

Aus dem  
Institut für Physiologie I  
Abteilung für Herz- und Kreislaufphysiologie  
der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Prof. Dr. J. Schrader

**Diabetes mellitus  
blockiert  
die späte Phase der  
ischämischen Präkonditionierung  
am Kaninchenherzen  
in vivo**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin

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

Jan Ferrari

2005

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab  
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Thämer  
Korreferent: Prof. Dr. Schipke

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einführung .....	1-9
1.1 Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung .....	1
1.2 Bedeutung von $K_{ATP}$ -Kanälen bei der LPC .....	3
1.3 Diabetes mellitus – eine kardiovaskuläre Erkrankung .....	5
1.4 Beim diabetischen Herzen sind endogene Protektions- mechanismen gestört .....	7
1.5 Aufgabenstellung der Studie .....	9
2. Methoden .....	10-23
2.1 Induzieren eines Diabetes mellitus .....	11
2.2 Chirurgische Präparation .....	13
2.3 LPC-Protokoll .....	14
2.4 Myokardinfarktprotokoll .....	16
2.5 Infarktgrößenbestimmung .....	19
2.6 Studienprotokoll .....	20
2.7 Datenverarbeitung .....	21
2.8 Hämodynamische Variablen .....	22
2.9 Statistische Analyse .....	22
2.10 Proteinlevelbestimmung von endothelialer- & induzierbarer Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS, iNOS) .....	23
3. Ergebnisse .....	24-32
3.1 Blutglukosekonzentration .....	24
3.2 Hämodynamische Variablen .....	26
3.3 Risikogebiet & Infarktgröße .....	29
3.4 eNOS- & iNOS-Proteinlevel der Aorta .....	30

4. Diskussion .....	32-37
4.1 Interpretation der Ergebnisse .....	32
5. Methodenkritik .....	37-42
5.1 Einfluss der Infarktgröße auf die funktionelle Erholung des Herzen .....	37
5.2 Dauer der ischämischen Präkonditionierung .....	38
5.3 Blutglukosespiegel .....	39
5.4 Alloxan .....	40
5.5 Infarktgrößenbestimmung und Dauer der Reperfusion .....	40
5.6 eNOS-Proteinlevel .....	41
6. Schlussfolgerung .....	42
7. Zusammenfassung .....	43-44
8. Literaturverzeichnis .....	45-54
9. Danksagung .....	56
10. Lebenslauf .....	57-58

# 1. Einführung

## 1.1 Das Phänomen der ischämischen Präkonditionierung

Kurze subletale Perioden myokardialer Ischämien erhöhen die Toleranz des Myokards gegenüber den Folgen einer längeren Ischämie hinsichtlich der Größe des entstehenden Infarktareals. Dieses Phänomen wurde zuerst von Murry et al. [65] beschrieben und ist seitdem als ischämische Präkonditionierung (Preconditioning [PC]) bekannt. Myokardprotektion durch ischämische Präkonditionierung konnte bisher an allen untersuchten Säugetierspezies nachgewiesen werden [52, 53, 86]. Es gibt zwei Phasen der Protektion; der initiale protektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung tritt unmittelbar nach dem ischämischen Stimulus auf und schützt das Myokard für ca. 1 bis 2 Stunden. Diese Phase der Protektion wird als „klassische Präkonditionierung“ bezeichnet (early preconditioning [EPC]). Vorhergehende Studien [59] haben gezeigt, dass die Myokardprotektion der ischämischen Präkonditionierung ca. 24 Stunden nach der initialen präkonditionierenden Ischämie erneut einsetzt und im Anschluss für etwa 48 Stunden die schädlichen Folgen einer Ischämie-Reperfusionssituation mindert. Diese zweite Protektionsphase wird als „späte Präkonditionierung“ oder „Zweites Fenster der Protektion“ (late preconditioning [LPC]) bezeichnet. Sowohl die frühe als auch die späte Präkonditionierung können durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden; z.B. durch kurze Ischämien [7], pharmakologisch durch Stickstoffmonoxid (NO)-Donatoren wie Nitroglycerin [51], oder aber durch Aktivierung von myokardialen Adenosin-[45],  $\alpha$ -adrenergen-[85], muskarinischen-[91], Opioid-[76], Bradykininrezeptoren [32] (pharmakologisch induziertes PC). Die zugrunde liegenden zellulären Mechanismen beider Phasen der Präkonditionierung sind in vielen wissenschaftlichen Studien untersucht worden, jedoch noch nicht

vollständig geklärt. Man weiß lediglich, dass neben vielen anderen Schritten EPC auf einer Öffnung der mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle) beruht. Über die Freisetzung von Sauerstoffradikalen kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Dies führt zu einer Aktivierung von Tyrosin- und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen), die auf einen noch unbekanntem Effektor wirken, der das Herz vor einem Ischämie-/Reperfusionsschaden schützt [18]. Die Myokardprotektion der LPC wird mit der Neusynthese von Stressproteinen [58] und Antioxidantien [95] in Verbindung gebracht. Aber auch die  $K_{ATP}$ -Kanäle scheinen während des „zweiten Fensters der Protektion“ eine entscheidende Rolle zu spielen [64] (siehe Bedeutung von  $K_{ATP}$ -Kanälen in der LPC, Seite 3).

Eine Reihe von Untersuchungen legt nahe, dass es eine Myokardprotektion durch Präkonditionierung auch beim Menschen gibt. Arstall et al. zeigten an isolierten Herzmuskelzellen des Menschen protektive Effekte sowohl durch klassische als auch durch späte Präkonditionierung in vitro [3]. Klöner et al. zeigten in ihrer retrospektiven Datenauswertung bei Patienten mit akutem Herzinfarkt, dass diejenigen, die innerhalb von 48 Stunden vor dem Infarkt eine Angina-pectoris-Symptomatik hatten, eine signifikant geringere Infarktgröße aufwiesen als die Vergleichsgruppe ohne vorausgegangene Symptomatik [47, 49]. Dies könnte als Hinweis gedeutet werden, dass späte Präkonditionierung auch das menschliche Myokard schützt.

Erleidet ein Patient also einen akuten Myokardinfarkt (MI), wird eine pectanginöse Vorgeschichte und die dadurch hervorgerufene ischämische Präkonditionierung in Form einer LPC, als ein wichtiger kardioprotektiver Mechanismus angesehen [49,69].

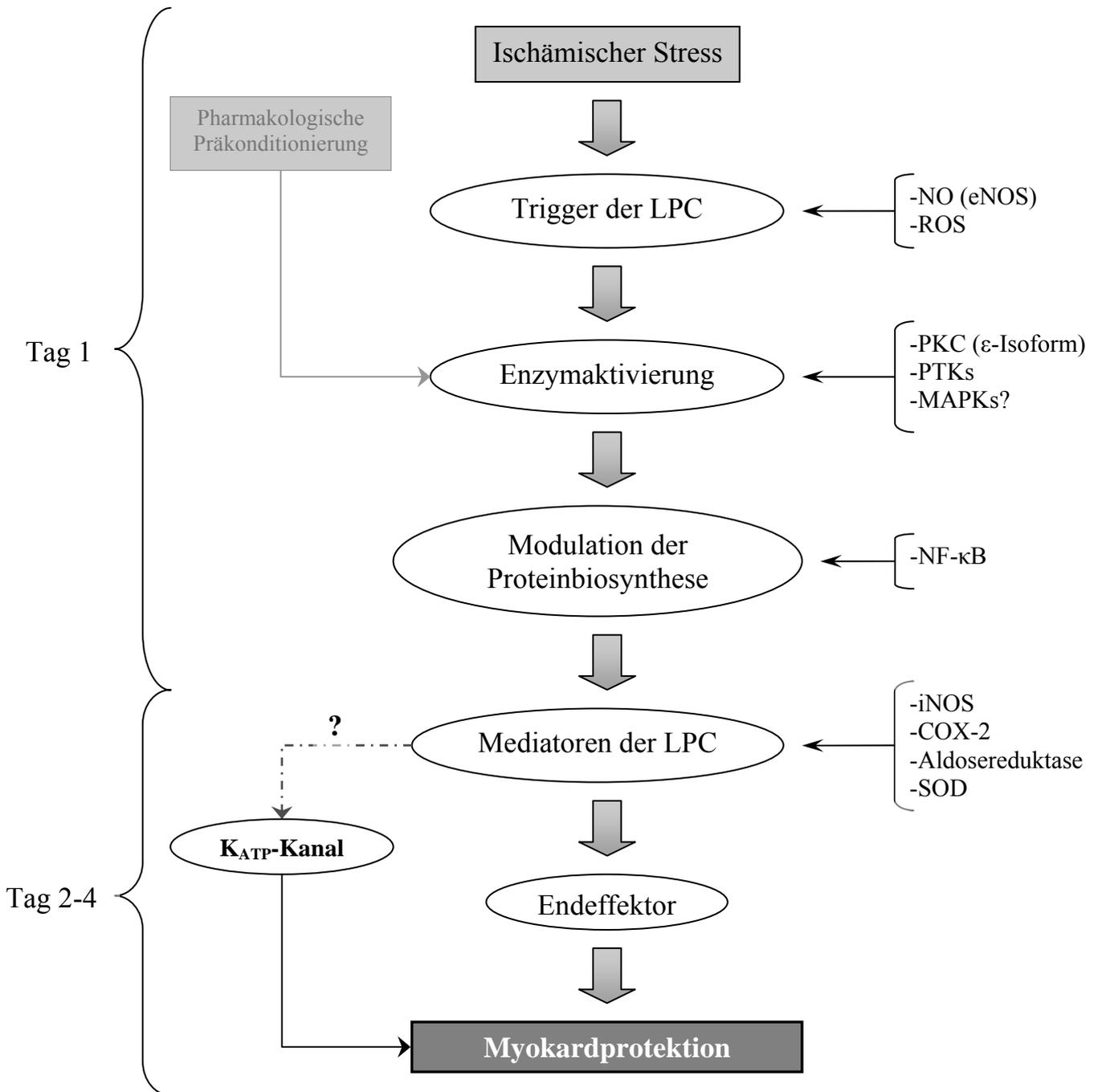
## 1.2 Bedeutung von $K_{ATP}$ -Kanälen bei der LPC

Bei der Vermittlung sowohl der klassischen als auch der späten Präkonditionierung spielt die Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen eine entscheidende Rolle, wobei ich hier auf den Mechanismus der Signaltransduktion der von uns durchgeführten LPC näher eingehen will.

Bei der mittlerweile weitgehend akzeptierten Stickstoffmonoxidhypothese von Bolli et al. wird postuliert, dass die ischämische Präkonditionierung in der späten Phase (LPC) zu einer erhöhten Produktion von NO und reaktiven Sauerstoffradikalen führt [8, 10]. Diese chemischen Stoffe dienen als „Trigger“ der LPC; sie aktivieren eine komplexe Signaltransduktionskaskade, innerhalb derer die Proteinkinase C (PKC), Tyrosinkinasen und möglicherweise MAP-Kinasen aktiviert werden. Diese Enzymaktivierung führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, was zu einer erhöhten Transkription verschiedener kardioprotektiver Gene und einer vermehrten Synthese verschiedener kardioprotektiver Proteine führt. Zu diesen „Mediatoren“ der LPC, werden neben der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), der endothelialen NO-Synthase (eNOS) auch die Cyclooxygenase-2 (COX-2), die Aldosereduktase und die Superoxiddismutase (SOD) gezählt. Sasaki et al. zeigten den direkten Einfluss einer gesteigerten NO-Produktion auf die  $K_{ATP}$ -Kanalaktivität in Herzmuskelzellen [74]. Die Öffnung von  $K_{ATP}$ -Kanälen vermittelt LPC, welche durch Ischämie [7], Monophosphoryl Lipid A [78], Aktivierung von Adenosinrezeptoren [45] und Opioiden [76] induziert werden kann.

Die Signaltransduktionskaskade der LPC ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

**Abb. 1:** Schematische Darstellung der vermuteten LPC-Signaltransduktionskaskade



NO:	Stickstoffmonoxid	ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies
eNOS:	endotheliale-Stickstoffmonoxid-Synthase	PKC:	Protein Kinase C
iNOS:	induzierbare-Stickstoffmonoxid-Synthase	PTKs:	Tyrosinkinase
MAPKs:	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	COX2:	Cyclooxygenase-2
NF-κB:	Transkriptionsfaktor	K <sub>ATP</sub> -Kanal:	ATP-sensitiver Kaliumkanal
SOD:	Superoxiddismutase		

Modifiziert nach Bolli et al., Circulation Research 2000: 972-983

### 1.3 Diabetes mellitus – eine kardiovaskuläre Erkrankung

Die Gesamtprävalenz des Diabetes mellitus betrug in Deutschland im Jahre 1990 3,5-4 Millionen Personen, was ca. 4,5% der Gesamtbevölkerung entsprach. In einer repräsentativen Bevölkerungsstichprobe (1999) wird anhand von HbA<sub>1c</sub>-Messungen eine Gesamthäufigkeit des Diabetes in Deutschland von ca. 8,2%, ungefähr 6,7 Millionen Menschen, angenommen [70]. Hierbei sind 93-95% der Fälle dem Typ II-Diabetes zuzurechnen. Für das Jahr 2010 ergibt eine Hochrechnung, dass etwa jeder 10. Deutsche Diabetiker ist. Der Diabetes nimmt also an Häufigkeit zu, was einerseits damit einhergeht, dass die Menschen aufgrund des Fortschritts der Medizin immer älter werden, andererseits die Bevölkerung der Industriestaaten immer mehr eine Lebensweise der Überernährung und mangelnden körperlichen Aktivität pflegt.

Nach Stellungnahme der American Heart Association (AHA) ist der Diabetes mellitus als eine kardiovaskuläre Erkrankung anzusehen [30]. Diese zunächst überraschende, aber durchaus zutreffende Charakterisierung entspricht einem Paradigmenwechsel von der Stoffwechselerkrankung hin zur kardiovaskulären Erkrankung Diabetes. Das Risiko des Todes durch ein diabetisches Koma ist heutzutage sehr viel geringer geworden [40]. Zugenommen jedoch haben die wesentlichen Spätkomplikationen des Diabetes in Form von degenerativen kardiovaskulären Veränderungen. Die kardiovaskuläre Erkrankung ist die häufigste Komplikation beim Typ II Diabetes und mit 66% die Haupttodesursache in diesem Patientenkollektiv [71]. Hiervon wiederum sind 75% auf die koronare Herzkrankheit (KHK) zurückzuführen, wobei der akute Myokardinfarkt hier als Todesursache im Vordergrund steht [62]. Diabetische Myokardinfarktpatienten haben nicht nur in der akuten Phase eine höhere Mortalität [36, 80] als Nichtdiabetiker, sondern auch in der Langzeit-Beobachtung [33, 63, 77]. Es ist also offensichtlich, dass der Diabetes durch

seine Endorganschäden keine rein endokrine Erkrankung bleibt, sondern sich zu einer vorrangig kardiovaskulären Erkrankung entwickelt. Hierunter sollte jedoch nicht nur die KHK verstanden werden. Eine Vielzahl weiterer Diabetesbedingter Veränderungen, welche die gesamten Strukturelemente des Herzens betreffen, beeinflussen direkt oder indirekt den Verlauf der kardialen Erkrankung – auch bekannt als diabetische Kardiopathie.

Zu diesen Veränderungen gehören:

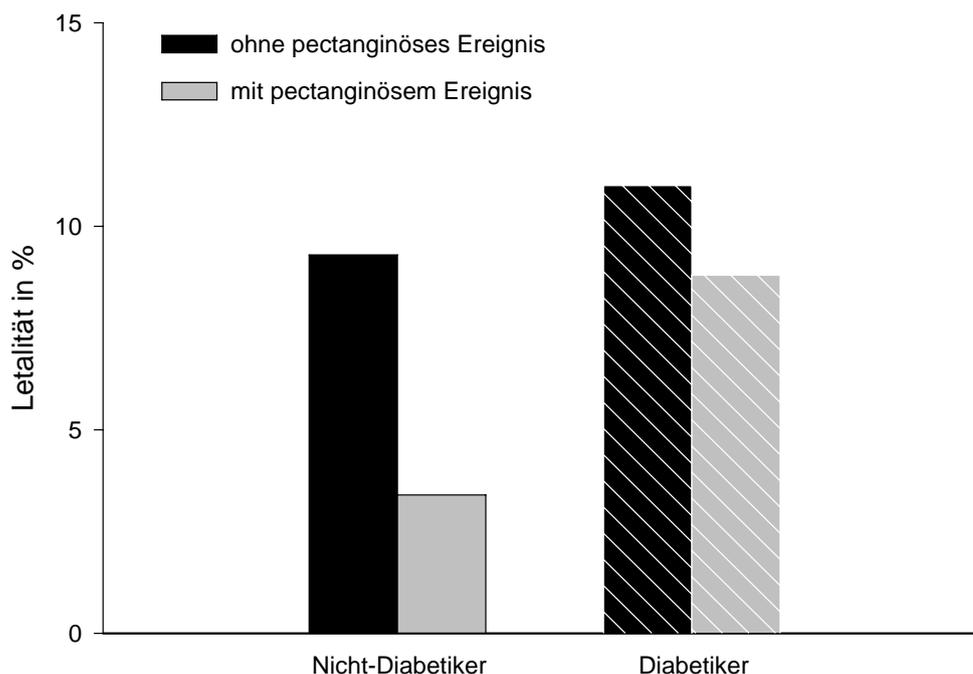
- die Makroangiopathie im Sinne einer KHK: Diabetiker haben eine höhere Prävalenz der Atherosklerose [27] und eine reduzierte Compliance der Koronarien [83];
- die diabetische Mikroangiopathie mit ihrer Endotheldysfunktion und einer eingeschränkten Koronarreserve [22, 66, 96];
- ein Ungleichgewicht der Hämostase: Hyperkoagulabilität [1, 13] und Thrombopathie [2, 16] bei gestörter Fibrinolyse [37];
- ein veränderter myokardialer Metabolismus und Energiehaushalt [79,82];
- eine vermehrte Fibrosierung des Myokards [17, 24, 87] bei erhöhter linksventrikulären Muskelmasse [29, 81] trotz gleicher Blutdruckwerte;
- die diabetische autonome Neuropathie und ihre kardiale Beeinflussung [93].

#### 1.4 Beim diabetischen Herzen sind endogene Protektionsmechanismen (in Form einer ischämischen Prækonditionierung) gestört

Beim Diabetiker scheint ein kardioprotektiver Effekt im Sinne einer durch eine pectanginöse Vorgeschichte hervorgerufenen ischämischen Prækonditionierung nicht oder nur sehr eingeschränkt zu existieren.

In einer klinischen Studie fanden Ishihara et al. heraus, dass Myokardinfarkt(MI)-Patienten, die 24 Stunden vor dem akuten Ereignis eine pectanginöse Episode erlitten hatten, niedrigere Spitzen-Creatinkinase-Werte, eine bessere linksventrikuläre Funktion und eine geringere Mortalität zeigten, als solche ohne ein pectanginöses Ereignis. Dieser Effekt zeigte sich bei dem diabetischen Patientenkollektiv jedoch nicht [34] (siehe Abbildung 2), wobei es sich um Nicht-Insulin (diätisch und oral antidiabetisch) behandelte Typ II Diabetiker handelte; Blutzuckerwerte sind von Ishihara et al. nicht angegeben.

**Abb.2:** MI-Krankenhausletalität mit und ohne pectanginöser Episode



modifiziert nach Ishihara, et al. J AM Coll Cardiol 2001, 38: 1007-11

Wie verschiedene Studien belegen, scheint die Hyperglykämie, ein häufiges Erscheinungsbild in der akuten Phase eines Myokardinfarktes, ein wichtiger Prädiktor im weiteren klinischen Verlauf zu sein. Sie korreliert mit einer erhöhten Mortalität, was sowohl bei Diabetikern [38, 50, 57], als auch bei Nichtdiabetikern [6, 38] gezeigt werden konnte. Im Tierversuch konnten Kersten et al. an Hunden zeigen, dass Hyperglykämie den kardioprotektiven Effekt der LPC blockiert [43]. Dies scheint am wahrscheinlichsten durch eine Blockierung der am Herzen vorkommenden ATP-abhängigen Kaliumkanälen hervorgerufen zu werden. Da auch bei der Vermittlung der durch die LPC hervorgerufenen Kardioprotektion, welche klinisch von größerem Interesse ist,  $K_{ATP}$ -Kanäle eine zentrale Rolle spielen [64], ist denkbar, dass Hyperglykämie und Diabetes mellitus (DM) ebenso den kardioprotektiven Effekt der LPC blockieren könnten. In einer von unserem Institut durchgeführten Studie konnte an Kaninchenherzen eine Blockierung der LPC durch eine akute Hyperglykämie (600 mg/dl) nachgewiesen werden [20].

Eine vollständige Aufklärung des Pathomechanismus der LPC und der Form, in welcher eine Hyperglykämie im Sinne eines DM eingreift, könnte für die Klinik einen großen Nutzen haben. Speziell beim Diabetiker wäre es nötig, geeignete Behandlungsstrategien zu entwickeln. Da Diabetiker durch ihren schlechten Gefäßstatus häufig unter einer KHK leiden (nahezu 50 Prozent der Todesursachen [38]) ist es wichtig abzuklären, in welcher Weise ein schlecht eingestellter Blutzucker einen körpereigenen Schutzmechanismus, wie die ischämische Präkonditionierung, beeinflusst oder unterdrückt, und wie man evtl. pharmakologisch eingreifen könnte.

## 1.5 Aufgabenstellung der Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, an Kaninchenherzen *in vivo* zu untersuchen, ob eine chronische Hyperglykämie in Form eines Alloxan-induzierten DM die Kardioprotektion der LPC blockiert, und in wie weit sich dies durch eine akute Insulinbehandlung beeinflussen lässt.

Da Diabetes die Verfügbarkeit von NO zu reduzieren scheint [26, 94], und NO eine entscheidende Rolle als Mediator der LPC hat [10], bestimmten wir bei den diabetischen Tieren mithilfe des Westernblot-Verfahrens die Proteinlevel sowohl der induzierbaren- als auch der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS, eNOS) der Aorta (siehe Proteinlevelbestimmung der endothelialen und induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase, Seite 23).

Als Versuchstier wurde das Kaninchen gewählt, weil es bei ihm zwischen den einzelnen Koronararterien keine relevanten Kollateralen gibt [60]. Bei der Infarktgrößenauswertung musste somit keine Kollateralversorgung gemessen und berücksichtigt werden.

## 2. Methoden

Die Studie wurde nach Genehmigung durch den Regierungspräsidenten Düsseldorf an 61 narkotisierten weißen Neuseeländerkaninchen (NZW) durchgeführt. Die Tiere wurden randomisiert einer von insgesamt sechs Gruppen zugeteilt (siehe Studienprotokoll Seite 21).

Zu Beginn versetzten wir die Kaninchen der Gruppen DM, DM+LPC, DM+Insulin (I) und DM+LPC+I (n=40) für ca. 5-6 Wochen in eine diabetische Stoffwechsellage (siehe Induzieren eines DM, Seite 11). Daraufhin wurden die Tiere aller Versuchsgruppen (n=61) in einer ersten Operation mit einem Koronararterienokkluder chronisch instrumentiert. Hierbei wurde unter Allgemeinanästhesie nach einer lateralen Thorakotomie ein Hauptast der linken Koronararterie mit 2 Fäden umstochen, und die zwei Fadenpaare durch einen Tubus aus den Thorax geleitet (siehe chirurgische Präparation). Nach einer 7-10tägigen Erholungsphase wurde mit Hilfe des Okkluders an wachen Tieren der LPC-, der DM+LPC- und der DM+LPC+I-Gruppen eine regionale kurze 5-minütige Myokardischämie zur Induktion der LPC ausgelöst (siehe LPC Protokoll). 24 Stunden nach der kurzen Myokardischämie wurde an allen Gruppen eine zweite Operation durchgeführt. In dieser wurden die narkotisierten Tiere zur Messung der hämodynamischen Werte instrumentiert und mit Hilfe des Okkluders einer langen 30-minütigen Myokardischämie (i. S. eines akuten Myokardinfarktes) mit anschließender 120-minütiger Reperfusion ausgesetzt (siehe Infarktprotokoll). Die Tiere der Gruppen DM+I und DM+LPC+I wurden unmittelbar 90 Minuten vor der langen Ischämie intravenös mit Schweineinsulin behandelt um die Blutglukose unter 200 mg/dl zu senken (siehe Studienprotokoll).

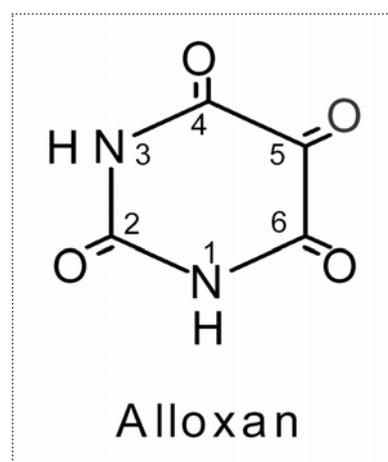
## 2.1 Induzieren eines Diabetes mellitus

5-6 Wochen vor der Instrumentierung mit dem Koronararterienokkluder induzierten wir bei den Tieren der entsprechenden Gruppen (siehe Studienprotokoll) einen Diabetes mellitus (DM). Hierzu punktierten wir unter Lokalanästhesie mit einer Lidocain- und Prilocainhaltigen Salbe (EMLA®) eine laterale Ohrvene und verabreichten den Tieren 100 mg/kg Alloxan intravenös (ALX; Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, DE).

2-3 Tage nach der ALX-Behandlung wurden die Tiere diabetisch, definiert anhand einer Blutglukosekonzentration von mehr als 250 mg/dl; Blutzuckernormalwerte von Kaninchen liegen bei 112-135 mg/dl [61]. Der Blutzucker der Kaninchen wurde täglich mit einem Blutzuckermessgerät (Accu-Chek Sensor System; Roche Diagnostics GmbH, Basel, CH) kontrolliert um sicher zu gehen, dass innerhalb der 5-6 Wochen der Blutglukosewert nicht unter das definierte Minimum sank.

Alloxan (2,4,5,6-Tetraoxypyrimidine;  $C_4H_2N_2O_4$ ; siehe Abbildung 3), ein Pyrimidinabkömmling und strukturell verwandt mit Barbitur- und Harnsäure, ist ein klassisches Diabetogen, welches spezifisch die  $\beta$ -Zellen des Pankreas zerstört.

**Abb.3:** Alloxan-Strukturformel



Nach Gabe einer einzigen, diabetogenen ALX-Dosis zeigt der Blutglukosespiegel einen charakteristischen, 3-phasigen Verlauf [15]:

1. eine frühe, deutliche Hyperglykämie von 1-4-stündiger Dauer, die aufgrund eines plötzlichen Stopps der Insulinsekretion hervorgerufen wird;
2. eine mehr oder weniger starke Hypoglykämie von 6-12-stündiger Dauer, verursacht aufgrund einer massiven Insulinfreisetzung aus den geschädigten und absterbenden  $\beta$ -Zellen;
3. eine lebenslange chronische Hyperglykämie nach 24-48 Stunden, die gekennzeichnet ist durch subnormale bis nicht mehr detektierbare Plasmainsulinspiegel und Symptome, die dem Typ I DM des Menschen sehr ähnlich sind (Hyperglykämie, Glucosurie, Polydipsie, Polyurie und Gewichtsverlust).

Histologisch treten innerhalb von 24 Stunden nach einer ALX-Behandlung massive  $\beta$ -Zellnekrosen auf [4, 11, 39]. Für die  $\beta$ -Zellspezifität wird die schnelle und hohe Akkumulation von ALX in das endokrine Pankreas, speziell der  $\beta$ -Zellen, verantwortlich gemacht [31].

Das toxische Potential von ALX besteht vorwiegend in der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [73]; hauptsächlich Superoxidanionen-, Wasserstoffperoxid- und Hydroxylradikalen.

## 2.2 Chirurgische Präparation

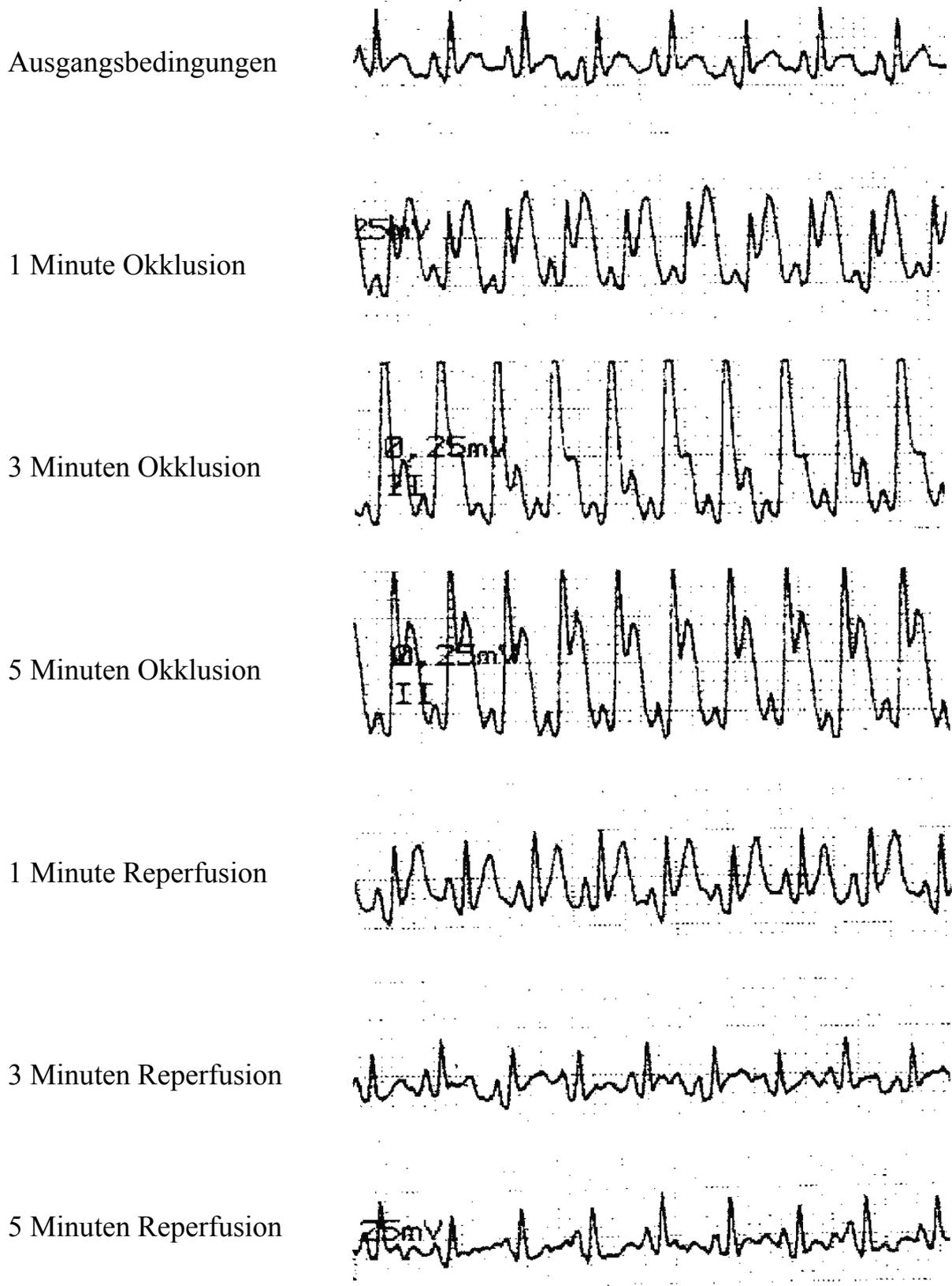
Bei allen 61 Tieren (Gruppen siehe Studienprotokoll) mit einem Gewicht von 2,5-3,2 kg (Mittelwert 2,8kg) wurde nach Lokalanästhesie mit einer Lidocain- und Prilocainhaltigen Salbe (EMLA<sup>®</sup>) die laterale Ohrvene punktiert um daraufhin die Anästhesie intravenös (i.v.) mit Propofol (DISOPRIVAN<sup>®</sup>, 10mg/kg KG) einzuleiten. Zusätzlich bekamen die Tiere eine intramuskuläre (i.m.) S-Ketamin-Injektion (30mg/kg KG). Die Trachea wurde mit einem Tubus (Innendurchmesser 3,0 mm) intubiert und mit einem Neugeborenenbeatmungsbeutel beatmet. Die linke Thoraxwand wurde rasiert und die Haut mit einem Antiseptikum (BRAUNOL<sup>®</sup>) desinfiziert. Anschließend wurden die Tiere in den Operationssaal gebracht und die Lunge maschinell ventiliert (Sulla 808, Dräger AG, Lübeck, Deutschland). Abhängig vom endtidal gemessenen CO<sup>2</sup>-Gehalt (Datex Capnomac Ultima, Division of Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland), der bei 35 mmHg liegen sollte, wurde die Beatmungsfrequenz zwischen 30-35 /min und das Hubvolumen zwischen 15 und 20 ml eingestellt. Durch die Beimengung von 2-4 Vol% Isofluran (ISOFLURAN<sup>®</sup>) zum Atemgasgemisch wurde die Anästhesie aufrechterhalten und anhand des Fehlens von Reflexen die ausreichende Narkosetiefe festgestellt. Alle chirurgischen Eingriffe wurden unter der Einhaltung steriler Kautelen durchgeführt. Als Infektionsprophylaxe erhielten die Tiere präoperativ Cephazolin i.v. (GRAMAXIN<sup>®</sup>, 35 mg/kg KG).

Durch eine linksseitige Thorakotomie im vierten Interkostalraum wurde erst der Thorax und anschließend die Herzhöhle durch eine perikardiale Inzision eröffnet. Nach Aufsuchen des Hauptastes der linken Koronararterie wurde sie mit zwei 5-0 Prolenenähten atraumatisch (Ethicon 5/0, 1-metrisch, TF) umstochen. Der Abstand der beiden Ligaturen betrug maximal 1 mm. Im Regelfall erfolgte die Umstechung der Koronararterie im proximalen Viertel. Ein Spiraltubus (2,5 mm Innendurchmesser, Mallinckrodt Medical, Athlone,

Irland) wurde durch subkutanes Tunneln zwischen beiden Schulterblättern nach Außen geführt und an der Haut fixiert, das intrathorakale Ende des Tubus in der Nähe der beiden Koronarumstechungen am Perikard mit einer Naht fixiert. Beide Fadenpaare wurden durch den Tubus gezogen, so nach außen geleitet und anschließend der Tubus mit Vaseline gefüllt, um die Ausbildung eines Pneumothorax zu verhindern. Unter Luftaspiration verschlossen wir den Thorax Schicht für Schicht und versorgten die Wunde mit einem sterilen Verband. Postoperativ erhielten die Tiere Piritramid (DIPIDOLOR<sup>®</sup>, 2 mg/kg KG) als Analgetikum sowie das Antibiotikum Amoxicillin (DUPHAMOX<sup>®</sup>, 15 mg/kg KG) zur Infektionsprophylaxe. Abschließend bekamen die Kaninchen eine Weste angelegt (Kaninchen Weste, Größe M, Byron, Grand Island, NY, USA) um einen Schutz der Wunde als auch des Tubus zu gewährleisten.

### 2.3 LPC-Protokoll

Nachdem sich die Tiere innerhalb von 7-10 Tagen von dem operativen Eingriff erholt hatten, wurde unter elektrokardiographischer (EKG) Kontrolle (SC 9000, Siemens AG, Düsseldorf, Deutschland) bei wachen Tieren der LPC-, DM+LPC- und der DM+LPC+I-Gruppe (siehe Studienprotokoll) ein Fadenpaar für 5 Minuten straff zugezogen. Hierdurch kam es zu einer Okklusion der Koronararterie mit nachfolgender Ischämie des abhängigen Versorgungsgebietes. Diese wurde durch eine ST-Streckenhebung im EKG bestätigt. Anschließend wurde das zugezogene Fadenpaar vollständig gezogen, um eine sichere Reperfusion zu gewährleisten, welche innerhalb von 5 Minuten anhand der EKG-Normalisierung objektiviert wurde (siehe Abbildung 4). Während der Okklusion hielten wir mögliche Stressoren der Umgebung wie Lärm oder Unruhe so gering wie möglich; die Tiere verhielten sich dabei ruhig.

**Abb. 4:** EKG während der späten Präkonditionierung (LPC)

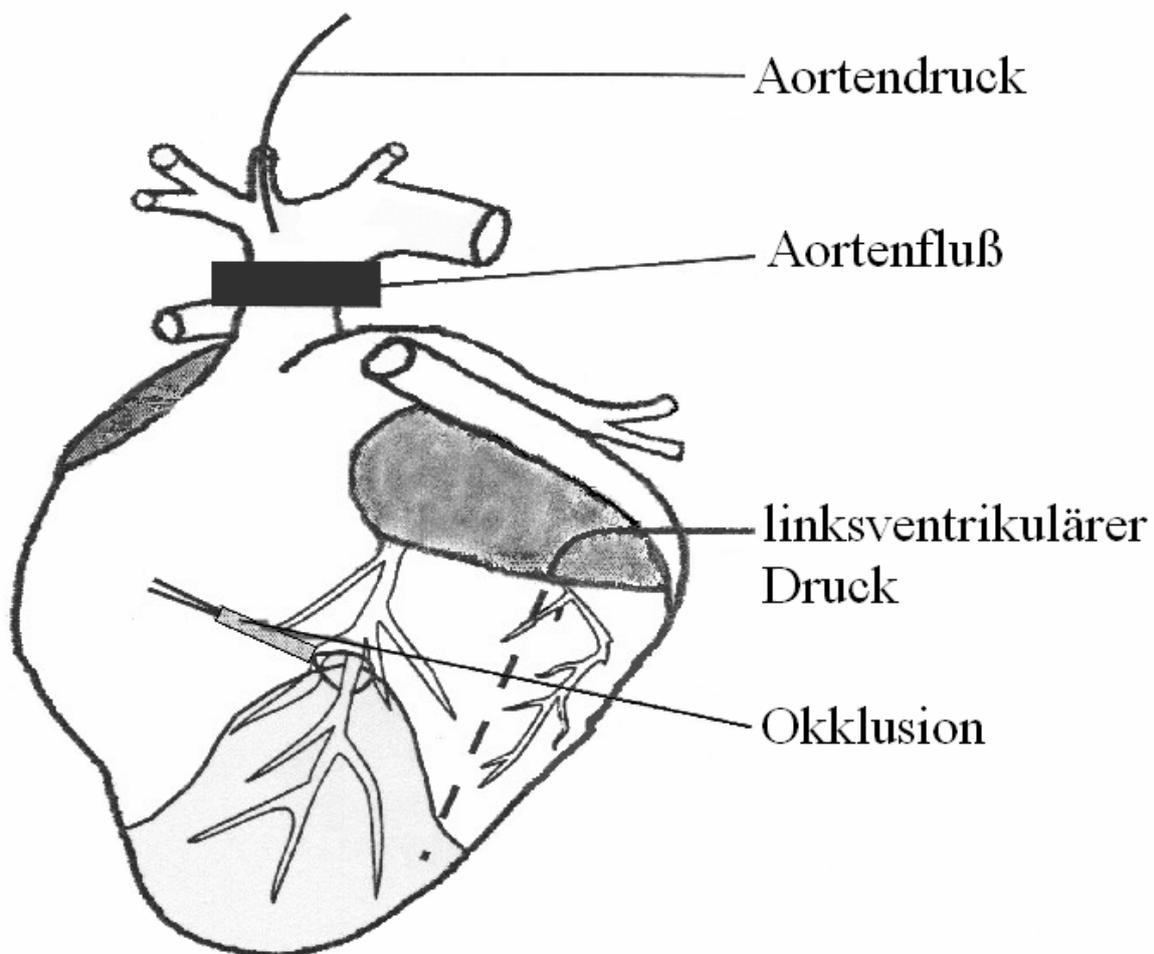
## 2.4 Myokardinfarkt-Protokoll

Zu Beginn erhielten alle Tiere einen venösen Zugang (siehe chirurgische Präparation). Die Tiere der DM+I- und der DM+LPC+I-Gruppe erhielten eine intravenöse Schweineinsulingabe (Insulin S Hoechst, Aventis Pharma, Straßburg, Frankreich), um die Blutglukose unter 200 mg/dl zu senken. Diese Behandlung erfolgte ca. 90 Minuten vor der 30 minütigen Ischämie am noch wachen Tier.

Schließlich erfolgte die Narkoseeinleitung bei allen Tieren erneut mit Propofol (10 mg/kg KG). Intubation und maschinelle Beatmung erfolgten wie beschrieben. Nun wurde jedoch zur Aufrechterhaltung der Narkose den Tieren eine i.v. Dauerinfusion  $\alpha$ -Chloralose (40 mg/kg KG \*h) verabreicht. Zur Bestimmung von Hämatokrit, Glukose- und Hämoglobinkonzentration wurden in regelmäßigen Intervallen Blutanalysen durchgeführt. Anhand von ausbleibenden Muskelbewegungen und fehlender hämodynamischer Reaktion auf chirurgische Stimuli wurde eine suffiziente Narkosetiefe nachgewiesen. Nach Punktion der rechten Vena jugularis communis mit einer Venenverweilkanüle (VENFLON™, 1,2 mm, Becton Dickinson, Helsingborg, Schweden) erhielten die Tiere die Dauerinfusion einer physiologischen Kochsalzlösung (15ml/kg KG \*h), um den intraoperativen Blut- und Flüssigkeitsverlust zu kompensieren. Zur kontinuierlichen Aortendruckmessung wurde ein 20-Gauge Teflonkatheter über die linke Arteria carotis communis in den Aortenbogen eingeführt, mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllt und mit einem Drucktransducer (AoP, Statham transducer, PD23, Gould, Cleveland, Ohio, USA) verbunden. Nach medianer Thorakotomie und Eröffnung des Perikards brachten wir an der Aorta ascendens einen Ultraschallflussmesskopf (4S, T2008, Transonic System Inc., Ithaca, NY, USA) an, um das Herzzeitvolumen (HZV) abzüglich der Koronardurchblutung messen zu können. Über den linken Vorhof wurde ein Katheterspitzenmanometer (SPC-340, Millar Instruments, Houston,

USA) in den linken Ventrikel eingeführt. Hiermit wurde der linksventrikuläre Druck gemessen. Aus dem Signal wurde  $dP/dt$  abgeleitet. Das verbliebene Fadenpaar wurde aufgesucht, freipräpariert und ein kleines Plastikröhrchen (Okkluder) darüber gezogen um später die Koronararterie für die Auslösung der 30-minütigen Ischämie verschließen zu können. Abbildung 5 zeigt schematisch das Herz nach der Versuchspräparation.

**Abb. 5:** Herz nach Versuchspräparation



Die zentrale Körpertemperatur wurde in der Thoraxhöhle gemessen (GTH1160, Digital Thermometer, Geisinger Electronic, Deutschland) und bei Bedarf mit Hilfe einer Wärmematte und Infrarotlampe konstant zwischen 38,3 °C und 38,7 °C gehalten.

Nach einer 15-minütigen Stabilisierungsphase wurden die hämodynamischen und hämatologischen Ausgangswerte (Baseline) registriert (siehe Tabelle 1). Diese Messungen wurden regelmäßig bis zum Ende des Versuchs durchgeführt. Die Tiere aller Gruppen wurden schließlich der 30-minütigen Myokardischämie unterzogen indem der Okkluder zugezogen wurde. Der Erfolg der Okklusion wurde anhand der sofort auftretenden epikardialen Zyanose im abhängigen Versorgungsgebiet und den unter einer Oberflächen-EKG-Kontrolle (siehe oben) auftretenden ST-Hebungen verifiziert. Während der Okklusion eventuell auftretendes Kammerflimmern wurde mit sofortiger interner elektrischer Defibrillation (5 Joule, DCS261 Defibrillator, Piekser, Ratingen, Deutschland) therapiert. Nach 30 Minuten wurde durch Öffnung des Okkluders die 120-minütige Reperfusionphase eingeleitet. Diese wurde anhand des zuvor zyanotischen und nun hyperämisch erscheinenden Segmentes und dem Rückgang der ST-Hebungen verifiziert.

## 2.5 Infarktgrößenbestimmung

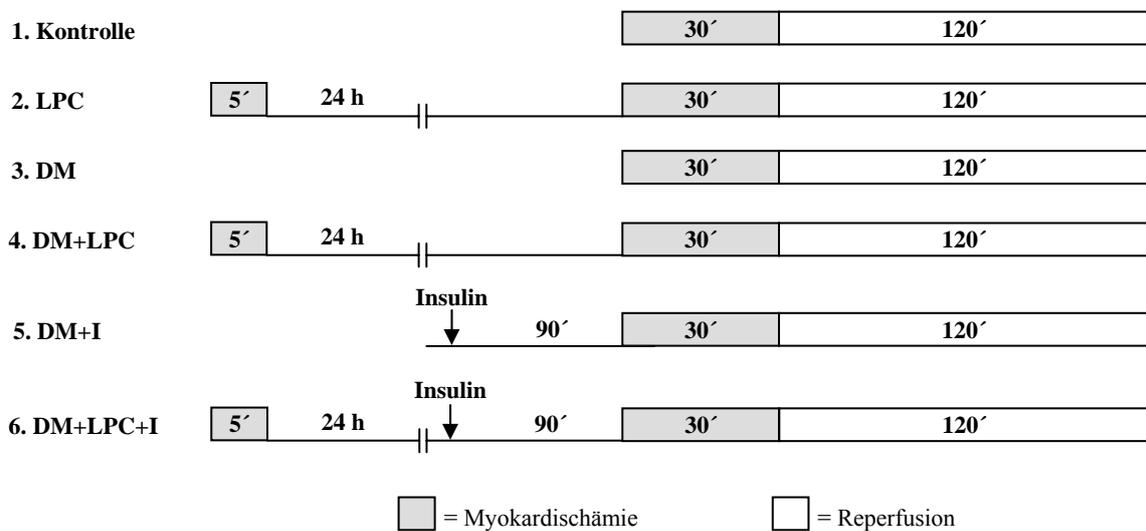
Am Ende der 120-minütigen Reperfusion erfolgte eine letale i.v. Trapanal-Injektion (35 mg/kg KG), mit welcher wir das Herz zum Stillstand brachten, um anschließend möglichst zügig herauspräpariert, an eine modifizierte Langendorff-Apparatur angebracht und so dem Färbevorgang überführt zu werden. Die Apparatur bestand aus einer Knopfkanüle, verbunden mit einem 3-Wege-Hahn, an den jeweils eine 0,9%ige NaCl- sowie eine 0,2%ige Evans-Blau-Infusion angeschlossen waren. Das frisch entnommene Herz wurde nun an dem Aortenstumpf mit der Knopfkanüle verbunden, das distale Ende der Kanüle über der Aortenklappenebene positioniert, um so selektiv die Koronararterien retrograd und luftfrei mit den Lösungen (siehe oben) perfundieren zu können. Zuerst perfundierten wir das Herz für ca. 5 Minuten mit Kochsalzlösung bei einem Perfusionsdruck von ca. 100 cm Wassersäule. Hierdurch wurden verbliebene Blutreste aus den Koronarien ausgewaschen. Anschließend wurde der verbliebene Okkluder zugezogen und das Herz für ca. 10 Minuten mit der Evans-Blau-Lösung und selbigem Perfusionsdruck retrograd durchspült. Erneute Perfusion mit NaCl-Lösung wusch intravaskulär verbliebene Evans-Blau-Reste aus. Durch dieses Verfahren verblieb das ischämisch-reperfundierte Gebiet (Risikogebiet) als einziger Bereich ungefärbt.

Anschließend wurden die Herzen durch transversale Schnitte in 2 mm dicke Scheiben geschnitten und der rechte Ventrikel entfernt, da sich alle Auswertungen nur auf den linken Ventrikel beziehen. Hiernach inkubierten wir alle Scheiben für 15 Minuten bei 38 °C in einer gepufferten Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC). Mit dieser Färbung erschien vitales Gewebe rot, nekrotisches Gewebe hingegen ungefärbt. Die Größe des linken Ventrikels, des Risiko- und des Infarktgebietes wurden mittels EDV-unterstützter Planimetrie bestimmt. Nach dem Trocknen (24 Stunden im Wärmeschrank bei 45 °C) wurde bei allen Scheiben das Gewicht bestimmt. Die

durch die Planimetrie bestimmten Flächen wurden nun im entsprechenden Verhältnis zum Trockengewicht der entsprechenden Scheibe als Gewichte errechnet. Die Infarktgrößen entsprechen also den gemessenen Gewichtsverhältnissen und werden in Gewichts-Prozent des Risikogebietes angegeben (siehe Risikogebiet und Infarktgröße, Abb. 11, Seite 29).

## 2.6 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll ist in Abb. 6 dargestellt. 61 Tiere (NZW, 2,5-3,2 kg KG, Mittelgewicht 2,8 kg) wurden vor Studienbeginn randomisiert einer der 6 Versuchsgruppen zugeteilt. Bei allen Kaninchen wurde eine 30 min Myokardischämie (Indexischämie) ausgelöst, der eine 120 min Reperfusion folgte. Bei der LPC- (n=10), DM+LPC- (n=11) und die DM+LPC+I-Gruppe (n=9) wurden durch eine 5-minütige Myokardischämie 24 Stunden vor der Indexischämie eine ischämische Präkonditionierung induziert (siehe LPC-Protokoll, Seite 14). In den Gruppen DM+I (n=10) und DM+LPC+I (n=9) wurden die wachen Tiere zusätzlich 90 Minuten vor der Indexischämie intravenös mit Schweineinsulin (Insulin S Hoechst, Aventis Pharma, Straßburg, Frankreich) behandelt, um die Blutglukose unter einen Wert von 200mg/dl zu senken. Die Tiere der DM- (n=10) und der Kontrollgruppe (n=11) wurden nicht präkonditioniert (keine LPC).

**Abb. 6:** Studienprotokoll

Kontrolle:	n=11		
LPC:	n=10		
DM:	n=10	LPC	: späte ischämische Präkonditionierung
DM+LPC:	n=11	DM	: Diabetes Mellitus
DM+I:	n=10	I	: i.v. Insulinbehandlung
DM+LPC+I:	n=09		

## 2.7 Datenverarbeitung

Der linksventrikuläre Druck (LVP), dessen erste Ableitung nach der Zeit (dP/dt), der Aortendruck und das Herzzeitvolumen (Aortenfluss) wurden kontinuierlich mittels eines Mehrkanalschreibers (Recorder 2800, Gould, Cleveland, Ohio, USA) registriert. Zu festgelegten Messzeitpunkten wurden die Daten mit einem analog-zu-digital Konverter (Data Translation, Marlboro, MA, USA) digitalisiert und auf einem Personalcomputer weiterverarbeitet.

## 2.8 Hämodynamische Variablen

Linksventrikulärer systolischer Spitzendruck (LVSSD) und die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{\max}$ ) wurden als Maß für die globale systolische Funktion gemessen. Das Minimum  $dP/dt$  ( $dP/dt_{\min}$ ) definierte das Ende der Systole. Der steile Anstieg des  $dP/dt_{\max}$  markierte das Ende der Diastole. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDD) und die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation ( $\tau$ ) wurden zur Beurteilung der linksventrikulären diastolischen Funktion herangezogen. Die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation ( $\tau$ ) wurde anhand folgender Formel errechnet:

$P_{(t)} = P_0 \exp(-t/\tau)$ , wobei  $P_{(t)}$  der Druck zum Zeitpunkt  $t$  ist,  $P_0$  der LVEDD und  $\tau$  die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation. Das Produkt aus Herzfrequenz (HF) und linksventrikulärem Spitzendruck (LVSD) (rate-pressure-product, RPP) wurde als Determinante des myokardialen Sauerstoffverbrauches berechnet. Der systemische vaskuläre Widerstand (SVR) wurde aus dem mittleren Aortendruck ( $AoP_{\text{mean}}$ ) und dem Herz-Zeit-Volumen (HZV) unter der Annahme berechnet, dass der rechtsatriale Druck bei geöffnetem Thorax 0 mmHg beträgt.

## 2.9 Statistische Analyse

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Zum statistischen Vergleich wurde der Student's t-test mit der Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt. Änderungen wurden dann als signifikant erachtet, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war.

## 2.10 Proteinlevelbestimmung von endothelialer und induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS, iNOS)

Die Aorten von acht diabetischen (DM-Gruppe) und acht nicht-diabetischen Tieren (Kontrollgruppe) wurden nach Versuchsende entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Aorten wurden pulverisiert und in eiskaltem TRIS-Puffer (5 mmol l<sup>-1</sup>, pH 7,4) gelöst (weitere Inhaltsstoffe der Lösung: Proteaseinhibitor Leupeptin, Benzamidin, Aprotinin, PMSF und 10 µg ml<sup>-1</sup> Antipain). Diese Lösung wurde dann für 30 Sekunden in einem Polytron Homogenisator homogenisiert und das Homogenisat für 10 min bei 100 g zentrifugiert, um Partikel und Zellen zu entfernen. Die Proteinmenge wurde mittels der Bradford-Methode bestimmt [12]. Das Protein (50 µg) wurde auf ein SDS-7,5% Polyacrylamidgel aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran in einer Transferkammer geblottet (Bio-Rad, Hercules, USA). Die Blots wurden mit 5 % fettfreier Trockenmilch über Nacht bei 4 °C inkubiert und nach Auswaschen mit Maus Anti-Mensch eNOS und iNOS monoklonalen IgG<sub>1</sub> (Verdünnung 1:2500, BD Transduction Laboratories, San Jose, USA) über 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Blots mit einem zweiten Antikörper (Meerrettich peroxidasegebundenes Anti-Maus IgG, Verdünnung 1:5000, Amersham Life Science, Piscataway, USA) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der zweite Antikörper wurde mittels Chemilumineszenz (ECL) Westernblot-Detektiersystem (Amersham Life Science, Piscataway, USA) sichtbar gemacht. Menschliche Endothelzellextrakte dienten als Positivkontrolle. Die Filme wurden densitometrisch (in optischen densitometrischen Einheiten [odu] pro mm<sup>2</sup>) mittels Gel Doc Gel Documentation System (Bio-Rad, Hercules, USA) analysiert.

## 3. Ergebnisse

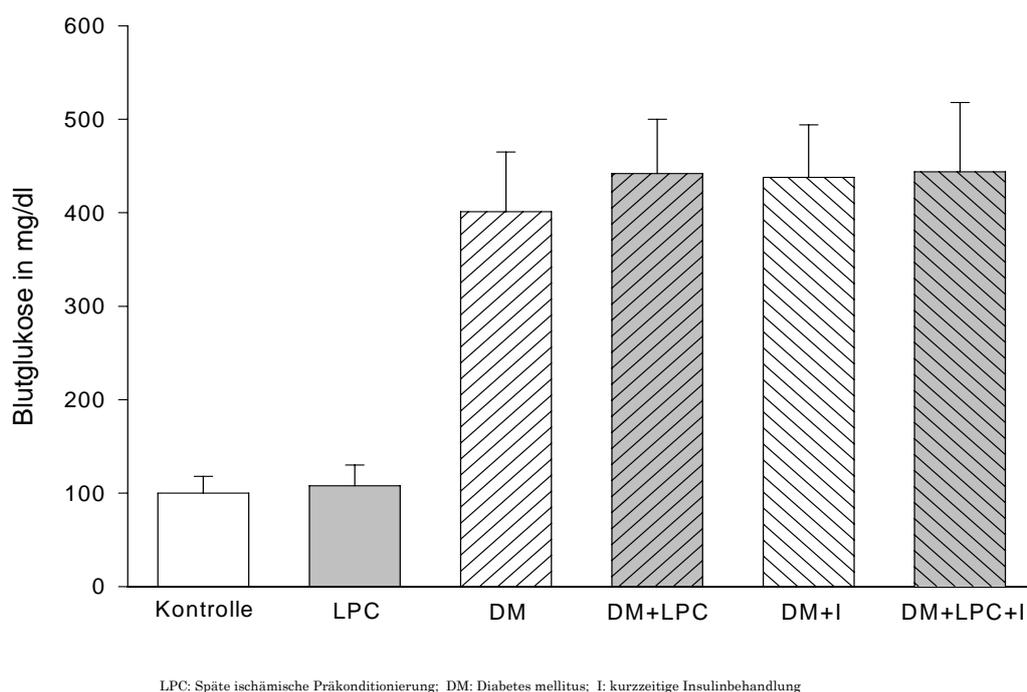
Von 61 Tieren wurden komplette Datensätze erhoben.

### 3.1 Blutglukosekonzentration

Kurz vor Durchführung des Myokardinfarktprotokolls wurden die Blutzuckerwerte am wachen Tier gemessen. Hierbei hing die Höhe des mittleren Blutzuckerwertes von der Gruppe ab (siehe Abbildung 7).

Die Tiere der Kontrollgruppe hatten einen mittleren Blutglukosewert von  $100 \pm 18$  mg/dl, die LPC-Gruppe lag bei  $108 \pm 22$  mg/dl.  $401 \pm 64$  mg/dl zeigte die DM-,  $442 \pm 58$  mg/dl in der DM+LPC-,  $438 \pm 56$  mg/dl in der DM+I- und  $444 \pm 74$  mg/dl in der DM+LPC+I-Gruppe; die Werte der Insulingruppen sind diabetisch, da kurz vor der akuten Insulinbehandlung gemessen wurde (vgl. dagegen Blutzuckerwerte im Myokardinfarktprotokoll, Abb. 8).

**Abb. 7:** mittlere Blutzuckerwerte vor dem Myokardinfarktprotokoll

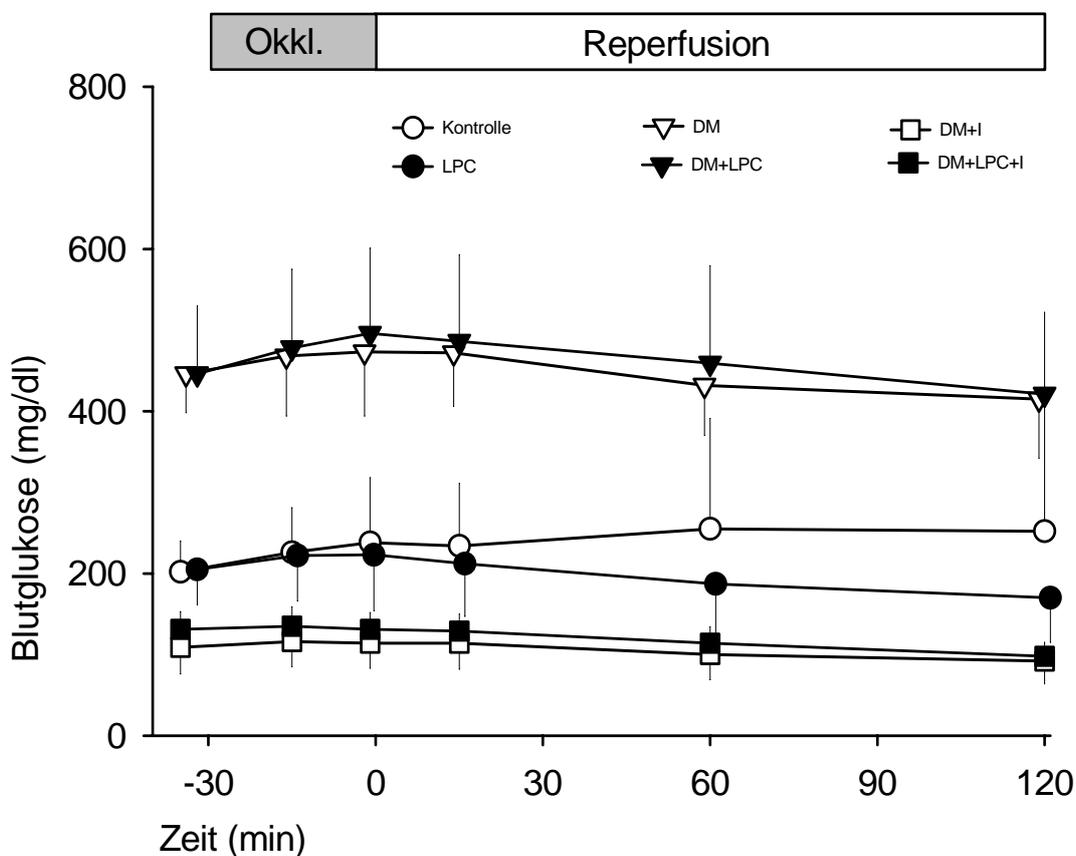


Die Glukosekonzentration während des Experimentes (Myokardinfarktprotokoll) ist in Abbildung 8 dargestellt. Der Mittelwert der Kontrollgruppe lag hier bei  $236 \pm 103$  mg/dl,  $203 \pm 59$  mg/dl in der LPC-,  $452 \pm 74$  mg/dl in der DM- und  $465 \pm 103$  mg/dl in der DM+LPC-Gruppe.

Bei der DM+I- und der DM+LPC+I-Gruppe (Insulingruppen) lagen die Mittelwerte bei  $108 \pm 31$  mg/dl bzw. bei  $122 \pm 23$  mg/dl. Hier hatten wir 90 Minuten vor der Indexischämie eine akute Insulinbehandlung vorgenommen (siehe Studienprotokoll, Seite 21).

Die Ausgangswerte der Blutglukose sind für die LPC- und Kontrollgruppe in Abb. 8 höher als in Abb. 7. Das liegt daran, dass die der Abb. 7 zugrunde liegenden Werte vor der OP (chirurgische Präparation), und die der Abb. 8 nach der OP gemessen wurden (siehe Methodenkritik, Seite 39)

**Abb. 8:** Blutglukosekonzentration während des Myokardinfarktprotokolls

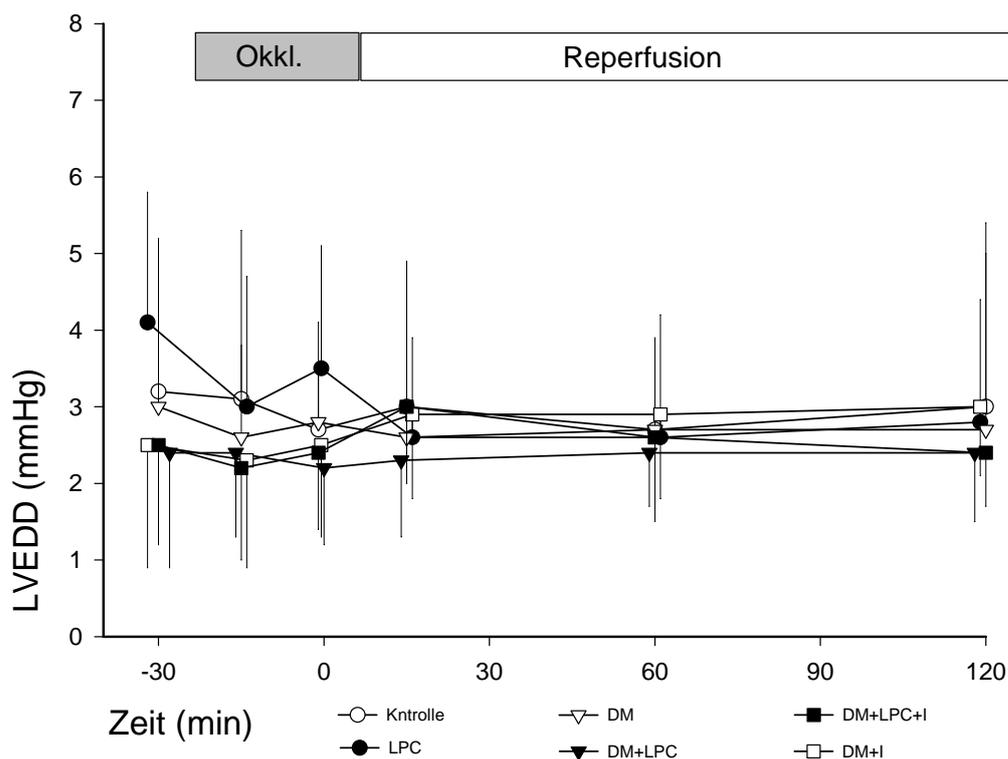


LPC: Späte ischämische Präkonditionierung; DM: Diabetes mellitus; I: Insulinbehandlung (akut); Okkl: Koronarokklusion

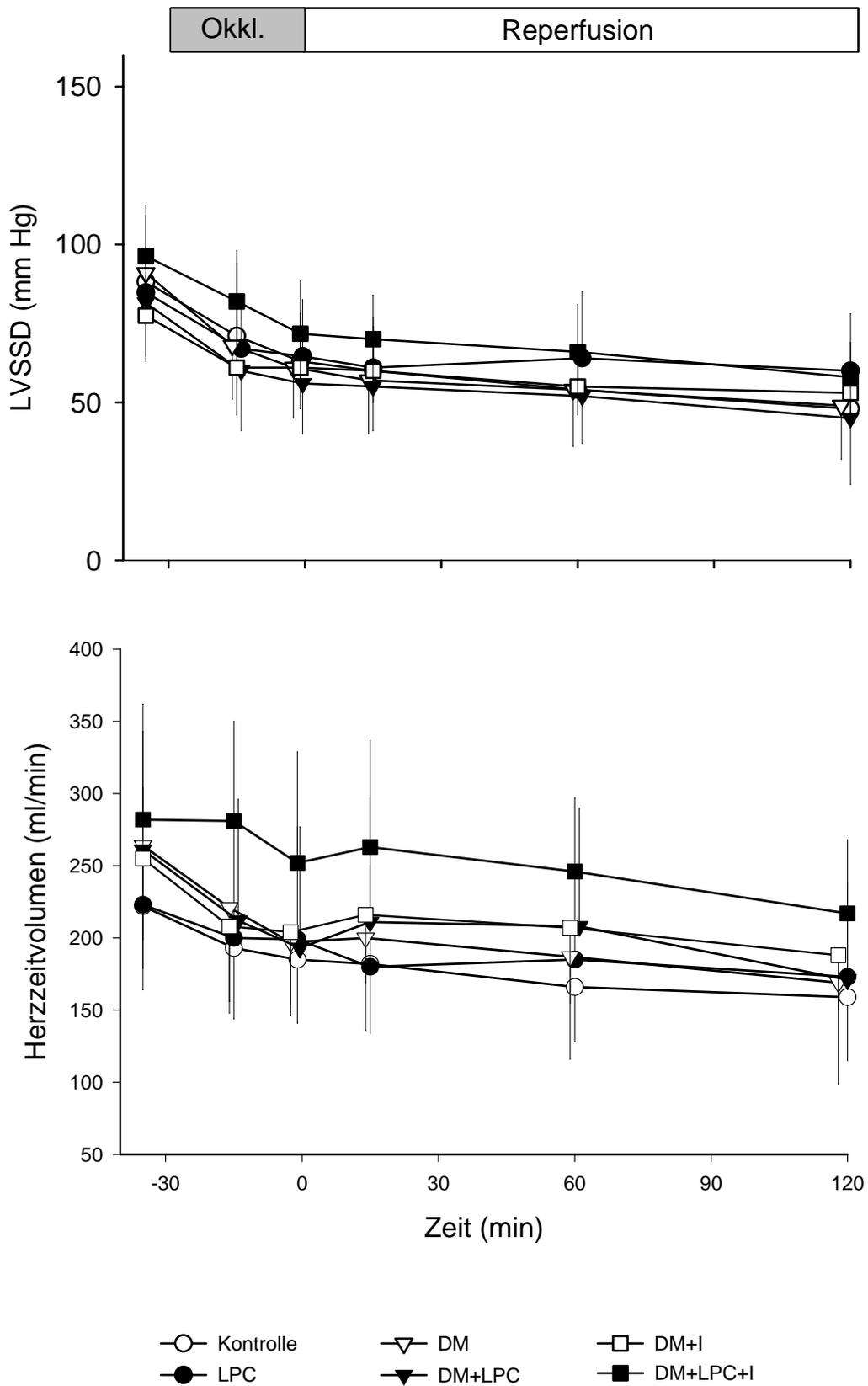
### 3.2 Hämodynamische Variablen

Die hämodynamischen Variablen jeder Gruppe sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Bei den Ausgangswerten (Ruhebedingungen oder Baseline) zeigten sich keine signifikanten hämodynamischen Unterschiede. Auch während des Experimentes (Myokardinfarktprotokoll) gab es sowohl beim LVEDD (s. Abb. 9) als auch beim LVSSD und HZV (Abb. 10),  $dP/dt_{max}$ ,  $dP/dt_{min}$ , RPP und SVR keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Koronarokklusion wurde bei allen Tieren von einem Abfall des LVSSD (um ca. 19 %), des HZV (um ca. 13 %), des  $dP/dt_{max}$  (um ca. 26 %), des  $dP/dt_{min}$  (um ca. 30 %) und des RPP (um ca. 23 %) begleitet und zeigte bis zum Ende des Experimentes, also auch nach der 30-minütigen Okklusion, einen kontinuierlichen Abfall aller dieser Variablen. Der LVEDD reduzierte sich auf 40 %, das HZV auf 29 %, das  $dP/dt_{max}$  auf 51 %,  $dP/dt_{min}$  bis 57 % und das RPP auf 50 % der Ausgangswerte (Tabelle 1).

**Abb. 9:** linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDD)



**Abb. 10:** HZV und linksventrikulärer systolischer Spitzendruck (LVSSD)



LPC: Späte ischämische Präkonditionierung; DM: Diabetes mellitus; I: Insulinbehandlung (akut); Okkl.: Koronarokklusion

**Tabelle 1: Hämodynamische Variablen; LVEDD**, linksventrikulärer enddiastolische Druck; **HZV**, Herzzeitvolumen; **dP/dt<sub>max</sub>**, maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit; **dP/dt<sub>min</sub>**, minimale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit; **RPP**, rate pressure product (Produkt aus Herzfrequenz und linksventrikulärem Spitzendruck, als Maß des myokardialen Sauerstoffverbrauches); **SVR**, systemischer vaskulärer Widerstand. **LPC**, späte ischämische Präkonditionierung; **DM**, Diabetes Mellitus; **I**, akute Insulinbehandlung (90 Minuten vor Koronarokklusion); Mittelwerte ± SD.

	Baseline	Koronarokklusion		Reperfusion		
		15 min	29 min	15 min	60 min	120 min
<b>LVEDD (mm Hg)</b>						
Kontrolle	3.2 ± 2.0	3.1 ± 2.2	2.7 ± 1.4	3.0 ± 1.9	2.7 ± 1.2	3.0 ± 2.0
LPC	4.1 ± 1.7	3.0 ± 1.7	3.5 ± 1.6	2.6 ± 1.3	2.6 ± 1.6	2.8 ± 1.6
DM	3.0 ± 1.2	2.6 ± 1.2	2.8 ± 0.8	2.6 ± 0.5	2.7 ± 1.1	2.7 ± 2.7
DM+LPC	2.4 ± 1.5	2.4 ± 1.1	2.2 ± 1.0	2.3 ± 1.0	2.4 ± 0.7	2.4 ± 0.9
DM+I	2.5 ± 1.6	2.3 ± 1.4	2.5 ± 1.2	2.9 ± 1.1	2.9 ± 1.1	3.0 ± 0.9
DM+LPC+I	2.5 ± 1.3	2.2 ± 1.2	2.4 ± 1.0	3.0 ± 1.0	2.6 ± 1.1	2.4 ± 0.7
<b>HZV(ml min<sup>-1</sup>)</b>						
Kontrolle	222 ± 58	193 ± 49	185 ± 44	182 ± 48	166 ± 38	159 ± 44
LPC	223 ± 81	200 ± 81	199 ± 78	180 ± 70	185 ± 63	173 ± 49
DM	264 ± 65	221 ± 65	197 ± 51	200 ± 64	187 ± 71	169 ± 70
DM+LPC	261 ± 101	212 ± 84	193 ± 84	211 ± 86	208 ± 82	171 ± 67
DM+I	255 ± 76	208 ± 60	204 ± 50	216 ± 47	207 ± 52	188 ± 38
DM+LPC+I	282 ± 61	281 ± 69	252 ± 77	263 ± 74	246 ± 51	217 ± 51
<b>dP/dt<sub>max</sub>(mm Hg s<sup>-1</sup>)</b>						
Kontrolle	3949 ± 1319	3102 ± 1436	2751 ± 985	2360 ± 703	2152 ± 704	1801 ± 640
LPC	3727 ± 985	2443 ± 1265	2602 ± 1412	2236 ± 1126	2233 ± 1273	2142 ± 1276
DM	4403 ± 1159	3031 ± 1262	2603 ± 1010	2363 ± 1001	2200 ± 962	1939 ± 994
DM+LPC	3444 ± 918	2425 ± 994	2366 ± 930	2159 ± 747	2073 ± 914	1656 ± 1183
DM+I	4111 ± 1257	2886 ± 1124	2904 ± 891	2576 ± 715	2444 ± 542	2195 ± 442
DM+LPC+I	4972 ± 1172	4307 ± 1516	3610 ± 1431	3133 ± 1055	2950 ± 954	2290 ± 607
<b>dP/dt<sub>min</sub>(mm Hg s<sup>-1</sup>)</b>						
Kontrolle	-3246 ± 1368	-2520 ± 1208	-2072 ± 837	-1847 ± 727	-1506 ± 597	-1170 ± 523
LPC	-3039 ± 808	-1801 ± 979	-1795 ± 996	-1635 ± 942	-1593 ± 1008	-1451 ± 986
DM	-3460 ± 978	-2164 ± 717	-1873 ± 629	-1723 ± 732	-1426 ± 597	-1110 ± 565
DM+LPC	-2935 ± 994	-1821 ± 929	-1731 ± 801	-1679 ± 767	-1508 ± 846	-1193 ± 1222
DM+I	-2729 ± 766	-1987 ± 737	-2018 ± 645	-1901 ± 498	-1658 ± 471	-1500 ± 473
DM+LPC+I	-4136 ± 847	-3319 ± 896	-2748 ± 924	-2689 ± 928	-2868 ± 981	-2020 ± 757
<b>RPP (mm Hg min<sup>-1</sup>)</b>						
Kontrolle	24120 ± 7691	19402 ± 7327	17141 ± 5377	15659 ± 4361	13463 ± 4592	11119 ± 4157
LPC	23953 ± 4076	18453 ± 5053	18045 ± 5248	16756 ± 4541	16565 ± 6025	14283 ± 5217
DM	24679 ± 5196	17888 ± 5261	15898 ± 4771	14952 ± 5000	12887 ± 4285	10930 ± 4479
DM+LPC	21156 ± 4792	14830 ± 5225	13975 ± 3644	13295 ± 4006	12005 ± 5115	9396 ± 6414
DM+I	22191 ± 4484	17042 ± 5819	16132 ± 4138	16060 ± 3498	14120 ± 2817	12730 ± 3047
DM+LPC+I	27666 ± 4776	22882 ± 5520	17447 ± 3873	18561 ± 4108	17648 ± 4902	13977 ± 3291
<b>SVR (mm Hg ml<sup>-1</sup> min)</b>						
Kontrolle	0.36 ± 0.07	0.34 ± 0.07	0.31 ± 0.07	0.28 ± 0.07	0.26 ± 0.06	0.23 ± 0.06
LPC	0.36 ± 0.09	0.31 ± 0.06	0.30 ± 0.06	0.28 ± 0.06	0.26 ± 0.07	0.26 ± 0.06
DM	0.33 ± 0.08	0.29 ± 0.07	0.28 ± 0.08	0.25 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.23 ± 0.04
DM+LPC	0.30 ± 0.08	0.25 ± 0.08	0.25 ± 0.07	0.23 ± 0.07	0.21 ± 0.05	0.20 ± 0.07
DM+I	0.26 ± 0.06	0.28 ± 0.09	0.25 ± 0.05	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.03
DM+LPC+I	0.32 ± 0.08	0.28 ± 0.05	0.26 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.05

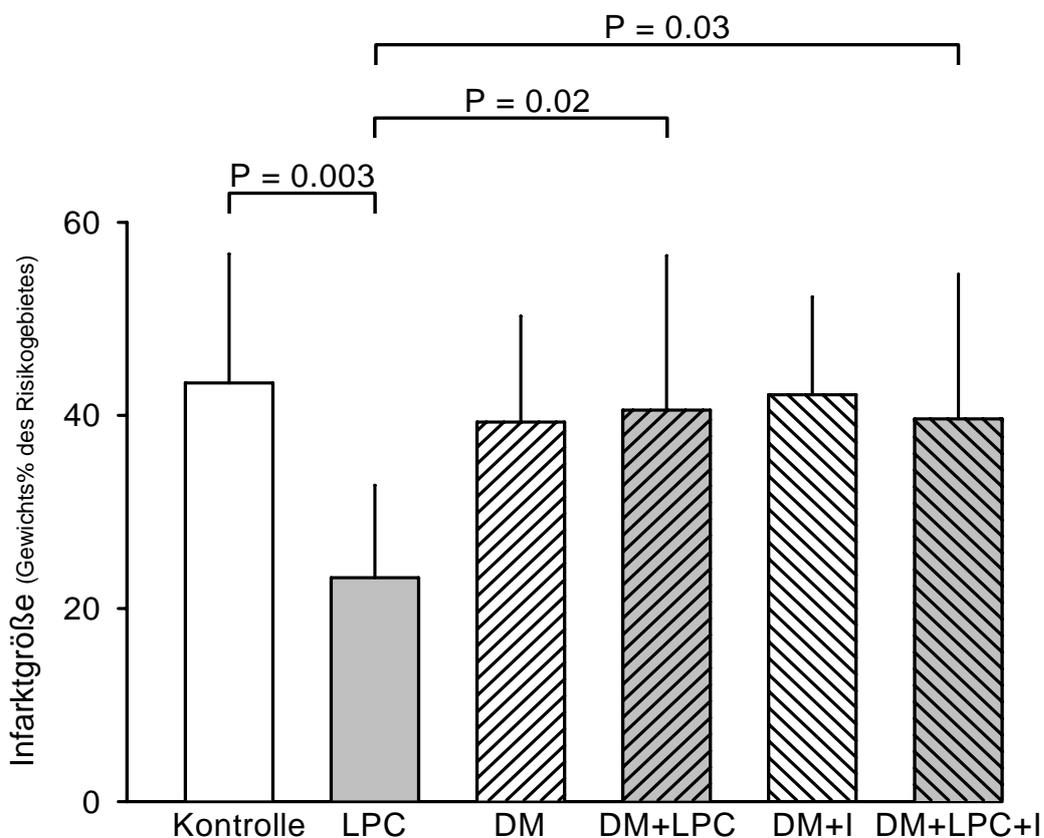
### 3.3 Risikogebiet und Infarktgröße

Bei der Bestimmung der Risikogebiete und der Infarktgrößen wurde allein der linke Ventrikel ausgewertet (siehe Infarktgrößenbestimmung).

Das mittlere linksventrikuläre Trockengewicht der Kaninchenherzen lag bei  $0,80 \pm 0,12$  g, mit keinen signifikanten Unterschieden zwischen den sechs Gruppen.

Das Ischämie-Reperfusion-Gebiet (Risikogebiet) aller Tiere lag bei  $0,22 \pm 0,09$  g und machte damit  $28 \pm 10$  % des linken Ventrikels aus. Die Infarktgrößen der einzelnen Gruppen sind in Abbildung 11 in Gewichts-Prozent des Risikogebietes dargestellt.

**Abb. 11:** Infarktgrößen (als Gewichts% des Risikogebietes)



LPC: Späte ischämische Präkonditionierung; DM: Diabetes mellitus; I : Insulinbehandlung (akut)

Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen eine Infarktgröße von  $43 \pm 13$  % des Risikogebietes auf. Die späte ischämische Präkonditionierung verkleinerte die Infarktgröße auf  $23 \pm 10$  % des Risikogebietes (LPC,  $P = 0,003$  vs. Kontrolle).

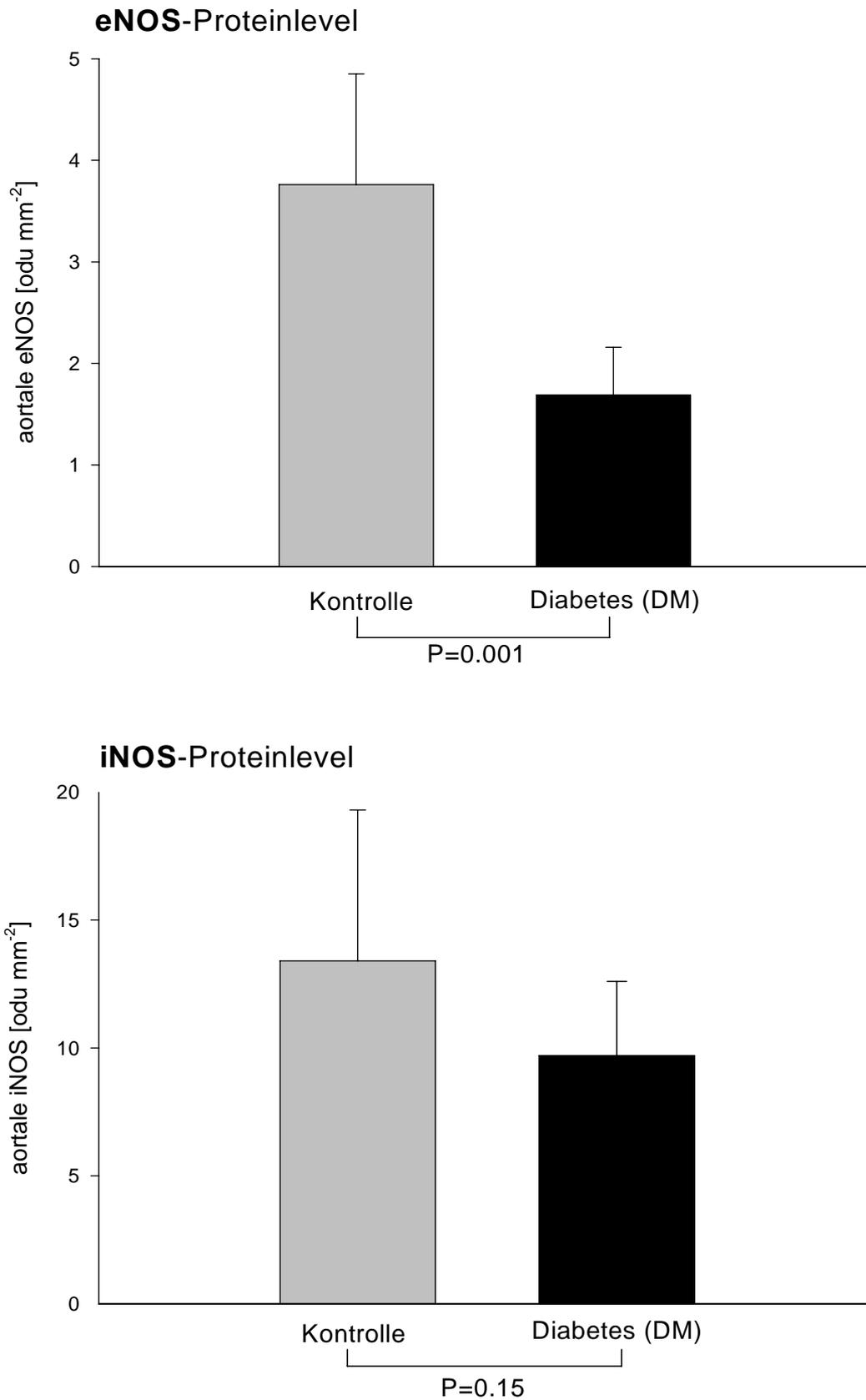
In den diabetischen Gruppen (DM, DM+LPC) war die Infarktgröße vergleichbar mit der Kontrollgruppe, unabhängig davon, ob eine späte ischämische Präkonditionierung (LPC) durchgeführt wurde. In diesen Gruppen war die Reduzierung der Infarktgröße, welche durch die LPC erreicht wurde, blockiert (DM  $39 \pm 11$  %; DM+LPC  $41 \pm 16$  %;  $P=0,02$  vs. LPC). Die DM+I-Gruppe, also diabetische Tiere mit einer kurzzeitigen Insulinbehandlung, zeigte eine Infarktgröße von  $42 \pm 10$  % des Risikogebietes.

Die akute Insulinbehandlung der diabetischen Gruppe, bei der eine LPC vorgenommen worden war (DM+LPC+I), erbrachte keine Infarktgrößenverkleinerung (DM+LPC+I  $40 \pm 10$  %,  $P = 0,03$  vs. LPC). Der blockierende Effekt eines Diabetes mellitus auf die LPC kann durch die akute Insulinbehandlung nicht wieder rückgängig gemacht werden.

### **3.4 eNOS- und iNOS-Proteinlevel der Aorta**

Die gemessenen eNOS-Proteinlevel der diabetischen Tiere (nur DM-Gruppe) waren signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe (eNOS: DM  $1,69 \pm 0,47$  odu, vs. Kontrolle  $3,76 \pm 0,47$  odu,  $P = 0,001$ ); siehe Abbildung 12.

Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den iNOS-Proteinlevel der beiden Gruppen festzustellen (iNOS: DM  $9,7 \pm 2,9$  odu vs. Kontrolle  $13,4 \pm 5,9$  odu,  $P = 0.15$ ).

**Abb.12:** eNOS- und iNOS-Proteinlevel der Aorta

## 4. Diskussion

Wir untersuchten den Effekt eines Diabetes mellitus (DM), mit und ohne akute Insulinbehandlung, auf die Myokardprotektion durch späte ischämische Präkonditionierung (LPC). Unsere Ergebnisse zeigen, dass ein DM den kardioprotektiven Effekt der LPC an in vivo Kaninchenherzen blockiert. Eine kurzzeitige Normalisierung des Blutglukosespiegels mit einer Insulinbehandlung kann die Protektion nicht wieder herstellen.

### 4.1 Interpretation der Ergebnisse

Diabetiker haben trotz Verbesserung der Koronarvorsorge [56, 67] im Falle eines Myokardinfarktes eine schlechtere Prognose als Nicht-Diabetiker. Fast 50% der Todesursachen bei Diabetikern ist die koronare Herzkrankheit (KHK) [38]. Wie widersprüchliche Ergebnisse zeigen [25, 54, 89], konnte bisher die Frage, ob das diabetische Herz wirklich anfälliger für Ischämien ist, im Tiermodell nicht endgültig geklärt werden. Der protektive Effekt der LPC jedoch geht sowohl bei akuter Hyperglykämie kurz vor und während der infarktauslösenden Ischämie als auch bei chronisch diabetischen Kaninchen verloren [20]. Dies kann mit Ergebnissen einer klinischen Studie von Ishihara et al. in Einklang gebracht werden, in der gezeigt wurde, dass die Prognose des akuten Herzinfarktes bezüglich Letalität und linksventrikulärer Funktion für Patienten mit Angina pectoris (AP) in der Vorgeschichte besser ist als für Patienten ohne AP (siehe Abbildung 2). Bei Diabetikern ist die Prognose unabhängig von einer pectangiösen Vorgeschichte. Sie haben auch mit einer pectangiösen Vorgeschichte eine ähnliche Prognose wie Nicht-Diabetiker ohne AP in ihrer Vorgeschichte [34; 35]. Die verantwortlichen pathogenen Mechanismen, die für das Phänomen der erhöhten Morbidität und Mortalität von

Diabetikern verantwortlich sind, sind bisher nur sehr unvollständig verstanden. Bezogen auf die schlechte Prognose bei Diabetikern mit akutem Myokardinfarkt könnte eine mögliche Erklärung der Verlust der endogenen kardioprotektiven Mechanismen durch den Diabetes und/oder der Hyperglykämie sein.

Ischämische Präkonditionierung verkleinert deutlich die Infarktgröße *in vivo* [8], und scheint ein wichtiger Faktor für die Reduktion der Infarktausdehnung bei Patienten mit einer pectanginösen Vorgeschichte zu sein [49, 69].

Kersten et al. haben zeigen können, dass DM und Hyperglykämien von 300 und 600 mg/dl die „klassische“ (= frühe) Präkonditionierung (= EPC) bei anästhesierten Hunden blockiert, unabhängig von Plasmainsulinkonzentration und Plasmaosmolarität [43, 44]. In einer Folgestudie wiesen sie nach, dass die Diazoxid-induzierte EPC, durch Diabetes und Hyperglykämie aufgehoben wird [42]. Diazoxid ist ein  $K_{ATP}$ -Kanal-Agonist und führt zu einer medikamenteninduzierten (= pharmakologischen) EPC.

Folglich scheint ein hoher Plasmaglukosespiegel der entscheidende Faktor bei einem DM zu sein, welcher die Kardioprotektion der EPC durch eine Blockierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle aufzuheben vermag. Es wurde bereits nachgewiesen, dass das Öffnen dieser  $K_{ATP}$ -Kanäle eine Schlüsselfunktion bei der Vermittlung der Kardioprotektion der EPC, der LPC und der Kombination von Beiden hat [64, 68].

In dieser Studie untersuchten wir den Effekt eines DM auf die kardioprotektive Wirkung der LPC. Bei den nichtdiabetischen Tieren reduzierte die späte Konditionierung (LPC) die Infarktgröße um fast 50 % (Kontrolle 43 % vs. LPC 23 % des Risikogebietes). Bei den diabetischen Tieren jedoch konnten wir keine signifikante Verkleinerung der Infarktgröße durch eine LPC erzielen (Kontrolle 43 % vs. DM+LPC 41 % des Risikogebietes). Basierend auf den Erkenntnissen von Kersten et al. in Bezug auf die EPC, und auf einer von uns zuvor durchgeführten Studie, welche eine Blockierung der LPC durch eine akute Hyperglykämie an *in vivo* Kaninchenherzen nachwies [20], scheint es

wahrscheinlich, dass die Blockade der LPC durch DM und akute Hyperglykämie ebenfalls der direkten Blockade von  $K_{ATP}$ -Kanälen durch Glukose zuzuschreiben ist. In unserer Studie zeigt sich aber, dass durch eine „Wegnahme“ des vermeintlich blockierenden Agens Glukose (in Form einer Hyperglykämie) mithilfe einer Insulinbehandlung, sich der kardioprotektive Effekt einer LPC nicht wieder herstellen lässt (DM+LPC+I  $40 \pm 15 \%$ ,  $P = 0,03$  vs. LPC). Die Blockierung der LPC durch einen DM und/oder eine Hyperglykämie [20] lässt sich also durch eine Normalisierung des Plasmaglukosespiegels nicht wieder rückgängig machen. Diese Tatsache führt uns zu zwei möglichen Erklärungen:

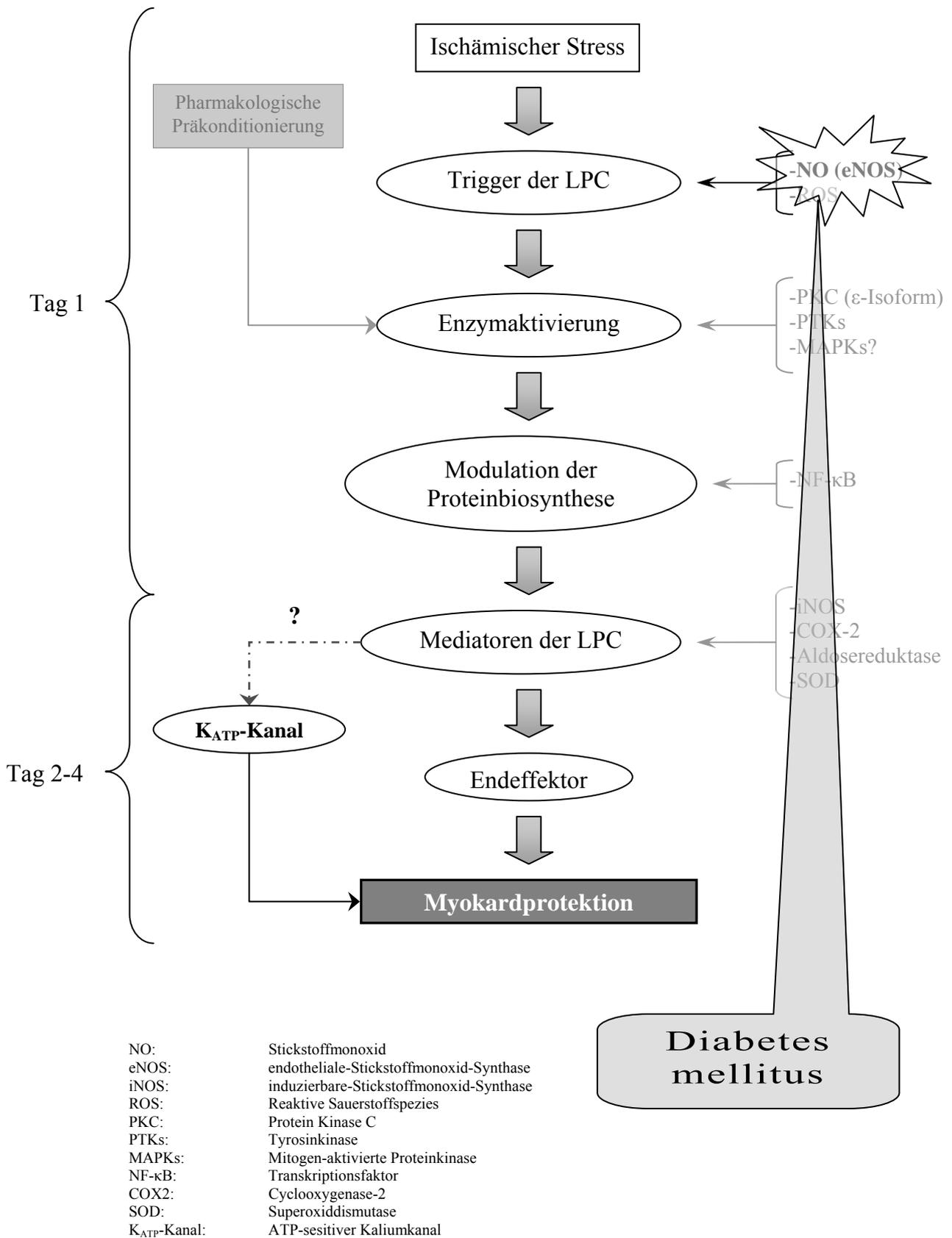
- 1.: die durch eine Hyperglykämie, in Form eines DM, induzierte Blockierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle könnte nach einer Normalisierung des Blutglukosespiegels bestehen bleiben; und/oder
- 2.: ein DM könnte mit einem weiteren Mechanismus der Signaltransduktionskaskade der LPC interferieren.

Zhao et al. zeigten an diabetischen Hunden eine reduzierte koronare NO-Produktion [94]. Auch beim Menschen gibt es Hinweise dafür, dass eine Hyperglykämie die Verfügbarkeit von NO reduziert [26].

Lessar et al. fanden, dass bei Patienten mit Nitroglycerin eine LPC ausgelöst werden kann [51]. NO scheint also als Mediator der LPC eine entscheidende Rolle zu spielen [10]. Hierbei scheint die endothelialen-Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) das NO zu generieren, welches die Entstehung der LPC am ersten Tag der Signaltransduktionskaskade triggert. Die induzierbare-Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) dagegen scheint NO zu generieren, welches am zweiten Tag der Signaltransduktionskaskade der LPC von Bedeutung ist (vgl. LPC- Signaltransduktionskaskade, Abb. 1, Seite 4).

Übereinstimmend mit diesen Studien zeigten wir eine Reduktion der eNOS im Aortengewebe der diabetischen Kaninchen. Die iNOS hingegen war bei den diabetischen und bei den nichtdiabetischen Kaninchen in gleicher Aktivität vorhanden. Dass Diabetes im Zusammenhang mit einer reduzierten Aktivität der eNOS steht, könnte das Phänomen der persistierenden LPC Blockierung auch nach einer Normalisierung des Blutglukosespiegels der diabetischen Tiere erklären (siehe Abb. 13). In den Herzzellen von diabetischen Ratten (streptozocin-induziert) ist die  $\epsilon$ -Isoform der Proteinkinase C (PKC) reduziert [41]. Die Bereitstellung der  $\epsilon$ -Isoform der PKC scheint ein wichtiger Faktor bei der Signaltransduktion der ischämisch-induzierten- als auch der durch NO-Donatoren induzierten [8] LPC zu sein. Somit könnte für den von uns am Kaninchen beobachteten blockierenden Effekt des DM auf die LPC, neben dem direkten Effekt einer Hyperglykämie auf die  $K_{ATP}$ -Kanäle, eine verminderte NO-Freisetzung durch eine Reduktion der eNOS- und/oder PKC-Aktivität verantwortlich sein.

**Abb. 13: Wo blockiert der Diabetes mellitus die Signaltransduktionskaskade?**



Modifiziert nach Bolli et al., Circulation Research 2000: 972-983

## 5. Methodenkritik

### 5.1 Einfluss der Infarktgröße auf die funktionelle Erholung der Herzen

In unserer Studie hatte die Reduktion der Infarktgröße in der LPC-Gruppe keine bessere funktionale Erholung der Herzen zur Folge. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen von Bolli et al, bei denen Kaninchenherzen nach ischämischer LPC-Induktion eine bessere Funktion haben [9]. Im Unterschied zu unserem Versuchsprogramm setzte Bolli et al. die Herzen aber keiner längeren infarktinduzierenden Ischämie aus. In dem von Bolli et al. eingesetzten Modell wurden die Kaninchen an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils sechs Zyklen von je vier Minuten Koronarokklusion ausgesetzt, gefolgt von jeweils vier Minuten Reperfusion. Dies führte zu keinem Infarkt, aber an den Tagen zwei und drei zu einer besseren funktionellen Erholung der kontraktile Funktion. Als Maß der kontraktile Funktion wurde von Bolli et al. die Wandverdickungsfraktion mittels Ultraschalldopplerkristallen gemessen. Auch von Cohen et al. wurde die regionale Wandfunktion nach ischämischer Präkonditionierung als Maß der kontraktile Myokardfunktion gemessen [14]. Im Gegensatz zu Bolli et al. untersuchten Cohen et al. dies aber für EPC. Cohen et al. präkonditionierten die Tiere durch eine 5-minütige Ischämie gefolgt von einer 30-minütigen Koronarischemie, wodurch Infarkte nachweisbar waren. Die Tiere wurden drei Tage lang beobachtet und der Verlauf der Wandverdickungsfraktion registriert. Cohen et al. stellten fest, dass eine bessere funktionelle Erholung der Herzen nach ischämischer Präkonditionierung und einer 30-minütigen regionalen Myokardischämie frühestens nach einem Tag Reperfusion zu erwarten ist. Nach Ansicht Cohens et al. befanden sich die Herzen nach der Ischämie im Stadium der reversiblen kontraktile Dysfunktion (Stunning). Erst nach etwa 24 Stunden bilde sich das Stunning zurück, so dass

erst danach Unterschiede in der Funktionserholung durch kleinere Infarkte der Herzen, die ischämisch präkonditioniert wurden, messbar wurden. Weder Bolli et al. noch Cohen et al. machen Angaben zur globalen Herzfunktion wie Ventrikeldruck oder  $dp/dt$  max. In der vorliegenden Studie wurde keine Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich dieser Parameter beobachtet. Dies bedeutet, dass in dem von uns beobachteten Zeitraum von zwei Stunden Reperfusion die kleineren Infarkte der präkonditionierten Tiere keinen Einfluss auf die globale hämodynamische Funktion der Herzen haben. Als mögliche Ursache kommt auch hier die reversible kontraktile Dysfunktion in Frage. Außerdem nahm das Risikogebiet durchschnittlich 28 % des linken Ventrikels ein. Die Infarktgröße lag zwischen 23 % (LPC-Gruppe) und 43 % (Kontrollgruppe) des Risikogebietes. Sie betrug also nur 6-12 % des linksventrikulären Gewichts. Diese kleinen Unterschiede in der Infarktgröße zwischen den Gruppen und die reversible kontraktile Dysfunktion (Stunning) könnten erklären, warum in unserer Studie keine verbesserte funktionelle Erholung des Herzens durch Infarktgrößenreduzierung (LPC) beobachtet wurde.

## **5.2 Dauer der ischämischen Präkonditionierung**

Wir können nicht ausschließen, dass unter diabetischen, also hyperglykämischen Bedingungen, ein anderes Präkonditionierungsprotokoll andere Effekte hätte. Die Reduzierung des Infarktgebietes der LPC-Gruppe, erreicht durch eine 5-minütige Ischämie, ist jedoch mit Infarktverkleinerung vergleichbar, die von anderen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen Protokollen beobachtet wurden [72, 90]. Baxter et al. zeigten für das Kaninchen, dass eine einmalige 5-minütige Koronarischemie ausreicht (die Zeit die unser Protokoll vorsah), um eine späte Präkonditionierung zu induzieren. Weitere Ischämie-Zyklen erbrachten keine Verstärkung der Kardioprotektion [5]. Dies deckt sich mit Daten unseres Labors,

in denen aus einer 5-minütigen Ischämie eine ähnliche Infarktgrößenreduktion resultiert wie aus fünf Zyklen 4-minütiger Ischämien [21]. Die Vermutung einer submaximalen Wirkung, der in dieser Studie von uns durchgeführten LPC, erscheint daher als unwahrscheinlich.

### 5.3 Blutglukosespiegel

Bei den nicht diabetischen Tieren beobachteten wir nach der chirurgischen Präparation unter Ruhebedingungen erhöhte Blutglukosekonzentrationen von  $236 \pm 103$  mg/dl (Kontroll-) und von  $203 \pm 59$  mg/dl (LPC-Gruppe; siehe Abb. 8 auf Seite 25). Dieses Phänomen kann durch den chirurgischen Stress erklärt werden, welcher die Glukosekonzentration im Blut durch verminderten Verbrauch [75] und gesteigerte Glukoneogenese [55] erhöht. Trotz dieser erhöhten Blutzuckerwerte kam es zu einem deutlich protektiven Effekt der späten Präkonditionierung. Es scheint also eine nur geringe Erhöhung der Blutglukosekonzentration keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die Kardioprotektion der LPC zu haben.

### 5.4 Alloxan

Wir benutzten Alloxan (ALX), also ein toxin-induziertes Diabetes mellitus (DM)-Modell, um den DM bei den Tieren hervorzurufen. Alle Studien, die den Effekt eines DM auf die frühe Präkonditionierung untersuchten, verwendeten dieses Modell. Diese Studien wurden allerdings mit Hunden durchgeführt [42, 44, 84].

ALX ist als ein klassisches Diabetogen bekannt [19], welches selektiv die  $\beta$ -Zellen des Pankreas zerstört und so ein dem Typ 1 DM ähnliches Krankheitsbild

imitiert. Ob ALX mit den Kanälen und Proteinen der Signaltransduktionskaskade der LPC interagiert, ist bisher nicht bekannt. Ein solcher Effekt scheint zwar unwahrscheinlich, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

### **5.5 Infarktgrößenbestimmung und Dauer der Reperfusion**

Die Größe eines Myokardinfarktes wird unter anderem durch die Größe des Gebietes beeinflusst, welches der Ischämie ausgesetzt war [23]. Für Kaninchen gilt die Korrelation von Risikogebiet und Infarktgröße nicht für sehr kleine Risikogebiete. So kann man bei sehr kleinen Risikogebieten keine Infarkte nachweisen, da diese auch während einer Okklusion der versorgenden Koronararterie durch Diffusion oder durch retrograden Fluss über die Vv. thebesei mit Sauerstoff und Substraten versorgt werden [92]. Versuche mit einem geringeren Risikogebiet als 0,05 g Trockengewicht wären so aus der Versuchsreihe ausgeschlossen worden.

Zur Bestimmung der Größe von Myokardinfarkten ist die Triphenyltetrazoliumchlorid-(TTC) Färbung eine anerkannte und gebräuchliche Methode [48, 88]. In vitalem Myokard wird TTC zu einem roten Formazanfarbstoff reduziert. Hierbei reagiert TTC mit membranständigen Diaphorasen, die NADH und NADPH als Kofaktoren benötigen. Bei frischen Infarkten wird jedoch durch das Fehlen der Kofaktoren die Reduzierung des TTC und somit die Bildung des roten Farbkomplexes verhindert [46]. Mit Beginn der Reperfusion werden die Kofaktoren aus den nekrotischen Zellen ausgewaschen. Nun färben sich nur noch vitale Zellen, also solche, die noch intakte Zellmembranen und somit noch den Kofaktor besitzen, rot an. Ist die Reperfusion nicht lang genug, werden nicht alle Kofaktoren aus den nekrotischen Zellen ausgewaschen. Man würde falsch kleine Infarkte bestimmen.

## 5.6 eNOS-Proteinlevel

Die eNOS-Werte der diabetischen Gruppe stammen nur von der rein diabetischen Gruppe (DM). Wir haben also keine eNOS-Werte der DM+LPC-, DM+I- und der DM+LPC+I-Gruppen bestimmt. Wir können also nicht ausschließen, dass die Insulinbehandlung 90 Minuten vor der langen (30-minütigen) Ischämie oder die LPC einen Einfluss auf das eNOS-Proteinlevel hat. Da sich die vier diabetischen Gruppen (DM, DM+LPC, DM+I, DM+LPC+I) hinsichtlich der Infarktgrößen jedoch nicht signifikant voneinander unterscheiden, gehen wir davon aus, dass eine akute kurzzeitige Insulinbehandlung oder die LPC selber keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das eNOS-Proteinlevel hat, und dieses auch in den anderen diabetischen Gruppen (DM+LPC, DM+I, DM+LPC+I) erniedrigt sein wird.

## 6. Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass ein Diabetes mellitus die Kardioprotektion einer späten ischämischen Präkonditionierung (LPC) beim in vivo Kaninchenherzen blockiert. Eine kurzzeitige Normalisierung des Blutglukosespiegels durch eine Insulinbehandlung kurz vor der infarktinduzierenden (langen) Ischämie kann die Protektion der LPC nicht wieder herstellen, wobei eine Verminderung der endothelialen-Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) eine Erklärung für dieses Phänomen sein könnte.

Der Ausfall endogener kardioprotektiver Mechanismen der LPC mag zu der klinisch schlechten Prognose von Diabetikern mit einem akuten Myokardinfarkt beitragen. Zum Beispiel bei herzchirurgischen Interventionen macht es bei Diabetikern keinen Sinn, eine frühe oder eine späte Präkonditionierung durchzuführen. Auch die akute Gabe von Insulin ändert nichts daran, dass sich diabetische Herzen nicht präkonditionieren lassen. Die Pathomechanismen dieser Blockierung sind jedoch weiterhin unklar und Gegenstand weiterer Forschung.

## 7. Zusammenfassung

### **Fragestellung:**

Diabetes mellitus und Hyperglykämie sind bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit einer erhöhten Letalität verbunden. Bekannt ist, dass Hyperglykämie den kardioprotektiven Effekt der frühen ischämischen Präkonditionierung (EPC) aufhebt; wahrscheinlich durch Blockierung der  $K_{ATP}$ -Kanäle. Es konnte gezeigt werden, dass eine akute Hyperglykämie während der Infarkt-induzierenden Ischämie auch den kardioprotektiven Effekt der späten ischämischen Präkonditionierung (LPC) blockiert. Diese Studie untersuchte den Effekt eines Alloxan-induzierten Diabetes mellitus (DM) auf die LPC an Kaninchenherzen *in vivo* und welchen Einfluss eine kurzzeitige Insulinbehandlung (I) hat. Da Diabetes die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) zu reduzieren scheint, und NO eine entscheidende Rolle als Mediator der LPC hat, bestimmten wir bei den diabetischen Tieren die Proteinlevel der induzierbaren- und der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS, eNOS) des Aortengewebes.

### **Methodik:**

61 Kaninchen, zuvor 6 Gruppen zugeteilt (Kontrolle, LPC, DM, DM+LPC, DM+I, DM+LPC+I), wurden chronisch mit einem Koronararterienokkluder instrumentiert. Die Kaninchen der DM-Gruppen wurden 5-6 Wochen vor der Instrumentierung durch Alloxan (100 mg/kg *i.v.*) in eine diabetische Stoffwechsellage versetzt. Alle Tiere wurden einer 30-minütigen Koronararterienokklusion (Indexischämie) gefolgt von einer 2-stündigen Reperfusion (I/R) unterzogen, wobei 90 Minuten vor I/R in 2 DM-Gruppen (DM+I, DM+LPC+I) eine kurzzeitige Insulinbehandlung durchgeführt wurde. Bei den LPC-Gruppen wurde 24 Stunden vor I/R eine 5-minütige myokardiale Ischämie hervorgerufen (LPC). Die Kontrollgruppe wurde nicht weiter behandelt. Nach I/R bestimmten wir die Infarktgröße (IS). Die eNOS- und

iNOS-Proteinlevel bestimmten wir mithilfe des Westernblot-Verfahrens; gemessen in optischen densometrischen Einheiten [odu] pro mm<sup>2</sup>.

### **Statistische Analyse:**

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung präsentiert. Zum statistischen Vergleich wurde der Student's t-Test mit der Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt. Änderungen waren signifikant, wenn der P-Wert kleiner als 0,05 war.

### **Ergebnisse:**

Die späte Präkonditionierung reduzierte die IS von  $43 \pm 13$  % (Kontrolle) auf  $23 \pm 10$  % (LPC) des ischämischen Gebietes (Risikogebiet) ( $P = 0,003$ ). Die DM-Gruppe zeigte eine IS von  $39 \pm 11$  %, wobei ein kardioprotektiver Effekt durch eine LPC bei den diabetischen Tieren nicht nachgewiesen werden konnte (DM+LPC  $41 \pm 16$  %;  $P = 0,02$  vs. LPC). Die akute Insulinbehandlung erbrachte keine Infarktgrößenverkleinerung, konnte die Blockierung der LPC also nicht aufheben (DM+I,  $42 \pm 15$  %; DM+LPC+I  $40 \pm 10$  %,  $P = 0,03$  vs. LPC). Die gemessenen eNOS-Proteinlevel der diabetischen Tiere waren signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe (eNOS: DM  $1,69 \pm 0,47$  odu, vs. Kontrolle  $3,76 \pm 0,47$  odu,  $P = 0,001$ ). Kein Unterschied zwischen den iNOS-Proteinlevel der beiden Gruppen (iNOS: DM  $9,7 \pm 2,9$  odu vs. Kontrolle  $13,4 \pm 5,9$  odu,  $P = 0,15$ ).

### **Schlussfolgerung:**

Diabetes mellitus blockiert die Kardioprotektion der späten ischämischen Präkonditionierung (LPC) beim Kaninchenherzen in vivo. Eine kurzzeitige Normalisierung des Blutglukosespiegels durch eine Insulinbehandlung 90 Minuten vor der Indexischämie kann die Protektion der LPC nicht wieder herstellen. Eine Verminderung der eNOS könnte eine Erklärung für dieses Phänomen sein.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Aoki I, Shimoyama K, Aoki N, Homori M, Yanagisawa A, Nakahara K, Kawai Y, Kitamura SI, Ishikawa K: Platelet-dependent thrombin generation in patients with diabetes mellitus: effects of glycemic control on coagulability in diabetes. *J Am Coll Cardiol* 27, 560-6, 1996
2. Aronson D, Bloomgarden Z, Rayfield EJ: Potential mechanisms promoting restenosis in diabetic patients. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Mar 1;27(3):528-35
3. Arstall MA, Zhao YZ, Hornberger L, Kennedy SP, Buchholz RA, Osathanondh R, Kelly RA. Human ventricular myocytes in vitro exhibit both early and delayed preconditioning responses to simulated ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30: 1019-1025.
4. Bailey O.T., Bailey CC., Hagen W.H. (1944): Alloxan diabetes in rabbit: Consideration of morphological and physiological changes. *Am J Med. Sci.* 208, 450
5. Baxter,GF, Goma,FM, Yellon,DM: Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium. *Basic Res Cardiol*. 1997; 92: 159-167
6. Bellodi G, Manicardi V, Malavasi V, Veneri L, Bernini G, Bossini P, Distefano S, Magnanini G, Muratori L, Rossi G, Zuarini A (1989) Hyperglycemia and prognosis of acute myocardial infarction in patients without diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 64:885-888
7. Bernardo NL, D'Angelo M, Okubo S, Joy A, Kukreja RC. Delayed ischemic preconditioning is mediated by opening of ATP-sensitive potassium channels in the rabbit heart. *Am J Physiol*. 1999; 276: H1323-H1330.
8. Bolli R (2000) The late phase of preconditioning. *Circ Res* 87:972-983
9. Bolli R, Bhatti ZA, Tang XL, Qiu Y, Zhang Q, Guo Y, Jadoon AK. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ Res*. 1997; 81: 42-52.

10. Bolli R, Dawn B, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, Jones WK, Takano H, Guo Y, Zhang J (1998) The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol* 93:325-338
11. Boquist L.; Lorentzon R. (1979): Stereological study of endoplasmic reticulum, Golgi complex and secretory granules in the beta cells of normal and alloxan-treated mice. *Virchows Arch. B* 31, 235-241
12. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
13. Cariello A, Coagulation activation in diabetes mellitus: the role of hyperglycaemia and therapeutic prospects. *Diabetologia* 36, 1119-1125, 1993
14. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Smaller infarct after preconditioning does not predict extent of early functional improvement of reperfused heart. *Am J Physiol* 1999; 277: H1754-H1761.
15. Cooperstein S.J. und Watkins D. (1977): Effect of alloxan on islet tissue permeability: protection and reversal by NADPH. *Biochem Biophys Res Com.* 79, 756-762
16. Davi G, Catalano I, Averna M, Notarbartolo A, Strano A, Ciabattoni G, Patrono C: Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1990 Jun 21;322(25):1769-74
17. Di Bello V, Talarico L, Picano E, Di Muro C, Landini L, Paterni M, Matteucci E, Giusti C, Giampietro O: Increased echodensity of myocardial wall in the diabetic heart: an ultrasound tissue characterization study. *J Am Coll Cardiol.* 1995 May;25(6):1408-15
18. Downey JM, Cohen MV. Do mitochondrial  $K_{ATP}$  channels serve as triggers rather than end-effectors of ischemic preconditioning's protection. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 272-274.
19. Dunn J.S., McLetchie N.G.B. (1943): Experimental alloxan diabetes in the rat. *Lancet* II, 384

20. Ebel D, Müllenheim J, Fräßdorf J, Heinen A, Huhn R, Bohlen T, Ferrari J, Südkamp H, Preckel B, Schlack W, Thämer V. Effect of acute hyperglycemia and diabetes mellitus with and without short-term insulin-treatment on myocardial ischemic late preconditioning in the rabbit heart in vivo. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 2003; 446: 175-182
21. Ebel D, Müllenheim J, Preckel B, Schlack W. Five minutes of ischemia induces ischemic late preconditioning with maximum protection. *Anesthesiology* 2004; 101: A713 (abstract)
22. Factor SM, Okun EM, Minase T: Capillary microaneurysms in the human diabetic heart. *N Engl J Med* 302, 384-388, 1980
23. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Land U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W. Early phase acute myocardial infarct size quantification: Validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 1981; 101: 593-600.
24. Fisher BM, Gillen G, Lindop GB, Dargie HJ, Frier BM: Cardiac function and coronary arteriography in asymptomatic type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: evidence for a specific diabetic heart disease. *Diabetologia*. 1986 Oct;29(10):706-12
25. Forrat R, Sebbag L, Wiernsperger N, Guidollet J, Renaud S, De Lorgeril M (1993) Acute myocardial infarction in dogs with experimental diabetes. *Cardiovasc Res* 27:1908-1912
26. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F (1997) Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* 95:1783-1790
27. Goraya TY, Leibson CL, Palumbo PJ, Weston SA, Killian JM, Pfeifer EA, Jacobsen SJ, Frye RL, Roger VL: Coronary atherosclerosis in diabetes mellitus: a population-based autopsy study. *J Am Coll Cardiol* 40, 946-53, 2002
28. Gorus F.K., W.J. Malaisse und D.G. Pipeleers (1982): Selective uptake of alloxan by pancreatic  $\beta$ -cells. *Biochem. J.* 208, 513-515

29. Grossman E, Shemesh J, Shamiss A, Thaler M, Carroll J, Rosenthal T: Left ventricular mass in diabetes-hypertension. *Arch Intern Med.* 1992 May;152(5):1001-4
30. Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC, Sowers JR: Diabetes and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 100, 1134-1146, 1999
31. Hammaström L. und Ullberg S. (1966): Specific uptake of labelled alloxan in the pancreatic islets. *Nature* 212, 708-709
32. Hartmann JC, Wall TM, Hulliger TG, Shebuski RJ: Reduction of myocardial infarct size in rabbits by Ramiprilat: Reversal by the bradykinin antagonist HOE 140. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 1993; 21: 996-1003.
33. Herlitz J, Malmberg K, Karlson BW, Ryden L, Hjalmarson A: Mortality and morbidity during a five-year follow up of diabetics with myocardial infarction. *Acta Med Scand* 244, 31-38, 1988
34. Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S, Nishioka K, Kouno Y, Umemura T (2001) Diabetes mellitus prevents ischemic preconditioning in patients with a first acute anterior wall myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 38:1007-1011
35. Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S, Nishioka K, Umemura T, Nakamura S, Yoshida M. Effect of acute hyperglycemia on the ischemic preconditioning effect of prodromal angina pectoris in patients with a first anterior wall acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 92: 288-291
36. Jaffe AS, Spadaro JJ, Schechtman UK, Roberts R, Geltman EM, Sobel BE: Increased congestive heart failure after myocardial infarction of modest and extent in diabetic patients. *Am Heart J* 108, 31-37, 1984
37. Jain SK, Nagi DK, Slavin BM, Lumb PJ, Yudkin JS: Insulin therapy in type 2 diabetic subjects suppresses plasminogen activator inhibitor (PAI-1) activity and proinsulin-like molecules independently of glycaemic control. *Diabet Med.* 1993 Jan-Feb;10(1):27-32

38. Jelesoff NE, Feinglos M, Granger CB, Califf RM (1996) Outcomes of diabetic patients following acute myocardial infarction: a review of the major thrombolytic trials. *Coron Artery Dis* 7:732-743
39. Jörns A., Munday R.; Tiedge M.; Lenzen S. (1997): Comparative toxicity of alloxan, N-alkylalloxans and ninhydrin to isolated islets in vitro. *Endocrinology* 155, 283-293
40. Joslin EP, Root HF, White P, Marble H: The treatment of diabetes mellitus. 10<sup>th</sup> ed. Sea & Febiger, Philadelphia, p 188, 1959
41. Kang N, Alexander G, Park JK, Maasch C, Buchwalow I, Luft FC, Haller H (1999) Differential expression of protein kinase C isoforms in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 56:1737-1750
42. Kersten JR, Montgomery MW, Ghassemi T, Gross ER, Toller WG, Pagel PS, Warltier DC (2001) Diabetes and hyperglycemia impair activation of mitochondrial  $K_{ATP}$  channels. *Am J Physiol* 280:H1744-H1750
43. Kersten JR, Schmeling TJ, Orth KG, Pagel PS, Warltier DC (1998) Acute hyperglycemia abolishes ischemic preconditioning in vivo. *Am J Physiol* 275:H721-H725
44. Kersten JR, Toller WG, Gross ER, Pagel PS, Warltier DC (2000) Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278:H1218-H1224
45. Kitakaze M, Hori M, Morioka T, Minamino T, Takashima S, Sato H, Shinozaki Y, Chujo M, Mori H, Inoue M, Kamada T: Infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning is blunted by inhibition of 5'-Nucleotidase activity and attenuation of adenosine release. *Circ.* 1994; 89: 1237-46.
46. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 1981; 393: 287-297.
47. Kloner RA, Shook T, Antman EM, Cannon CP, Przyklenk K, Yoo K, McCabe CH, Braunwald E, TIMI-9B investigators: Prospective temporal analysis of the onset of preinfarction angina versus outcome. *Circulation* 1998; 97: 1042-5.

48. Kloner RA, Shook T, Antman EM, Cannon CP, Przyklenk K, Yoo K, McCabe CH, Braunwald E, TIMI-9B investigators. Prospective temporal analysis of the onset of preinfarction angina versus outcome: an ancillary study in TIMI-9B. *Circulation* 1998; 97: 1042-1045.
49. Kloner RA, Shook T, Przyklenk K, Davis VG, Junio L, Matthews RV, Burstein S, Gibson M, Poole WK, Cannon CP, et al (1995) Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning? *Circulation* 91:37-45
50. Kuusisto J, Mykkanen J, Pyorala K, Laakso M (1994) NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes* 43:960-967
51. Leeser,MA, Stoddard,MF, Dawn,B, Jasti,VG, Masden,R, Bolli,R: Delayed preconditioning-mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 2001; 103: 2935-2941
52. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson, RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991; 84: 350-356.
53. Liu Y, Downey JM. Ischemic preconditioning protects against infarction in rat heart. *Am J Physiol* 1992; 263: H1107-H1112.
54. Liu Y, Thornton JD, Cohen MV, Downey JM, Schaffer SW (1993) Streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetes protects the heart from infarction. *Circulation* 88:1273-1278
55. Long CL, Spencer JL, Kinney JM, Geiger JW (1971) Carbohydrate metabolism in normal man and effect of glucose infusion. *J Appl Physiol* 31:102-109
56. Malmberg K, Ryden L (1988) Myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. *Eur Heart J* 9:259-264
57. Malmberg K, Ryden L, Hamsten A, Herlitz J, Waldenström A, Wedel H (1997) Mortality prediction in diabetic patients with myocardial infarction: experience from the DIGAMI study. *Cardiovasc Res* 34:248-253

58. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88(3): 1264-1272.
59. Marber MS, Latchmann DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993; 88:1264-1272.
60. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischemia: a critical determination of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1987; 21(10):737-746.
61. McLaughlin R.M, Fish R.F.: *Clinical biochemistry and haematology, The Biology of the laboratory rabbit*, second edition. Academic press (1994), 111-114
62. Morrish NJ, Stevens LK, Head J, Fuller JH, Jarret JR, Keen H: A prospective study of mortality among middle-age diabetic patients (the London cohort of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetics). I. causes and death rates. *Diabetologia* 33, 538-541, 1990
63. Mukamal KJ, Nesto RW, Cohen MC, Muller JE, Maclure M, Sherwood JB, Mittleman MA: Impact of diabetes on long-term survival after acute myocardial infarction: comparability of risk with prior myocardial infarction. *Diabetes Care* 24, 1422-1427, 2001
64. Müllenheim J, Schlack W, Fräßdorf J, Preckel B, Thämer V (2001) Additive protective effects of late and early ischaemic preconditioning are mediated by opening of KATP channels in vivo. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 442:178-187
65. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-1136.
66. Nitenberg A, Valensi P, Sachs R, Dali M, Aptecar E, Attali JR: Impairment of coronary vascular reserve and ACH-induced coronary vasodilation in diabetic patients with angiographically normal coronary arteries and normal left ventricular systolic function. *Diabetes* 42, 1017-25, 1993

67. Orlander PR, Goff DC, Morrissey M, Ramsey DJ, Wear ML, Labarthe DR, Nichaman MZ (1994) The relation of diabetes to the severity of acute myocardial infarction and post-myocardial infarction survival in Mexican-Americans and non-Hispanic whites. The Corpus Christi Heart Project. *Diabetes* 43:897-902
68. O'Rourke B (2000) Myocardial KATP channels in preconditioning. *Circ Res* 87:845-855
69. Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, Rusticali F (1995) Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning. *Circulation* 91:291-297
70. Palitzsch KD, Nusser J, Arndt H, Enger I Zietz b, Cuk A, Schäffler A, Büttner R, Frick E, Rath H, Schölmerich J, und die Diabetomobil-Studiengruppe: Die Prävalenz des Diabetes mellitus wird in Deutschland deutlich unterschätzt – eine bundesweite epidemiologische Studie auf der Basis einer HbA1c-Analyse. *Diabetes und Stoffwechsel* 8, 189-200, 1999
71. Panzram G: Mortality and survival in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 30, 123-131, 1987
72. Qiu,Y, Rizvi,A, Tang,XL, Manchikalapudi,S, Takano,H, Jadoon,AK, Wu,WJ, Bolli,R: Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1997; 273: H2931-H2936
73. Sakurai K., Katoh M., Someno K. und Fujimoto Y. (2001): Apoptosis and mitochondrial damage in INS-1 cells treated with Alloxan. *Biol. Pharm. Bull.* 24, 876-882
74. Sasaki N, Sato T, Ohler A, O'Rourke B, Marban E.: Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation* 2000; 101: 439-445.
75. Schricker T, Lattermann R, Fiset P, Wykes L, Carli F (2001) Integrated analysis of protein and glucose metabolism during surgery: effects of anesthesia. *J Appl Physiol* 91:2523-2530
76. Schultz JJ, Hsu AK, Gross GJ: Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning via a Glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart. *Circulation Research* 1996; 78: 1100-4.

77. Smith JW, Marcus FI, Serokman A: Prognosis of patients with diabetes mellitus after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 54, 718-721, 1984
78. Stambaugh K, Elliott GT, Jacobson KA, Liang BT. Additive effects of late preconditioning produced by monophosphoryl lipid A and the early preconditioning mediated by adenosine receptors and  $K_{ATP}$  channel. *Circulation* 1999; 99: 3300-3307.
79. Stanley WC, Hall JL, Hacker TA, Hernandez LA, Whitesell LF: Decreased myocardial glucose uptake during ischemia in diabetic swine. *Metabolism*. 1997 Feb;46(2):168-72
80. Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CB, Turi ZG, Strauss HW, Willerson JT, Robertson T, Braunwald E, Jaffe AS, and the MILIS Study Group: The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: Contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. *J Am Coll Cardiol* 14, 49-57, 1989
81. Strödter D, Wegenaer M, Federlin K: Reduziert diastolische Funktion bei Typ-I-Diabetikern. *Diab Stoffw* 4, 395-401, 1995
82. Strödter D, Willmann P, Willmann J, Federlin K, Schaper W: Results of a balance of energy in the diabetic heart, pp 383-393. In: *The Diabetic Heart*, edited by Nagano M and Dhalla NS, Raven Press, LTD, New York, 1991
83. Tajaddini A, Klingensmith JD, Vince DG: An intravascular ultrasound study of coronary artery compliance in the diabetic population. *Circulation* 102, suppl II, II-636, 2000
84. Tanaka K, Kehl F, Gu W, Krolikowski JG, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR.: Isoflurane-induced preconditioning is attenuated by diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Jun;282(6):H2018-23
85. Tsuchida A, Liu A, Liu GS, Cohen MV, Downey JM: Alpha-1-adrenergic agonists precondition rabbit myocardium independent of adenosine by direct activation of protein kinase C. *Circulation Research* 1994; 75: 576-85.

86. Vahlhaus C, Schulz R, Post H, Onallah R, Heusch G. No prevention of ischemic preconditioning by protein kinase C inhibitor staurosporine in swine. *Circ Res* 1996; 79: 407-414.
87. van Hoeven KH, Factor SM: A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease. *Circulation*. 1990 Sep;82(3):848-55
88. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol* 1985; 121: 522-530.
89. Vogel WM, Apstein CS (1988) Effects of alloxan-induced diabetes on ischemia-reperfusion injury in rabbit hearts. *Circ Res* 62:975-982
90. Yang, XM, Baxter, GF, Heads, RJ, Yellon, DM, Downey, JM, Cohen, MV: Infarct limitation of the second window of protection in a conscious rabbit model. *Cardiovasc. Res.* 1996; 31: 777-783
91. Yao Z, Gross GJ: Acetylcholine mimics ischemic preconditioning via a glibenclamide-sensitive mechanism in dogs. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: H2221-H2225.
92. Ytrehus K, Liu Y, Tschida A, Miura T, Liu GS, Yang X-M, Herbert D, Cohen MV, Downey JM. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol* 1994; 267: H2383- H 2390.
93. Zarich S, Waxman S, Freeman RT, Mittleman M, Hegarty P, Nesto RW: Effect of autonomic nervous system dysfunction on the circadian pattern of myocardial ischemia in diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol.* 1994 Oct;24(4):956-62
94. Zhao G, Zhang X, Smith CJ, Xu X, Ochoa M, Greenhouse D, Vogel T, Curran C, Hintze TH (1999) Reduced coronary NO production in conscious dogs after the development of alloxan-induced diabetes. *Am J Physiol* 277:H268-H278
95. Zhou X, Zhai X, Ashraf M. Direct evidence that initial oxidative stress triggered by preconditioning contributes to second window of protection by endogenous antioxidant enzyme in myocytes [see comments]. *Circulation* 1996; 93(6): 1177-1184.

96. Zoneraich S, Silverman G: Myocardial small vessel disease in diabetic patients. In: Zoneraich S, ed. Diabetes and Heart, Springfield, Charles C. Thomas, p 3-18, 1978

## 9. Danksagung

Zu Beginn möchte ich gerne meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. V. Thämer für die große Hilfsbereitschaft und bereitwillige Betreuung dieser Arbeit danken. Es war eine Selbstverständlichkeit für ihn stetes Interesse an den laufenden Versuchen zu zeigen und mich bis zur Fertigstellung dieser Arbeit mit konstruktiver Kritik zu (beg)leiten.

Herrn Dr. med. D. Ebel, der die gesamte Durchführung organisierte und die Auswertung der Versuchsreihe vorgenommen hat. Trotz einer Menge Arbeit war die Atmosphäre immer fröhlich und seine Hilfsbereitschaft fast unermesslich. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht so zustande gekommen. Ganz besonderen Dank und alles erdenklich Gute für deine noch junge Familie.

Vielen Dank der gesamten Arbeitsgruppe für die sehr gute Unterstützung, die fröhliche Atmosphäre und die lustigen Bowlingabende. Ich habe mich bei euch sehr wohl gefühlt und ihr habt sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Nicht zuletzt danke ich aus tiefstem Herzen meinen Eltern, die mir wie selbstverständlich mein Medizinstudium ermöglicht haben, und meiner Schwester Susanne. Sie unterstützten mich in meinem bisherigen Leben in so vielen Dingen, die mir wichtig waren, bauten mich auf wenn ich zweifelte und halfen mir an mich selbst zu glauben. Danke für euer Vertrauen und eure Liebe.

Liebsten Dank meiner Freundin Nina, die mir -trotz all meiner Launen und meinem Wahnsinn- all ihre Liebe und Kraft schenkt. Ihre Gutmütigkeit und ihr Fleiß können mir nur ein Vorbild sein. Danke auch meinen engsten Freunden Thomas, Karsten, Daniel, Ruben und Florian –Ihr habt mich bisher sehr geprägt.

# 10. Lebenslauf

## Hochschulausbildung:

- Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf seit 10/1998: Studiengang Medizin
  - 08/06/2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: Gut)/
  - 04/2004-03/2005: Praktisches Jahr am St. Antonius Klinikum Wuppertal und Conradie Hospital in Kapstadt (University of Cape Town)
  - 03/2004: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: Gut)
  - 03/2002: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: Befriedigend)
  - 09/2000: Ärztliche Vorprüfung (Note: Befriedigend)
  - Famulaturen:
    - 08-09/2003: Innere Medizin im Conradie Hospital Cape Town
    - 09-10/2002: Pädiatrie Universitätsklinikum Düsseldorf
    - 07-08/2002: Neurologie in Praxis Dr. A. Brosig Grevenbroich
    - 08-09/2001: Anästhesiologie Universitätsklinikum Düsseldorf
    - 02-03/2001: Unfallchirurgie Krankenhaus Neuwerk MG
  - Nebentätigkeiten:
    - 2000-2004: regelmäßige Nachtwachenaushilfe auf versch. Chirurgischen Stationen Uniklinik Düsseldorf
    - 1999-2000: pflegerische Hilfskraft Geriatrie Psychiatrie Lore-Agnes-Haus Düsseldorf
  - Publikationen (Koautorenschaft):
    - 2003: Ebel, D., Müllenheim, J., Fräßdorf, J., Heinen, A., Huhn, R., Bohlen, T., Ferrari, J., Südkamp, H., Preckel, B., Schlack, W., Thämer, J.: Effect of acute hyperglycaemia and diabetes mellitus with and without short-term insulin treatment on myocardial ischaemic late preconditioning in the rabbit heart in vivo. *Pflügers Arch – Eur J Physiol* 446: 175-182 (2003)
    - 2004: Ebel, D., Müllenheim, J., Südkamp, H., Bohlen, T., Ferrari, J., Huhn, R., Preckel, B., Schlack, W.: Role of tyrosine kinase in desflurane-induced preconditioning. *Anaesthesiology* 100: 555-561 (2004)
- Albert-Ludwigs-Universität Freiburg 04-10/1998: Studiengang Zahnmedizin

**Zivildienst:**

- 08/1996-08/1997: Pflegedienst Unfallchirurgie Kreiskrankenhaus Dormagen

**Schulbildung:**

- 08/1987-06/1996: Pascal Gymnasium Grevenbroich, Abitur (Note 1,5)
- 08/1983-07/1987: Grundschule Wevelinghoven

**Persönliche Daten:**

- Geburtsdatum/-ort: 22.10.1976 in Neuss
- Eltern: Heinz Ferrari (dipl. Grafikdesigner),  
Margot Ferrari (Zahnarzthelferin / Hausfrau)
- Geschwister: Susanne Ferrari (dipl. Grafikdesignerin)
- Familienstand: ledig

Düsseldorf, den 06.07.2005

Jan Ferrari

## Diabetes mellitus blockiert die späte Phase der ischämischen Präkonditionierung am Kaninchenherzen in vivo

### Abstract

**Fragestellung:** Diabetes mellitus und Hyperglykämie sind bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt mit einer erhöhten Letalität verbunden. Bekannt ist, dass Hyperglykämie den kardioprotektiven Effekt der frühen ischämischen Präkonditionierung (EPC) aufhebt; wahrscheinlich durch Blockierung der ATP abhängigen Kaliumkanäle ( $K_{ATP}$ -Kanäle). Es konnte gezeigt werden, dass eine akute Hyperglykämie während der Infarkt-induzierenden Ischämie auch den kardioprotektiven Effekt der späten ischämischen Präkonditionierung (LPC) blockiert. Diese Studie untersuchte den Effekt eines Alloxan-induzierten Diabetes mellitus (DM) auf die LPC an Kaninchenherzen in vivo und welchen Einfluss eine kurzzeitige Insulinbehandlung (I) hat. Da Diabetes die Verfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) zu reduzieren scheint, und NO eine entscheidende Rolle als Mediator der LPC hat, bestimmten wir bei den Diabetischen Tieren die Proteinlevel der induzierbaren- als auch der endothelialen NO-Synthase (iNOS, eNOS) des Aortengewebes.

**Methodik:** 61 Kaninchen zuvor 6 Gruppen zugeteilt (Kontrolle, LPC, DM, DM+LPC, DM+I, DM+LPC+I) wurden chronisch mit einem Koronararterienokkluder instrumentiert. Die Kaninchen der DM-Gruppen wurden 5-6 Wochen vor der Instrumentierung durch Alloxan (100 mg/kg i.v.) in eine diabetische Stoffwechsellage versetzt. Alle Tiere wurden einer 30-minütigen Koronararterienokklusion (Indexischämie) gefolgt von einer 2-stündigen Reperfusion (I/R) unterzogen, wobei 90 Minuten vor I/R in 2 DM-Gruppen (DM+I, DM+LPC+I) eine kurzzeitige Insulinbehandlung durchgeführt wurde. Bei der LPC-Gruppe wurde 24 Stunden vor I/R eine 5-minütige myokardiale Ischämie hervorgerufen (LPC). Die Kontrollgruppe wurde nicht weiter behandelt. Nach I/R bestimmten wir die Infarktgröße (IS). Die eNOS- und iNOS-Proteinlevel bestimmten wir mithilfe des Westernblot-Verfahrens; gemessen in optischen densometrischen Einheiten [odu] pro  $\text{mm}^2$ .

**Statistische Analyse:** Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung präsentiert. Zum statistischen Vergleich wurde der Student's t-Test mit der Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche durchgeführt. Änderungen waren signifikant, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war.

**Ergebnisse:** Die späte Präkonditionierung reduzierte die IS von  $43 \pm 13$  % (Kontrolle) auf  $23 \pm 10$  % (LPC) des ischämischen Gebietes (Risikogebiet) ( $P=0,003$ ). Die DM-Gruppe zeigte eine IS von  $39 \pm 11$  %, wobei ein kardioprotektiver Effekt durch eine LPC bei den diabetischen Tieren nicht nachgewiesen werden konnte (DM+LPC  $41 \pm 16$  %;  $P=0,02$  vs. LPC). Die akute Insulinbehandlung erbrachte keine Infarktgrößenverkleinerung, konnte die Blockierung der LPC also nicht aufheben (DM+I,  $42 \pm 15$  %; DM+LPC+I  $40 \pm 10$  %,  $P=0,03$  vs. LPC). Die gemessenen eNOS-Proteinlevel der diabetischen Tiere waren signifikant kleiner als die der Kontrollgruppe (eNOS: DM  $1,69 \pm 0,47$  odu, vs. Kontrolle  $3,76 \pm 0,47$  odu,  $P=0,001$ ). Kein Unterschied zwischen den iNOS-Proteinlevel der beiden Gruppen (iNOS: DM  $9,7 \pm 2,9$  odu vs. Kontrolle  $13,4 \pm 5,9$  odu,  $P=0,15$ ).

**Schlussfolgerung:** Diabetes mellitus blockiert die Kardioprotektion der späten ischämischen Präkonditionierung (LPC) beim Kaninchenherzen in vivo. Eine kurzzeitige Normalisierung des Blutglukosespiegels durch eine Insulinbehandlung 90 Minuten vor der Indexischämie kann die Protektion der LPC nicht wieder herstellen. Eine Verminderung der endothelialen-Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) könnte eine Erklärung für dieses Phänomen sein.

Prof. Dr. V. Thämer

Hinseldorf, den 22.12.2005