Einfluss des Proteinaseninhibitors Aprotinin und des Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127 auf die Ischämie/Reperfusionsreaktion isoliert perfundierter Kaninchenherzen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von aus

Cernaianu, Grigore Bukarest/Rumänien

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin – Medizinische Klinik I des Universitätsklinikums Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Neuhof

Gutachter: Prof. D. K. D. Schlüter

Tag der Disputation: 17.12.2002

Meinen Eltern und Gina gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Zielsetzung	6
1.1 Grundlagen	6
1.1.1 Aprotinin	7
1.1.2 Bradykinin-B <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonisierung	8
1.1.3 Pathomechanismen der Entzündungsreaktion	8
1.2 Zielsetzung	13
2 Material und Methodik	15
2.1 Methodik	15
2.1.1 Versuchsmodell des isoliert perfundierten Herzens	15
2.1.1.1 Präparation	15
2.1.1.2 Beschreibung der für die künstliche Perfusion des isolierter	า
Herzens verwendeten Anlage	19
2.1.1.3 Versuchsverlauf während des künstlichen Kreislaufes	26
2.1.1.3.1 Aprotinin-Testreihe	28
2.1.1.3.2 Testreihe zur Bradykinin-Antagonisierung mit dem Brady	ykinin-
B <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonisten CP-0127	30
2.1.2 Laborchemische Bestimmung der Metabolite von Thromboxan	A <sub>2</sub> und
Prostacyclin	32
2.1.2.1 Bestimmung des TXB <sub>2</sub>	32
2.1.2.2 Bestimmung des 6-Keto-PGF <sub>1α</sub>	33
2.1.2.3 Bezugsquellen der Antikörper und Tracer	33
2.1.3 Statistische Auswertung der erhobenen Daten	33
2.2 Material	34
2.2.1 Aprotinin	34
2.2.1.1 Entdeckung, physiologische Organverteilung und	
Isolierungsmethoden	34
2.2.1.2 Stoffspezifische physikalische und chemische Eigenschafte	n 36
2.2.1.3 Hemmeigenschaften	37
2.2.1.4 Pharmakokinetik	39
2.2.1.5 Nachweismethoden	40

	2.2.2 Bradykinin-B <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonist CP-0127	. 41
3	Ergebnisse	.42
4	3.1 Aprotinin-Testreihe	. 42
	3.1.1 Inotropie	. 42
	3.1.2 Mediatorfreisetzung	. 44
	3.1.2.1 Thromboxan B <sub>2</sub>	. 44
	3.1.2.2 6-Keto-PGF <sub>1α</sub>	. 46
	3.1.3 Koronarvaskulärer Widerstand	. 47
	3.1.4 Herzfrequenz	. 49
	3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse	. 49
4	3.2 Bradykinin-B <sub>2</sub> -Rezeptor-Antagonist CP-0127	. 50
	3.2.1 Linksventrikuläre Druckamplitude	. 51
	3.2.2 Koronarvaskulärer Widerstand	. 53
	3.2.3 Herzfrequenz	. 55
4	Diskussion	.56
5	Zusammenfassung	.71
6	Anhang	.73
7	Literatur	.76
8	Danksagung	.83
9	Lebenslauf	84
•		

# 1 Einleitung und Zielsetzung

# 1.1 Grundlagen

Obwohl bisher die Mechanismen der Entzündungsreaktion mit ihren positiven, aber auch negativen Auswirkungen auf unterschiedliche Organsysteme oft untersucht worden sind und einige der zugrunde liegenden Reaktionsketten als gesichert gelten, stellt die schier enorme Flut an freigesetzten Mediatoren ein großes Interaktionsspektrum dar, das eine differenzierte Bewertung sehr schwierig gestaltet. Viele dieser Mediatoren jedoch, speziell Kinine und Polypeptide aus hypoxischen und zerstörten Geweben, die eine nachgewiesene Rolle bei der Entzündungsreaktion spielen, werden von spezifischen Proteasen aus den entsprechenden Vorstufen abgespalten. Solche Mediatoren können die Entzündungsreaktion des Organismus über verschiedene Mechanismen verstärken und üben zum Teil toxische Effekte auf die Herz- und Lungenfunktion aus, wie schon seit langem bekannt [1, 2].

Mit der Entdeckung von Proteinase-Inhibitoren und deren industriellen Produktion ergibt sich die Möglichkeit zur Hemmung der bei der Inflammation beteiligten Enzyme, um durch Reduktion der Mediatorfreisetzung ebenfalls das Ausmaß der unspezifischen Entzündungsreaktion zu vermindern.

Eines der klassischen Beispiele dafür stellt das Kallikrein-Kinin-System dar. Kallikrein, ein Enzym, das hauptsächlich Proteine spaltet, die eine Serin-Sequenz beinhalten, ist maßgeblich an der Freisetzung von Kininen beteiligt [3] (beispielsweise Bradykinin, ein potenter Gefäßpermeabilitätsfaktor und chemischer Schmerzmediator), die ihrerseits unter anderem über Komplementaktivierung zu einer unspezifischen Entzündungsreaktion führen [4]. Zu einer solchen unspezifischen Entzündungsreaktion kommt es auch im Rahmen kardiochirurgischer Eingriffe, die den Einsatz einer extrakorporalen Zirkulation benötigen, wobei die Produktion der genannten Kinine ebenfalls eine große Rolle spielt.

Ihre Auswirkungen sind vor allem in der Reperfusionsphase des Herzens unmittelbar anhand der verminderten Inotropie-Parameter klinisch fassbar. Dies macht sich durch eine verminderte Förderleistung des Herzens, einen verzögerten Anstieg des systolischen Blutdruckes bei einem Abfall der Koronarperfusion mit reziprokem Anstieg des Koronarwiderstandes bemerkbar.

Dieses so genannte Reperfusionssyndrom ist für viele der postoperativen Komplikationen zuständig, die nicht selten den Erfolg des primär gelungenen schwierigen Eingriffs gefährden können.

# 1.1.1 Aprotinin

Mit Aprotinin, einem Serin-Protease-Inhibitor, der in klinisch tolerablen Dosen (200-400 Kallikrein-Inaktivator Units (KIU)/mI) die Aktivitäten des Gewebe- und Plasma-Kallikreins zu hemmen vermag [5], bot sich erstmals die Möglichkeit, diese unspezifische Entzündungsreaktion zu reduzieren.

Das hauptsächliche Einsatzgebiet des bereits in den 30er Jahren entdeckten, körpereigenen Wirkstoffes Aprotinin liegt seit seiner "Wiederentdeckung" in den 80er Jahren im Bereich der Reduktion des perioperativen Blutverlustes. Der durch mehrere Studien inzwischen nachgewiesene Effekt basiert unter anderem auf der Hemmung der körpereigenen, durch Plasmin vermittelten Fibrinolyse.

Neuere Erkenntnisse weisen jedoch auch auf mögliche kardioprotektive Effekte des Aprotinins hin, die weitere Anwendungsbereiche erschließen könnten.

# 1.1.2 Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung

Da Bradykinin ein sehr wichtiger Mediator im Rahmen der unspezifischen Entzündungsreaktion ist, liegt der Schluss nahe, mit seiner direkten Antagonisierung das Ausmaß des ischämischen Schadens zu reduzieren. Mit dem Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127 steht ein selektiver Gegenspieler dieses wichtigen Entzündungsmediators zur Verfügung.

# 1.1.3 Pathomechanismen der Entzündungsreaktion

Im Folgenden soll eine kurze Darstellung der bekannten Pathomechanismen der akuten Entzündungsreaktion unter Betonung der für diese Studie wichtigen Aspekte vorgestellt werden.

Definitionsgemäß ist die akute Entzündungsreaktion in ihrer Anfangsphase eine lokale physiologische Reaktion des Organismus auf eine wie auch immer geartete Gewebsverletzung. Eine akute Inflammation kann unterschiedlichste Ursachen haben, wie z.B. mikrobielle Infektionen, Hypersensitivitätsreaktionen, physikalische (Trauma, ionisierende Strahlen usw.) und chemische Noxen sowie nicht zuletzt Gewebsnekrosen, wie sie unter anderem durch Sauerstoff- und Substratmangel auftreten können [4, 6]. So zeigt oft der Rand einer Infarktzone die typischen morphologischen Zeichen einer akuten Entzündung [4].

Unabhängig von der auslösenden Ursache läuft die initiale Phase der akuten Inflammation nach einem weitgehend festen Schema ab [4]: Zuerst wird die so genannte vaskuläre Phase initiiert, die durch eine Vasodilatation mit erhöhtem Blutfluss, vornehmlich im Bereich des kapillaren Strombettes und der nachgeschalteten postkapillären Venolen, charakterisiert ist. Durch die Öffnung der präkapillären Gefäßsphinkteren kann je nach Ausmaß der Gewebsverletzung ein bis zum Zehnfachen erhöhter Blutfluss erreicht werden. Die Ursache liegt in der Mehrdurchblutung vorher verschlossener Kapillaren.

An die vaskuläre Phase schließt sich die Phase der Permeabilitätserhöhung an, die durch Abnahme des Blutflusses, Plasmaexsudation und Viskositätserhöhung gekennzeichnet ist. Hierbei ist die Abnahme des Blutflusses letztlich eine Folge der Permeabilitätserhöhung, vornehmlich der postkapillären Venolen, die zu einem Transfer von Plasma mit den dazugehörigen Proteinen in den Extravasalraum führt. Diese wird durch aktive Kontraktion unter anderem der Aktinfilamente der Endothelzellen verursacht, die eine Zunahme der Porengröße zwischen den Endothelzellen bewirkt.

Diese Reaktion ist in der Anfangsphase der Inflammation eine aktive Leistung der Endothelzellen, die durch lokale Mediatorfreisetzung hervorgerufen wird, wie aus Experimenten mit Histamin festgestellt werden konnte. In einer späteren Phase wird die gesteigerte Permeabilität des Endothels auch durch direkte Zellschädigung hervorgerufen.

Die Vergrößerung der interendothelialen Poren führt zum Übertritt von großen Plasmaproteinen in den Extravasalraum mit konsekutiver Verminderung des kolloidosmotischen Druckes in dem postkapillären Bereich.

Wie schon durch Starling festgestellt wurde, ist die Abgabe von Flüssigkeit an den Extrazellulärraum in erster Linie eine Funktion des hydrostatischen Druckes im Sinne einer Ultrafiltration. Die Rückresorption der Flüssigkeit erfolgt dann vornehmlich im Bereich der Venolen durch den hier vorherrschenden kolloidosmotischen Druck der normalerweise nicht durchgängigen großen Plasmaproteine.

Im Rahmen der akuten Entzündung ist jedoch der venöse kolloidosmotische Druck durch den Verlust der großen Plasmaproteine an das Interstitium vermindert. Dies führt zu einer Retention von Flüssigkeit im Extrazellulärraum und damit zur Abnahme des intravasalen Blutflusses sowie zur Blutviskositätserhöhung, die wiederum eine vermehrte Plättchenadhäsion ermöglicht.

Der verminderte Blutfluss bedingt auch das Verlassen der Leukozyten aus der axialen Strömung in der Mitte des Gefäßes und ihre Anordnung entlang der Zellwände, der als "pavementing, bezeichnet wird. In der sich nun anschließenden Phase der zellulären Exsudation beginnen diese Leukozyten eine amöboide Konfiguration einzunehmen, die ihnen erlaubt, durch die Endothellücken in den Extrazellulärraum zum Ort der Gewebsläsion zu wandern, um dort körperfremdes und/oder körpereigenes nekrotisches Material zu phagozytieren und die Voraussetzungen für eine Regeneration des Gewebes zu schaffen. Dieses komplexe, aber relativ standardisierte System der Reaktion auf eine Gewebsverletzung wird durch eine Vielzahl von zellulären oder humoralen Mediatoren gesteuert [6]. Zu diesen gehören potente Entzündungsmediatoren, wie Zytokine oder Histamin aus Mastzellen und Basophilen, die eine Vasodilatation, Permeabilitätserhöhung und Chemotaxis hervorrufen.

Weiterhin aktiviert eine zelluläre Läsion den in der Zellmembran integrierten Arachidonsäuremetabolismus zur Bildung von Prostaglandinen und Leukotrienen, die unter anderem eine Permeabilitätserhöhung und Plättchenaggregation hervorrufen. Die Blockierung des Arachidonsäurestoffwechsels auf unterschiedlichsten Stufen der Mediatorsynthese (Cortison hemmt bereits an der Zellmembran den Abbau der Arachidonsäure, nichtsteroidale Antiphlogistika nachgeschaltet die Cyclooxigenase als Schlüsselenzym der Prostaglandin-Synthese) hat sich inzwischen als potentes Therapieverfahren zur Entzündungshemmung etabliert. Die Vielzahl der synthetisierten Metabolite und ihre teilweise antagonistischen Wirkungen limitieren jedoch stark den Einsatz solcher relativ unspezifischen Enzymblocker. Neben den Arachidonsäuremetaboliten gibt es eine weitere Gruppe von Entzündungsmediatoren, die von spezifischen Enzymen aktiviert werden und eine anerkannte starke Rolle im Ablauf der Entzündungsreaktion spielen. Das Plasma beinhaltet vier enzymatische Kaskadensysteme [6], die zu den ältesten Abwehrsystemen des Körpers zählen und eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren produzieren. Sie sind miteinander an vielen Stufen verschaltet und stimulieren sich zum Teil im Sinne eines positiven Feedbacks gegenseitig (Abb. 1).



**Abb.1.** Interaktion der vier Kaskadensysteme (Komplement-, Kallikrein-Kinin-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-System) und Angriffsziele des Aprotinins

Es sind dies das Komplement-, das Kallikrein-Kinin-, das Gerinnungs- und das Fibrinolyse-System.

Das Komplement-System ist eine Kaskade aus enzymatischen Proteinen, die während der akuten Entzündung auf unterschiedlichem Weg aktiviert werden kann. Während einer Infektion kann dieses System durch zirkulierende Antigen-Antikörper-Komplexe über den "klassischen" Weg aktiviert werden oder aber direkt durch Endotoxine gramnegativer Bakterien auf dem so genannten "alternativen" Weg. Von besonderer Bedeutung ist die Aktivierung des Komplement-Systems im Rahmen von Gewebsnekrose durch freigesetzte Enzyme der sterbenden Zellen und durch Produkte aus dem Kallikrein-Kinin-System, dem Gerinnungs- und Fibrinolyse-System.

Produkte der Komplement-Aktivierung fördern die Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten, erhöhen die Gefäßpermeabilität und setzen Histamin aus Mastzellen frei (C5a, C3a). Weiterhin üben sie eine zytolytische Wirkung aus (C5-9) und opsonisieren Bakterien (C4b, 2a, 3b). Das Gerinnungssystem ist seinerseits durch die Umwandlung des löslichen Fibrinogens zum unlöslichen Fibrin stark an der Begrenzung der Entzündung beteiligt. Der Hageman-Faktor (Faktor XII), der durch Kontakt mit Fremdoberflächen, freigelegte Basallaminas und zahlreiche proteolytische Enzyme bakteriellen Ursprungs aktiviert wird, kann seinerseits das verwandte Kinin- und Fibrinolyse-System aktivieren.

Das Fibrinolyse-System führt über die proteolytische enzymatische Aktivierung des Plasmins zur Lyse des Fibrins zugunsten von Fibrinabbauprodukten, die ihrerseits auch lokale Effekte auf die Gefäßpermeabilität haben können.

Das durch Faktor XII aktivierte Kinin-System setzt eine Reihe von Peptiden frei, die so genannten Kinine, von denen Bradykinin eines der wichtigsten Gefäßpermeabilitätsfaktoren und Entzündungsmediatoren ist. Es wird für eine Reihe

von Reaktionen im Rahmen der Gewebsnekrose verantwortlich gemacht und ist deswegen Gegenstand der experimentellen Überlegungen dieser Studie.

# 1.2 Zielsetzung

Aprotinin wird bereits in der Herzchirurgie zur Reduktion des operativen Blutverlustes eingesetzt. Der Effekt wird über eine Wirkung auf Thrombozyten und humorales Gerinnungssystem vermittelt.

Ziel des ersten Teils dieser Dissertation war es zu klären, ob Aprotinin darüber hinaus einen unabhängigen protektiven Einfluss auf die Herzfunktionin der postischämischen Reperfusionsphase hat. Ziel des zweiten Teils dieser Dissertation war es zu untersuchen, ob und unter welchen Bedingungen eine Hemmung der Bradykinin-B2-Rezeptoren einen negativen Einfluss auf die Herzfunktion in der Reperfusionsphase ausübt. Bradykinin hat im Organismus mehrere Wirkungen:

Einerseits scheint es zu einer generalisierten Ödembildung der Lunge zu führen. Andererseits wird die Koronarperfusion maßgeblich durch Bradykinin gesteuert. Es sind bisher Experimente unternommen worden, um den Schenkel der Kallikrein-Bradykinin Synthese therapeutisch entweder bei der Synthese selbst zu hemmen (Aprotinin) [7–9] oder direkt nach erfolgter Synthese zu antagonisieren (Bradykinin-Antagonist CP-0127) [10–12].

# 2 Material und Methodik

# 2.1 Methodik

### 2.1.1 Versuchsmodell des isoliert perfundierten Herzens

Die Methode, die dieser tierexperimentellen Studie an Kaninchen zugrunde liegt, wurde von dem deutschen Physiologen LANGENDORFF 1895 veröffentlicht. Mit Hilfe seines Prinzips gelang es erstmalig, auch isolierte Herzen von Säugetieren zum Schlagen zu bringen und an ihnen unter anderem eine Vielzahl von toxikologischen Experimenten durchzuführen.

Das Prinzip basiert darauf, dass eine Nährlösung retrograd in die Aorta eines zuvor vom Spendertier isolierten Herzens infundiert wird. Durch den Druck der Flüssigkeit werden die Semilunarklappen geschlossen. Die gesamte Nährlösung perfundiert sodann die Koronarien und verlässt anschließend wieder via Koronarsinus und den bei der Präparation geöffneten Hohlvenen das Herz [13].

## 2.1.1.1 Präparation

Im Folgenden werden die Schritte beschrieben, die zur Explantation des Herzens aus dem Kaninchen notwendig sind. Danach wird lediglich das isolierte Organ künstlich perfundiert und oxygeniert.

Es wurden ausschließlich Kaninchen zwischen 2,5 und 3,0 kg beiderlei Geschlechts aus einer Standardkoloniezucht der Behring-Werke, Marburg, verwendet. Die Tiere wurden bis kurz vor Versuchsbeginn mit Altromin<sup>®</sup>-Standarddiät und Wasser ad libitum ernährt. Die Versuche wurden entsprechend den Regeln des Deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18.08.1986 durchgeführt und als Organentnahmen dem Regierungspräsidenten in Gießen angezeigt. Die Tiere werden mit insgesamt 40-50 mg Pentobarbital-Natrium/kg Körpergewicht (KG) narkotisiert. Nach Rasur des Fells wird das Tier durch Injektion von etwa einem Drittel der Gesamtmenge der Pentobarbital-Natriumlösung in die seitliche Ohrvene narkotisiert. Diese Konzentration gewährt noch keine komplette Analgesie und verursacht keine Barbiturat-induzierte Atemdepression.

Zusätzlich zum Pentobarbital wird Heparinnatrium (1000 IU/kg KG) zur Antikoagulation in die Ohrvene injiziert. Anschließend wird das Tier auf den Rücken gelagert. Um die Atemwege freizuhalten, wird der Kopf rekliniert und die Zunge seitlich herausgezogen. Am Hals des Tieres wird nun der Processus thyreoideus palpiert und kaudal davon 10 ml einer 1% igen Xylocain-Lösung subkutan als Quaddel gesetzt. Diese soll eine lokale Anästhesie gewährleisten, die zur Tracheotomie notwendig ist. Nach Setzen der Quaddel wird nun das Fell über der Ventralseite des Körpers abrasiert. Währenddessen ist das Gewebe um die Trachea durch das Xylocain nicht mehr schmerzempfindlich, und die Tracheotomie kann durchgeführt werden. Mit einer Schere werden nun Haut, Platysma und infiltriertes Subkutangewebe entfernt. Danach werden die Halsfaszien in der Medianebene unter Schonung der Karotiden, Jugularvenen und der Vagusnerven bis zur Trachea scharf abgetrennt. Nach einer fischmaulförmigen Inzision der Luftröhre wird diese nun kanüliert und an einer Starling-Pumpe (Fa. B. Braun Melsungen) angeschlossen mit einer Atemfrequenz von 50 Atemzügen/min und einem Atemzugvolumen von etwa 6 ml.

Nun kann die Narkose weiter bis zum Analgesiestadium gefahrlos vertieft werden. Es wird weiter Pentobarbital bis zu einer Gesamtdosis von 40-50 mg/kg KG i.v. injiziert.

Um die Tiefe der Analgesie zu überprüfen, werden Schmerzreize durch Kneifen des Ohres mit einer Pinzette gesetzt. Sobald das Tier keine Reaktion mehr zeigt, kann mit der eigentlichen Explantation begonnen werden. Dazu wird die Haut über dem Abdomen bis zur Trachealkanüle mit einer Schere scharf von der darunter liegenden Körperfaszie abgetrennt. Seitlich werden Entlastungsschnitte in der Haut angebracht. Haut und Muskulatur über dem Processus xyphoideus werden abpräpariert. Danach wird an der Ansatzstelle des Zwerchfells am Xyphoid vorsichtig eine Eröffnung der Thoraxhöhle durchgeführt, ohne die Lungen zu verletzen. Dies führt zu einem partiellen Kollabieren der Lungen, welches für die weitere Präparation im Thoraxraum unerlässlich ist. Das Zwerchfell kann nun gefahrlos nach lateral eröffnet werden. Mit einer Pinzette wird es nach kaudal gezogen, um eine bessere Übersichtlichkeit des Operationsgebietes zu gewährleisten. Dabei muss verhindert werden, dass die V. cava inferior nicht durch zu starken Zug abgeknickt wird. Als nächstes wird das Sternum mit Hilfe einer Thoraxschere median unter Schonung der Aa. thoracicae internae gespalten und nach lateral gespreizt. Am nun freiliegenden Thoraxsitus wird der Thymus stumpf mit zwei Pinzetten abpräpariert, um die darunter liegenden großen thorakalen Gefäße darzustellen. Zunächst wird jeweils um die Vv. cavae und um die Aorta ascendens eine Schlaufe gelegt. Anschließend werden die Schlaufen um die Vv. cavae zugezogen und ein Entlastungsschnitt kranial der Schlaufe in der V. cava inferior durchgeführt. Die Aorta wird mit einem horizontalen Schnitt fischmaulförmig eröffnet. Rasch wird nun ein Katheter, der an einer Spritze mit auf 4 °C gekühlter Cardioplegie-Lösung angeschlossen ist, retrograd unter ständiger Durchströmung, um eine Luftembolie zu vermeiden, in die Aorta eingeführt. Es werden etwa 20 ml Cardioplegie-Lösung (Custadiol<sup>®</sup>, Köhler Chemie, Alsbach-Hähnlein) retrograd über die Aorta in die

Koronararterien gespritzt, was aufgrund des hohen Kaliumgehaltes der Lösung sowie der tiefen Temperatur zu einem Herzstillstand führt. Dadurch wird, analog den Herzoperationen am Menschen, der Sauerstoffverbrauch des Herzens in dieser Ischämiephase so niedrig wie möglich gehalten.

Herz und Lungen werden sodann freipräpariert und aus dem Thoraxraum entnommen.

Der mit einem 3-Wege-Hahn versehene Reperfusionskatheter wird zunächst in die Aortenwurzel oberhalb der Abgänge der Koronararterien eingebunden. Er wird nun in den Perfusionskreislauf der Anlage eingeschaltet, ohne dass er zunächst vom Perfusat durchströmt wird. Durch Präparation entlang der Trachea werden Lungen und überschüssiges Gewebe abpräpariert, um die Mediatorausschüttung aus diesem Gewebe zu vermeiden. In einem kleinen Behälter, der mit einer isotonen NaCI-Lösung gefüllt ist, wird nun das linke Herzohr inzidiert und ein Ballon via linkem Vorhof in den linken Ventrikel eingebracht. Der Ballon wird später mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt, auf die ein Druck von 3 mm Hg ausgeübt wird. Dieser Ballon ist über einen Katheter mit einem Druckaufnehmer verbunden, über den im Laufe des Versuches die Kontraktionskraft des Ventrikels bei einem konstanten diastolischen Druck von 3 mm Hg gemessen wird. Dadurch wird eine Ventrikelvordehnung im Bereich des Optimums der Frank-Starling-Kurve erreicht. Die Präparation erfolgt komplett im Flüssigkeitsbad, um das Eindringen von Luft in den Ventrikel zu verhindern. Diese Luft könnte unter Umständen im weiteren Versuchsverlauf, falls der Ventrikeldruck den künstlichen Perfusionsdruck von 70 mm Hq überschreiten sollte, durch die sich druckpassiv öffnende Aortenklappe in das Koronarsystem eindringen und dort zu einer Luftembolie führen.

Mit der Perfusion der Koronarien beginnt das Herz wieder zu schlagen. Der Versuchsbeginn erfolgt nach einer Erholungsphase von 5 min, die gleichzeitig der Erfassung der Steady-state-Parameter dient.

# 2.1.1.2 Beschreibung der für die künstliche Perfusion des isolierten Herzens verwendeten Anlage

Zur Perfusion des isolierten Herzens wurde ein modifiziertes LANGENDORFF-Modell verwendet. Um das isolierte Herz, nachdem es explantiert worden ist, zum Schlagen zu bringen und für die Versuchsdauer von einer Stunde und 45 min am Schlagen zu erhalten, muss das Herz mit einer Lösung perfundiert werden, die möglichst dem natürlichen Elektrolyt- und Nährstoffbedarf des Organismus entspricht. Diese Kriterien erfüllt die im Versuch verwendete Krebs-Henseleit-Lösung (für Zusammensetzung der Lösung und erreichte Konzentrationen im Perfusat siehe Tab. 1 des Anhangs). Das eingesetzte Perfusat erlaubte eine Versuchsdauer von etwa 2 h bei Flusswerten von 35-50 ml/min.

Die verwendete Anlage ist schematisch in Abbildung 2 dargestellt: Die isolierten Herzen werden mit einem konstanten Druck von 70 mm Hg perfundiert. In dem verwendeten Perfusionssystem wird das fertige Perfusat in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37°C eingestellt (1). Über eine Rollerpumpe (2) wird es zu einem Gasaustauschsystem geführt (3), in dem eine Anreicherung mit O<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> erfolgt. Die Gase werden dabei physikalisch im Perfusat gelöst. Zur ausreichenden O<sub>2</sub>-Versorgung wird ein pO<sub>2</sub> von 500-600 mm Hg äquilibriert. Der pCO<sub>2</sub> muss erfahrungsgemäß auf einem Wert von 16-19 mm Hg einreguliert werden, um einen

pH-Wert zwischen 7,40 und 7,45 zu erreichen. Über eine Membran (4) können



Abb. 2. Schematische Darstellung der verwendeten Anlage. 1 = Perfusatbehälter im Wasserbad,
2 = Rollerpumpe, 3 = Gasaustauschsystem für CO<sub>2</sub> und O<sub>2</sub>, 4 = Membran für
Perfusatentnahme, 5 = zweite Rollerpumpe, 6 = Filterstation, 7 = zusammengefalteter Schlauch
zur Temperatur-Steuerung des zirkulierenden Perfusates, 8 = Verzweigung des Perfusatflusses,
9 = Stativ zur Einstellung des Perfusionsdruckes, 10 = Strömungsmessknopf, 11 =
elektronischer Druckaufnehmer, 12 = abmontierbares Katheterstück für intraoperative
Cardioplegie, 13 = Ballon im linken Ventrikel, 14 = höhenverstellbarer Flüssigkeitsbehälter zur
Druckeinstellung im Ballon (entspricht dem enddiastolischen Druck), 15 = Behälter zur Immersion
des Herzens, 16 = Thermometer, 17 = doppelwandiges Auffanggefäß, 18 = 8-Kanal-Registriergerät.

blasenfrei Proben aus dem Perfusatkreislauf vor dem Herzen zur Bestimmung von

PO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub> und dem pH-Wert in einem Blutgasanalysegerät (ABL 330, Fa.

Radiometer Kopenhagen) entnommen werden.

Nach Passage des Gasaustauschsystems wird das Perfusat über eine weitere

Rollerpumpe (5) zu einer Filterstation, die aus einem Blood Transfusion Filter (Sq-

40S, Fa. Pall) besteht (6), gepumpt. Das Perfusat durchströmt anschließend einen

Schlauch von etwa 1 m Länge und 2 mm Lumenweite (7). Dieser befindet sich

zusammengefaltet in einem doppelwandigen, geheizten Wasserbad. Durch die

Eintauchhöhe des Schlauchknäuels kann eine sehr feine Abstimmung der Temperatur des Perfusats erreicht werden. Die Richtung des Perfusatflusses verzweigt sich nun (8). Ein Teil der Flüssigkeit läuft über ein senkrecht angebrachtes Schlauchstück zurück zum Perfusatbehälter im Wärmebad im Sinne eines Überlaufs. der andere Teil strömt zum Herzen. Die Höhe des abführenden Schlauchsegmentes lässt sich mit Hilfe eines Stativs einstellen (9). Nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren kann damit ein konstanter Perfusionsdruck zum Herzen von 70 mm Hg eingestellt werden, die überschüssige Flüssigkeit wird zum Perfusatbehälter (1) umgeleitet. Dieser Perfusionsdruck entspricht dem physiologischerweise bei Kaninchen vorhandenen diastolischen Aortendruck, der für die vornehmlich während der Diastole wirksame Koronarperfusion verantwortlich ist. Der koronare Perfusionsdruck kann in dem LANGENDORFF-Modell unabhängig von der Schlagkraft des Ventrikels konstant eingestellt werden. Somit kann ein Circulus vitiosus infolge einer geringeren Koronarperfusion bei einsetzender geringerer Schlagleistung des Herzens und konsekutiver weiterer Abschwächung der Schlagleistung unterbunden werden. Es kann somit die alleinige Wirkung der zu testenden Substanz in Bezug auf die Inotropie untersucht werden. Der zum Herzen führende Schlauch durchläuft einen elektromagnetischen Strömungsmessknopf (10), der mit einem Messgerät im Verbindung steht. Bei Durchfluss der ionenreichen Perfusionsflüssigkeit entsteht durch Induktion nach dem Faraday'schen Prinzip eine Spannung, die proportional der durchströmenden Flüssigkeitsmenge ist. Diese wird durch das Messgerät (Blood Flowmeter SP 2202, Fa. Gould) erfasst und als Volumen pro Zeiteinheit (ml/min) ausgegeben. Dieses ermöglicht eine direkte Messung des Koronardurchflusses, da das gesamte Perfusat ausschließlich die Koronarstrombahn perfundiert.

Über einem in allen Richtungen geöffneten 3-Wege-Hahn wird ein Schlauchstück dem Perfusatfluss parallel geschaltet, das mit einem elektronischen Druckaufnehmer in Verbindung steht (11) und den Perfusionsdruck in mm Hg misst. Das letzte Schlauchsegment (12) kann flexibel abmontiert und während der Explantation an einer Spritze mit Cardioplegie-Lösung angeschlossen werden, um einen Erregungsleitungsblock des Herzens bis zum Anschluss an das Perfusionssystem zu induzieren. Unmittelbar vor dem Katheterende, das retrograd in die Aorta eingeführt wird, ist noch ein parallel geschalteter Schlauchteil angefügt. Mit Hilfe eines 3-Wege-Hahnes lässt sich so eine Umleitung der Flüssigkeit am Herzen vorbei durchführen, um letzte, noch vorhandene Luftblasen vor Anschluss des Herzens ableiten zu können.

Der Ballon (13), der im linken Ventrikel zur Druckmessung platziert wird, steht ebenfalls mit einem elektronischen Druckaufnehmer in Verbindung. Parallel dazu wird ein Flüssigkeitsbehälter geschaltet, dessen Höhe verstellbar ist (14). Wie bei der Präparation beschrieben, dient er dazu, den Ballondruck auf 3 mm Hg einzuregulieren, der den enddiastolischen Druck im Organismus simuliert. Es kann somit ein Optimum der Vorlast des Herzens im physiologischen Bereich eingestellt werden. Ein dazwischengeschalteter 3-Wege-Hahn erlaubt je nach Stellung eine isometrische oder eine isotonische Druckentwicklung im Herzen. Das Herz selbst befindet sich in einem kleinen mit Perfusat gefüllten Behälter (15). Je eine Elektrode wird an der Herzbasis und eine an der Flüssigkeit im Behälter angelegt. Sie ermöglichen eine bipolare EKG-Ableitung. Im Wasserbad befindet sich auch der Messkopf eines Thermometers (Thermometer 1100, Fa. Testotherm) (16), das die Temperatur des Perfusates anzeigt.

Die ganze Anordnung wird in einem doppelwandigen, geheizten Auffanggefäß gelagert (17), der die Entnahme von Proben des Perfusates zur laborchemischen Bestimmung der Metaboliten Thromboxan  $B_2$  oder 6-Keto-PGF<sub>1</sub> $\alpha$ , den Metaboliten des Thromboxans und Prostazyklins, erlaubt.

Alle gemessenen, für den Versuch relevanten Parameter (Perfusionsdruck,

Ballondruck = linksventrikuläre Druckamplitude, Flow und EKG zur Messung der

Herzfrequenz), werden auf einem 8-Kanal-Schreiber (Schwarzer Uniscript UD 210,

Fa. Picker) als kontinuierliche Kurven ausgegeben (18).

Mit Hilfe des LANGENDORFF-Versuchsmodells können somit die wichtigsten

Parameter des Herzens untersucht werden:

- Perfusionsdruck
- Koronarfluss
- linksventrikuläre Druckamplitude
- EKG
- Herzfrequenz.

Die Messung des Perfusionsdruckes und des Koronardurchflusses erlaubt die Berechnung des koronaren Strömungswiderstandes R im Sinne der abgeleiteten

Ohm'schen-Formel (Abb. 3):

$$\frac{R = P}{F} = \frac{[mm Hg]}{\left[\frac{ml}{min}\right]}$$

**Abb.3**. Ohm'sche Formel. R = koronarer Strömungswiderstand, P = Perfusionsdruck im Koronarsystem, F = Koronardurchfluss.

Dabei symbolisiert P den Perfusionsdruck in dem Koronarsystem und F den Koronardurchfluss. Der gemessene Koronarwiderstand wird in Relation zum Gewicht des isolierten Herzens gesetzt und als Einheit pro 10g Herzgewebe ausgegeben. Somit kann direkt die Wirkung vasodilatativer sowie -konstringierender Substanzen auf das Koronarsystem getestet werden. Diese kann entweder direkt anhand der Veränderung des Koronarflusses (bei konstantem Perfusionsdruck) oder noch empfindlicher über Beobachtung der veränderten Autoregulation der Koronargefäße bei künstlich induzierter abrupter Veränderung des Perfusionsdruckes erfasst werden. Dabei macht man sich den Bayliss-Effekt zunutze, der eine Dilatation der Gefäße bei abrupt erhöhtem Perfusionsdruck und vice versa beschreibt. Ziel des Organismus ist eine Konstanthaltung des Perfusionsdruckes.

So konnten z.B. GRÜN und FLECKENSTEIN [13] eine Aufhebung der myogenen Autoregulation durch den Ca-Antagonisten Verapamil beobachten. Eine induzierte abrupte Abnahme des Perfusionsdruckes konnte infolge der vasodilatierenden Wirkung des Ca-Antagonisten nicht mehr mit einer Vasokonstriktion der Koronargefäße beantwortet werden, so dass der Perfusionsdruck nicht mehr ansteigen konnte. Ähnliche Experimente wurden mit Nitroglycerin durch THURAU und KRAMER und DÖRING durchgeführt [13].

Über das Verhalten der direkt messbaren linksventrikulären Druckamplitude können inotrope Substanzen getestet werden. Dabei kann die Beurteilung negativer inotroper Substanzen direkt über die Verminderung der linksventrikulären Druckamplitude erfolgen.

Zur Prüfung positiver inotroper Substanzen lässt sich durch eine vorherige Abschwächung der Herzkraft eine Sensitivitätssteigerung der Methode erreichen. Diese kann analog der Versuche von KRAYER [13] durch Umschaltung auf ein

Perfusat erfolgen, dem entweder Barbiturate oder Ca-Antagonisten wie Verapamil zugesetzt werden. Beide Substanzen inhibieren die Ca-abhängige Erregungs-Kontraktions-Folge und somit die Druckamplitude, die dann von der getesteten Substanz wieder angehoben werden sollte.

Uber die simultane Messung eines EKG während des Versuchsablaufes kann das Chronotropie-Verhalten und die Wirkung auf den Herzrhythmus studiert werden. So testeten FREY und DÖRING sowie NOLTE et al. die Wirkung von Antiarrhythmika auf eine durch Doppelstimuli induzierte ventrikuläre Extrasystolie [13]. Des weiteren können histologische Schnitte unter wesentlicher Artefaktverminderung durch Perfusion mit der Fixierlösung durch das Koronarsystem aufbereitet werden (z.B. Koronarperfusion mit Phosphat-gepuffertem Glutaraldehyd durch POCHE et al.). Außerdem können durch Perfusion des Herzens mit enzymatischen Substanzen isolierte Herzzellen gewonnen werden (z.B. Kollagenase-Gabe im Perfusat durch RAJS et al.) [13].

Neben hämodynamischen Messungen kann das aus dem Koronarsystem ausströmende Perfusat auf das Vorhandensein von Metaboliten, Mediatoren und Marker für Zellschädigung untersucht werden (z.B. Freisetzung von Creatinin-Kinase in Herzen mit Teilobstruktion der Koronargefäße durch BERNAUER und WOLF [13]). Somit bewährt sich auch weiterhin, 90 Jahre nach ihrer Erstbeschreibung, die Methode nach LANGENDORFF in zahlreichen Abwandlungen als zuverlässiger Versuchsaufbau zur Testung der potentiellen Wirkungen herzaktiver Substanzen.

# 2.1.1.3 Versuchsverlauf während des künstlichen Kreislaufes

Nach Durchspülen des künstlichen Kreislaufes mit physiologischer Kochsalzlösung wird das angesetzte Perfusat in den Vorratsbehälter im Wärmebad eingesetzt und ein Durchlauf gestartet, um die noch in den Schläuchen verbliebene NaCI-Lösung auszuspülen. Die Flussrichtung ist dabei durch 3-Wege-Hähne so bestimmt, dass die durchlaufende Flüssigkeit nicht rezirkuliert, sondern verworfen wird. Es wird nach mehrmaligem Beklopfen der Filter sichergestellt, dass eventuell noch vorhandene Luftblasen entweichen und dass der Perfusatstrom blasenfrei abläuft. Danach wird die Anlage auf Rezirkulation umgestellt, um Perfusat bis zum eigentlichen Beginn des Experiments zu sparen.

Die Druckaufnehmer für den Perfusionsdruck und die Kontraktionsamplitude werden bei atmosphärischem Druck auf 0 geeicht, indem bei Unterbrechung des Kreislaufes die Schläuche durch Umstellen der 3-Wege-Hähne in einem offenen System verwandelt werden.

Bei stillstehendem Kreislauf wird außerdem das Flowmeter auf 0 geeicht. Nachdem die Flüssigkeit die gewünschte Temperatur von 37 °C erreicht hat, wird der O<sub>2</sub>- und CO<sub>2</sub>-Gasfluss so einreguliert, dass in der rezirkulierenden Flüssigkeit ein pH-Wert von  $\approx$ 7,4 bis 7,45 und ein pO<sub>2</sub> von 500-600 mm Hg erreicht wird. Dazu werden ständig Proben aus dem Kreislauf entnommen und in dem Blutgasmessgerät analysiert.

Durch Heben und Senken des integrierten Flüssigkeitsniveaugefäßes wird im Ballon zur linksventrikulären Druckmessung ein enddiastolischer Druck von 3 mm Hg eingestellt. Nachdem mit Versuchsbeginn der Perfusatfluss auf Durchlauf gestellt wurde, fängt das Herz durch das Ausspülen der Cardioplegie-Lösung wieder spontan an zu schlagen. Das dabei aus dem Herzen ausströmende Perfusat wird verworfen. Gleichzeitig wird durch Heben oder Senken des Niveaugefäßes für die Koronarperfusion der Perfusionsdruck auf 70 mm Hg eingestellt.

Sobald alle Parameter (Systemdruck, pH, pO<sub>2</sub>, Temperatur) im gewünschten Bereich stabil eingestellt sind, beginnt die chronologische Sequenz des Versuches (Abb. 4). Initial wird zunächst das Ventil des intraventrikulären Ballonanschlusses so umgestellt, dass sich der bis dahin noch leere intraventrikuläre Ballon während der Diastole mit Flüssigkeit mit dem voreingestellten Druck von 3 mm Hg füllen kann. In der Systole kann die Kontraktion des Herzens jedoch den Ballon wieder entleeren, so dass das Herz nur isotonisch belastet wird. Dieser Zeitpunkt wird als Zeitpunkt 0 des Experimentes markiert. Nach 5 min wird der Flüssigkeitsrückfluss aus dem Ballon blockiert, so dass sich das Herz isometrisch kontrahieren muss. Ab jetzt kann die Druckamplitude als Unterschied zwischen dem maximalen systolischen Ventrikeldruck und dem eingestellten Ballondruck (3 mm Hg) über den elektronischen Druckabnehmer gemessen werden.

Das Herz wird so für weitere 25 min, insgesamt also 30 min, perfundiert. Danach wird das Herz für weitere 30 min durch Unterbrechung der Perfusion in Ischämie versetzt und anschließend wieder für 45 min perfundiert (Reperfusionszeit). Das durch das Herz fließende Perfusat wird über bestimmte Zeitabstände gesammelt, um daraus anschließend Proben für die Bestimmung von Thromboxan TXB<sub>2</sub> und 6-Keto-PGF<sub>1</sub> zu entnehmen. Die Sammelperioden erfolgen zwischen folgenden Zeitpunkten:

- Start des Versuchs nach Äquilibrierung des Steady-state bis zur 15. min der Perfusion
- zwischen der 15. und der 30. min (Ende Perfusion vor Beginn der Ischämie-Phase)
- 3. unmittelbar nach bis 2,5. min nach Einsetzen der Reperfusion (nach Ende der Ischämie)
- 4. zwischen der 2,5. und der 10. min nach Reperfusion
- 5. zwischen der 15. und der 30 min nach Reperfusion



**Abnb.4.** Chronologischer Ablauf eines Experiments. Durchgezogene Linie = Steady-state-Einstellung, isotonische Kontraktion des Herzens, linker Balken = Perfusion des Herzens, gepunktete Linie = Ischämie des Herzens, rechter Balken = Reperfusion nach Ablauf der Ischämie-Zeit

#### 2.1.1.3.1 Aprotinin-Testreihe

Es werden 2 Gruppen mit je 12 Versuchstieren gebildet, die miteinander verglichen

werden (Abb. 5).

In Gruppe 1 wird kein Aprotinin während der Perfusionsphase dem Perfusat zugemischt. Nach der 30. min wird das Herz durch Abdrehen der Perfusatzufuhr + Injektion von 10 ml Cardioplegie-Lösung zum Stillstand gebracht.

Bei den Versuchen der Gruppe 2 werden 2 x 100.000 KIU Aprotinin (Trasylol<sup>®</sup>, Fa. Bayer) in der 15. min der Perfusion im Perfusatbehälter zugegeben (erreichte Konzentration 100 KIU/mI). Der Rest des Versuches erfolgt analog Gruppe 1, indem die Herzen nach der 30. min durch Abdrehen der Perfusatzufuhr + Injektion der Cardioplegie-Lösung gestoppt werden.

In allen 2 Gruppen erfolgt nach 30 min Ischämie eine Reperfusion der Herzen durch Einschalten der Perfusatzufuhr. Die Herzen werden dabei für weitere 45 min reperfundiert. Anschließend wird die Perfusatzufuhr wieder unterbrochen, und es werden die Herzen nach erfolgtem Stillstand gewogen.



**Abb. 5.** Versuchsgruppen Aprotinin. Linker Balken = Perfusion, mittlerer Balken = Ischämie-Periode, rechter Balken = Reperfusionsperiode, Gruppe 1 = unbehandelte Kontrollgruppe, Gruppe 2 = mit Aprotinin behandelte Gruppe, Schraffierung = Periode der Aprotinin-Gabe.

# 2.1.1.3.2 Testreihe zur Bradykinin-Antagonisierung mit dem Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127

Hierbei wurden die Tiere wie bei der ersten Testreihe behandelt, es wurde aber ab der 15. min der Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist CP-0127 bis zum Erreichen einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> mol/l dem Perfusat zugemischt (Abb. 6). Es wurden 6 Tiere mit dem Antagonisten getestet, 6 weitere Tiere wurden analog der Gruppe 1 in der Aprotinin-Testreihe nur mit der Cardioplegie-Lösung behandelt und dienten als Kontrollgruppe. Es wurden noch zwei weitere Gruppen von jeweils 6 Tieren gebildet, in denen die Ischämie durch Abschalten der Perfusatzufuhr ohne vorherige Gabe von Cardioplegie-Lösung induziert wurde. Ziel war es, vergleichend die Wirkung der Cardioplegie auf die Reperfusionsphase zu untersuchen. Der Versuchsablauf erfolgte analog den Gruppen 1 und 2, entweder mit Gabe des CP-0127 (Gruppe 3) oder ohne als reine Ischämie-Kontrollgruppe (Gruppe 4).



**Abb. 6.** Versuchsgruppe Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist CP-0127. Linker Balken = Perfusion, mittlerer Balken = Ischämie-Periode, rechter Balken = Reperfusionsperiode, Schraffierung = Periode der Gabe des Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127, Gruppe 1 = Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist(CP-0127)-Gabe ab der 15. Perfusionsminute in Kombination mit Cardioplegie-Induktion des Herzstillstandes, Gruppe 2 = Kontrollgruppe mit alleiniger Cardioplegie-Induktion des Herzstillstandes, Gruppe 3 = Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist(CP-0127)-Gabe ab der 15. Perfusionsminute in Kombination mit ischämischer Induktion des Herzstillstandes, Gruppe 4 = Kontrollgruppe mit alleiniger ischämischer Induktion des Herzstillstandes.

## 2.1.2 Laborchemische Bestimmung der Metabolite von

#### Thromboxan A<sub>2</sub> und Prostacyclin

Es werden TXB<sub>2</sub> als Metabolit des Thromboxan A<sub>2</sub> und 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$ </sub> als stabiles Hydrolyseprodukt des Prostacyclinabbaus mit Hilfe eines Doppelantikörper-Radioimmunoassay (RIA) aus den entnommenen Perfusatproben entsprechend der Methode nach Peskar et al. [14] bestimmt.

### 2.1.2.1 Bestimmung des TXB<sub>2</sub>

Dabei konkurieren das in 100 µl der Perfusatprobe vorhandene TXB<sub>2</sub> und das in bekannter Konzentration eingesetzte radioaktiv markierte TXB<sub>2</sub> (3H) (Tracer) um die Bindung mit einem eingesetzten Kaninchen-Antikörper gegen TXB<sub>2</sub>. Da die Menge des Tracers und des Antikörpers bekannt sind, wird der Prozentsatz an markierter Substanz (Tracer), die mit dem Antikörper reagiert, umso geringer, je mehr unmarkierte zu bestimmende Substanz (TXB<sub>2</sub> im Perfusat) vorhanden ist. Durch Vergleich mit mehreren Standardkonzentrationen von TXB<sub>2</sub> anhand von Standardverdünnungskurven ist es möglich, die unbekannte Menge des TXB<sub>2</sub> in der Perfusatprobe zu ermitteln.

Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden mit einem weiteren Antikörper (GOAT) präzipitiert und durch Zentrifugieren sedimentiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wird das Sediment mit 0,1 N NaOH (Nr. 9141, Fa. Merck) resuspendiert. Die Messung der vom gebundenen Tracer ausgehenden Radioaktivität erfolgt durch Umwandlung der Strahlenenergie in Lichtenergie durch eine Szintilatorflüssigkeit (Rotiszint eco Plus, Fa. Karl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) und anschließende Zählung in einem Betacounter (2000CA TRICARB<sup>®</sup>, United Technologies Packard, Frankfurt).

# 2.1.2.2 Bestimmung des 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$ </sub>

Die Bestimmung erfolgte analog der Methode für TXB<sub>2</sub>. Es wurden hier Kaninchenanti-6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$ </sub> Antikörper sowie 3H-markiertes 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$ </sub> als Tracer eingesetzt.

Bei den verwendeten Tests lag die untere Nachweisgrenze für  $TXB_2$  bei 5 pg/ml und für 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$ </sub> bei 10 pg/ml.

# 2.1.2.3 Bezugsquellen der Antikörper und Tracer

Kaninchen-anti-TXB<sub>2</sub>-Antikörper sowie Kaninchen-anti-6-Keto-PGF<sub>1a</sub>-Antikörper wurden von Paesel (Frankfurt), 3H-markiertes TXB<sub>2</sub> und 3H-markiertes 6-Keto-PGF<sub>1a</sub> von New England Nuclear (Dreieich) und präzipitierende Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper von Calbiochem-Behring (Frankfurt) erworben.

## 2.1.3 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

Für die Berechnungen wurde ein Statistiksoftwarepaket (Statgraphics Ver. 4.0, STSC Inc., USA) benutzt. Aus den Rohdaten wurden für alle Zeitpunkte Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes (SE) errechnet und graphisch dargestellt. Die Mittelwerte in den einzelnen Gruppen wurden mit einer einfachen Varianz-Analyse (ANOVA) verglichen. Zur weiteren Differenzierung wurde der Tukey-Test angewandt. Die 0-Hypothese wurde ab einem Signifikanzniveau p < 0,05 verworfen.

### 2.2 Material

## 2.2.1 Aprotinin

# 2.2.1.1 Entdeckung, physiologische Organverteilung und Isolierungsmethoden

KRAUT et al. [15] fanden 1930 in Rinderlymphknoten einen Stoff, den sie aufgrund seiner Eigenschaften als "Kallikrein-Inaktivator, bezeichneten. Unabhängig davon entdeckten KUNITZ und NORTHROP 1936 [15] einen Trypsinhemmstoff im Rinderpankreas. Schließlich wiesen WERLE et al. Kallikrein-Hemmaktivitäten auch in anderen Geweben, die vom Rind stammten, wie z.B. von Lunge, Parotis, Milz, Leber, Pankreas und Samenblase, nach [15].

Später wurde festgestellt, dass die inhibierende Wirkung auf das Kallikrein sowie auch auf das Trypsin, die beide Proteasen darstellen, zum größten Teil auf das Vorkommen des gleichen Stoffes zurückzuführen war, den man als Aprotinin bezeichnete. Weiterhin wurde die Substanz aufgrund seiner Kallikreininaktivierenden Eigenschaft auch noch in Ovar-, Herz-, Hypophyse-, Knorpel- und Aortengewebe des Rindes nachgewiesen.

Weltweit setzte sich die so genannte KIU als Maß für die Aprotininaktivität durch. Eine KIU ist definiert als diejenige Aprotinin-Menge, die die Aktivität von zwei biologischen Kallikrein-Einheiten (KU) um 50% erniedrigt. Sie entspricht einer Menge von 0,14 Mikrogramm Aprotinin. Dabei ist eine KU als diejenige Kallikrein-Menge definiert, die die gleiche Druckabnahme am Carotisdruck eines Hundes verursacht wie 5 ml Urin einer speziell definierten Sammelprobe gesunder Personen. Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz gelang die Lokalisation des Aprotinins vorwiegend in Mastzellen, was sich auch mit dem Organverteilungsmuster des Stoffes deckte. Gewebe, die besonders reichhaltig an Mastzellen sind (z.B. Lunge, Parotis, Pankreas), weisen auch eine hohe Aktivität an Aprotinin auf. Aufgrund seiner Verteilung in Mastzellen und seiner hemmenden Wirkung auf Proteasen wurde deswegen auch die Hypothese aufgestellt, dass Aprotinin an der Kontrolle der Proteinasenaktivität in Mastzellen beteiligt sein könnte [15].

Eine Isolierung des Stoffes ist mittels fraktionierter Fällung, Gelfiltration sowie Ionenaustauschchromatographie von Extrakten aus Lunge, Pankreas und Parotis des Rindes möglich. Durch anschließende Reinigung mittels Säurefällung mit nachfolgender Affinitätschromatographie an wasserunlöslichen Enzymderivaten, wie Trypsin-Sepharose, lässt sich eine Ausbeute bis zu 90% erreichen .

# 2.2.1.2 Stoffspezifische physikalische und chemische

### Eigenschaften

Es handelt sich um ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz von 58 Aminosäureresten mit einem Massengewicht von 6512 Dalton, das in kristalliner Form dargestellt werden kann.

Mittels Röntgenstrukturanalyse lässt sich eine birnenförmige 3D-Struktur ermitteln. Die Tatsache, dass dabei die hydrophoben Reste nach innen und die hydrophilen Reste außen lokalisiert sind, verleiht der Substanz eine außerordentlich kompakte Tertiärstruktur. Diese ist sehr resistent gegenüber Denaturierungsversuchen durch hohe Temperaturen, Säuren, Basen, organische Lösungsmittel sowie proteolytischen Abbau. So kann Aprotinin kurzzeitig ohne Aktivitätsverlust in verdünnter Säure auf 100 °C bzw. in 2,5% Trichloressigsäure auf 80 °C erhitzt werden. Es kann in Lösungen mit einem pH-Wert zwischen 1 und 12,6 in intaktem Zustand gelöst werden. Des weiteren ist der Inhibitor stabil und löslich in 70% wässrigem Methanol oder Ethanol sowie in 50% wässrigem Aceton.

Bemerkenswert ist außerdem die Stabilität gegenüber dem Abbau durch Proteasen. Lediglich Thermolysin ist nach dem momentanen Erkenntnisstand in der Lage, "natives" Aprotinin nach Hitzelabilisierung bei 60-80 °C zu spalten.

Die negativ geladenen Reste sind an der Basis der birnenförmigen Struktur lokalisiert, was einen starken Dipolcharakter des Moleküls bedingt. Weiterhin fällt ein isoelektrischer Punkt von 10,5 auf, der auf eine starke Basizität des Stoffes hinweist. Diese ist unter anderem für einige pharmakologische Interaktionen wichtig, wie z.B. die Bildung schwerlöslicher Komplexe mit dem saueren Mucopolysaccharid Heparin (diese spielt aber *in vivo* wegen der dabei starken Verdünnung im Körper keine
Rolle) oder die starke Bindung an die neuraminsäurereichen Bestandteile des Bürstensaums der Nierentubuli.

Oft wird Aprotinin auch an den normalerweise verwendeten Dialysemembranen gebunden, was den Gebrauch acetylierter oder neutraler Dialysemembranen mit einer Ausschlussgröße von 5000 Dalton notwendig macht.

#### 2.2.1.3 Hemmeigenschaften

Aprotinin blockiert mehrere Proteinasen mit unterschiedlich starker Wirkung. Das reaktive Zentrum des Aprotinins wurde in der Sequenz Lys(15)-Ala(16) lokalisiert. Diese sterische Konfiguration ermöglicht es dem Inhibitor, an Proteinasen zu binden, die einen Serin-Rest in ihrem aktiven Zentrum tragen, wie dies für Trypsin, Kallikrein, Plasmin, Elastase, Urokinase und andere so genannte Serin-Proteasen der Fall ist. Diese Enzyme werden jedoch in unterschiedlichem Maße durch den Inhibitor blockiert. Es stellt sich ein stöchiometrisches Gleichgewicht bei der Reaktion ein.

## (c)E + (c)I \_\_\_\_\_(c) C

Abb. 7.. Stöchiometrisches Gleichgewicht für eine Enzym Inhibition. (c) E = Konzentration des Enzyms, (c) I = Konzentration des Inhibitors, (c) C = Konzentration des Enzym-Inhibitor Komplexes. Dabei definiert (c) E die Konzentration des Enzyms, (c) I die Konzentration des Inhibitors und (c) C die Konzentration des Enzym-Inhibitor Komplexes. Annähernd lässt sich die Affinität des Aprotinins zu seinem Substrat durch die Gleichgewichts-(Dissoziations-)Konstante K<sub>i</sub> beschreiben, die in mol/I die Rückbildung des nativen Inhibitors charakterisiert.

$$K_{i} = (c)E \times c)I$$

$$(c)C$$

**Abb. 8.** Dissoziationskonstante als Maß für die Enzym-Affinität. (c) E = Konzentration des Enzyms, (c) I = Konzentration des Inhibitors, (c) C = Konzentration des Enzym-Inhibitor Komplexes.

Je kleiner K<sub>i</sub> ist, desto weniger tendiert der Inhibitor aus dem Komplex, mit dem Enzym zu dissoziieren, das Enzym wird also um so effektiver blockiert. Betrachtet man die Dissoziationskonstanten für ausgewählte Enzyme beim Menschen, so wird die unterschiedliche Wirkungsstärke des Inhibitors veranschaulicht: K<sub>i</sub> Plasmin (1,0 x  $10^{-9}$  mol/l) < K<sub>i</sub> Kallikrein-Plasma (3,5 x  $10^{-8}$  mol/l) < K<sub>i</sub> Elastase (3,5 x  $10^{-6}$  mol/l) < K<sub>i</sub> Urokinase (8,0 x  $10^{-6}$  mol/l). Im Vergleich dazu ist die K<sub>i</sub> des Gewebe-Kallikreins des Schweins (das in enger Verwandtschaft zum humanen Gewebe-Kallikrein steht [3]) in einer ähnlich günstigen Größenordnung wie das Plasmin (Gewebe-Kallikrein des Schweinepankreas 1,3 x  $10^{-9}$  mol/l sowie der Schweinesubmandibula 1,6 x  $10^{-9}$ mol/l).

In vielen Versuchen, die sich mit der entzündungshemmenden Eigenschaft von Aprotinin beschäftigten, wurden unterschiedliche Konzentrationen verwendet, was vielleicht auch für die widersprüchlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnte. Es ist deswegen wichtig, eine Mindestkonzentration des Wirkstoffs zu errechnen, die eine effektive Hemmung des postulierten Zielsystems erreicht.

In dem vorliegenden Versuchsaufbau wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen: Die konzentrationsabhängige Potenz des Aprotinins konnte in einem System simuliert werden, in dem die Abnahme der Plasma-Kallikrein-abhängigen Aktivierung des Gerinnungssystems als Maß für die Inaktivierungskraft des Aprotinins galt. Je geringer die Gerinnungsaktivierung, desto stärker ist dabei die Aprotinin-Wirkung.

Da die K<sub>i</sub> für Plasma-Kallikrein den Wert der *In-vivo*-Konzentration des Plasma-Prokallikreins erreicht, ist ein großer molarer Überschuss an Aprotinin nötig, um eine effektive Hemmung zu erzielen. Diese wird erst ab einer Aprotinin-Konzentration von 250 bis 500 KIU/ml erreicht.

Hingegen wird eine vollständige Hemmung des Plasmins bereits bei einer Aprotinin-Konzentration von 125 KIU/ml erzielt, da die K<sub>i</sub> für Plasmin weit unter der *in vivo* Konzentration des Plasmins liegt [16].

Es sind also 250-500 KIU/ml notwendig, um die Gesamtaktivität aller genannten Proteinasen im gesamten Organismus zu hemmen. Sie sind bei Verwendung von Ganzkörpermodellen als Anhalt für eine ausreichende Konzentration des Inhibitors verwendbar, um eine Unterdosierung des Stoffes auszuschließen.

Im Organismus müssten jedoch weit geringere Konzentrationen bereits ausreichend sein, da dort nur Bruchteile der Enzyme aus ihren Vorstufen freigesetzt werden und somit aktiv sind. Außerdem sind körpereigene endogene Inhibitoren vorhanden, die in einem beträchtlichen molaren Überschuss vorliegen und ähnlich rasch wie das Aprotinin reagieren. (Im LANGENDORFF-Modell am isolierten Herzen, liegen nur die gewebeständigen Proteasen des Herzens vor, so dass in unserem Experiment eine niedrigere Inhibitionskonzentration des Aprotinins von 100 KIU/ml verwendet wurde.)

## 2.2.1.4 Pharmakokinetik

Da Aprotinin ein Peptid ist, muss es parenteral verabreicht werden, um eine Inaktivierung im Magen-Darm-Trakt zu umgehen. Weiterhin muss Aprotinin als

Dauerinfusion verabreicht werden, da der Plasmaspiegel sehr rasch abnimmt. So sind nach Gabe eines Bolus von 500.000 KIU i.v. nach 15 min nur noch 50 KIU/ml, nach 30 min nur noch 30 KIU/ml und nach 4 h schließlich nur noch 10 KIU/ml im Plasma vorhanden .

Zu diesem Zeitpunkt findet man in der Ratte 80% der Aprotinin-Dosis in den Nieren, wo es von Epithelzellen der proximalen Tubuli aufgenommen wird. Danach folgt eine fast vollständige Metabolisierung in Phagosomen des Nierengewebes. Lediglich 1,5% einer Dosis von 1.000.000 Einheiten werden mit dem Urin ausgeschieden. Trotz einer extrem niedrigen Toxizität ( $LD_{50} = 0,5 \times 10^6 \text{ KIU/kg}$  für Kaninchen), müssen schnelle Injektionen von großen Dosen vermieden werden, da die hohe Basizität des Aprotinins zur Histamin-Liberation mit nachfolgender anaphylaktischen Reaktion führen kann.

#### 2.2.1.5 Nachweismethoden

Die ersten Nachweismethoden liefen über Trypsinhemmtests, da Aprotinin eine wesentlich schnellere Hemmung des Trypsins als des Kallikreins bewirkt. Dabei wurde der Umsatz eines geeigneten Substrats [N-Benzoylarginin-p-nitroanilid (L-BAPA)], der durch Trypsin katalysiert wird, anhand der Absorptionsänderung bei 405 nm gemessen.

Heute liegen modernere spezifische Radioimmunoassays oder Enzymimmunoassays vor, die einen empfindlicheren Nachweis ermöglichen [17, 18].

# 2.2.2 Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist CP-0127

Der hier verwendete selektive Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor Antagonist CP-0127 wurde von der Firma Cortech,Denver, USA, bereitgestellt und in einer Dosierung von 10<sup>-6</sup> mol/I verwendet.

## 3 Ergebnisse

## 3.1 Aprotinin-Testreihe

Wie bereits im Kapitel Material und Methodik beschrieben, wurden zwei Gruppen zu je 12 Tieren verglichen. Gruppe 1 war dabei die Kontrollgruppe und Gruppe 2 die Medikamentengruppe, die Aprotinin als Perfusatadditiv verabreicht bekam.

#### 3.1.1 Inotropie

Zunächst wurde für jeden Zeitpunkt die Differenz zwischen systolischem und diastolischem (künstlich angelegter Ballondruck zur Simulation der Ventrikelvordehnung nach Frank-Starling) Ventrikeldruck berechnet, im Folgenden als Amplitude (Amp) bezeichnet. Der Amplitudenwert in der 6. min der Messung wurde als Ausgangswert (100%-Wert) gewählt. Um unterschiedliche Amplitudenwerte in den einzelnen Experimenten miteinander zu vergleichen, wurden diese in Prozent des Ausgangswertes umgerechnet (siehe Abb. 9 sowie Tab. 2 im Anhang).

Für die Dauer der Perfusionszeit vor der Cardioplegie unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant. So betrug zum Zeitpunkt 30 min, unmittelbar vor Einsetzen der Cardioplegie die linksventrikuläre Druckamplitude in der unbehandelten Kontrollgruppe 98,8  $\pm$  6,7% (SE), im Vergleich zu 109,2  $\pm$  4,58% (SE) in der Aprotinin-Gruppe. Durch Injektion der Cardioplegie und Perfusionsstopp wurde anschließend ein Herzstillstand für 30 min ausgelöst.

4 min nach Einsetzen der Reperfusion, das entspricht der 64. min, erholt sich die Amplitude in der Aprotinin-Gruppe und steigt auf 126,4  $\pm$  10,5% (SE) des Ausgangswertes und damit geringfügig mehr im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 111,7  $\pm$  12% (SE).

Der überproportionale Amplitudenanstieg in beiden Gruppen unmittelbar mit Beginn der Reperfusionsphase fällt bis zur 76. min (16 min nach Einsetzen der Reperfusion) gleichmäßig ab. Zu diesem Zeitpunkt liegen beide Gruppen ungefähr gleich mit einem Amplitudenabfall auf 84,01  $\pm$  9,28% (SE) in der Kontrollgruppe und 92,2  $\pm$ 7,03% (SE) in der Aprotinin-Gruppe.

Ab diesem Zeitpunkt jedoch nehmen die linksventrikulären Druckamplituden in den beiden Gruppen unterschiedliche Verläufe an. Während die Kontrollgruppe langfristig einen stetigen Abfall der Amplitude auf 73,9  $\pm$  8% (SE) in der 90. min (30 min nach Reperfusionsbeginn) verzeichnet, zeigt die Medikamentengruppe eine deutlich positive Entwicklung mit einem erneuten Amplitudenanstieg auf 98,21  $\pm$  6,73% (SE) während des gleichen Zeitpunktes. Dieser Trend bleibt bis zum Versuchsende in der 105. min konstant und ist mit p < 0,05 signifikant.



**Abb. 9**. Druckamplitude des linken Ventrikels in Prozent des Ausgangsdruckes (in der 6. min nach Beginn des Experiments) für die Kontrollgruppe (Quadrate) im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe (Dreiecke). Der schwarze Balken markiert die Dauer der Ischämie-Zeit zwischen der 30. und der 60. min. Die Messwerte sind der Tabelle 2 im Anhang zu entnehmen.

## 3.1.2 Mediatorfreisetzung

#### 3.1.2.1 Thromboxan B<sub>2</sub>

Zum Zeitpunkt der Aprotinin-Gabe in der 15. min vor der Ischämie unterscheidet sich

die Thromboxan-B<sub>2</sub>-Konzentration in beiden Gruppen nicht [133,40  $\pm$  34,8 pg/ml (SE)

in der Kontrollgruppe, 138,9 ± 19,2 pg/ml (SE) in der Aprotinin-Gruppe] (siehe Abb.

10 sowie Tab. 3 im Anhang).

Während der gesamten Perfusionsphase vor der Ischämie bleiben die Thromboxan-

B<sub>2</sub>-Konzentrationen in beiden Gruppen annähernd konstant und unterscheiden sich

nicht wesentlich voneinander. So beträgt zum Zeitpunkt der 30. min unmittelbar vor

Cardioplegie und Perfusionsstopp die Thromboxan-B<sub>2</sub>-Konzentration 138,45  $\pm$  28,39

pg/ml (SE) in der Kontrollgruppe sowie 137,65  $\pm$  20,9 pg/ml (SE) in der behandelten Gruppe.

Nach Beendigung der 30-minütigen Ischämie-Phase und Einsetzen der Reperfusion verzeichneten beide Gruppen einen Anstieg der Thromboxan-B<sub>2</sub>-Konzentration, der jedoch in der Kontrollgruppe weitaus höher war.

So betrug 2 min und 30 s nach Einsetzen der Reperfusion (62 min und 30 s nach Versuchsbeginn) die Konzentration in der Aprotinin-Gruppe  $154,98 \pm 20,6$  pg/ml (SE), was einen Anstieg um 11,5% im Vergleich zum Ausgangswert in der 15. min bedeutet.

Demgegenüber nimmt die Thromboxan- $B_2$ -Ausschüttung in der unbehandelten Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt um 51% zu [auf 201,4 ± 26,85 pg/ml (SE)]. 10 min nach Einsetzen der Reperfusion nimmt in beiden Gruppen die Thromboxan- $B_2$ -Produktion leicht ab, als Zeichen der verbesserten metabolischen Situation durch die Reperfusion. Auch hier bestehen jedoch deutliche Unterschiede zwischen der unbehandelten und der behandelten Gruppe.

Insgesamt tendiert die Kontrollgruppe während des weiteren Experimentverlaufes jedoch zu einem Wiederanstieg der Thromboxan-B<sub>2</sub>-Ausschüttung auf 205,91  $\pm$ 29,46 pg/ml (SE)), wie die 90. min verdeutlicht. Im Gegensatz dazu nimmt in der Aprotinin-Gruppe die Thromboxan-B<sub>2</sub>-Konzentration signifikant ab und unterschreitet zum Zeitpunkt der 90. min sogar den Ausgangswert der 15. min um 9,16% [126,25  $\pm$ 19,5 pg/ml (SE), p = 0,01].



**Abb. 10**. Thromboxan-<sub>2</sub>-Konzentration im koronaren Ausflusstrakt für die Kontrollgruppe (Quadrate) im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe (Dreiecke). Der schwarze Balken markiert die Dauer der Ischämie-Zeit zwischen der 30. und der 60. min Messwerte sind der Tabelle 3 im Anhang zu entnehmen.

## 3.1.2.2 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>

Die Konzentration des Prostacyclin-Metaboliten zeigte während des gesamten Versuchsverlaufes keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf (siehe Abb. 11 sowie Tab. 4 im Anhang). Die Konzentration des Metaboliten blieb in beiden Gruppen während der Perfusionsphase annähernd konstant. Nach Beendigung der 30-minütigen Ischämie und Einsetzen der Reperfusion stiegen in beiden Gruppen die Konzentrationen der Metabolite signifikant an, wie es der Zeitpunkt der 62,5. min verdeutlicht. Im weiteren Verlauf der Reperfusion nahm die Konzentration von 6-Keto PGF<sub>1α</sub> wieder in beiden Gruppen gleichmäßig ab (10 min nach Reperfusion, in der 70. min). Der in der Kontrollgruppe anschließend zu beobachtende Anstieg (30 min nach Reperfusion, in der 90. min) war im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe nicht signifikant.



**Abb. 11:** 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$ </sub>-Konzentration im koronaren Ausflusstrakt für die Kontrollgruppe (Quadrate) im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe (Dreiecke). Der schwarze Balken markiert die Dauer der Ischämie-Zeit zwischen der 30. und der 60. min. Die Messwerte sind der Tabelle 4 im Anhang zu entnehmen.

## 3.1.3 Koronarvaskulärer Widerstand

Während der initialen Perfusionsphase verhielten sich Kontroll- und Aprotinin-Gruppe ähnlich (siehe Abb. 12 und Tab. 5 im Anhang), wie aus den Messwerten 15 min nach Start der Perfusion sowie nach 30 min Perfusion, unmittelbar vor Einsetzen der Ischämie, deutlich wird.

Nach Beendigung der Ischämie und Wiedereinsetzen der Perfusion fällt der Widerstand in beiden Gruppen ohne signifikanten Unterschied ab. Anschließend ist in beiden Gruppen ein erneuter überproportionaler Anstieg des Widerstandes zu verzeichnen. 30 min nach Einsetzen der Reperfusion (90. min) bestehen dabei sichtbare Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Aprotinin-Gruppe, die sich im Messzeitraum fortsetzen und in der 105. min (45 min nach Reperfusion) bei Beendigung des Versuches am auffälligsten sind. Zu diesem Zeitpunkt liegt der koronarvaskuläre Widerstand in der Aprotinin-Gruppe bei  $27,35 \pm 1,77$  mm Hg/ (ml/min/10g).

Im Vergleich dazu ist in der Kontrollgruppe ein höherer Widerstand bei  $38,92 \pm 4,51$  mm Hg/ (ml/min/ 10g) zu verzeichnen. Der Unterschied ist mit p = 0,07 an der Grenze zur statistischen Signifikanz.



**Abb. 12.** Koronarvaskulärer Widerstand für die Kontrollgruppe (Quadrate) im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe (Dreiecke). Der schwarze Balken markiert die Dauer der Ischämie-Zeit zwischen der 30. und der 60. min. Die Messwerte sind der Tabelle 5 im Anhang zu entnehmen.

#### 3.1.4 Herzfrequenz

Während des Beobachtungszeitraumes lagen die Herzfrequenzen in den einzelnen Gruppen im gleichen Bereich, ohne relevante Unterschiede aufzuweisen (Abb. 13 sowie Tab. 6 im Anhang).



#### Herzfrequenz

**Abb. 13.** Herzfrequenz für die Kontrollgruppe (Quadrate) im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe (Dreiecke). Der schwarze Balken markiert die Dauer der Ischämie-Zeit zwischen der 30. und der 60. min. Die Messwerte sind der Tabelle 6 im Anhang zu entnehmen.

#### 3.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte eine signifikant bessere Erholung der Druckamplitude des linken

Ventrikels in Bezug auf die Ausgangswerte vor der Ischämie bei Aprotinin-

Verwendung verzeichnet werden. Bezüglich der Herzfrequenz bestanden keine

relevanten Unterschiede zwischen behandelter Gruppe und Kontrollgruppe.

Parallel zur besseren ventrikulären Inotropie war ein signifikant geringerer Anstieg des Thromboxan-Spiegels in der Reperfusionsphase in der behandelten Gruppe zu beobachten. Der 6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$ </sub>-Anstieg in der Reperfusionsphase war in beiden Gruppen gleich.

Es wurde ein Trend zur Verringerung des koronarvaskulären Widerstandes in der Aprotinin-Gruppe beobachtet, der mit p = 0,07 an der Grenze zur statistischen Signifikanz war.

## 3.2 Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist CP-0127

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Experimente mit dem Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127 unter Einsatz der Cardioplegie bei Induktion des ischämischen Herzstillstandes schließen an der von Soeffker durchgeführten Testreihe an [19]. Er verwendete ebenfalls CP-0127, allerdings wurde keine Cardioplegie-Lösung als Zusatz bei der Induktion des ischämischen Herzstillstandes benutzt.

Es wurde der Einfluss des Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten in Abhängigkeit von der Herzstillstand-Induktion untersucht. Die unbehandelte Kontrollgruppe wurde einer reinen Ischämie durch Abschalten der Perfusatzufuhr unterzogen. In einer zweiten unbehandelten Gruppe wurde die Herzstillstand-Phase durch vorherige Cardioplegie-Gabe eingeleitet. Der Einfluss des Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten wurde nun bei gleichzeitiger reiner Ischämie und bei durch Cardioplegie induziertem Herzstillstand untersucht (siehe Gruppendarstellung im Kapitel Material und Methodik).

## 3.2.1 Linksventrikuläre Druckamplitude

Die alleinige 30-minütige Ischämie führte zu einem signifikanten Abfall der linksventrikulären Druckamplitude (Abb. 14) auf  $64.9 \pm 10.6\%$  (SE) des Ausgangswertes in der 90. min am Ende des Versuches (30 min nach Beginn der Reperfusion) (p < 0,005). Die gleichzeitige Gabe von CP-0127 führte zu einem signifikant stärkeren Abfall der linksventrikulären Druckamplitude auf  $44.0 \pm 15.2\%$ (SE) (p < 0,005) zum gleichen Zeitpunkt im Vergleich zur reinen Ischämie-Gruppe. Hingegen zeigte sich kein signifikanter Druckabfall nach Reperfusion, wenn die induzierte Ischämie mit Gabe der Cardioplegie-Lösung kombiniert wurde. Dieser positive Effekt wurde jedoch durch die gleichzeitige Verabreichung des Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127 antagonisiert, so dass in dieser Gruppe 30 min nach Beginn der Reperfusion erneut ein signifikanter Abfall der linksventrikulären Druckamplitude auftrat [auf  $65.1 \pm 15.4\%$  (SE) des Ausgangswertes (p < 0,005)]. Dieser in Gegenwart des CP-0127 induzierte Druckabfall war im Vergleich zu den zugehörigen Kontrollen signifikant (p < 0,001).



Druckamplitude linker Ventrikel

**Abb. 14.** Druckamplitude des linken Ventrikels in Prozent des Ausgangsdruckes (in der 6. min nach Beginn des Experiments) für die Kontrollgruppe bei reiner Ischämie (schwarze Kreise) im Vergleich zur Ischämie bei CP0127 Gabe während der Perfusion (weiße Kreise). Weiterhin wurde die alleinige Kombination der Ischämie mit Cardioplegie-Gabe (schwarze Dreiecke) mit der Ischämie-Cardioplegie-Gabe bei Verwendung des CP-0127 während der Perfusion verglichen (weiße Dreiecke). Der schwarze Balken markiert die Dauer der Ischämie-Zeit zwischen der 30. und der 60. min.

## 3.2.2 Koronarvaskulärer Widerstand

Die Gabe des B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127 bei gleichzeitiger Durchführung einer Ischämie führte zu einem signifikanten Anstieg des koronarvaskulären Widerstandes in der Reperfusionsphase nach Herzstillstand (p < 0,01) im Vergleich zu den anderen experimentellen Gruppen (Abb. 15). Es erfolgte ein Anstieg des Koronarwiderstandes auf 59,0  $\pm$  6,5 (SE) mm Hg/ml/min/10 g Herzgewebe (p < 0,05) im Vergleich zum Ausgangswert von 31,9  $\pm$  2,1 (SE) mm Hg/ml/min/10 g Herzgewebe.

Die Gabe des CP-0127 führte jedoch nicht zu einer Erhöhung des koronarvaskulären Widerstandes, wenn die Ischämie mit Cardioplegie kombiniert wurde, und unterschied sich nicht von den dazugehörigen Kontrollen bei Verwendung alleiniger Ischämie bzw. Ischämie + Cardioplegie.



## Koronarvaskulärer Widerstand (mm Hg/ml/min/10g)

Abb. 15. Koronarvaskulärer Widerstand des linken Ventrikels für die Kontrollgruppe bei reiner Ischämie (schwarze Kreise) im Vergleich zur Ischämie bei CP0127 Gabe während der Perfusion (weiße Kreise). Weiterhin wurde die alleinige Kombination der Ischämie mit Cardioplegie-Gabe (schwarze Dreiecke) mit der Ischämie-Cardioplegie-Gabe bei Verwendung des CP-0127 während der Perfusion verglichen (weiße Dreiecke). Der schwarze Balken markiert die Dauer der Ischämie-Zeit zwischen der 30. und der 60. min.

## 3.2.3 Herzfrequenz

Arrhythmien mit konsekutivem Herzstillstand traten bei 2 der 6 mit CP-0127 behandelten Herzen während der frühen Reperfusionsphase nach Ischämie ohne Cardioplegie auf. Ansonsten wiesen alle Gruppen eine Erholung der Herzfrequenz in der Reperfusionsphase und Einstellung eines Steady-state bei etwa 130 Schläge pro min ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf.

## **4** Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde am veränderten Ischämie-Reperfusions-Modell des nach LANGENDORFF isoliert perfundierten Herzens der Einfluss des Proteinase-Inihibitors Aprotinin sowie des selektiven Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127 auf die Inotropie und den koronarvaskulären Widerstand untersucht. Zur Untersuchung der an der Erhöhung des koronarvaskulären Widerstandes beteiligten Mediatoren wurden die Konzentrationen von Metaboliten des Thromboxan (Thromboxan  $A_{2}$ ) und Prostacyclin (6-Keto-PGF<sub>1 $\alpha$ </sub>) bestimmt. Thromboxan hat einen vasokonstringierenden, Prostacyclin hingegen einen vasodilatierenden Effekt auf die Koronararterien. Von besonderem Interesse war der zusätzliche Einfluss der Cardioplegie auf die Ischämie-Reperfusionsreaktion.

Die Synthese von Entzündungsmediatoren aus ischämischem Gewebe spielt eine wichtige Rolle bei der Ischämie/Reperfusionsreaktion. Eine entscheidende Rolle dabei wird dem Kallikrein-Kinin-System und speziell der Wirkung von Bradykinin zugeschrieben [20–22]. Die Mediatorsynthese wird von Proteinasen gesteuert. Die Auswirkungen der Ischämie/Reperfusionsreaktion führen zu einer Verschlechterung der kardialen Funktion, die durch eine reduzierte Inotropie und eine koronare Vasokonstriktion gekennzeichnet ist. Gleichzeitig kommt es zu einer verstärkten Produktion von proinflammatorischen vasokonstringierenden Mediatoren wie Thromboxan. Es kommt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen vasokonstringierenden Substanzen wie Thromboxan und vasodilatierenden Stoffen wie Prostacyclin zugunsten des Thromboxan [23–26].

Die Ischämie/Reperfusionsreaktion wird bei kardiochirurgischen Eingriffen zusätzlich durch die Verwendung der extrakorporalen Zirkulation im Herz-Lungen-Bypass

aggraviert, da der Kontakt des Blutes mit den Fremdoberflächen des Schlauchsystems zu einer weiteren Freisetzung inflammatorischer Mediatoren führt, die Veränderungen der endothelialen Barriere, des Koronartonus und der Gefäßpermeabilität bewirken. Der intraoperativ erwünschte Herzstillstand wird durch Verwendung von hyperkaliämer Cardioplegie-Lösungen erreicht.

In der hier vorliegenden Studie wurde in einer ersten Versuchsreihe der Einfluss von Aprotinin auf die linksventrikuläre Druckamplitude, die Herzfrequenz und der koronarvaskuläre Widerstand vor einer 30-minütigen Cardioplegie-induzierten Ischämie sowie kontinuierlich bis zu 45 min während der Reperfusionsphase gemessen. Die Menge des Thromboxan A<sub>2</sub> und 6-Keto-PGF-1α wurden aus dem Perfusat vor der Ischämie sowie in der Reperfusionsphase bestimmt.

Am gesunden Herzen, vor der Ischämie, hat die Aprotinin-Gabe keinen Einfluss auf die linksventrikuläre Druckamplitude, den koronarvaskulären Widerstand und die Thromboxan A<sub>2</sub> sowie 6-Keto-PGF-1α-Spiegel.

In der frühen Reperfusionsphase kommt es zu einer erwarteten [27] hypoxisch bedingten koronaren Vasodilatation mit Abnahme des koronarvaskulären Widerstandes ohne signifikanten Unterschied zwischen Aprotinin- und Kontrollgruppe. Diese bedingt eine überproportionale Zunahme der linksventrikulären Druckamplitude im Vergleich zur Zeit vor der Ischämie. Die Reperfusionsreaktion führt zu einer gleichzeitig gesteigerten Freisetzung der Metaboliten des vasokonstringierenden Thromboxans und des vasodilatierenden Prostacyclins. Während jedoch die Prostacyclin-Synthese im Verlauf in beiden Gruppen wieder abfällt, bleibt die Thromboxan-Synthese in der unbehandelten Gruppe hoch. Nur die behandelte Gruppe erreicht eine Unterschreitung der Werte vor der Ischämie. Somit kommt es in der unbehandelten Gruppe zu einem stärkeren Anstieg der Thromboxan-Produktion und einer deutlichen Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen vasokonstringierenden und vasodilatierenden Mediatoren mit einer ausgeprägten koronaren Vasokonstriktion. Dies bedingt eine schlechtere hämodynamische Erholung der unbehandelten Herzen im Verlauf der Reperfusion. Während in der Kontrollgruppe der vasokonstriktorische Einfluss des Thromboxans im Verlauf der Reperfusion rasch zu einem Anstieg des koronarvaskulären Widerstandes mit konsekutivem Abfall der linksventrikulären Druckamplitude führt, zeigt sich unter Aprotinin-Gabe eine protektive Wirkung. Unter Aprotinin-Behandlung ist die Zunahme des Koronarwiderstandes tendenziell geringer, es gelingt die linksventrikuläre Druckamplitude zu stabilisieren und 30 min nach Reperfusionsbeginn auf Werte vor der Ischämie zu normalisieren.

Unsere Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein. So zeigten Sirieix et al. [28] eine signifikant bessere Erholung der linksventrikulären Druckamplitude 60 min nach Reperfusion bei Verwendung isoliert perfundierter Kaninchenherzen mit der gleichen wie von uns vorgenommenen Dosierung (Aprotinin 200 KIU/ml als Perfusatadditiv). Der positive Effekt der Substanz ist in diesem Fall nicht durch eine Wirkung auf die Leukozyten und die zirkulierenden Plasmaproteine vermittelt, da es sich hier um isoliert mit künstlichem Perfusat perfundierte Organe handelt. Vielmehr spielt eine Hemmung der membranassozierten Faktoren des plasmatischen Kallikrein-Kinin Systems in unseren Versuchen eine entscheidende Rolle. Eine weitere Studie [29] bestätigt die Normalisierung der Kontraktilität in der Reperfusionsphase durch Aprotinin. Auch hier wird eine Wiederherstellung der koronaren Vasodilatation nach der Ischämie unter Medikamentengabe beobachtet. Im Gegensatz dazu sinken in der Kontrollgruppe die Kontraktilität und der Sauerstoffverbrauch während der Reperfusion. Die Substanz beeinflusst die hämodynamischen Parameter

linksventrikuläre Druckamplitude und Koronarfluss sowie den Sauerstoffverbrauch normaler Herzen vor der Ischämie nicht [27–29]. Von entscheidender Bedeutung für eine maximale Wirkung scheint aber der Beginn der Applikation vor Einsetzen der Ischämie und die Dauerapplikation sofort mit Einsetzen der Reperfusion zu sein. Die weitaus höchste Anzahl der Operationen mit Aprotinin-Gabe wird bei Patienten mit moderater Hypothermie und Aufrechterhaltung eines künstlichen Kreislaufes durch die Herz-Lungen-Maschine durchgeführt. Das am meisten verbreitete Applikationsschema liegt dem folgenden Protokoll zugrunde:

- Loading dose: Nach Legen des zentralen Zugangs 2 Millionen KIU als Kurzinfusion über 30 min
- 2. anschließende Dauerinfusion bis zur Verlegung auf der Intensivstation mit 500.000 KIU/h

3. zusätzlich 2 Millionen KIU in das Füllvolumen der Herz-Lungen-Maschine.

Dieses Schema garantiert Plasma-Konzentrationen, die eine effektive Plasmin- und Kallikrein-Inhibierung gewährleisten und trägt der relativ kurzen Halbwertszeit des Stoffes im Plasma Rechnung.

Sehr wichtig ist neben der verwendeten hohen Dosis vor allem die Gabe vor Induktion der Ischämie. Dies ist von entscheidender Bedutung für eine adäquate kardioprotektive Wirkug des Medikamentes, da es noch vor dem Start der Ischämieinduzierten Inflammationskaskade an seinem Wirkort angelangt sein muss. Wenn das Medikament erst mit oder nach Einsetzen der Ischämie gegeben wird, besteht die Möglichkeit, dass nachgeschaltete Enzyme beispielsweise der Kinin-Kaskade bereits in großer Zahl freigesetzt sind und die Inflammationsreaktion überproportionell aufrecht erhalten. Das könnte ein Grund dafür sein, dass Studien, die mit der Medikamentengabe erst mit Einsetzen der Ischämie oder danach begannen, keine kardioprotektiven Effekte aufweisen konnten. So weist die von Bukhari et al. [30] an Hunden durchgeführte RIVA-Okklusionsstudie keine Vorteile der Aprotinin-Applikation auf. Diese setzt jedoch erst mit Induktion der Ischämie ein.

Auch die von Ashraaf et al. [31] an Patienten durchgeführte Studie, die keine Beeinflussung der Inflammationsreaktion postulierte, verwendete das Medikament nur als Beigabe zum Füllungsvolumen der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) und somit sehr knapp vor Einsetzen der kardialen Ischämie. Außerdem war die verwendete Dosis von 2.000.000 KIU kaum geeignet, um den Hämodillutionseffekt auszugleichen und adäguate Inhibitionskonzentrationen zu erreichen. Hoffmeister et al. [27] weisen bei alleiniger Bolus-Gabe vor der Ischämie noch eine signifikant niedrigere Troponin-Freisetzung in der behandelten Gruppe auf, die gemessenen hämodynamischen Parameter wie Koronarfluss und Kontraktilitätsreserve nach maximaler Ca<sup>++</sup>-Stimulation sowie die metabolischen Parameter Sauerstoffverbrauch und Kreatininphosphat-Freisetzung konnten nicht mehr signifikant verbessert werden. Bei alleiniger Aprotinin-Beimengung zur Priming-Flüssigkeit der Herz-Lungen-Maschine gelang es in einer klinischen Studie [32] an Patienten, die sich einer elektiven Koronarbypass-Operation unterzogen, die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin(IL)-6 und IL-8 im zirkulierenden Blut nicht zu limitieren.

Im Gegensatz dazu setzten nahezu alle Studien, die eine antiinflammatorische Wirkung des Medikamentes beobachteten, das Mittel vor Beginn der Ischämie ein [9, 29, 33–39].

Wird die Substanz kontinuierlich in der gleichen wie von uns gewählten Dosierung schon vor Einsetzen der Ischämie appliziert [34] und mit Cardioplegie-Gabe zur Ischämie-Induktion kombiniert, lässt sich übereinstimmend mit unseren Ergebnissen eine bessere hämodynamische Erholung nachweisen. Damit einhergehend sind höhere ATP-Spiegel und geringere ultrastrukturelle Schädigungen des Myokards zu verzeichnen. Die Verwendung einer Cardioplegie-Lösung ist entscheidend für die Wirkung des Aprotinins in der Reperfusionsphase, da die alleinige Verwendung ohne Cardioplegie keine Veränderung zur Kontrollgruppe aufweist. Auch Madhala-Givon et al. [40] zeigten eine höhere linksventrikuläre Druckamplitude bei Aprotinin-Verwendung in einem Ischämie-Reperfusionsmodell, an der isoliert perfundierte Lebern und Herzen nacheinander von künstlicher Perfusionslösung durchströmt wurden. Als Ausdruck einer gleichzeitigen protektiven Wirkung auf die Reperfusionsreaktion der Leber wurde der signifikant niedrigere portalvenöse Druck bei Aprotinin-Gabe gewertet. Die direkte positive hämodynamische Wirkung des Aprotinins konnte in einer weiteren klinischen Studie [41] nicht verifiziert werden, es zeigte sich jedoch ein signifikant niedrigerer Bedarf an positiv inotropen Substanzen, um den hämodynamischen Status in den ersten 48 h postoperativ zu halten. In einer unter der Leitung von Gurevitch an isolierten Rattenherzen durchgeführten Studie [29] zeigte sich, dass Aprotinin keinen Einfluss auf die Funktion des normalen Herzen hat, jedoch signifikante protektive Effekte auf ischämische Herzen aufweist. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe wiesen die mit Aprotinin behandelten Herzen in der Reperfusionsphase eine signifikant bessere Kontraktilität, sowie einen

ebenfalls signifikant höheren Koronarfluss auf. Als weiteres Korrelat der damit einhergehenden geringeren Ischämieschädigung wiesen die behandelten Herzen eine signifikant niedrigere CK-Freisetzung im koronaren Ausflusstrakt auf [34, 36]. Auch die rechtsventrikuläre Funktion wird effektiviert, da es zu einer Abnahme des normalerweise [42] unter EKZ erhöhten pulmonalarteriellen Druckes kommt. Dies wurde unabhängig voneinander in einer von Prendergast et al. [33] veröffentlichten Studie nach reoperativer Herztransplantation sowie von Tweddel et al. [39] an Kindern mit univentrikulärem Herzen, die sich der Fontan-Operation unterzogen, nachgewiesen (Anlage einer klappentragenden Prothese zwischen rechtem Atrium und Pulmonalarterie unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine).

In unserem Versuchsmodell wurde das Aprotinin deswegen ab der 15. min vor Einsetzen der Ischämie verabreicht. Die beobachtete verbesserte Erholung des linken Ventrikels in der Reperfusionsphase bestätigt die kardioprotektive Wirkung des Aprotinins und weist positive Eigenschaften in der Reduzierung des ischämischen Schadens auf.

Seit der Entdeckung, dass hohe Aprotinin-Dosen (insgesamt 6.000.000 KIU) den perioperativen Blutverlust bei herzchirurgischen Eingriffen signifikant verringern können [43], wurde eine Vielzahl von Studien publiziert [33, 44–46], die diese Ergebnisse bestätigten und Erklärungshypothesen für den Wirkmechanismus aufstellten.

Für diesen Effekt verantwortlich ist nach Meinung der Forscher die Fähigkeit des Proteinaseninhibitors Aprotinin, vor allem Plasmin und Kallikrein zu hemmen. Durch Kontakt mit den Fremdoberflächen des Kreislaufsystems der EKZ werden via Faktor XII das Fibrinolyse-, Kallikrein-, Gerinnungs- sowie Komplementsystem aktiviert. Die dabei generierten Kaskadensysteme führen über eine Freisetzung großer Mengen

von Entzündungsmediatoren zur Ausbildung der "whole body inflammatory response,, die für das so genannte "Postperfusionssyndrom, verantwortlich ist. Dieses Syndrom, das durch Fieber nichtinfektiöser Ursache, pulmonale und renale Dysfunktion, Leukozytose und abnormale Blutung charakterisiert ist, zeichnet für einen großen Prozentsatz der Morbidität und Mortalität in Risikopatienten bei kardialen Prozeduren.

Die Myokard-Ischämie führt zu einem sowohl biochemisch als auch morphologisch nachweisbaren Myokardschaden [47–49], der parallel zu der beobachteten schlechteren Erholung der Herzen verläuft. Die Reperfusion nach Ischämie bedingt anschließend einen zusätzlichen Schaden mit Abfall der linksventrikulären Funktion. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Ischämie-Dauer Iysosomale Enzyme des ischämischen Herzen mit Proteasen-Charakter freigesetzt werden [49–52]. Gleichzeitig wird eine Verminderung des intrazellulären ATP-Gehaltes beobachtet [53].

*In-vitro*-Untersuchungen bei Ischämie zeigen eine durch Zunahme der Freisetzung Iysosomaler Enzyme der Myokardzelle bedingte Schädigung der mitochondrialen Ultrastrukturen und eine damit verbundene Verminderung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung [54, 55].

Nach einer ischämischen Läsion des Myokards werden lokal proteolytische Enzyme freigesetzt, die das Kinin-, Gerinnungs- und Fibrinolyse-System aktivieren [20–22]. Speziell das Kinin-System ruft intramyokardial über eine Pemeabiltätserhöhung ein interstitielles Ödem hervor [56]. Dieses führt über Schwellung zur Kapillarokklusion mit konsekutiver Behinderung der Mikrozirkulation.

Die genannten Schlüsselenzyme dieser Kaskaden werden im Hochdosis-Schema effektiv gehemmt [57, 58]. Die von den Autoren postulierte Wirkungshypothese des

kardioprotektiven Effektes des Aprotinins soll zum einen auf den Kallikrein-Block beruhen. Dadurch werde die Ausschüttung von im Rahmen des Einsatzes der Herz-Lungen-Maschine freigesetzten, zirkulierenden Kinine vermindert, die sonst zu Permeabilitätserhöhung der Myokardkapillaren führe und damit zum myokardialen interstitiellen Ödem.

Zum anderen wird eine Blockierung von membranständigen Proteasen angenommen, die andernfalls eine proteolytisch induzierte Erhöhung der Membranpermeabilität bei Anoxie hervorrufen. Diese Effekte werden durch Aprotinin günstig beeinflusst. Aprotinin führt zu einer signifikanten Verminderung der Freisetzung lysosomaler Enzyme bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung höherer ATP-Konzentrationen [8, 9, 59].

Cheng et al. [34] konnten eine bessere Protektion der zellulären und mitochondrialen Ultrastruktur der Myokardzelle unter Aprotinin-Gabe nachweisen. Damit verbunden waren gleichzeitig ebenfalls höhere ATP-Konzentrationen in der Reperfusionsphase und eine bessere funktionelle myokardiale Erholung zu verzeichnen. Die Wirkung war vor allem auf das Aprotinin zurückzuführen, da die Ergebnisse bei alleiniger Verwendung entweder der Cardioplegie- oder der Puffer-Lösung nach Krebs-Henseleit signifikant schlechter waren.

Diaz et al. [36] konnten vor mehr als 15 Jahren niedrigere Creatinin-Kinase-Werte, gepaart mit einer besseren histologischen Morphologie bei Aprotinin-Applikation, im Rahmen regionaler Myokardischämien beim Hund nachweisen. In einer Studie von Wendel et al. [35] wurde eine signifikant niedrigere Troponin-T-Freisetzung am 1. postoperativen Tag nach Anlage eines aortokoronaren venösen Bypasses gezeigt. Gleichzeitig wurden der Aprotinin-Spiegel und die Kallikrein-Inhibitionsfähigkeit im Serum gemessen. Es zeigte sich, dass zu jedem Zeitpunkt die

Medikamentenkonzentration > 200 KIU/ml war und dass Kallikrein ausreichend inhibiert wurde (bis zu 387,8 +/– 88,4%).

Der Fremdoberflächenkontakt bedingt den nachweisbar erhöhten Thromboxan-B<sub>2</sub>-Spiegel während und nach Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, denn bei Operationen ohne Herz-Lungen-Maschine wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen prä- und intra- oder postoperativen Werten beobachtet [23, 26]. Nach Aktivierung durch die Fremdmaterialien der Schläuche der EKZ setzen die fälschlich aktivierten Plättchen Thromboxan frei. Es ist ein Produkt des Arachidonsäuremetabolismus und der stärkste bekannte Plättchenaggregationsfaktor sowie ein sehr starker Vasokonstriktor. In tierexperimentellen Versuchsserien verursacht TxB<sub>2</sub> eine starke koronare Vasokonstriktion, Myokardischämie und den Tod [24, 25] sowie eine Verschlechterung der Mikro- und Koronarzirkulation [60–62]. Das Thromboxan hat einen natürlichen Antagonisten, das Prostacyclin, das vorwiegend durch das Gefäßendothel freigesetzt wird. Es ist ein Vasodilatator und Aggregationsinhibitor. Mehrere Studien haben inzwischen nachgewiesen, dass ein Gleichgewicht zwischen Thromboxan und Prostacyclin essentiell zur Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation und Plättchenfunktion ist [63–65]. Im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation steigen zwar sowohl die Thromboxan- als auch die Prostacyclin-Konzentrationen signifikant an, es überwiegt jedoch die Thromboxan-Ausschüttung durch die Freisetzungsreaktion der Thrombozyten, so dass die vasokonstriktorische und aggregatorische Komponenten im Vordergrund stehen [7]. Thromboxan wird auch von einer Vielzahl von anderen Geweben synthetisiert. So wiesen Spagnuolo et al. [50] bereits 1980 nach, dass stimulierte Granulozyten vermehrt Thromboxan freisetzten, das zur erhöhten Adhäsionsfähigkeit der Granulozyten führte. Außerdem ist bekannt, dass Thromboxan auch in anderen

Geweben produziert wird. Bisher wurde eine Thromboxan-Synthese in Lunge, Milz, weißen Blutkörperchen und Plättchen nachgewiesen [26]. Die Aktivierung der Thrombozyten durch die EKZ führt zur Plättchensequestration im Kapillarbereich mit konsekutiver Thromboxan-B<sub>2</sub>-Freisetzung. Dadurch ist aber eine gesteigerte Synthese in jedem Organ möglich, was auch die Thromboxan-Entstehung im isoliert perfundierten Herzen erklären könnte.

Dass ein entscheidender Teil des Myokardschadens via Thromboxan-vermittelter Reaktion entstehen kann, beweisen auch Studien, die sich mit den Effekten selektiver Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten beschäftigen.

In diesem Zusammenhang ist die mit dem SQ 29548 Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten durchgeführte Studie von Singh et al. [66] zu erwähnen, die eine Reduktion des Infarktareals und des linksventrikulären enddiastolischen Druckes nach Okklusion des Ramus interventricularis anterior nachwies. Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Annahme einer Korrelation zwischen der Höhe des Thromboxan-Spiegels und den Auswirkungen der Ischämiereaktion erhärtet.

Der Gebrauch des Aprotinins [7, 67] reduziert die fehlgeleitete Aktivierung der Plättchen durch die EKZ und damit die anschließende Thromboxan-Synthese im Rahmen der "Freisetzungs- oder Release-Reaktion" der Thrombozyten. Dadurch reduziert sich auch die Anzahl der Thrombozyten, die in der kapillären Strombahn sequestriert werden und dort über Thromboxan-Ausschüttung zu weiteren Mikrozirkulationsstörungen führen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist CP-0127 eingesetzt, um die Rolle einer selektiven Bradykinin-Antagonisierung zu evaluieren. Bei Induktion des Herzstillstandes durch alleinigen Perfusionsstopp, führte CP-0127 zu einem signifikant erhöhten koronarvaskulären Widerstand in der

Reperfusionsphase im Vergleich zur unbehandelten Gruppe. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass die selektive Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung in der Lage ist, den Anstieg des koronaren Blutflusses nach Reperfusion zu annullieren [68–70]. So zeigten Groves et al. [11] eine Zunahme des koronaren Widerstandes bei Patienten, denen selektiv ein B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist in die linke Koronararterie gespritzt wurde. Gleichzeitig mit Erhöhung des Koronarwiderstandes kam es in unserer Versuchsserie zu einem signifikant stärkeren Abfall der linksventrikulären Druckamplitude 30 min nach Reperfusion. Die mit der Erhöhung des Koronarwiderstandes einhergehende koronare Vasokonstriktion machte sich durch eine erhöhte Inzidenz von Arrhythmien während der frühen Reperfusionsphase mit konsekutivem Herzstillstand bemerkbar. Dies ist in Einklang mit einer antiarrhythmogenen Wirkung von Bradykinin [71].

Die Bradykinin-Produktion ist Folge des durch den kardiopulmonalen Bypass aktivierten Kallikrein-Kinin-Systems [10, 72]. Bradykinin ist am Mechanismus der ischämischen Präkonditionierung beteiligt [70, 71, 73–75]. Die ischämische Präkonditionierung durch transient durchgeführte Ischämie-Episoden vor der prolongierten Ischämie-Phase führt zu einer Reduktion des Infarktareals, wie unter anderem Wolfrum et al. berichten [71, 73, 74, 76, 77]. Sie wird durch eine hypoxische koronare Vasodilatation charakterisiert [70, 78, 79], die den myokardialen Blutfluss [68, 80] verbessert. Sie bewirkt eine Erhöhung der linksventrikulären Druckamplitude [68, 81], wie auch durch unsere Serie gezeigt werden konnte.

ACE-Inhibitoren blockieren den Abbau des Bradykinins und verstärken somit seine Wirkung [82]. So zeigen Oikawa et al. [69] den gleichen Anstieg des myokardialen Blutflusses durch Enalaprilat wie bei Durchführung der ischämischen Präkonditionierung durch "rapid pacing" von Hundeherzen.

Bradykinin wird gleichermaßen durch Aminopeptidase P abgebaut. Die Aufrechterhaltung des Bradykinin-Spiegels durch Hemmung dieses abbauenden Enzyms [76] zeigt den gleichen protektiven Effekt.

Die selektive Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung macht die positiven Effekte der ischämischen Präkonditionierung zunichte, da es die Infarktgröße auf vergleichbare Werte wie ohne ischämische Präkonditionierung ansteigen lässt [73, 76, 77] und die hypoxische koronare Vasodilatation aufhebt [34].

Der Wirkungsmechanismus des Bradykinins wird durch mehrere Kaskaden vermittelt. Feng und Rosenkranz [68] decken einen NO-abhängigen Wirkmechanismus auf. Auch andere Autoren berichten über eine vasodilatierende Wirkung der Kinine im Koronarkreislauf, die unter anderem auf NO-Freisetzung aus dem Koronarendothel beruht [78, 79].

Es wird angenommen, dass die Wirkung des Bradykinins notwendig ist, um die verstärkte Ausschüttung von Vasodilatatoren des Endothels hervorzurufen. Dies kann in der Ischämie von entscheidender Bedeutung sein, um die überwiegende Wirkung konstriktiver Mediatoren zu antagonisieren [83]. Demgegenüber weisen Danser et al. [80] eine Antagonisierung der Bradykinin-Wirkung durch NO-Synthase-Inhibitoren nur nach chronischer Inhibition auf. Sie postulieren, dass Bradykinin zusätzlich zur Aktivierung der NO-Synthase auch vorhandene NO-Pools in den Zellen mobilisiert und somit unabhängig von der NO-Synthase agiert. Gianella et al. [70] zeigen, dass nicht allein die NO-Aktivierung zur Bradykinin-vermittelten hypoxischen koronaren Vasodilatation beiträgt. Sie weisen nach, dass die Bradykinin-Wirkung unter anderem über Vermittlung von Adenosin-Rezeptoren zustande kommt. Die Beteiligung weiter nachgeschalteter Faktoren findet sich in der Studie von Goto et al. [73], die der Protein-Kinase C eine entscheidende Wirkung

zuweisen. Auch Brew et al. berichten [75], dass Bradykinin-Rezeptoren die Präkonditionierung des Herzens über die Aktivierung von Protein-Kinase C modulieren. Die Arbeitsgruppe konnte am Modell des isoliert perfundierten Rattenherzen nachweisen, dass eine 2-minütige transiente Ischämie, die 10 min vor der eigentlichen 20-minütigen Ischämie gesetzt wurde, einen positiven Einfluss auf die Erholung des Herzens in der Reperfusionsphase aufwies. Die Gabe eines B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten war in der Lage, diesen Effekt der ischämischen Präkonditionierung zu annullieren. Gleiche Ergebnisse wie die Präkonditionierung durch eine transiente Ischämie brachte die Gabe von exogenem Bradykinin. Die parallele Gabe des exogenen Bradykinins und des B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten zeigte wiederum keine verbesserte Wirkung gegenüber der Kontrollgruppe. Daraus schlossen die Autoren, dass der Effekt der ischämischen Präkonditionierung zu einem wichtigen Anteil über B<sub>2</sub>-Bradykinin-Rezeptoren vermittelt wird und dementsprechend durch eine B<sub>2</sub>-Rezeptorblockade antagonisiert werden kann. Es wird spekuliert, dass die aktivierte Protein-Kinase C ihrerseits über Phosphorylierung von Startenzymen eine Ökonomisierung des Metabolismus der Myokardzelle bewirkt, die ihr helfen, dem reduzierten Nährstoffangebot während der Ischämie zu begegnen.

Diese These wird durch Beobachtungen von Linz et al. [12] gestützt, die bei Bradykinin-Gabe in Konzentrationen, die den Koronarwiderstand nicht beeinflussten, eine Erhöhung der energiereichen Phosphate sowie eine Verminderung des Enzymverlustes feststellten. Dies könnte erklären, warum Bradykinin auch dann protektiv zu sein scheint, wenn es nicht den Koronartonus des Herzens beeinflusst, da die Ökonomisierung der Nährstoffreserven des Myokards eine genauso tragende Rolle spielt.

Aus der Arbeitsgruppe von FENG [81] wird den Tyrosin-Kinasen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Bradykinin-Wirkung zugewiesen.

Die von uns durchgeführte Experimentreihe sollte in Fortführung der von SOEFFKER mit dem B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127 durchgeführten Studie [19] untersuchen, ob die Bradykinin-Antagonisierung durch die gleichzeitige Verwendung einer Cardioplegie-Lösung beeinflusst werden kann. Die durch den Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonist CP-0127 induzierte Zunahme des koronaren Widerstandes in der Reperfusionsphase, konnte durch die Verwendung der Cardioplegie-Lösung antagonisiert werden.

Der durch die alleinige Ischämie induzierte Abfall der linksventrikulären Druckamplitude im Lauf der Reperfusion konnte durch die Anwendung der Cardioplegie ausgeglichen werden. CP-0127 machte diesen Effekt jedoch zunichte, es kam zu einem Druckamplitudenabfall wie in der Gruppe mit alleiniger Ischämie ohne Cardioplegie.

Bei gleichzeitiger Applikation der Cardioplegie mit dem CP-0127 traten keine Arrhythmien mehr in der Reperfusionsphase auf. Dennoch signalisiert die auch unter Cardioplegie auftretende signifikante Verminderung der ventrikulären Druckamplitude eine verminderte myokardiale Funktion in der Reperfusionsphase. Zusammenfassend betrachtet zeigen die Ergebnisse unserer Studie, dass Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisierung ein mögliches zusätzliches Risiko für Patienten, die sich herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine unterziehen, darstellt. Die Verwendung einer Cardioplegie-Lösung zur Einleitung des Herzstillstandes vermag die negativen Auswirkungen auf die kardiale Inotropie in der Reperfusionsphase jedoch, wenn auch nur teilweise, zu kompensieren.

## 5 Zusammenfassung

Die in dieser Studie am modifizierten Langendorff-Modell des isoliert salin perfundierten Kaninchenherzens gewonnenen Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen.

Die reine Ischämie führt zu einer signifikant niedrigeren linksventrikulären Druckamplitude in der Reperfusionsphase. Wenn der Herzstillstand durch Cardioplegie-Gabe induziert wird, erreicht die Druckamplitude in der Reperfusion die Ausgangswerte vor der Ischämie.

Die Applikation des Bradykinin-B<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten CP-0127 zusammen mit der Cardioplegie macht die protektive Wirkung der Cardioplegie zunichte. Es kommt zu einem Abfall der Druckamplitude in der Reperfusionsphase.

Die Gabe des CP-0127 ohne Cardioplegie führt zum einem noch stärkeren Abfall der Druckamplitude während der Reperfusionsphase als die alleinige Ischämie-

Anwendung durch Unterbrechung der Perfusatzufuhr.

Dies ist durch eine koronare Vasokonstriktion bedingt, die auf die Antagonisierung des koronaren Vasorelaxators Bradykinins zurückzuführen ist. Damit einhergehend traten Arrhythmien während der frühen Reperfusionsphase auf, die teilweise zu einem konsekutiven Herzstillstand führten. Bei gleichzeitiger Cardioplegie-Gabe wird der koronarvaskuläre Widerstand nicht beeinflusst und unterscheidet sich nicht von der unbehandelten Ischämie-Gruppe. Dies bestätigt die positive Rolle des Bradykinins als koronaren Vasorelaxator im Rahme der Ischämie/Reperfusionsreaktion. Eine Antagonisierung der Substanz führt zur schlechteren myokardialen Erholung nach Ischämie während der Reperfusionsphase und sollte nicht durchgeführt werden.

Währenddessen bewirkt die unspezifische Proteinase-Inhibition durch Aprotinin trotz Inhibition des Kallikrein-Kinin Systems eine Verbesserung der myokardialen Leistung während der Reperfusion, die sich durch eine Verbesserung der linksventrikulären Druckamplitude bemerkbar macht. Die Substanz führt zu einer tendenziellen koronaren Vasodilatation, die mit der Reduktion der Thromboxan-Produktion bei Aufrechterhaltung des Prostacyclin-Spiegels einhergeht. Die Gabe des Aprotinins kontinuierlich und bereits vor Durchführung der Ischämie verbessert die myokardiale Funktion nach Ischämie/Reperfusion.
## 6 Anhang

# **Tab. 1.** Zusammensetzung der verwendeten Krebs-Henseleit-Lösung und erreichte Konzentrationen im Perfusat

1.	5 g Na-Pyruvat	
2.	3250 ml HAES 10% (Haes <sub>200.000</sub> , Fresenius, Bad Homberg)	
3.	125 ml Glucose 10%	
4.	310 ml NaHCO <sub>3</sub> 0,9%	
5.	1000 ml von 5000 ml einer Elektrolytlösung bestehend aus:	
5.1	35,78 g NaCl	
5.2	8,75 g CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	
5.3	3,75 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
5.4	6,75 g MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	
5.5	6,31 g KCl	
5.6	5000 ml Aqua dest.	
Es werden somit folgende <b>Konzentrationen im Perfusat</b> erreicht, die in etwa den physiologischen Verhältnissen entsprechen:		
	400 JUN T	

- 1. 138 mmol/l Na<sup>+</sup>
- 2. 110,8 mmol/l Cl<sup>-</sup>
- 3. 4,5 mmol/l K<sup>+</sup>
- 4. 2,38 mmol/l Ca<sup>2+</sup>
- 5. 1,33 mmol/Mg<sup>2+</sup>
- 6. 1,1 mmol/l Po<sub>4</sub><sup>3-</sup>
- 7. 10 mmol/l Na-Pyruvat
- 8. 6,5% HAES

**Tab. 2.** Druckamplitude des linken Ventrikels in Prozent des Ausgangsdruckes (in der 6 min nach Beginn des Experiments) für die Kontrollgruppe im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe

	Zeitpunkt	Prozent der Startamplitude Kontrolle	Prozent der Startamplitude Aprotinin
Unmittelbar vor Ischämie	30. min	98,8 ± 6,7% (SE)	109,2 ± 4,58% (SE)
4 min nach Reperfusion	64. min	111,7 ± 12% (SE)	126,4 ± 10,5% (SE)
16 min nach Reperfusion	76. min	84,01 ± 9,28% (SE)	92,2 ± 7,03% (SE)
30 min nach Reperfusion	90. min	73,9 ± 8% (SE)	98,21 ± 6,73% (SE)

## **Tab. 3.** Thromboxan B<sub>2</sub>-Konzentration im koronaren Ausflußtrakt für die Kontrollgruppe im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe

<b>Q</b>			
	Zeitpunkt	Thromboxan- Konzentration in pg/ml Kontrolle	Thromboxan- Konzentration in pg/ml Aprotinin
15 min nach Start der Perfusion	15. min	133,40 ± 34,8 (SE)	138,98 ± 19,28 (SE)
Unmittelbar vor Ischämie	30. min	138,45 ± 28,39 (SE)	137,65 ± 20,9 (SE)
2,5 min nach Reperfusion	62,5.min	201,43 ± 26,85 (SE)	154,98 ± 20,64 (SE)
30 min nach Reperfusion	90. min	205,91 ± 29,46 (SE)	126,25 ± 19,54 (SE)

## **Tab. 4.** 6-Keto-PGF<sub>1a</sub>-Konzentration im koronaren Ausflusstrakt für die Kontrollgruppe im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe

	Zeitpunkt	6-Keto PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> Konzentration in pg/ml	6-Keto PGF <sub>1<math>\alpha</math></sub> Konzentration in pg/ml
		Kontrolle	Aprotinin
15 min nach Start Perfusion	15. min	428,58 ± 42,4 (SE)	422,65 ± 52,22 (SE)
Start Ferrusion			
Unmittelbar vor Ischämie	30. min	386,75 ± 42,28 (SE)	403,708 ± 55,94 (SE)
2,5 min nach Reperfusion	62,5. min	622,08 ± 57,64 (SE)	702,667 ± 116,65 (SE)
10 min nach Re- perfusion	70. min	472,45 ± 47,19 (SE)	448,25 ± 49,79 (SE)
30 min nach Re- perfusion	90. min	577,33 ± 60,87 (SE)	436,45 ± 47,02 (SE)

# **Tab. 5.** Koronarvaskulärer Widerstand für die Kontrollgruppe im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe

Markierung	Zeitpunkt	Koronarvaskulärer	Koronarvaskulärer
		Widerstand	Widerstand
		in mm Hg/ ml/min/10g	in mm HG / ml/min/10 g
		Kontrolle	Aprotinin
0.	8. min	23,89 ± 0,82 (SE)	22,15 ± 1,13 (SE)
1.	16. min	24,62 ± 0,99 (SE)	21,19 ± 1,26 (SE)
2.	30. min	24,33 ± 0,81 (SE)	21,52 ± 1,12 (SE)
3.	63. min	22,88 ± 1,74 (SE)	21,21 ± 1,70 (SE)
4.	70. min	25,83 ± 1,76 (SE)	25,52 ± 2,22 (SE)
5.	90. min	31,48 ± 2,45 (SE)	25,23 ± 1,58 (SE)
6.	105. min	38,92 ± 4,51 (SE)	27,35 ± 1,77 (SE)

### Tab. 6. Herzfrequenz für die Kontrollgruppe im Vergleich zur Aprotinin-Gruppe

	Zeitpunkt	Herzfrequenz	Herzfrequenz
		Kontrollgruppe	Aprotinin-Gruppe
8 min nach Start	8. min	155 ±10,7 (SE)	157 ± 8,8 (SE)
16 min nach Start	16. min	155 ± 9,4 (SE)	155 ± 7,9 (SE)
Unmittelbar vor	30. min	159 ± 10,1 (SE)	148 ± 6,7 (SE)
Ischämie			
3 min nach Reperfusion	63. min	71 ± 8,8 (SE)	62 ± 10,4 (SE)
10 min nach	70. min	134 ± 8,0 (SE)	124 ± 6,7 (SE)
Reperfusion			
30 min nach	90. min	147 ± 7,4 (SE)	140 ± 5,9 (SE)
Reperfusion			
45 min nach	105. min	132 ± 10,6 (SE)	135 ± 6,3 (SE)
Reperfusion			

### 7 Literatur

- 1 Back N, Wilkens H, Steger H (1968): Proteinases and proteinase inhibitors in experimental shock states, Ann. N.Y. Acad. Sci. 146:491-516
- 2 Glenn TM, Herlich BL, Lefer AM (1979): Protective actions of a proteinase inhibitor in hemorrhagic shock, Arch. Int. Pharmacodyn. 241:316-323.
- 3 Geiger R, Stuckstedte U, Fritz H (1980): Isolation and characterization of human urinary kallikrein, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361:1003-1016
- 4 Underwood JCE (1992): General and Sytematic Pathology, Churchill Livingstone Verlag, 173 ff.
- 5 Royston D (1992): High-Dose Aprotinin Therapy: A review of the First Five Years Experience, Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia, Vol 6, No 1, 76-100
- 6 Roitt IM, Brostoff J, Male DK (1995): Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Dt. Übersetztung von Ihor Harabacz. 3., neubearbeitete Aufl. Stuttgart, New York, Thieme, pp 234-255
- 7 Nagaoka H, Innami R, Murayama F (1991): Effects of aprotinin on prostaglandin metabolism and platelet function in open heart surgery. J. Cardiovasc. Surg. 32:31-36
- 8 Sunamori M, Sultan I, Suzuki A (1991): Effect of Aprotinin to improve myocardial Viability in Myocardial Preservation followed by reperfusion. Ann. Thorac. Surg. 52:971-8
- 9 Horpacsy G, Schnells G (1980): Energy metabolism and lysosomal events in hemorrhagic shock after aprotinin treatment. Circ. Shock 7(1):49-58
- 10 Pang LM, Stalcup SA, Lipset JS (1979): Increased circulating bradykinin during hypothermia and cardiopulmonary bypass in children. Circulation 60:1503-1507
- 11 Groves P, Kurz S, Just H (1995): Role of endogenous bradykinin in human coronary vasomotor control. Circulation 92:3424-3430
- 12 Linz W, Scholkens B (1992): Role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. J. Cardiovasc. Pharmacol. 20(suppl. 9): 83-90
- 13 Döring HJ, Dehnert H (1974): The Isolated Perfused Heart according to Langendorff, 1st English Edition, Biomesstechnik-Verlag March
- 14 Peskar BA, Steffens C, Peskar PM (1979): Radioimmunoassay of Drugs and Hormones in Cardiovascular Medicine; in DaPrada M, Peskar BA (eds): Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979, pp 239-248

- 15 Fritz H, Kruck H, Rüsse J, Liebich HG (1979): Immunofluorescent studies indicate that the basic trypsin-kallikrein inhibitor of bovine organs (Aprotinin) originates from mast cells. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 360:437-444
- 16 Philipp E (1978): Calculation and hypothetical considerations on the inhibition of plasmin and plasma kallikrein by Trasylol; in Davidson JF, Rowan RM, Samama MM, Desnoyers PC (eds): Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis. New York, Raven Press, Vol. 3, pp 291-295
- 17 Fink E, Greene LJ (1974): Measurement of the bovine pancreatic trypsin inhibitors by
   radioimmunoassay; in Fritz H, Tschesche HL, Greene J, Truscheit E (eds): Proteinase-Inhibitors.
   Bayer Symposium V. Berlin, Springer, pp 243-249

18 Shikimi T (1982): Sandwich Enzyme Immunoassay of Aprotinin. J. Pharm. Dyn. 5: 708-715

- 19 Neuhof C, Soeffker G, Cernaianu G, Dapper F, Tillmanns H, Neuhof H (1997): Effect of bradykinin B<sub>2</sub>-receptor antagonism on post-ischemic coronary reperfusion. Immunopharmacology 36:179-183
- 20 Marokko PR, Braunwald E (1973): Modification of myocardial infarction size after coronary occlusion. Ann. Intern. Med. 79:720-733
- 21 Marokko PR, Braunwald E (1976): Effects of metabolic and pharmacologic interventions on myocardial infarct size following coronary occlusion. Circulation 53(suppl I):162-168
- 22 Pitt B, Mason J, Conti CR (1969): Observations on the plasma kallikrein system during myocardial ischemia. Trans. Assoc. Am. Physicians 82:98-108
- 23 Faymonville ME, Dupont GD, Larbuisson R (1986): Prostaglandin E2, prostacyclin and thromboxane changes during nonpulsatile cardiopulmonary bypass in humans. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 91:858-866
- 24 Needleman P, Kulkarni PS, Raz A (1977): Coronary tone modulation:formation and actions of prostaglandins, endoperoxides, and thromboxanes. Science 195:195-409
- 25 Shimamoto T, Kobayashi M, Takahashi T (1977): Myocardial infarction experimentally induced by thromboxane A2. Circulation 56(suppl III):111-123
- 26 Davies G, Sobel M, Salzman E (1980): Elevated Plasma Fibrinopeptide A and Thromboxane B<sub>2</sub> Levels during Cardiopulmonary Bypass. Circulation 61:808-813
- 27 Hoffmeister HM, Fischer M, Kanzmaier S, Heller W, Seipel L (1999): Action of aprotinin in myocardial ischemia – an investigation using a plasma-free model. Thorac. Cardiovasc. Surg. 47(2):88-93

- 28 Sirieix D, Clinquart F, Delayance S, Massonnet-Castel S, Paris M, Baron JF (1999): Does aprotinin modify the effects of ischemia-reperfusion on the myocardial performance of a blood perfused isolated rabbit heart? Eur. J. Anaesthesiol. 16(10):712-718
- 29 Gurevitch J, Barak J, Hochhauser E (1994): Aprotinin improves myocardial recovery after ischemia and reperfusion. Effects of the drug on isolated rat hearts, J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 108(1):109-18
- 30 Bukhari E, Krukenkamp I, Burns P (1995): Does Aprotinin increase the myocardial damage in the setting of ischemia and preconditioning? Ann. Thorac. Surg. 60:307-10
- 31 Ashraf S, Tian Y, Cowan D (1997): Low-Dose Aprotinin modifies Hemostasis but not Proinflammatory Cytokine Release. Ann. Thorac. Surg. 63:68-73
- 32 Wei M, Kuukasjarvi P, Laurikka J, Pehkonen E, Kaukinen S, Laine S, Tarkka M (2001): Pump prime aprotinin fails to limit proinflammatory cytokine release after coronary artery bypass surgery. Scand. Cardiovasc. J. 35(1):50-54
- 33 Prendergast T, Furukawa S, Beyer A (1996): Defining the role of Aprotinin in Heart Transplantation, Ann. Thorac. Surg. 62:670-674
- 34 Cheng G, Lan H, Sun Z (1997): Experimental Study on the Effects of Aprotinin on Myocardial Ischemia and Reperfusion. J. Tongji Med. Univers. 17(1):36-39
- 35 Wendel HP, Heller W, Michel J (1995): Lower cardiac troponin T levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass and receiving high-dose aprotinin therapy indicates reduction of perioperative myocardial damage. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 109:1164-1172
- 36 Diaz PE, Fishbein MC, Davis MA, (1977): Effect of the kallikrein inhibitor aprotinin on myocardial ischemic injury after coronary occlusion in the dog. Am. J. Cardiol. 40:541-549
- 37 Soerparwata R, Hartman A, Frerichmann U (1996): Aprotinin diminishes inflammatory processes.Int. J. Cardiol. 53(suppl):55-63
- 38 Traber D, Schlag G, Redl H (1988): Aprotinin inhibits the cardiopulmonary response to endotoxin in sheep. Progr. Clin. Biol. Res. 264:379-383
- 39 Tweddell J, Berger S, Frommelt P (1996): Aprotinin improves outcome of single-ventricle palliation.Ann. Thorac. Surg. 62:1329-1336

- 40 Madhala-Givon O, Hochhauser E, Weinbroum A, Barak Y, Krasnov T, Lelcuk S, Harell D, Vidne B (2000): The influence of aprotinin on myocardial function after liver ischemia-reperfusion, Isr. Med. Assoc. J. 2(6):450-454
- 41 Wippermann CF, Schmid FX, Eberle B, Huth RG, Kampmann C, Schranz D, Oelert H (1999):
  Reduced inotropic support after aprotinin therapy during pediatric operations. Ann. Thorac. Surg.
  67(1):173-176
- 42 Berger S, Salzman EW (1974): Thromboembolic complications of prosthetic devices; in Spaet T (ed): Progress in Hemostasis and Thrombosis. New York, Grune and Stratton, Vol.11, p 273
- 43 Van Oeveren W, Jansen N, Bidstrup B, Royston D, Westaby S, Neuhof H, Wildevuur C (1987):
   Effects of Aprotinin on Hemostatic Mechanisms during Cardiopulmonary Bypass. Ann. Thorac.
   Surg 44:640-645
- 44 Lemmer J, Stanford W, Bonney S (1994): Aprotinin for coronary artery bypass operations: efficacy, safety, and influence on early saphenous vein graft patency. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 107:543-553
- 45 Probst JW, Siegel L, Feeley T (1994): Effect of Aprotinin on transfusion requirements during repeat sternotomy for cardiac transplantation surgery. Transplant. Proc. 26:3719-3721
- 46 Havel M, Owen A, Simon P (1992): Decreasing use of donated blood and reduction of bleeding after orthotopic heart transplantation by use of aprotinin. J. Heart Lung Transplant. 11:348-349.
- 47 Wildenthal K (1978): Lysosomal alterations in ischemic myocardium: result or cause of myocellular damage. J. Mol. Cell. Cardiol. 10:595-603
- 48 Decker RS, Wildenthal K (1978): Sequential lysosomal alteration during cardiac ischemia. II. Ultrastructural and cytochemical changes. Lab. Invest. 38:662-7349
- 49 Fox AC, Hoffstein S, Weissmann G (1976): Lysosomal mechanisms in production of tissue damage during myocardial ischemia and the effect of treatment with steroids. Am. Heart J. 91:394-397
- 50 Spagnuolo P, Ellner J, Hassid A (1980): Thromboxane A2 Mediates Augmented Polymorphonuclear Leucocyte Adhesiveness. J. Clin. Invest. 66:406-414
- 51 Bayley IE, Fawzi AB (1985): Calcium-binding to cardiac myocytes protected from proteolytic enzyme activity. Biochem. Biophys. Acta 839:199-208

- 52 Yakushev VS, Lifshits RI, Slobodin VB (1975): Effect of an inhibitor of trypsin-like enzymes on some metabolic processes in the heart muscle during the acute period of experimental ischemia. Kardiologia 15:114-118
- 53 Case, RB (1971): Ion alterations during myocardial ischemia. Cardiology 56:245-62
- 54 Abell CW, Monahan TM (1973): The role of adenosine 3'5'-cyclic monophosphate in the regulation of mammalian cell division. J. Cell. Biol. 59:549-558
- 55 Mela L, Bacalzo LV Jr, Miller LD (1971): Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in hemorrhagic and endotoxin shock, Am. J. Physiol. 220:571-577
- 56 Rodell TC (1996): The kallikrein/kinin system and kinin antagonists in trauma. Immunopharmacology 33:279-283
- 57 Wachtfogel YT, Kucich U, Hack CE, Gluszko P, Colman RW, Edmunds LH (1993): Aprotinin inhibits the contact, neutrophil and platelet activation system during simulated extracorporal perfusion. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 106:1-10
- 58 Wachtfogel YT, Yanina T, Hack E (1995): Selective kallikrein inhibitors alter human neutrophil elastase during extracorporal circulation. Am. J. Physiol. 268:1353-1357.
- 59 Sultan I, Sunamori M, Suzuki I (1992): Heart Preservation: Analysis of cardioprotective Infusate Characteristics. Membrane Stabilization, Calcium Antagonism, and Protease Inhibition on Myocardial Viability: A Biochemical, Ultrastructural, Functional Study. J. Heart Lung Transplant. 11:607-618
- 60 Cella G, Vittadello O, Gallucci V (1981): The release of ß-Thromboglobulin and platelet factor 4 during extracorporal circulation for open heart surgery. Europ. Clin. Invest. 11:165-169
- 61 Davies G, Sobel M, Salzman E (1980): Elevated plasma fibrinopeptide A and Thromboxane B<sub>2</sub> levels during cardiopulmonary bypass. Circulation 61:808-814
- 62 Hirsh P, Hills L, Campbell WB (1981): Release of prostaglandins and thromboxane into the coronary circulation in patients with ischemic heart disease. N. Engl. J. Med. 304:685-91
- 63 Moncada S, Vane JR (1975): Pharmacology and endogenous role of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2 and prostacyclin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:2994-2998
- 64 Moncada S, Vane JR (1979): Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood vessel walls., N. Engl. J. Med. 300:1142-1147

- 65 Ylikorkala O, Saarela E, Viinikka L (1981): Increased prostacyclin and thromboxane production in man during cardiopulmonary bypass. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 82:245-247
- 66 Singh U, Seth S, Manchanda S (1997): Protective actions of a thromboxane receptor antagonist, SQ 29548 on the ischemic myocardium: Morphologic and hemodynamic effects. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 56(2):105-110
- 67 van Oeveren W, Eijsman L, Roozendaal KJ, Wildevuur CRH (1988): Platelet preservation by aprotinin during cardiopulmonary bypass. Lancet 1:644
- 68 Feng J, Li H, Rosenkranz ER (2000): Bradykinin protects the rabbit heart after cardioplegic ischemia via NO-dependent pathways. Ann. Thorac. Surg. 70(6):2119-2124
- 69 Oikawa Y, Maehara K, Saito T, Tamagawa K, Maruyama Y (2001): Attenuation of angiotensin IImediated coronary vasoconstriction and vasodilatory action of angiotensin-converting enzyme inhibitor in pacing-induced heart failure in dogs. J. Am. Coll. Cardiol. 38(4):1188-1194
- 70 Giannella E, Mochman HC, Levi R (1997): Ischemic preconditioning prevents the impairment of hypoxic coronary vasodilatation caused by ischemia/reperfusion:role of adenosine A1/A3 and bradykinin B<sub>2</sub> receptor activation. Circ. Res. 81(3):415-422
- 71 Parratt JR, Vegh A, Papp JG (1995): Bradykinin as an endogenous myocardial protective substance with particular reference to ischemic preconditioning a brief review of the evidence.
   Can. J. Physiol. Pharmacol. 73(7):837-842
- 72 Campbell DJ, Dixon B, Kladis A, Kemme M, Santamaria JD (2001): Activation of the kallikrein-kinin system by cardiopulmonary bypass in humans, Am. J Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 281(4):1059-1070
- 73 Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM (1995): Role of Bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. Circ. Res. 77(3):611-621
- 74 Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM (2001): Acetycholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. Circ. Res. 89(3):273-278
- 75 Brew EC, Rehring TF, Banerjee A (1994): Bradykinin receptors mediate preconditioning through protein kinase C. Circulation 90:201-207

- 76 Wolfrum S, Richardt C, Dominiak P, Katus HA, Dendorfer A (2001): Apstatin, a selective inhibitor of aminopeptidase P, reduces myocardial infarct size by a kinin-dependent pathway. Br. J. Pharmacol. 134(2):370-374
- 77 Kositprapa C, Ockaili RA, Kukreja RC (2001): Bradykinin B<sub>2</sub>-receptor is involved in the late phase of preconditioning in rabbit heart. J Mol Cell Cardiol 33(7):1355-1362
- 78 D'Orléans-Juste P, de Nucci G, Vane JR (1989): Kinins act on B<sub>1</sub> or B<sub>2</sub> receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells.
   Br. J. Pharmacol. 96:920-926
- 79 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991): Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43:109-142
- 80 Danser AH, de Vries R, Schoemaker RG, Saxena PR (1998): Bradykinin-induced release of nitric oxide by the isolated perfused rat heart:importance of preformed pools of nitric oxide–containing factors. J. Hypertens. 16(2):239-244
- 81 Feng J, Rosenkranz ER (1999): Bradykinin pretreatment improves ischemia tolerance of the rabbit heart by tyrosine kinase mediated pathways. Ann. Thorac. Surg. 68(5):1567-1572
- 82 Taylor-McCabe KJ, Ersahin C, Simmons WH (2001): Bradykinin metabolism in the isolated perfused rabbit heart. J. Hypertens. 19(7):1295-1299
- 83 Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ (1990): Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. Circulation 82:1402-1412

## 8 Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Neuhof, für die Überlassung des Themas und die Hilfestellungen bei der Durchführung und Korrektur.

Herrn Harald Mihnacz und Frau Antje Weber gilt mein Dank für die hervorragende technische Unterstützung und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ohne den Humor und die liebenswürdige Art von Frau Tiziana Wieth wäre die Arbeit nicht Zustande gekommen. Dafür gilt Ihr mein besonderer Dank.

### 9 Lebenslauf

Name:	Cernaianu
Vorname:	Grigore
Geb. Datum:	11.12.1971
Geb. Ort:	Bukarest/Rumänien
Adresse:	Reichpietschstr. 47
	04317 Leipzig

### Schulausbildung:

1979-1984	Grundschule und Gymnasium Nr. 3 Bukarest
1982-1986	Gymnasium Luisenschule Essen
1986-1991	Kepler Gymnasium Weiden i.d. Opf.
1991	Abschluss Allgemeine Hochschulreife
	Note : sehr gut

### Bundeswehr:

1991-1992	Grundausbildung in Regensburg + Wehrdienst in
	Weiden i.d. Opf.

#### Studium:

Justus-Liebig Universität Giessen –
Abschluss Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr an der Uni-Klinik Regensburg :
Wahlfach Anästhesie
Studienabschluss Dritter Abschnitt der Ärztlichen
Prüfung
Note : sehr gut

### Bisherige ärztliche Tätigkeiten:

04/1999-10/2000	Arzt im Praktikum an der Chirurgischen Klinik und
	Poliklinik der Universitätsklink Regensburg
	Leiter: Prof. Dr. med. K.W. Jauch
seit dem 15.01.2001	Assistenzarzt in der Facharztweiterbildung für
	Kinderchirurgie an der Klinik und Poliklinik für
	Kinderchirurgie der Universitätsklinik Leipzig
	Leiter: Univ-Prof. Dr.med. J. Bennek