Funcke C. (2001):

Restitution warmischämisch vorgeschädigter Schweineherzen nach verschiedenen Konservierungsverfahren und orthotroper Transplantation.

Inaugural-Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover

Furchgott R. F. und Zawadzki J. V. (1980):

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.

Nature 288: 373-376.

Furchgott R. F. (1988):

Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide .

Vasodilatation; Vascular smooth muscle, peptides and endothelium, Raven Press (NY): 401-414

Furchgott R. F. (1999):

Endothelium dependent relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide (nobel lecture).

Angew. Chem. Int. Ed. 38, 1870-1880

Gavras H. und Gavras I. (1996):

Endothelial function in cardiovascular disease: the role of bradykinin.

London, Science Press Ltd: 1-57

Ge Z., Zhang X., Fung P.C., He G. W. (2000):

Endothelium-dependent hyperpolarisation and relaxation resistance to N(G)-nitro-L-arginine and indomethacin in coronary circulation.

Cardiovasc Res 46, 547-556

Golino P., Piscione F., Willerson J. T., Cappelli-Bigazzi M., Focaccio A., Villari B., Indolfi C., Russolillo E., Condorelli M., Chiariello M. (1991):

Divergent effects of serotonin on coronary-artery dimensions and blood flow in patients with coronary atherosclerosis and control patients.

N Engl J Med 324 (10), 641-648

Gwathmey J. K., Hajjar R. J., Solaro R. J. (1991):

Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges; Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium.

Circulation Res. 69, 1280-1292

Hall J. M. (1992):

Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles.

Pharmac Ther 56: 131-190.

Hardy J. D., Chavez C. M., Kurrus F. D., Neely W. A., Erasalan S., Don Turner M., Fabian L. D., Labecki T. D. (1964):

Heart transplantation in man.

JAMA 29, 114-122

Hardy J. D. und Chavez C. M. (1969):

The first heart transplant in man: historical reexamination of the 1964 case in the light of current clinical experience.

Transpl. Proc. 1, No. 2, 717-725

Harsing L., Köver G. Y., Malyusz M., Toth G., Harza T. (1964):

Die Wirkung von vasodilatorischen Substanzen (Papaverin, Acetylcholin) auf die Nierenfunktion.

Pflügers Archiv 281, 346-355

He G. W., M.D., Ph.D., Cheng-Qin Yang, M.D. (1998):

Impaired endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation in coronary arteries by cold storage with university of wisconsin solution.

J Thorac Cardiovasc Surg 1998; 116: 122-130

He G. W. (2003):

Nitric oxide release, EDHF, and the role of potassium channels in coronary circulation.
Drug Develop Res 58: 23-27.

Hearse D. J., Humphrey S. M., Bullock C. R. (1978):

The oxygen paradox and the calcium paradox: Two facts of the same problem?
J. Mol. Cell. Cardiol. 10, 641-668

Hecker M., Bara A. T., Bauersachs J., Busse R. (1994):

Characterization of endothelium-derived hyperpolarizing factor as a cytochrome
P450 derived arachidonic acid metabolite in mammals.
J Physiol 481: 407-414.

Hellige G. und Spieckermann G. (1998):

Informationen zum Thema NO.
In: Herz-Kreislauf Transparent, Hoechst Marion Roussel.
Berlin, Verlag H.Hoffmann GmbH, 1998.

Hosenpud J. D., Bennett L. E., Keck M. B., Fiol B., Boucek M. M. u. Novick R. J. (2000):

The registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation: sixteenth official
report-2000.
J. Heart Lung Transplant. 19, No. 10, 909-924

**Ishida T. S., Kawashima K., Hirata T., Sakoda Y., Shimokawa Y., Mixa N.,
Inoue T., Ueyama M., Shiomi H., Akita H., Yokoyama M. (2001):**

Serotonin-induced hypercontraction through 5-hydroxytryptamine 1B receptors in
atherosclerotic rabbit coronary arteries.
Circulation 103 (9), 1289-1295

Isselhard W., Hinzen D., Geppert E., Mäurer W. (1970):

Beeinflussung des post-asphyktischen Wiederaufbaus der Adeninnukleotide am
Kaninchenherzen in vivo durch Substratangebot.
Pflügers Arch. 320, 195-209

Isselhard W., Eitenmüller J., Mäurer W., Welter H., Reinecke H. (1976):

Myocardial adenine nucleotides after infusion of adenosin.

Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism 11, 319-323

Isselhard W. und Minor T. (1999):

Gasförmiger Sauerstoff zur Protektion und Konditionierung von Organen in Ischämie.

Zentralbl. Chir. 124, 2-9

Jahania S., Sanchez J. A., Narayan P., Lasley R. D., Mentzer R. M. (1999):

Heart preservation for transplantation: principles and strategies.

Ann Thorac Surg 68, 1983-1987

Jamieson S. W., Reitz B. A., Oyer P. E., Bieber C. P., Stinson E. B., Shumway N. E. (1979):

Current management of cardiac transplant recipients.

British Heart Journal 42, 703-708

Kalns J., Ryan K. L., Mason P. A., Bruno J. G., Gooden R., Kiel J. L. (2000):

Oxydative stress precedes circulatory failure induced by 35-GHz microwave heating.

Shock 2000; 13 (1): 52 - 59

Karck M., Rahmanian P., Haverich A. (1996):

Läßt sich die tiefhypotherme Myokardkonservierung durch ischämische Präkonditionierung verbessern?- Untersuchungen an isolierten Rattenherzen.

European Surgery 6 (28): 340-342

Kilpatrick E. V. und Cocks T. M. (1994):

Evidence for differential roles of nitric oxide (NO) and hyperpolarization in endothelium dependent relaxation of pig isolated coronary artery.

Br J Pharmacol 112: 557-565.

Koomen J. M., Jager L. P., Van Noordwijk J. (1980):

Effects of perfusion pressure on coronary flow, myocardial Ca²⁺-washout, and the occurrence of calciumparadox in isolated perfused rat heart ventricles.

Basic Res Cardiol. 75 (2): 318-327

Ku K., Oku H., Sham Alam M., Saitoh Y., Nosaka S., Nakayama K. (1997):

Prolonged hypothermic cardiac storage with histidine-tryptophan-ketoglutarate solution.

Transplantation 64, No. 7, 971-975

Lamontagne D., Pohl U., Busse R. (1991):

N^G-nitro-L-arginine antagonizes endothelium-dependent dilator responses by inhibiting endothelium-derived relaxing factor release in the isolated rabbit heart.

Pflugers Arch 418: 266-270

Laude K., Thuillez C., Richard V. (2001):

Coronary endothelial dysfunction after ischemia and reperfusion: a new therapeutic target?

Brazilian J Med Bio Res 34: 1-7

Linz W., Martorana P. A., Schölkens B. (1990):

Local inhibition of bradykinin degradation in ischemic hearts.

J Cardiovasc Pharmacol 15 (Suppl 6): 99-109

Loebe M., Hetzer R., Schüler S., Friedel N., Wenig Y., Schiessler A. (1992):

Herztransplantation-Indikation und Ergebnisse.

Zentralbl. Chir. 681-688

Lower R. R. und Shumway N. E. (1960):

Studies on orthotopic homotransplantation of canine heart.

Surg. Forum 11, 18-19

Lower R. R., Dong E., Shumway N. E. (1965):

Suppression of rejection crises in the cardiac homograft.

Ann. Thorac. Surg. 1, No. 5, 645-649

Lüscher T. F., Romero J. C., Vanhoutte P. M. (1986):

Bioassay of endothelium-derived vasoactive substances in the aorta of normotensive and spontaneously hypertensive rats.

J Hypertension 1986; 4 (suppl 6): 81-83

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: 519-527.

Maggi M., Filippi S., Ledda F., Magini A., Forti G. (2000):

Erectile dysfunction: from biochemical pharmacology to advances in medical therapy.

Eur J Endocrinology 143, 143-154

Mechiche H., Koroglu A., Elearts J., Devillier P. (2001):

Vascular effects of neurokinins in humans.

(Effets vasculaires des neurokinines chez l'homme.)

Therapie 56 (3), 205-211

Mitchell J. A., Williams F. M., Williams T. J., Larkin S. W. (1997):

Role of nitric oxide in the dilator actions of capsaicin-sensitive nerves in the rabbit coronary circulation.

coronary circulation. Neuropeptides 31: 333-338.

Moncada S. and Vane J. R. (1979):

Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂ and prostacyclin.

Pharmacol Rev 1979; 30: 293-331

Morrow J. D., Hill K. E., Burk R. F., Nammour T. M., Badr K. F., Roberts L. J. (1990):

A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase free radical catalyzed mechanism.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 9383-9387

Murry C. E., Jennings R. B., Reimer K. A. (1986):

Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium.
Circulation, 74: 1124-1136

Nakhostine N., Laurent C. E., Nadeau R., Cardinal R., Lamontagne D. (1995):

Hypoxia induced release of prostaglandins: mechanisms and sources of production
in coronary resistance vessels of isolated rabbit heart.
Can J Physiol Pharmacol 73: 1742 –1749.

Nickel R., Schummer A., Seiferle E. (1984):

Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere, Band III.
3. Aufl Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg

Palmer R. M. J., Feridge A. G., Moncada S. (1987):

Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium derived
relaxing factor.
Nature (Lond) 327: 525-526

Park S. J., Nakashima M., Nagao T., Vanhoutte P. M. (1999):

Hyperpolarization caused by serozonin contributes to endothelium-dependent relaxation in
the porcine coronary artery.
Acta Pharmacol Sin 20: 1093-1097

Piper P. J. und Vane J. R. (1971):

The release of prostaglandins from lung and other tissues.
Ann N Y Acad Sci 180: 363-385.

Poizat C., Keriél C., Cuchet P. (1994):

Is oxygen supply sufficient to induce normotoxic conditions in isolated rat hearts?
Basic Res Cardiol 89: 535-544

Popp R., Fleming I., Busse R. (1998):

Pulsatile stretch in coronary arteries elicits release of endothelium-derived hyperpolarizing factor: a modulator of arterial compliance.

Circ.Res., 82, 696-703

Radovancevic B. und Frazier O. (1999):

Heart transplantation; Approaching a new century.

Tex. Heart Inst. J. 26, 60-70

Reichenspurner H., Russ C., Überfuhr P., Nollert G., Schlüter A., Reichart B., Klövekorn W. P., Schüler S., Hetzer R., Brett M., Posival M., Körner M. M., Körfer R. (1993):

Myocardial preservation using HTK for heart transplantation.

Cardio.-thorac. Surg. 7, 414-419

Rodeberg D. A., Chaet M. S., Bass R. C., Arkovitz M. S., Garcia V. F. (1995):

Nitric Oxid: An Overview.

Am J Physiol. 170: 292-299

Saitoh Y., Hashimoto M., Ku K., Kin S., Nosaka S., Masumura S., Nakayama K. (2000):

Heart preservation in HTK solution: role of coronary vasculature in recovery of cardiac function.

Ann. Thorac. Surg. 69, 107-112

Schlüter K. D., Schwartz P., Siegmund B., Piper H. M. (1991):

Prevention of the oxygen paradox in hypoxic-reoxygenated hearts.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 261: H 416-H 423

Secombe J. F., M. D., Hartzell V., Schaff M. D. (1995):

Coronary Artery Endothelial Function After Myocardial Ischemia and Reperfusion.

Ann Thorac Surg 60: 778-788

Sommerschild H. T. und Kirkeboen K. A. (2000):

Adenosine and cardioprotection during ischemia and reperfusion- an overview.
Acta. Anaesthesiol. Scand. 44, 1038-1055

Southard J. H. und Belzer F. O. (1995):

Annu Rev Med 46: 235-247

Sumimoto R. A. und Kamada N. (1991):

Comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation.
Transplantation 51: 589-593

Takeuchi K. und Takashima K. (1995):

Improved protection of hypertrophied myocardium in ischemia by histidine buffer cardioplegia.
Kyobu Geka 48: 461-463

Tossios P. und Mehlhorn U. (2004):

Freie Radikale und Antioxidantien in der Herzchirurgie.
Blickpunkt des Mannes 2004; 2 (3): 36-39

Triggle C. R. und Ding Hong (2002):

Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor:
Is There A Novel Mediator?
Clin and Exp Pharmacol and Physiol 29: 153-160

Tschudi M. R. und Lüscher T. F. (1996):

Stickstoffmonoxid: Das endogene Nitrat im Kreislauf.
Herz 21, Suppl. I: 50-60

Udilova N. (1999):

Vergleichende Untersuchung von Methoden zum Nachweis von Superoxidradikalen in biologischen und Modellsystemen.
Inaugural-Dissertation Humboldt-Universität zu Berlin

Upadhy G. A. und Strasberg S. M. (2000):

Glutathione, lactobionate, and histidine: cryptic inhibitors of matrix metalloproteinases contained in University of Wisconsin and histidine/tryptophan/ketoglutarate liver preservation solutions.

Hepatology 31: 1115-1122

Vahl C. F., Bonz A., Hagl C., Timek T., Herold U., Fuchs A., Kochsiek N., Hagl S. (1995):

„Cardioplegia on the contractile apparatus level“: Evaluation of a new concept for myocardial preservation in perfused pig hearts.

Thorac. Cardiovasc. Surgeon 43, 185-193

Vanhoutte P. M. (2003)

Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history.

Pharmacol 49: 503-508

Vischjager M. (1995):

Morphology and function of dog arterial grafts preserved in UW solution.

Eur J Vasc Endovasc Surg 10: 431-439

Vischjager M. (1997):

Morphology and function of preserved microvascular arterial grafts: an experimental study in rats.

Ann Vasc Surg 11: 284-291

Vossoughi D. (2006):

Immunohistochemischer Nachweis der NO-Synthase-Isoformen in Rattenlebern bei experimenteller Zirrhoseinduktion durch Gallengangsligatur.

Inaugural-Dissertation, Goethe-Universität Frankfurt am Main

Vrints C. J., Bult H., Bosmans J., Herman A. G., Snoeck J. P. (1992):

Paradoxical vasoconstriction as result of acetylcholine and serotonin in diseased human coronary arteries.

Eur Heart J 13 (6), 824-831

Yotsumoto G., Jeschkeit-Schubbert S., Funcke C., Kuhn-Régnier 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.

Transplantation 75 (6), 750-756

Zimmermann A. N. E. und Hüllsmann W. C. (1966):

Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes in the isolated rat heart.

Nature 211, 646-647

8. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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 Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ich habe die Dissertation an folgendem Institut angefertigt:

Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln

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

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

Julia Naglo-Dünner

9. Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Dr. Gerald Reiner danke ich für die freundliche Übernahme meiner Doktorarbeit von veterinärmedizinischer Seite.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Heinrich Dahmen für die unermüdliche Unterstützung und Motivation bei der Fertigstellung meiner Doktorarbeit.

Für die ausgesprochen nette und kollegiale Zusammenarbeit während unserer gemeinsamen Zeit am Institut für experimentelle Medizin der Universität zu Köln bedanke ich mich bei Frau Manuela Lerwe, Frl. Iris Wisser, Frau Petra Heid, Frau Greiwe sowie meiner Kollegin Dorothee Dahmen.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Wilhelm Bloch und Frau Dr. Klara Brixius von der Deutschen Sporthochschule Köln, Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Abteilung Molekulare und Zelluläre Sportmedizin für ihre sehr freundliche Hilfe.

Meinen Eltern Joachim und Marie-Louise Naglo, die immer hinter mir stehen und mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht haben.

Zum Abschluß danke ich meinem Mann Marc Dünner, der mir stets (un)geduldig all mein fehlendes Computergrundlagenwissen beigebracht und meine zeitweise schlechten Launen ertragen hat.



edition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5577-2



9 11 8 3 8 3 5 1 1 5 5 7 7 6