

Aus dem Zentrum für Operative Medizin I
Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie
Universitätsklinikum Düsseldorf
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. E. Gams
Betreuer: Prof. Dr. J.D. Schipke

**Über die kardioprotektive Wirkung eines δ -Opioid Agonisten
auf das ischämisch/reperfundierte Myokard in Abhängigkeit von freien Radikalen**

Eine Studie an blutperfundierten, isolierten Kaninchenherzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf
vorgelegt von

Frank Nickel

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch M.A.

Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jochen D. Schipke

Koreferent: Prof. Dr. med. Malte Kelm

für Britta

für meine Eltern

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Vom Winterschlaf zur Kardioprotektion - Einfluß von Opioiden auf das Herz	1
1.2	Myokardiales Stunning	3
1.3	Ziele	6
2	Methodik	7
2.1	Versuchstiere und Präparation	7
2.2	Langendorff-Anlage	8
2.2.1	Perfusionskreislauf	9
2.2.2	Systemischer Kreislauf	10
2.3	Perfusionsmedium	10
2.4	Experimentelles Protokoll	11
2.5	Datenerfassung	12
2.6	Berechnungen und Statistik	13
3	Ergebnisse	15
3.1	Blutgasanalysen	15
3.2	Einfluß von DADLE und Mannitol auf die myokardiale Funktion vor der Ischämie	16
3.2.1	Systolische und diastolische, mechanische Funktion und Herzfrequenz	16
3.2.3	Sauerstoffverbrauch und Koronarfluß	17
3.2.4	Externer Wirkungsgrad	18
3.3	Einfluß von DADLE und Mannitol auf die myokardiale Funktion während der Ischämie	18
3.3.1	Ischämische Kontraktur	18
3.4	Einfluß von DADLE und Mannitol auf die myokardiale Funktion in der Reperfusion	19
3.4.1	Systolische Funktion	19
3.4.2	Diastolische Funktion	21
3.4.3	Koronarfluß und Sauerstoffverbrauch	23
3.4.4	Externer Wirkungsgrad	24
3.5	Troponin T	25
3.6	Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	26
4	Diskussion	28
4.1	Methodische Aspekte	28
4.1.1	Das Langendorff-Modell	28
4.1.2	Perfusat	28
4.2	Einfluß von DADLE und Mannitol auf das nichtischämische Myokard	29
4.3	Ischämische Kontraktur	32
4.4	Einfluß von DADLE und Mannitol während der Reperfusion	36
4.4.1	Kontraktile Funktion	36
4.4.2	Koronarfluß, Sauerstoffverbrauch und Wirkungsgrad	43
4.5	Troponin T	49
4.6	Klinische Aspekte	50
5	Zusammenfassung	55
6	Literatur	56
7	Eigene Veröffentlichungen	65
8	Lebenslauf	66

1 Einleitung

1.1 Vom Winterschlaf zur Kardioprotektion - Einfluß von Opioiden auf das Herz

Der Winterschlaf bei Tieren ist ein Phänomen, das eine hohe Anpassung an extreme Überlebensbedingungen ermöglicht. Tiere, die sich im Winterschlaf befinden, können bis zu 90 % ihrer Energie einsparen und ohne Nahrung und Wasser bis zu fünf Monaten bei sehr niedrigen Temperaturen überleben (Bolling et al. 1997). Dabei spielt eine Umstellung ihres Stoffwechsels eine wichtige Rolle. Die Tiere entwickeln eine Bradypneu, eine Bradykardie und eine Hypothermie (Bolling et al. 1997).

Dieser Zustand wird durch eine Substanz hervorgerufen, die aus dem Serum winterschlafender Tiere isoliert werden konnte, dem sogenannten Hibernation Induction Trigger (HIT). Durch Injektion dieser Substanz konnten auch nicht winterschlafende Tiere in einen winterschlafähnlichen Zustand versetzt werden (Dawe and Spurrier 1971; Dawe, Spurrier, and Armour 1970). Die beschriebene Wirkung ließ sich durch Gabe des unspezifischen Opioid-Antagonisten Naloxon aufheben. Damit lag nahe, daß die Wirkung von HIT über eine Stimulation von Opioid-Rezeptoren vermittelt wurde.

Weitere Untersuchungen zeigten, daß HIT der künstlich hergestellten Substanz D-Ala²-D-Leu⁵-Enkephalin (DADLE) sehr ähnlich war, mit welcher bestimmte Tiere ebenfalls in einen winterschlafähnlichen Zustand versetzt werden konnten (Oeltgen et al. 1988). Bei DADLE handelt es sich um einen selektiven δ -Opioid-Agonisten, der nicht nur die physiologischen Veränderungen bei Tieren im Winterschlaf einleiten und aufrecht erhalten kann, sondern zusätzlich protektive Eigenschaften auf Organe hat, um diese vor der extremen Umstellung des Körpers und den extremen Umweltbedingungen während der Hibernation zu schützen. In der Mitte der 90er Jahre wurde daher untersucht, ob DADLE sich auch für eine bessere Protektion von Transplantaten eignet. Die Situation von Organen, die für eine Transplantation vorgesehen

sind, ähnelt sehr der Situation während des Winterschlafes. Der Stoffwechsel befindet sich auf einem minimalen Niveau, das Sauerstoffangebot ist gering und Transplantate werden bei sehr niedrigen Temperaturen gelagert. Nachdem mit Hilfe von DADLE die Haltbarkeit von Herztransplantaten um ein Vielfaches verlängert werden konnte (Bolling et al. 1997) lag nahe, daß DADLE kardioprotektive Eigenschaften besitzt, die durch δ -Opioid-Rezeptor vermittelt werden. Auch für andere Opioide, die δ -Opioid-agonistisch wirken, wie z.B. Morphin, konnte eine Kardioprotektion gezeigt werden. Dagegen wirken Opioide, die κ - oder μ -agonistisch sind, nicht kardioprotektiv (Schultz, Hsu, and Gross 1998).

Es folgten zahlreiche Studien über die kardioprotektive Eigenschaft von Substanzen, die δ -opioide-agonistisch wirken. So konnte z.B. die Größe von experimentell herbeigeführten Infarkten um fast die Hälfte verkleinert werden (Schultz et al. 1998). Weitere Untersuchungen ergaben, daß δ -Opioide allerdings nur dann kardioprotektiv sind, wenn sie vor einer Ischämie gegeben werden (Kevelaitis et al. 1999). Die Wirkungsweise der Opioide beruht dabei auf δ -Rezeptoren, die direkt am Myokard (Mensch, Kaninchen) nachgewiesen wurden (Birkenkamp-Demtroeder and Schipke 1999). Der durch diesen Rezeptor ausgelöste Mechanismus ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Mehrere Studien zeigten, daß eine Stimulation dieses Rezeptors dazu führt, daß über ein G-Protein ein ATP-abhängiger Kalium-Kanal geöffnet wird (Schultz et al. 1998) (\rightarrow Abb.1). Andere Arbeitsgruppen schlagen vor, daß die Kardioprotektion über eine Reduktion von freien Radikalen, wie sie während einer Ischämie oder Reperfusion gebildet werden, durch eine Verzögerung des ATP-Verbrauchs oder durch eine verbesserte Kalzium-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum vermittelt wird (Benedict et al. 1999; Bolling et al. 1997; Ventura et al. 1992; Wong, Lee, and Tai 1990).

Es besteht also Konsens, daß δ -agonistische Opioide die Ischämietoleranz des Herzens erhöhen und

dadurch irreversible Schäden - wie Infarkte- verringern können. In dieser Studie sollte der Einfluß auf reversible, ischämiebedingte Schäden untersucht werden.

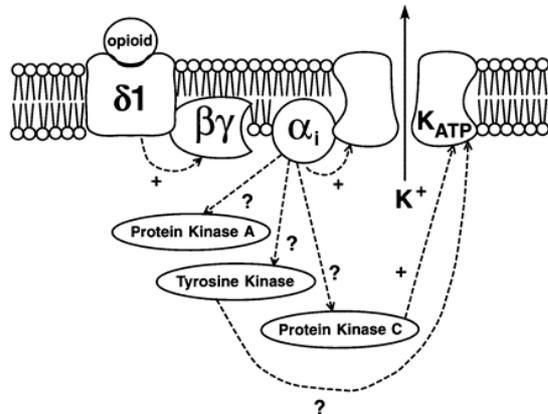


Abb.1: Modell des δ_1 -Opioid-Rezeptor. Es handelt sich um ein membranständiges Protein, das über ein G-Protein gekoppelt, ATP-sensitive Kalium-Kanäle öffnet. Außerdem wird eine Beteiligung von Protein-Kinase A, Tyrosin-Kinase A und vor allem von Protein-Kinase C angenommen.

(nach Schultz et al, 1998)

1.2 Myokardiales Stunning

Die längerfristige Okklusion einer oder mehrerer Koronararterien führt zur Ausbildung eines Infarktes. Dieser irreversible Zustand ist von einer verschlechterten, kontraktile Herzfunktion begleitet. Eine Okklusion von nur kurzer Dauer (z.B. 20 min) führt dagegen nicht zu irreversiblen Schäden. Es kommt jedoch in der Reperfusion zu einer erheblichen Verschlechterung der kontraktile Funktion und dies, obwohl die Koronardurchblutung nahezu vollständig wiederhergestellt wurde (Bolli 1990; Braunwald and Kloner 1982). Dieses Phänomen wird als „myokardiales Stunning“ bezeichnet und wurde 1975 zuerst von Heyndrickx et al (Heyndrickx et al. 1975) beschrieben. Definitionsgemäß ist das myokardiale Stunning eine kontraktile Dysfunktion, die sich nach einer kurzen Ischämie trotz vollständig wiederhergestellter Koronardurchblutung einstellt und keine irreversiblen Schäden zur Ursache hat (Braunwald and Kloner 1982). Diese Dysfunktion kann Stunden bis Tage andauern (Bolli 1990).

Das myokardiale Stunning konnte am Herzen sowohl nach regionaler Ischämie (durch Okklusion einer Koronararterie) als auch nach einer globalen Ischämie nachgewiesen werden (Bolli 1990) und zwar am in situ-Modell und am isolierten Herz. Außerdem zeigte sich ein Stunning bei

einer arbeitsinduzierten Ischämie, d.h. das Phänomen kann nicht nur nach einer Einschränkung des Sauerstoffangebotes sondern auch durch Erhöhung der Sauerstoffnachfrage auftreten (Homans et al. 1986).

Das myokardiale Stunning ist ein sehr komplexes Geschehen, daß durch viele Faktoren beeinflusbar ist und sich in vielen verschiedenen Facetten äußern kann. Nach dem heutigen Wissensstand gibt es zwei Hypothesen, die das Phänomen weitgehend erklären und die wahrscheinlich auch beide ursächlich für die postischämische Funktion sind. Die erste Hypothese führt das Stunning auf die Bildung von freien Radikalen in der frühen Reperfusion zurück, die durch noch nicht bekannte Mechanismen zu einer verschlechterten Funktion führen (Bolli et al. 1987; Bolli et al. 1989; Farber et al. 1988; Gross et al. 1986; Koerner, Anderson, and Dage 1991; Myers et al. 1985; Myers et al. 1986; Przyklenk and Kloner 1986) (Abb. 2). Es wird vermutet,

daß freie Radikale die kontraktilen Filamente und/oder wichtige Enzyme, die z.B. den Kalzium-Haushalt regeln, angegriffen werden. Die Rolle der freien Radikale für das myokardiale Stunning ist heute weitgehend akzeptiert (Bolli and Marban 1999).

Die zweite Hypothese postuliert ein Ungleichgewicht der Kalziumhomöostase als Ursache für die postischämische

Dysfunktion (Kusuoka et al. 1987), (Marban et al. 1990), (Kusuoka and Marban 1992). Hierbei spielt zum einen die Bildung einer Kalzium-Überladung während der Ischämie und Reperfusion und zum anderen eine Verminderung der Kalzium-Sensitivität der kontraktilen Filamente eine Rolle, was

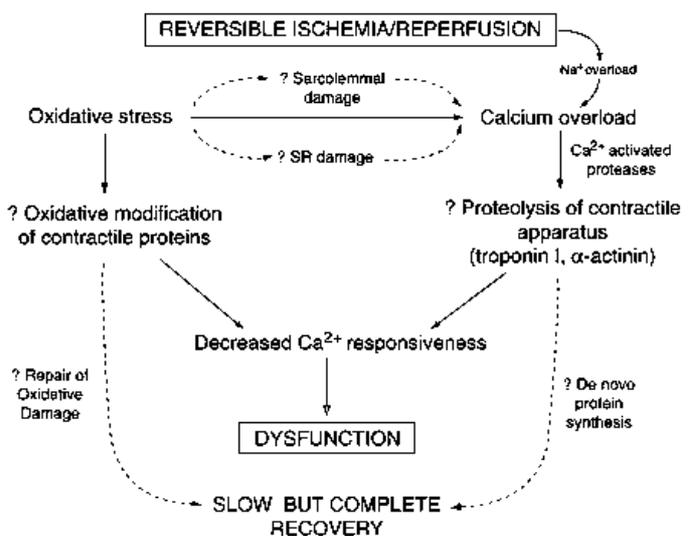


Abb.2: Modell für die Mechanismen des myokardialen Stunning (Bolli, Marban et. al. 1999)

schließlich zu einer eingeschränkten, kontraktilen Funktion führt (→Abb. 2).

Obwohl beide Hypothesen zunächst sehr unterschiedlich erscheinen, gibt es viele Hinweise darauf, daß tatsächlich beide am myokardialen Stunning beteiligt sind. So wird z.B. vermutet, daß freie Radikale eine Kalziumüberladung verstärken können, und es wird eine gemeinsame Endstrecke beider Hypothesen angenommen, die in einer verminderten Kalzium-Sensitivität besteht, zu der die Bildung der freien Radikale und die Kalzium-Überladung führen, und wodurch es schließlich zur eingeschränkten kontraktilen Funktion kommt (Bolli and Marban 1999)(→ Abb. 2.).

Im Zusammenhang mit dem myokardialen Stunning wird zusätzlich die Frage nach dem Zeitpunkt diskutiert, zu dem die Schädigung des Myokard stattfindet. Einige Autoren beschreiben, daß die Schädigung – vor allem die durch freie Radikale – nicht schon während der Ischämie, sondern erst in der frühen Reperfusion stattfindet, und sprechen deshalb von einem Reperfusionsschaden (Bolli et al. 1989). Diese Aussage stützt sich vor allem darauf, daß die postischämische Dysfunktion durch Gabe von Antioxidantien, wie z.B. Mannitol, in der frühen Reperfusion (bis zu 1 min nach der Ischämie), verbessert werden kann. Mit einer späteren Gabe ließ sich keine Verbesserung mehr erreichen. Daraus läßt sich schließen, daß die Schädigung durch freie Radikale in den ersten Minuten der Reperfusion stattfindet (Bolli et al. 1989).

Auch mit anderen Substanzen war es möglich, die postischämische Funktion zu verbessern. Zu diesen gehörten z.B. Kalzium-Antagonisten (Beyer et al. 1999), Adenosin (Sekili et al. 1995) und Substanzen, die den ATP-abhängigen Kaliumkanal öffnen (Sekine et al. 1999), wie z.B. δ -Opioid-Agonisten (Schultz et al. 1998) (→ Abb. 1). Diese Substanzen verhindern allerdings einen Schaden, der während der Ischämie entsteht (Bolli and Marban 1999). Der Schaden, der zum Stunning führt setzt sich also aus einer Komponente zusammen, die während der Ischämie und einer Komponente, die während der Reperfusion entsteht (Bolli and Marban 1999).

δ -Opioid-Agonisten, wie DADLE, entwickeln ihre kardioprotektive Eigenschaft nur dann,

wenn sie vor einer Ischämie gegeben werden, was ein Hinweis darauf ist, daß dadurch der Ischämieschaden beeinflußt wird. Antioxidative Substanzen wie Mannitol wirken auch dann, wenn sie zu Beginn der Reperfusion gegeben werden und vermindern damit den Reperfusionsschaden.

1.3 Ziele

- (1) Die kardioprotektiven Eigenschaften von DADLE sollten hinsichtlich der Auswirkung auf das myokardiale Stunning untersucht werden. Insbesondere sollte durch den Einsatz von DADLE die postischämische Dysfunktion verbessert werden. Zusätzlich sollten andere, durch DADLE verursachte Aspekte des myokardialen Stunnings einbezogen werden, wie z.B. der myokardiale Sauerstoffverbrauch und der kardiale Wirkungsgrad.
- (2) Es sollte untersucht werden, ob die Kardioprotektion durch DADLE, die auf der Ebene des Ischämieschadens wirkt, durch eine zusätzliche Behandlung mit dem Radikalfänger Mannitol, dessen Wirkung sich auf den Reperfusionsschaden bezieht, einen weiteren kardioprotektiven Effekt zeigt. Diese Untersuchung sollte zum einen weitere Aspekte zur Aufklärung des Pathomechanismus des myokardialen Stunnings liefern und zum anderen weitere Hinweise auf den Wirkmechanismus von DADLE geben. Außerdem würde eine Funktionsverbesserung durch die Kombination der beiden Substanzen einen klinischen Einsatz überlegenswert machen.

2 Methodik

2.1 Versuchstiere und Präparation

Adulte (ca. 6 Monate alte) männliche White New Zealand Kaninchen mit einem Körpergewicht zwischen 2500 und 3500 g (Mittelwert: 2944 g) wurden nach einer Nahrungskarenz von 12 h für die Versuche verwendet. Die Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt und waren von der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt. Zur Narkose erhielten die Tiere Ketanest[®] (2 ml, i.m.) und Rompun[®] (1,5 ml, i.m.). Sie wurden von ventral rasiert und erhielten einen venösen Zugang an einer Ohrvene. Die Narkose wurde im weiteren Verlauf mit Rohypnol[®] und Ketanest[®] i.v. aufrecht erhalten. Nach einer Tracheotomie wurde ein 3 mm dicker Tubus eingeführt. Anschließend wurden die Tiere mit Pancuronium[®] (0,5 ml, i.v.) relaxiert und mit einer Kleintier-Respirator (UGO BASILE Typ 7025) kontrolliert beatmet (Atemfrequenz: 35 min⁻¹; Atemzugvolumen: 20-30 ml; Biology Data Book, Bethesda, 1974). Der Thorax wurde durch eine mediane Sternotomie unter Schonung der Lungen eröffnet und das Perikard nach Resektion des Thymus von kaudal nach kranial durchtrennt. Nach Umschlingen der Aorta ascendens und der Arteria pulmonalis wurden 0,3 ml Liquemin[®] (i.v.) zur Gerinnungshemmung verabreicht. Nach dem Abklemmen der Vena cava inferior wurde die Arteria pulmonalis durchtrennt und in die eröffnete Aorta eine Metallkanüle mit einem Außendurchmesser von 5 mm eingebunden, über die das Herz mit dem auf 37 °C erwärmten Blut perfundiert wurde. Die Beatmung wurde abgestellt, das Herz vorsichtig aus dem Thorax herauspräpariert und durch die Beseitigung des Verlängerungsschlauches direkt an die modifizierte Langendorff-Apparatur (→ Abb. 3) angeschlossen. Der Perfusionsdruck betrug für den weiteren Verlauf des Versuches 80 mmHg.

Die freie Wand des linken Vorhofs wurde inzidiert und die Mitralklappe weit geöffnet.

Danach wurde ein Latexballon entsprechender Größe (Größe 12 - 14, HSE) in den linken Ventrikel vorgeschoben. Als Nächstes wurden die beiden Venae cavae inferior und die V. cava superior mit Hilfe einer Fadenschlinge verschlossen. Über eine Kanüle in der A. pulmonalis wurde das venöse Effluat abgeleitet. Außerdem wurde in Höhe der Vorhöfe eine Temperatursonde befestigt. Bei Bedarf wurde eine Infrarotlampe benutzt, um eine Temperatur von 37 °C aufrecht zu erhalten. Die gesamte Präparation am isoliert schlagenden Herzen dauerte im Durchschnitt 20 min. Sie war für die vier Versuchsserien nicht unterschiedlich.

2.2 Langendorff-Anlage

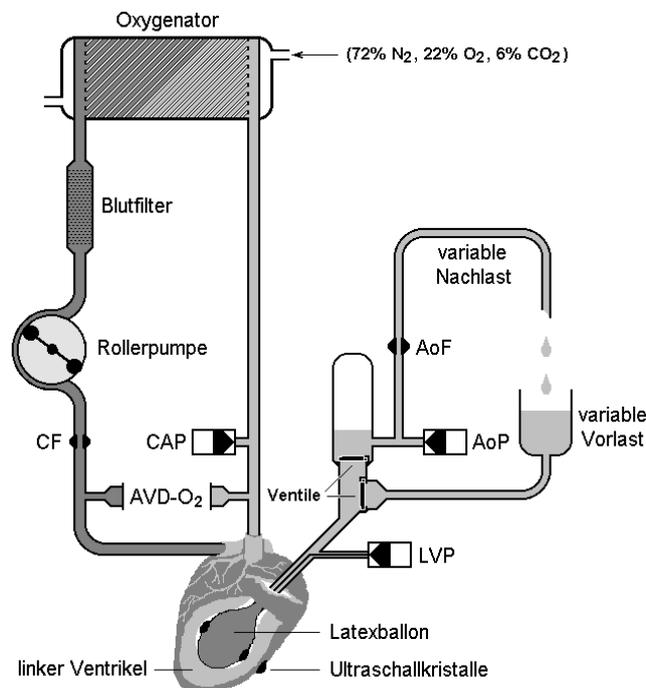


Abb. 3: Schema der modifizierten Langendorff-Anlage. Der Perfusionssystemkreislauf ist auf der linken Seite skizziert. Mittels einer Rollerpumpe wird das gesamte Blutvolumen in einem geschlossenen Kreislauf durch einen Filter und einen Oxygenator gepumpt und der gewünschte koronare Perfusionsdruck (CAP) eingestellt. Auf der rechten Seite ist der systemische Kreislauf dargestellt: ein intraventrikulärer Latexballon ist mit einer Vorrichtung verbunden, die eine 'Mitralklappe', eine 'Aortenklappe' und einen Windkessel enthält. Damit handelt es sich um ein working heart-Modell. Zusätzlich können Vor- und Nachlast-Bedingungen variiert werden (AoF = Aortenfluß, AoP = Aortendruck, LVP = linksventrikulärer Druck, CF = Koronarfluß, AVD-O₂ = arterio-venöse Sauerstoffdifferenz).

Bereits 1895 entwickelte Oscar Langendorff die erste Methode zur Registrierung der kontraktile Leistung eines isoliert schlagenden Herzens. Heute verwendete Anlagen gestatten die Trennung des „systemischen“ und des Perfusionskreislaufes und die Variation der Vor- und Nachlastbedingungen (Bardenheuer and Schrader 1983). (→ Abb. 3)

2.2.1 Perfusionskreislauf

Die in die Aorta eingebundene Metallkanüle war mit einem System zur Perfusion der Koronargefäße verbunden. Für die verwendete Blutperfusion wurde die Langendorff-Anlage modifiziert. Zur Aufrechterhaltung eines koronaren Perfusionsdruckes von 80 mmHg wurde eine Blutsäule erzeugt. Durch das dabei verwendete Glasrohr wurde mit einer Rollerpumpe (10-20-00; Stöckert München) das gesamte in der Anlage befindliche Blutvolumen kontinuierlich gepumpt. Über einen Überlauf konnte das nicht zur Koronarperfusion erforderliche Blut in ein Reservoir (nicht in Abb. 3 gezeigt) abfließen. Dorthin floß auch das Koronarperfusat, nachdem es das AVOX-Meßgerät (Shepherd and Burgar 1977) zur Bestimmung der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz durchlaufen hatte. Eine zweite Rollerpumpe (10-20-00; Stöckert München) förderte das Blut durch einen Kinder-Membranoxigenator (Masterflow 51, Fa. dideco) und einen Filter (Ultipor, Fa. Pall; Porengröße 120 µm). Dieser geschlossene Kreislauf entsprach im Prinzip einer extrakorporalen Zirkulation. Das über die kanülierte Arteria pulmonalis abgeleitete Perfusat wurde mit Hilfe einer Rollerpumpe (Gilson Abimed; Minipuls 2) ebenfalls durch das AVOX-Meßgerät geleitet. Proximal dieses Meßgerätes befand sich ein Flußmeßkopf (3 mm Innendurchmesser), der über ein Ultraschall-Flußmeßgerät (Transonic System Inc.; T206) den Koronarfluß registrierte.

Die Temperatur im Perfusionskreislauf und im systemischen Kreislauf wurde über einen Wärmekreislauf mit Umwälzthermostat (Braun-Melsungen, Thermofix 1420) konstant auf

37 °C gehalten.

2.2.2 Systemischer Kreislauf

Der im linken Ventrikel positionierte Latexballon war mit einem systemischen Kreislauf verbunden: Aus einem Vorratsgefäß (Abb. 1) gelangte 0,9 %-ige NaCl-Lösung über ein künstliches Klappensystem in den Latexballon. Die Höhe des Flüssigkeitspiegels im Vorratsgefäß entsprach dabei der Vorlast. Über einen seitlichen Zugang proximal der 'Mitralklappe' wurde ein 3F Mikrotip-Manometer (Millar, TC 500) zur Messung des linksventrikulären Druckes in den Latexballon vorgeschoben. Das Schlagvolumen wurde aus dem Latexballon durch die 'Aortenklappe' und einen sich anschließenden Windkessel in den künstlichen Kreislauf ausgeworfen. Die Höhe des Flüssigkeitspiegels im nachgeschalteten Gefäß entsprach der Nachlast, die während der Versuche konstant auf 60 mmHg gehalten wurde. Das Fördervolumen, d.h. der Aortenfluß, floß wieder in das Vorratsgefäß zurück. Der Aortendruck wurde mit einem Druckaufnehmer (Statham, P 23 ID) distal vom Windkessel gemessen. Weiter distal befand sich ein Flußmeßkopf (Innendurchmesser 3 mm), der über ein Ultraschall-Flußmeßgerät (Transonic System Inc.; T206) den Aortenfluß registrierte. Um auch isovolumetrische Kontraktionen untersuchen zu können, ließ sich der Verbindungsschlauch distal der künstlichen Aortenklappe abklemmen.

2.3 Perfusionsmedium

Um möglichst physiologische Bedingungen während der Perfusion der isolierten Herzen zu erzielen, wurde ein mit Erythrozyten angereichertes Perfusat hergestellt.

Hierzu wurden etwa 8 l frisches Rinderblut vom Schlachthof Düsseldorf geholt. Dieses Blut wurde vierfach zentrifugiert und das Serum jeweils abgesaugt. Beim 2. und 3. Waschgang wurde den Erythrozyten-Konzentraten gepufferte NaCl-Lösung und bei dem 4. Waschgang

ungezuckerte Krebs-Henseleit-Lösung zugesetzt. Der gewaschenen Erythrozyten-Suspension wurden 4 g/100 ml Albumin hinzugefügt, das zweimal 24 h lang dialysiert worden war. Diese Lösung wurde mit Krebs-Henseleit-Lösung (→ Tab. 1) soweit verdünnt, daß ein Hämoglobingehalt von 10 g/dl resultierte.

Auf 1 l Perfusionsmedium wurden 5000 Einheiten Liquemin, 1,1 g Glukose und 0,22 g Pyruvat gegeben. Je nach Versuchsgruppe wurde dem Perfusionsmedium 1,5 g Mannitol zugesetzt. Bei einem Volumen von 1 l Perfusionslösung betrug die Stoffmengenkonzentration des Mannitols 8,6 mM, was einer

Tab. 1: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung

	[mmol/l]	[g/l]
NaCl	90	5,21
NaHCO₃	30	2,44
KCl	4	0,37
Na₂HPO₄·7 H₂O	1	0,27
MgSO₄·7 H₂O	0,5	0,12
CaCl₂·2 H₂O	3,6	0,53
EDTA	0,04	0,015

hypoosmolaren Mannitollösung entspricht (hyperosmolar erst ab 10 mM (Poullis 1999)). Für einen Versuch wurden 500 ml Perfusionslösung verwendet.

2.4 Experimentelles Protokoll

Die insgesamt 27 Kaninchenherzen wurden in 4 Versuchsgruppen eingeteilt:

1. Placebo-Gruppe (n=6)
2. DADLE-Gruppe (n=8)
3. Mannitol-Gruppe (n=7)
4. DADLE+Mannitol-Gruppe (n=7)

Nach der Präparation folgte eine 15 min Einschlagphase, in der sich das Herz an der Apparatur stabilisieren konnte. Nach einer 15 min Kontrollphase bei einem Perfusionsdruck

von 80 mmHg wurden die hämodynamischen Größen (HF, LVP, dP/dt, AoF, CF und AVDO₂) an auswerfenden, sowie an isovolumetrisch kontrahierenden Herzen (durch Abklemmen der „Aorta“) gemessen. Danach folgte eine 60 min Phase, zu deren Beginn bei den Gruppen 2 und 4 DADLE (430 nmol = 5 mg) gegeben wurde. Alle 15 min wurden die oben aufgeführten Größen bei auswerfenden und isovolumetrisch schlagenden Herz gemessen. Diese Phase dauerte 60 min, um eventuelle, hämodynamisch wirksame Effekte von DADLE oder Mannitol vor der Ischämie zu erkennen und den gegebenen Substanzen eine gewisse Einwirkzeit zu geben. Als Nächstes folgte eine 20 min lange, globale ‘No-Flow‘-Ischämie, bei der der Perfusionsdruck 0 mmHg betrug. Während dieser Phase wurde der linksventrikuläre Druck alle 5 min gemessen, um eine ischämische Kontraktur des Ventrikels zu erfassen. In der folgenden Reperfusionphase betrug der Perfusionsdruck wiederum 80 mmHg (→ Abb.4). Die oben genannten Größen wurden alle 15 min für auswerfende und isovolumetrisch schlagende Herzen gemessen. Die Reperfusion dauerte insgesamt 60 min.

Perfusionsdruck: 80 mmHg		0 mmHg	80 mmHg
15 min	60 min	20 min	60 min
Kontrolle	(+ 430 nmol DADLE)	No Flow - Ischämie	Reperfusion

Abb. 4: Schema des Versuchsprotokolls. Je nach Versuchsgruppe wurde ein mit Mannitol versetztes Perfusionsmedium verwendet und/oder nach der Kontrollphase die Substanz DADLE verabreicht.

2.5 Datenerfassung

Variable, Laborwerte, histologische Untersuchungen und Registrierung

Der Aortenfluß, der Koronarfluß, der Perfusionsdruck, die arterio-venöse Sauerstoffdifferenz und der linksventrikuläre Druck wurden kontinuierlich gemessen. Aus dem Drucksignal wurde die Herzfrequenz, der systolische Spitzendruck (LVP_{max}), als Maß für den kontraktile Zustand die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) und als Maß für die frühe Relaxation dP/dt_{min} abgeleitet. Diese Variablen wurden kontinuierlich auf einem achtkanaligen

Tintenschreiber (Typ 481, Brush) aufgezeichnet. Während der interessierenden Phasen wurden diese Variablen mit einer Papiergeschwindigkeit von 100 mm/s geschrieben. Simultan wurden diese Variablen mit einem Computerprogramm (EASYDAT, (Britz, Sunderdiek, and Schipke 1992)) für die spätere Analyse auf Festplatte gespeichert. Zuvor waren die Variablen mit einer Frequenz von 300 Hz abgetastet und in einem Analog-Digital-Wandler (12 bit) digitalisiert worden.

Es wurden regelmäßig Blutgasanalysen durchgeführt und der pH, pO₂ und pCO₂ bei Bedarf korrigiert. Bei den Versuchsreihen 1 und 2 wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Protokolls Perfusat für die Bestimmung von Troponin T entnommen, um eventuelle irreversible Schäden zu entdecken.

2.6 Berechnungen und Statistik

Die hämodynamischen Daten wurden mit *Microsoft Excel 97*[®] weiterverarbeitet. Der Koronarwiderstand wurde aus dem koronararteriellen Druck und dem auf 1 g Feuchtgewicht normalisierten Koronarfluß ermittelt. Der myokardiale Sauerstoffverbrauch wurde nach dem Fick'schen Prinzip aus dem normalisierten Koronarfluß und der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz errechnet. Als Index für den externen Wirkungsgrad wurde das Verhältnis von Schlagarbeit zum myokardialen Sauerstoffverbrauch pro Schlag bestimmt. Die Schlagarbeit wurde aus dem linksventrikulären Spitzendruck und dem Schlagvolumen berechnet.

Die Daten werden in Form von Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Die statistische Analyse wurden *SYSTAT*[®] durchgeführt. Nichtischämische und postischämische Werte und, wenn angebracht, Werte nach Gabe einer Substanz wurden miteinander verglichen, wobei jede Gruppe von Herzen als eigene Kontrollgruppe fungierte. Eine Ein-Wege-Varianzanalyse wurde benutzt, um die Effekte der Interventionen auf funktio-

nelle und metabolische Variablen innerhalb der Gruppen zu vergleichen. Um den unterschiedlichen Einfluß einer einzelnen Intervention zu eliminieren, wurde eine Korrektur nach Bonferroni durchgeführt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Blutgasanalysen

Bei den Blutgasanalysen galt das Interesse vor allem dem pH-Wert und den Elektrolyten Kalium und Calcium. Während des gesamten Protokolls zeigten der pH-Wert und die Stoffmengenkonzentration von Kalium bei allen Versuchsgruppen einen weitgehend konstanten Verlauf (\rightarrow Tab. 2). Die Stoffmengenkonzentration von Calcium sank in der DADLE-Gruppe im Verlauf des Protokolls kontinuierlich, während diese Größe bei allen anderen Versuchsgruppen während des gesamten Versuches im wesentlichen unverändert blieb.

Tab. 2: Ergebnisse der Blutgasanalysen während der Versuche. Mittelwerte \pm SEM.

		Placebo	DADLE	Mannitol	Mannitol +DADLE
pH	Kontrolle	7,42 \pm 0,01	7,37 \pm 0,03	7,36 \pm 0,04	7,37 \pm 0,03
	60 min	7,41 \pm 0,03	7,36 \pm 0,02	7,35 \pm 0,04	7,36 \pm 0,03
	5 min Reperfusion	7,41 \pm 0,04	7,36 \pm 0,04	7,38 \pm 0,04	7,36 \pm 0,01
	15 min Reperfusion	7,43 \pm 0,04	7,36 \pm 0,02	7,37 \pm 0,06	7,37 \pm 0,01
	60 min Reperfusion	7,42 \pm 0,02	7,36 \pm 0,04	7,38 \pm 0,05	7,35 \pm 0,01
Kalium [mmol/l]	Kontrolle	4,67 \pm 0,13	4,81 \pm 0,15	4,90 \pm 0,08	4,92 \pm 0,20
	60 min	4,67 \pm 0,13	4,83 \pm 0,17	4,90 \pm 0,05	4,96 \pm 0,32
	5 min Reperfusion	4,70 \pm 0,10	4,90 \pm 0,20	4,93 \pm 0,06	4,80 \pm 0,14
	15 min Reperfusion	4,60 \pm 0,14	4,80 \pm 0,10	4,90 \pm 0,05	4,93 \pm 0,23
	60 min Reperfusion	4,60 \pm 0,14	4,75 \pm 0,12	4,90 \pm 0,06	4,73 \pm 0,25
Calcium [mmol/l]	Kontrolle	2,30 \pm 0,09	2,03 \pm 0,34	2,40 \pm 0,11	2,30 \pm 0,11
	60 min	2,29 \pm 0,04	1,93 \pm 0,33	2,40 \pm 0,11	2,28 \pm 0,08
	5 min Reperfusion	2,27 \pm 0,07	1,88 \pm 0,40	2,39 \pm 0,09	2,27 \pm 0,08
	15 min Reperfusion	2,31 \pm 0,04	1,76 \pm 0,05	2,37 \pm 0,08	2,27 \pm 0,08
	60 min Reperfusion.	2,29 \pm 0,05	1,73 \pm 0,25	2,38 \pm 0,09	2,26 \pm 0,09

3.2 Einfluß von DADLE und Mannitol auf die myokardiale Funktion vor der Ischämie

3.2.1 Systolische und diastolische, mechanische Funktion und Herzfrequenz

Innerhalb der 60 min vor der Ischämie war die ventrikuläre Funktion in allen Versuchsgruppen stabil, ohne daß signifikante Unterschiede zwischen den mit DADLE oder Mannitol vorbehandelten Herzen und den nicht vorbehandelten Herzen (Placebo-Gruppe) bestanden. Sowohl Herzfrequenz, AoF, LVP_{\max} , und dP/dt_{\max} waren in dieser Zeit durch DADLE und Mannitol nicht beeinflusst (\rightarrow Tab. 3). Bei allen Versuchen waren LVP_{\max} und dP/dt_{\max} an den isovolumetrisch schlagenden Herzen stets größer, als an auswerfenden Herzen (\rightarrow Tab. 3).

Tab. 3: Ergebnisse für die systolische Funktion zu Beginn des Versuches (Kontrolle) und nach 60 min, unmittelbar vor der Ischämie. Mittelwerte \pm SEM.

		Placebo	DADLE	Mannitol	Mannitol +DADLE
HF [Schläge/min]	Kontrolle	198 \pm 18	158 \pm 28	162 \pm 14	158 \pm 16
	60 min	193 \pm 7	164 \pm 34	164 \pm 34	152 \pm 12
AoF [ml/min]	Kontrolle	49 \pm 10	53 \pm 11	48 \pm 12	58 \pm 11
	60 min	49 \pm 12	55 \pm 11	72 \pm 6	57 \pm 11
LVP_{\max} [mmHg] Auswerfend	Kontrolle	82 \pm 7	87 \pm 8	93 \pm 6	100 \pm 7
	60 min	76 \pm 6	87 \pm 6	94 \pm 13	101 \pm 6
LVP_{\max} [mmHg] Isovolumetrisch	Kontrolle	139 \pm 22	141 \pm 12	151 \pm 16	152 \pm 19
	60 min	147 \pm 38	129 \pm 9	146 \pm 6	141 \pm 7
dP/dt_{\max} [mmHg/min] Auswerfend	Kontrolle	1431 \pm 212	1490 \pm 324	1568 \pm 232	1597 \pm 504
	60 min.	1178 \pm 211	1375 \pm 344	1567 \pm 134	1421 \pm 250
dP/dt_{\max} [mmHg/min] Isovolumetrisch	Kontrolle	1705 \pm 329	1592 \pm 350	1546 \pm 592	1586 \pm 661
	60 min	1766 \pm 998	1395 \pm 331	1609 \pm 150	1276 \pm 362

Auch die diastolische Funktion blieb über 60 min stabil und ließ keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen erkennen. LVP_{ed} und dP/dt_{min} blieben durch Mannitol oder DADLE unbeeinflusst und blieben, wie in der Placebo-Gruppe, über 60 min nahezu unverändert (\rightarrow Tab. 4). Wie bei der systolischen Funktion waren bei allen Versuchen LVP_{ed} und dP/dt_{ed} bei isovolumetrisch schlagenden Herzen größer als bei auswerfenden Herzen.

Tab. 4: Ergebnisse für die diastolische Funktion zu Beginn des Versuches (Kontrolle) und nach 60 min, unmittelbar vor der Ischämie. Mittelwerte \pm SEM.

		Placebo	DADLE	Mannitol	Mannitol +DADLE
LVP_{ed} [mmHg] Auswerfend	Kontrolle	2,0 \pm 3,4	0,5 \pm 0,3	2,5 \pm 2,8	1,4 \pm 1,8
	60 min	2,8 \pm 1,2	0,8 \pm 0,4	2,9 \pm 1,9	2,7 \pm 1,9
LVP_{ed} [mmHg] Isovolumetrisch	Kontrolle	10,8 \pm 4,7	7,8 \pm 1,77	10,7 \pm 3,8	9,6 \pm 2,9
	60 min	10,5 \pm 4,3	8,7 \pm 2,76	11,5 \pm 4,0	9,3 \pm 2,2
-dP/dt_{min} [mmHg/min] Auswerfend	Kontrolle	1241 \pm 293	1414 \pm 447	1306 \pm 190	1304 \pm 249
	60 min	1093 \pm 143	1586 \pm 562	1594 \pm 203	1346 \pm 205
-dP/dt_{min} [mmHg/min] Isovolumetrisch	Kontrolle	1468 \pm 303	1410 \pm 350	1493 \pm 530	1314 \pm 349
	60 min	1573 \pm 1007	1645 \pm 331	1552 \pm 308	1268 \pm 206

3.2.3 Sauerstoffverbrauch und Koronarfluß

In den Gruppen, bei denen Mannitol eingesetzt wurde, war der Koronarfluß von Anfang an höher als in den beiden anderen Gruppen. Der Unterschied zwischen der Mannitolgruppe und der Placebo-Gruppe war statistisch signifikant. Während der folgenden 60 min kam es bei allen Versuchsgruppen zu einem kontinuierlichen, leichten Rückgang des Koronarflusses (\rightarrow Tab. 5). Im Gegenzug nahm der koronare Widerstand und die AVDO₂ im selben Maße zu, so daß der auf das Herzgewicht bezogene Sauerstoffverbrauch innerhalb 60 min nahezu unverändert blieb (\rightarrow Tab. 5).

Tab. 5: Ergebnisse für den Koronarfluß und den Sauerstoffverbrauch zu Beginn des Versuches (Kontrolle) und nach 60 min, unmittelbar vor der Ischämie. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ vs. Placebo.

		Placebo	DADLE	Mannitol	Mannitol +DADLE
CF [ml/min/g]	Kontrolle	1,36 \pm 0,20	1,27 \pm 0,26	1,81 \pm 0,42 *	1,51 \pm 0,45
	60 min	1,16 \pm 0,25	1,04 \pm 0,27	1,41 \pm 0,31	1,14 \pm 0,26
CR [ml/min/mm Hg]	Kontrolle	8,61 \pm 1,28	9,89 \pm 1,8	6,7 \pm 1,52	9,99 \pm 2,26
	60 min	10,47 \pm 2,40	12,5 \pm 2,9	9,1 \pm 2,34	13,01 \pm 2,56
AVDO₂ [ml/dl]	Kontrolle	7,0 \pm 0,8	6,6 \pm 0,6	6,1 \pm 0,7	6,2 \pm 1,0
	60 min	8,2 \pm 0,6	7,8 \pm 0,5	8,1 \pm 0,9	7,8 \pm 1,2
MVO₂ [ml/min/g]	Kontrolle	0,10 \pm 0,02	0,08 \pm 0,02	0,09 \pm 0,01	0,11 \pm 0,03
	60 min	0,10 \pm 0,02	0,08 \pm 0,03	0,09 \pm 0,02	0,11 \pm 0,02

3.2.4 Externer Wirkungsgrad

Der Wirkungsgrad war während Kontrolle in den beiden DADLE-Gruppen höher als in den beiden anderen Gruppen (n.s.). Die Werte in den einzelnen Versuchen blieben jedoch innerhalb der 60 min vor der Ischämie auf einem konstanten Niveau, mit Ausnahme der Mannitol Gruppe, in welcher der Wirkungsgrad-Index nicht signifikant anstieg (→ Tab. 6).

Tab. 6: Ergebnisse für den Wirkungsgrad zu Beginn des Versuches und nach 60 min, unmittelbar vor der Ischämie. Mittelwerte \pm SEM.

		Placebo	DADLE	Mannitol	Mannitol +DADLE
WG	Kontrolle	5,97 \pm 1,60	7,90 \pm 2,41	6,17 \pm 1,45	10,28 \pm 1,21
[mmHg*ml SV / ml O ₂ /min/Schlag]	60 min	5,53 \pm 1,22	8,95 \pm 1,56	9,06 \pm 2,36	10,82 \pm 1,90

3.3 Einfluß von DADLE und Mannitol auf die myokardiale Funktion während der Ischämie

3.3.1 Ischämische Kontraktur

Während der Ischämie wurde in allen Herzen ein Verlust der systolischen Funktion und die Ausbildung einer Kontraktur beobachtet. Diese Kontraktur ließ sich über den diastolischen Druck quantifizieren, der in den ersten 5 min nach Ischämiebeginn schnell anstieg und nach ca. 10 min ein Plateau erreichte (→ Abb. 5). Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestanden Unterschiede in der Ausbildung der Kontraktur, wobei sich in der Placebo-Gruppe die Kontraktur stärker ausbildete als in den vorbehandelten Herzen. Bei den mit DADLE plus Mannitol perfundierten Herzen war die Kontraktur signifikant geringer, als in den anderen Versuchsgruppen (→ Abb. 5)

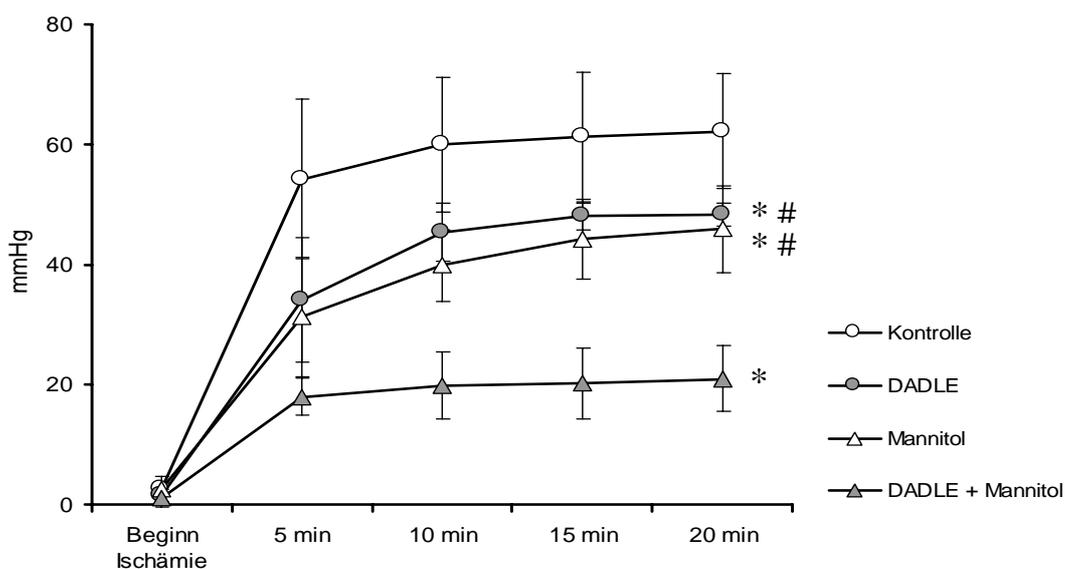


Abb. 5: Ausbildung der ischämischen Kontraktur während der Ischämie. Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. DADLE+Mannitol

3.4 Einfluß von DADLE und Mannitol auf die myokardiale Funktion in der Reperfusion

3.4.1 Systolische Funktion

Unmittelbar nach Beginn der Reperfusion kam es zu einer deutlichen Verschlechterung der systolischen Funktion, die sich während der Reperfusion zunehmend verbesserte und nach 60 min auf einem niedrigen Niveau stabilisierte (\rightarrow Abb. 6 u. Abb. 7). Hierbei war die Funktion aller vorbehandelten Herzen gegenüber der Placebo-Gruppe verbessert, was vor allem im Aortenfluß deutlich wird (\rightarrow Abb. 6). Beim LVP_{max} für die auswerfenden Herzen bestanden geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. An den isovolumetrisch kontrahierenden Herzen der DADLE+Mannitol-Gruppe war LVP_{max} bereits nach 30 min gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant verbessert. Nach 60 min erreichte der LVP_{max} in der DADLE+Mannitol-Gruppe wieder Ausgangswerte und war auch gegenüber der DADLE-Gruppe und der Mannitol-Gruppe signifikant erhöht (auswerfend und isovolumetrisch;

→ Abb. 7). Diese waren gegenüber Placebo nur geringfügig verbessert (→ Abb. 7).

Die Werte von dp/dt_{max} bestätigen die Verbesserung der systolischen Funktion bei den mit Mannitol und/oder DADLE vorbehandelten Herzen gegenüber den Herzen der Placebo-Gruppe, wobei hier die Werte der einzelnen vorbehandelten Versuchsgruppen nicht unterschiedlich waren. Auffällig ist, daß es in der Placebo-Gruppe während der Reperfusion unabhängig von der Kontraktionsform zu einer tendentiellen Abnahme und bei den anderen Versuchsgruppen zu einer Zunahme von dp/dt_{max} kam (→ Abb. 7).

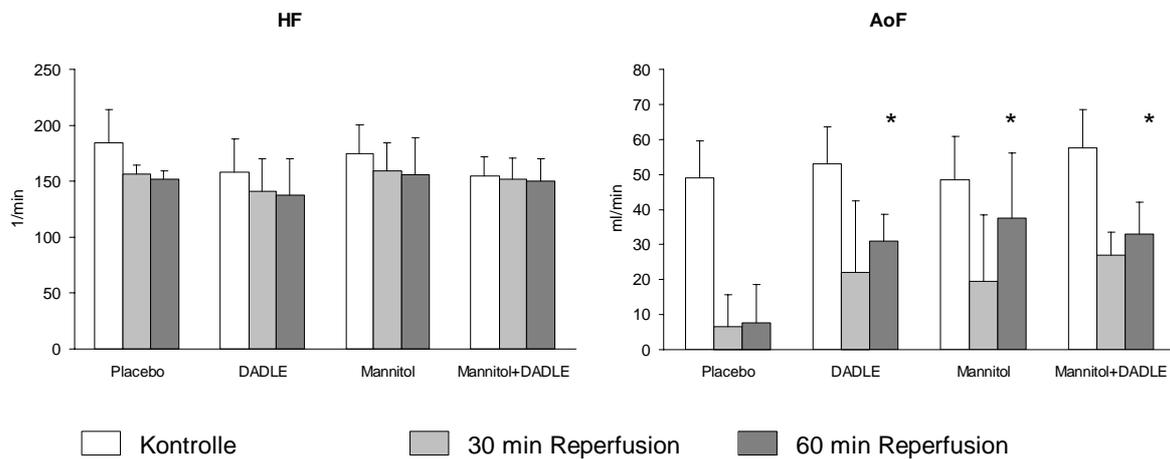


Abb. 6: Ergebnisse für die systolische Funktion zu Beginn des Versuches (Kontrolle) und in der Reperfusion. Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Placebo

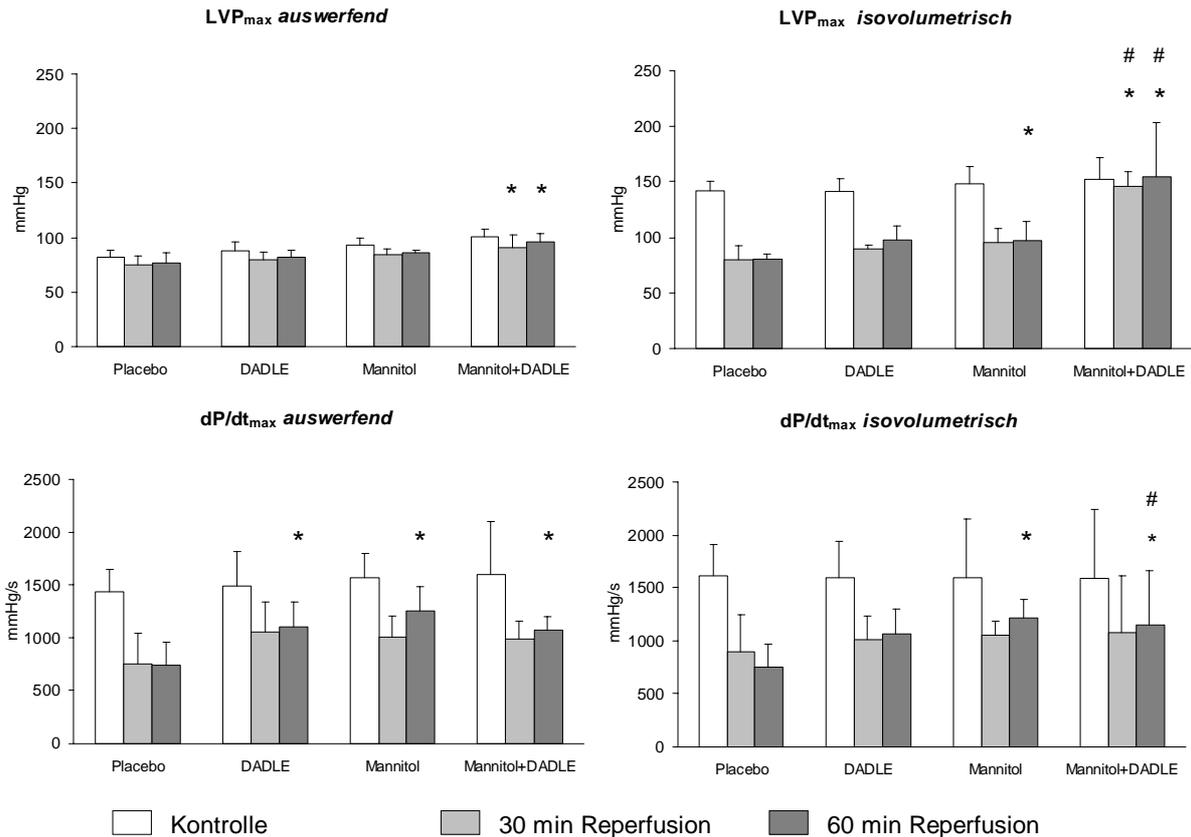


Abb. 7: Ergebnisse für die systolische Funktion zu Beginn des Versuches (Kontrolle) und in der Reperfusion. Mittelwerte \pm SEM; * p <0,05 vs. Placebo, # p <0,05 vs. DADLE

3.4.2 Diastolische Funktion

Zu Beginn der Reperfusion war bei der Placebo-Gruppe die diastolische Funktion stark beeinträchtigt, die sich durch eine reduzierte Relaxationsgeschwindigkeit (dP/dt_{min} = Maß für die frühe Relaxation) und einen hohen linksventrikulären Druck in der späten Diastole (LVP_{ed}) bemerkbar machte, was sowohl die auswerfenden als auch die isovolumetrischen Größen betraf. Im Laufe der 60 min Reperfusion konnten sich die diastolischen Größen nur geringfügig verbessern und so war dP/dt_{min} nach 30 min noch stark reduziert und änderte sich von da an bis zum Versuchsende kaum, und LVP_{ed} blieb nach 30 min und nach 60 min auf einem hohen Niveau (\rightarrow Abb. 8). Unabhängig von der Kontraktionsform blieb LVP_{ed} bei der Placebo-

Gruppe gegenüber der Kontrolle erhöht, während dieser Druck bei den anderen Gruppen die Tendenz hatte, den Kontrollwert zu erreichen. DP/dt_{\min} war hierbei ebenfalls gegenüber der Placebo-Gruppe verändert. Bei der DADLE-Gruppe konnte dP/dt_{\min} den Ausgangswert vor der Ischämie schon nach 30 min Reperfusion wieder fast erreichen. Auch die mit Mannitol behandelten und die mit DADLE plus Mannitol behandelten Herzen waren in der diastolischen Funktion gegenüber den Herzen der Placebo-Gruppe deutlich verbessert. LVP_{ed} und dP/dt_{\min} zeigen in der Reperfusion eine annähernd gute diastolische Funktion, wie bei den Versuchen der DADLE-Gruppe (→ Abb. 8).

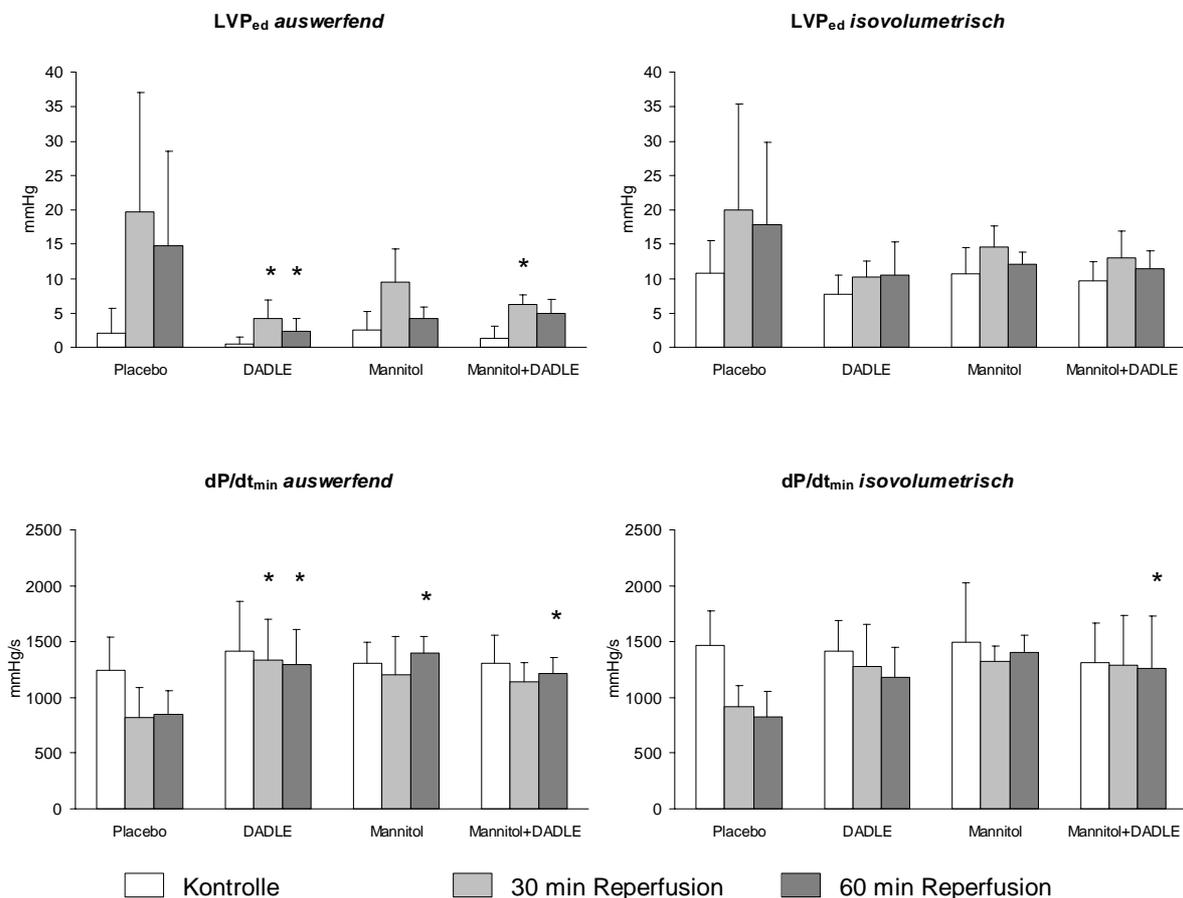


Abb. 8: Ergebnisse für die diastolische Funktion zu Beginn des Versuches (Kontrolle) und in der Reperfusion. Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Placebo

3.4.3 Koronarfluß und Sauerstoffverbrauch

Zu Beginn der Reperfusion war der Koronarfluß zunächst stark erhöht, was sich darauf zurückführen läßt, daß die Koronargefäße reaktiv auf die Ischämie weitgehend dilatiert waren. Diese reaktive Hyperämie (Buckberg et al. 1972; Wilcken and Eikens 1974) war in allen Gruppen zu beobachten: Nach 5 min betrug der Koronarfluß in der Placebo-Gruppe $1,941 \pm 0,9$ ml/min/g, in der DADLE-Gruppe $1,78 \pm 0,78$ ml/min/g, bei der Mannitolgruppe $2,85 \pm 1,68$ ml/min/g und in der Mannitol+DADLE-Gruppe $1,69 \pm 0,67$ ml/min/g. Der Koronarfluß stabilisierte sich innerhalb der ersten 10 min in der Reperfusion auf einem etwas niedrigeren Niveau als der präischämische Kontrollwert. Danach kam es bei allen Versuchsgruppen während der gesamten Reperfusion zu einer zunehmenden Verringerung des Koronarflusses (\rightarrow Abb. 9). Nach 60 min war der Koronarfluß durchschnittlich um ein Drittel gesunken. Während der gesamten Reperfusion war der Koronarfluß in der Mannitol-Gruppe größer als bei den anderen Gruppen, was nach 60 min Reperfusion auch statistisch signifikant wurde (\rightarrow Abb. 9). In dieser Gruppe war der Koronarfluß jedoch schon vor der Ischämie signifikant erhöht, so daß der relative Abfall in der späteren Reperfusion gegenüber den anderen Versuchsgruppen nicht unterschiedlich war.

Der Sauerstoffverbrauch war im Gegensatz zum Koronarfluß, der unmittelbar nach der Ischämie einen maximalen Werte erreichte, zu Beginn der Reperfusion etwas niedriger als vor der Ischämie und änderte sich in den folgenden 60 min nur noch wenig. Tendenziell stieg der Sauerstoffverbrauch bei den vorbehandelten Herzen im Laufe der Reperfusion geringgradig an und fiel in der Placebo-Gruppe ein wenig ab.

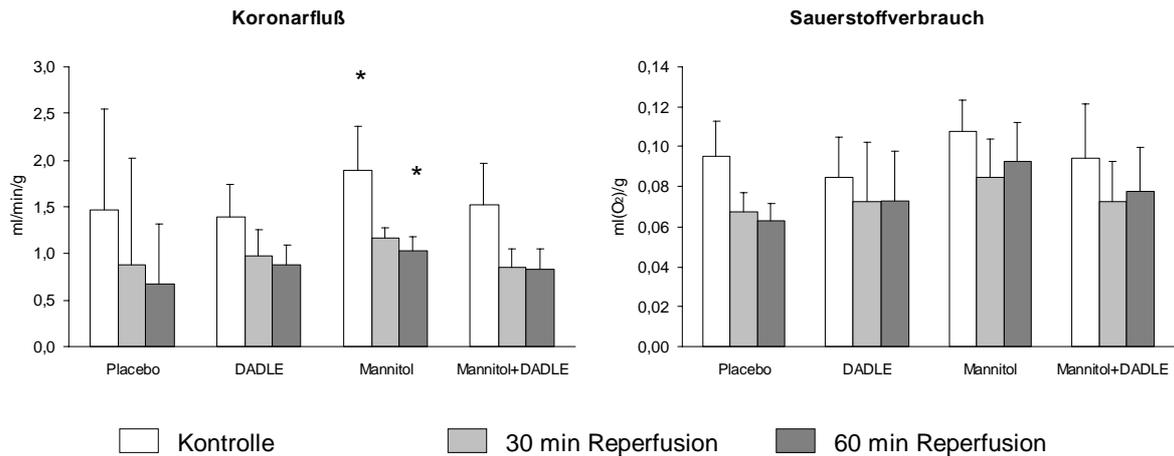


Abb. 9: Ergebnisse für den Sauerstoffverbrauch und den Koronarfluß zu Beginn des Versuches (Kontrolle) und in der Reperfusion. Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Placebo

3.4.4 Externer Wirkungsgrad

In der Placebo-Gruppe war der Wirkungsgrad nach der Ischämie deutlich schlechter als unter Ausgangsbedingungen. Selbst nach 60 min konnte keine wesentliche Verbesserung beobachtet werden. Im Unterschied dazu war der Wirkungsgrad bei der DADLE-Gruppe und bei der Mannitol-Gruppe nach 30 min Reperfusion deutlich größer als bei der Placebo-Gruppe, und in den weiteren 30 min konnte eine zusätzliche Verbesserung erreicht werden, die zum Zeitpunkt von 60 min nach Beginn der Reperfusion signifikant gegenüber der Placebo-Gruppe war (\rightarrow Abb. 10). Bei der DADLE+Mannitol-Gruppe war die Verbesserung des Wirkungsgrades nach 30 min und nach 60 min Reperfusion noch deutlicher, als bei den Versuchen in denen nur DADLE oder Mannitol verwendet wurden.

Da die präischämischen Kontrollen in den Versuchsgruppen bereits recht unterschiedlich waren, wurden in einem weiteren Schritt (siehe Abb. 10) alle Ausgangswerte auf 100 % gesetzt. Dabei ist, wie bei den absoluten Werten des Wirkungsgrades ebenfalls eine Verbesserung in der Reperfusion bei den vorbehandelten Herzen zu sehen. Im Unterschied zu

den absoluten Werten ist jedoch der Wirkungsgrad der DADLE+Mannitol-Gruppe gegenüber der DADLE- oder Mannitol-Gruppe nicht verbessert.

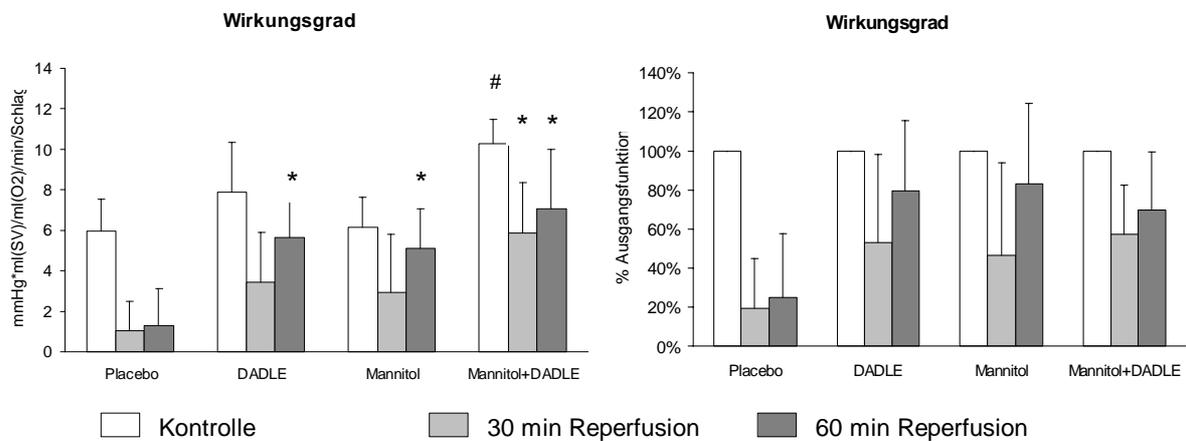


Abb. 10: Absolute (links) und relative (rechts) Ergebnisse für den Wirkungsgrad zu Beginn des Versuches (Kontrolle) und in der Reperfusion Mittelwerte \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. Placebo, # $p < 0,05$ vs. DADLE

3.5 Troponin T

Troponin T (TnT) gilt, ähnlich wie die Creatinkinase, als Marker für eine Gewebeschädigung des Myokards. Die TnT-Bestimmungen wurden nur für die Placebo- und die DADLE-Gruppe für folgende Zeitpunkte durchgeführt: Beginn des Versuches (Kontrolle), unmittelbar vor der

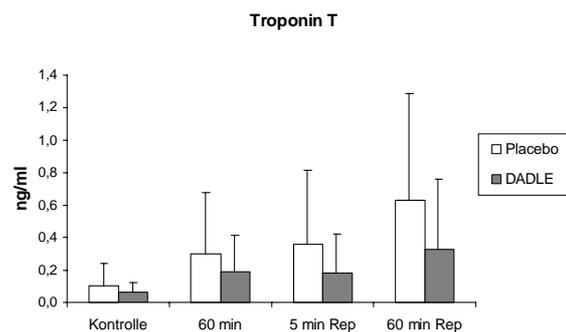


Abb. 11: Ergebnisse für das gemessene Troponin T; Mittelwerte \pm SD; Referenzbereich beim Menschen: $< 0,1$ ng/ml lt. Labor der Universitätsklinik Düsseldorf

Iσχämie (60 min) und in der frühen (5 min Rep) und späten (60 min Rep) Reperfusion. Die TnT-Konzentration stieg bei beiden Versuchsgruppen schon vor der Ischämie an, was bei der Placebo-Gruppe etwas ausgeprägter war (\rightarrow Abb. 11). In der Reperfusion kam es bei der Placebo-Gruppe zu einem weiteren TnT-Anstieg während es bei der DADLE-Gruppe keine nennenswerte Zunahme gab. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichung in beiden

Versuchsgruppen und aufgrund der Tatsache, daß nur in jeweils 4 Versuchen je Gruppe die TnT-Konzentration gemessen wurde, wurde von einer statistischen Auswertung abgesehen.

3.6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

In allen Versuchsgruppen gab es in der Zeit vor der Ischämie keine nennenswerten Veränderungen der hämodynamischen Variablen. In dieser Zeit ging lediglich der Koronarfluß leicht zurück, während der myokardiale Sauerstoffverbrauch gleich blieb.

Die ischämische Kontraktur bildete sich in den verschiedenen Gruppen unterschiedlich stark aus; sie war in der Placebo-Gruppe am stärksten. Die nur mit DADLE oder Mannitol behandelten Herzen zeigten eine signifikant geringere Kontrakturausbildung als die Herzen der Placebo-Gruppe. Eine weitere Reduktion der Kontraktur konnte durch den kombinierten Einsatz von DADLE und Mannitol erreicht werden, wobei diese Ergebnisse sogar eine signifikante Verringerung gegenüber den mit DADLE oder Mannitol einzeln behandelten Herzen zeigte.

Während der Reperfusion war die Ventrikelfunktion bei allen Versuchsgruppen eingeschränkt, was bei der Placebo-Gruppe signifikant stärker als bei den anderen Versuchsgruppen war, die untereinander nur teilweise statistisch signifikante Unterschiede zeigten. Die Herzen der Mannitol+DADLE-Gruppe hatten die beste postischämische Funktion. Diese Funktionsverbesserung gegenüber der Kontrolle betraf sowohl systolische als auch diastolische Größen. Der Aortenfluß war bei allen vorbehandelten Versuchsgruppen in der Reperfusion besser, als bei den Kontrollherzen. Da die Herzfrequenz annähernd gleich geblieben ist, ist diese Zunahme vor allem auf ein erhöhtes Schlagvolumen bei den vorbehandelten Herzen zurückzuführen.. CF und MVO_2 änderten sich postischämisch bei allen Versuchsgruppen im gleichen Ausmaß: Zu Beginn der Reperfusion kam es zu einer maximalen

Durchblutung des Myokards, die sich durch einen hohen Koronarfluß ausdrückte. Diese reaktive Hyperämie war nach 10 min rückläufig, und es stellte sich ein Koronarfluß ein, der unter dem präischämischen Niveau lag. Der MVO_2 zeigte postischämisch etwas niedrigere Werte als präischämisch. Wie beim Koronarfluß ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

Der kardiale Wirkungsgrad bestätigte die hämodynamischen Ergebnisse in der Reperfusion: Postischämisch war der Wirkungsgrad bei den Versuchsgruppen, bei denen Mannitol und/oder DADLE eingesetzt wurde signifikant höher als bei den Herzen der Placebo-Gruppe.

4 Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

4.1.1 Das Langendorff-Modell

Für das arbeitende, isolierte Herz an einer modifizierten Langendorff-Anlage können im Vergleich zu in situ Modellen störende neurohumorale Einflüsse oder Interaktionen mit den übrigen Organen und dem peripheren Kreislauf nahezu ausgeschlossen werden. Damit lassen sich unmittelbare kardiale Einflüsse von Wirkstoffen eindeutiger analysieren, wie z.B. in unserer Studie DADLE oder Mannitol. Andererseits können die gewonnenen Daten nur eingeschränkt auf die in vivo Situation übertragen werden, und es müssen durch das fehlende Perikard und durch das Aufhängen des Präparates Veränderungen der Ventrikelgeometrie in Kauf genommen werden.

Im systemischen Kreislauf des verwendeten experimentellen Modells konnte der linksventrikuläre Spitzendruck bei auswerfenden Herzaktionen einen Betrag von 80 mmHg nicht überschreiten, da die „Nachlast“ aus einer definierten Wassersäule und einem Überlauf besteht. Veränderungen der Ventrikelfunktion wurden daher durch die isovolumetrischen Parameter [LVP_{\max} , LVP_{ed} , dP/dt_{\max} , dP/dt_{\min}] repräsentiert.

4.1.2 Perfusat

Das verwendete Perfusat sollte durch seine Zusammensetzung möglichst physiologische Bedingungen erfüllen. Die Perfusion mit einer Erythrozyten-Suspension bietet gegenüber einer Perfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung ohne weitere Zusätze mehrere Vorteile: Zum einen kommt es nicht zu einem interstitiellen Ödem, wie es bei der Perfusion ohne Erythrozyten und ohne Albumin oft der Fall ist. Zum anderen ist das Sauerstoffangebot an das Herz und damit auch die kontraktile Funktion erheblich verbessert. Ein Nachteil der Erythrozyten-Suspension

ist die Gefahr einer Hämolyse, die vor allem bei der Perfusat-Aufbereitung entstehen kann. Als Indikator für eine Hämolyse-Entwicklung konnte die Kaliumkonzentration benutzt werden, die mit den Blutgasanalysen vor und während der Versuche erfaßt wurde. Die konstante Kaliumkonzentration von $4,8 \pm 0,1$ mmol/l zeigte bei jeder Versuchsgruppe, daß es während der Versuche zu keiner nennenswerten Hämolyse kam. Dieser Befund war unabhängig davon, ob das Perfusat Mannitol enthielt, oder nicht. Der membranstabilisierende Effekt von Mannitol auf die Erythrozyten (Gronow, Prechtel, and Klause 1989), wirkt sich also nicht nennenswert auf das mit Mannitol versetzte Perfusat aus. Das lag zum einen daran, daß das Perfusat auch ohne Mannitol kaum hämolytisch wurde und zum anderen, daß der membranstabilisierende Effekt erst bei einer Konzentration von über 60 mM greift (Gronow, Prechtel, and Klause 1989), also bei Werten, die deutlich über der von uns verwendeten Konzentration (8,6 mM) lag.

4.2 Einfluß von DADLE und Mannitol auf das nichtischämische Myokard

Es war das Ziel der 60 min Perfusion vor Einsatz der Ischämie, den gegebenen Substanzen eine gewisse Einwirkzeit zu geben, und ihre Wirkung auf das normoxische Herz zu erfassen, um die einzelnen Versuchsgruppen während der Ischämie und Reperfusion sinnvoll vergleichen zu können.

Unsere Ergebnisse zeigen keine nennenswerten, hämodynamisch wirksamen Effekte von DADLE auf das nichtischämische, isolierte Myokard. In der Literatur wird immer wieder beschrieben, daß vergleichbare Konzentrationen von DADLE im Säugetierorganismus einen dem Winterschlaf ähnlichen Zustand herbeiführen, der mit dem Zustand nach einer Applikation des *hibernation induction trigger* (HIT = aus dem Serum winterschlafender Tiere gewonnene Substanz) die DADLE sehr ähnlich ist - vergleichbar ist. Hierbei kommt es u.a. zu einer

Abnahme der Herzfrequenz, zu einer Atemdepression und zur Hypothermie (Bolling et al. 1997). Die zentrale (cerebrale) Applikation von DADLE führt beim wachen Hund zu einer Bradykardie, zur Hypoventilation mit erniedrigtem globalen Sauerstoffverbrauch und zu einem erniedrigten Schlagvolumen bei unverändertem Blutdruck (Rosen, Cote, and Haddad G.G. 1989). Demgegenüber hat DADLE am isolierten Herz keinen meßbaren Einfluß auf die Herzfrequenz, den linksventrikulären Druck oder Sauerstoffverbrauch, wie es viele Arbeiten u.a. auch am isolierten Kaninchenherz zeigten (Bolling et al. 1997; Kevelaitis et al. 1999). Die „Winterschlaf-induzierenden“ Effekte von DADLE (z.B. Bradykardie) werden also vermutlich über das zentrale Nervensystem und nicht über eine direkte Stimulation der myokardialen δ -Opioid-Rezeptoren vermittelt. Derartige Rezeptoren waren von uns in einer vorläufigen Studie mittels rtPCR nachgewiesen worden (Birkenkamp-Demtroeder and Schipke 1999). Übereinstimmend mit den Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Bolling et al. 1997; Kevelaitis et al. 1999; Rosen, Cote, and Haddad G.G. 1989) zeigen unsere Ergebnisse, daß DADLE in den verwendeten Konzentrationen keinen meßbaren Einfluß auf die Inotropie, die Chronotropie, den Sauerstoffverbrauch oder den Koronargefäßtonus am normoxischen, isoliert perfundierten Kaninchenherz hat. Die myokardialen δ -Opioid-Rezeptoren scheinen also erst während oder nach einer Ischämie eine Rolle zu spielen und zwar im Sinne einer Kardioprotektion. So wurde gezeigt, daß durch die Stimulation mit dem δ_1 -Opioid-Agonisten TAN-67 Infarktareale am Rattenherz verkleinert werden (Schultz et al. 1998). Andererseits ließ sich die Haltbarkeit von Herztransplantaten durch Zusatz von DADLE erheblich verlängern (Bolling et al. 1997).

In allen Versuchsgruppen beobachteten wir eine Abnahme des Koronarflusses bei steigender AVDO₂ und konstantem Sauerstoffverbrauch. Dieses Phänomen hatten wir bereits bei anderen eigenen Arbeiten mit isolierter Perfusion von Kaninchenherzen an der Langendorff-Anlage

gesehen. Dies deutet darauf hin, daß dieser Effekt auf methodische Aspekte zurückzuführen ist.

Die arrhythmogenen Effekte von Opioiden werden offenbar nicht über δ -Opioid-Rezeptoren vermittelt und deshalb auch nicht von DADLE hervorgerufen (Wong, Lee, and Tai 1990). Unsere Ergebnisse bestätigen diese Befunde: Nach Gabe von DADLE kam es weder zu vermehrten Extrasystolen noch zu anderen Rhythmusstörungen

Auch der Einfluß von Mannitol auf das nichtischämische Myokard wurde über die Dauer von 60 min untersucht: Die Versuchsgruppen, in denen Mannitol eingesetzt wurde (Mannitolgruppe und Mannitol+DADLE-Gruppe), waren präischämisch stabil und wiesen, abgesehen von einer initial etwas erhöhten Koronardurchblutung keine großen Unterschiede zu den anderen Versuchsgruppen (Placebo-Gruppe und DADLE-Gruppe) auf. Von Mannitol ist eine gewisse, vasodilatierende Eigenschaft bekannt (Dunphy et al. 1999), allerdings macht sich dieser Effekt häufig erst postischämisch bemerkbar (Magovern et al. 1984). Andere hämodynamisch wirksame Effekte sind in der Literatur nicht beschrieben, was mit unseren Ergebnissen im Einklang steht.

In der Placebo-Gruppe gab es vor der Ischämie keinen Unterschied zu den Werten der anderen drei Versuchsgruppen. Die hämodynamischen und metabolischen Größen blieben 60 min lang stabil.

Die Ergebnisse während der ersten 60 min vor der Ischämie stimmen also weitgehend mit den Ergebnissen anderer Arbeiten überein und zeigen, daß in jeder Versuchsgruppe während dieser Zeit gleiche, stabile Ausgangsbedingungen vorlagen, so daß die vier Versuchsgruppen während der anschließend folgenden Ischämie und Reperfusion sinnvoll miteinander verglichen werden konnten.

4.3 Ischämische Kontraktur

Die Ausbildung einer Kontraktur unter ischämischen Bedingungen ist lange bekannt: Es handelt sich dabei um eine Erhöhung der Steifigkeit des Myokards und eine damit verbundene Zunahme des linksventrikulären Druckes im Laufe einer globalen Ischämie. Diese Kontraktur setzt ca. 5 min nach Beginn der Ischämie ein und erreicht nach etwa 15 min ein Plateau (MacGregor et al. 1975). Klinisch erscheint die ischämische Kontraktur z.B. bei Bypass-Operationen als sog. ‚stone-heart‘ (Katz and Tada 1972): Hierbei erhöht sich die Steifigkeit des Myokard im Laufe der Kardioplegie teilweise so stark, daß eine Reperfusion im Anschluß an die Kardioplegie erschwert ist, weil das koronare Gefäßsystem durch die Kontraktur verschlossen wird (Cooley, Reul, Jr., and Wukasch 1975). Außerdem spielt die Ischämische Kontraktur bei der Entstehung einer diastolische Dysfunktion frisch transplanteder Herzen eine Rolle (Kevelaitis, Mouas, and Menasche 1996). Am isolierten Rattenherz war der zeitliche Einsatz der ischämischen Kontraktur eng mit der Abnahme des intrazellulären ATP-Gehaltes verbunden (Hearse, Garlick, and Humphrey 1977). Für die Ausbildung der Kontraktur wird ein Mangel an intrazellulären ATP verantwortlich gemacht, der sich nach Ischämiebeginn einstellt und der ähnlich wie beim rigor mortis die Aktin-Myosin-Hydrolyse verhindert (MacGregor et al. 1975). Durch Erhöhung des ATP-Angebots (z.B. durch Glukoseinfusion) oder Erniedrigung des ATP-Bedarfs (z.B. durch Kardioplegie mit Kalium oder Hypothermie) konnte eine Verzögerung der Kontraktur erreicht werden (Hearse, Garlick, and Humphrey 1977). Jüngere Arbeiten konnten diesen Zusammenhang mit Hilfe von Kernresonanz-Untersuchungen (Kupriyanov et al. 1988) bestätigen. Zusätzlich ließ sich durch Aufrechterhaltung bestimmter ATP-Konzentrationen und entsprechende Berechnungen eine Schwelle für den intrazellulären ATP-Gehalt bestimmen, bei dem die ischämische Kontraktur einsetzt (Owen, Dennis, and Opie 1990). Dieser Schwellenwert ist identisch mit dem intrazellulären

ATP-Gehalt, der bei Säugetieren der anaeroben Glykolyse während Ischämie vorliegt (nach Verbrauch der Glykogenreserven); in der Folge kommt es zu keinem weiteren Abfall des intrazellulären pH-Wertes (Kingsley et al. 1991).

Desweiteren wird auch eine Beteiligung von Kalzium am Phänomen der ischämischen Kontraktur diskutiert. Denn der zeitliche Einsatz der Kontraktur ist nicht nur ATP-abhängig, sondern die Amplitude der Kontraktur kann auch durch eine Senkung des intrazellulären Kalziums (z.B. durch Kalziumantagonisten) erheblich verringert werden (Hearse, Garlick, and Humphrey 1977). Der Anstieg des intrazellulären Kalziums während einer Ischämie ist ebenfalls abhängig vom ATP-Gehalt in der Zelle: Während einer Ischämie kommt es zunächst zu einem Kalziumausstrom aus der Zelle und wenige Minuten später zu einem massiven Wiedereinstrom, der genau dann eintritt, wenn der zelluläre ATP-Gehalt der Zelle erschöpft ist, und es zur Kontraktur kommt (Schumacher et al. 1998). Für die Entstehung der Kontraktur wird also der ATP-Mangel verantwortlich gemacht, während die - auch durch ATP-Mangel entstehende Kalzium-Überladung in den Zellen eine verstärkende Funktion auf die Kontraktur hat und teilweise zu einem weiteren ATP-Verbrauch führen kann. Der ATP-Abfall und der Kalzium-Anstieg während der Ischämie sind also eng miteinander verbunden und sind beide für die ischämische Kontraktur bedeutsam.

In der vorliegenden Studie konnte die Ausbildung der ischämischen Kontraktur mit DADLE oder mit Mannitol signifikant eingeschränkt werden. Einzeln angewendet verringern beide Substanzen die ischämische Kontraktur nahezu vergleichbar. Durch die Kombination von Mannitol und DADLE ließ sich eine weitere Einschränkung der Kontrakturausbildung erreichen. Da DADLE und Mannitol die Kontrakturbildung gegenüber Placebo zeitlich nicht verzögerten, kann man davon ausgehen, daß die intrazellulären ATP-Konzentrationen während der Ischämie in allen Versuchsgruppen nicht unterschiedlich schnell abfallen. Die

unterschiedliche Stärke der Kontrakturamplituden bei den einzelnen Versuchsgruppen läßt vermuten, daß Mannitol und DADLE die Kontrakturbildung über eine Erniedrigung des intrazellulären Kalziums beeinflussen.

Der additive Effekt von Mannitol und DADLE auf die Verringerung der Kontraktur läßt vermuten, daß die Substanzen über unterschiedliche oder verschieden starke Mechanismen wirken, die letztlich zu einer Verminderung des intrazellulären Kalziums oder zu einer Verbesserung des Gleichgewichts von ATP-Angebot und ATP-Bedarf in der Myokardzelle führen.

Der Mechanismus von DADLE könnte dabei auf einer Öffnung des ATP-sensitiven Kalium-Kanals beruhen (Schultz et al. 1998), der einerseits zu einem Kaliumausstrom aus der Zelle und damit über eine beschleunigte Repolarisation (Gross and Auchampach 1992) und andererseits über eine Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Abnahme des intrazellulären Kalzium führen könnte (Wang and Ashraf 1999). Mannitol könnte andererseits durch eine Bindung von Hydroxyl-Radikalen eine Schädigung von Proteinen verhindern, die für einen verbesserten intrazellulären ATP-Haushalt führen oder für den Kalziumtransport der Zelle wichtig sind. Über freie Radikale wird beispielsweise berichtet, daß sie bestimmte myofibrilläre ATPasen schädigen (Robert, Ayoub, and Berson 1991), die Glykolyse hemmen (Bello-Klein et al. 1997) oder Enzyme (z.B. ADP-Ribose) im Zellkern aktivieren können, die zu einem vermehrten ATP-Verbrauch führen (Schraufstatter et al. 1986). Außerdem ließ sich eine Kontraktur durch Perfusion mit freien Radikalen (H_2O_2) auslösen (Bello-Klein et al. 1997). Die Wiederaufnahme von Kalzium in das Sarkoplasmatische Retikulum wird durch die freien Radikale (Oxid- und Hydroxyl-Radikale) gehemmt, indem Transportenzyme, wie z.B. die Ca-ATP-ase, geschädigt werden, so daß es zu einer Kalziumüberladung im Sarkoplasma kommt (Matsubara and Dhalla 1996) (Okabe 1998)). Dieser Effekt konnte auch durch Mannitol

verhindert werden (Morris and Sulakhe 1997). Ein solcher postulierter Wirkmechanismus setzt jedoch voraus, daß es schon während der Ischämie und nicht erst während der Reperfusion zur Bildung freier Radikale kommt. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die Herzen schon vor der Ischämie eine Stunde lang mit Mannitol perfundiert wurden und in dieser Zeit eine Radikalbildung verhindert werden konnte. Andererseits könnte Mannitol nicht über die Bindung freier Radikale wirken, sondern über seine osmotischen Eigenschaften interstitielle Ödeme verhindern, die eine Kontraktur verstärken könnten. Dem würde allerdings widersprechen, daß die verwendeten Mannitol-Konzentrationen zu niedrig waren, um osmotisch wirksam zu sein. Dafür sprechen auch die am Versuchsende gemessenen Herzgewichte zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden (Mannitol-behandelte Herzen: $6,3 \pm 1,4$ g vs. Herzen ohne Mannitol: $6,8 \pm 1,2$ g).

Insbesondere zeigen die Ergebnisse, daß beide Substanzen bereits während der Ischämie wirksam sind und offenbar den Kalzium- und ATP-Haushalt in der Zelle günstig beeinflussen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß eine Verbesserung der postischämischen Dysfunktion durch DADLE und Mannitol in der Reperfusion eine Folge einer intraischämischen Protektion sein könnte und nicht nur auf eine Verminderung von Schäden zurückzuführen ist, die erst in der Reperfusion entstehen. Diese Aussage steht in einem gewissen Kontrast zu der traditionellen Interpretation des myokardialen Stunning, nach der die – vor allem durch freie Radikale verursachten - Schäden ganz überwiegend erst während der Reperfusion entstehen (Bolli et al. 1989). Jedoch ist ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Ausmaß einer Kontrakturbildung und der nachfolgenden kontraktilen Funktion nur bedingt zu treffen: Zwar korreliert das Ausmaß der Kontraktur bei vielen Arbeiten mit der postischämischen Funktion, dennoch zeigen Arbeiten, die eine Kardioprotektion mittels Ischämischer Präkonditionierung

durchgeführt haben, auch einen umgekehrten Zusammenhang (Kolocassides, Galinanes, and Hearse 1996): Es kommt zur starken und frühen Kontrakturausbildung, während die kontraktile Funktion gegenüber einer Kontrollgruppe mit geringerer Kontrakturbildung nicht verschlechtert war. Als Ursache dafür wurde ein Glykogenverbrauch während der kurzen präkonditionierenden Ischämiephasen angenommen, wodurch es zu einem schnelleren ATP-Verbrauch in der langen Ischämiephase und deshalb zur schnelleren Kontrakturausbildung kam. Sollten die in der vorliegenden Studie verwendeten Substanzen die Kontraktur über eine Senkung des intrazellulären Kalziums verringert haben, dann ist die Ausgangssituation vor Beginn der Reperfusion bei den Herzen die eine geringere Kontraktur zeigen - und deshalb eine geringere intrazelluläre Kalziumkonzentration aufweisen - sicherlich besser, da für das Myokardiale Stunning auch eine Kalzium-Überladung in der frühen Reperfusion verantwortlich gemacht wird (Carrozza et al. 1992; Kusuoka et al. 1987; Kusuoka and Marban 1992; Marban et al. 1990). Für diesen Fall könnte man von einer Protektion schon während der Ischämie sprechen. Die Tatsache, daß DADLE oder andere δ -Opioide nur dann kardioprotektiv wirksam sind, wenn sie vor der Ischämie gegeben werden und nicht erst zu Beginn der Reperfusion, bestätigt dies (Kevelaitis et al. 1999).

4.4 Einfluß von DADLE und Mannitol während der Reperfusion

4.4.1 Kontraktile Funktion

Es sollte vor allem untersucht werden, ob DADLE einen günstigen Einfluß auf die postischämische, kontraktile Funktion hat, und ob es durch eine Bindung der freien Radikale mittels Mannitol zu einer weiter gesteigerten Kardioprotektion kommt. Dies würde Hinweise darauf geben, inwiefern sich die Wirkungsweisen der beiden Substanzen ergänzen, und würde dazu beitragen, die Mechanismen des myokardialen Stunnings besser zu verstehen.

Die postischämische Dysfunktion machte sich in den vier Versuchsserien vor allem dadurch bemerkbar, daß in Übereinstimmung mit der Literatur (Bolli and Marban 1999) zu Beginn der Reperfusion die systolische und die diastolische Funktion massiv eingeschränkt war. Sowohl bei der auswerfenden als auch bei der isovolumetrischen Kontraktion waren der linksventrikuläre Spitzendruck, die Druckanstiegsgeschwindigkeit und das Schlagvolumen vermindert. Der enddiastolische Druck war erhöht während die Herzfrequenz nahezu unbeeinflusst blieb. Dieses myokardiale Stunning ist zwar reversibel, hält aber bei unbehandelten Herzen in der Regel über Stunden und Tage an (Bolli and Marban 1999).

Dieses Phänomen war insbesondere bei der Placebo-Gruppe zu beobachten. Im Gegensatz dazu war die Erholung bei der DADLE- und der Mannitolgruppe in vielen systolischen und diastolischen Meßgrößen signifikant verbessert, woraus man schließen kann, daß die verwendeten Substanz kardioprotektiv wirken. Am deutlichsten läßt sich diese Aussage über den Aortenfluß festmachen, der in beiden Versuchsgruppen gegenüber der Placebo-Gruppe nach 60 min Reperfusion mehr als das Dreifache betrug. Auch dp/dt_{max} , als Maß für den kontraktilen Zustand war bei den behandelten Herzen gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant verbessert, während der linksventrikuläre Spitzendruck nur in der kombinierten Mannitol+DADLE-Gruppe gegenüber Placebo signifikant verbessert war. Herzen, die mit DADLE oder Mannitol einzeln behandelt wurden, entwickelten also in der Reperfusion nicht unbedingt einen höheren linksventrikulären Spitzendruck, sondern erreichten diesen Druck schneller (dp/dt_{max}). Die Zunahme des Aortenflusses der DADLE- und Mannitolgruppen ist ein wichtiges Ergebnis, denn die Perfusion des Körperkreislaufes ist nicht nur vom Blutdruck sondern auch vom Herzzeitvolumen abhängig. In der Kombinationsgruppe (DADLE + Mannitol) ist nicht nur der Aortenfluß nach 60 min Reperfusion gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant erhöht, sondern auch der linksventrikuläre Spitzendruck

(auswerfend und isovolumetrisch), der bereits nach 60 min Ausgangswerte erreicht hatte. DADLE und Mannitol sind hier also additiv wirksam, was dazu führt, daß das Herz - im Gegensatz zur Placebo-Gruppe - nach 60 min Reperfusion wieder ein erhöhtes Herzzeitvolumen und einen hohen Blutdruck aufrechterhalten kann, was Voraussetzungen für eine suffiziente Perfusion des Körperkreislaufes sind.

Die diastolischen Größen bestätigen die kardioprotektiven Eigenschaften von DADLE und Mannitol: Die frühe Relaxation (dp/dt_{\min}) war durch DADLE und Mannitol gegenüber der Placebo-Gruppe verbessert. Der deutlich erhöhte linksventrikuläre, enddiastolische Druck in der Placebo-Gruppe macht eine starke Einschränkung der späten Relaxation deutlich, die durch DADLE und Mannitol erheblich geringer ausgeprägt war, wodurch es zu einer verbesserten Füllung des Ventrikels kam welche zu einer Erhöhung des Schlagvolumens beitragen kann . Ein additiver Effekt von DADLE und Mannitol für die diastolischen Funktion war jedoch nicht vorhanden.

Die Ergebnisse zeigen, daß DADLE und Mannitol sowohl die systolische als auch die diastolische Funktion in der Reperfusion im Sinne einer Kardioprotektion günstig beeinflussen. Die kardioprotektiven Eigenschaften der beiden Substanzen werden durch viele andere Studien bestätigt: Mit δ -Opioid-Agonisten wie DADLE ist möglich, die Haltbarkeit von Herztransplantaten (Kaninchen) erheblich zu verlängern und deren kontraktile Funktion nach der Transplantation zu verbessern (Bolling et al. 1997); dieser Effekt war unabhängig von der Temperatur des Perfusates (Schwartz et al. 1999). Außerdem konnte sowohl mit dem unselektiven Morphin als auch mit dem selektiven δ_1 -Opioid-Agonisten TAN-67, eine Verkleinerung von Infarktarealen erreicht werden (Schultz, Hsu, and Gross 1996; Schultz et al. 1998). Auch an isolierten Myokardzellen konnte eine kardioprotektive Wirkung von Morphin nach einer simulierten Ischämie (Zellen in einem anoxischen Medium) nachgewiesen werden,

die durch Naloxon, einem unselektiven Opioid-Antagonist aufgehoben werden konnte (Liang and Gross 1999). Desweiteren spielen Opioid-Rezeptoren auch bei der Ischämischen Präkonditionierung eine Rolle (Schultz, Hsu, and Gross 1997), da es durch deren Blockade mittels Naloxon zu einer Abschwächung der präkonditionierenden Wirkung der kurzen Ischämiephasen kommt (Chien and van Winkle 1996).

Die kardioprotektive Wirkung des Mannitols wurde schon in verschiedenen Modellen beschrieben. Sowohl am normothermen, ischämischen Herz, als auch beim hypothermen, kardioplegischen Herzen führt Mannitol zu einer Verbesserung der postischämischen Funktion (Willerson et al. 1972) (Ouriel et al. 1985) (Magovern et al. 1984). Daher wird Mannitol bereits klinisch eingesetzt. Wegen seiner osmotischen Eigenschaften (Prävention kardialer Ödeme), aber auch wegen der Eigenschaft als Radikalfänger, wird es im Rahmen der Herzchirurgie den kardioplegischen Lösungen (z.B. Bretschneider-Lösung) hinzugefügt (Dunphy et al. 1999) (Poullis 1999).

Die Wirkungsmechanismen von DADLE und Mannitol sind unterschiedlich. DADLE wirkt über eine direkte Stimulation des δ -Opioid-Rezeptors (Schultz, Hsu, and Gross 1998) an der Myokardzelle (Liang and Gross 1999), wodurch es über bestimmte G-Proteine zum Öffnen des ATP-sensitiven Kalium-Kanals (Schultz et al. 1998) und zur Aktivierung der Proteinkinase C (Miki, Cohen, and Downey 1998) kommt. Dieser Mechanismus wird auch bei der Ischämischen Prekonditionierung diskutiert, da einige Studien durch eine Blockade der K_{ATP} -Kanäle mittels Glibenclamid eine Aufhebung des kardioprotektiven Effektes erreichen konnten (Bernardo et al. 1999; Schulz et al. 2001), der normalerweise durch die kurzen Ischämiephasen bei der Ischämischen Präkonditionierung entsteht. Die Wirkung von DADLE entspricht also einer pharmakologischen Präkonditionierung. Die ATP-abhängigen Kalium-Kanäle sind bei physiologischen, zellulären ATP-Konzentrationen geschlossen und öffnen sich, sobald die

ATP-Konzentration in der Zelle sinkt, wie es während einer Ischämie der Fall ist (Noma 1983). Dies führt über verschiedene Mechanismen zu einer Senkung des intrazellulären Kalziums (Gross and Auchampach 1992). Nach einer Hypothese wird eine Kalzium-Überladung als Ursache für das myokardiale Stunning verantwortlich gemacht (Kusuoka et al. 1987), (Marban et al. 1990), (Kusuoka and Marban 1992). Es ist denkbar, daß der kardioprotektive Effekt der Opiode auf der Senkung des intrazellulären Kalziums durch Öffnen der K_{ATP} -Kanäle bei schon physiologischen ATP-Konzentrationen noch vor der Ischämie beruht, oder daß das physiologische Öffnen der K_{ATP} -Kanäle während der Ischämie durch DADLE verstärkt oder begünstigt wird. Auch das Aktivieren der Proteinkinase C kann einer Kalzium-Überladung entgegenwirken (Wang and Ashraf 1999). Die ischämische Kontraktur wurde durch DADLE deutlich in ihrer Amplitude gesenkt. Daraus könnte man schließen, daß der Kalzium-Gehalt schon während der Ischämie gesenkt werden konnte (→ Diskussion: Ischämische Kontraktur). Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Kardioprotektion durch DADLE schon vor oder während der Ischämie stattfindet, was auch bestätigen würde, daß δ -Opiode nicht protektiv wirken, wenn sie erst zu Beginn der Reperfusion gegeben werden (Kevelaitis et al. 1999).

Im Gegensatz dazu wirken antioxidative Substanzen wie Mannitol auch kardioprotektiv, wenn man sie unmittelbar zu Beginn der Reperfusion gibt (Bolli et al. 1989) (Bolli et al. 1990), weil sie freie Radikale binden, die zu Beginn der Reperfusion entstehen (Bolli et al. 1988), und die nach einer weiteren Hypothese als Ursache für das myokardiale Stunning diskutiert werden (Bolli et al. 1987; Bolli et al. 1989; Farber et al. 1988; Gross et al. 1986; Koerner, Anderson, and Dage 1991; Myers et al. 1985; Myers et al. 1986; Przyklenk and Kloner 1986). Die osmotisch wirksamen Eigenschaften des Mannitols scheinen bei der Kardioprotektion eine untergeordnete Rolle zu spielen (Ouriel et al. 1985) (Magovern et al. 1984).

Weil sich die kontraktile Funktion durch zwei sehr unterschiedlich wirkende Substanzen

wie DADLE und Mannitol verbessern läßt, handelt es sich beim myokardialen Stunning vermutlich um ein multifaktorielles Geschehen, das sowohl vor als auch nach der Ischämie beeinflussbar ist. DADLE, der δ -Opioid Agonist, wirkt schon vor der Ischämie im Sinne einer pharmakologischen Präkonditionierung über einen Rezeptor, der an der Zellmembran lokalisiert ist, und über seine secondmessenger auf den intrazellulären Stoffwechsel. Mannitol hingegen ist im extrazellulären Milieu wirksam, indem es die unmittelbar nach der Ischämie entstehenden freien Radikale abfängt und somit den *Reperfusionsschaden* vermindert, der als Hauptursache für die postischämische Funktion verantwortlich gemacht wird (Bolli et al. 1989). Beides führt zu einer nahezu vergleichbaren Verbesserung der postischämischen Funktion.

Im Gegensatz zur bisherigen Literatur sollte mit dieser Studie auch untersucht werden, ob es durch die Kombination der beiden unterschiedlichen wirkenden Substanzen möglich ist, die postischämische Funktion ergänzend zu verbessern, also durch eine pharmakologische Präkonditionierung mittels DADLE – und somit durch die Verringerung eines *Ischämie-Schadens*, wie er neben des Reperfusionsschadens in der Pathogenese des Myokardialen Stunnings verantwortlich gemacht wird (Bolli and Marban 1999) - und durch eine Verringerung des *Reperfusionsschadens* mittels Mannitol. Diese Kombination führte auch tatsächlich zu einer weiteren Verbesserung, die aber auf die systolischen Meßgrößen beschränkt war. Dieser additive Effekt war während der Reperfusion allerdings nicht so deutlich, wie es während der Ischämie bei der ischämischen Kontraktur der Fall war. Immerhin ist es jedoch in dieser Studie mit der Kombination von DADLE und Mannitol möglich gewesen, sowohl den linksventrikulären Spitzendruck (auswerfend und isovolumentrisch) nach 60 min Reperfusion auf den Ausgangswert vor der Ischämie zu verbessern – Da auch der Aortenfluß in der Reperfusion signifikant verbessert war, scheint eine

Kombination von δ -Opioid-Agonisten und Radikalfängern durchaus auch eine klinische Relevanz zu haben (s. Diskussion: Klinische Aspekte). Außerdem bestätigt dies, daß die beiden Substanzen unterschiedliche kardioprotektive Wirkungsmechanismen haben, die in die Pathogenese des myokardialen Stunning ergänzend eingreifen.

Es ist denkbar, daß für die effektive kardioprotektive Wirksamkeit der Opiode das zelluläre Enzymsystem in der Reperfusion unversehrt sein muß, was durch Mannitol gewährleistet wird, indem es vor Schäden durch freie Radikale schützt. Freie Radikale haben die Eigenschaft, Enzyme zu schädigen, die u.a. mit der Aufrechterhaltung der Kalziumhomöostase (Matsubara and Dhalla 1996) (Okabe 1998)- und damit mit einem System im Zusammenhang stehen, auf das auch die Opiode über den K_{ATP} -Kanal und über die Proteinkinase C Einfluß nehmen (Gross and Auchampach 1992; Schultz et al. 1998) (Wang and Ashraf 1999). Einige Studien beschreiben auch eine ursächliche Beteiligung freier Radikale an der Entstehung der Kalzium-Überladung, indem die Aktivität von Kalziumpumpen im sarkoplasmatischen Retikulum durch freie Radikale erheblich reduziert wird. Die dabei verursachte Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums führt zu einem erhöhten Kalziumeinstrom in das Sarkoplasma und damit zur Kalziumüberladung (Kaneko, Beamish, and Dhalla 1989; Kaneko, Elimban, and Dhalla 1989). Dieser Effekt konnte u.a. durch Mannitol verhindert werden. Außerdem können freie Radikale direkt die kontraktilen Filamente in den Herzmuskelzellen schädigen, wodurch es zu einer verminderten Ansprechbarkeit auf Kalzium und somit zu einer Verschlechterung der kontraktilen Funktion kommt (Bolli 1990).

Obwohl sich die kardioprotektiven Eigenschaften von DADLE und Mannitol gegenseitig ergänzen, kam es dennoch zu einer postischämischen Dysfunktion. Dieser Befund spricht dafür, daß es sich bei der Pathogenese des myokardialen Stunnings um ein sehr kompliziertes

und verzweigtes System handelt. Entsprechend sind viele Aspekte dieses Phänomens noch ungeklärt. Einige Faktoren der Pathogenese konnten nicht näher untersucht werden, z.B. die Rolle, die eine verminderte Ansprechbarkeit der Myofilamente gegenüber Kalzium spielt, die als weitere Hypothese bei der Entstehung der postischämischen Dysfunktion diskutiert wird (Gao et al. 1995) (Korbmacher et al. 1995). Die Untersuchung dieses Faktors konnte in den Versuchen dieser Studie nur indirekt und theoretisch geschehen: Laut heutigen Hypothesen bildet die veränderte Kalzium-Sensitivität der Myofilamente die Endstrecke der Pathogenese des Myokardialen Stunnings (Bolli and Marban 1999). Es wird davon ausgegangen, daß freie Radikale und durch Kalzium-Überladung entstandene Kalzium-aktivierte Proteasen – sog. *Calpaine* – zu einer Schädigung von Troponin I (Gao et al. 1997) und zu dieser verminderten Kalzium-Sensitivität der Myofilamente führen (Bolli and Marban 1999), welche für die verminderte postischämische Funktion verantwortlich ist. Durch eine Reduzierung der Kalziumüberladung und die Bindung von freien Radikalen in dieser Studie wurde dieser Faktor indirekt beeinflußt. Diese Ergebnisse fügen sich gut in die heutigen Hypothesen über die Pathomechanismen des myokardialen Stunnings ein.

Mit Mannitol und DADLE konnte über zwei unterschiedliche Wirkungsmechanismen die postischämische Funktion verbessert werden. Die gegenseitige Verstärkung bei der Kombination beider Substanzen zeigt, daß ein multimodales Eingreifen über unterschiedliche Wirkungsmechanismen die Kardioprotektion verstärken kann, was viele Aspekte der Pathogenese des myokardialen Stunnings bestätigt und erhellt.

4.4.2 Koronarfluß, Sauerstoffverbrauch und Wirkungsgrad

Beim myokardialen Stunning kommt es nicht nur zu einer eingeschränkten, kontraktilen Funktion, sondern auch zu charakteristischen Veränderungen des Gefäßtonus und des

Myokard-Stoffwechsels (Schipke et al. 1996). Diese beinhalten eine reaktive Hyperämie (hoher Koronarfluß unmittelbar nach Beginn der Reperfusion), eine Reduktion des Koronarflusses während der weiteren Reperfusion, einen geringfügig reduzierten bis gleichbleibenden Sauerstoffverbrauch und eine erhebliche Einschränkung des kardialen Wirkungsgrades (Schipke et al. 1996).

Die kardioprotektiven Eigenschaften der verwendeten Substanzen sollten in dieser Studie auch auf diese Aspekte hin untersucht werden. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die Verbesserung der postischämischen Funktion durch DADLE und Mannitol auf einer Veränderung des Koronarflusses beruht, ob die verbesserte postischämische Funktion von einem erhöhten Sauerstoffverbrauch begleitet ist, und ob es zu Veränderungen des kardialen Wirkungsgrades kommt.

Koronarfluß. In allen Versuchsgruppen war der Koronarfluß und der myokardiale Sauerstoffverbrauch in den ersten 5 min nach Reperfusionsbeginn massiv angestiegen (reaktive Hyperämie). Dieses Phänomen war in jeder Versuchsgruppe zu beobachten und beruht auf einer maximalen Koronargefäßdilatation als Folge der vorrausgegangenen Ischämie (Wilcken and Eikens 1974). Im weiteren Verlauf der Reperfusion kam es dann bei allen Versuchsgruppen zu einer Reduktion des Koronarflusses auf ein Niveau, das deutlich unterhalb der präischämischen Werte lag. Diese Einschränkung des Koronarflusses, welche in der Literatur mehrfach beschrieben worden ist, ist mit einer eingeschränkten Koronarreserve assoziiert (Bolli, Triana, and Jeroudi 1990) und wird auch als mikrovaskuläres Stunning bezeichnet (Bolli, Triana, and Jeroudi 1990). Mögliche Ursachen dafür sind eine veränderte endotheliale Dysfunktion (Kiowski et al. 1994) (Kalweit et al. 2001) oder eine Bildung von interstitiellen Ödemen, die die Mikrozirkulation beeinflussen (Schipke et al. 1996) (Sunnergren

and Rovetto 1987) (Jennings and Reimer 1983). Der Koronarfluß sank im Verlauf der Reperfusion bei allen Versuchsgruppen etwa gleich stark, war aber in der Mannitolgruppe nach 60 min signifikant höher, als in den anderen Versuchsgruppen. Allerdings war auch der Kontrollwert vor der Ischämie in dieser Versuchsgruppe signifikant höher, als bei den beiden anderen Gruppen, so daß der relative Abfall in der Reperfusion gegenüber den anderen Versuchsgruppen nicht unterschiedlich war (→ Abb. 9)

Mannitol soll vasodilatierend wirken (Dunphy et al. 1999), eine Eigenschaft, die vor allem in der Reperfusion zur Geltung kommt (Magovern et al. 1984). In den beschriebenen Studien wurde jedoch im Gegensatz zur vorliegenden Studie eine höhere (z.T. hyperosmolare) Mannitol-Konzentration eingesetzt, und so ist der vasodilatorische Effekt dort deutlicher ausgeprägt als in dieser Studie, was dafür spräche, daß Mannitol in hyperosmolaren Konzentrationen einer Ödembildung entgegenwirkt, die einen erhöhten Koronargefäßwiderstand zur Folge hätte (Schipke et al. 1996). Außerdem wäre es denkbar, daß Mannitol durch Bindung von freien Radikalen einem Endothelschaden entgegen wirkt, der während der Reperfusion entsteht. In der DADLE+Mannitol-Gruppe ist kein vasodilatorischer Effekt zu beobachten. Da viele Wirkungen von Mannitol stark dosisabhängig sind (Dunphy et al. 1999), könnte es sein, daß die Dosis von Mannitol nicht ausreichend war, um bei allen Herzen den Koronarfluß zu erhöhen, so daß es nur in einer Versuchsgruppe beim Kontrollwert, 60 min vor der Ischämie und in der Reperfusion, 60 min nach der Ischämie zu einer signifikanten Steigerung des Koronarflusses kam.

Über die Wirkung von δ -Opioid-Agonisten auf den Gefäßtonus ist bislang bekannt, daß DADLE-Amid, ein DADLE-Derivat, ab Konzentrationen von 10^{-4} M an der Pia mater eine Dilatation auslöst (Wahl 1985). Niedrigere Konzentrationen (also in denen physiologisch vorkommender Opioide im Liquor vorliegen) lösten keine Vasodilatation aus. Höhere

DADLE-Konzentrationen (z.B. 10^{-4} M) lösen an isolierten Herzen ebenfalls keine Zunahme des Koronarflusses aus, und zwar weder während einer normoxischen Kontrolle, noch während einer Reperfusion (Kevelaitis et al. 1999). An isolierten Aortenstreifen zeigte der selektive δ -Agonist DPDPE in Konzentrationen bis zu 10^{-6} M keinen Einfluß auf den Gefäßtonus (Parra et al. 1995), im Gegensatz zu μ -Opioid-Agonisten, die eine Vasokonstriktion auslösten. Allerdings wurde die vasokonstriktive Wirkung von Noradrenalin durch δ -Opioid-Agonisten verstärkt (Parra et al. 1995). Diese Arbeiten zeigen, daß es in hohen Konzentrationen eine vasodilatierende Wirkung durch Opiode in Gefäßen des ZNS gibt, im peripheren Kreislauf zeigen μ -Opioid-Agonisten dagegen eine ebenfalls konzentrationsabhängige, vasokonstriktive Wirkung, und δ -Opioid-Agonisten keine direkte vasoaktive Wirkung. In der vorliegenden Studie war deshalb eine Veränderung des Gefäßwiderstandes (die Konzentration von DADLE lag bei ca. 10^{-7} mol/l) nicht zu erwarten, wie es auch die Versuchsergebnisse bestätigen.

Es ist mit den verwendeten Substanzen also nicht gelungen, den erhöhten Koronargefäßwiderstand in der Reperfusion zu senken. Daraus kann gefolgert werden, daß die Verbesserung der postischämischen Dysfunktion durch DADLE nicht auf der Ebene der Koronargefäße im Sinne einer verbesserten, postischämischen Durchblutung des Myokards stattfindet (Laxson et al. 1989), sondern direkt auf der Ebene der Kardiomyozyten wirkt. Auch die kardioprotektive Wirkung des Mannitols ist in den verwendeten Konzentrationen nicht auf einer Erhöhung des Koronarflusses zurückzuführen, da dieser erst in der späten Reperfusion (60 min) in der Mannitolgruppe signifikant höher war, als in den anderen Versuchsgruppen.

Sauerstoffverbrauch und Wirkungsgrad. Der Sauerstoffverbrauch war in der Reperfusion bei allen Versuchsgruppen gegenüber den Werten vor der Ischämie etwas erniedrigt. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestanden nur tendentielle Unterschiede, so daß sich der

Sauerstoffverbrauch in der Reperfusion bei allen Versuchen auf einem gleichen Niveau hielt. In der Placebo-Gruppe ist die kontraktile Funktion erheblich verschlechtert, so daß der Sauerstoffverbrauch inadäquat hoch war. Es wird also mehr Sauerstoff verbraucht, als für die mechanische Funktion der Kardiomyozyten benötigt wird. Dieses Phänomen ist für das myokardiale Stunning typisch und wird auch als *metabolisches Stunning* bezeichnet (Schipke et al. 1996).

Der myokardiale Sauerstoffverbrauch setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen, die alle als Ursache für die relative Zunahme in der Reperfusion diskutiert werden: Der Sauerstoffverbrauch beim leerschlagendem Herzen, der sich aus dem Sauerstoffverbrauch für den basalen Stoffwechsel und dem Sauerstoffverbrauch für die elektromechanische Kopplung zusammensetzt und der Sauerstoffverbrauch, der für die Kontraktion des Myokards benötigt wird (Suga et al. 1983; Suga et al. 1988) (Laster et al. 1989; Laxson et al. 1989; Schipke et al. 1995). Die Sauerstoffverschwendung findet vermutlich auf der Ebene der elektromechanischen Kopplung und des kontraktilen Apparates statt (Laster et al. 1989; Schipke et al. 1998). Gegen eine überproportionale Zunahme des basalen Sauerstoffverbrauch sprechen Untersuchungen an postischämischen Herzen, in denen diese Größe nicht angestiegen war (Schipke et al. 1998). Als mögliche Mechanismen für den ineffizienten Sauerstoffverbrauch werden Störungen des Kalzium-Haushaltes in der Zelle diskutiert (Krause, Jacobus, and Becker 1989; Kusuoka and Marban 1992) (Laster et al. 1989).

Gegenüber der Placebo-Gruppe ist in den anderen Versuchsgruppen die postischämische, kontraktile Funktion erheblich verbessert und der Sauerstoffverbrauch nur tendenziell erhöht, so daß bei diesen Herzen der Sauerstoff effizienter in kontraktile Arbeit umgesetzt wurde.

Um die Effizienz des Umsatzes von Sauerstoff in die äußere Herzarbeit zu quantifizieren wurde ein Index für den externen Wirkungsgrad (=Schlagarbeit/Sauerstoffverbrauch) be-

rechnet. Da es bei den Kontrollwerten vor der Ischämie bereits große Unterschiede gab, wurde bei jeder Versuchsgruppe der Anfangswert als 100% festgelegt (→ Abb. 10). Die prozentualen Werte zeigen deutlich, daß im stunned Myokard ein Mißverhältnis zwischen der Herzarbeit und der dafür eingesetzten Energie besteht. Vor allem in der Placebo-Gruppe ist dies sehr deutlich ausgeprägt: Der kardiale Wirkungsgrad erreicht hier nach 60 min Reperfusion nur 20 % des präischämischen Ausgangswertes. Die anderen Gruppen erzielen zu diesem Zeitpunkt bereits ca. 80 % ihres Ausgangswertes und sind untereinander nicht verschieden. DADLE und Mannitol erhöhen also ungefähr gleich stark den externen Wirkungsgrad nach 60 min Reperfusion und verbessern die postischämische Funktion nicht auf Kosten eines erhöhten Sauerstoffverbrauches, wie es z.B. bei positiv inotropen Substanzen der Fall ist (Rooke and Feigl 1982)).

Die Verbesserung des kardialen Wirkungsgrades ist eine weitere Komponente der Kardioprotektion. Durch die Kombination beider verwendeten Substanzen konnte bei den relativen Werten des Wirkungsgrades (s Abb. 10) allerdings keine weitere Steigerung erreicht werden. Dieser fehlende additive Effekt läßt vermuten, daß beide Substanzen über den gleichen Mechanismus den externen Wirkungsgrad verbessern, z.B. durch eine Verbesserung der Kalzium-Homöostase, deren Störung für den inadäquat hohen Sauerstoffverbrauch in der Reperfusion verantwortlich gemacht wird (Krause, Jacobus, and Becker 1989; Kusuoka and Marban 1992) (Laster et al. 1989). Da beide Substanzen das myokardiale Stunning unterschiedlich beeinflussen (DADLE über Öffnen des K_{ATP} -Kanal und Mannitol als Radikalfänger), bei der Verbesserung des Wirkungsgrades aber ein gemeinsamer Mechanismus angenommen werden kann, ist es zu überlegen, ob dieser Mechanismus mit der Endstrecke der Pathogenese des Stunnings (Veränderung der Kalzium-Sensitivität durch freie Radikale oder Calpaine – → Diskussion: Kontraktile Funktion) assoziiert ist, auf die beide Substanzen über

ihre Wirkungskaskade Einfluß nehmen können. Denkbar wäre z.B., daß durch die Protektion der Myofilamente der Sauerstoff besser in kontraktile Arbeit umgesetzt wird, wodurch es schließlich zu einer Steigerung des kardialen Wirkungsgrades kommt.

4.5 Troponin T

Mit der Messung von Troponin T sollten ergänzend Aussagen über die protektive Wirkung von DADLE auf mögliche irreversible Schädigungen der Herzen gemacht werden. Troponin T gilt als Marker für Schädigungen der Kardiomyozyten (Yamahara et al. 1993), und seine Bestimmung eignet sich sowohl klinisch z.B. bei der Diagnostik des akuten Herzinfarktes (Katus et al. 1991; Katus and Muller-Bardorff 1997; Rottbauer et al. 1996) (Rottbauer et al. 1996; Stubbs et al. 1996) als auch zum Erfassen von kardialen Schäden im Tiermodell, z.B. bei isoliert perfundierten Herzen (O'Brien et al. 1997; Remppis et al. 1995; Yamahara et al. 1993). Troponin T scheint spezifischer und sensitiver zu sein, als andere kardiale Enzyme, die klinisch gemessen werden (z.B. CK-MB oder LDH) (Mair et al. 1991) (Katus et al. 1991). Der Referenzbereich beim Menschen wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Einige Autoren fordern, daß bei gesunden Menschen kein Troponin T im Serum meßbar sein sollte (Katus et al. 1989), bei anderen Studien liegt der Bereich bei unter 0,1 ng/ml (Rottbauer et al. 1996) oder unter 0,5 ng/ml (Mair et al. 1991). Das Labor der Universitätsklinik Düsseldorf, das in der vorliegenden Studie die Troponinwerte bestimmte, gibt einen Referenzbereich von unter 0,1 ng/ml an. Nach einem transmuralen Herzinfarkt sind bei Menschen Werte zwischen 7 – 110 ng/ml gemessen worden (Katus et al. 1989). Diese Zahlen können bei den vorliegenden Versuchen nur als Orientierungswerte dienen. Die gemessenen Troponinwerte dieser Studie befinden sich in einem Wertebereich (zwischen 0,2 und 0,8 ng/ml), der mit anderen Arbeiten, in denen ebenfalls mit isolierten, reperfundierten Herzen gearbeitet wurde, übereinstimmt

(Kawakami et al. 1999; Remppis et al. 1995).

Die Ergebnisse zeigen, daß es bereits vor der Ischämie (60 min nach Kontrolle) in beiden Versuchsgruppen zu einem leichten Anstieg von Troponin T kommt, was in der Placebo-Gruppe etwas deutlicher ausgeprägt ist als bei der DADLE-Gruppe. Dieser Anstieg kann als Folge von geringfügigen Schäden während der Präparation und der in-vitro-Perfusion der Herzen interpretiert werden. In der Reperfusion wird der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen noch größer. Statistische Aussagen über diese Unterschiede sind allerdings nur bedingt möglich, da nur Werte von 4 Herzen pro Versuchsgruppe vorliegen. Trotzdem können die Troponin T-Werte ergänzend zu den bisherigen Ergebnissen verwendet werden: Sie bestätigen die kardioprotektiven Eigenschaften von DADLE, die bereits bei der kontraktilen Funktion und beim Wirkungsgrad gezeigt werden konnte. Außerdem weisen die Ergebnisse der Troponin T-Bestimmungen darauf hin, daß DADLE auch eine protektive Eigenschaft auf irreversible Schäden der perfundierten Herzen hat. Ein derartiger Effekt ist bei einem anderen δ -Opioid-Agonisten (TAN-67) bekannt, mit welchem sich, im Rahmen einer pharmakologischen Präkonditionierung Infarktgebiete erheblich verkleinern ließen (Schultz et al. 1998; Schultz, Hsu, and Gross 1997).

4.6 Klinische Aspekte

Obwohl die klinische Relevanz der postischämischen Dysfunktion zur Zeit kontrovers diskutiert wird, (Baer and Erdmann 1998; Bolli, Hartley, and Rabinovitz 1991; Futterman and Lemberg 2000) gibt es Hinweise darauf, daß dieses Phänomen in vielen Bereichen der Kardiologie bzw. Herzchirurgie eine wichtige Rolle spielt. Dies betrifft Ereignisse, bei denen es zu einer kurzzeitigen Ischämie mit anschließender Reperfusion kommt, z.B. Bypass-

Operationen, die PTCA, der Akute Myokardinfarkt mit frühzeitiger Lysetherapie, bei der instabilen Angina pectoris, während Herztransplantationen, bei der chronischen, linksventrikulären Dysfunktion und bei der arbeitsinduzierten Ischämie (Bolli 1998). Im Rahmen dieser Ereignisse kann es zu einer postischämischen verschlechterten Herzfunktion kommen (Bolli 1998).

Besonders bei Bypass-Operationen wird eine verschlechterte, postoperative Herzfunktion nicht selten beobachtet, was besonders bei Risikopatienten, die z.B. aufgrund eines akuten Herzinfarkt von Beginn an eine schlechte ventrikuläre Funktion haben, auch mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist (Bolli 1992). Hierzu gibt es zahlreiche Studien, die zeigen, daß nach Bypass-Operationen bis zu 90 % der Patienten postoperativ eine verschlechterte Herzfunktion haben, die sich innerhalb 24 - 48 h wieder zurückbildete (Gray et al. 1979; Sugiura et al. 1998; Sugiura and Yamashita 1998) (Breisblatt et al. 1990). Eine solche, eingeschränkte Herzfunktion kann besonders bei Risikopatienten umfangreiche, therapeutische Interventionen notwendig machen, wie z.B. eine pharmakologische Therapie mit positiv inotrop wirksamen Substanzen oder eine mechanische Unterstützung des Herz-Kreislauf-Systems (Bolli 1992) Eine adäquate Therapie oder Prävention für diese postischämische Dysfunktion wäre deshalb bei Risikopatienten sehr wünschenswert.

Unter klinischen Bedingungen kann das Phänomen Stunning als Ursache für diese verschlechterte Herzfunktion nur schwer von anderen möglichen Ursachen abgegrenzt werden. So kann z.B. eine stille Ischämie (Ischämie, die zwar vorhanden, aber mit klinischen Methoden nicht nachweisbar ist), die gleiche reduzierte Herzfunktion verursachen, oder es kann myokardiale Hibernation vorliegen, wobei es zu einer reduzierten Herzfunktion infolge einer eingeschränkten Koronarperfusion kommt (Heusch 1998) (Bolli 1998). Das Phänomen Stunning ist einerseits in zahlreichen Experimenten nachgewiesen und beschrieben worden

(Bolli and Marban 1999), andererseits ist es unter klinischen Bedingungen bisher nicht gelungen, einen eindeutigen Nachweis für dieses Phänomen beim Menschen zu erbringen. Das Hauptproblem besteht darin daß eine reversible, verschlechterte Herzfunktion und eine vollständig wieder hergestellte Koronarperfusion gleichzeitig nur schwer nachzuweisen ist.

Auch wenn es schwierig ist, am Menschen eine postischämische Dysfunktion im Sinne des myokardialen Stunnings wie im Tiermodell nachzuweisen, gibt es mehrere Hinweise darauf, daß es sich oft um dieses Phänomen handeln könnte: So hält die postoperative Dysfunktion bei Bypass-Operationen oft Stunden bis Tage an, so wie es für das myokardiale Stunning beschrieben ist (Bolli 1992). Außerdem verbesserten Substanzen wie Adenosin (Mentzer, Jr. et al. 1997) oder Vitamin E (Yau et al. 1994), die sich schon im Tiermodell im Rahmen des myokardialen Stunning als kardioprotektiv erwiesen haben, die postoperativ verschlechterte Funktion erheblich. Desweiteren wurde das myokardiale Stunning in zahlreichen Säugetierspezies anhand unterschiedlicher Modelle beschrieben, und es gibt keinen Grund dafür, warum es diese Phänomen beim Menschen nicht geben sollte.

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, daß es möglich war, im Tierexperiment das myokardiale Stunning mit zwei verschiedenen Substanzen zu verbessern. Dies betrifft vor allem die postischämische ventrikuläre Funktion und den kardialen Wirkungsgrad. Mit Kombination der beiden Substanzen konnte bereits 60 min nach Reperfusionbeginn eine 100 %ige Verbesserung des linksventrikulären Druckes und ein ausreichend hoher Aortenfluß erreicht werden – und das bei einem nahezu gleichgebliebenen Sauerstoffverbrauch. Es wäre also zu überlegen, ob ein klinischer Einsatz dieser Substanzkombination sinnvoll wäre. Mannitol wird bereits wegen seiner osmotischen Eigenschaften in kardioplegischen Lösungen bei Bypass-Operationen verwendet. Auch in niedrigen Dosen – wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen – ist Mannitol eine wirksame, kardioprotektive Substanz. Ein wichtiges Ergebnis

dieser Studie ist, daß die Kardioprotektion, die durch Mannitol erreicht wird, durch δ -Opioid-Agonisten wie DADLE noch gesteigert werden kann. Das bedeutet, daß es sinnvoll sein könnte, bei Bypass-Operationen δ -Opioid-Agonisten zusätzlich zum Mannitol einzusetzen. Dies könnte beispielsweise im Rahmen der Anästhesie geschehen. Die in der Anästhesie zum Einsatz kommenden Opioide wie z.B. Fentanyl haben keine δ -agonistische Wirkung sondern stimulieren zum größten Teil den μ -opioid-Rezeptor (Kevelaitis et al. 1999). Es wäre also sinnvoller, bei Bypass-Operationen Anästhetika einzusetzen, die zusätzlich eine δ -agonistische Wirkung haben, und somit das Herz zusätzlich zum Mannitol, das sich in der kardioplegischen Lösung befindet, schützen, so wie es in dieser Studie gezeigt werden konnte. Da die Kardioprotektion von DADLE über das Öffnen von K_{ATP} -Kanal stattfindet, wäre auch ein Einsatz von Substanzen denkbar, die diesen Kanal direkt öffnen, wie z.B. Nicorandil (Menasche et al. 1995) oder Diaxozid (Garlid et al. 1997). Bisher wird nach Bypass-Operationen die verschlechterte Funktion mit positiv inotropen Medikamenten behandelt. Diese haben jedoch den Nachteil, den Sauerstoffverbrauch des Herzens zu erhöhen, was in dieser Studie bei DADLE und Mannitol nicht der Fall war.

Im Gegensatz dazu scheint eine Anwendung von DADLE bei akuten Ereignissen - wie der akute Myokardinfarkt mit frühzeitiger Revaskularisierung - weniger sinnvoll zu sein. Die beim akuten Myokardinfarkt applizierten Opioide wie z.B. Morphin, die den Patienten schmerzfrei machen und ihn sedieren sollen, haben zwar eine über den δ -Rezeptor vermittelte, kardioprotektive Wirkung (Schultz, Hsu, and Gross 1996), jedoch kommt diese Wirkung hier zu spät zur Anwendung, da die Kardioprotektion nur dann erreicht wird, wenn die Substanz schon vor dem ischämischen Ereignis gegeben wird (Kevelaitis et al. 1999).

Ein weiteres Anwendungsgebiet von DADLE ist der Einsatz bei Herztransplantationen. Auch hierbei kommt es postoperativ zu einer verschlechterte Herzfunktion, die besonders

davon abhängig ist, wie lange das Herz gelagert wurde (Bolli 1992). Im Tiermodell konnte die Haltbarkeit von Herztransplantaten durch den Einsatz von DADLE bereits um ein Vielfaches verlängert und die spätere ventrikuläre Funktion dieser Herzen erheblich verbessert werden (Bolling et al. 1997). In einigen Transplantationslösungen, wie z.B. die Celsior-Lösung, wird auch Mannitol eingesetzt (Sugiura et al. 1998). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie läßt sich ableiten, daß ein Einsatz von DADLE auch bei Herztransplantaten die mit solchen, Mannitol-haltigen Lösungen behandelt werden, einen zusätzlichen, protektiven Effekt haben könnte. Eine Verlängerung der Transplantat-Haltbarkeit hat nicht nur den Vorteil, daß die postoperative Funktion gesteigert werden kann, sondern auch, daß die Organe länger gelagert und damit über weitere Strecken transportiert werden können.

Innerhalb dieser Studie konnten die kardioprotektiven Eigenschaften von zwei Substanzen belegt werden, deren klinischer Einsatz in der Herzchirurgie denkbar und im Rahmen von kardioplegischen Lösungen oder innerhalb der Anästhesiologie interessant wäre. Auch eine Kombination von DADLE und Mannitol könnte sich in der klinischen Anwendung bewähren, da beide Substanzen in dieser Studie einen additiv wirksamen Effekt auf das postischämische, isolierte Herz hatten.

5 Zusammenfassung

An 27 isolierten Kaninchenherzen wurde untersucht, ob der δ -Opioid-Agonist DADLE und der Radikalfänger Mannitol kardioprotektiv wirken, und ob auch eine Kombination beider Substanzen sinnvoll ist. Darüber hinaus sollten Rückschlüsse auf den Pathomechanismus der postischämischen Dysfunktion (=myokardiales Stunning) und über die Wirkungsweise von DADLE gezogen werden. Dazu wurden die Herzen an einer Langendorff-Anlage mit einer Erythrozyten-Suspension isoliert perfundiert und nach einer Einschlagphase von 60 min einer 20 min globalen, No-Flow'-Ischämie ausgesetzt, worauf eine 60 min lange Reperfusion folgte. Vor der Ischämie und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Reperfusion wurden am auswerfenden und am isovolumetrisch schlagenden Herzen HF, AoF, LVP_{max} , dP/dt_{max} , LVP_{ed} , dP/dt_{min} , CF, und $AVDO_2$ gemessen und daraus der myokardiale Sauerstoffverbrauch MVO_2 und der externe Wirkungsgrad E_{ext} berechnet. Zusätzlich wurde die Ausbildung einer ischämischen Kontraktur quantifiziert. Die Herzen wurden in 4 Gruppen eingeteilt: 1. Kontrollgruppe: Keine Gabe von Substanzen; 2. Gabe von DADLE in das Perfusat; 3. Gabe von Mannitol in das Perfusat; 4. Gabe von Mannitol und DADLE in das Perfusat. Bei allen Versuchsgruppen kam es postischämisch zu einer Einschränkung der kontraktilen Funktion, die in ihrer Ausprägung bei der Placebo-Gruppe signifikant stärker war (sowohl systolisch als auch diastolisch) als bei den anderen Versuchsgruppen. Diese zeigten untereinander nur wenige statistisch signifikante Unterschiede. Die beste postischämische Funktion hatten die Herzen der Mannitol+DADLE- Gruppe. CF und MVO_2 änderten sich postischämisch bei allen Versuchsgruppen im gleichen Ausmaß, ohne daß signifikante Unterschiede vorlagen. Die ischämische Kontraktur, die sich bei allen Herzen während der Ischämie ausbildete, war bei der DADLE-Gruppe und der Mannitol-Gruppe signifikant geringer als bei der Placebo-Gruppe und in der DADLE+Mannitol-Gruppe am geringsten. E_{ext} war postischämisch bei den Versuchsgruppen, bei denen DADLE und/oder Mannitol eingesetzt wurde signifikant höher als bei der Placebo-Gruppe. Alle Ergebnisse zeigen, daß sowohl DADLE als auch Mannitol kardioprotektive Eigenschaften haben. Die Kombination beider Substanzen führt bei der ischämischen Kontraktur zu einem additiven, kardioprotektiven Effekt. In der Reperfusion zeigt die Kombination von DADLE und Mannitol nur in einigen Meßgrößen (systolische Funktion) eine Verbesserung gegenüber den Einzelsubstanzen. Da diese in ihren Wirkungsmechanismen unterschiedlich sind (Mannitol ist Radikalfänger und DADLE öffnet ATP-sensitive Kaliumkanäle), kann man davon ausgehen, daß der Pathomechanismus des myokardialen Stunning eine gemeinsame Endstrecke besitzt, die sowohl über die Bindung durch freie Radikale (durch Mannitol) und über das Öffnen von ATP-sensitiven Kaliumkanälen in gleicher Weise beeinflußt werden kann. Die Wirkung von DADLE läßt sich durch das zusätzliche Binden von freien Radikalen teilweise verbessern. Dies scheint ein Hinweis darauf zu sein, daß der Wirkungsmechanismus von DADLE das myokardiale Stunning über einen Eingriff in den Kalzium-Haushalt der Zelle und nicht über die Reduktion von freien Radikalen beeinflußt. Für beide Substanzen, die bereits wegen anderer Eigenschaften klinisch genutzt werden, wäre zusätzlich ein klinischer Einsatz im Rahmen ihrer kardioprotektiver Eigenschaften denkbar, z.B. als Additiv in kardioplegischen Lösungen.

6 Literatur

1. Bolling, S. F. et al., "Use of 'natural' hibernation induction triggers for myocardial protection.," *Ann Thorac Surg* 64, no. 3 (1997): 623-627.
2. Dawe, A. R., W. A. Spurrier, and J. A. Armour, "Summer hibernation induced by a cryogenically preserved blood "trigger",," *Science* 168 (1970): 298-299.
3. Dawe, A. R. and W. A. Spurrier, "A more specific characterization of the blood 'trigger' for hibernation," *Cryobiology* 8 (1971): 302-305.
4. Oeltgen, P. R. et al., "Further studies on opioids and hibernation: delta opioid receptor ligand selectively induced hibernation in summer-active ground squirrels," *Life Sci* 43 (1988): 1565-1574.
5. Bolling, S. F. et al., "The use of hibernation induction triggers for cardiac transplant preservation," *Transplant* 63 (1997): 326-329.
6. Schultz, J. E. J., A. K. Hsu, and G. J. Gross, "Ischemic preconditioning in the intact rat heart is mediated by δ 1- but not μ - or κ -opioid receptors," *Circulation* 97 (1998): 1282-1289.
7. Schultz, J. E. J. et al., "TAN-67, a delta-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of Gi/o proteins and KATP channels," *Am J Physiol* 274 (1998): H909-H914.
8. Kevelaitis, E. et al., "Opening of potassium channels: the common cardioprotective link between preconditioning and natural hibernation?," *Circulation* 99, no. 23 (1999): 3079-3085.
9. Birkenkamp-Demtroeder, K. and J. D. Schipke. Identifizierung der δ -Opioid-Rezeptor mRNA am Myokard von Maus, Kaninchen sowie am insuffizienten menschlichen Myokard. *Z Kardiol* 88, S82. 1999.
10. Benedict, PE et al., "Opiate drugs and δ -receptor-mediated myocardial protection," *Circulation* 100 (1999): 357-360.
11. Ventura, C. et al., "Kappa and delta opioid receptor stimulation affects cardiac myocyte function and Ca²⁺ release from an intracellular pool in myocytes and neurons," *Circ.Res* 70, no. 1 (1992): 66-81.
12. Wong, T. M., A. Y. Lee, and K. K. Tai, "Effects of drugs interacting with opioid receptors during normal perfusion or ischemia and reperfusion in the isolated rat heart--an attempt to identify cardiac opioid receptor subtype(s) involved in arrhythmogenesis," *J Mol Cell Cardiol* 22, no. 10 (1990): 1167-1175.
13. Braunwald, E. and R. A. Kloner, "The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction," *Circulation* 66(6) (1982): 1146-1149.

14. Bolli, R., "Mechanism of myocardial "stunning"," *Circulation* 82 (1990): 723-738.
15. Heyndrickx, G. R. et al., "Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs," *J Clin Invest* 56 (1975): 978-985.
16. Homans, D. C. et al., "Persistence of regional left ventricular dysfunction after exercise-induced myocardial ischemia.," *J Clin Invest* 77 (1986): 66-73.
17. Bolli, R. et al., "Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury," *Circ Res* 65 (1989): 607-622.
18. Bolli, R. et al., "The iron chelator desferrioxamine attenuates postischemic ventricular dysfunction," *Am J Physiol* 253 (1987): H1372-H1380.
19. Farber, N. E. et al., "Evidence for a role of iron-catalyzed oxidants in functional and metabolic stunning in the canine heart," *Circ Res* 63 (1988): 351-360.
20. Gross, G. J. et al., "Beneficial actions of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium of dogs," *Am J Physiol* 250 (1986): H372-H377.
21. Koerner, J. E., B. A. Anderson, and R. C. Dage, "Protection against postischemic myocardial dysfunction in anesthetized rabbits with scavengers of oxygen-derived free radicals: superoxide dismutase plus catalase, N-2-mercaptpropionyl glycine and captopril," *J Cardiovasc Pharmacol* 17, no. 2 (1991): 185-191.
22. Przyklenk, K. and R. A. Kloner, "Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the "stunned myocardium"," *Circ Res* 58 (1986): 148-156.
23. Myers, M. L. et al., "N-2-mercaptpropionylglycine improves recovery of myocardial function after reversible regional ischemia," *J Am Coll. Cardiol* 8, no. 5 (1986): 1161-1168.
24. Myers, M. L. et al., "Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia," *Circulation* 72, no. 4 (1985): 915-921.
25. Bolli, R. and E. Marban, "Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning," *Physiol Rev.* 79, no. 2 (1999): 609-634.
26. Kusuoka, H. et al., "Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium: Depressed Ca-activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts," *J Clin Invest* 79 (1987): 950-961.
27. Marban, E. et al., "Quantification of $[Ca^{2+}]_i$ in perfused hearts: Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia

- and reperfusion," *Circ Res* 66 (1990): 1255-1267.
28. Kusuoka, H. and E. Marban, "Cellular mechanisms of myocardial stunning," *Ann Rev Physiol* 54 (1992): 243-256.
 29. Beyer, M. E. et al., "Inotropic effects of endothelin-1: interaction with molsidomine and with BQ 610," *Hypertension* 33, no. 1 (1999): 145-152.
 30. Sekili, S. et al., "Effect of adenosine on myocardial 'stunning' in the dog," *Circ Res* 76 (1995): 82-94.
 31. Sekine, T. et al., "Developmental conversion of inotropism by endothelin I and angiotensin II from positive to negative in mice," *Eur J Pharmacol* 374, no. 3 (1999): 411-415.
 32. Bardenheuer, H. and J. Schrader, "Relationship between myocardial oxygen consumption, coronary flow, and adenosine release in an improved isolated working heart preparation of guinea pigs," *Circ Res* 51 (1983): 263-271.
 33. Shepherd, A. P. and C. G. Burgar, "A solid-state arteriovenous oxygen difference analyzer for flowing whole blood," *Am J Physiol* 232(4) (1977): H437-H440.
 34. Poullis, M., "Mannitol and cardiac surgery," *Thorac Cardiovasc Surg* 47, no. 1 (1999): 58-62.
 35. Britz, M., U. Sunderdiek, and J. D. Schipke. Easydat: A computer program for data acquisition and processing. *Pfluegers Arch* 420(suppl 1.), R 140. 1992.
 36. Buckberg, G. D. et al., "Experimental subendocardial ischemia in dogs with normal coronary arteries," *Circ Res* 30 (1972): 67-81.
 37. Wilcken, D. E. and E. Eikens, "Reactive hyperaemia in the dog heart: studies on mechanisms," *Adv Cardiol* 12, no. 0 (1974): 318-329.
 38. Gronow, G, P Prechtel, and N. Klause, "Cytoprotective Effect of isotonic mannitol at low oxygen tension," *Adv Exp Med Biol* 248 (1989): 755-762.
 39. Rosen, C. L., A. Cote, and Haddad G.G., "Effect of enkephalins on cardiac output and regional blood flow in conscious dogs," *Am J Physiol* 256 (1989): H1651-8.
 40. Schultz, J. J. et al., "Tan-67, a δ 1-opioid receptor agonist, reduces infarct size via activation of $G_{i/o}$ proteins and KATP channels," *Am J Physiol* 274 (1998): H909-H914.
 41. Dunphy, G. et al., "The effects of mannitol, albumin, and cardioplegia enhancers on 24-h rat heart preservation," *Am J Physiol* 276, no. 5 Pt 2 (1999): H1591-H1598.
 42. Magovern, G. J. et al., "The mechanism of mannitol in reducing ischemic injury: Hyperosmolarity or hydroxyl scavenger?," *Circulation* 70 Suppl I (1984): I-91-I-95.

43. MacGregor, D. C. et al., "Ischemic contracture of the left ventricle. Production and prevention," *J Thorac Cardiovasc Surg* 70, no. 6 (1975): 945-954.
44. Katz, A. M. and M. Tada, "The "stone heart": a challenge to the biochemist," *Am J Cardiol* 29, no. 4 (1972): 578-580.
45. Cooley, D. A., G. J. Reul, Jr., and D. C. Wukasch, "Ischemic myocardial contracture ("stone heart"). A complication of cardiac surgery," *Isr.J Med Sci* 11, no. 2-3 (1975): 203-210.
46. Kevelaitis, E., C. Mouas, and P. Menasche, "Poststorage diastolic abnormalities of heart transplants: is vascular dysfunction or myocardial contracture the culprit?," *J Heart Lung Transplant*. 15, no. 5 (1996): 461-469.
47. Hearse, D. J., P. B. Garlick, and S. M. Humphrey, "Ischemic contracture of the myocardium: mechanisms and prevention," *Am J Cardiol* 39, no. 7 (1977): 986-993.
48. Kupriyanov, V. V. et al., "Relationships between pre-ischemic ATP and glycogen content and post-ischemic recovery of rat heart," *J Mol Cell Cardiol* 20, no. 12 (1988): 1151-1162.
49. Owen, P., S. Dennis, and L. H. Opie, "Glucose flux rate regulates onset of ischemic contracture in globally underperfused rat hearts," *Circ Res* 66, no. 2 (1990): 344-354.
50. Kingsley, P. B. et al., "Ischemic contracture begins when anaerobic glycolysis stops: a ³¹P-NMR study of isolated rat hearts," *Am J Physiol* 261, no. 2 Pt 2 (1991): H469-H478.
51. Schumacher, C. A. et al., "Energy-dependent transport of calcium to the extracellular space during acute ischemia of the rat heart," *J Mol Cell Cardiol* 30, no. 8 (1998): 1631-1642.
52. Gross, G. J. and J. A. Auchampach, "Role of ATP dependent potassium channels in myocardial ischaemia," *Cardiovasc Res* 26, no. 11 (1992): 1011-1016.
53. Wang, Y. and M. Ashraf, "Role of protein kinase C in mitochondrial KATP channel-mediated protection against Ca²⁺ overload injury in rat myocardium," *Circ Res* 84, no. 10 (1999): 1156-1165.
54. Robert, V., S. Ayoub, and G. Berson, "Effects of hydroxyl radicals on ATPase and protein structure of myofibrils from rat heart," *Am J Physiol* 261, no. 6 Pt 2 (1991): H1785-H1790.
55. Bello-Klein, A. et al., "Effect of trolox C on cardiac contracture induced by hydrogen peroxide," *Braz.J Med Biol Res* 30, no. 11 (1997): 1337-1342.
56. Schraufstatter, I. U. et al., "Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase," *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 83, no. 13 (1986): 4908-4912.

57. Matsubara, T. and N. S. Dhalla, "Relationship between mechanical dysfunction and depression of sarcolemmal Ca(2+)-pump activity in hearts perfused with oxygen free radicals," *Mol Cell Biochem.* 160-161 (1996): 179-185.
58. Okabe, E., "[Superoxide anion radical selectively increases Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca²⁺ channel]," *Nippon Yakurigaku Zasshi* 112 Suppl 1 (1998): 58P-62P.
59. Morris, T. E. and P. V. Sulakhe, "Sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals," *Free Radic.Biol Med* 22, no. 1-2 (1997): 37-47.
60. Kolocassides, K. G., M. Galinanes, and D. J. Hearse, "Dichotomy of ischemic preconditioning: improved postischemic contractile function despite intensification of ischemic contracture," *Circulation* 93 (1996): 1725-1733.
61. Carrozza, J. P. et al., "Decreased myofilament responsiveness in myocardial stunning follows transient calcium overload during ischemia and reperfusion," *Circ Res* 71 (1992): 1334-1340.
62. Bolling, S. F. et al., "Use of "natural" hibernation induction triggers for myocardial protection," *Ann Thorac.Surg* 64, no. 3 (1997): 623-627.
63. Schwartz, C. F. et al., "Delta opioid receptors and low temperature myocardial protection," *Ann.Thorac Surg* 68, no. 6 (1999): 2089-2092.
64. Schultz, J. E., A. K. Hsu, and G. J. Gross, "Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart," *Circ.Res* 78, no. 6 (1996): 1100-1104.
65. Liang, B. T. and G. J. Gross, "Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and KATP channels," *Circ Res* 84, no. 12 (1999): 1396-1400.
66. Schultz, J. J., A. K. Hsu, and G. J. Gross, "Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart," *J Mol.Cell.Cardiol* 29, no. 5 (1997): 1355-1362.
67. Chien, G. L. and D. M. van Winkle, "Naloxone blockade of myocardial ischemic preconditioning is stereoselective," *J Mol Cell Cardiol* 28, no. 9 (1996): 1895-1900.
68. Willerson, J. T. et al., "Improvement in myocardial function and coronary blood flow in ischemic myocardium after mannitol," *J Clin.Invest* 51, no. 12 (1972): 2989-2998.
69. Ouriel, K. et al., "Preservation of myocardial function with mannitol reperfusate," *Circulation* 72, no. 3 Pt 2 (1985): II254-II258.
70. Dunphy, G. et al., "The effects of mannitol, albumin, and cardioplegia enhancers on 24-

- h rat heart preservation," *Am J Physiol* 276, no. 5 Pt 2 (1999): H1591-H1598.
71. Miki, T., M. V. Cohen, and J. M. Downey, "Opioid receptor contributes to ischemic preconditioning through protein kinase C activation in rabbits," *Mol. Cell Biochem.* 186, no. 1-2 (1998): 3-12.
 72. Bernardo, N. L. et al., "Delayed ischemic preconditioning is mediated by opening of ATP-sensitive potassium channels in the rabbit heart," *Am J Physiol* 276, no. 4 Pt 2 (1999): H1323-H1330.
 73. Schulz, R. et al., "Signal transduction of ischemic preconditioning," *Cardiovasc Res* 52, no. 2 (2001): 181-198.
 74. Noma, A., "ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle," *Nature* 305, no. 5930 (1983): 147-148.
 75. Bolli, R. et al., "Iron-mediated radical reactions upon reperfusion contribute to myocardial "stunning"," *Am J Physiol* 259, no. 6 Pt 2 (1990): H1901-H1911.
 76. Bolli, R. et al., "Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron [published erratum appears in *J Clin Invest* 1988 Nov;82(5):following 1807]," *J Clin. Invest* 82, no. 2 (1988): 476-485.
 77. Kaneko, M., R. E. Beamish, and N. S. Dhalla, "Depression of heart sarcolemmal Ca²⁺-pump activity by oxygen free radicals," *Am J Physiol* 256 (1989): H368-H374.
 78. Kaneko, M., V. Elimban, and N. S. Dhalla, "Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca²⁺ pump by oxygen free radicals," *Am J Physiol* 257 (1989): H804-H811.
 79. Gao, W. D. et al., "Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium," *Circ Res* 76 (1995): 1036-1048.
 80. Korbmacher, B. et al., "Comparison between the effects of a novel Ca⁺⁺ sensitizer and a phosphodiesterase inhibitor on stunned myocardium," *J Pharmacol Exp Ther* 275 (1995): 1433-1441.
 81. Gao, W. D. et al., "Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium," *Circ Res* 80, no. 3 (1997): 393-399.
 82. Schipke, J. D. et al., "Hemodynamic and energetic properties of stunned myocardium in rabbit hearts," *Heart* 75 (1996): 55-61.
 83. Bolli, R., J. F. Triana, and M. O. Jeroudi, "Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible ischemia. Evidence for microvascular stunning," *Circ Res* 67 (1990): 332-343.

84. Kiowski, W. et al., "Diminished vascular response to inhibition of endothelium-derived nitric oxide and enhanced vasoconstriction to exogenously administered endothelin-1 in clinically healthy smokers," *Circulation* 90 (1994): 27-34.
85. Kalweit, G. A. et al., "Changes in coronary vessel resistance during postischemic reperfusion and effectiveness of nitroglycerin," *J Thorac Cardiovasc Surg* 122, no. 5 (2001): 1011-1018.
86. Sunnergren, K. P. and M. J. Rovetto, "Myocyte and endothelial injury with ischemia reperfusion in isolated rat hearts," *Am J Physiol* 252 (1987): H1211-H1217.
87. Jennings, R. B. and K. A. Reimer, "Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effects of reperfusion of arterial blood," *Circulation* 68 (suppl I) (1983): 25-36.
88. Wahl, M., "Effects of enkephalins, morphine, and naloxone on pial arteries during perivascular microapplication," *J Cereb. Blood Flow Metab* 5, no. 3 (1985): 451-457.
89. Parra, L. et al., "mu- and delta-opioid receptor-mediated contractile effects on rat aortic vascular smooth muscle," *Eur J Pharmacol* 277, no. 1 (1995): 99-105.
90. Laxson, D. D. et al., "Oxygen consumption and coronary reactivity in postischemic myocardium," *Circ Res* 64 (1989): 9-20.
91. Suga, H. et al., "Effect of positive inotropic agents on the relation between oxygen consumption and systolic pressure-volume area in canine left ventricle," *Circ Res* 53 (1983): 306-318.
92. Suga, H. et al., "O₂ consumption of dog heart under decreased coronary perfusion and propranolol," *Am J Physiol* 254 (1988): 292-303.
93. Schipke, J. D. et al., "Utilization of oxygen by the contractile apparatus is disturbed during reperfusion of post-ischemic myocardium," *Eur Heart J* 16 (1995): 1476-1481.
94. Laster, S. B. et al., "Reduced aerobic metabolic efficiency in globally "stunned" myocardium," *J Mol Cell Cardiol* 21 (1989): 419-426.
95. Schipke, J. D. et al., "Basal metabolism does not account for high O₂ consumption in stunned myocardium," *Am J Physiol* 274 (1998): H743-H746.
96. Krause, S. M., W. E. Jacobus, and L. C. Becker, "Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium," *Circ Res* 65 (1989): 526-530.
97. Rooke, G. A. and E. O. Feigl, "Work as a correlate of canine left ventricular oxygen consumption, and the problem of catecholamine oxygen wasting," *Circ Res* 50 (1982): 273-286.

98. Yamahara, Y. et al., "Release kinetics and correlation with hemodynamic dysfunction of cardiac troponin T in coronary effluent from isolated rat hearts during reperfusion," *Basic Res Cardiol* 88, no. 4 (1993): 307-313.
99. Katus, H. A. et al., "Intracellular compartmentation of cardiac Troponin T and its release kinetics in patients with reperfused and nonreperfused myocardial infarction.," *Am J Cardiol* 67 (1991): 1360-1367.
100. Rottbauer, W. et al., "Troponin T: a diagnostic marker for myocardial infarction and minor cardiac cell damage," *Eur Heart J* 17, (Suppl.F) (1996): 3-8.
101. Katus, H. A. and M. Muller-Bardorff, "Kardiales Troponin T," *Z Kardiol* 86, no. 10 (1997): 785-787.
102. Stubbs, P. et al., "Prognostic significance of admission troponin T concentrations in patients with myocardial infarction," *Circulation* 94, no. 6 (1996): 1291-1297.
103. O'Brien, P. J. et al., "Cardiac troponin T is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals," *Lab Anim Sci* 47, no. 5 (1997): 486-495.
104. Remppis, A. et al., "Intracellular compartmentation of troponin T: release kinetics after global ischemia and calcium paradox in the isolated perfused rat heart," *J Mol Cell Cardiol* 27, no. 2 (1995): 793-803.
105. Mair, J. et al., "Cardiac troponin T in diagnosis of acute myocardial infarction [see comments]," *Clin Chem.* 37, no. 6 (1991): 845-852.
106. Katus, H. A. et al., "Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients," *J Mol Cell Cardiol* 21, no. 12 (1989): 1349-1353.
107. Kawakami, T. et al., "Post-ischaemic dysfunction does not correlate with release of cardiac troponin T in isolated rat hearts," *Acta Physiol Scand.* 167, no. 1 (1999): 23-27.
108. Schultz, J. J., A. K. Hsu, and G. J. Gross, "Ischemic preconditioning is mediated by a peripheral opioid receptor mechanism in the intact rat heart," *J Mol Cell Cardiol* 29 (1997): 1355-1362.
109. Futterman, L. G. and L. Lemberg, "Hibernating myocardium, stunning, ischemic preconditioning: clinical relevance," *Am J Crit Care* 9, no. 6 (2000): 430-436.
110. Baer, F. M. and E. Erdmann, "Methods of assessment and clinical relevance of myocardial hibernation and stunning. Assessment of myocardial viability," *Thorac Cardiovasc Surg* 46 Suppl 2 (1998): 264-269.
111. Bolli, R., C. J. Hartley, and R. S. Rabinovitz, "Clinical relevance of myocardial

- "stunning", *Cardiovasc Drugs Ther* 5, no. 5 (1991): 877-890.
112. Bolli, R., "Why myocardial stunning is clinically important," *Basic Res Cardiol* 93, no. 3 (1998): 169-172.
 113. Bolli, R., "Myocardial "stunning" in man," *Circulation* 86 (1992): 1671-1691.
 114. Gray, R. et al., "Scintigraphic and hemodynamic demonstration of transient left ventricular dysfunction immediately after uncomplicated coronary artery bypass grafting," *J Thorac Cardiovasc Surg* 77 (1979): 504-510.
 115. Sugiura, S. and H. Yamashita, "Functional characterization of cardiac myosin isoforms," *Jpn.J Physiol* 48, no. 3 (1998): 173-179.
 116. Sugiura, S. et al., "Distinct kinetic properties of cardiac myosin isoforms revealed by in vitro studies," *Adv.Exp.Med.Biol.* 453:125-30 (1998): 125-130.
 117. Breisblatt, W. M. et al., "Acute myocardial dysfunction and recovery: A common occurrence after coronary bypass surgery," *J Am Coll Cardiol* 15 (1990): 1261-1269.
 118. Heusch, G., "Hibernating Myocardium," *Physiol Rev* 78, no. 4 (1998): 1055-1085.
 119. Mentzer, R. M., Jr. et al., "Safety, tolerance, and efficacy of adenosine as an additive to blood cardioplegia in humans during coronary artery bypass surgery," *Am J Cardiol* 79, no. 12A (1997): 38-43.
 120. Yau, T. M. et al., "Vitamin E for coronary bypass operations. A prospective, double-blind, randomized trial," *J Thorac Cardiovasc Surg* 108, no. 2 (1994): 302-310.
 121. Menasche, P. et al., "Preconditioning with potassium channel openers. A new concept for enhancing cardioplegic protection?," *J Thorac Cardiovasc Surg* 110, no. 6 (1995): 1606-1613.
 122. Garlid, K. D. et al., "Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection," *Circ Res* 81, no. 6 (1997): 1072-1082.
 123. Sugiura, S. et al., "Comparison of unitary displacements and forces between 2 cardiac myosin isoforms by the optical trap technique: molecular basis for cardiac adaptation [see comments]," *Circ Res* 82, no. 10 (1998): 1029-1034.

7 Eigene Veröffentlichungen

Nickel, F, Schwanke, U, Meyer, D., Schipke J.D.

Verbesserung der postischämischen Dysfunktion durch einen Hydroxylradikalfänger und/oder einen δ -opioid-Rezeptor-Agonisten

Z Kardiologie 90 (Suppl. 2), II/128-II/ 2001

Schipke J.D., Meyer, D., Nickel, F, Gallmann, J., Schwanke, U

Can the dysfunction in stunned myocardium partially be attributed to insufficient oxygen supply ?

Pfluegers Arch 439, suppl, R352-R352. 2000

Sanii, A.P., Nickel, F., Winter, J. Dehnen-Seipel, H., Schumann, C., Arnold, Schipke, J.D.

Vascular waterfall or static filling pressure in patients during cardioverter/defibrillator-implantation

Eur J Physiol 433(Suppl. 6) P 325. 1997

Schipke, J.D., Winter, J., Nickel, F., Sanii, A.P., Schumann, C., Arnold, G.

Arterial and venous pressures in anesthetized patients during cardioverter/defibrillator-implantation: Static filling pressure or vascular waterfall ?

FASEB Jour 10(3), 564. 1996

Winter, J., Schumann, C., Nickel F., Schipke, J.D., Sanii, A.P., Godehardt, E., Schulte, H.D.

E 50-Bestimmung versus konventionelle Defibrillationsschwellenleistung bei der ICD-Implantation

Z Kardiologie 84 (Suppl. 3), 236. 1995

Garcia-Pomblum, S.C., Pomblum VJ, Nickel F., Schipke J.D.

Different contribution of reactive oxygen species to microvascular stunning

Basic Res Cardiol 2001; 96 (Suppl 1): I/5

Garcia-Pomblum, S.C., Pomblum VJ, Nickel F., Schipke J.D.

Different contribution of hydroxyl peroxide and peroxynitrite to the ischemia-reperfusion injury in the rabbit myocardium.

Z Kardiologie 2001; 90 (Suppl 5): V/73

8 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Frank Nickel
Wohnort: Liebfrauenstr. 37
40591 Düsseldorf
Telefon: 0211-7606805
Geburtsdatum: 4.10.1972
Geburtsort: Ratingen
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Konfession: katholisch

Schulausbildung

1979-1983 Christian-Morgenstern-Grundschule in Ratingen-Homberg
1983-1989 Theodor-Heuss-Gymnasium in Ratingen
1989-1992 Kollegschule Kikweg in Düsseldorf
1992 Abitur an der Kollegschule Kikweg

Berufsausbildung

1989-1993 Ausbildung zum staatlich geprüften Assistent für Umwelttechnik an der
Kollegschule Kikweg
1994 Abschluß der Berufsausbildung

Zivildienst

1993-1994 Zivildienst am Institut für Experimentelle Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

Studium

1995-2001 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1997 Ärztliche Vorprüfung
1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000-2001 Praktisches Jahr im Lukaskrankenhaus, Neuss
1. Tertial: Innere Medizin
2. Tertial: Chirurgie
3. Tertial: Anästhesie
2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Studienbegleitende Nebentätigkeiten

Famulaturen

18.08.1997-19.09.1997 Praxisfamulatur Augenheilkunde
01.03.1998-31.03.1998 Krankenhausfamulatur Innere Medizin
01.03.1999-30.03.1999 Krankenhausfamulatur Anästhesie
01.09.1999-30.09.1999 Wahlfamulatur Pathologie

Nebentätigkeiten

1995-1999 Arbeit als Studentische Hilfskraft im Institut für Experimentelle Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Tätigkeiten: Netzwerkbetreuung, Systemadministration, Versuchsdatenauswertung

Promotion

Anfertigung der experimentellen Dissertation am Institut für Experimentelle Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei Prof. Dr. J.D. Schipke

Berufliche Tätigkeiten

seit 2002: AiP in der Abteilung für Anästhesiologie, Kliniken der Landeshauptstadt Düsseldorf, Krankenhaus Gerresheim

Danksagung

Mein Dank gilt...

vor allem Prof. Dr. J.D. Schipke für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und für alle hilfreichen Anregungen.

Herrn Prof. Dr. M. Kelm für die Übernahme des Koreferates

Herrn Prof Dr. S. Cleveland, der sich freundlicherweise als 3. Prüfer zur Verfügung gestellt hat

Dr. U. Schwanke für die hervorragende Einführung in den Umgang mit dem experimentellen Versuchsmodell.

meiner Freundin und Verlobten Britta für die Geduld und psychischen Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit und der Zeit des Studiums.

meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht, und mich in jeder Hinsicht dabei unterstützt haben.

allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe Experimentelle Chirurgie, für eine schöne Zeit die ich hier über das Studium hinaus hatte und haben werde

Dem Schlachthof Düsseldorf für die Bereitstellung des Blutes