Herzchirurgie bei Myokardischämie : Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie vs. Blutkardioplegie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Von Komguem Massudom Yvette Audrey

aus Duala Kamerun

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Zentrum für Chirurgie, Klinik für Herz-, Kinderherz- und Gefäßchirurgie

Betreuer: Prof. Dr. med. Andreas Böning

Gutachter: PD. Dr. Abdallah

Tag der Disputation:

Dienstag, 07. November 2023

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Zielsetzung ... 2

1.2 Entwicklung der Kardioplegie ... 2

1.3 Herzerregung ... 3

1.4 Definition und Mechanismus der Kardioplegie ... 4

1.4.1 Depolarisierende Kardioplegie ... 5
1.4.2 Polarisierende Kardioplegie ... 5
1.4.3 Kalzium abhängige Kardioplegie ... 6
1.4.4 Esmolol Kardioplegie ... 6

1.5 Stoffwechsel des Myokards ... 7

2 Intraoperative kardioprotektive Verfahren 9

2.1 Extrakorporale Zirkulation ... 9

2.2 Unterkühlung des Organismus ... 10

2.3 Kardioplegie-Lösung ... 11

2.3.1 Kristalloide Kardioplegie ... 11
2.3.2 Blutkardioplegie ... 13

2.4 Verabreichung Möglichkeiten ... 14

2.4.1 Die antegrade Perfusion ... 15
2.4.2 Die retrograde Perfusion ... 15
2.4.3 Kombinierte antegrade und retrograde Perfusion ... 15

2.5 Ischämie-Reperfusionsschaden ... 15

2.6 Messparameter der Ischämie-Reperfusionsschaden ... 18

3 Material und Methoden 19

3.1 Material ... 19

3.1.1 Versuchstieren ... 19
3.1.2 Pharmaka zur Herstellung der Kardioplegie Lösung ... 19
3.1.3 Material und Geräte für die Herzperfusion ... 20
3.1.4 Verbrauchsmaterialien ... 22

4 Methode 23

4.1 Blutaufbereitung ... 23

4.1.1 Vorbereitung der Ratten und Organentnahme: ... 24
4.1.2 Langendorff-Apparat ... 25
4.1.3 Versuchsaufbau ... 27
4.1.4 Versuchsablauf ... 28
4.1.5 Erfassung Physiologische Parameter ... 30
4.1.6 Erfassung elektromikroskopischen Parameter ... 32

5 Ergebnisse 33

5.1 Hämodynamische Parameter ... 33

5.2 Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion ... 36

5.3 Elektromikroskopische Untersuchung ... 38

5.4 Statistik ... 41

6 Diskussion 43

6.1 Klinische Problematik und Entwicklung der Fragestellung ... 43

6.2 Myokardprotektion ECCP versus CBCP versus EBCP ... 44

6.2.1 Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch ... 44
6.2.2 Hämodynamische Parameter ... 45
6.2.3 Ultrastruktur ... 46
6.2.4 Temperatur der Kardioplegie ... 46

6.3 Relevanz der Fragestellung ... 47

6.4 Limitation des Studienaufbaus ... 48

6.5 Schlussfolgerung ... 49

7 Zusammenfassung 50

7.1 Deutsch ... 50

7.2 Englisch ... 51

8 Abkürzungen 53

9 Diagramm-, Abbildungsverzeichnis 54

10 Literaturverzeichnis 55

11 Ehrenwörtliche Erklärung 60

12 Danksagung 61

13 Lebenslauf 62

1 Einleitung

Zunehmend sind die Patienten in der Herzchirurgie älter, kränker (Alterserkrankung), mit diffuserer Erkrankung und daher einer geringeren Toleranz gegenüber Ischämie-Reperfusions-Schäden während einer herzchirurgischen Operation. Durch den Einsatz kardioprotektiven Verfahren können bestmögliche Bedingungen für Operationen am offenen Herzen gewährleistet werden und einen besseren Outcome für den Patienten angeboten werden.

Die Myokardprotektion besteht aus drei Säulen: Kardioplegie, Hypothermie und extrakorporaler Zirkulation (EZK) (1). Die Entwicklung solcher Verfahren ist die Antwort auf einen zunehmenden Bedarf an Verbesserungen herzchirurgischer Methoden. Das Interesse an der Fortentwicklung der Herzchirurgie ist wahrscheinlich auf die Komplexität der Erkrankungen, die Erhöhung der Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen sowie der Komorbidität- und Morbiditätsfaktoren zurückzuführen.

Herz-Kreislauf-Krankheiten sind immer noch Todesursache Nummer eins in Deutschland. Die Zahl der Herzoperationen ist im vergangenen Jahr in Deutschland um rund 1,8 % auf 100.446 Eingriffe gestiegen (2). Mit der Weiterentwicklung und Verbesserung der Operationsverfahren hat sich die Überlebensrate nach herzchirurgischen Eingriffen verbessert. Die unbereinigte In-Hospital-Überlebensrate für die 34.224 isolierten Koronararterien-Bypass-Transplantationen (Verhältnis on-/off-pump 3,8:1) betrug 97,3 %. Bei den 36.650 isolierten Herzklappeneingriffen (einschließlich 16.625 Transkathetereingriffen) lag sie bei 96,4 % (3). Unter den mehr als außergewöhnlichen Bedingungen der anhaltenden weltweiten Coronavirus-Pandemie 2019 lag die Überlebensrate weiterhin nahezu konstant bei ca. 97 % (4).

Die Mehrheit der herzchirurgischen Eingriffe erfolgen unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine und kardioplegischen Lösungen. Mit Hilfe der HLM wird trotz Abklemmung der Aorta die Durchblutung des Köpers gewährleistet. Die Koronardurchblutung des Herzmuskels und damit die Sauerstoffversorgung des Myokards ist aber unterbrochen. Die Aufgabe der kardioplegischen Lösung ist es, das Herz vor der entstandenen azidotischen Stoffwechsellage zu schützen. Man spricht von einer sogenannten iatrogenen Kardioplegie, einem künstlich herbeigeführten Herzstillstand, der bei chirurgischen Eingriffen am Herz zum Schutz des Herzens und zur Verlängerung der Ischämietoleranz eingesetzt wird. Nach langer Forschung und Entwicklung hat sich der kardioplegischen Herzstillstand als kardioprotective etabliert.

Ziel war und ist der Schutz des Herzmuskels durch verschiedene Komponente wie Puffersubstanzen, unterschiedliche Ionenkonzentrationen sowie osmotisch wirksame Substanzen bestmöglich vor einer myokardischämischen bedingten Zellschaden zu schützen. Es stehen viele kardioplegischen Lösungen zur Verfügung. Diese Lösungen lassen sich durch ihre ionische Zusammensetzung und Bedienungseinleitung/Anwendungsmodus unterscheiden. Die Blutkardioplegie benutzt Blut als Hauptkomponente. Sie kann sowohl warm als auch kalt appliziert werden. Hier zählen die Erythrozyten als natürliche Puffer. Die kristalloide Kardioplegie hat Wasser als Hauptkomponente und wird vorzugsweise kalt appliziert.

1.1 Zielsetzung

Mithilfe zahlreicher Studien konnte die Effizienz einzelner kardioplegischer Lösungen bewiesen werden. Der Kardioplegie-Stillstand auf Esmolol-Basis bietet eine bessere Kardioprotektion als die kristalloide Kardioplegie, wurde aber bisher nicht mit der Blutkardioplegie verglichen.

Da die optimale Myokardprotektion für jede Herzoperation angeboten werden sollte, ist das Ziel dieser Arbeit die Evaluation der Myokardprotektionspotenziale der Blutkardioplegie im Vergleich zur Kristalloidekardioplegie.

Wir haben am isolierten Rattenherz während der Ischämie- und Reperfusionszeit den Einfluss von der Calafiore-Blut-Kardioplegie, Esmolol-Blut-Kardioplegie und der Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie auf hämodynamische Parameter wie die Herzfunktion, den Stoffwechsel und auf elektromikroskopischen Strukturen während eines 90-minütigen Kardioplegie-Stillstand untersucht.

1.2 Entwicklung der Kardioplegie

Die Mehrheit der herzchirurgischen Eingriffe erfolgen unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine und einer kardioplegischen Lösung. Im Jahr 1980 revolutionierte der deutsche Mediziner Hans Jürgen Bretschneider die Geschichte der Herzchirurgie durch seine Kardioplegie, eine kalzium- und natriumarme, procainhaltige Lösung, die durch Depolarisation einen Herzstillstand provoziert (5).

D.G Melrose und sein Team gehörten zu den ersten, die den potentiellen Wert eines Herzstillstandes und eines Wiederanlaufs für die Herzchirurgie erkannten, und entwickelten eine Kaliumcitrat-Lösung (6). Im Jahr 1995 verwendete Melrose ein kalium- und zitratreiches

Blut als kardioplegisches Agens und ermöglichte damit einen reversiblen mechanischen und elektrischen Herzstillstand (7).
Es wurde aber festgestellt, dass die Melrose-Kardioplegie-Lösung herzschädigend wirkt, daher wurde sie lange nicht mehr verwendet (8), bis H.J. Bretschneider mit seinem kardioprotectiven Konzept die Idee der Operation am asystolischen Herzen wieder in den Vordergrund der wissenschaftlichen Forschung stellte. Herzoperationen wurden viel sicherer, da die Myokardischämie und Reperfusionsverletzung verringert wurden. Sie ist zu einer integralen und wesentlichen Methode des Myokardschutzes für Patienten jeden Alters, die eine Herzoperation benötigen, geworden (9).

R. Bessho und D.J. Chambers haben gezeigt, dass eine Esmolol-Lösung eine Asystolie induzieren kann und dass Multidosis-Infusionen (für zwei Minuten alle 15 Minuten bei 45 mmHg) einer 1,0 mmol/L Esmololol-Lösung an isolierten, kristalloidperfundierten Rattenherzen über längere Zeiträume (bis zu 90 Minuten) vor einer normothermischen globalen Ischämie schützen können (10).

Davor wurde im Jahr 1950 ein Riesenschritt in der Herzchirurgie durch die Entwicklung der Oberflächenhypothermie durch W.G. Bigelow in Toronto getan (11). Er zeigte, dass der Sauerstoffverbrauch durch die Reduzierung der Körpertemperatur vermindert werden kann.
Dann wurde die extrakorporale Zirkulation 1953 durch J.H. Gibbon in Philadelphia entwickelt (12). Am 6. Mai 1953 operierte J.H. Gibbon erstmals erfolgreich unter Verwendung der extrakorporalen Herz-Lungen-Maschine. Diese signifikante Entwicklung erlaubte es J. W. Kirklin, eine Serie erfolgreicher intrakardialer Eingriffe durchzuführen und W. Lilleheis angeborene Malformation zu korrigieren (13).
Aber die Eingriffe waren durch die Hypothermie und die Unterbrechung der Koronardurchblutung nach Abklemmen der Aorta zeitlich limitiert. Mit Hilfe der kardioplegischen Lösung konnte die ischämische Toleranz verlängert werden.

1.3 Herzerregung

Die Herzkontraktion erfolgt rhythmisch und spontan. Damit die Versorgungsfunktion des Herzens gewährleistet bleibt, bilden spezialisierte Schrittmacherzellen spontan Aktionspotenziale, die sich auf das gesamte Herz ausbreiten und eine mechanische Kontraktion des Myokards auslösen. Dies passiert mit Hilfe der elektrischen Erregung, die durch

Hyperpolarisation aktivierten Kationenkanäle der spezialisierten Herzmuskelzellen des Schrittmacherzentrums generiert wurden (Funny Channels im Sinusknoten).

Die Erregung wird über ein Leitungssystem an den Vorhöfen und nach Verzögerung über AV-Knoten an die Herzkammern weitergeleitet (14). Im Ruhezustand weist das Arbeitsmyokard ein stabiles Membranpotenzial von ca. -85mv auf, das durch eine dominierende Permeabilität für K^+ generiert wird. Die Permeabilität der Plasmamembran auf anderen Ionen hat eine geringfügige Bedeutung, deshalb wird das Ruhemembranpotenzial durch das Kaliumgleichgewichtspotenzial bestimmt (14).

Das Aktionspotential ist durch Ionenkanäle und Ionenfluss auslösbar. In der Depolarisation bewirkt die Aktivierung spannungsgesteuerter Na^+-Kanäle einen Natriumeinwärtsstrom und führt dazu, dass das Membranpotenzial positiver wird. Der langanhaltende Kalziumeinwärtsstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle vom L-Typ ist für die Plateauphase verantwortlich. Das Membranpotenzial wird konstant gehalten (0mV) und das notwendige Kalzium für die Kontraktion strömt ein. Während der Repolarisation werden die zuvor aktivierten Kalziumkanäle inaktiviert und das Kaliumgleichgewichtspotenzial wird durch Kaliumauswärtsstrom durch die Kaliumkanäle wiederhergestellt (14).

Das Membranpotenzial ist nicht nur von der selektiven Permeabilität der Zellmembran abhängig, sondern auch von der Verteilung von Ionen zwischen Zellinnerem und -äußerem (Konzentrationsgradient): Diffusionspotenzial. Iatrogen kann man die Myokardkontraktion über den Konzentrationsgradienten oder die Kanäleblockade beeinflussen.

1.4 Definition und Mechanismus der Kardioplegie

Ein gesundes Myokard kann physiologisch ohne irreversiblen Schaden eine totale Ischämie fünf Minuten lang überstehen. Aber die meisten Herzoperationen erfordern eine lange Unterbrechung der Koronardurchblutung.
Eine spezielle kardioplegische Lösung wird verwendet, um das Herz während des Eingriffs stillzulegen und den Sauerstoffbedarf des Myokards zu reduzieren. Dies ermöglicht eine Verlängerung der Ischämietoleranz während der Operation und einen bestmöglichen Outcome nach der Operation.

Eine gewollte Asystolie kann durch die Induktion von Depolarisation, Polarisation oder die Beeinflussung von Kalziumströmen erreicht werden.

1.4.1 Depolarisierende Kardioplegie

Ein Zufluss von Kalium (Kaliumlösung 20 bis 25 mmol/L) depolarisiert die Myokardmembran, was zu einer Freisetzung und anschließender Sequestrierung von Kalziumionen führt, was die intrakardiale Erregungsausbreitung unterbricht (15).

Das Ruhemembranpotential im Myozyten beträgt etwa -85 mV und mit dem Einströmen von Natriumionen tritt eine Depolarisation auf. Wenn die Membran auf -65mV positiver wird, werden die spannungsabhängigen schnellen Natriumkanäle inaktiviert, wodurch der schnelle Na^+-induzierte Anstieg des Aktionspotenzials verhindert und das Herz in eine diastolische Asystolie gebracht wird. Erreicht das Membranpotential -45 bis -30 mV, werden die Kalziumkanäle vom L-Typ potenziert. Es fördert eine Überlastung des Kalziums, was den Herzstillstand aufrechterhält (13). Die Persistenz von Kalium verringert das Membranpotential und ermöglicht keine ausreichende Repolarisation. Dies führt wiederum zu einem diastolischen Herzstillstand.

Trotz klinischen Erfolgs der hyperkaliämischen Lösung lässt die Depolarisierung des Ruhemembranpotenzials (auf ca. -50 mV) in hyperkalämischen Arrestlösungen es wahrscheinlich erscheinen, dass der Schutz nicht optimal ist. Dies ist auf eine Reihe von Faktoren zurückzuführen, darunter die Natrium- und Kalziumbelastung durch die Aufrechterhaltung von Fensterströmen, die zu einer konstanten Energienutzung führen (16). Daher besteht ein anhaltendes Interesse daran, eine vorteilhafte Alternative zum hyperkalämischen depolarisierten Arrest zu finden.

1.4.2 Polarisierende Kardioplegie

Polarisierende kardioplegische Lösungen sind eine Alternative zum Herzstillstand durch Depolarisation. Es geht darum, die Polarisation in der Nähe des Ruhemembranpotentials beizubehalten. Der Vorteil daran ist, dass die Ionenbewegung (insbesondere Na^+- und Ca^{2+}-Ionen) reduziert werden, da das Schwellenpotential für die Aktivierung der Ionenkanäle nicht erreicht wird und Fensterströme nicht aktiviert werden. Diese Verringerung des Ionenungleichgewichts sollte wiederum die myokardiale Energienutzung für Ionenbewegungen und Versuche zur Aufrechterhaltung von Ionengradienten reduzieren (17).

Natriumkanalblocker wie z.B. Tetrodotoxin reduzieren nachweislich den myokardialen Sauerstoffverbrauch im Vergleich zu einem hyperkaliämischen Herzstillstand (18).

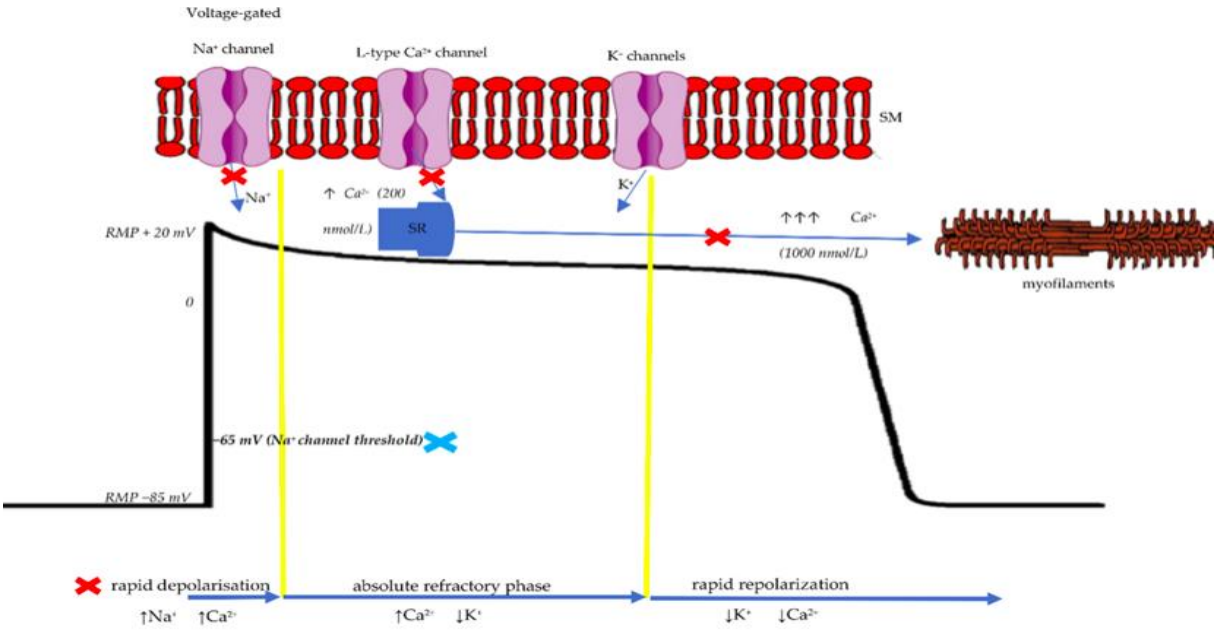


Abbildung 1: The action mechanisms of Bretschneider and St. Thomas cardioplegias. Theorical und Practical Aspects in the Use of Bretschneider Cardioplegia by Claudiu Ghiragosian and co.

1.4.3 Kalzium abhängige Kardioplegie

Sowohl das Fehlen von extrazellulären Kalziumionen als auch eine erhöhte Konzentration an Kalziumantagonisten induzieren einen Herzstillstand in der Diastole durch Hemmung der Erregungs-Kontraktionskopplung. Als kardioplegische Lösung haben Kalziumantagonisten einen ähnlichen Schutz wie der hyperkaliämische Arrest bewiesen, aber sie zeigen Nachteile wie eine langsame Erholung des Myokards nach der Ischämiezeit sowie eine temperaturabhängige Wirkung mit wenig zusätzlichem Schutz während der Hypothermie (19) (20).

1.4.4 Esmolol Kardioplegie

Esmolol ist ein Betablocker, der meistens in herzchirurgischen Eingriffen eingesetzt wird, um Myokardkontraktionen gering zu halten und gleichzeitig eine kontinuierliche normotherme Perfusion aufrechtzuerhalten, um Ischämie zu vermeiden.

Bei 1 mmol/L (und darunter) ist der ausgeprägte negative inotrope Effekt weitgehend auf die Hemmung der Ca^{2+}-Kanäle vom L-Typ zurückzuführen. In hoher Konzentration induziert Esmolol einen Herzstillstand, indem er die Ableitung des Aktionspotenzials durch zusätzliche Hemmung der schnellen Na^{+}-Kanäle verhindert (21).

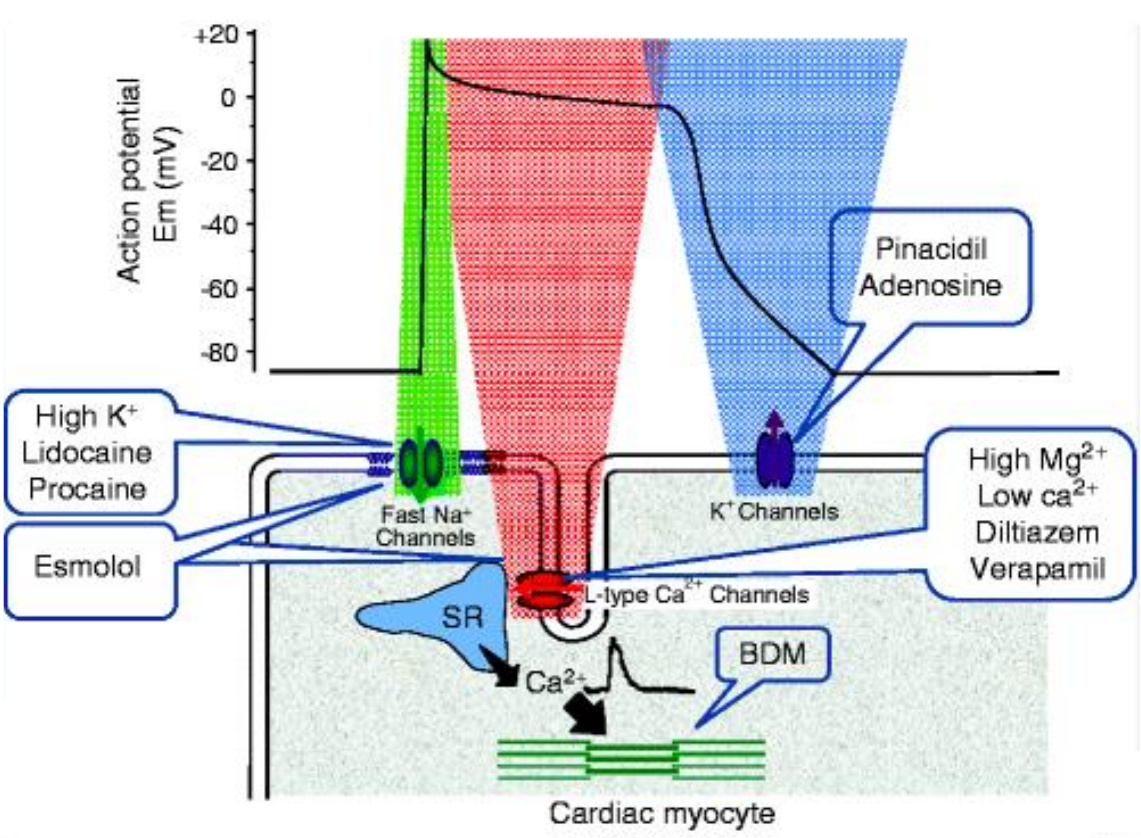


Abbildung 2: The cellular targets for cardioplegic arrest and their influence on the action potential with examples of pharmacological agents. New Approaches to Cardioplegia: Alternatives to Hyperkalemia David J. Chambers and Hazem B. Fallouh

1.5 Stoffwechsel des Myokards

Normalerweise gewinnt das Herz Energie parallel über die aerobe und anaerobe Oxidation von freien Fettsäuren, Laktat und Glucose. Die Versorgung an Substrat geschieht hauptsächlich während der Durchblutung der Koronarien in der Diastole.

Zur Energieentwicklung benötigt das Herz Sauerstoff. Dies setzt voraus, dass die Organdurchblutung ausreichend ist, um den Bedarf zu decken. Das Herz gewinnt seine Energie aus dem aeroben Abbau von Fettsäuren, Glukose und Laktat. Aus diesen Substraten werden Reduktionsäquivalente in Form von $NADH/H^+$ und $FADH_2$ gebildet. Diese werden in der Atmungskette (Mitochondrien) unter Verbrauch von Sauerstoff zu Oxidationswasser, NAD und FAD umgewandelt. Im Gegenzug wird aus ADP ATP gebildet. In Ruhebedingungen generiert der Myokardstoffwechsel eine ATP-Produktion von 20 bis 30 umol/min pro Gramm Herzmuskel beziehungsweise 38 ATP pro Mol oxydierte Glukose (22).

Bei Unterbrechung der Myokarddurchblutung während kardiochirurgischer Eingriffe, die eine Anwendung der HLM und Aortenabklemmung benötigen, kompensiert das Herz seinen Energiemangel mittels anaeroben Abbaus von Glykogen und Glukose. Diese Anaerobiose erbringt nur zwei bis drei Mol ATP pro metabolisiertem Mol Glucose.

Unter anaeroben Bedingungen stauen sich die Reaktionsäquivalente $NADH/H^+$ und $FADH_2$ an, da O_2 nicht ausreichend für die Atmungskette vorhanden ist. Dies führt dazu, dass die Gleichgewichtsreaktion zwischen Laktat und Pyruvat zu Laktatakkumulation tendiert (Laktat kann nicht mehr in Pyruvat umgewandelt werden). Das Herz greift seine Energiereserve an, die nur wenige Sekunden ausreicht, bevor erhebliche funktionelle Konsequenzen auftreten bzw. 20 Minuten ausreichen, bevor irreversible Schäden auftreten (22).

Der Mangel an ATP führt nicht nur zu einem pH-Anstieg durch Laktat-Akkumulation, sondern wirkt sich auch negativ auf die Kontraktilität des Myokards aus und beeinträchtigt die zelluläre Integrität mit Zellödem, Membraninstabilität und Zelltod. Das azidotische Milieu inhibiert wichtige Enzymfunktionen, die zu Veränderungen der Zellfunktion führen, und schädigen die Endothelzellen der Koronargefäße.
Laktatbildung, Struktur und Funktionsveränderung des Myokards sind Zeichen unzureichender Sauerstoffversorgung bzw. unzureichender Myokardprotektion während einer Herzoperation.

2 Intraoperative kardioprotektive Verfahren

Die kardioprotektiven Verfahren dienen dem Schutz und Erhalt des Metabolismus, der Funktion und der Morphologie des Herzens mit dem Ziel seiner vollständigen und anhaltenden Erholung (23). Die Kardioprotektion betrifft nicht nur die Kardioplegie-Lösung, sondern alle Verfahren wie die Herz-Lungen-Maschine und Hypothermie, die den Schutz des Herzens sowohl während der intraischämischen als auch der prä- und postischämischen Phase dienen (24).

2.1 Extrakorporale Zirkulation

Die Idee der extrakorporalen Zirkulation wurde im Jahr 1885 durch Frey und Gruber inspiriert (25); entwickelt wurde sie durch Gibbon im Jahr 1953. Die Idee dahinter war, den Blutkreislauf maschinell aufrechtzuerhalten und künstlich zu oxygenieren. Durch die Übernahme der kompletten Herz- und Lungenfunktion konnten die Operationen am Herzen und an den großen Gefäßen erfolgreich durchgeführt werden.

Die Funktion der extrakorporalen Zirkulation während der Operation ist heutzutage standardisiert. Dabei übernimmt die HLM in Kombination mit einem EKZ-System die Pumpfunktion des Herzens, den Gasaustauschfunktion der Lunge sowie die Regelung der Bluttemperatur.

Folgende Funktion müssen gewährleistet und aufrechterhalten werden:

- ausreichendes Perfusionsvolumen (HZV)
- ausreichender Perfusionsdruck (MAD)
- Bluttemperaturregulierung
- ausreichende Oxygenierung des Blutes
- adäquate Kohlendioxyd-Elimination
- optimale Myokardprotektion

Mittels einer Kanüle wird das venöse, nicht oxygenierte Blut aus der Vena cava superior und inferior bzw. dem rechten Vorhof gesaugt. Das Blut landet in einem Schlauchsystem und schließlich durch Gravitationskraft in dem Blutreservoir der HLM. Das venöse Blut fließt durch den Membranoxygenator, wodurch es entlang eines physiologischen Gefälles mit Sauerstoff gesättigt und von CO_2 befreit wird. Das oxygenierte Blut erreicht über eine Rollenpumpe den Wärmeaustauscher, der das Blut und somit die Köpertemperatur je nach Erfordernis der Operation reguliert: Am Anfang der Operation wird das Blut abgekühlt, während der Operation wird die Temperatur konstant gehalten und zum Schluss aufgewärmt. Letztendlich wird das

Blut über die Arteria femoralis oder axillaris dem Körperkreislauf des Patienten zurückgeführt. Somit wird die Funktion des Herzens und der Lunge während des Eingriffes sicher ersetzt.

.

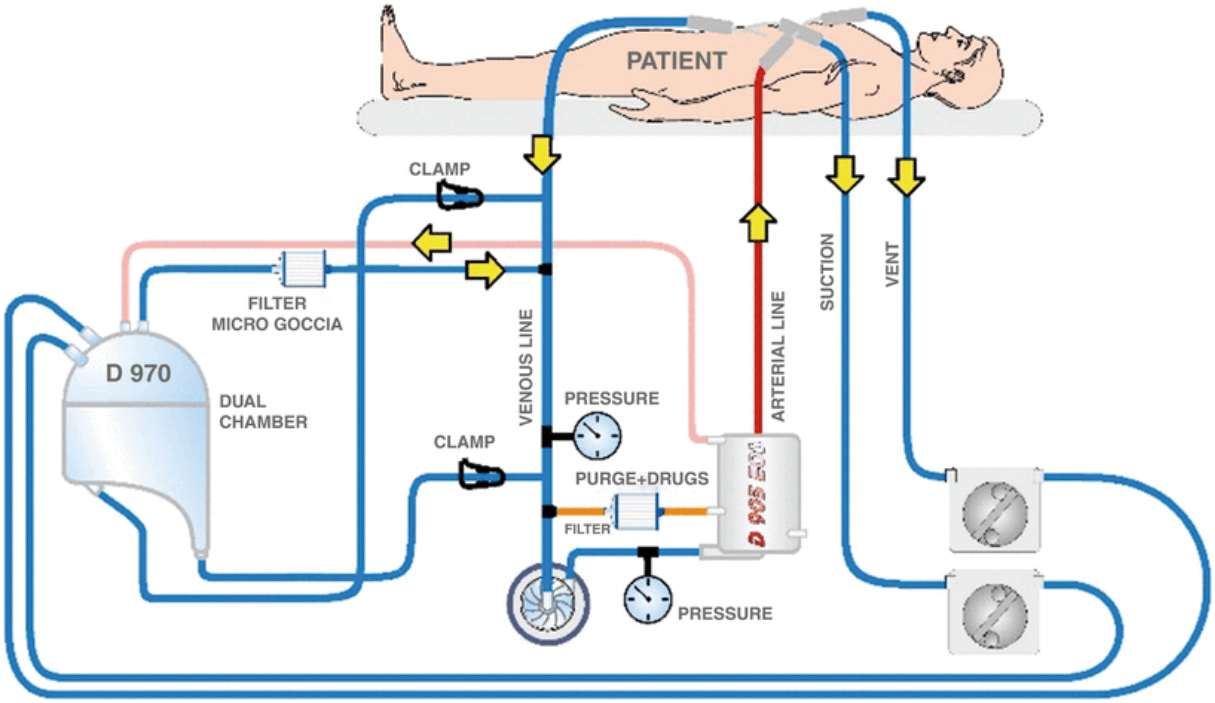


Abbildung 3: Einmalperfusionssysteme (Quelle: Vorlesungsskript Kardiotechnik Frank Born)

2.2 Unterkühlung des Organismus

In der Kardiochirurgie sind die zu operierenden Herzen schon oft vorgeschädigt. Deswegen ist es erforderlich, intraoperativ die Ischämietoleranz des Herzens zu verlängern. Dies wird ermöglicht, indem man durch Hypothermie und Verwendung einer Kardioplegie-Lösung den Sauerstoffbedarf senkt oder den Abbau der energiereichen Phosphate blockiert (26).

Der Vorteil der Hypothermie für einen Herzeingriff liegt in der Reduktion des Energieverbrauchs. Die Stoffwechselaktivtät des Gewebes wird dadurch abgesenkt (27). Der Impuls der Hypothermie zum Schutz des Myokards wurde zwischen 1950 und 1956 durch G. Bigelow und seinem Team in Toronto, F.J. Lewis und Kollegen in Chicago, H.C. Swan und Mitarbeiter in Denver sowie R. Brock und D.N. Ross in London gegeben (8).

Auf molekularer Ebene zeigte schon Arrhenius mit seiner Gleichung, dass je niedriger die Temperatur ist, desto langsamer verlaufen chemische Reaktionen. Es ist genauso aus dem Reaktionsgeschwindigkeit-Zeit-Gesetz abzuleiten: Wenn sich im Bioorganismus die Temperatur um bis zu 10 °C verringert, vermindert sich die Reaktionsgeschwindigkeit auf ½

bis ¼. Aus diesem Gesetz konnte man einen Weg finden, die Toleranzbreite von Geweben gegenüber ischämischen Zuständen zu vergrößern.
Aber es muss immer darauf geachtet werden, dass die Kältetoleranz von Säugetieren im Allgemeinen durch eine gemeinsame spezifische, minimale Stoffwechselrate begrenzt ist, die größere Organismen aufgrund ihres niedrigeren Grundstoffwechsels bereits bei geringerer Hypothermie erreichen (28). Dies bedeutet, dass jeder metabolische Prozess unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten hat, sodass Vorsicht geboten ist, dass die Imbalance nicht auf eine katalytische Reaktion und zur Dysintegrität dieser Stoffwechselpfade hinausläuft.

2.3 Kardioplegie-Lösung

Heutzutage sind zahlreiche Kardioplegie-Lösungen erhältlich. Sie dienen dem Schutz des Herzens nicht nur während der intraischämischen, sondern auch während der prä- und postischämischen Phase (29). Diese unterscheiden sich durch ihre Zusammensetzung, Temperatur der Applikation und Anwendungstechnik. Sie werden in kristalline, kolloidale und bluthaltige Lösungen unterteilt. Die Applikationsform kann anterograd, retrograd oder in kombinierter Form sein. Die Perfusion kann einmalig durchgeführt werden sowie intermittierend oder kontinuierlich. Daraus ergibt sich eine Vielzahl an kardioprotektiven Möglichkeiten (30).

2.3.1 Kristalloide Kardioplegie

Bretschneider revolutionierte die Welt der modernen Herzchirurgie mit seiner kristalloiden Kardioplegie. Im Jahr 1964 brachte er eine natrium- und calciumarme, ungepufferte Lösung auf den Markt, die Procain zur Stabilisierung des Sarkolemmes enthielt (31).
Ein paar Jahre später wurde festgestellt, dass Procain die Myokardstruktur beschädigt. Die chemische Kardioplegie-Lösung wurde deshalb vom Markt genommen. Durch die Zusammenarbeit von Holscher, H.J. Bretschneider und Kirsch konnte 1975 die modifizierte Kardioplegie als Standardprotektionsverfahren anerkannt werden.

Herzoperationen wurden viel sicherer, da die Myokardischämie und Reperfusionsverletzungen vermindert wurden. Trotz dieses klinischen Erfolgs ist es aufgrund der Depolarisation des Ruhemembranpotentials (auf etwa -50 mV) bei hyperkalämischen Herzstillstandslösungen wahrscheinlich, dass der Schutz nicht optimal ist (32).

Deswegen suchten Hazem B. Fallouh, David J. Chamber und Team eine Alternative zur hyperkaliämischen Lösung. 2010 publizierten Hazem B. Fallouh et. al die Ergebnisse ihrer Forschung. Das Ziel war es, zu zeigen, wie und bei welcher Konzentration Esmolol eine Asystolie erzeugen kann. Esmolol gehört zur Gruppe der kurz wirksamen Betablocker und Antiarrhythnika der Klasse II. Es ist ein Arzeinmittel, das üblicherweise in der Behandlung von Herzkreislauf-Erkrankung eingesetzt wird.

Die Ergebnisse ihrer Forschung zeigten, dass Esmolol bei millimolaren Konzentrationen durch zwei Mechanismen einen diastolischen Ventrikel-Stillstand verursacht: Bei 1 mmol/L (und darunter) ist der ausgeprägte negative inotrope Effekt weitgehend auf die Hemmung der Ca^{2+}-Kanäle vom L-Typ zurückzuführen. Esmolol in höherer Konzentration führt zur kompletten Asystolie durch Unterdrückung der Ableitung des Aktionspotenzials durch die Hemmung der schnellen Na+-Kanälen (in der Knotenregion) und Ca^{2+}-Kanäle vom L-Typ (21).

Die Ergebnisse zeigen, durch welche Eigenschaften Esmolol sich als ein klinisch nützliches alternatives kardioplegisches Mittel erweisen kann. Durch schnelle Hydrolyse von Esmolol (Halbwertszeit ~9 min) durch Esterasen in den Erythrozyten wurde der negativ inotrope Effekt von Esmolol beendet, sodass die Asystolie nach der Reperfusion rasch rückläufig war, was sich positiv auf die postoperative Erholung der Patienten auswirkt.

Esmolol weist eine weitere vorteilhafte Eigenschaft dadurch auf, dass die Clearance von Esmolol durch die roten Blutkörperchen unabhängig von den Nieren und der Leber ist, deren Funktion nach einer Herzoperation beeinträchtigt sein kann.
Esmolol hat im Vergleich zur hyperkaliämischen Kardioplegie einen niedrigen Marktpreis. Dies zählt zusätzlich zu seiner polarisierenden asystolischen Eigenschaft als Vorteil gegenüber der hyperkaliämische Kardioplegie.

Bereits 1999 zeigten U. Mehlhorn et al., dass eine Koronarperfusion mit warmem mit Betablockern angereichertem Blut eine Asystolie verursachen kann und dazu Myokardischämieschäden wie die Bildung eines Myokardödems minimieren kann, sodass die linke Herzkammer eine besser erhaltene Pumpfunktion zeigt (33). Sie führten eine randomisierte Studie durch, in der 60 Patienten mit koronarer Herzchirurgie, die entweder eine kristalloide Kardioplegie oder eine Esmolol-Blut-Kardioplegie bekamen, untersucht wurden.
Aus linksventrikulären Biopsien bestimmten die Autoren, dass:

- Patienten mit Betabocker-Kardioplegie weniger Myokardödeme als Patienten mit kristalloider Kardioplegie zeigten
- kristalloide Kardioplegie-Herzen signifikant höhere Laktatmengen gegenüber Esmolol-Herzen freisetzten
- in Betablocker-Kardioplegie-Herzen der myokardiale Wassergehalt unverändert blieb, während er bei Patienten mit kristalloider Kardioplegie weniger wurde.
- Esmolol-Kardioplegie-Herzen weniger strukturelle Schädigungen als kristalloide-Kardioplegie-Herzen zeigten (33).
- Wie H. J. Geissler und sein Team am Ende ihres Experiments zeigen konnten, verhindert eine kontinuierliche koronare Perfusion mit einer Betablocker-Warmblutkardioplegie die Bildung von interstitiellen Ödemen und schützt das Herz vor Funktionsstörungen bei Hochrisikopatienten (34).

2.3.2 Blutkardioplegie

Die Blutkardioplegie ist, wie der Name bereits sagt, eine Mischung aus Patientenblut und kristalloider Lösung. Gerald D. Buckberg und seine Arbeitsgruppe beschrieben 1979 die Blutkardioplegie als optimales Myokardprotektionsverfahren.

Mit Hilfe des Blutes können auf verschiedene Art und Weise die Bedürfnisse des Patienten abgedeckt werden. Die Blutkardioplegie ermöglicht die Verbesserung der Sauerstoffversorgung und Verabreichung sowohl von Nährstoffen als auch von Medikamenten. Das Blut bietet eine Erhöhung der Pufferkapazität für das Herz. Dadurch sorgt die Blutkardioplegie nach der gewünschten Asystolie für eine schnelle Erholung des Myokardes. Die Blutkardioplegie kann sowohl warm als auch kalt appliziert werden.

Erstmalig wurde 1977 ein Zusatz von Blut zur rein kristalloiden Kardioplegie durch Folette und Buckberg entwickelt, um eine bessere Sauerstoff- und Energieversorgung des Herzens während des Eingriffs zu gewährleisten (35). Dann publizierten 1995 Calafiore und sein Team die Ergebnisse zur Applikation einer kaliumhaltigen warmen Blutkardioplegie (36). Die Arbeitsgruppe beschreibt normothermes Blut, das intermittierend aus einem Oxygenator durch einen Schlauch von 0,625 cm Durchmesser über Rollenpumpen anterograde in Aortenwurzel oder Koronarsinus appliziert wird. Vor Applikation in die Aorta wird das Blut mittels einer Perfusorspritze, die 2 mmol/ml K^+ enthält, mit K^+ versetzt.

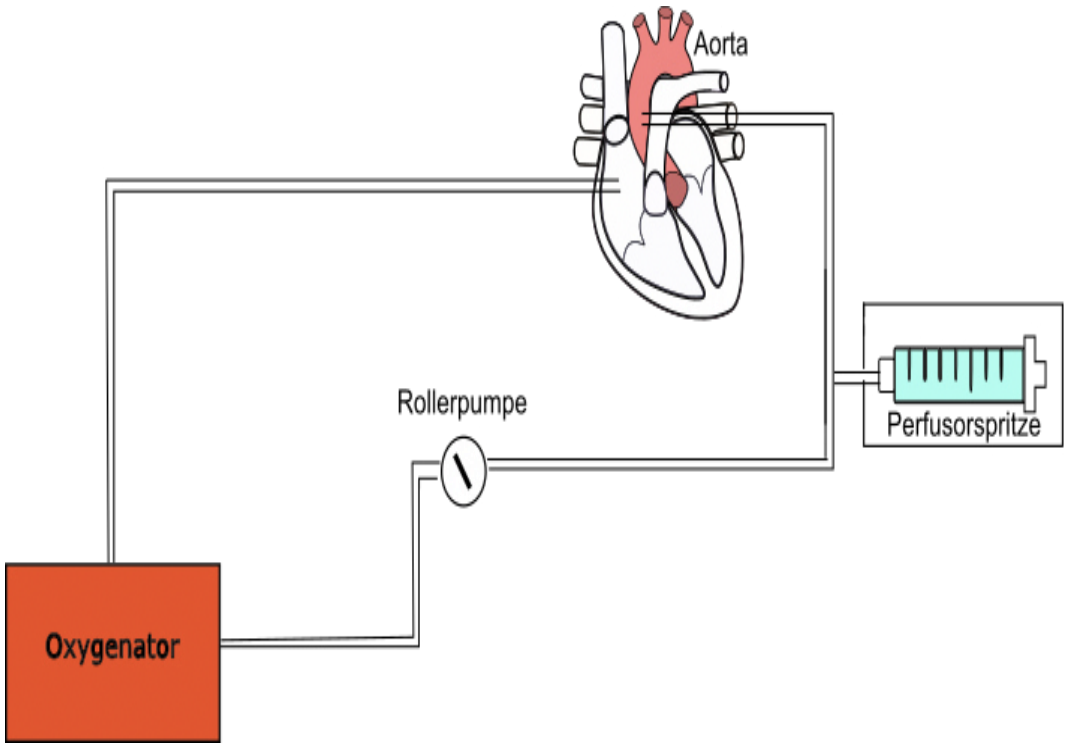


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Myokardprotektionsverfahrens nach CAL (nach Calafiore et al., 1995). O2 angereichertes Blut aus dem Oxygenator wird mittels Perfusorspritze mit K+ versetzt und nach erfolgter Abklemmung der Aorta in die Aortenwurze

Wenige Jahre später (1998) führten Caputo et al. eine randomisierte Studie durch, die Vorteile von Zugabe von Magnesium zur Calafiore-Blutkardioplegie gezeigt hat. Laut Caputo verhindert die Zugabe von Magnesium den intrazellulären Anstieg von Kalzium während der Ischämiephase (37). Deshalb enthält die heutige Calafiore-Kardioplegie Magnesium.

Zusammensetzung im Langendorf Modell

10ml 2M KCL 14,9 %

- K^+: 2,4 * 10^-3 mol
- Cl^-: 2,4 * 10^-3 mol

2ml $MgSO_4$, $7H_2O$, 50%

- $Mg_2^+(SO_4$^2-) 2,4 * 10^-3 mol

Temperatur bei Verabreichung: 37 °C

2.4 Verabreichung Möglichkeiten

Der Myokardschutz bei Herzoperationen hängt von einer adäquaten Versorgung aller Herzregionen mit einer Kardioplegie-Lösung ab. Es gibt mehrere Diskussionen über die Applikationsform und Dauer der Kardioplegie.

2.4.1 Die antegrade Perfusion

Hier kann die kardioplegische Lösung über den Koronararterien-Baum verabreicht werden. Der Operateur kann selektiv in den rechten, linken oder in beide Koronarostien die Kardioplegie verabreichen. Der Operateur kann auch direkt in die Aortenwurzel die Lösung applizieren. Es erzeugt schnell die erwünschte Asytolie und trägt zu einer guten Erhaltung der Herzfunktion bei.

2.4.2 Die retrograde Perfusion

Die retrograde Verabreichung der Kardioplegie verläuft über die Kanülierung des Sinus coronarius und daher über den venösen Koronarbaum retrograd bis an die Myokardzellen. Der Abfluss erfolgt über die Koronararterien und die Koronarostien in die Aorta ascendens.
V. L. Gott und Mitarbeiter beschrieben diese Technik im Jahre 1957 als erste, aber sie blieb weitestgehend ungenutzt, bis Solorzano und seine Kollegen in Toronto 1978 über ihre Erfahrungen berichteten. Danach hat sich die Technik weiterverbreitet (8).

Einen besonderen Wert hat die retrograde Perfusion für Klappenchirurgie, Re-Koronareingriffe und Verschluss der Hauptstammstenose der linken Koronararterie. Die retrograde Kardioplegie kann ohne Unterbrechung der Operation gegeben werden. Sie erleichtert den operativen Eingriff und schont das Myokard im Gegensatz zur antegraden Applikation der Kardioplegie, die eine selektive Applikation der Kardioplegie in die Koronarostien (Aortenklappenoperation) oder das Herunternehmen der Mitralklappenspreizer (Mitraloperation) verlangt.

Viele experimentelle Studien haben aber gezeigt, dass eine retrograde Kardioplegie mit einer unvollständigen Perfusion, einer verminderten funktionellen Erholung und einer beeinträchtigten Erhaltung des Energiestoffwechsels im rechten Ventrikel assoziiert ist (38).

2.4.3 Kombinierte antegrade und retrograde Perfusion

Hier wird die kardioplegische Lösung dauerhaft über den Sinus coronarius appliziert; alle 20 - 30 Minuten werden die Koronarostien antegrad perfundiert.

2.5 Ischämie-Reperfusionsschaden

Ein O_2-Mangel hat eine Einschränkung der ATP-Neubildung zur Folge. Die Energiegewinnung verläuft über anaerobe Glykolyse. Aber sie kann eine lange Ischämiedauer, die für eine

Herzoperation notwendig ist, nicht längerfristig kompensieren. Das entstandene Laktat kann aufgrund einer mangelnden Durchblutung nicht abtransportiert werden.
Darüber hinaus verschiebt sich der intrazelluläre pH-Wert durch Laktatakkumulation und notwendige Enzymfunktionen für die myozytäre Funktion werden inhibiert. Es entsteht eine Gewebeazidose. Die akkumulierten sauren Metabolite beschädigen nicht nur die Kardiomyozyten, sondern auch Endothelzellen der Koronarzikulation bis zu einer irreversiblen Zellschädigung.

Im Vergleich zur Ischämie allein fügt die zusätzliche Reperfusion den Endothelzellen großen zusätzlichen Schaden zu, da sie die Durchlässigkeit der Gefäße erhöht und Ödembildungen verursacht. Mikroskopisch gesehen zeigen sich umfangreiche Schädigungen mit Fehlstellung der Kardiomyozyten, Unterbrechung der Kapillaren, massiver intramyokardialer Blutung und mitochondrialer Schwellung.
Die Kerne der Endothelzellen zeigten ebenfalls Anzeichen von Zelltod. Maurits R. Hollander und sein Team vermuten, dass nach langer Ischämiezeit die Mikrozirkulation, die schon auf einen anaeroben Stoffwechsel angewiesen war, keine plötzliche Sauerstoffzufuhr verkraftet (39).

Bei Wiederherstellung der Durchblutung ist der Herzmuskel nicht in der Lage, seine Kontraktionsfähigkeit wiederherzustellen. Grund hierfür ist neben einem kalziumgetriggerten Sensibilitätsverlust der Myofilamente unter anderem auch eine Störung der mitochondrialen Funktion. Laut Studie scheint der Grund dafür ein Defekt im Elektronenfluss der Mitochondrien zu sein (40). Die Reperfusion provoziert oxidativen Stress, der das intrazelluläre Stickstoffmonoxid reduziert, wodurch seine kardioprotektive Wirkung aufgehoben wird (41).

Zum Zeitpunkt der myokardialen Reperfusion kommt es zu einem intrazellulären und intramitochondrialen überschüssigen Kalziumeinstrom, der zu einer Schädigung und einer oxidativen stressbedingten Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums führt. Die verursachte Hyperkontraktur der Herzzellen führt zum Zelltod (41).

Abbildung 5: Oxidative Stress in myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden

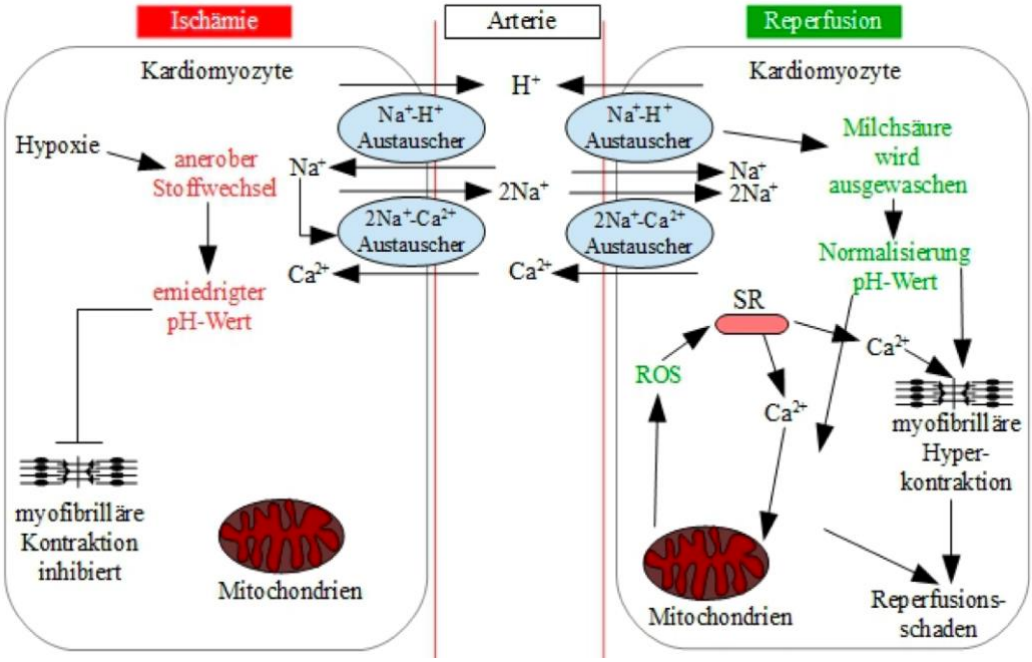


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung des Ischämie/Reperfusionsschaden in Kardiomyozyten im akuten Myokardinfarkt

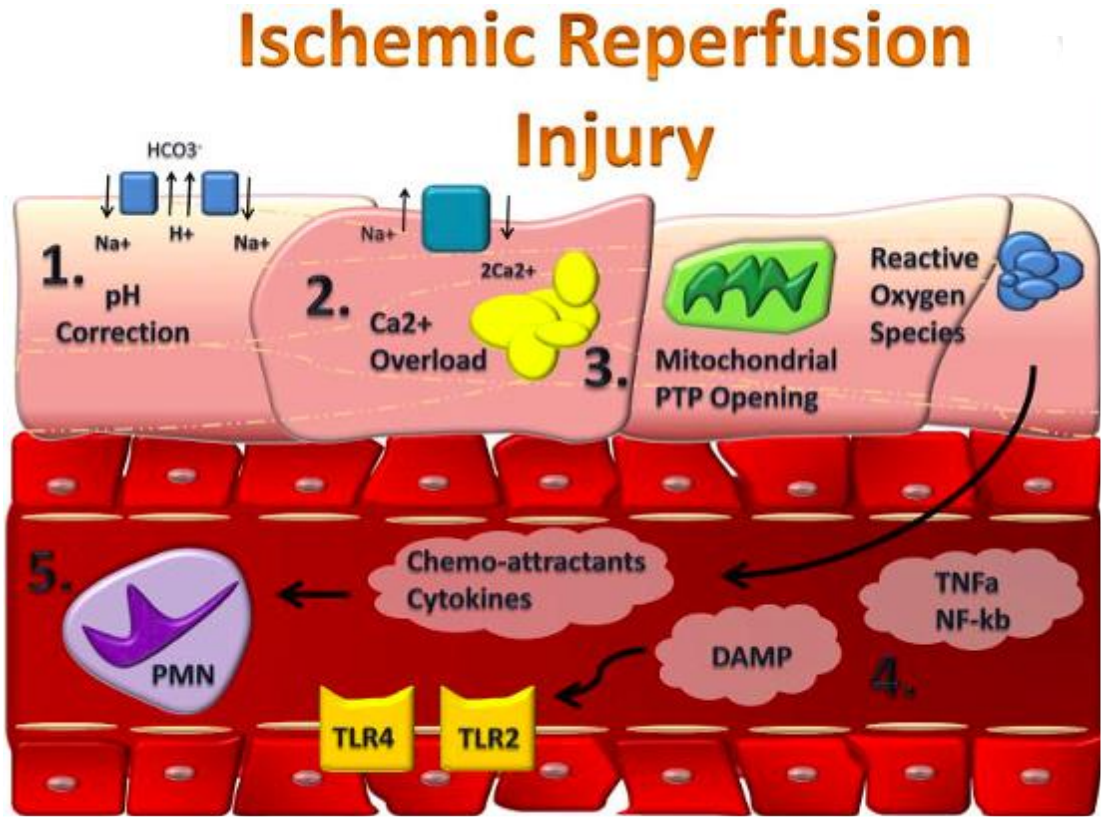


Abbildung 5.2: Mediators in Myocardial Reperfusion Injury Anja Frank and Co.: Myocardial ischemia reperfusion injury- from basic science to clinical bedside, Feb 2012, Figure 1

2.6 Messparameter der Ischämie-Reperfusionsschaden

Um die Effizienz einer kardioplegischen Lösung zu überprüfen, sollte man sich nach dem Ischämie-Reperfusionsschaden trotz Kardioplegie-Lösung richten. Dafür prüft man diverse Parameter wie:

- Hämodynamische Paramater: Blutdruck, Vor- und Nachlast, Koronarblutfluss
- Myokardiale Kontraktilität (dp/dt) zu Versuchsbeginn, vor Ischämie, alle 10 Minuten während der Reperfusion
- Laktatproduktion und Sauerstoffverbrauch des Myokards (arterio-venöse Differenz)
- Kapillarpermeabilität und mitochondriale Integrität

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Versuchstieren

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Ratten der Inzuchtlinie Wistar Hannover. Die Ratten waren drei Monate alt und stammten von der Firma Janvier, CS 4105 Le Genest-Saint-Isle, F-53941 Saint-Berthevin Cedex. Die Tiere wurden im Physiologischen Institut Gießen der Justus-Liebig-Universität gehalten. Dabei hatten sie freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden entsprechend dem deutschen Tierschutzgesetz gehalten.

Gruppe 1: Drei Monate alte Ratten, Calafiore-Blut-Kardioplegie

Gruppe 2: Drei Monate alte Ratten, Esmolol-Blut-Kardioplegie

Gruppe 3: Drei Monate alte Ratten, Esmolol-Kristalloide-Kardioplegie

3.1.2 Pharmaka zur Herstellung der Kardioplegie Lösung

Herstellung der Blutkardioplegie	**Hersteller**
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraction V pH7,0	GE Healthcare Bio-Sciences Austria GmbH, A-4061 Pasching
Brevibloc 10mg/ml	Baxter Deutschland GmbH
Calciumchlorid Dihydrat	Carl Roth GmbH + Co KG, D-76185 Karlsruhe
Carbogen 5 % CO2 95 % O2	Praxair Deutschland GmbH, D-40476
D-(+)-Glucose wasserfrei	Carl Roth GmbH + Co KG, D-76185 Karlsruhe
EDTA- Dinatriumsalz Dihydrat Titerkomplex III	Carl Roth GmbH + Co KG, D-76185 Karlsruhe
Gentamicin 160 mg/ml SF	Ratiopharm GmbH, D-89079 Ulm
Glutardialdehyd (GDA)	Carl Roth GmbH + Co KG, D-76185 Karlsruhe
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm	Ratiopharm GmbH, D-89079 Ulm
Insuman Rapid 40 I.E./ml	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH D-65926 Frankfurt

Isofluran Baxter	Baxter Deutschland GmbH
Kaliumchlorid 14,90 %	B. Braun, Melsungen AG, D-34209 Melsungen
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH und Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH und Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Magnesiumsulfat 50 % Inresa	Inresa Arzneimittel GmbH, D-79114 Freiburg
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Carl Roth GmbH und Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH und Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH und Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot H_2O$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO 63103
Phosphat-Gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO 63103
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), p.A.	SERVA Electrophoresis GmbH, D-69115 Heidelberg

3.1.3 Material und Geräte für die Herzperfusion

Organperfusion	**Hersteller**
Aortenkanüle aus Edelstahl ID: 1,5mm AD: 2,0mm	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH, D-79232 March-Hugstetten

Bluttransfusionsfilter SQ40SE	Haemonetics Corporation, MA-02184 Braintree
Brückenverstärker	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH, D-79232 March-Hugstetten
Druckaufnehmer Braun Combitrans	B. Braun, Melsungen AG, D-34209 Melsungen
Fiberoxygenator D150 73-3757	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH, D-79232 March-Hugstetten
Isoheart Software	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH, D-79232 March-Hugstetten
Isolated Heart ICH-SR Apparatus Type:844/1	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH, D-79232 March-Hugstetten
Lactat Photometer plus DP 110	Diaglobal GmbH, D-12555 Berlin
Latexballon Gr.5/6	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH, D-79232 March-Hugstetten
Perfusatbehälter, doppelwandig, 1,0 l	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH, D-79232 March-Hugstetten
Perfusor 11plus	Hugo Sachs Elektronik - Harvard apparatus GmbH, D-79232 March-Hugstetten
Schlauchpumpe Ismatec Reglo digital ISM 834/230	Ismatec-Idex Health und Science GmbH D-97877 Wertheim
Tygon Pumpenschläuche (ID: 3,18 mm)	Ismatec-Idex Health und Science GmbH D-97877 Wertheim
Wärmepumpe Ecoline Lauda E100	Lauda Dr. R Wobser GmbH und Co. KG D-97922 Königshofen
Rapidlab® 348	Siemens Healthcare GmbH, D-91052 Erlangen
Ethicon Prolene (Polypropylen) Stärke 0	Johnson & Johnson Medical N.V./S.A., D-22851 Norderstedt
Herstellung der Schnitte & Mikroskopie	**Hersteller**
BioShake® IQ	Quantifoil Instruments GmbH, D-07749 Jena
Integrierte 3MP-Kamera Leica IC80 HD Kamera & SW Kit	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, D-35578, Wetzlar
Leica Application Suite Version 4.6.0	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, D-35578, Wetzlar
Low Profile Microtome Blades, DB80 LS	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, D-35578, Wetzlar
Objektträger 76 x 26 mm	R. Langenbrinck, D-79312 Emmendingen

Ringlicht Leica LED3000 RL, 58 mm	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, D-35578, Wetzlar
Stereomikroskop Leica M60	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, D-35578, Wetzlar

3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Materialien	**Hersteller**
Frischhaltefolie	PAPSTAR GmbH, D-53925 Kall
Konisches Röhrchen 15 ml, Polypropylen, Falcon™	BD Biosciences, Bedford, MA 01730 USA
Pipettenspitze 1000 µl, blau	Sarstedt Aktiengesellschaft und Co., D-51588 Nümbrecht
Pipettenspitze 5000 µl	Eppendorf AG, D-22331 Hamburg
SafeSeal Gefäß 1,5 ml, braun	Sarstedt Aktiengesellschaft und Co., D-51588 Nümbrecht

4 Methode

4.1 Blutaufbereitung

Das Rinderblut wird einmal in der Woche aus einem Schlachthof der Region gesammelt. Zunächst wird das Blut mit 1,5ml Heparin (250000 I.E) pro Liter gemischt, um die Koagulation zu vermeiden.

Das Blut wird mindestens dreimal für jeweils fünf Minuten zentrifugiert. Zwischen jeder Zentrifugierung wird der Überstand abgesaugt und der Rest mehrmals mit 0,9 % NaCl gewaschen. Das Erythrozytenkonzentrat wird in einem Verhältnis von 1:1 mit 0,9 % Nacl versetzt. Es wird Gentamycin hinzugegeben, um die Keimvermehrung zu verhindern.

Zum Schluss wird das Konzentrat durch einen Transfusionsfilter in eine Glasflasche gefüllt und im Kühlschrank bei 8 °C gelagert.

- Blutperfusat

Das davor präparierte Konzentrat wird erneut dreimal bei 1500 g für drei Minuten zentrifugiert. Das entstandene Konzentrat wird mit Langendorff-Puffer gewaschen und im Verhältnis 1:1 mit einem LD/BSA-Puffer versetzt. Der BSA-Puffer wird vorbereitet, indem man 250 ml des Langendorf-Puffers mit 5g bovinem Serumalbumin (BSA) und 1 IE Insulin zubereitet.

Zur pH-Korrektur des Blutperfusats vor Versuchsbeginn werden 10-15 ml einer Bicarbonat-Lösung aus 100 ml des LP und 1,3 g Natriumhydrogencarbonat hinzugegeben. Zum Schluss wird das Perfusat mehrmals mit Carbogen begast, um einen pH-Wert von 7,33-7,40 zu erreichen.

- Rezeptur Langendorff-Puffer

2,5l Aqua dest. + 20,25 g NaCl + 8,1 g Glukose. Dieses Gemisch wird mit Carbogen begast.

505 ml Aqua dest. + 6,8 g Natriumbicarbonat ansetzen und zugeben.

Dazu: 50 ml $CaCl_2$	(21,96 g/l)	MW 147,02 g/mol
50 ml KCL	(17,25 g/l)	MW 74,56 g/mol
50 ml $MgSO_4$	(19,1 g/l)	MW246,48 g/mol
50 ml $KH2PO_4$	(10,7 g/l)	MW136,09 g/mol
50ml NaEDTA	(12,21 g/l)	MW 372,24 g/mol

durch POR-1-Filter in Flaschen abfüllen und im Kühlschrank bei 8 °C lagern.

- Rezeptur BSA Puffer

250 ml Langendorff-Puffer + 5 g BSA + 1 Tropfen Insulin vermengen und mit dem Magnetrührer vermischen.

- LD Puffer

1,3 g Natriumbicarbonat + 100 ml LD-Puffer zur pH-Korrektur vermengen

- Kristalloidperfusat

Es wurden je nach Bedarf des Herzens zwischen drei und fünf Liter der Bikarbonat-gepufferte Perfusionslösung angesetzt.

	mM	g für 1l Ansatz	g für 5l Ansatz
NaCl	140	8,18	40,9
KCl	2,7	0,2	1
$NaH_2PO_4*H_2O$	0,4	0,055	0,275
$MgCl_2*6H_2O$	1	0,2	1
Glucose	5	0,99	4,95
$CaCl_2*2H_2O$	1,8	0,26	1,3
$NaHCO_3$	24	2,02	10,1

4.1.1 Vorbereitung der Ratten und Organentnahme:

Die Ratten wurden vom Tierstall ins Labor überführt und hatten Zeit, sich dort an die neue Umgebung zu gewöhnen. Im Labor wurden die Ratten durch eine Inhalationsnarkose mit 1 ml Isofluran betäubt. Danach bekamen sie eine Injektion von 2500 IE Natrium-Heparin intramuskulär, um intrakoronare Thrombenbildung zu vermeiden. Um die Narkosetiefe zu überprüfen, wurde der Cornealreflex getestet. Nachdem der Cornealreflex erloschen war, wurden die Ratten durch Genickbruch getötet. Direkt im Anschluss begann die Entnahme des Herzens. Dabei wurden durch einen Schnitt das Abdomen und der Thorax durch das Diaphragma geöffnet. Das Herz wurde an der Aorta abgesetzt und sofort in kalte NaCl-Lösung überführt. Dort wurde das Herz für den Langendorff-Apparat präpariert. Dabei wurden

mögliche Reste von Perikard, Thymus oder Bindegewebe entfernt, das linke Atrium geöffnet und die LAD dargestellt. Das Herz wurde danach an den Langendorff-Apparat angeschlossen indem der Aortenstumpf mit einem Faden an der Aortenkanüle befestigt wurde. Anschließend begann die Versorgung des Herzens mit dem Blutperfusat druckkonstant mit 70 mmHg und bei einer konstanten Temperatur von 37 °C. Ein Latexballon zur Druckaufnahme wurde über das geöffnete linke Atrium in den linken Ventrikel geschoben und dort fixiert.

4.1.2 Langendorff-Apparat

Das Prinzip der Perfusion isolierter Rattenherzen nach O. Langendorff stammt aus dem Jahr 1895. Der Physiologe Oskar Langendorff (1853-1908) entwickelte ein Verfahren zur physiologischen Untersuchung isolierter schlagender Tierherzen.
Dabei wird ein zuvor freipräpariertes Säugetierherz über den Aortenstumpf fixiert und retrograd perfundiert. Der Vorteil daran ist, dass der resultierende Perfusionsdruck den Verschluss der Aortenklappe ermöglicht, wie es auch unter physiologischen Bedingungen am Herzen zu beobachten ist. Dadurch wird das Perfusat, ohne vorher in den linken Ventrikel umgeleitet zu werden, direkt in die Koronararterien abfließen und das Myokard kontinuierlich versorgt.
Unter diesen Bedingungen bleibt das Reizleitungssystem intakt und das Herz kann problemlos spontan wieder zu schlagen anfangen. Die Herzkammern bleiben leer und das infundierte Perfusat fließt über den Sinus coronarius im rechten Vorhof ab (42).
Mithilfe des Langendorff-Apparats können sämtliche Parameter und synthetisierte Mediatoren des isolierten Herzens gemessen werden.

Der grundlegende Aufbau des Langendorff-Apparats

Der Langendorff-Apparat ermöglicht eine offene Perfusion. Er besteht aus:

- einer geschlossenen Kammer. Sie wird über einen Warmwasserkreislauf auf 37 °C aufgeheizt.
- einem Reservoir. Durch dieses gelangt das mit Carbogen-Sauerstoff begaste Perfusat durch einen Wärmetauscher, der dieses auf 37 °C bringt, über eine Perfusionskanüle aus Edelstahl (ø innen 1,8 mm; außen 3,0 mm) in die Herzen.
- einer Hahnenbank. Sie hilft, unterschiedliche Perfusate aus den verschiedenen Reservoiren zuzuführen.
- einer Blasenfalle. Sie verhindert Lufteinschlüsse in den Herzen.

- einem Trichter, der das Perfusat, nachdem es das Herz passiert hat, auffängt. Siehe Abb. 6.1

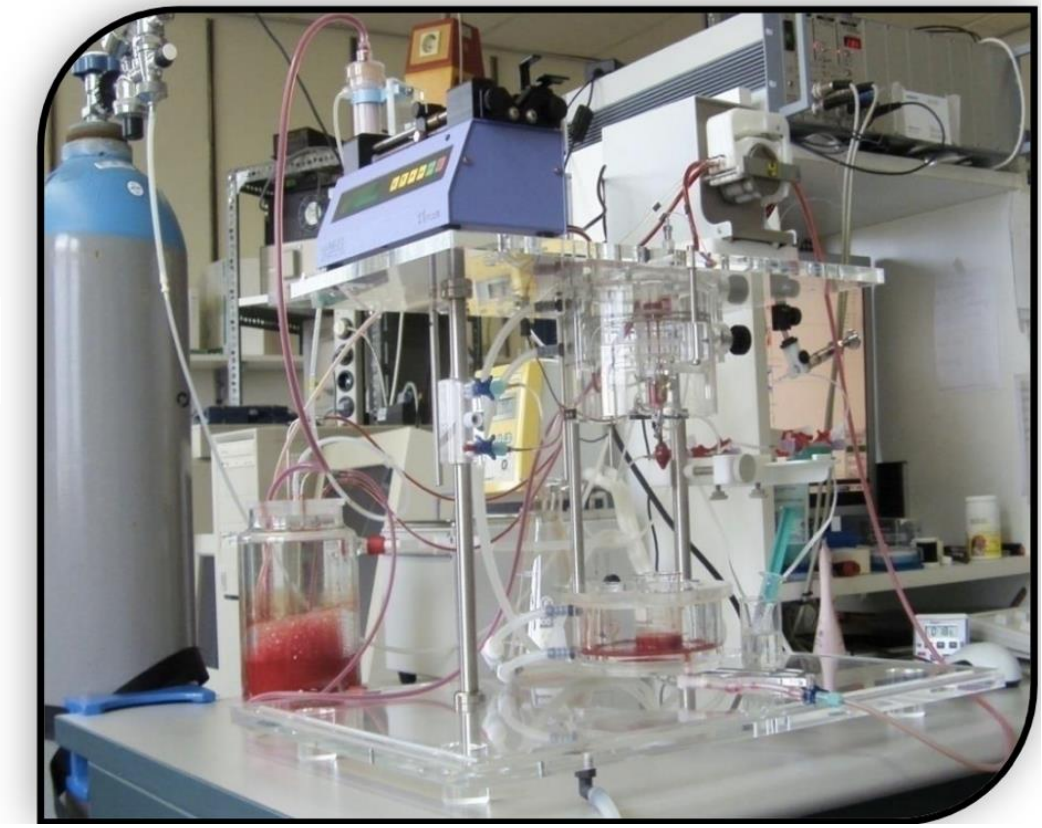


Abbildung 6.1: Langendorff-Modell

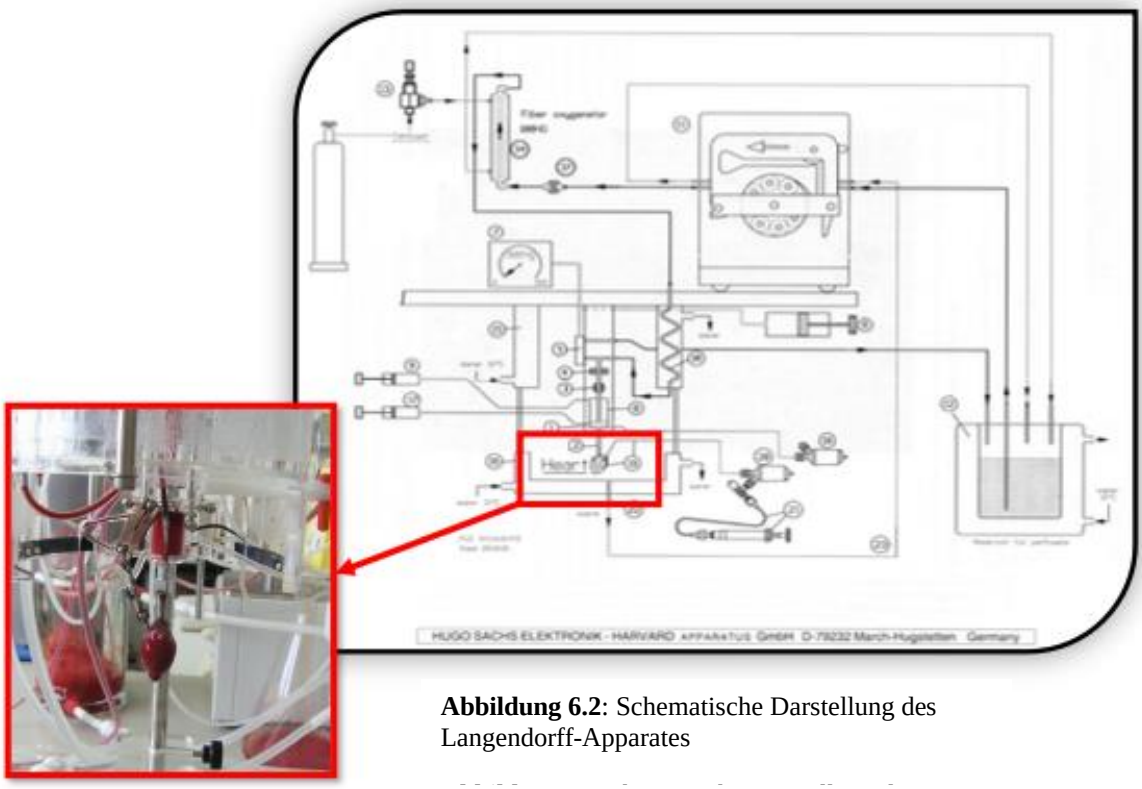


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung des Langendorff-Apparates

4.1.3 Versuchsaufbau

Das zuvor entnommene Rattenherz wird in einer 38 °C warmen doppelwandigen Plexiglas-Organkammer über die Aorta fixiert und mit dem Blutkonzentrat mit einem konstanten Druck von 70 mmHg perfundiert.

Nachdem das warme Blut den Perfusatbehälter verlässt, erreicht es mit Hilfe eines Schlauchsystems und einer Rollenpumpe das Herz. Dadurch wird das Koronarstrombett mit oxygeniertem Blut versorgt. Der Langendorff-Apparat verfügt über ein Kreislaufsystem, das einerseits der Oxygenierung des Blutes dient, sodass die Blutlösung einen PO_2 von 76-215 mmHg, PCO_2 von 38-52 mmHg und einen pH-Wert von 7,4 erreicht, und andererseits der Durchblutung des Herzes dient.

Der Latexballon, der sich im linken Ventrikel befindet, übernimmt die linksventrikuläre Druckmessung und die Bestimmung der maximalen LVD-Geschwindigkeit (dP/dtmax).

Das Blut, das in der Organkammer durch die Öffnung am rechten Vorhof tropft, wird für die venösen Proben entnommen und zurück in den Perfusatbehälter befördert.

Für die arteriellen Proben wurde das Blut über den Dreiwegehahn hinter der Organkammer entnommen. Der koronare Perfusionsdruck (CCP) wird über die Aortenkanüle gemessen, aber konstant auf 70 mmHg gehalten, der Koronarfluss ist herzabhängig.

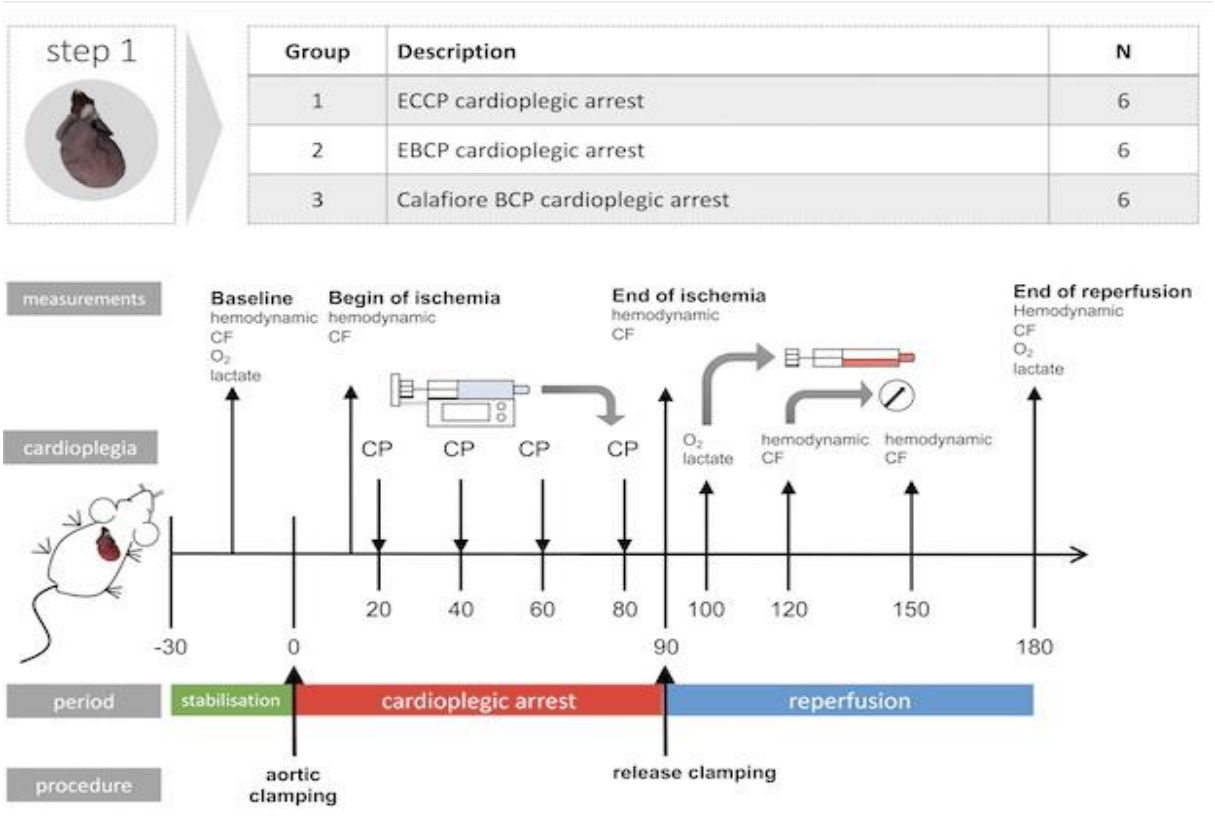
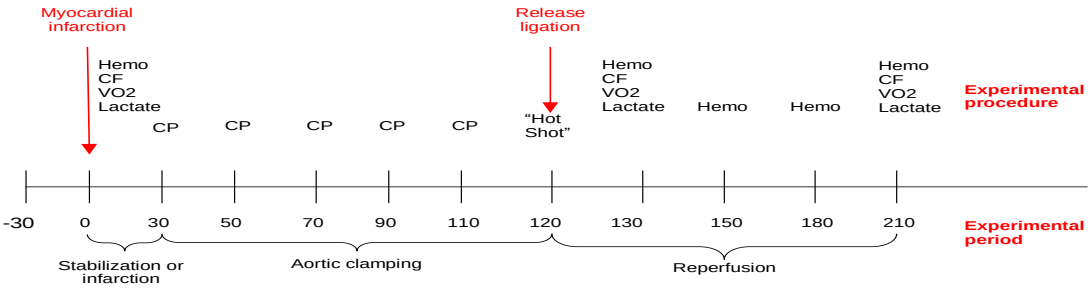


Abbildung 7: Versuchaufbau und Verlauf

4.1.4 Versuchsablauf

Das Ziel dieses Versuchs ist, mit Hilfe des Langendorff-Apparats den Ablauf eines kardiochirurgischen Eingriffs zu simulieren. Mit Hilfe der kardioplegischen Lösung wird versucht, das Outcome des Herzens nach einer langen Ischämiezeit zu verbessern.



0 Minuten: Perfusion des schlagenden Herzens mit warmem, oxigeniertem gepuffertem Blut bzw. mit der kristalloiden Lösung

30 Minuten: Beginn der Ischämiephase mit Gabe der kardioplegischen Lösung

120 Minuten: Ende Ischämie, Beginn Reperfusion

210 Minuten: Versuchsende, Abwaschen des Herzes mit NaCl, Fixierung des Präparates

- **Perfusionsphase**

Das präparierte Herz wird über dem Aortenstumpf kanüliert und an den Perfusionsapparat angeschlossen. Der Latexballon wird über den freigelegten linken Vorhof in den linken Ventrikel eingebracht. Er sichert danach einen konstanten linksventrikulären Druck von 70 mmHg.

Die retrograde Perfusion des Herzens kann dann anfangen. Das Herz wird 30 Minuten mit warmem (37 °C) oxygenierten Blut versorgt.

- **Ischämiephase**

Nachdem die Herzen bis zu 30 Minuten hämodynamisch stabil waren, folgt die Blockierung des arteriellen Blutflusses durch die Klemmung der Aorta. Die Aortaklemmphase dauert 90 Minuten, während derer die kardioplegische Lösung alle 20min verabreicht wird.

- **Verabreichung der Kardioplegie**

Calafiore Blutkardioplegie

Man nimmt zuerst aus dem Blutbehälter 20 ml warmes Blut und versetzt es mit 150 µl des Kalium/Magnesium-Gemisches.

Die daraus resultierende Lösung wird über einen Perfusor bei konstanter Flussrate über zwei Minuten gegeben. Gleichzeitig wird die Bolusgabe von 150 µl Kalium/Magnesium-Gemisch über den Dreiwegehahn appliziert.

Die weitere Gabe der Kardioplegie erfolgt mithilfe eines Perfusors alle 20 Minuten über zwei Minuten mit 42 ml Blutperfusat + 225 µl Kalium/Magnesium-Lösung. Der Perfusor ist so eingestellt, dass zu der Baseline des Koronarflusses zusätzlich 30 % der Baseline addiert wurden.

Esmolol Blutkardioplegie

Zur Herstellung des Kardioplegie-Perfusats werden 100 ml Blutperfusat mit 3 ml Breviblock gemischt. Das Gemisch wird mithilfe eines Perfusors bei konstanter Flussrate über zwei Minuten alle 20 Minuten verabreicht. Die Perfusorgeschwindigkeit ist auf 30 % mehr Fluss als dem präoperativen gemessenen Fluss eingestellt.

Esmolol Kristalloidkardioplegie

Die Esmolol-kristalloide-kardioplegische-Lösung wurde aus der Gabe von 3 ml Brevibloc zu 100 ml Kristalloidperfusat hergestellt. Die Infusion der kardioprotektiven Lösung erfolgte alle 20 Minuten über 2 Minuten mit einer Perfusorrate von 30 %.

- **Reperfusion**

Nach Ablauf der 90 Minuten wurde der Blutfluss zum Herzen wieder freigegeben und eine 90-minütige Reperfusionsphase begann. Während der Reperfusion wurde nach 10, 30, 60 und 90 Minuten der Blutfluss in ml/min gemessen. Ebenso wurde der Sauerstoff- und Laktatgehalt des Blutes arteriell und venös gemessen.

- **Fixierung**

Nach Ablauf der Reperfusion wurde das Versuchstierherz mit NaCl gewaschen, bis die abgetropfte Lösung klar wurde. Das Herz wurde dann vom Langendorff-Apparat entkoppelt und schnell in einen anderen Raum zur Fixierung gebracht.

Die Fixierung erfolgte durch vaskuläre Perfusion über die Aortenkanüle mit einem Konzentrat, bestehend aus 1,5 % Glutaraldehyd und 1,5 % Paraformaldehyd in 0,15 M Hepes-Puffer, flusskonstant (Koronarfluss + 30 %) über ca. fünf Minuten. Das Präparat wurde in dieser Konzentration eingelegt im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

Die Anfertigung, Färbung und Untersuchung der Schnitte wurden von Herrn Prof. Dr. Christian Mühlfeld aus dem Institut für Funktionelle und Angewandte Anatomie der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Um jedem Teil des linken Ventrikels die gleiche Chance auf Eintritt in die Analyse zu geben, erfolgte die Probenentnahme aus dem linken Ventrikel durch systematic uniform random sampling (43), bevor die Herzen erneut in 0,15 M Hepes-Puffer gewaschen wurden.

Danach erfolgte die Postfixierung in Osmium-Tetraoxid sowie nochmaliges Waschen mit destilliertem Wasser und die Blockkontrastierung in wässrigem Uranylacetat. Nach dieser chemischen Fixierung wurde das entstandene Präparat in einer aufsteigenden Acetonreihe entwässert und letztendlich in Epoxidharz eingebettet. Am Ende folgte die Anfertigung der Ultradünnschnitte an einem Ultramikrotom und die Nachkontrastierung der Präparate mittels Bleicitrat und Uranylacetat.

4.1.5 Erfassung Physiologische Parameter

Nach der Euthanasie wurden die Herzen von 18 Ratten schnell exzidiert, kanüliert und in einen blutdurchströmten, isolierten Herzapparat eingesetzt. In jeder Gruppe wurden entweder Calafiore-Blutkardioplegie (CBCP), Esmolol-Blutkardioplegie (EBCP) oder Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie (ECCP) für eine Aortenklemmzeit von 90 Minuten verabreicht. Während der Reperfusion wurden funktionelle Parameter aufgezeichnet: koronarer Blutfluss, linksventrikulärer Entwicklungsdruck (LVDP) und Kontraktilität (dp/dt max), Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion. Die Ergebnisse wurden relativ zur Baseline (BL) ausgedrückt und mit der statistischen Software SPSS Version 24 analysiert. Die Daten werden als Mittelwert +/- SD angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit einem p-Wert von $p<0,05$ angenommen.

Laktat und Sauerstoffverbrauch

Der arterielle und venöse myokardiale Laktat- und Sauerstoffgehalt wurde mithilfe des Blutgasanalysegerät in der Blutprobe gemessen.

Der myokardiale Sauerstoffverbrauch wurde gemäß der Standardformel berechnet.

$$MVO_2\left[\frac{\text{ml O2}}{\text{min}}\right] = (cO_{2a}\left[\frac{\text{ml O}_2}{\text{dl}}\right] - cO_{2v}\left[\frac{\text{ml O}_2}{\text{dl}}\right]) \cdot Fluss\left[\frac{\text{ml}}{\text{min}}\right] / 100\frac{\text{ml}}{\text{dl}}$$

cO_2a: Sauerstoffgehalt des arteriellen

cO_2v: Sauerstoffgehalt des venösen Bluts multipliziert mit dem jeweiligen

Fluss: Koronarer Blutfluss

Anhand der arteriellen (cLaca) und venösen (cLacv) Werte des Laktas kann die myokardiale Laktatproduktion (MLac) errechnet werden, indem die Differenz mit dem für den Zeitpunkt der Messung errechneten Flusses multipliziert wird:

$$Mlac\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{min}}\right] = (cLac_a\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}\right] - cLac_v\left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{ml}}\right]) \cdot Fluss\left[\frac{\text{ml}}{\text{min}}\right]$$

Linksventrikulärer Druck (LVdP)

Der in den linken Ventrikel eingebrachte Latexballon misst den aus der Differenz zwischen systolischen und diastolischen linksventrikulären Druck entwickelte LVdP. Der Druck wird über ein Schlauchsystem und Druckaufnehmer, der an den Ballon angeschlossen ist, an den Computer weitergeleitet.

Maximale (dLVP/dtmax) und minimale Relaxationsgeschwindigkeit (dLVP/dtmin)

Um die Werte für $dLVP/dt_{max}$ und $dLVP/dt_{min}$ zu erhalten, leitet man den LVdP nach der Zeit hin ab.

Herzfrequenz

Sie wird aus dem Abstand zwischen den systolischen Druckspitzen ermittelt.

Blutfluss

Er wurde durch Auszählen der Perfusattropfen aus dem Koronarsinus gemessen.

4.1.6 Erfassung elektromikroskopischen Parameter

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen konnten die zellulären Veränderungen am Myokard durch kardioplegische Lösungen während der Ischämie- und Asystoliephasen gezeigt werden. Die Elektronenmikroskopie wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Mühlfed durchgeführt.
Die postischämischen Schäden konnten erfasst werden durch:

Zellulärer Ödemindex der Mitochondrien

Aufgrund des Sauerstoffmangels entstehen im Myokard Radikale, die zur Schwellung und Zerstörung der Zelle führen (44). Die Bestimmung der Volumenveränderung der Zelle kann zur Quantifizierung der ischämischen Schäden beitragen.

Die Berechnung des zellulären Ödem-Index wurde aus der Volumendichte von Mitochondrien, Sarkoplasma und Myofibrillen gemäß dieser Gleichung errechnet:

$$CEI = \mathrm{Vv}\left(\frac{\text{Mitochondrien}}{\text{Myozyten}}\right) + \frac{\mathrm{Vv}\left(\frac{\text{Sarkoplasma}}{\text{Myozyten}}\right)}{\mathrm{Vv}\left(\frac{\text{Myofobrillen}}{Myozyten}\right)}$$

Ratio der mitochondrialen Volumina zu Oberflächenverhältnis der Mitochondrien (Sv-Ratio)

Zellatmung und mitochondriale Funktion sind aneinandergekoppelt. Störungen dieser Balance durch Ischämie und Reperfusionsschäden verursachen eine Reduktion der Mitochondrienfunktion sowie eine Steigerung der Vulnerabilität der Mitochondrien im Zuge der Öffnung der MPTP (mitochondrial permeability transition pore) und der Schwellung der Mitochondrien (45).
Zur Bewertung der mitochondrialen Schwellung benutzt man die Sv-Ratio.
Die Sv-Ratio ergibt sich aus der Ableitung der Mitochondrienschwellung zu dem Volumen-Oberflächenverhältnis der Mitochondrien, wobei das Volumen der Mitochondrien ins Verhältnis zu ihrer Oberfläche gesetzt wird.

$$SvRatio = \mathrm{Vv}\left(\frac{\text{Mitochondrien}}{\text{Myozyten}}\right) / Sv\left(\frac{\text{Mitochondrien}}{\text{Myozyten}}\right)$$ [Einheit: 1/µm]

$Sv = \frac{2 * \text{intersection}}{\text{LT}}$ [Einheit: 1/µm]. LT= Gesamtlänge der Testlinien auf Myozyt

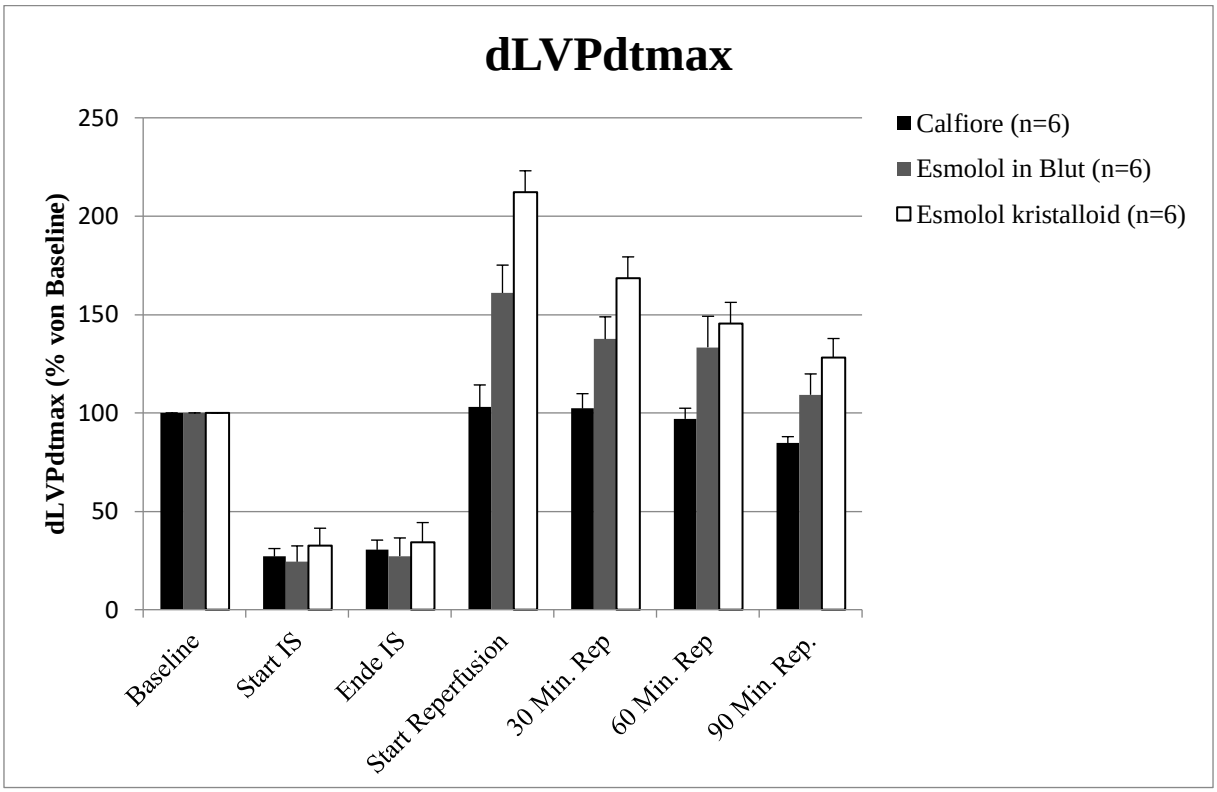
$L_T = Punkte\ Myozyt\ x\ \left(\frac{l_T}{2}\right)$

$$\mathrm{L_T}_{(\mu m)} = \frac{\text{Testlinien in Cm} * \text{Bildbreite in um}}{\text{gesamte Bildbreite in cm}}$$

5 Ergebnisse

5.1 Hämodynamische Parameter

Grafik 1: Kontraktilität Linken Ventrikel

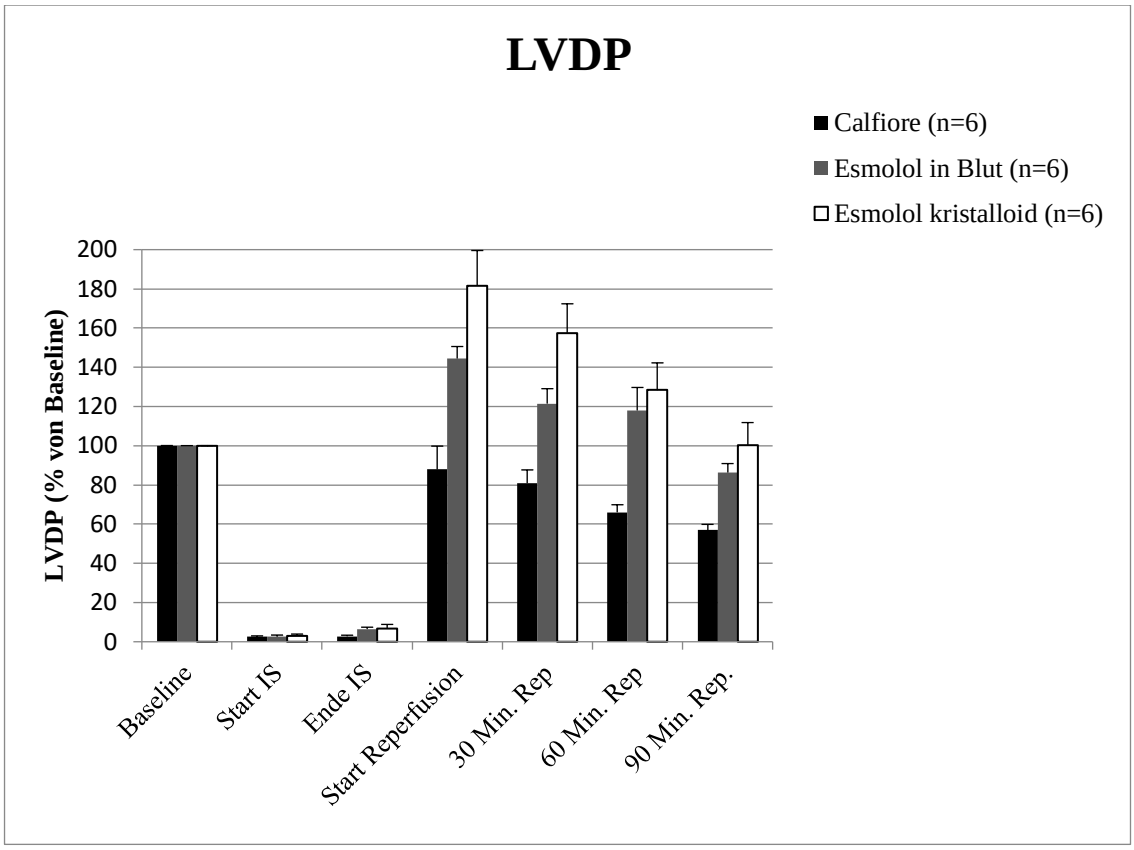


Darstellung der Kontraktilität des linken Ventrikels (dLVPdtmax) in % von Baseline in der jeweiligen Kardioplegie Gruppe zu verschiedenen Messzeitpunkten.

Ein großer Unterschied der dLVPdtmax zwischen Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie, Esmolol-Kardioplegie in Blut und Calafiore-Kardioplegie zeigt sich bei Start der Reperfusion.

Die Kontraktilität des linken Ventrikels, gemessen an dLVPdtmax, ist am besten nach Gabe von kristalloider Esmolol-Kardioplegie erhalten, gefolgt von der Gabe von Esmolol-Blutkardioplegie und Calafiore-Kardioplegie. Dies trifft für alle Messzeitpunkte (Graf. 1) mit ECCP mit dp/dt max. 128 +/- 10 % des Ausgangswertes als mit EBCP (dp/dt max. 109 +/- 11 % des Ausgangswertes) oder mit CBCP (dp/dt max. 85 +/- 3 % des Ausgangswertes) zu.

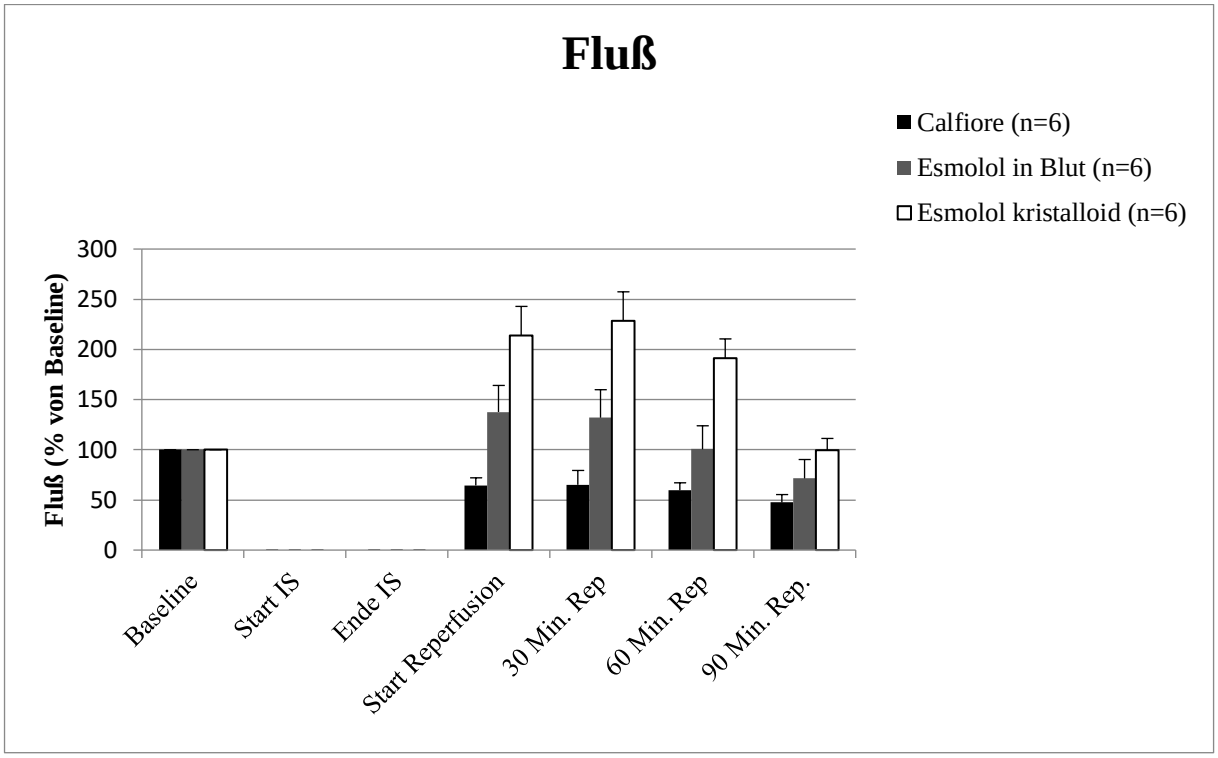
Grafik 2: Linksventrikulärer Druck



Darstellung des linksventrikulären Drucks (LVDP) in % von Baseline in der jeweiligen Kardioplegie Gruppe zu verschiedenen Messzeitpunkten.

Mit Beginn der Reperfusion steigt LVDP in jeder Versuchsgruppe. Der Druck des linken Ventrikels, gemessen an LVDP, ist am besten nach Gabe von kristalloider Esmolol-Kardioplegie erhalten, gefolgt von der Gabe von Esmolol-Blutkardioplegie und Calafiore-Kardioplegie. Dies trifft für alle Meßzeitpunkte (Graf.2) mit ECCP (LVDP 100 +/- 11 %) des Ausgangswertes als mit EBCP (LVDP 86 +/- 5 % des Ausgangswertes) oder mit CBCP (LVDP 57 +/- 3 % des Ausgangswertes) zu.

Grafik 3: Coronarfluß

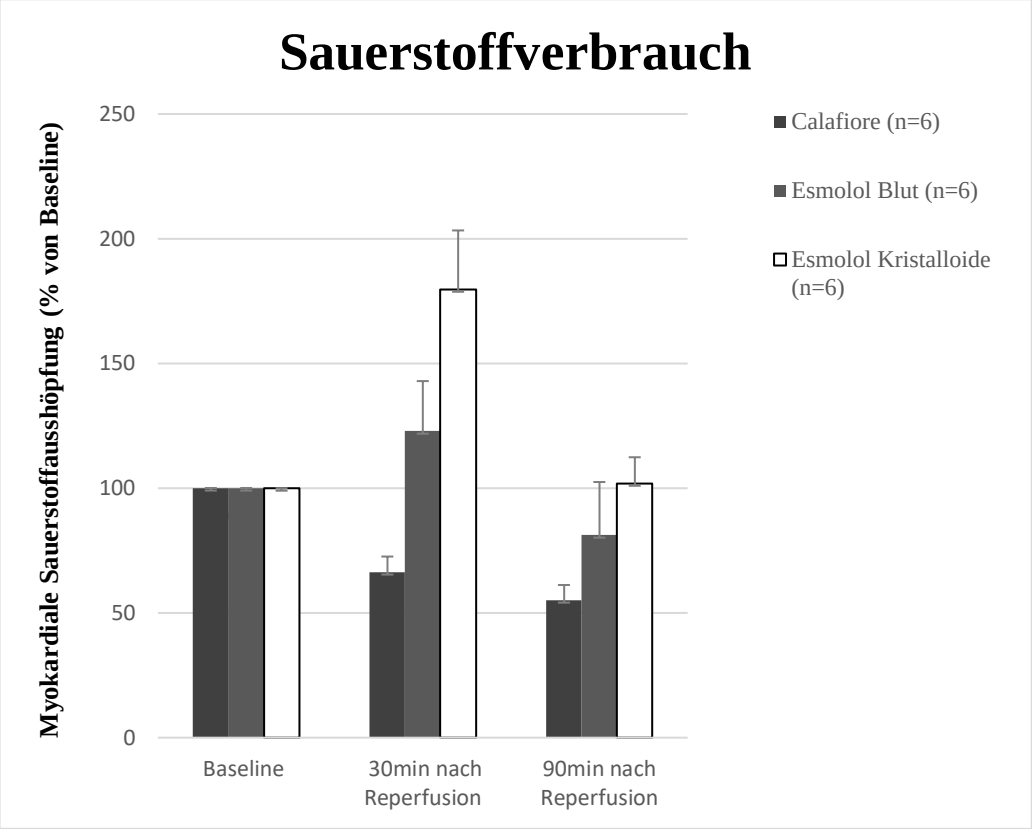


Darstellung der Coronarfluß in % von Baseline in der jeweiligen Kardioplegie Gruppe zu verschiedenen Messzeitpunkten.

Gemessen an der Flussentwicklung ist die Koronardurchblutung nach der Reperfusion am besten nach der Gabe von kristalloider Esmolol-Kardioplegie erhalten, gefolgt von der Gabe von Esmolol-Blutkardioplegie und Calafiore-Kardioplegie für alle Meßzeitpunkte (Graf. 3). Dementsprechend war der Koronarfluss mit ECCP (CF 99 +/- 12 % des Ausgangswertes) besser erhalten als mit EBCP (CF 71 +/- 20 % des Ausgangswertes) oder mit CBCP (CF 48 +/- 8 % des Ausgangswertes).

5.2 Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion

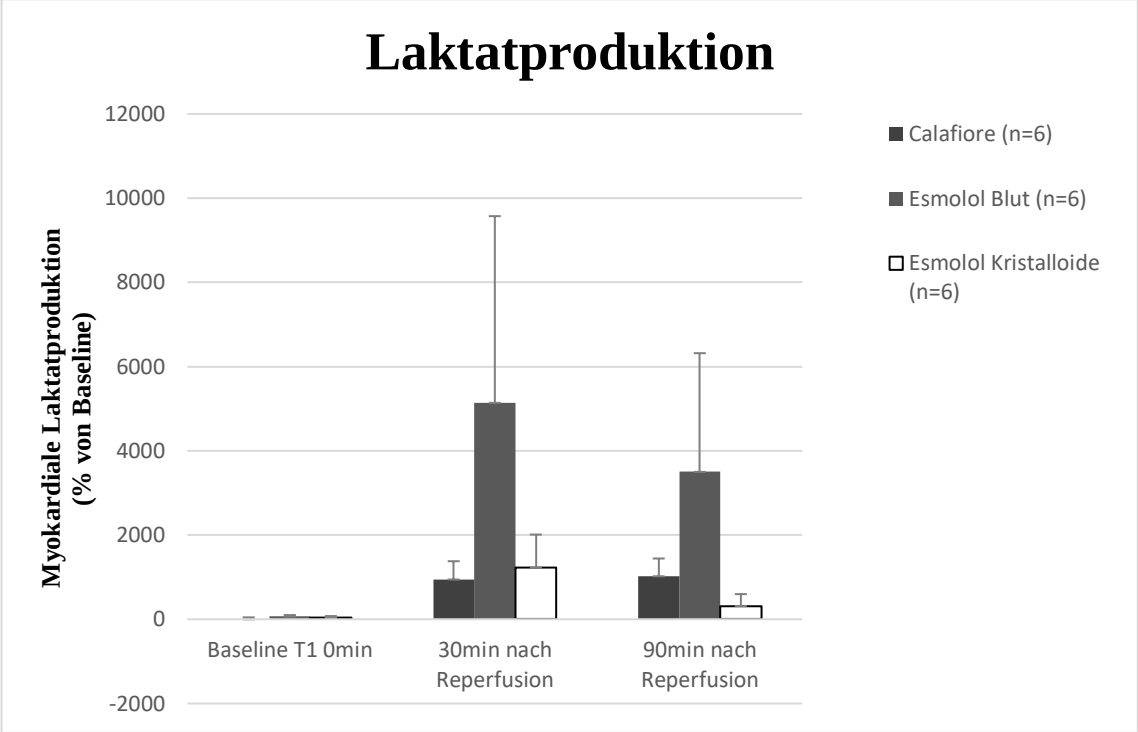
Grafik 4: Sauerstoffverbrauch nach Reperfusion



Darstellung der Sauerstoffverbrauch in % von Baseline in der jeweiligen Kardioplegie Gruppe nach Reperfusion.

Wenn man den Sauerstoffverbrauch aller Gruppen vergleicht, kann festgestellt werden, dass die Sauerstofferschöpfung am besten nach Gabe von der Esmolol-kristalloide-Kardioplegie erhalten ist, gefolgt von der Gabe von Esmolol-Blut und Calafiore-Kardioplegie für alle Meßzeitpunkte (Graf. 4).

Grafik 5: Laktatproduktion



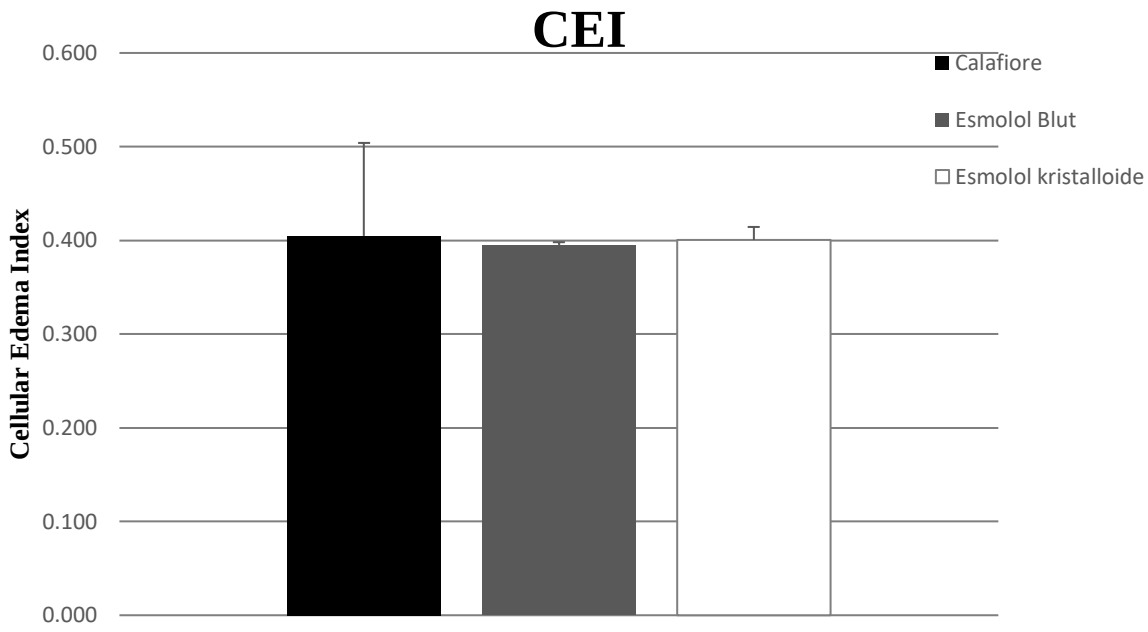
Darstellung der Laktatproduktion in % von Baseline in der jeweiligen Kardioplegie Gruppe nach Reperfusion.

Die Laktatproduktion zeigte den höchsten Anstieg nach Gabe der Esmolol-Blut-Kardioplegie. Der arteriovenöse Laktatunterschied war 90 Minuten nach CBCP- und ECCP-Gabe sehr niedrig, aber am höchsten nach EBCP.

5.3 Elektromikroskopische Untersuchung

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und Morphometrie wurden zwei Parameter zur Quantifizierung des Grades der Ischämie/Reperfusionsschädigung der Kardiomyozyten bestimmt: Ein zellulärer Ödemindex (CEI), der bei einer Schwellung der Kardiomyozyten ansteigt, und das Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Mitochondrien (VS-Verhältnis), das einen geeigneten Parameter zur Beurteilung der ischämieinduzierten Schwellung der Mitochondrien darstellt.

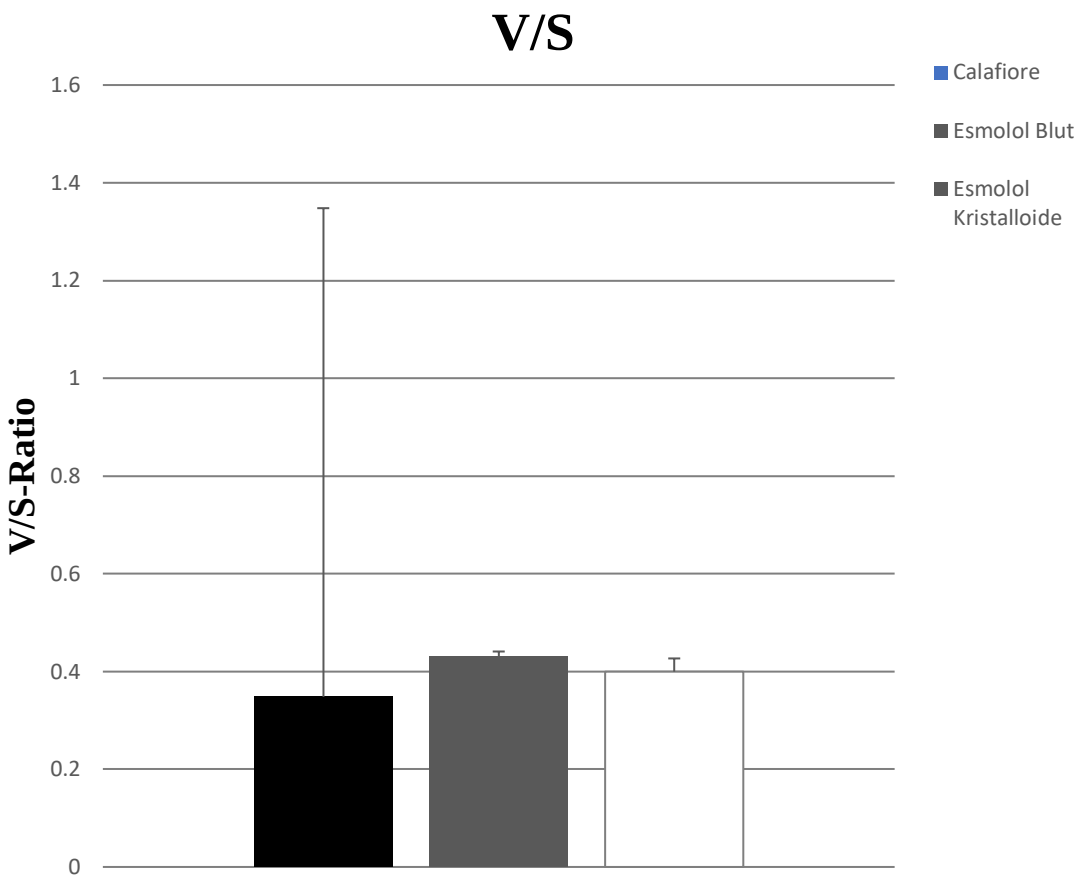
Grafik 6: Zellulärer Ödemindex



Darstellung des zellulären Ödemindex (CEI) der Kardiomyozyten in der jeweiligen Kardioplegie Gruppe.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den drei Gruppen nicht.

Grafik 7: Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Mitochondrien



Darstellung des Volumen/Oberflächenverhältnisses (V/S) der Mitochondrien in der jeweiligen Kardioplegie Gruppe.

Betrachtet man die drei Versuchsgruppen, ist allenfalls ein geringer Unterschied des Volumen/Oberflächenverhältnisses der Mitochondrien feststellbar. Die Esmolol-Blut-Kardioplegie zeigt die höchste V/S Ratio, gefolgt von der Esmolol-kristalloide-Gruppe. Das kleinste Verhältnis zeigt die Calafiore-Gruppe. Dies bedeutet, dass elektronenmikroskopisch kein signifikanter Unterschied zwischen den drei geprüften Kardioplegie-Techniken besteht. Der fehlende Unterschied weist darauf hin, dass die strukturelle Integrität des Myokards nach Ischämie/Reperfusion bei allen drei Kardioplegie-Verfahren etwa gleich gut ist (Abb.7)

Elektronenmikroskopische Bilder

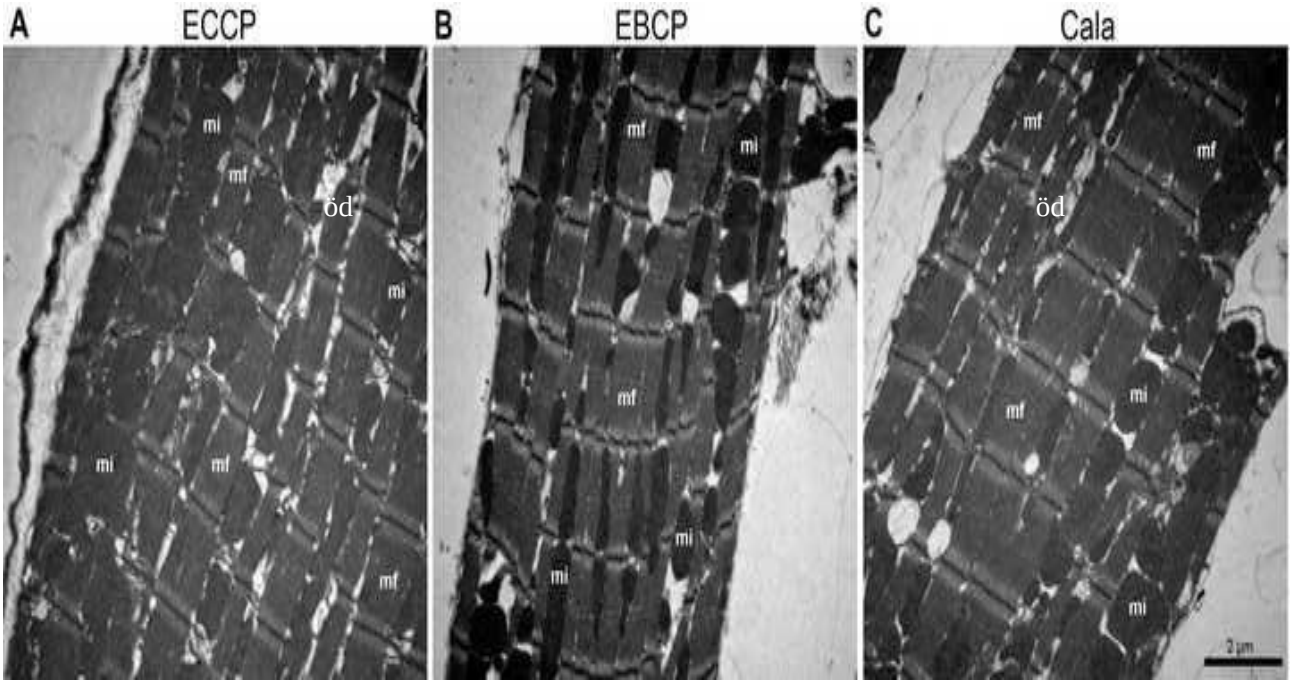


Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Bilder des linken Ventrikels bei A: Esmolol Kristalloide; B: Esmolol Blut; C: Calafiore; mi: Mitochondrien, mf: mikrofibrillen, öd: intrazelluläres Ödem.

Es besteht kein großer Unterschied zwischen den drei Gruppen. Alle Proben zeigen eine sehr gute Moykardprotektion mit wenig Ödemen und wenig geschwollenen Mitochondrien.

5.4 Statistik

Die hämodynamischen Parameter, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Ende der Kardioplegie oder der Öffnung der Aortenklemme gemessen wurden, wurden im Verhältnis zum Ausgangswert (BL) ausgedrückt und mit der statistischen Software SPSS Version 24 (IBM, Ehningen, Deutschland) analysiert. Die Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der hämodynamischen Parameter und der Ergebnisse des kardialen Stoffwechsels (Reaktionsvariablen) im Laufe der Zeit wurden mit Hilfe von gemischten ANOVA-Modellen (Varianzanalyse) mit zwei Faktoren analysiert, wobei "Zeit" (kategorisch) als Faktor innerhalb der Probanden und "Gruppe" (kategorisch: "Buckberg jung", "Calafiore jung", "ECCP jung", "Buckberg alt", "Calafiore alt" und "ECCP alt") als Faktor zwischen den Probanden diente. Wurde ein Unterschied festgestellt, wurde der Tukey-Post-hoc-Test angewendet. Die Daten werden als Mittelwert +/- SD angegeben. Statistische Signifikanz wurde bei einem Niveau von $p<0,05$ angenommen.

Parameter	ECCP (n=6)	EBCP (n=6)	Cala (n=6)	p-Value
LVpdP				
Baseline (mmHg)	105.6±27.1	101.4±21.6	93.8±26.8	0.7184
30 min reperfusion (%)	157.5±36.3***	121.4±18.6*	80.9±16.5	0.0004
90 min reperfusion (%)	100.4±27.9**	86.3±11.2*	56.9±7.1	0.0024
dLVP/dt$_{max}$				
Baseline (mmHg/s)	2928±374	3013±474	2764±936	0.7957
30 min reperfusion (%)	168.4±26.8***	137.6±27.6	102.2±18.5	0.0012
90 min reperfusion (%)	128.0±24.0**	109.2±25.9	84.6±8.2	0.0092
dLVP/dt$_{min}$				
Baseline (mmHg/s)	-2283±318	-2230±544	-2050±711	0.7462
30 min reperfusion (%)	151.5±29.3**,#	112.7±23.3	91.20±20.1	0.0023
90 min reperfusion (%)	113.8±27.7**,#	80.4±17.4	73.3±12.0	0.0073
Heart rate				
Baseline (beats/min)	206.7±30.4	259.5±32.1§	230.4±19.4	0.0172
30 min reperfusion (%)	97.2±12.0	86.0±15.1	98.0±15.8	0.2995
90 min reperfusion (%)	107.6±15.1#	74.7±25.0	99.8±16.1	0.0249
Coronary blood flow				
Baseline (ml/min)	4.5±0.9	4.3±0.7	4.2±0.9	0.8699
30 min reperfusion (%)	228.4±70.9***,#	132.0±68.3	65.1±35.0	0.0011
90 min reperfusion (%)	99.3±29.2*	71.4±46.1	47.5±19.1	0.0520
Myocardial oxygen consumption				
Baseline (ml/(min • 100 g))	10.92±2.14	10.41±1.61	10.44±2.19	0.1258
10 min reperfusion (%)	148.2±58.8*	126.5±47.6	60.7±24.6	0.0128
90 min reperfusion (%)	99.5±25.6	87.1±48.7	55.2±13.6	0.0848
Myocardial lactate production				
Baseline (µmol/(ml • min))	-0.01±0.57	0.17±0.31	0.02±0.41	0.7480
10 min reperfusion (%)	1.71±1.68	1.87±0.91	0.98±0.57	0.3791
90 min reperfusion (%)	0.67±0.72	1.72±0.93	0.97±1.14	0.1784

Table 1: Hemodynamic and metabolic measurements in hearts. Values are presented as mean ± standard deviation. % values represent % baseline. * $p<0.05$ vs Cala, ** $p<0.01$ vs Cala, *** $p<0.001$ vs Cala, $^{\#}p<0.05$ vs EBCP, § $p<0.05$ vs ECCP. Cala: Calafiore blood cardioplegia; dLVP/dt$_{max}$ and dLVP/dt$_{min}$: velocity of contractility and relaxation over time; EBCP: esmolol blood cardioplegia; ECCP: esmolol crystalloid cardioplegia; LVpdP: left ventricular peak developed pressure.

6 Diskussion

6.1 Klinische Problematik und Entwicklung der Fragestellung

Die Kardioplegie durch eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration ist derzeit die am häufigsten verwendete Technik. Allerdings haben die Myokardschäden, die mit einem ionischen Ungleichgewicht mit Natrium- und Kalziumüberladung einhergehen, zusammen mit Energieverlust aus der Aufrechterhaltung von Stoffwechselprozessen, die vom Versuch, diese Ungleichgewichte zu korrigieren, resultiert, dazu geführt, dass nach Alternativen gesucht wird.

Die Calafiore-Kardioplegie hat seit ihrer ersten Beschreibung durch Calafiore und seinem Team im Jahr 1995 ihre gute kardioprotektive Wirkung gezeigt (36). Das Blut als zusätzliche Komponente zu der Kristalloidkardioplegie reduziert den oxidativen Stress sowie den Sauerstoffverbrauch und bietet eine höhere Pufferkapazität. Dadurch schafft sie nach der gewünschten Asystolie eine schnelle Erholung des Myokards (46). Trotzdem können immer noch myokardiale Schäden beobachtet werden, vor allem nach einer langen Klemmung der Aorta während diverser kardiochirurgischer Eingriffe.

Es wurden Alternativen wie die esmololbasierte Kardioplegie gefunden. Im Jahr 1999 zeigten U. Mehlhorn et al., dass die Myokardprotektion durch kontinuierliche Koronarperfusion mit warmem und mit Betablockern angereichertem Blut eine Asystolie verursachen kann. Zusätzlich kann die Esmolol-Kardioplegie eine Myokardischämie vermeiden und die Bildung eines Myokard-Ödems minimieren, sodass die Funktion der linken Herzkammer vollständig erhalten bleibt.

In der Literatur sind zahlreiche vergleichende Studien zu finden, die eine klinische myokardprotektive Anwendung der Buckberg- und Calafiore-Kardioplegie und gewisse Unterschiede zwischen denen mit Kristalloid- und Blutkardioplegie behandelten Gruppen zeigen. Es bestehen bereits Diskussion über die Unterschiede zwischen speziellen Esmolol-Kardioplegie und Kristalloid-Kardioplegie. In dieser Arbeit wurden jedoch erstmals Esmolol-Kardioplegie und Blutkardioplegie miteinander verglichen. Das Ziel der vorliegenden Studie war es, die Wirkung von Calafiore (BCCP), Esmolol-Blut (EBCP) und Esmolol-Kristalloide-Kardioplegie (ECCP) an Rattenherzen zu untersuchen und zu klären, ob Unterschiede in Bezug auf postischämische hämodynamische Funktion, Stoffwechsel und Ultrastruktur bestehen.

Wir haben gezeigt, dass Kardioplegielösungen auf Esmolol-Basis, insbesondere ECCP, einen besseren Schutz des Myokards als Calafiore bieten. ECCP verbesserte sowohl die hämodynamische Funktion als auch Sauerstoffverbrauch und Laktatproduktion der behandelten Herzen während und nach der Reperfusion besser als Calafiore und Esmolol-Blut-Kardioplegie. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigten Fujii et al. zuvor eine bessere Erholung ischämischer Herzen, die mit Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie behandelt wurden, als bei Herzen, die mit Esmolol Blutkardioplegie behandelt wurden (47).

6.2 Myokardprotektion ECCP versus CBCP versus EBCP

6.2.1 Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch

Die Ergebnisse unsere Studie zeigen, dass die Laktatproduktion 30 Minuten nach der Reperfusion den größten Anstieg bei der EBCP-Gruppe zeigt. Während der Laktatspiegel 90 Minuten nach Reperfusion sowohl bei ECCP als auch bei CBCP sinkt, bleiben die Werte in der EBCP-Gruppe signifikant hoch. Dies spricht für eine eingeschränkte Umkehr von negativer zu positiver Laktatextraktion.

Erhöhte Laktatwerte sind die Folge einer Imbalance zwischen myokardialem Energiebedarf und Energiebereitstellung aufgrund einer Sperrung des Blutflusses. Eine fehlende Umkehrung der Laktatextraktion nach Reperfusion spricht dafür, dass sich das Herz von der Dauer der Ischämie nicht erholt hat. Die myokardiale Protektion kann daher als nicht optimal angesehen werden, da gilt: Je günstiger sich die periischämische Konservierung der Energieressourcen gestaltet, desto niedriger ist die Laktatkonzentration im Koronarvenensinus in der Reoxygenierungsphase.

Bei genauerer Betrachtung von Grafik 4 ist zu erkennen, dass ECCP-perfundierte Rattenherzen 30 Minuten nachdem die Versorgung an oxygeniertem Blut wiederhergestellt wurde, den höchsten Sauerstoffverbrauch zeigen und nach 90 Minuten eine konstant gute Sauerstoffausschöpfung aufweisen. Der niedrigste Sauerstoffverbrauch ist in der CBCP-Gruppe zu beobachten.

Durch ischämische Reperfusionsschäden kann die myokardiale Sauerstoffausschöpfung nicht mehr gewährleistet werden. Eine Einschränkung der Durchblutung und Sauerstoffextraktion hat eine Einschränkung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs zur Folge.

Erschöpfung der Koronarreserve durch lange Aortenklemmung oder myokardiale Kompression durch zelluläre Ödeme sind Gründe für die Störung der Myokardoxygenierung nach Wiederherstellung der Durchblutung. Eine weitere Ursache kann die Senkung des Koronargefäßtonus sein. Durch oxydativen Stress sind Mediatoren für die Regulierung des Tonus der glatten Muskelzellen inhibiert. Je besser die Myokardprotektion gewirkt hat, desto besser ist die Myokardintegrität erhalten und dadurch ist die Sauerstoffverbrauch besser erhalten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus dem Sauerstoffverbrauch und Laktatspiegel der untersuchten Gruppen eine Überlegenheit der Myokardprotektion bei ECCP im Vergleich zu EBCP und CBCP festgestellt werden kann, die zu einer Verminderung der postischämischen Myokardschädigung führt.

6.2.2 Hämodynamische Parameter

Nach Wiederherstellung der Koronarperfusion ist die myokardiale Pumpfunktion am besten bei ECCP, jedoch weniger gut bei EBCP und CBCP erhalten. Laut unserer Ergebnisse blieb der linksventrikuläre Druck und die maximale myokardiale Kontraktilität in allen Gruppen erhalten. Die ECCP-Gruppe zeigte nach 90 Minuten Reperfusion die besten Werte.

Postoperativer LVDP und Myokardkontraktilität sind Prädikatoren für die Morbidität und Mortalität nach Herzoperation. Ein Kontraktilitätsverlust zeigt bei ischämischer Azidose, induziert durch oxidativen Stress, einen ausgeprägteren Grad der Störung. Ein weiterer Grund für den Kontraktilitätsverlust sind entstandene Myokardschäden, die durch sauerstoffvermittelte freie Radikale während der Reperfusion aufgetreten sind (47). Aus diesem Grund ist die Auswahl der effektiven Myokardprotektion, sowohl intraischämisch als auch postischämisch, Voraussetzung für eine bestmögliche postoperative Erholung.

Laut unserer Ergebnisse kann man vermuten, dass ECCP eine gute Pufferkapazität hat, da der Kontraktilitätsverlust in dieser Gruppe gering und die Postoperative LVDP gut sind. Die Esmolol-Kardioplegie könnte deshalb bei Herzchirurgiepatienten mit hohem Risikoprofil, wie bei reduzierter linksventrikulärer Pumpfunktion, Myokardhypertrophie oder akutem Herzinfarkt, effektiv myokardprotektiv wirken.

Nach der Ischämie wird der Koronarfluss durch Veränderung der Endothelzellen und Ödem die die Gefäße komprimieren beeinträchtigt. Die Entwicklung des Koronarflusses der

Kardioplegiegruppen zeigt, dass im Gegensatz zu EBCP und CBCP die postischämische Veränderung der Endothelzellen aufgrund des azidotischen Stoffwechels in ECCP-perfundierten Rattenherzen geringer ist. Die Koronarien zeigten eine bessere Funktionserhaltung mit ECCP.

6.2.3 Ultrastruktur

Ziel einer kardioplegischen Methode ist der Erhalt der zellulären Integrität. Prädiktoren für eine ischämische Belastung der Herzmuskelzellen nach Herzoperationen sind intrazelluläre Ödeme und Mitochondrien-Schwellungen. Der Grad der Erhaltung der myokardialen Struktur im hypoxischen Herzmuskel ist für die postischämische Wiederbelebung bedeutungsvoll.

Zur Beurteilung der postischämischen Ultrastruktur nach unterschiedlichen Kardioplegie-Lösungen wurden der zelluläre Ödemindex und das Volumen-Oberflächenverhältnis (VS-Ratio) der Mitochondrien berechnet sowie die Ödembildung elektronenmikroskopsich beobachtet und beurteilt (48).

Anhand von Grafik 6 und 7 lässt sich zeigen, dass die drei Gruppen eine sehr gute Moykardprotektion mit geringer Ödembildung und wenig geschwollenen Mitochondrien aufweisen. Es gibt keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Gruppen.
Im Gegensatz zu unseren Daten konnte eine Studie von Hans J. Geissler et al. zum Vergleich von Esmolol-Kristalloide zu Warm-Blut-Kardioplegie deutliche zelluläre Schäden in der Blutkardioplegie aufzeigen (49).

6.2.4 Temperatur der Kardioplegie

Ein weiterer kritischer Aspekt könnte die Anwendung der Kardioplegie-Temperatur sein: in einer früheren Studie unserer Gruppe stellten wir fest, dass eine warme Calafiore-Applikation zu einem höheren LVDP und einem geringeren zellulären Ödem führte (50). Daher verwendeten wir CBCP und EBCP bei 36 °C. Für ECCP wählten wir eine Temperatur von 32°C, da Nishina et. Al. gezeigt haben, dass diese Temperatur ideal für CCP Multidosis-Infusion mit Esmolol ist, und verbesserte die Kardioprotektion besser als die hyperkaliämische CCP (51).

Melendez et al. untersuchten Esmolol in menschlichem Vollblut bei Temperaturen zwischen 37 °C und 4 °C und beobachteten einen Anstieg der Halbwertszeit von Esmolol von 19 Minuten

bei 37 °C auf 227 Minuten bei 4 °C (53). Es wurde angenommen, dass die verlängerte Halbwertszeit zu einer anhaltenden Betablockade führen könnte, die entweder einen zusätzlichen Schutz der Kardiomyozyten nach einem kardiopulmonalen Bypass bietet oder zu Schwierigkeiten bei der Entwöhnung von der Herz-Lungen-Maschine führt (52). Die Infusion von Esmolol-Kardioplegie bietet einen vollständigen Schutz für längere Zeiträume der hypothermen (51) und normothermen (53) Ischämie. Die im Vergleich zu früheren Studien (10, 54) verlängerten Infusionsintervalle und die höhere Esmolol-Konzentration von 1 mmol/l scheinen jedoch keinen Schaden anzurichten, da sich das Herz gut erholt und die Werte nahe dem Ausgangswert liegen.

6.3 Relevanz der Fragestellung

Die hyperkaliämische Kardioplegie nach Calafiore ist seit 1995 zum Goldstandard für den Myokardschutz, der für einen optimalen herzchirurgischen Eingriff erforderlich ist, geworden. In der Folge wurden unzählige experimentelle und klinische Studien zur Überprüfung und Verbesserung der Myokardprotektion durchgeführt, wobei Techniken wie die Zugabe von verschiedenen Medikamentenklassen wie Betablocker zum Einsatz gekommen sind.

Ähnlich wie bei Böning et. al (54) zeigen die gewonnenen Erkenntnisse aus dieser Studie, dass die Calafiore-Blutkardioplegie einen ausreichenden kardioprotektiven Effekt aufweist. Es wird in diesem Zusammenhang weiterhin die Temparaturkonditionierung der Calafiore-Lösung diskutiert, also ob eine kalt oder warm applizierte Calafiore-Blutkardioplegie die Ischämietoleranz des Myokards in der anschließenden genauso langen Ischämiezeit verbessern soll (50). Die Herzfunktion nach Blutkardioplegie-Applikation während der Aortenklemmung zeigte bei warmer Calafiore-Blut-Kardioplegie eine etwas bessere Erholung als bei kalter Calafiore-Blut-Kardioplegie.

In dieser Arbeit vergleichen wir die warme Calafiore-Blut-Kardioplegie mit der Esmolol-Blut- und der Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie. Genauso wie in der Arbeit von David Chambers und Ryuzo Bessho (55) lässt sich die kardioprotektive Wirkung der Esmolol-Kardioplegie zeigen. Bereits 2003 beschrieben sie die Esmolol-Kardioplegie als ein gleichwertiges, wenn nicht sogar überlegenes Protektionsverfahren.

Die gewonnen Erkenntnisse aus unserer Studie zeigen, dass trotz guter Myokardprotektion von Calafiore- und Esmolol-Blut-Kardioplegie die ECCP die Ischämietoleranz des Herzens zu verbessern scheint.

Wie in der Studie von Hans J. Geissler et al. können wir beschreiben, dass eine hochdosierte Betablockade zu weniger interstitiellen Myokardödemen und einer verbesserten LV-Funktion führte als eine kontinuierliche Warmblutkardioplegie (49).

U. Mehlhorn et al., die ebenfalls über neue Strategien der Myokardprotektion nachdachten, verwiesen auf den guten strukturellen und funktionellen myokardprotektiven Einfluss von EBCP. Ihre klinischen Ergebnisse von sechzig Patienten, bei denen Esmolol-Blut- und Bretschneider-Kardioplegie verglichen wurden, deutet darauf hin, dass eine kontinuierliche Koronarperfusion mit warmem mit Esmolol angereichertem Blut im Vergleich zur kristalloiden Kardioplegie zu einem besseren Myokardschutz führt und sogar eine Alternative für den Myokardschutz bei koronarer Herzchirurgie sein könnte (56). Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen in diesem Fall, dass die kristalloide Kardiopledie effizienter als die Blutkardioplegie wirkt, genauer gesagt die kristalloide Kardioplegie vom Esmolol-Typ.

Auffällig ist jedoch, dass die Herzen, die mit EBCP perfundiert wurden, eine weniger gute funktionelle Erholung und Zellfunktion zeigten als die mit ECCP perfundierten. Die Annahme, dass die vorteilhafte Kombination von der guten Pufferkapazität des Blutes und des polarisierenden Herzstillstandes des Esmolol die optimale Kardioprotektion bieten würde, wurde nicht bestätigt; es hat sich das Gegenteil gezeigt. Der Grund dafür könnte sein, dass die Metabolisierung des Esmolols über sich im Plasma befindende Esterasen-Hydrolase erfolgt (58), sodass die Kardioplegie schnell abgebaut wird und seine schützende Funktion nicht optimal ausüben kann.

6.4 Limitation des Studienaufbaus

Unser Versuch wurde mit Hilfe des Langendorff-Apparats an Rattenherzen durchgeführt. Daher ist es fraglich, ob es eins zu eins auf den Menschen übertragen werden kann. Wir haben aber versucht, den Ablauf eines kardiochirurgischen Eingriffs so gut wie möglich zu simulieren. Es fehlt aber der Kontext eines Organismus, obwohl wir versucht haben, die klinische Umgebung hinsichtlich Temperatur, Anwendung und Zusammensetzung der Kardioplegie nachzuahmen. Die Aortaklemmphase dauert nur 90 Minuten und nicht an einem funktionierenden Herzen über einen längeren Zeitraum.

Bei der Betrachtung der Wirkung des Esmolols auf den menschlichen Organismus kann festgehalten werden, dass Esmolol bei einer gestörten Nierenfunktion akkumulieren kann (Auswendungsdauer bei einer GFR von 30 bis 60 ml/min auf vier Stunden beschränkt und bei

einer GFR von <30 ml/min Kontraindikation), da der Wirkstoff renal eliminiert wird. Es ist bekannt, dass kardiochirurgische Patienten häufig multimorbide mit eingeschränkter Nierenfunktion sind. Deswegen kann eine esmololhaltige Kardioplegie-Lösung nicht bei allen Patienten eingesetzt werden. Da wir ein In-vitro-Experiment durchgeführt haben, konnte dieser Parameter nicht berücksichtigt werden.

6.5 Schlussfolgerung

Die Esmolol-Kristalloid- und Esmolol-Blut-Kardioplegie zeigten sich in unserem Experiment effektiver als die Calafiore-Blut-Kardioplegie. Signifikante Vorteile aufseiten der Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie-Gruppe waren zu beobachten.

Bei Rattenherzen führt nach einem kardioplegischen Herzstillstand eine mit Esmolol angereicherte Kardioplegie, insbesondere eine kristalloide Kardioplegie, zu einer besseren funktionellen Erholung als bei einer reinen Blutkardioplegie. Ein höherer O_2-Verbrauch und eine höhere Laktatproduktion weisen auf eine schlechtere Zellfunktion jeweils nach Calafiore-Blut-Kardioplegie und Esmolol-Blut-Kardioplegie hin.

Obwohl die hyperkaliämische Blutkardioplegie nach Calafiore weltweit eine der am häufigsten verwendeten kardioplegischen Lösungen ist, steht eine alternative kristalloide Lösung vom Esmolol-Typ zur Verfügung. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen in den Cala- und Esmolol-Gruppen könnten auf unterschiedliche Mechanismen zurückzuführen sein, die zum Herzstillstand führen. Während Calafiore eine Lösung auf Kaliumbasis ist, die einen depolarisierten diastolischen Stillstand (Membranpotenzial um -40 mV) verursacht, ist Esmolol ein kurzwirkender Betablocker, der einen diastolischen Stillstand mit nahezu normalem Ruhemembranpotenzial verursacht. Bei einem extrazellulären Kaliumspiegel von etwa 30 mmol/l werden Kalzium-Kanäle aktiviert und es kommt zu einer Ca^{2+}-Aufnahme in die Myozyten, was zu einer Ca^{2+}-Überladung führen kann, die bekanntermaßen einen erhöhten myokardialen Sauerstoffverbrauch und eine Ischämie-Reperfusionsschädigung zur Folge hat. Im Gegensatz dazu verringert Esmolol den myokardialen Sauerstoffverbrauch und verbessert die Sauerstoffnutzung. Ihre Einführung in die klinische Routineanwendung kann prinzipiell empfohlen werden. Jedoch erfordern diese alternativen Techniken eine umfassende Erprobung am Menschen.

7 Zusammenfassung

7.1 Deutsch

Einführung: Bei Patienten, bei denen eine Koronararterien-Bypass-Operation als Standardmethode für die chirurgische Myokardrevaskularisierung durchgeführt wird, stehen verschiedene Kardioplegie-Lösungen zur Herzstillstandsinduktion zur Verfügung. In der Literatur gibt es mehrere Vergleiche der Anwendung von Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie und Calafior-Blut-Kardioplegie-Lösungen, die einen Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zeigen, aber keine Informationen über den Vergleich zwischen Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie und Esmolol-Blut-Kardioplegie.
Daher haben wir experimentell in einem isolierten Rattenherzmodell den Einfluss von Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie-, Esmolol-Blut-Kardioplegie- und Calafior-Blut-Kardioplegie-Lösung auf die hämodynamische Herzfunktion, den myokardialen Stoffwechsel untersucht.

Material und Methoden: Mit Hilfe eines Langendorff-Apparats wurden insgesamt 18 männliche Wistar-Rattenherzen mit Blut perfundiert. Nach einer Stabilisierungsphase von 30 Minuten wurden in jeweils sechs Herzen eine warme (37 °C) Calafior-Blut-Kardioplegie, eine warme Esmolol-Blut-Kardioplegie oder eine kalte (4 °C) (ECCP Esmolol + KHB) Kardioplegie verabreicht. Dies wurde alle 15 Minuten wiederholt, bis eine Aortenklemmzeit von 90 Miuten erreicht war. Während der 90-minütigen Reperfusion wurden funktionelle Parameter aufgezeichnet: koronarer Blutfluss, linksventrikulär entwickelter Druck (LVDP) und Kontraktilität (dp/dt max). Außerdem wurden der myokardiale Sauerstoffverbrauch sowie die Laktatproduktion berechnet. Der zelluläre Ödemindex und der mitochondriale Schaden durch Bestimmung der V/S Ratio der Mitochondrien wurden mit Hilfe der Elektronenmikroskopie ermittelt.

Ergebnisse: Der linksventrikuläre Druck bleibt nach 90 Minuten Herzstillstand im Vergleich zu Esmolol-Blutkardioplegie oder Calafiore-Blutkardioplegie am besten mit Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie erhalten. Passend dazu zeigt der Koronarfluss mit Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie die besseren Werte als mit Esmolol-Blut-Kardioplegie oder mit Calafiore-Blut-Kardioplegie
Der Sauerstoffverbrauch und arteriovenöse Laktatunterschied waren 90 Minuten nach Esmolol-Kristalloid-Kardioplegie gut, aber jeweils schlechter nach Calafiore-Blut-Kardioplegie und Esmolol-Blut-Kardioplegie.

Schlussfolgerung: Bei Rattenherzen nach einem kardioplegischen Herzstillstand führt eine mit Esmolol angereicherte Kardioplegie, insbesondere eine kristalloide Kardioplegie, zu einer besseren funktionellen Erholung als eine reine Blutkardioplegie. Ein höherer O_2-Verbrauch und eine höhere Laktatproduktion weisen auf eine schlechtere Zellfunktion nach Calafiore-Blut-Kardioplegie hin.

7.2 Englisch

Introduction: For patients undergoing coronary artery bypass surgery as the standard method for surgical myocardial revascularization, various cardioplegia solutions are available for cardiac arrest induction. In the literature there are several comparisons of the use of esmolol crystalloid cardioplegia and calafior blood cardioplegia solutions that show differences between treated groups but no information on the comparison between esmolol crystalloid cardioplegia and esmolol blood cardioplegia.
Therefore, we tried to experimentally investigate the influence of esmolol crystalloid cardioplegia, esmolol blood cardioplegia and Calafior blood cardioplegia solutions on haemodynamic heart function, myocardial metabolism in an isolated rat heart model.

Materials and Methods: Using a Langendorff apparatus, a total of 18 male Wistar rats were perfused with blood. After a stabilization phase of 30 minutes, a warm (37°C) Calafior blood cardioplegia, warm esmolol blood cardioplegia or cold (4°C) ECCP (esmolol + KHB) antegrade was administered to 6 hearts each; this was repeated every 15 min until an aortic clamping time of 90 min was reached. Afterwards, the rat heart was slowly supplied with blood. During the 90-minute reperfusion, functional parameters were recorded: coronary blood flow, left ventricular developed pressure (LVDP) and contractility (dp/dt max). Isovolumetric measurement of left ventricular (LV) performance is performed with a flexible latex balloon inserted into the LV via the mitral valve and connected to a pressure transducer. Myocardial oxygen consumption and lactate production are then calculated. At the end of the experiment the hearts were fixed and the cellular edema index and mitochondrial damage were determined by determining the V/S ratio of the mitochondria. This was done by electron microscopy

Results: Left ventricular pressure was best maintained after 90 minutes of cardiac arrest with esmolol crystalloid cardioplegia than with esmolol blood cardioplegia or Calafiore blood cardioplegia , and coronary flow with ECCP was better than with esmolol blood cardioplegia or with Calafiore blood cardioplegia..

Oxygen consumption and arteriovenous lactate difference were good 90 minutes after esmolol crystalloid cardioplegia, , but worse after Calafiore blood cardioplegia and esmolol blood cardioplegia.

Conclusion: In rat hearts after cardioplegic cardiac arrest, esmolol-enriched cardioplegia, especially crystalloid cardioplegia, leads to a better functional recovery than pure blood cardioplegia. Higher O2 consumption and higher lactate production indicate poorer cell functionafter Calafiore blood cardioplegia.

8 Abkürzungen

ATP	Adenosin Triphosphat
Aqua dest	Destilliertes Wasser
BCP	Blutkardioplegie
BSA	Bovines Serum Albumin
CCP	Koronaren Perfusionsdruck
CaCl2	Calcium Chlorid
Cal	Calafiore
CEI	Zelluläre Ödemindex
CF	Corornar Fluß
CCP	koronaren Perfusionsdruck
CP	Kreatininphosphat
CTGF	Bindegewebswachstumsfaktor
cGMP	Zyklisches GMP
CBCP	Calafiore Blutkardioplegie
CF	Cardialen Fibroblasten
dLVPdtmax	Kontraktilität des linken Ventrikels
ECCP	Esmolol Kristalloide Kardioplegie
EBCP	Esmolol Blutkardioplegie
EKZ	Extra Korporal Zirkulation
EMT	Epithelialen Mesenchymalen Transition
$FADH_2$	Flavinadenin Dinucleotid
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
G6PD	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HLM	Herz-Lunge-Maschine
HF	Herzfrequenz
KCL	Kaliumchlorid
$KH2PO_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
Koll-1	Kollagen-1
LV	Linksventrikel
LVDP	Linksventrikulärer Druck
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
MW	Mittelwert
MPTP	mitochondrial permeability transition pore
MPO	Myeloperoxidase
MF	Myofibroblasten
$NADH_2$	Dihydrogen-Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NaEDTA	Natrium Aethylen Diamin Tetraessigsäure
PKG	Proteinkinase G
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SO_2 art.	Sauerstoffsättigung arteriell
SO_2 ven.	Sauerstoffsättigung venös
V/S-Ratio	Volumen-Oberflächenverhältnis

9 Diagramm-, Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: The action mechanisms of Bretschneider and St. Thomas cardioplegias. Theorical und Practical Aspects in the Use of Bretschneider Cardioplegia by Claudiu Ghiragosian and co. 6
Abbildung 2: The cellular targets for cardioplegic arrest and their influence on the action potential with examples of pharmacological agents. New Approaches to Cardioplegia: Alternatives to Hyperkalemia David J. Chambers and Hazem B. Fallouh 7
Abbildung 3: Einmalperfusionssysteme (Quelle: Vorlesungsskript Kardiotechnik Frank Born)..... 10
Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Myokardprotektionsverfahrens nach CAL (nach Calafiore et al., 1995). O2 angereichertes Blut aus dem Oxygenator wird mittels Perfusorspritze mit K+ versetzt und nach erfolgter Abklemmung der Aorta in die Aortenwurze 14
Abbildung 5: Oxidative Stress in myokardialen Ischämie/Reperfusionsschaden..... 17
Abbildung 6.1: Schematische Darstellung des Lan-gendorff-Apparates..... 26
Abbildung 7: Versuchaufbau und Verlauf 27
Abbildung 8: Elektronenmikroskopische Bilder des linken Ventrikels bei A: Esmolol Kristalloide; B: Esmolol Blut; C: Calafiore; mi: Mitochondrien, mf: mikrofibrillen, öd: intrazelluläres Ödem..... 40

Grafik 1: Kontraktilität Linken Ventrikel 33
Grafik 2: Linksventrikulärer Druck 34
Grafik 3: Coronarfluß..... 35
Grafik 4: Sauerstoffverbrauch nach Reperfusion..... 36
Grafik 5: Laktatproduktion 37
Grafik 6: Zellulärer Ödemindex..... 38
Grafik 7: Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Mitochondrien 39

10 Literaturverzeichnis

(1) Larsen R.: Anästhesie und Intensivmedizin in Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, 2005. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo, Springer.

(2)https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/114838/Mehr-als-100-000-herzchirurgische-Eingriffe-in-Deutschland

(3) Beckmann A., Meyer R., Lewandowski J., Markewitz A., Gummert J.: German Heart Surgery Report 2019: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery 68 (4):263-276.

(4) Beckmann A., Meyer R., Lewandowski J., Markewitz A., Gummert J.: German Heart Surgery Report 2019: The Annual Updated Registry of the German Society for Thoracic and Cardiovascular Surgery 69 (4): 294-307.

(5) Bretschneider H.J**:** Myocardial protection, Thorac Cardiovasc Surg 1980; 28: 295-302

(6) Cordell A.R: Milestone in der development of cardioplegia 1995 Sep,60 (3): 793-6

(7) Melrose D.G, Dreyer B, Bentall H.H, Baker J.B, Elektive Cardiac Arrest 1955 Jul 2;269 (6879): 21-2

(8) Cordell A.R: Milestone in der development of cardioplegia 1995 Sep,60 (3): 793-6, Pietschmann, 1996

(9) The Journal of Extra-Corporeal Technlogy.2013 Dec;45(4): 262

(10) Bessho R., Chambers D.J. Myocardial protection: the efficacy of an ultra-shot-acting beta-blocker, esmolol, as a cardioplegic agent2001 Nov;122(5): 993-1003

(11) Bigelow W.G., Lindsay W.K., Greenwood W.F.: Hypothermia; its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. Ann Surg. 1950 Nov;132(5): 849-66

(12) Gibbon J.H**.:** Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery 1954; 37:171-85

(13) Chambers D.J., Fallouh H.B.: Cardioplegia and cardiac surgery: pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion. Pharmacol. Ther. 2010 Jul;127(1):41-52

(14) Brandes R., Lang F., Schmidt R.F.**:** Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, 32. Auflage Seite 188-189

(15) Ali J.M., Miles L.F., Abu-Omar Y., Galhardo C., Falter F.: Global Cardioplegia Practices: Results from the Global Cardiopulmonary Bypass Survey. J Extra Corpor Technol. 2018 Jun;50(2):83-93.

(16) Attwell D., Cohen I., Eisner D., Ohba M., Ojeda C.**:** The steady state TTX-sensitive („window“) sodium current in cardiac Purkinje fibes Pflugers. Arch,1979,379 :137-142

(17) Chambers D.J.: Mechanisms and alternative methods of achieving cardiac arrest, Ann Thorac Surg, 2003, vol. 75: 661- 666

(18) Sternbergh W.C., Brunsting L.A., Abd-Elfattah A.S., Wechsler A.S.: Basal metabolic energy requirements of polarized and depolarized arrest in rat heart**.***Am J Physiol.* 1989; 256: 846-851

(19) Yamamoto F., Manning A.S., Braimbridge M.V., Hearse D.J.: Calcium antagonists and myocardial protection during cardioplegic arrest 1983 Dec, 31(6): 369-73

(20) Dhalla N.S., Hearse D.J. Advances in myocardiology. Plenum Press, New York1985: 545-562

(21) Fallouh H.B., Bardswell S.C., McLatchie L.M., Shattock M.J., Chambers D.J., Kentish J.C.: Esmolol cardioplegia: the cellular mechanism of diastolic arrest *Cardiovascular Research*, 1 August 2010, Volume 87, Issue 3: 552–560

(22) Brandes R., Lang F., Schmidt R.F.**:** Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie, 32. Auflage: 213-214

(23) Bretschneider H., Gebhard M.M., Preusse C.J.: Physiology and Pathophysiology oft he Heart, Chapter Cardioplegia Principles and Problems 1980: 605-616.

(24) Beyersdorf et al., 1990; Gebhard, 1990; Preusse et al., 1985, 1987; Preusse 1993, 1996

(25) Frey M.G.M.: Untersuchungen über den Stoffwechsel isolierter Organe. Ein Respirations-Apparat für isolierte Organe 1885. Virchow's Arch Physiol. 9: 519- 532

(26) Lawin P., Morr-Strathmann U.: Deutsche Gesellschaft für Anaesthesie und Wiederbelebung.Nov 1992: Seite 289-291.

(27) Bretschneider H.J.: Überlebenszeit und Wiederbelebungszeit des Herzens bei Normo- und Hypothermie 1964. Verh Dtsch Ges Kreislaufforsch 30: 11-34

(28) Singer D., Bretschneider H.J.: Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natureal examples – part 1 and part 2. 1990.Thorac Cardiovasc Surg 38: 205-219

(29) Beyersdorf et al.; Clinical evaluation of hypothermic ventricular fibrillation, multi-dose blood cadioplegia ,and single-dose Bretschneider cardioplegia in coronary surgery 1990 Feb; 38 (1): 20-9.

(30) Toshizumi Shirai M.D. et al., The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Antegrade and retrograde cardioplegia: Alternate or simultaneous? Volume 112, Issue 3, September 1996: 787-796

(31) Schulte H.D., Preusse C.J., Groschopp C. et al: Crystalloid cardioplegia- Experience with the Bretschneider solution. In Engelman RM, Levitsky S (eds): A Textbook of Clinical Cardioplegia. New York: Futura Publ Comp, 1982: 199-210.

(32) Brambrige M.V., Chayen J., Bitensky L., Hearse D.J., Jynge P., Cankovic-Darracott S. : Cold cardioplegia orcontinuous coronary perfusion? Report on preliminary clinical experience as assessed cytochemically, J Thorac Cardiovasc Surg, 1977, vol 74: 900-906

(33) Mehlhorn U., Sauer H., Kuhn-Regnier F., Südkamo M., Dhein S., Eberhardt F., Grond S., Horst M., Hekmat K,. Geissler H.J., Warters R.D., Allen S.J., Rainer de Vivie E.: Myocardial beta-blockade as an alternative to cardioplegic arrest during coronary artery surgery. 1999 Aug,7(5):549-57

(34) Geissler H.J., Davis K.L., Laine G,A., Ostrin E.J., Mehlhorn U., Hekmat K., Warters R.D., Allen S.J.: myocardial Protection with high-dose beta-blockade in acute myocardial ischemia 2000 Jan,17(1): 63-70

(35) Follette D.M., Steed D.L., Foglia R., Fey K., Buckberg G.D.: Advantages of intermittent blood cardioplegia over intermittent ischemia during prolonged hypothermic aortic clamping. 1978 Sep, 58 (3 Pt 2): 200-9

(36) Calafiore A.M., Teodori G., Mezzetti A., Bosco G., Verna A.M., Giammarco G.D., Lapenna D.: intermittent antegrade warm blood cardioplegia, 1995 Feb, 59 (2): 398-402.

(37) Caputo M., Bryan A.J., Calafiore A.M., Suleiman M.S., Angelini G.D.: Intermittent antegrade hyperkalaemic warm blood cardioplegia supplemented with magnesium prevents myocardial substrate derangement in patients undergoing coronary artery bypass surgery. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, Volume 14, Issue 6, Dec. 1998: 596-601.

(38) Vähäsilta T., Malmberg M., Saraste A., Koskenvuo J.W., Pärkkä J.P., Valtonen M., Leino K., Nuutila K., Saukko J.P., Kuttila K,. Savunen T.**:** Cardiomyocyte Apoptosis After Antegrade and Retrograde Cardioplegia During Aortic Valve Surgery Ann Thorac Surg 2011; 92:1351–7.

(39) Hollander M.R., de Waard G.A., Konijnenberg L.S.F., Meijer-van Putten R.M.E., van den Brom C.E., Paauw N., de Vries H.E., van den Ven P.M., Aman J., Van Nieuw-Amerongen G.P., Hordijk P.L., Niessen H.W.M., Horrevoets A.J.G., Van Royen N.: Dissecting the Effects of Ischemia and Reperfusion on the Coronary Mircrocirculation in a Rat Model of Acute Myocardial Infarction. 2016 Jul 8,11(7): e0157233

(40) Kane J.J., Murphy M.L., Bissett J.K., deSoyza N., Doherty J.E. und Straub K.D.: Mitochondrial function, oxygen extraction, epicardial S-T segment changes and tritiated digoxin distribution after reperfusion of ischemic myocardium. Am J Cardiol. 36(2) (1975): 218-24

(41) Yellon D.M. und Hausenloy D.J.: Myocardial reperfusion injury. N Engl J Med. 2007,357(11): 1121-35

(42) Bell R.M., Mocanu M.M., Yellon D.M.: Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. Volume 50, Issue 6, June 2011: 940-950

(43) Mayhew T.M.**:** Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies Jan; Epub 2007 Jul 23, Placenta. 2008 29(1):1-14

(44) Kurian G.A., Rajagopal R., Vedantham S., Rajesh M.: The Role of Oxidative Stress in Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury and Remodeling: Revisited. Oxidative Medecine and Cellular Longevity, 25 May 2016:1656450.

(45) Moch C.P.: Analyse der mitochondrialen Dysfunktion im myokardialen Ischamie-Reperfusionsschaden unter Einfluss von Enoximon im Modell der Langendorffperfusion des Rattenherzens. 2019:37-38

(46) Mezzetti A., Calafiore A.M., Lapenna D., Deslauriers R., Tian G., Salerno T.A., Verna A.M., Bosco G., Pierdomenico S.D., Caccurullo F.**:** Intermittent antegrade warm cardioplegia reduces oxidative stress and improves metabolism of the ischemic-reperfused human myocardium, Ann Thorac Surg 1995; 109: 787-95

(47) Beisel B.: Hämodynamische und metabolische Untersuchungen bei Patienten mit einer Hauptstammstenose der linken Herzkranzarterie.Hamburg, Univ., Diss., 1980:335

(48) Schmiedl A., Schnabel P.A, Mall G., Gebhard M.M., Hunneman D.H., Richter J., Bretschneider H.J.: The surface to volume ratio of mitochondria, a suitable parameter for evaluating mitochondrial swelling. Correlations during the course of myocardial global ischaemia.1990; 416(4):305-15.

(49) Hans J.G., Karen L. Davis, Glen A. Laine, Edwin J. Ostrin, Uwe Mehlhorn, Khosro Hekmat, R. David Warters, Steven J. : Myocardial protection with high-dose b-blockade in acute myocardial ischemia Allen European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, Volume 17, Issue 1, January 2000: 63–70

(50)Böning A., Hagmueller S., Heep M., Rohrbach S., Niemann B., Mühlfeld C. Is Warm or Cold Calafiore Blood Cardioplegia Better? Hemodynamic, Metabolic, and Electron Microscopic Differences. Thorac Cardiovasc Surg Georg Thieme Verlag KG 2014;62: 683–9.

(51)Nishina D., Chambers D.J. Efficacy of esmolol cardioplegia during hypothermic ischaemia Eur J Cardio-Thoracic Surg 2017;53: 392–9.

(52)Melendez J.A., Stone J.G., Delphin E., Quon C.Y. Influence of temperature on in vitro metabolism of esmolol. J Cardiothorac Anesth W.B. Saunders 1990;4: 704–6.

(53)Bessho R, Chambers DJ. Myocardial protection with oxygenated esmolol cardioplegia during prolonged normothermic ischemia in the rat. J Thorac Cardiovasc Surg Mosby 2002;124: 340–51

(54) Böning A., Assling-Simon L., Heep M., Böngler K., Niemann B., Schipke J., et al. Bloodcardioplegia for cardiac surgery in acute myocardial infarction: rat experiments with two widely used solutions. Interact Cardiovasc Thorac Surg Oxford University Press 2018;27: 88–94.

(55) Chamber D.J. und Bessho R.: Myocardial protection with oygenated esmolol cardioplegia durein prolonged normothermic ischemia in the rat 2002 Aug,124(2):340-51

(56) Mehlhorn U., Sauer H., Kuhn-Regnier F., Südkamo M., Dhein S., Eberhardt F., Grond S., Horst M., Hekmat K., Geissler H.J., Warters R.D., Allen S.J., Rainer de Vivie E: Myocardial beta-blockade as an alternative to cardioplegic arrest during coronary artery surgery. 1999 Aug,7(5): 549-57

(57) Dr.med. Nabieva N., Dr. Antwerpes F., Schippan I. DocCheck Flexikon,Esmolol. 2021 Aug

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort, Datum. Unterschrift

12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Böning für die ausgezeichnete Betreuung und die Überlassung des Themas bedanken. Seine Unterstützung, Hilfe und Geduld ist der erfolgreiche Abschluss dieser Arbeit zu verdanken.

Zusätzlich danke ich auch Herrn Prof. Dr. Mühlfeld vor allem für die Unterstützung in Bezug auf den elektronenmikroskopischen Teil und die Unterstützung zur Statistik.

Ich bedanke mich bei Frau Martina Heep für ihre vielfältige, kompetente und stete labor-technische Unterstützung, für die Begleitung im Experimentalteil und die gute Expertise bei Tierversuchen.

Besonders möchte ich mich bei meiner Familie Gaetan, Larissa, Gwladys, Michele, Guy-Cedric, Josephe Komguem für ihre Unterstützung und ihr unerschütterliches Vertrauen in mich bedanken. Insbesondere danke ich meinem geliebten Vater Dr. Leon Komguem, dem ersten seines Namens und meiner geliebten Mutter Hortense Komguem. Vielen Dank an meinen wunderbaren Ehemann Francis Nkemgang, der mich ausdauernd motiviert und unterstützt hat.

Zusätzlich einen großen Dank an die Familie Gouadjio, die mich in Deutschland aufgenommen und adoptiert hat. Schließlich danke ich meinen treuen Freundinnen „les femmes généreuses“.