

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. Benedikt Pannen

Endotheliale Dysfunktion am isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff

Etablierung eines Modells
zur kontrollierten Endothelschädigung *ex vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Natalie Schneider
2024

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

gez.:

Dekan: Professor Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. Annika Raupach

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dr. André Heinen

Für meine Oma

Zusammenfassung

Die endotheliale Dysfunktion (ED), bei der das geschädigte Endothel bzw. die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) nicht ausreichend Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert, ist eine verbreitete Pathologie mit Konsequenzen für die kardiovaskuläre Gesundheit. Im Langendorff-Modell kann die ED z. B. durch Perfusion einer hochmolaren Kaliumlösung oder durch Bolusgabe von Triton X-100 induziert werden; letzteres funktioniert durch eine unspezifische Lyse von Zellen. Zur gezielteren Schädigung ist das Ziel dieser Arbeit die Etablierung eines kaliumbasierten ED-Protokolls. Dabei soll im Ischämie/Reperfusion (I/R)-Versuch kein Einfluss des ED-Modells auf Infarktgrößen (IS) nachweisbar sein. Zur Verifizierung der ED soll die physiologische Endothelfunktion zunächst mittels endothelabhängigen (Histamin) und -unabhängigen (Natriumnitroprussid, SNP) Vasodilatoren charakterisiert werden.

Rattenherzen wurden in einem fluss- und druckkonstanten sowie kombinierten Langendorff-Modell untersucht. Histamin (800 nmol) und SNP (1 μ M) wurden allein sowie unter L-Name (eNOS-Inhibitor, 100 μ M) perfundiert und anschließend jeweils vor und nach Perfusion mit 60 mM Kaliumpuffer (K^+), Vehikeln (Kontrolle, Kon) oder Triton (1 %) perfundiert, um eine Abschwächung der Vasodilatation (VD) sichtbar zu machen. Zuletzt wurden die IS im I/R-Versuch bestimmt.

Histamin und SNP bewirkten allein eine deutliche VD; bei Zugabe von L-Name nahm die VD durch Histamin signifikant ab. Histamin zeigt also die Endothelantwort. Auch K^+ verminderte die VD durch Histamin hochsignifikant im Vergleich zu Kon, woraus sich eine durch 60 mM Kaliumlösung induzierte ED ableiten lässt. Die Positivkontrolle mit Triton bewirkte eine ähnlich starke Verminderung der VD wie K^+ . Die VD durch SNP, und somit die glatte Muskulatur, blieb unbeeinträchtigt. Im I/R-Versuch zeigten K^+ und Kon im Vergleich zu einer Referenzgruppe ohne Intervention jeweils signifikant niedrigere IS.

Im Zuge dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Modell zur ED im Langendorff-Modell mittels 60 mM Kaliumpuffer etabliert werden; es gelang somit eine ED ohne lysierende Substanzen wie Triton bei gleichwertig ausgeprägtem Funktionsverlust. Die ED scheint auf mildereren Pathomechanismen, in erster Linie einem hohen Scherstress, zu basieren. Mit einer innovativen Kombination von druck- und flusskontrolliertem Langendorff-Aufbau ließ sich das ED-Protokoll in I/R-Versuche integrieren und erlaubt somit die Erforschung der ED im Kontext der Kardioprotektion. Ein kardioprotektiver Effekt des Modells muss aktuell noch berücksichtigt und in Zukunft weiter optimiert werden. Nichtsdestotrotz lässt sich das Modell verlässlich nutzen und erlaubt unter minimalen Einschränkungen die ED-Forschung im Langendorff-Modell.

Summary

Endothelial Dysfunction (ED) is a common pathology of the endothelium, characterized by its inability to produce sufficient amounts of nitric oxide (NO) via the endothelial nitric oxide synthase (eNOS). This condition significantly impacts overall cardiovascular health. It is possible to mimic ED in a Langendorff apparatus, for example, via the perfusion of lysing agent Triton X-100. Another approach involves highly concentrated potassium solutions, offering a more specific and less destructive way of damaging the endothelium. Therefore, the aim of this thesis was to develop an ED model that employs such a potassium solution. The developed ED model should not alter infarct sizes (IS) in ischemia-reperfusion trials (I/R trial). To verify the induced ED, this work will first examine the physiological function of the endothelium, utilizing Histamine (an eNOS-mediated vasodilator) and sodium nitroprusside (SNP, a vasodilator independent of the endothelium).

Rat hearts were assessed using both a flow-controlled and pressure-controlled, as well as a combined Langendorff apparatus. Histamine (800 nmol) and SNP (1 μ M) were perfused individually and concurrently with perfusion of L-Name (an eNOS inhibitor, 100 μ M). Their vasodilating effects were then tested before and after perfusion with a 60 mM potassium solution (K^+), vehicle (control group, Con), and Triton (1 %, positive control), to determine if vasodilation was impaired. Finally, IS were determined in I/R trials.

Histamine and SNP both exhibited significant vasodilatory effects. L-Name significantly diminished the vasodilating properties only of Histamine, indicating Histamine can be used to determine endothelial function. K^+ also significantly reduced the vasodilating effect of Histamine in comparison to the Con group, suggesting the induction of an ED. IS in the Triton group did not alter from those in the K^+ group. K^+ also did not affect the impact of SNP, suggesting no effect on endothelium-independent vasodilation but a significant ED. In I/R trials, significantly lower IS of both K^+ and Con groups could be observed in comparison to a reference group without any intervention.

This study successfully established an ED model in a Langendorff apparatus using a 60 mM potassium solution. Diverging from prior approaches using lysing agent Triton, this model induces ED through comparably mild techniques such as a high perfusion pressure. An innovative combination of flow-controlled and pressure-controlled Langendorff apparatus allowed for integration into ischemia-reperfusion (I/R) trials, enabling further research on ED in the context of cardioprotection. It is important to consider the remaining cardioprotective effect of the model and optimize it further. Nonetheless, it represents a viable approach to ED research in Langendorff trials.

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
5-HT	5-Hydroxytryptamin/Serotonin
BGA	Blutgasanalyse
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
bpm	Schläge pro Minute
Ca ²⁺	Calciumion
CaM	Calmodulin
CF	Koronarfluss
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cmH ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CPP	Koronarer Perfusionsdruck
CPP mean/min	Durchschnittlicher/minimaler Perfusionsdruck
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
dP/dt max	Maximale Druckdifferenz pro Zeitdifferenz/Kontraktilität
ED	Endotheliale Dysfunktion
EDRF	Vom Endothel stammender Relaxationsfaktor
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
ERK1	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1
FAD	Flavinadenindinukleotid
FDR	<i>False Delivery Rate</i>
FMN	Flavinmononukleotid
g, mg, kg	Gramm, Milligramm, Kilogramm
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	<i>High Density</i> Lipoprotein
HF	Herzfrequenz
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor-1 α
HLA	Humane Leukozytenantigene
HTG	Herztrockengewicht
IS	Infarktgröße
IPC	Ischämische Präkonditionierung
IPostC	Ischämische Postkonditionierung
I/R	Ischämie/Reperfusion
JAK	Janus-Kinase
KHP	Krebs-Henseleit-Puffer
KI	Konfidenzintervall
l, ml	Liter, Milliliter
LVDP	Linksventrikulär entwickelter Druck
LVEDP	Enddiastolischer linksventrikulärer Druck
LVESP	Endsystolischer linksventrikulärer Druck
LVP	Linksventrikulärer Druck
L-Name	N ^{ω} -Nitro-L-Arginin-Methylester
min	Minute
MW	Mittelwert

Abkürzung	Erklärung
MLK	Myosinleichtketten
MLKK	Myosinleichtkettenkinase
MLKP	Myosinleichtkettenphosphatase
nM, μ M, mM,	Nanomolar, mikromolar, millimolar
nmol, μ mol, mmol	Nanomol, Mikromol, Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mTPT	Mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore
mU	Milliunits
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamid-Adenindinukleotidphosphat
NF κ B	Nukleärer Factor <i>kappa</i> B
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ^{-·}	Superoxid
ONOO [·]	Peroxynitrit-Radikale
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKG	Proteinkinase G
RG	Körpergewicht der Ratten
RIPC	Ischämische Fernpräkonditionierung
RIPostC	Ischämische Fernpostkonditionierung
RISK	<i>Reperfusion injury salvage kinase</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Umdrehungen pro Minute
s, ms	Sekunde, Millisekunde
SAFE	<i>Survivor activating factor enhancement</i>
SD	Standardabweichung
SMC	Glatte Muskelzelle
SNO	S-Nitrosothiol
SNP	Natriumnitroprussid
STAT3	Signalumwandler und Transkriptionsaktivator 3
TNF- α	Tumornekrosefaktor- <i>alpha</i>
Triton	Triton X-100/Octoxynol 9
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
TxA2	Thromboxan A2
VEGF	Vaskulärer Wachstumsfaktor
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
VR	Versuchsreihe
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierschutz und Tierexperimente der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Endothel	1
1.1.1	Physiologie des Endothels	1
1.1.2	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthese und Stickstoffmonoxid	2
1.1.3	Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion	5
1.1.4	Epidemiologie	7
1.1.5	Klinische Relevanz der endothelialen Dysfunktion	8
1.2	Kardiovaskuläre Erkrankungen und Ischämie-/Reperfusionsschaden	9
1.2.1	Kardiovaskuläre Erkrankungen	9
1.2.2	Ischämie- und Reperfusionsschaden	9
1.3	Grundlagen der Kardioprotektion	10
1.3.1	Möglichkeiten der Konditionierung	10
1.3.2	Physiologische Grundlagen	11
1.3.2.1	Signalwege	11
1.3.2.2	Endotheliale Signalwege	11
1.3.3	Kardioprotektion bei Komorbiditäten	12
1.4	Die Langendorff-Anlage	13
1.4.1	Vasodilatation im Langendorff-Modell	16
1.4.2	Endothelfunktion im Langendorff-Versuch	16
1.4.3	Endotheliale Dysfunktion im Langendorff-Modell	17
1.4.3.1	Verwendung von Triton X-100	17
1.4.3.2	Verwendung von hochmolaren Kaliumpuffern	18
1.5	Ziele der Arbeit	20
2	Methoden	22
2.1	Geräte und Software	22
2.2	Materialien und Chemikalien	23
2.3	Versuchstiere	25
2.4	Langendorff-Versuche	25
2.4.1	Druckkonstante Standard-Langendorff-Anlage	25
2.4.2	Flusskonstante Anlage	26
2.4.3	Kombiniert fluss- und druckkonstante Anlage	26
2.4.4	Krebs-Henseleit-Puffer	27
2.4.5	Hochmolarer Kaliumpuffer	27

2.4.6	Versuchsbeginn	28
2.5	Physiologische Endothelfunktion	29
2.5.1	Vasodilatation durch Histamin	29
2.5.2	Vasodilatation durch SNP	30
2.5.3	Effekt von L-Name auf Histamin- oder SNP- vermittelte Vasodilatation	31
2.6	Endotheliale Dysfunktion	32
2.6.1	Druckkonstante Kaliumperfusion	32
2.6.2	Flusskonstante Kaliumperfusion	33
2.6.3	Angleichung des flusskonstanten Koronarflusses . . .	35
2.6.4	Korrelation von CPP und prozentualem CPP-Abfall . . .	36
2.7	Ischämie-Reperfuersionsversuche zur Infarktgrößenbestim- mung	38
2.7.1	Auswertung der Versuche	39
2.7.2	Bestimmung der Infarktgrößen	39
2.8	Zellkultur	39
2.8.1	Bewertung der Zellschädigung durch Kalium und Tri- ton	39
2.8.2	Permeabilitätsmessung	40
2.9	Statistische Auswertung und Programme	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Physiologische Endothelfunktion	41
3.1.1	Vasodilatation durch Histamin	41
3.1.2	Vasodilatation durch SNP	43
3.1.3	Histamin- oder SNP-induzierte Vasodilatation unter der Gabe von L-Name	45
3.2	Endotheliale Dysfunktion: Druckkonstante Kaliumperfusion	47
3.2.1	Druckkonstante Implikation ohne Washout	48
3.2.2	Druckkonstante Implikation mit Washout	50
3.3	Endotheliale Dysfunktion: Flusskonstante Kaliumperfusion .	53
3.3.1	Flusskonstante Perfusion mit 8,5 ml/min im druck- konstanten Modell ohne Perfusionsdruckmessung . .	53
3.3.2	Perfusion mit 8,5 ml/min im flusskonstanten Modell .	55
3.3.3	Ischämie-Reperfuersionsversuche bei flusskonstanter Perfusion mit 8,5 ml/min	58
3.3.4	Angepasste Perfusion im flusskonstanten Modell . . .	62
3.4	Ischämie-Reperfuersionsversuche zur Infarktgrößenbestim- mung mit angepasstem Koronarfluss	65

3.4.1	Ischämie-Reperfuſionsversuche mit angepasstem Fluss	65
3.4.2	Anpassung der Wärmeverhältnisse	68
3.5	Zellschädigung durch Kaliumpuffer und Triton	73
4	Diskussion	75
4.1	Ziele der Arbeit	75
4.1.1	Physiologische Endothelfunktion	75
4.1.2	Endothelschädigung	75
4.1.3	Ischämie/Reperfuſionsversuche unter ED	77
4.2	Endothelschädigung	77
4.2.1	Endotheliale Dysfunktion durch hochmolare Kaliumlösungen	77
4.2.2	Methodische Umsetzung	79
4.3	Auswahl von Methodik und Substanzen	79
4.3.1	Physiologische Endothelfunktion	79
4.3.2	Korrelation von Ausgangsdruck und prozentualem Druckabfall	80
4.3.3	Berechnungen mittels Differenz und Baseline	81
4.4	Infarktgrößenreduktion durch die Methodik	82
4.4.1	Temperaturbedingte Konditionierung	82
4.4.2	Hypoxische und ischämische Konditionierung	86
4.4.2.1	Konditionierung durch Minderperfusion	86
4.4.2.2	Induktion einer kurzen Ischämie beim Pufferwechsel	88
4.4.3	Präkonditionierung durch Kalium	88
4.5	Einordnung und Relevanz der Ergebnisse	89
4.5.1	Das Langendorff-Modell im 21. Jahrhundert	89
4.5.2	Endothelfunktion im Langendorff-Modell	90
4.5.3	Relevanz von Komorbiditäten im Langendorff-Modell	91
4.5.4	Kombination von druck- und flusskonstantem Langendorff-Modell	92
4.6	Limitationen	93
4.7	Schlussfolgerungen und Fazit	94
5	Danksagungen	

1 Einleitung

1.1 Das Endothel

1.1.1 Physiologie des Endothels

Im Jahr 1998 erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad den Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung von Stickstoffmonoxid (NO) als Signalstoff am Endothel. [1] Das Gefäßendothel, eine einschichtige Lage von Zellen, die das Gefäß luminal auskleidet, wird seither weiter erforscht und inzwischen als wichtiger Faktor in diversen Signalwegen verstanden. [2] Bereits 1980 konnte von Furchgott & Zawadzki gezeigt werden, dass NO eine Rolle in Regulationsprozessen des Gefäßes spielt; sie entdeckten, dass Acetylcholin nur einen relaxierenden Effekt auf Aortenringe hat, wenn deren Endothel nicht mechanisch beschädigt wurde. [3] Kurz darauf bezeichnete Furchgott die Substanz, die er für diesen Effekt verantwortlich machte, als „Vom Endothel stammender Relaxationsfaktor“ (EDRF); man wusste zunächst nur, dass die Substanz kein Prostaglandin war. [4]

1986 entdeckte dann u.a. Robert Furchgott, dass es sich bei dem bislang nicht näher identifizierten EDRF um NO handelte — eine Entdeckung, die nicht nur den bereits erwähnten Nobelpreis gewann, sondern auch Jahrzehnte von Forschung an NO und seinen Signalkaskaden und klinischen Einflüssen des Endothels nach sich zog. [1]

Abgesehen von NO setzt das Endothel diverse weitere Substanzen frei, darunter Prostacyclin, Thromboxan A_2 und Superoxid ($O_2^{\cdot-}$). [5] Zahlreiche weitere Funktionen des Endothels wurden seitdem entdeckt. Im physiologischen Zustand dient es als semipermeable Membran, die am Stoffwechsel des Gefäßes bzw. seiner glatten Muskelzellen (SMC) beteiligt ist und die Hämostase ermöglicht. Es ist durch Freisetzung von NO über die endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS, s. Kapitel 1.1.2) am Gefäßtonus, der Gefäßpermeabilität sowie Entzündungs- und Adhäsionsprozessen beteiligt. [6] Auch in der Regulation der Immunantwort, der Destruktion von Pathogenen und der Tumorgenese wird NO eine relevante Rolle zugeschrieben. Außerdem reguliert es die Migration und Proliferation vaskulärer SMCs sowie die Plättchenaggregation. [7]

Physiologischerweise führen verschiedene Arten von Reizen am Endothel dazu, dass die eNOS aktiviert und konsekutiv NO freigesetzt wird.

Hierzu zählen sowohl physikalische Kräfte bzw. eine erhöhte Schubspannung als auch verschiedene Mediatoren, darunter Histamin, Bradykinin und Acetylcholin. [8–10]

1.1.2 Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase und Stickstoffmonoxid

Die eNOS ist ein Enzym in Endothelzellen, das die Synthese von NO katalysiert. Um diesen physiologischen Prozess zu aktivieren, muss zunächst ein Reiz in die Endothelzelle gelangen (s. Kapitel 1.1.1). Die daraus resultierende Aktivierung der eNOS ist in Abbildung 1 dargestellt. Sie erfolgt durch die Aktivierung von membranständigen Calciumkanälen auf den Endothelzellen; der resultierende erhöhte Einstrom von Calcium aktiviert wiederum die eNOS. Daraufhin synthetisiert diese, in zwei Nicotinamid-Adenindinukleotidphosphat (NADPH)-abhängigen Reaktionsschritten, aus L-Arginin über Flavinadenindinukleotid (FAD) und Flavinmononukleotid (FMN) die Herstellung von NO unter Abspaltung von L-Citrullin. Das Enzym wird hierbei dimerisiert. [12] Im Reaktionsprozess wird Tetrahydrobiopterin (BH₄) als Reduktionsmittel benötigt, um ein Elektron von NADPH auf Arginin zu übertragen [11]. Der Prozess erfordert zudem die Präsenz von gebundenem Calcium an Calmodulin (CaM). [12]

Das freigesetzte NO ist ein flüchtiges Gas mit einer sehr kurzen Halbwertszeit. Es kann frei in die glatte Muskelzelle des Gefäßes diffundieren und hier für eine Relaxation sorgen, indem es die Guanylatzyklase in der glatten Muskelzelle aktiviert, die wiederum Guanosintriphosphat (GTP) zu zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) umsetzt. Dieses aktiviert die Proteinkinase G (PKG) und konsekutiv die Myosinleichtkettenphosphatase (MLKP). [13] Diese ist dafür verantwortlich, dass Myosinleichtketten (MLK) dephosphoryliert werden und der Muskel relaxiert. Ihr Gegenspieler ist die Myosinleichtkettenkinase (MLKK), die unter Calcium und CaM durch Phosphorylierung der MLK zu einer Kontraktion des Gefäßes führt. [13]

Abgesehen von der Wirkung über cGMP kann NO jedoch auch physiologische Effekte durch die sogenannte S-Nitrosierung bewirken. Durch Interaktion mit Cysteingruppen an Proteinen kommt es zur Bildung von S-Nitrosothiol (SNO)-Gruppen an Molekülen und zur strukturellen Änderung des jeweiligen Proteins; eine posttranslationale Modifikation, über die diverse Signalwege beeinflusst werden können. [14]

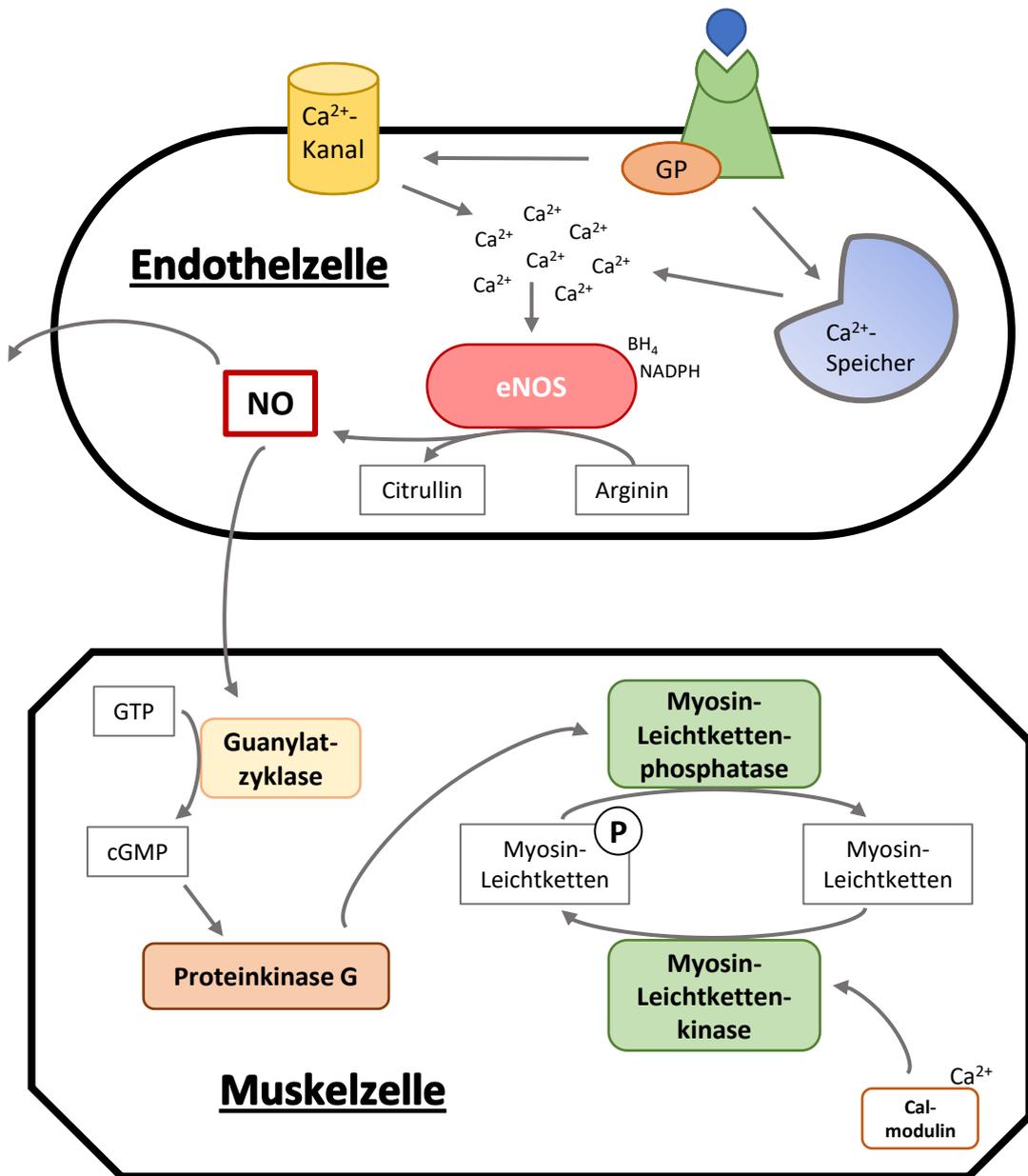


Abbildung 1: Vasodilatative Wirkung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase

Schematische Darstellung der Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) und des durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) vermittelten Signalwegs. Beim Einstrom von Calciumionen (Ca^{2+}) oder einer G-Protein (GP)-vermittelten Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern wird die eNOS aktiviert und setzt Stickstoffmonoxid (NO) frei. Dieses kann als flüchtiges Gas frei in die glatte Gefäßmuskelzelle diffundieren, wo es die Bildung von cGMP aus Guanosin triphosphat (GTP) über die Guanylatzyklase fördert; cGMP wiederum aktiviert die Proteinkinase G, die über die Myosinleichtkettenphosphatase und die Dephosphorylierung der Myosinleichtketten zu einer Vasodilatation führt. Calmodulin aktiviert hingegen den Gegenspieler, die Myosinleichtkettenkinase, die zu einer Phosphorylierung und Vasokonstriktion führt. BH_4 : Tetrahydrobiopterin, NADPH: Nicotinamid-Adenindinukleotidphosphat, P: Phosphorylierung. Modifiziert nach [11–13].

1.1.3 Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion

Die Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion (ED) lässt sich nach Hunt & Jurd in fünf Kernveränderungen zusammenfassen [20], welche schlussendlich dafür sorgen, dass das Gleichgewicht von Vasokonstriktion und Vasodilatation gestört ist und die vaskuläre Homöostase nicht mehr aufrechterhalten werden kann. [21] Sie umfassen den Verlust der vaskulären Integrität, die Expression von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten, eine Veränderung hin zu prothrombotischen Eigenschaften, die Produktion von Zytokinen sowie eine Heraufregulierung von humanen Leukozytenantigen-(HLA)-Molekülen. Insgesamt stellt sich also ein proinflammatorischer Prozess dar, der gleichzeitig die eigentlichen Funktionen des Endothels verhindert oder umkehrt. [20] Die ED wird sowohl als Vorstufe der Atherosklerose als auch als Risikofaktor für diese bzw. deren Progression eingeordnet [22]. So entstehen die meisten pathophysiologischen Vorgänge der Atherosklerose im sub-endothelialen Raum, wo sie zu großen Teilen durch das Endothel beeinflusst werden können. [2]

In Abbildung 3 ist das Vorschreiten einer ED zur Atherosklerose sowie die Rolle des Endothels in der Atherogenese dargestellt. In frühen Phasen kommt es unter gestörter Endothelfunktion zur Verdickung der Intima, worauf aufbauend Fettzellen eingelagert werden, Immunzellen einwandern und ein atheromatöser Plaque entsteht. Dieser entwickelt schließlich einen nekrotischen Kern, welcher durch die gestörte Endothelbarriere ins Lumen des Gefäßes rupturieren kann und dann eine

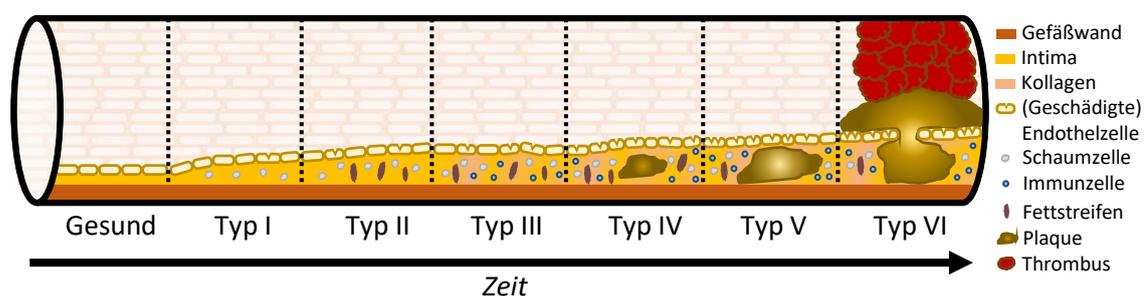


Abbildung 3: Entstehung der Atherosklerose

Von links nach rechts sind die Stadien/Typen der Atherosklerose im zeitlichen Verlauf vereinfacht dargestellt. Während bei Typ I zunächst nur eine Intima-Verdickung mit endothelialer Dysfunktion und Einwanderung von Schaumzellen vorliegt, kommt es bei Typ II zur Ablagerung von Fett in der Intima. Ab Typ III wandern zudem zahlreiche Immunzellen ein und es bilden sich Kollagenfasern in der Intima, bevor sich in Typ IV ein atheromatöser Plaque bildet. Ab Typ V entwickelt dieser einen nekrotischen Kern, der bei Typ VI ins Lumen rupturiert. Dies zieht die Bildung eines Thrombus mit konsekutivem Gefäßverschluss nach sich. Modifiziert nach [19].

Thrombosierung des Gefäßes nach sich zieht. [19]

Ein früher Faktor in der Entstehung einer ED sind ROS, die z. B. in Stoffwechselprozessen entstehen können. Bei einem Ungleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien kommt es zur Schädigung umliegenden Gewebes. Außerdem wird NO von ROS mit hoher Affinität inaktiviert, mit der Folge einer niedrigeren Bioverfügbarkeit. [22] Darüber hinaus führen diese ROS zur sogenannten Entkopplung der eNOS, bei der am Häm-Molekül der eNOS O_2^- , also freie Radikale, statt NO produziert werden. [23] Die Abbildung 4 zeigt den Vergleich von physiologischer und entkoppelter eNOS.

Bei gleichzeitigem Vorliegen von entkoppelter und physiologischer

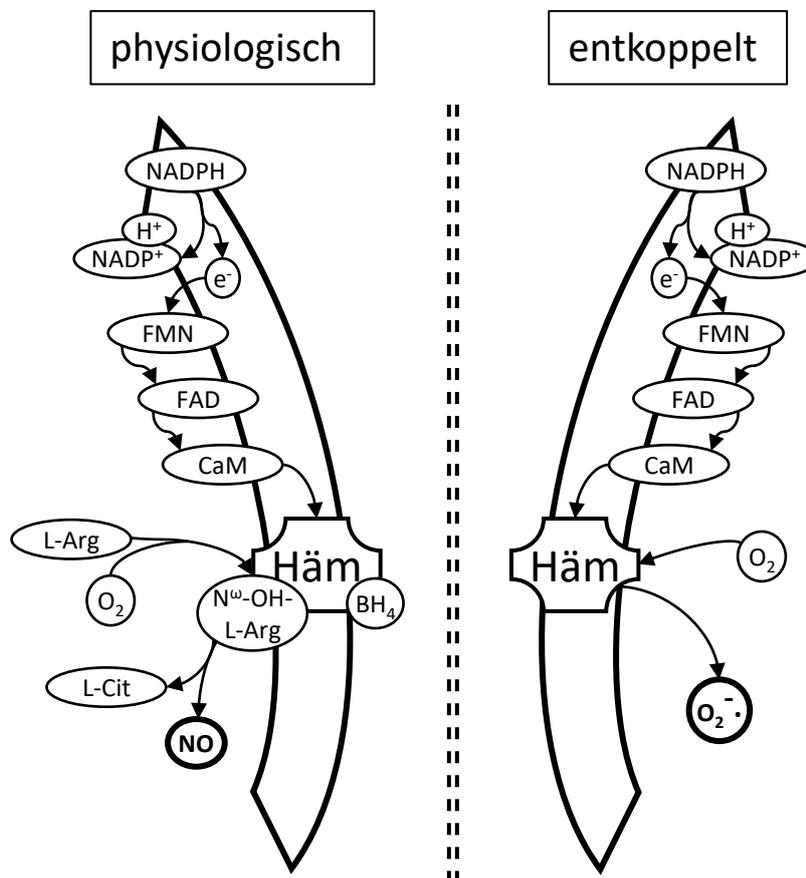


Abbildung 4: Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthese (eNOS)

Links im Bild ist ein eNOS-Monomer mit physiologischen Reaktionen dargestellt. Unter Abspaltung eines Protons (H^+) überträgt es ein Elektron (e^-) von Nicotinamid-Adenindinukleotidphosphat (NADPH) (über Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) über Calmodulin (CaM)) an Häm. Dort entstehen aus L-Arginin (L-Arg) und Sauerstoff (O_2) in Anwesenheit von Tetrahydrobiopterin (BH_4) zunächst N ω -Hydroxy-L-Arginin (N ω -OH-L-Arg) und daraus L-Citrullin (L-Cit) und Stickstoffmonoxid (NO). Rechts ist ein entkoppeltes Monomer dargestellt, das in Abwesenheit von BH_4 und L-Arginin im letzten Schritt Superoxid (O_2^-), also freie Radikale, herstellt. Beide Monomere liegen zur Reaktion in vivo als Dimer vor.

eNOS reagieren NO und $O_2^{\cdot-}$ zu Peroxynitrit-Radikalen ($ONOO^{\cdot-}$), was wiederum den oxidativen Stress erhöht und die Bioverfügbarkeit von NO erniedrigt. [24] Zudem wird BH_4 , ein wichtiger Cofaktor der eNOS, durch $ONOO^{\cdot-}$ oxidiert, was schlussendlich durch verminderte Synthese wiederum zu einer niedrigeren Bioverfügbarkeit von NO beiträgt. [25] Komorbiditäten wie ein Diabetes mellitus fördern bekanntermaßen die Entstehung und Progression einer ED durch vermehrte Produktion von ROS. Dies löst wiederum die Entkopplung der eNOS aus und bzw. verstärkt sie. Ein Diabetes mellitus fördert zudem auch durch weitere Einflüsse auf Signalwege wie z. B. den Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (Akt)-Signalweg das Voranschreiten einer ED. [22]

Auch ein Hypertonus führt, u. a. über eine vermehrte Freisetzung von ROS, zur Verschlechterung der Endothelfunktion. [26] Da höherer Scherstress bei laminarer Strömung die Endothelzellen durch deren Aktivierung schützt, bilden sich in frühen Stadien der ED endotheliale Läsionen und atherosklerotische Plaques primär an Stellen mit niedrigem Scherstress und turbulenter Strömung [27]. Längerfristig führen ein hoher Perfusionsdruck im Sinne einer Hypertonie und ein daraus resultierender hoher Scherstress jedoch ebenfalls zur Schädigung des Endothels [26].

Schlussendlich führen all diese pathophysiologischen Zusammenhänge zu einer eingeschränkten endothelvermittelten Vasodilatation und Störungen in Homöostase sowie den zuvor genannten weiteren Funktionen des Endothels. [6]

1.1.4 Epidemiologie

Die Epidemiologie der ED lässt sich nur ungenau benennen, da bislang kein klinisches Screening dieser Pathologie etabliert ist. [6, 28] Die ED wird allgemein als Vorstufe der Atherosklerose betrachtet [2], welche bei Menschen über 60 Jahren mit einer Prävalenz von ca. 15 % vorliegt und auf der Grundlage einer Hyperlipidämie entsteht [29]. Die ED wird zudem mit diversen weiteren kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie assoziiert [2]; diverse Stimuli wurden bereits als Faktoren für ein Voranschreiten der ED identifiziert, darunter Diabetes mellitus Typ 2 sowie das metabolische Syndrom und der Nikotinabusus [6].

1.1.5 Klinische Relevanz der endothelialen Dysfunktion

Obwohl Studien zeigen konnten, dass das Ausmaß einer Endothelschädigung mit dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse korreliert [30], gibt es aktuell weder eine einheitliche Methode zur Messung der ED, noch ist die Prüfung auf ED klinischer Standard [6].

Wie in Kapitel 1.1.3 beschrieben, ist die ED sehr eng mit der Atherosklerose verknüpft. Diese wiederum ist die häufigste Ursache für Myokardinfarkte, da rupturierte Plaques die Koronararterien okkludieren und so zu einer akuten Ischämie führen können. Ebenso sind atherosklerotische Plaques durch unvollständige Gefäßverschlüsse ursächlich für die Symptomatik vieler Patienten mit stabiler Angina pectoris. [31] Dass Patienten mit einer Herzinsuffizienz im Stadium NYHA II-III und unterdurchschnittlicher Endothelfunktion eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für Hospitalisierung aufgrund der Herzinsuffizienz, Tod aus kardialer Ursache und Herztransplantation aufweisen, konnten außerdem Fischer *et al.* zeigen. [32] Letztendlich liegt also in einem großen Patientenkollektiv eine klinisch meist unerkannte ED vor, deren medikamentöse Beeinflussbarkeit als relevanter Prognosefaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) gilt. [6]

Diverse gängige Herz-Kreislauf-Medikamente können allerdings die Endothelfunktion verbessern: Z. B. arbeiteten Landmesser *et al.* heraus, dass im Mausmodell eine Statintherapie die endothelvermittelte Vasodilatation verbessert und die Kapillarisation in Infarktzone begünstigt. [33] Angesichts der Tatsache, dass leitliniengerecht jeder Patient mit Myokardinfarkt ein Statin bekommen sollte, hat die individuelle Endothelfunktion hier einen potenziellen direkten Einfluss auf die Sekundärprävention. [34]

Auch Inhibitoren des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE-Hemmer) wie Ramipril und Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten wie Losartan konnten in tierexperimentellen Studien eine Verbesserung der Endothelfunktion zeigen [35, 36] und werden in der Sekundärprävention eines Myokardinfarkts empfohlen [34].

1.2 Kardiovaskuläre Erkrankungen und Ischämie-/Reperfusionsschaden

1.2.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Im 21. Jahrhundert sind CVD noch immer die führende Todesursache weltweit, welche mit hohem Maß an Leiden für die Betroffenen und hoher sozioökonomischer Belastung einhergeht. Daraus erklärt sich der hohe Forschungsbedarf auf dem Gebiet der kardiovaskulären Forschung, der Morbidität und Mortalität durch CVD schlussendlich verringern soll. [37–39] Im Fokus stehen Lebensqualität und Lebensverlängerung; der Krankheitsprogress soll verlangsamt und Symptome mit den geringstmöglichen Nebenwirkungen gelindert werden. [40, 41] Erreicht wird dies z. B. durch die Entwicklung neuer Medikamente, Therapieansätze und Technologien. [42]

Ebenso wichtig ist die Weiterentwicklung der Kardiochirurgie und ihrer Sicherheit für den Patienten [43] sowie das perioperative Management kardiochirurgischer Patienten, z. B. die Kardioprotektion – der Versuch, das Herz des Patienten während kardiochirurgischer Eingriffe vor einem Schaden durch ischämische Bedingungen und die darauffolgende Reperfusion zu schützen. Dieser Ansatz wird auch bei ischämischen Erkrankungen des Herzens, in erster Linie dem Myokardinfarkt, verfolgt. [44, 45]

Durch die Forschung zur Kardioprotektion konnten bereits diverse Methoden und Mechanismen zur Reduktion der Myokardschädigung etabliert werden, jedoch sind die Pathologie und die Protektion selbst sowie die genauen Zusammenhänge bisher nicht vollständig verstanden. [45]

1.2.2 Ischämie- und Reperfusionsschaden

Der Ischämie-Reperfusionsschaden beschreibt die Schädigung von Gewebe bzw. Myokard, die durch eine Ischämie und die darauffolgende Reperfusion entsteht. Obwohl die Ischämie der eigentlich schädigende Mechanismus für die Kardiomyozyten ist, hat sich gezeigt, dass ein großer Teil des Schadens erst durch die Reperfusion entsteht. [46]

Die Ischämie bedingt zum einen eine prothrombotische Mikroumgebung, die zum konsekutiven Verschluss kleinster Gefäße durch Thrombozytenaggregation nach der Reperfusion führt. Zudem bedingen auch atheromatöse Bestandteile, die während der Reperfusion freigesetzt werden, den Verschluss von Kapillaren. Eine weitere wichtige Rolle

in der Entstehung des Ischämie-Reperfusionsschadens spielen ROS und die Akkumulation von Calcium sowie proapoptotische Signalkaskaden. [46] Endpunkt dieser proapoptotischen Signalkaskaden ist die mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-Pore (mPTP), ein Ionenkanal des Mitochondriums, dessen Öffnung bei pathologisch erhöhter Öffnungswahrscheinlichkeit zum Anschwellen des Mitochondriums und dadurch zur Apoptose führt. [47]

1.3 Grundlagen der Kardioprotektion

1.3.1 Möglichkeiten der Konditionierung

Die älteste und bekannteste Methode, um eine Kardioprotektion auszulösen, ist die ischämische Präkonditionierung (IPC). Hierbei wird das Herz kurzen, wiederkehrenden Zyklen aus Ischämien und Reperfusionen (I/R) ausgesetzt. [45] Kommt es anschließend zu einer langanhaltenden Ischämie, die zu einem massiven Untergang von Kardiomyozyten führt, so ist das Ausmaß des Zelltods nach IPC deutlich geringer als in Herzen ohne IPC. [48] Eine vergleichbare Protektion kann auch im Rahmen einer ischämischen Postkonditionierung (IPostC) erzielt werden, bei der das Herz erst nach einer längeren Ischämie den mehrfachen I/R-Zyklen ausgesetzt wird. Der Vorteil der IPostC ergibt sich vor allem in Situationen außerhalb des Operationssaals, da kardiale Ischämien hier in der Regel nicht vorhersehbar sind. [45]

Da auch vor allem die IPC im lebenden Organismus schwer umsetzbar ist, wurde sie zur ischämischen Fernpräkonditionierung (*remote ischemic preconditioning*, RIPC) bzw. auch Fernpostkonditionierung (*remote ischemic postconditioning*, RIPostC), also der Unterbrechung der Durchblutung einer Extremität, weiterentwickelt. [45, 49]

Eine weitere Möglichkeit zur Kardioprotektion ist die Konditionierung des Herzens durch Medikamente: Beispielsweise Katecholamine, Adenosin, Bradykinin oder Opiode können wie die repetitiven I/R-Zyklen durch Initiierung kardioprotektiver Signalwege (s. Kapitel 1.3.2) eine Protektion bewirken. [50] Als nicht-invasive und praktikable Methode ist die pharmakologische Konditionierung eine vielversprechende Entwicklung, an deren Translation in die Klinik noch geforscht wird. [45]

1.3.2 Physiologische Grundlagen

1.3.2.1 Signalwege

Für die Kardioprotektion konnte eine Beteiligung diverser Signalkaskaden bereits gezeigt werden, wobei die Gesamtheit der kardioprotektiven Signaltransduktion noch nicht im Detail verstanden ist. [45] Eine wichtige Rolle spielen hierbei der *Reperfusion Injury Salvage Kinase* (RISK)-Pathway und der *Survivor Activating Factor Enhancement* (SAFE)-Pathway, die jeweils eine Verschaltung verschiedener antiapoptotischer Signalproteine beschreiben [45, 51] und deren jeweilige alleinige Inhibition kardioprotektive Effekte bereits auslöscht. [52] Letztendlich bewirken Proteine wie PI3K eine Hemmung der mPTP und proapoptische Gene wie bax und p53 werden herunter- sowie antiapoptische Gene wie bcl-2 hochreguliert. [47, 53] Auch NO-vermittelte Signalwege spielen eine Rolle in der Kardioprotektion. [54]

1.3.2.2 Endotheliale Signalwege

Das Endothel hat viele kardiovaskulär wichtige und protektive Funktionen (s. Kapitel 1.1); darüber hinaus wirken einige endothelial freigesetzte Substanzen kardioprotektiv. Die wohl Wichtigste ist NO [54], darüber hinaus sind aber auch Neuregulin 1 und Prostacyclin erwähnenswert. [5, 55]

NO ist ein flüchtiges Gas, das im Gefäßsystem vor allem von Endothelzellen freigesetzt wird (s. Kapitel 1.1); es scheint an den Signalwegen, die den protektiven Effekt der IPC und IPostC vermitteln, beteiligt zu sein. Die meisten Autoren schreiben NO demnach eine kardioprotektive Wirkung zu, auch da konditionierte Herzen *in vivo* während einer Ischämie signifikant höhere Level an NO aufweisen [5] und der IPC außerdem eine direkte Verbesserung der Endothelfunktion zugeschrieben wird [56]. Nur wenige Daten deuten auf eine potenziell schädigende Wirkung hin [54, 57, 58], die beispielsweise mit der Entkopplung der eNOS zusammenhängen könnte. [59] Nur 12 % von 92 Studien der Neunziger Jahre kommen jedoch zum Schluss eines solchen schädlichen Effekts. [58] Einen protektiven Effekt von NO konnten z. B. Jones *et al.* anhand von Mausmodellen zeigen. In Tieren mit einem Knockout der eNOS fiel der I/R-Schaden gravierender aus [60], woraufhin sie auch Mäuse mit einer eNOS-Überexpression untersuchten und hier eine geringere Infarktgröße (IS) als in den Kontrolltieren messen

konnten [61]. Passend dazu wurde in Herzen nach der Induktion einer ED durch Triton X-100 (Triton) eine verminderte Kontraktilität beobachtet [62], die z. B. durch den Wegfall der aktivierenden S-Nitrosierung eines Ryanodin-Rezeptors am Myokard erklärt werden kann. Diese führt unter physiologischen Bedingungen zu einer verbesserten Kontraktilität. [63] Mit steigender Anzahl an S-Nitrosierungen verstärkt sich sogar die Kontraktilitätsverbesserung, sodass eine erhöhte Bioverfügbarkeit von NO mit der Verbesserung der Kontraktilität korreliert. [64]

Auf molekularer Ebene werden viele weitere protektive Effekte der S-Nitrosierung zugeschrieben. Ein Beispiel ist die S-Nitrosierung des Myokard-inhibierenden Faktors (MIF). Dessen Funktion liegt in der Verminderung des oxidativen Stresses in den ersten Minuten der Reperfusion nach einer Ischämie; diese Wirkung wird durch die S-Nitrosierung verstärkt. [65] Über den Mechanismus der S-Nitrosierung übt NO auch Einfluss auf diverse weitere, in der frühen Reperfusion relevante Proteine wie z. B. HIF-1 α und COX 2 aus und nimmt so außerdem Einfluss auf die hypoxische Vasodilatation, Thrombozytenaggregation und Perfusion bzw. Mikrozirkulation. [14]

1.3.3 Kardioprotektion bei Komorbiditäten

Die bisher schwierige Übertragung von kardioprotektiven Maßnahmen aus dem experimentellen Kontext in die klinische Anwendung wird inhibierenden Effekten durch Komorbiditäten, wie Alter oder Diabetes mellitus, und Komedikation, z. B. dem Anästhetikum Propofol, zugeschrieben. [44] So konnte auch für pathophysiologische Vorgänge, die eine Rolle bei der ED spielen, bereits ein negativer Einfluss auf den kardioprotektiven Effekt der IPC gezeigt werden. Eine verschlechterte Bioverfügbarkeit von NO reduzierte einen IPC- oder IPostC-induzierten kardioprotektiven Effekt an Mäuseherzen [66].

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Hyperlipidämie, die wie zuvor beschrieben relevant mit der ED assoziiert ist (s. Kapitel 1.1.4), kardioprotektive Effekte abschwächt und die Infarktschwere aggraviert. [67] Unter Hyperlipidämie hatten zudem Substanzen, die die Freisetzung von cGMP stimulieren und so in ihrer Wirkung der von NO gleichkommen (z. B. S-nitroso-N-acetyl-Penicillamin), einen geringeren protektiven Effekt. In Zusammenschau mit der oft verminderten endogenen Produktion von NO unter Hyperlipidämie lässt beides auf eine verschlechterte Infarktverringern bei Patienten mit ED schlie-

ßen. [68] Auch andere Komorbiditäten, die häufig zusammen mit einer ED auftreten, interferieren im experimentellen Modell mit der Kardioprotektion. Beispielsweise ist der protektive Effekt der IPostC unter hypertonen Bedingungen nicht mehr nachweisbar. [69]

Neben den Komorbiditäten an sich spielen jedoch auch die dafür verabreichten Medikamente eine Rolle. So zeigten Gori *et al.*, dass die kontinuierliche Applikation von Nitraten, einem gängigen Medikament zur Therapie der Angina pectoris, zu einer Nitrattoleranz und funktionellen ED führt [70]; weitere Daten zeigen einen verminderten Effekt der IPostC in Herzen mit einer solchen Nitrattoleranz [71].

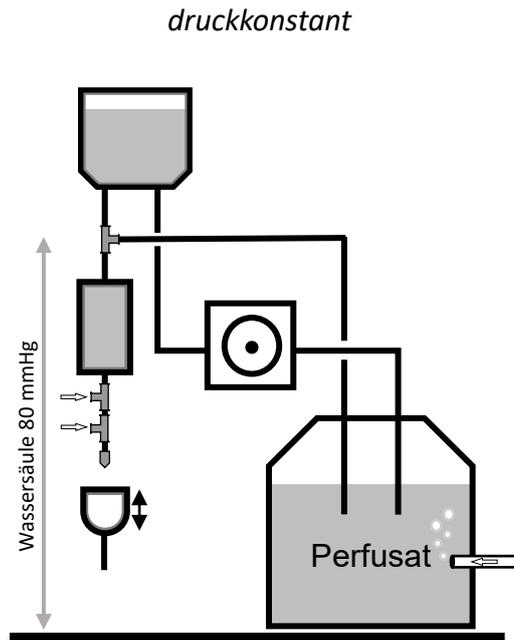
Im Rahmen der Zusammenhänge von Kardioprotektion und Komedikation finden sich ebenfalls Beispiele für eine endothelvermittelte Kardioprotektion durch die Komedikation selbst. Hier lässt sich vor allem der α 2-Agonist Dexmedetomidin nennen, der als Sedativum eingesetzt wird und kardioprotektive Eigenschaften aufweist. Dass seine kardioprotektiven Eigenschaften durch das Endothel vermittelt werden, entdeckten Riquelme *et al.*; jedoch konnten He *et al.* auch in isolierten Rattenherzen mit ED noch einen protektiven Effekt zeigen. [72, 73] Viele Zusammenhänge zu der genauen Vermittlung von Kardioprotektion über das Endothel sind also noch nicht ganz klar und erfordern weitere Forschung. [44]

Es liegt folglich nahe, experimentelle Modelle zu generieren, die die klinische Situation möglichst genau abbilden. Deshalb werden sowohl Modelle für Komorbiditäten als auch für Komedikationen getestet. Insbesondere im Fokus stehen häufige Komorbiditäten kardial erkrankter Patienten (wie Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und arterielle Hypertonie) und die dafür oft verwendeten Medikamente (wie Betablocker, Calciumkanalblocker, Antidiabetika und Thrombozytenaggregationshemmer). [74] Aufgrund der zuvor beschriebenen Wechselwirkungen der Endothelfunktion mit diesen Komorbiditäten und Komedikationen ergibt sich darüber hinaus die Relevanz eines Modells einer ED in der Grundlagenforschung. [74]

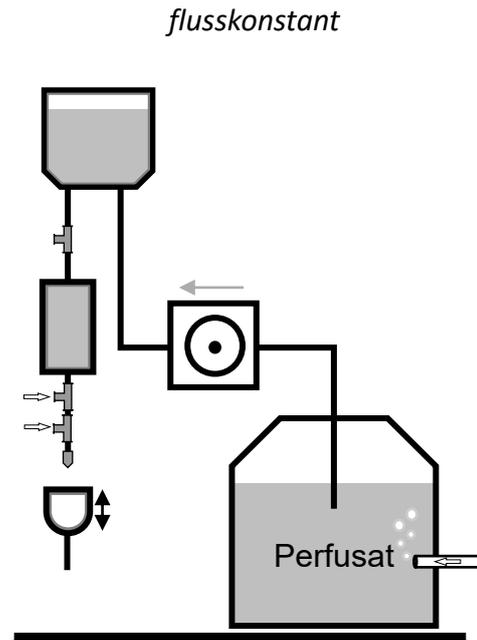
1.4 Die Langendorff-Anlage

Bei der Suche nach einer Möglichkeit zur Forschung am isolierten Herzen des Säugetiers etablierte Oskar Langendorff 1895 die Langendorff-Anlage, die bis heute in der Forschung zur Kardioprotektion und zur Untersuchung von Komorbiditäten und Komedikationen eingesetzt wird.

(a) Langendorff-Anlage



(b) Langendorff-Anlage



(c) Langendorff-Modell: Legende

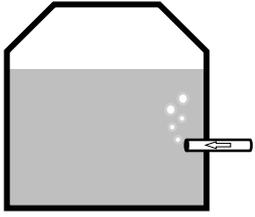
Symbol	Anlagenbestandteil	Symbol	Anlagenbestandteil
	Pufferreservoir, gefüllt, mit Carbogen-Begasung		Verbindungsschlauch
	Luftfalle, gefüllt, doppelwandig		Peristaltische Pumpe
	Wärmespirale, gefüllt, doppelwandig		Wärmeschild, doppelwandig, höhenverstellbar
			Dreivegehahn mit Zuflussmöglichkeit
			Metallkanüle

Abbildung 5: Aufbau der Langendorff-Anlage

(a) Dargestellt ist eine druckkonstante Langendorff-Anlage mit 80 mmHg Perfusionsdruck (CPP), welcher durch eine Wassersäule über dem Herzen generiert wird. **(b)** Eine flusskonstante Langendorff-Anlage, in der die peristaltische Pumpe den Koronarfluss (CF) reguliert. Der CPP ergibt sich aus der Vasodilatation am Herzen und wird in der Regel durch einen Druckaufnehmer knapp über dem Herzen erfasst (hier nicht mit abgebildet). Vom Carbogen-begassten Pufferreservoir aus fließt der Puffer in beiden Anlagentypen durch die peristaltische Pumpe in eine Luftfalle und von dort in eine Wärmespirale. Über dem Herzen können mittels Dreivegehähnen Perfusorpumpen mit weiteren Substanzen angeschlossen werden.

(c) Komponenten der Langendorff-Anlage. Dieser Symbolschlüssel wurde für alle Abbildungen der Langendorff-Anlage in dieser Arbeit verwendet.

Langendorff entwarf einen Modell-Aufbau zur retrograden Perfusion des Herzens. Hierzu wird die Aorta an einer Kanüle fixiert, sodass der retrograde Fluss die Aortenklappe schließt und die Koronarien an der Aortenwurzel perfundiert werden. [75] Die Langendorff-Anlage wurde seither vielfach modifiziert und angepasst, ohne dass der grundlegende Aufbau sich geändert hätte. Die Perfusion am Herzen *ex vivo* ist sowohl im fluss- als auch im druckkonstanten Aufbau möglich. Beide Arten sind in Abbildung 5a und 5b schematisch dargestellt (Abbildung 5c erklärt die hier verwendeten Symbole). Die Abbildung 5a zeigt beispielhaft einen druckkonstanten Aufbau mit einem koronaren Perfusionsdruck (CPP) von 80 mmHg, wie er in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendet und beispielsweise von Raupach *et al.* [76] vorbeschrieben wurde. In einem solchen druckkonstanten Modell wird das Herz einem konstanten hydrostatischen Druck ausgesetzt und reguliert seinen Koronarfluss (CF) darauf aufbauend selbst. Im Gegensatz dazu wird beim flusskonstanten Aufbau ein konstanter CF vorgegeben wird, dem das Herz mit unterschiedlich hohen Widerständen, gemessen als CPP, begegnet. [77]

Die Langendorff-Anlage wurde bereits intensiv für die Untersuchung von kardioprotektiven Maßnahmen zur Verminderung eines I/R-Schadens in der Forschung genutzt. Da an der Apparatur verschiedene Erkrankungen des Herzens und der Gefäße impliziert werden können, bietet sie sich auch für die Analyse von Komorbiditäten und ihrem Einfluss auf die Kardioprotektion an. [75, 78] Das Vorliegen von Komorbiditäten und Komedikation ist ein relevanter Faktor bei der Übertragung experimenteller Modelle in klinische Studien. [67]

Ein Beispiel für die erfolgreiche Übertragung einer Komorbidität ins Langendorff-Modell ist die Hyperglykämie, die zur Imitierung eines Diabetes mellitus genutzt wird. Dabei kann durch die Zugabe von Glukose in das Perfusat eine Hyperglykämie zu gewünschten Versuchsphasen simuliert werden. [49] Die Übertragung diverser weiterer Komorbiditäten ins experimentelle Modell wird derzeit angestrebt, um anschließend Daten aus der Grundlagenforschung besser in die Klinik übertragen zu können. Auch die Untersuchung von Komedikation im Kontext von Konditionierung und Komorbidität kann wertvolle Daten liefern. [44, 78]

1.4.1 Vasodilatation im Langendorff-Modell

Das Ausmaß einer Vasodilatation oder Vasokonstriktion im Langendorff-Modell lässt sich als Korrelat von CPP und CF ableiten; abhängig vom gewählten Langendorff-Aufbau (druck- oder flusskonstant) variiert einer dieser Parameter in Abhängigkeit von der Gefäßweite. Bei der Perfusion mit einem konstanten Druck schwankt das Flussvolumen abhängig von der Gefäßweite bzw. dem Gefäßtonus; effektiv muss der CPP ausreichen, um den Vasotonus zu überwinden, damit eine Perfusion stattfinden kann. In flusskonstanten Langendorff-Modellen hingegen schwankt der CPP je nach Vasotonus. [77] Trifft der definierte Fluss auf ein dilatiertes Gefäß mit geringem Tonus, so entsteht auch ein niedriger Druck, der überwunden werden muss. Bei enggestellten Gefäßen hingegen muss viel Druck aufgebaut werden, um das gleiche Volumen pro Zeit durch die geringere Durchflussfläche zu pressen. Bei einem konstanten CF korreliert eine Veränderung des CPP direkt mit der Vasodilatation. [79] Die jeweiligen Korrelat-Parameter (CPP und CF) können im Versuch gemessen werden, um Rückschlüsse auf den Vasotonus zu ziehen. Je kontinuierlicher die Messung, desto genauer die Aussage über die Entwicklung des Vasotonus im zeitlichen Verlauf. [79]

1.4.2 Endothelfunktion im Langendorff-Versuch

Aufgrund des in Kapitel 1.3.3 beschriebenen Einflusses von Komorbiditäten, insbesondere auch der ED, auf die Kardioprotektion, empfiehlt sich die Entwicklung experimenteller Modelle zur Abbildung beispielsweise einer ED. [74] Zur Etablierung eines schädigenden Modells kann zunächst die Physiologie des Endothels beleuchtet werden, um darauf aufbauend schädigende Mechanismen zu bewerten. Im Kapitel 1.1.1 wurden bereits einige Reize genannt, die zu einer endothelvermittelten Vasodilatation führen. Prinzipiell kann anhand der diversen bestehenden Studien davon ausgegangen werden, dass diese physiologischen Gegebenheiten *in vivo* auf die Koronargefäße am Langendorff-Herzen des Säugetiers *ex vivo* übertragbar sind (vgl. [73, 80, 81]). Zur Überprüfung der Endothelfunktion werden in der Literatur verschiedene Substanzen verwendet, die jeweils Rückschlüsse auf spezifische Mechanismen der Vasodilatation zulassen. Zur Verifizierung der Dilatationsfähigkeit eines Endothels kann die eNOS z. B. durch Bradykinin [81], 5-Hydroxytryptamin bzw. Serotonin (5-HT) [82] oder Histamin [73] aktiviert werden. Diese Substanzen induzieren über ihre jeweiligen Rezep-

toren einen Calcium-Einstrom zur Aktivierung der eNOS. Im Falle von Histamin wird dieser Effekt beispielsweise primär über H₁-Rezeptoren vermittelt. [83]

Zum Aufzeigen endothelvermittelter Effekte bietet sich auch eine Inhibition der eNOS an. Diverse Publikationen nutzen dazu N^ω-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-Name) und überprüfen so, ob die beobachteten Effekte unter dieser Inhibition schwächer werden oder verschwinden. Im Falle eines verminderten Effekts kann davon ausgegangen werden, dass der Effekt eNOS-abhängig ist und somit die Funktion des Endothels widerspiegeln kann. [61, 72, 84, 85]

Um die endothelvermittelte Vasodilatation von der endothelunabhängigen Vasodilatation zu unterscheiden und um die Funktion der glatten Muskulatur des Gefäßes zu überprüfen, perfundieren die meisten Autoren zudem einen eNOS-unabhängigen Vasodilatator. Eine gängige Substanz hierfür ist Natriumnitroprussid (SNP), das durch die Freisetzung von NO die Bildung von cGMP stimuliert und dadurch gefäßerweiternde Effekte hat. [86] Um die Effektivität einer endothelschädigenden Prozedur zu zeigen, empfehlen sich Vergleiche der Gefäßreagibilität auf endothelaktivierende Substanzen vor und nach der Intervention. [73, 82]

1.4.3 Endotheliale Dysfunktion im Langendorff-Modell

Die Initiierung einer ED im Langendorff-Modell wurde bereits mit zwei Modellen beschrieben. Zum einen durch Gabe von Triton [80] und zum anderen mit hochmolaren Kalium-Lösungen [73]. Beide Modelle werden im folgenden Verlauf beschrieben.

1.4.3.1 Verwendung von Triton X-100

Eine Methode zur Induktion einer ED ist die Gabe von Triton, einem nicht-ionischen Tensid, das in der Forschung unter anderem zur Lyse von Zellen verwendet wird. [87] Triton wird in der Regel als Bolus appliziert, z. B. in einer Publikation von Filice *et al.* in einer Konzentration von 1 % über eine Sekunde. [88] Die Konzentrationen und Perfusionsdauern für Triton für Herzen von 200 bis 300 g schweren Ratten variieren; so verwenden beispielsweise Giraldez *et al.* eine 0,25 % Triton-Lösung ebenfalls über eine Sekunde [80], während Hassanabad *et al.* 0,01 % Triton über eine Minute applizieren [89]. Dass die Zugabe von Triton als Detergens zur Lyse der Endothelzellschicht führt, wird in elek-

tronenmikroskopischen Bildern von Hassanabad *et al.* deutlich. Dies ist auch der größte Nachteil einer tritonbasierten ED. Die Lyse der Zellen imitiert kaum die Pathophysiologie der menschlichen ED (s. Kapitel 1.1.3) und birgt durch die lysierenden Eigenschaften das Risiko, auch tiefere Zellschichten wie die glatte Muskulatur zu zerstören. [87, 89]

1.4.3.2 Verwendung von hochmolaren Kaliumpuffern

Eine Alternative zur Perfusion mit Triton ist die Verwendung von hochmolaren Kaliumpuffern, die Konzentrationen ab 24 mM Kalium enthalten können. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die Veröffentlichungen, die solche hochmolaren Kaliumpuffer verwenden. Beschrieben wurde diese Methode bislang von He *et al.* mit 60 mM Kalium. [73] Andere Studien untersuchten zudem die niedrigste Kaliumkonzentration, die im Langendorff-Modell einen Endothelschaden induziert. Hierfür gaben Mankad *et al.* eine Konzentration von 30 mM Kalium und Cartier *et al.* eine Konzentration von 24 mM Kaliumlösung an. [82, 91] Der zur Endothelschädigung verwendete Kaliumpuffer entspricht in der Regel einer Abwandlung der gängigen Perfusionslösung, beispielsweise einem Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) mit reduzierter Konzentration von Natriumchlorid und erhöhter Konzentration von Kaliumchlorid. [73] Es liegen insgesamt nur wenige Studien vor, die die gezielte Verwendung von hochmolaren Kaliumpuffern zur Induktion einer ED im Langendorff-Modell beschreiben. Wenige weitere Studien beschreiben die Verwendung von hochmolaren Kaliumlösungen zur Endothelschädigung an Aortenringen bzw. an primären, isolierten Endothelzellen, die mittels der Langendorff-Apparatur gewonnen wurden. [90, 92]. Diese Methodik ist also bislang weniger etabliert als die Nutzung von Triton und die genauen Protokolle zur Kaliumperfusion variieren zwischen den Publikationen. Z. B. verwenden Cartier *et al.* verschiedene Konzentrationen und Perfusionszeiträume von hochmolarer Kaliumlösung in einem druckkonstanten Langendorff-Modell. In ihrer Studie mit 250-300 Gramm schweren Sprague-Dawley-Ratten beschreiben sie, dass die Endothelschädigung maßgeblich vom CPP und der Perfusionsdauer abhängt. Zur Überprüfung dieser These bzw. der verursachten Endothelschädigung wurden 5-HT und SNP verwendet. Die Versuche wurden in einem druckkontrollierten Perfusionsmodus mit einem CPP von 80 cmH₂O (ca. 58,85 mmHg) bzw. 160 cmH₂O (ca. 117,69 mmHg) in Konzentrationen zwischen 12 nM und 100 nM über zehn bis dreißig Minuten

Tabelle 1: Ausgewählte Veröffentlichungen zur Endothelschädigung mittels hochmolarer Kaliumpuffer

Exemplarische Übersicht über Studien zur Endothelialen Dysfunktion (ED) mittels hochmolarer Kaliumlösungen. Während die älteren Studien aus den 80er- und 90er-Jahren noch auf das Verständnis des Endothels und seiner Effekte sowie auf seine allgemeine Rolle in gängigen klinischen Prozeduren wie der kardiologischen Kardioplegie abzielen, sind neuere Studien mehr auf eine detaillierte Forschung am Endothel ausgelegt.

Autor	Ziele	Perfusionsmodus	Protokoll	Konzentration	Ergebnis	Jahr
Griffith <i>et al.</i> [90]	Nachweis endothel-abhängiger Vasodilatation	druckkonstant; 20 mmHg, 8-10 ml·min ⁻¹	Kaninchen, <i>in vitro</i>	40 mM	Schädigung durch die Perfusion gleichwertig zu mechanischer Beschädigung der Aortenringe	1983
Mankad <i>et al.</i> [91]	Effekt von Kardioplegie auf das Endothel	druckkonstant; 100 cmH ₂ O; 30 oder 60 Minuten	Ratte, <i>ex vivo</i>	20 und 30 mM	Schädigung ab 30 mM über 30 min	1991
Cartier <i>et al.</i> [82]	Effekt von Kardioplegie auf das Endothel	druckkonstant; 80 und 160 cmH ₂ O; 10 oder 30 Minuten	Ratte, <i>ex vivo</i>	12, 24, 40 und 100 mM	Schädigung ab 24 mM bei 160 cmH ₂ O über 30 min, steigender Effekt mit der Konzentration; kein Effekt bei weniger Druck, Dauer oder Konzentration	1993
Qian <i>et al.</i> [92]	ED zur Forschung in Zellkultur	flusskonstant; 7 ml·min ⁻¹ ·g ⁻¹ Herz	Kaninchen, <i>ex vivo/in vitro</i>	44,3 mM	Schädigung durch die Perfusion	2008
He <i>et al.</i> [73]	ED im Langendorff-Modell	flusskonstant; 8,5 ml·min ⁻¹	Ratte, <i>ex vivo</i>	60 mM	Schädigung durch die Perfusion	2019

durchgeführt. [82]. Cartier *et al.* kamen in ihrer Studie zu dem Schluss, dass im druckkonstanten Langendorff-Modell eine Endothelschädigung durch hochmolare Kaliumlösung nur bei einem eher unerwünscht hohen CPP von 160 cmH₂O (ca. 117,69 mmHg) und einer langen Perfusionsdauer von einer halben Stunde, aber bereits mit Konzentrationen ab 24 nM möglich ist. Bei 100 mM Kalium bezeichnen sie die endotheliale Antwort als vollkommen erloschen. [82]

Von He *et al.* wurde ein anderer Ansatz gewählt, bei dem die Herzen mit einer Kaliumkonzentration von 60 mM flusskontrolliert mit 8 bis 9 ml/min perfundiert wurden. Die gewählten Versuchstiere waren ebenfalls Sprague-Dawley-Ratten, hier mit einem Gewicht von 280 bis 300 Gramm. [73] Die Autoren stellen in diesem Versuchsaufbau eine Endothelschädigung fest, die sie mit der Reaktion der Koronarien auf einen Bolus von 0,1 ml 1 mM Histamin prüften. Nach Gabe von Histamin zeigten zum Versuchsbeginn alle Herzen eine deutliche Vasodilatation, die nach Kaliumperfusion jedoch nicht mehr nachweisbar war. In den Kontrollherzen, die nicht mit Kalium perfundiert wurden, war die Reaktion auf Histamin hingegen zu beiden Zeitpunkten nahezu identisch. Schlussfolgernd kann also ein mit 60 mM Kaliumlösung behandeltes Endothel nicht mehr adäquat mit einer Vasodilatation auf eNOS-stimulierende Substanzen reagieren. [73]

Im Gegensatz zur beschriebenen Lyse durch Triton (s. Kapitel 1.4.3.1) sind für hochmolare Kaliumlösungen keine zellschädigenden Eigenschaften vorbeschrieben, woraus sich Anhalt für eine mildere Form der Endothelschädigung ergibt. Niedrige Konzentrationen von Kalium und geringe Perfusionsdrücke induzieren laut Mankad *et al.* und Cartier *et al.* keinen Endothelschaden, weshalb sich ein Pathomechanismus auf physikalischer Ebene vermuten lässt. [82, 91]

1.5 Ziele der Arbeit

Das Endothel spielt eine wichtige Rolle im Herz-Kreislauf-System, unter anderem durch die Synthese von NO, welches verschiedene Funktionen wie z.B. die Vasodilatation erfüllt. Durch NO ist das Endothel auch direkt an physiologischen Prozessen, die der Kardioprotektion zugrunde liegen, beteiligt.

Die ED ist eine häufige Pathologie in der modernen Gesellschaft, die eng mit anderen CVDs assoziiert ist. Unter Vorliegen einer ED kann z. B. die Wirkung kardioprotektiver Maßnahmen abgeschwächt oder sogar

erloschen sein; deshalb empfiehlt es sich, Studien zur Kardioprotektion auch unter dem Einfluss einer ED durchzuführen. Hierzu werden Modelle benötigt, die diese Pathologie im Experiment imitieren. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein solches Modell zur ED am isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff zu etablieren, das ohne lysierende und breit schädigende Substanzen wie Triton auskommt und keinen relevanten Einfluss auf die glatte Muskulatur hat. Hierzu soll die Verwendung einer hochmolaren Kaliumlösung in das bestehende druckkonstante Langendorff-Modell mit 80 mmHg CPP integriert werden. Um eine Endothelschädigung etablieren und definieren zu können, soll zuvor die Physiologie von Endothel und glatter Muskulatur im Sinne der Reaktion auf vasoaktive Substanzen am ungeschädigten Herzen im Modell untersucht und dargestellt werden. Im Anschluss an die Etablierung eines ED-Modells soll dessen Einfluss auf IS im I/R-Versuch untersucht und minimiert werden, um die Implikation in weitere Forschung zu verbessern.

2 Methoden

2.1 Geräte und Software

Tabelle 2: Geräte

Gerät	Gerätedaten
Blutgasanalysegerät	ABL800 Flex BGA Gerät, Firma Radiometer GmbH, Krefeld, Deutschland
Datenaufnehmer	PowerLab 8/35, Firma AD Instruments, Oxford, England
Digitalthermometer	Temperaturmessgerät GTH 1150 C, Firma Greisinger, Regenstauf, Deutschland
Druckaufnehmer	Blutdruckaufnehmer MLT0699, Firma AD Instruments, Oxford, England
Einhängethermostat	Julabo MW-4, Firma Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Elektrodenkammer	Endohm2-Kammer, WorldPrecisionInstruments, Sarasota, Florida, USA
Guillotine	Kleintierdekapitator, Modell 7950, Firma Ugo Basile, Comero, Italien
Magnetrühr- und Heizplatte	MR Hei-Tec, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter Typ 646, Firma Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Präzisionslaborwaage	Secura 224-1S, Firma Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Peristaltische Pumpe 1+2	Minipuls 3 peristaltische Pumpe, Firma Gilson Incorporated, Middleton, Wisconsin, USA
Scanner	CanoScan LIDE 700F, Firma Canon, Amsterdam, Niederlande
Perfusorpumpe 1	Perfusor Space, Firma Braun SE, Melsungen, Deutschland
Perfusorpumpe 2+3	Perfusor fm, Firma Braun SE, Melsungen, Deutschland
Verstärker	Bridge Amp FE221, Firma AD Instruments, Oxford, England
Voltmeter	EVOM2 Voltmeter, WorldPrecisionInstruments, Sarasota, Florida, USA
Wärmebad 1	Julabo MEC-5, Firma Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Wärmebad 2	Heating Immersion Circulator CORIO C, Firma Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Wasserbad	GFL Typ 1001, Firma Gesellschaft für Labortechnik mbH & Co., Hannover, Deutschland

Tabelle 3: Software

Produkt	Produktdaten
Aufzeichnungssoftware	LabChart 8 Pro, AD Instruments, Oxford, England
Datenerfassung und -verarbeitung	Microsoft Excel Version 2211, Firma Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Datenpräsentation und Grafikerstellung	Microsoft PowerPoint Version 2211, Firma Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Datenvisualisierung	R/ggplot2, H. Wickham, Springer-Verlag, New York City, New York, USA
Planimetrie	SigmaScan Pro 5, SPSS Science Software, Chicago, Illinois, USA
Statistik	R: Statistical Computing, Wien, Österreich
Statistik	RStudio, PBC, Boston, Massachusetts, USA

2.2 Materialien und Chemikalien

Tabelle 4: Materialien

Produkt	Produktdaten
Injektionskanüle	Sterican 20G, Firma Braun SE, Melsungen, Deutschland
Injektionsspritze 1 ml	Omnifix F Solo 1 ml, Firma Braun SE, Melsungen, Deutschland
Injektionsspritzen	Inject 5/10/20 ml, Firma Braun SE, Melsungen, Deutschland
Laborflaschen	Simax Laborflasche, 2000/5000 ml, Firma Kavalierglass a.s., Savaza, Tschechische Republik
Luer Adapter	Luer to Tube Connector Kits, Firma Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA
Nahtfaden	Veterinärmedizinischer chirurgischer Faden, Stärke 4-0, Firma Resorba, Nürnberg, Deutschland
Pumpenschlauch 1	Pumpenschlauch, 2-Stopp, Tygon LMT-55, Innendurchmesser 3,17 mm, Firma VWR International GmbH, Hannover, Deutschland
Pumpenschlauch 2	Pumpenschlauch, 2-Stopp, Tygon LMT-55, Innendurchmesser 1,65 mm, Firma VWR International GmbH, Hannover, Deutschland
Silikonschlauch	Schlauch, Silikon, Innendurchmesser 5 mm, Firma VWR International GmbH, Hannover, Deutschland
Tygonschlauch dick	Schlauch Tygon E-3603, Innendurchmesser 6 mm, Firma VWR International GmbH, Hannover, Deutschland
Tygonschlauch dünn	Schlauch Tygon E-3603, Innendurchmesser 3,2 mm, Firma VWR International GmbH, Hannover, Deutschland

Tabelle 5: Gase

Gas	Produktdaten
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	CAS: 124-38-9 bzw. 7782-44-7, Firma Linde AG, Pullach, Deutschland
Stickstoff 5.0 (N ₂)	CAS: 7727-37-9, Reinheit \geq 99,999%, Firma Linde AG, Pullach, Deutschland

Tabelle 6: Chemikalien

Substanz	Produktdaten
Akasols Aqua Care Wasserbadschutz	Firma Carl Roth + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	CAS: 10043-52-4, Reinheit ≥ 93%, Firma Acros Organics, Geel, Belgien
D-Glucose	CAS: 50-99-7, Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	CAS: 67-68-5, Reinheit ≥ 99,9%, Firma Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	CAS: 60-00-4, Reinheit ≥ 99%, Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 37% mit 10% Methanol	CAS: 50-00-0, Reinheit 36,5-38%, Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Heparin-Natrium	CAS: 9041-08-1, 5000 IE/ml, Firma Braun SE, Melsungen, Deutschland
Histamin	CAS: 51-45-6, Reinheit ≥ 97%, Firma Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA
Isotonische Kochsalzlösung (NaCl)	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Kaliumchlorid(KCl)	CAS: 7447-40-7, Reinheit ≥ 99,5%, Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogen-phosphat (KH ₂ PO ₄)	CAS: 7778-77-0, Reinheit ≥ 99%, Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
L(+)-Natriumlaktat	CAS: 867-56-1, Reinheit ≥ 99%, Firma Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ + 7 H ₂ O)	CAS: 10034-99-8, Reinheit ≥ 99,5%, Firma Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	CAS: 7647-14-5, Reinheit ≥ 99%, Firma VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaOH)	CAS: 144-55-8, Reinheit ≥ 99%, Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Nitroprussid (SNP)	CAS: 13755-38-9, Reinheit ≥ 99%, Firma Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA
N ω -Nitro-L-Arginin-Methylester-Hydrochlorid (L-Name)	CAS: 51298-62-5, Reinheit ≥ 96%, Firma Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA
Pentobarbital	Narcoren, Merial/Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein, Deutschland
Salzsäure 37% (HCl)	CAS: 7647-01-0, Reinheit ≥ 37%, Firma Carl Roth + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	CAS: 298-96-4, Reinheit ≥ 99%, Firma Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	CAS: 77-86-1, Reinheit ≥ 99,9%, Tris Pufferan [®] , Firma Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100 (Octoxynol 9)	CAS: 9002-93-1, Firma Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA

2.3 Versuchstiere

Die Erlaubnis zur Organentnahme wurde von der Zentralen Einrichtung für Tierschutz und Tierexperimente der Heinrich-Heine-Universität (ZETT) unter dem Aktenkennzeichen O27/12 erteilt. In den Versuchen wurden männliche Wistar-Ratten verwendet, die ein Gewicht von ca. 300 g ($\pm 15\%$) bei einem Alter von etwa 8 Wochen hatten. Die Tiere wurden durch die ZETT bereitgestellt.

2.4 Langendorff-Versuche

2.4.1 Druckkonstante Standard-Langendorff-Anlage

Alle Versuche in dieser Studie wurden nach Erwerb einer Tierversuchsgenehmigung nach FELASA-D an derselben Langendorff-Anlage durchgeführt. Etwa alle vier Wochen wurden die Instrumente mit einprozentiger Salzsäure gereinigt und alle Schläuche erneuert, um Kontaminationen, z.B. durch Bakterien, zu vermeiden.

Die wichtigen Komponenten der Anlage lassen sich der Abbildung 5c entnehmen. Der Standardaufbau entsprach einer druckkonstanten Langendorff-Anlage mit einem CPP von 80 mmHg (vorbeschrieben von Raupach *et al.* [76]), welcher regelmäßig überprüft und adjustiert wurde. Die Anlage bestand im Kern aus einer Pumpe (Gilson Minipuls 3) sowie aus doppelwandiger Glasware (Luftfalle, Wärmespirale und Wärmeschild). Diese Glasware wurde von 38,5 °C warmem, vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) aus einem Wärmebad durchflossen, um eine Innentemperatur von 37 °C zu gewährleisten. An der Metallkanüle eines metallenen Dreiwegehahn wurde im Versuch das Herz an der Aorta aufgehängt; über diverse Plastikdreiwegehähne konnten Flüsse gesteuert und Perfusorpumpen in den Versuch eingebracht werden. Tygon-Schläuche verbanden Glaswaren und Dreiwegehähne miteinander; lediglich der Ablaufschlauch unter dem Herzen sowie der Rückfluss von der Wassersäule ins Pufferreservoir bestanden aus Silikon. Der Unterschied zwischen beiden Materialien begründete sich darin, dass Silikon eine Desoxygenierung erlaubt, Tygon hingegen nicht. [93, 94] Die Verbindungsstellen zwischen den Schläuchen und den restlichen Bestandteilen wurden durch Kabelbinder und Adapter der Marke Harvard Apparatus abgedichtet. Ein zweites, mit VE-Wasser und Wasserbadschutz (*Aqua Care*) befülltes Wärmebad erhitze die Glasflasche mit Pufferlösung auf 45 °C, um eine physiologische Perfusionstemperatur zu ge-

währleisten und Hypothermie zu vermeiden. Auf dieselbe Temperatur wurde hier auch ein mit Stickstoff begaster Puffer erhitzt, der im Versuch der Aufrechterhaltung der Ischämie diente.

2.4.2 Flusskonstante Anlage

Für einen Teil der Versuche wurde die Anlage in einen flusskonstanten Aufbau überführt (s. Kapitel 1.4 und Abbildung 5b). Erreicht wurde dies durch das Ausschalten des zusätzlichen Flussweges zwischen der Luftfalle und dem Pufferreservoir, der die Wassersäule im druckkonstanten Aufbau bildete. Somit blieb nur ein Pfad für den Pufferfluss und der durch die Pumpe geförderte Fluss entsprach dem CF. Für die Etablierung der ED-Methodik brachte dies den Vorteil einer kontinuierlichen CPP-Messung, wodurch exaktere Rückschlüsse auf die Vasodilatation und -konstriktion möglich waren als durch eine über 30 bis 60 Sekunden gemittelte Messung des CF.

2.4.3 Kombiniert fluss- und druckkonstante Anlage

Zur Etablierung der ED war der Einbau eines flusskonstanten Teils in die druckkonstante Anlage notwendig. Hierzu brachte eine zweite Pumpe über eine Luftfalle ein zweites Pufferreservoir in das System ein, das an einem Dreiwegehahn über dem Herzen in die Anlage fließen konnte. So konnte auf eine flusskonstante Perfusion umgeschaltet und eine zweite Pufferlösung, z. B. hochmolarer Kaliumpuffer, verwendet werden. Im weiteren Verlauf wurde dieser Arm der Anlage durch eine Verbindung von der Luftfalle zurück in das Pufferreservoir noch weiter optimiert (diese wurde aus Gründen der Übersicht in den Grafiken dieser Arbeit nicht dargestellt). So konnte der Puffer zirkulieren, bis er in den Versuch eingebracht wurde, was zu einer Verbesserung von Temperatur und Oxygenierung führte. Mit Beginn der flusskonstanten Perfusion wurde die Verbindung ausgeschaltet, sodass sie im tatsächlichen Versuch keine Rolle spielte.

Ergänzt wurde außerdem ein zweites Wärmebad für die zweite Pufferlösung, das in Abhängigkeit des flusskonstanten CF eine höhere Temperatur als das Wärmebad der Hauptanlage erzeugte. Detaillierte Beschreibungen der Temperaturoptimierung finden sich im Ergebnisteil dieser Arbeit (Kapitel 3.4.2).

2.4.4 Krebs-Henseleit-Puffer

Zur Perfusion der Herzen wurde ein gängiger, vorgeschriebener KHP [76] verwendet (s. Tabelle 7). Dieser wurde an einer Hochpräzisionswaage aus den Chemikalien und doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) hergestellt und für mindestens 30 Minuten gerührt. Eine Überprüfung der Elektrolytzusammensetzung und des pH-Wertes wurde mittels Blutgasanalyse (BGA) durchgeführt. Vor dem Versuch wurde der Puffer im Wärmebad erhitzt und mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast, sodass ein physiologischer pH zwischen 7,35 und 7,45 und ein Sauerstoffpartialdruck >300 mmHg eingestellt wurde. Aus dem warmen, begasten Puffer wurde zudem der Ischämiepuffer erstellt, indem etwa 50 ml Puffer pro Ischämie in eine kleine Flasche umgefüllt und mit Stickstoff begast wurde. Auch der Ischämiepuffer wurde im Wärmebad auf physiologische Temperaturen erwärmt.

Tabelle 7: Krebs-Henseleit-Puffer

Zusammensetzung modifiziert nach Raupach et al. [76]

Substanz	Menge [mM]
NaCl	118
KCl	4,7
MgSO ₂	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
EDTA	0,5
Glukose	11
Laktat	1
CaCl ₂	2,25

2.4.5 Hochmolarer Kaliumpuffer

Der hochmolare Kaliumpuffer zur Endothelschädigung wurde analog zum gewöhnlichen KHP hergestellt. Die Stoffzusammensetzung wurde durch He *et al.* vorgeschrieben, die die Konzentrationen von Natriumchlorid und Kaliumchlorid anpassten, sodass bei gleichbleibender Osmolarität eine Konzentration von 60 mM Kalium im Puffer entstand (s. Tabelle 8). [73] Von diesem Puffer konnte keine BGA erstellt werden, da die hohe Kaliumkonzentration die technischen Limitationen des BGA-Geräts überschritt. Angesichts gleicher Erwärmung und Begasung des Kaliumpuffers zusammen mit dem KHP wurde deshalb hier ein physiologischer pH anhand der BGA des KHP angenommen.

Tabelle 8: Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) mit hochmolarem Kalium

Kalium-KHP: Zusammensetzung. Modifiziert nach Raupach et al. und He et al. [73, 76]

Substanz	Menge [mM]
NaCl	63
KCl	60
MgSO ₂	1,2
KH ₂ PO ₄	1,2
NaHCO ₃	25
EDTA	0,5
Glukose	11
Laktat	1
CaCl ₂	2,25

2.4.6 Versuchsbeginn

Zur Sedierung der Versuchstiere diente eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Pentobarbital; die gleichzeitige Injektion von 3330 IE/kg Heparin sollte eine Thrombenbildung vermeiden. Fünf Minuten nach der Applikation wurde die ausreichende Narkosetiefe der Tiere mittels Zehenreflextest überprüft und die Dekapitation unter ausreichender Sedierung vorgenommen. Nach Sedierung und Dekapitation erfolgte ein sagittaler Hautschnitt mit einer Schere von subdiaphragmal parasternal bis zur Dekapitationsstelle. So konnte der Thorax mit Hilfe eines Spreizers offengehalten werden, um die Aorta ascendens mit einer Pinzette zu fassen und mit einer kleineren Schere vor dem Arcus aortae abzutrennen. Das Herz wurde anschließend in 10 ml sterile NaCl-Lösung überführt. An der Langendorff-Anlage konnte es mit zwei feinen Pinzetten vorsichtig an der Aorta über eine Metallkanüle gezogen und mit einer Bulldogklemme am oberen Schnitttrand an der Kanüle fixiert werden. Die Aorta wurde dann mit einem chirurgischen Faden der Stärke 4-0 an der Kanüle festgeknotet. Um Lufteinschlüsse zu vermeiden, lief während dieser Zeit ein niedriger Pufferfluss durch das Herz. Erst nach Festziehen des Knotens wurde der maximale Fluss ermöglicht. Dieser Zeitpunkt wurde als Dekapitations-Perfusions-Zeit bezeichnet und durfte nicht mehr als drei Minuten betragen, um eine Präkonditionierung des Myokards zu vermeiden. Anschließend wurde das linke Herzohr unter minimaler mechanischer Manipulation des restlichen Herzens abgetrennt. Zur Bestimmung des linksventrikulären Drucks (LVP) wurde ein wassergefüllter Plastikballon genutzt, der zum Einführen in den linken Ventrikel zunächst entleert und dann über den Schnitt durch die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingebracht wurde. Anschließend wurde zum Erhalt von 37 °C ein Wärmeschild um das Herz platziert und mit einem Deckel aus Aluminium abgedeckt, sodass das Herz unberührt schlagen konnte. Nach Sicherstellung einer ausreichenden Umgebungstemperatur wurde der Ballon im linken Ventrikel vorsichtig mit ddH₂O befüllt und mit einem Druckaufnehmer verbunden. Dieser leitete die Messwerte an einen LabChart Bridge Amp weiter, welcher die Aufzeichnung der hämodynamischen Variablen in LabChart 8 Pro ermöglichte. Anschließend wurde die Füllung des Ballons so adjustiert, dass ein enddiastolischer Druck (LVEDP) von 2 bis 8 mmHg eingestellt war. Das Herz wurde als hämodynamisch gut eingestuft, wenn zudem eine Frequenz von mindestens 250 Schlägen pro Minute (bpm) und ein links-

ventrikulärer endsystolischer Druck (LVESP) von mindestens 80 mmHg erreicht wurde.

2.5 Physiologische Endothelfunktion

In einer Versuchsreihe (VR) zur physiologischen Endothelfunktion wurde der Einfluss der vasodilatierenden Substanzen Histamin und SNP auf sonst unbehandelte Herzen getestet. Hierzu wurde eine flusskonstante Anlage verwendet, da diese den in Kapitel 2.4.2 genannten Vorteil einer präziseren Messung des CPP ermöglichte. So ließ sich im flusskonstanten Versuch die CPP-Verminderung in Echtzeit beobachten. Zur Beurteilung der Vasodilatation wurde der minimale gemessene CPP (CPP min) vor und nach Perfusion einer vasodilatierenden Substanz verwendet.

2.5.1 Vasodilatation durch Histamin

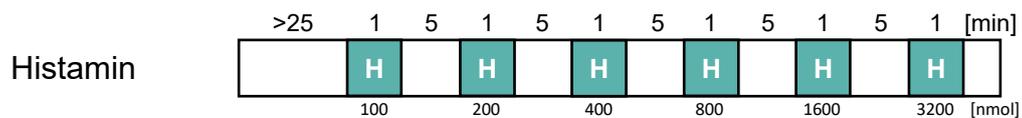
Zur Exploration des Effekts von Histamin auf ein gesundes Endothel wurden Herzen mit 100 nmol bis 3,2 μ mol Histamin perfundiert. Den Ablauf der Versuche mit Histamin zeigt Abbildung 6a. Zu Beginn des Versuchs fand eine Einpendelungsphase statt. Ziel war die Stabilisierung des durchschnittlichen CPP (CPP mean) auf ca. 80 mmHg (± 10 %) mit gleichbleibenden Werten über drei Minuten. Anschließend fand die Perfusion von Histamin über jeweils eine Minute statt. Zwischen den einzelnen Stoffmengen wurde eine fünfminütige Erholungsphase zur Regeneration des CPP belassen. Ziel der Versuche war, die wirksamste Dosis zur Vasodilatation durch die Substanz herauszufinden, um mit dieser in den Versuchen zur ED zu arbeiten. Als Zielwert wurde hier die Stoffmenge/Konzentration mit dem höchsten durchschnittlichen CPP-Abfall bestimmt.

Darüber hinaus wurden in diesen Versuchen auch die Einflüsse von Histamin auf die hämodynamischen Variablen der Herzen untersucht, um diese Einflüsse, falls vorhanden, in die Auswertung der ED-Versuche einzubeziehen. Zur Auswertung der Versuche wurde der CPP in den 30 Sekunden vor Perfusion mit Histamin (*Wert A*) und innerhalb von anderthalb Minuten nach Beginn der Histamin-Perfusion (*Wert B*) gemessen. Hierbei wurde jeweils der minimalste CPP, der mithilfe der entsprechenden LabChart-Funktion ermittelt wurde, verwendet. Messungen zum Zeitpunkt von Extrasystolen wurden in der Auswertung exkludiert. Aus den beiden Werten wurde eine prozentuale Differenz gebildet:

$$\text{Effekt Histamin} = \frac{\text{Wert A} - \text{Wert B}}{\text{Wert A}}$$

Mithilfe dieser Berechnung konnte die Wirkung der einzelnen Stoffmengen Histamin auf den Vasotonus quantifiziert und miteinander verglichen werden. Das Ergebnis wurde als Verminderung der Vasodilatation bezeichnet.

(a)



(b)

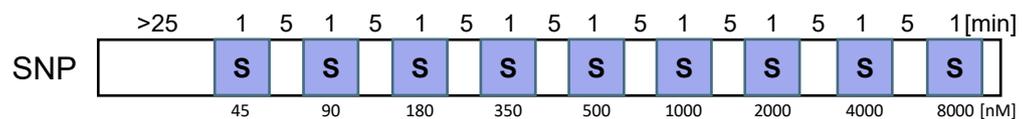


Abbildung 6: Versuchsablauf: (a) Histamin und (b) SNP
 Versuchsablauf für die Konzentrationsreihen mit Histamin (H) und Natriumnitroprussid (SNP, S) als Zeitstrahl; nach einer mindestens 25 min langen Einpendelungsphase erfolgte die Perfusion in aufsteigenden Mengen/Konzentrationen mit je 5 min Regeneration. Zeitangaben über dem Zeitstrahl in Minuten, Stoffmengenangabe unter dem Zeitstrahl für Histamin in nmol, Konzentration für SNP in nM. n=3-4.

2.5.2 Vasodilatation durch SNP

Im Anschluss an die Versuche mit Histamin wurde eine sehr ähnliche VR mit dem NO-Donor SNP durchgeführt, die in Abbildung 6b dargestellt ist. Die niedrigste perfundierte Dosis lag hier bei 45 nM SNP und wurde bis 8 μ M SNP gesteigert. Auch hier erfolgte nach einer Einpendelungsphase von etwa 25 Minuten und bei einem stabilen CPP mean von 80 mmHg ($\pm 10\%$) die Perfusion von SNP jeweils über eine Minute. Zwischen den einzelnen Stoffmengen fand eine Regenerationsphase von fünf Minuten zum Wiederanstieg des CPP statt. Auch hier war das Ziel der Versuche, die wirksamste Dosis der Substanz im Sinne des höchsten durchschnittlichen CPP-Abfalls herauszufinden. Zusätzlich wurden wieder Einflüsse auf die hämodynamischen Variablen untersucht. Die Auswertung der Versuche erfolgte analog zu denen mit Histamin (wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben).

2.5.3 Effekt von L-Name auf Histamin- oder SNP-vermittelte Vasodilatation

Um zu zeigen, ob die vasodilatative Wirkung von Histamin und SNP über das Endothel bzw. die eNOS vermittelt wird, wurden Versuche mit dem eNOS-Inhibitor L-Name durchgeführt. Die Abbildung 7 zeigt den Ablauf dieser Versuche: Nach einer Einpendelungsphase erfolgte die Perfusion der zuvor ermittelten Konzentration/Menge von 1 μM SNP und 800 nmol Histamin, bevor das Herz eine halbe Stunde lang mit L-Name in einer Konzentration von 100 μM perfundiert wurde. Diese Konzentration wurde aus den Publikationen Farah *et al.* und Liu *et al.* [84, 85] entnommen und aufgrund der „proof of concept“-Natur der Versuche nicht erst in Konzentrationsreihen getestet. Unter anhaltender Perfusion mit L-Name wurden dann nacheinander Histamin und SNP, mit entsprechender Regenerationspause, zur Wiederherstellung des basalen CPP (ca. 15 Minuten) zwischen beiden Substanzen, perfundiert. Die Ermittlung der jeweiligen CPP-Verminderung durch Histamin oder SNP erfolgte zunächst analog wie in Kapitel 2.5.1. Dann wurde die CPP-Verminderung unter L-Name als prozentualer Anteil des Ausgangswertes berechnet, um eine Effektminderung durch eine eNOS-Inhibition auszudrücken:

$$\text{Effekt unter L-Name} = \frac{\text{Wert A} - \text{Wert B}}{\text{Wert A}}$$

Wert A war hier der Ausgangswert der prozentualen CPP-Verminderung, Wert B der entsprechende Wert unter L-Name. Somit ergibt sich die prozentuale Verminderung des Druckabfalls.

Für die statistische Auswertung des Einflusses von L-Name auf die Vasodilatation wurde ebenfalls diese errechnete Effektminderung verwendet.



Abbildung 7: Versuchsablauf: N^ω-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-Name)

Versuchsablauf für die Versuche mit Histamin und Natriumnitroprussid (SNP) unter L-Name als Zeitstrahl. Zeitangaben über dem Zeitstrahl in Minuten.

H = Histamin (800 nmol), S = SNP (1 μM), LN = L-Name (100 μM). n=3.

2.6 Endotheliale Dysfunktion

2.6.1 Druckkonstante Kaliumperfusion

Zur Etablierung einer ED im Langendorff-Modell wurde zunächst eine druckkonstante Einbettung des Kaliumpuffers in den Versuchsaufbau angestrebt. Der Aufbau der Versuchsanlage ist in Abbildung 8 dargestellt. Zur besseren Übersicht wurden die Langendorff-Modelle in dieser Arbeit durchnummeriert; diese Ausgangsversion wurde Version 1 genannt. In Abbildung 9 ist der zeitliche Ablauf der Versuche illustriert. Zum definierten Zeitpunkt im Versuchsablauf wurde der Ansaugschlauch der Pumpe aus dem KHP-Reservoir in die Flasche mit dem Kaliumpuffer überführt. Um die Vermischung von regulärem KHP und hochmolarem Kaliumpuffer in der Luftfalle zu minimieren, wurde zwischen beiden Lösungen etwas Luft angesaugt, sodass die Luftfalle nur noch zu etwa einem Drittel mit KHP gefüllt war. Im Anschluss wurde über zehn Minuten mit Kaliumpuffer perfundiert. Nach zehn Minuten erfolgte die Rücküberführung des Ansaugschlauchs in den gängigen KHP. Die Pufferzirkulation aus der Wassersäule wurde während der Kaliumperfusion und in den folgenden ca. 20 Minuten danach in ein getrenntes Gefäß abgeleitet. Erst wenn in diesem abgeleiteten Puffer (vgl. Abbildung 8)

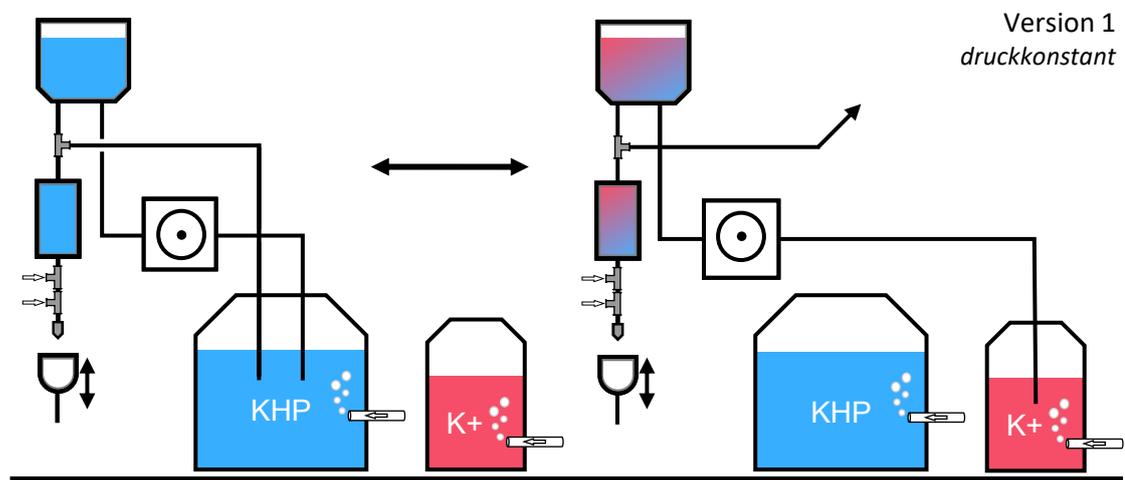


Abbildung 8: Aufbau der Langendorff-Anlage zur druckkonstanten Kaliumperfusion

KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, K⁺ = Kaliumpuffer. In diesem druckkonstanten Aufbau bestimmt die Wassersäule zwischen Luftfalle und Pufferreservoir über die Höhe des CPP. Zum Umstellen auf die Kaliumperfusion wurde der Ansaugschlauch der Pumpe in das Kaliumpufferreservoir überführt, sodass dieser Puffer in die Anlage laufen konnte. Der Rückfluss zum Reservoir wurde für diesen Zeitraum nach extern ausgeleitet, um eine Durchmischung mit folgender Erhöhung der Kaliumkonzentration im Reservoir zu vermeiden.

ein normaler Wert von $5,7 \pm 0,1$ mM Kalium mittels BGA bestimmt werden konnte, wurde wieder in das Pufferreservoir abgeleitet. Das Modell wurde während der Versuche kontinuierlich weiterentwickelt, um entstandenen Problemen zu begegnen.

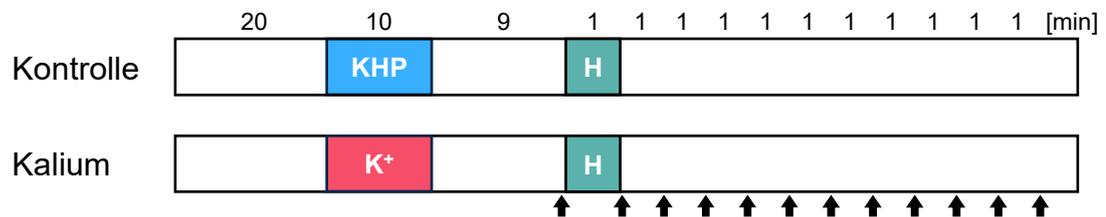


Abbildung 9: Versuchsablauf: Druckkonstante Methodikversuche
Versuchsablauf für die druckkonstanten Methodikversuche mit Washout und die Versuche mit flusskonstanter Kaliumperfusion im druckkonstanten Modell ohne Perfusionsdruckmessung. H = Histamin (100 nmol), KHP = flusskonstante Perfusion mit regulärem Puffer, K⁺ = flusskonstante Perfusion mit Kaliumpuffer. Zeitangaben über dem Zeitstrahl in Minuten. Schwarze Pfeile markieren die Koronarflussmessung zur Auswertung der Antwort auf Histamin. n=3-4.

2.6.2 Flusskonstante Kaliumperfusion

Zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Perfusion des Herzens mit Kaliumpuffer wurde die Perfusionsart auf ein flusskonstantes Modell umgestellt. Die Versuche mit flusskonstanter Kaliumperfusion lassen sich in drei VR aufteilen, deren genaue Entwicklung im Ergebnisteil dieser Arbeit erklärt wird:

- **VR A:** Die flusskonstante Kaliumperfusion mit 8,5 ml/min im ansonsten druckkonstanten Aufbau,
- **VR B:** die Perfusion im vollständig flusskonstanten Aufbau mit Kaliumperfusion von 8,5 ml/min
- **VR C:** sowie die Kaliumperfusion mit angepasstem CF.

Die flusskonstante Laufrate von 8,5 ml/min wurde von He *et al.* übernommen. [73] Zum vorgegebenen Zeitpunkt im Versuchsablauf wurde dann die Pumpe für die flusskonstante Kaliumperfusion angestellt und die KHP-Perfusion gleichzeitig ausgestellt. Im zehnmütigen flusskonstanten Versuchsteil erfolgte mindestens zweimal eine Kontrolle des CF. Nach zehn Minuten wurde der vorherige Zulauf der Pumpen wiederhergestellt.

Der Ablauf von VR A folgte noch dem in Abbildung 9 gezeigten Vorgehen der Versuche mit druckkonstanter Kaliumperfusion. Nach der Perfusion mit Kaliumpuffer wurden 100 nmol Histamin über eine Minute

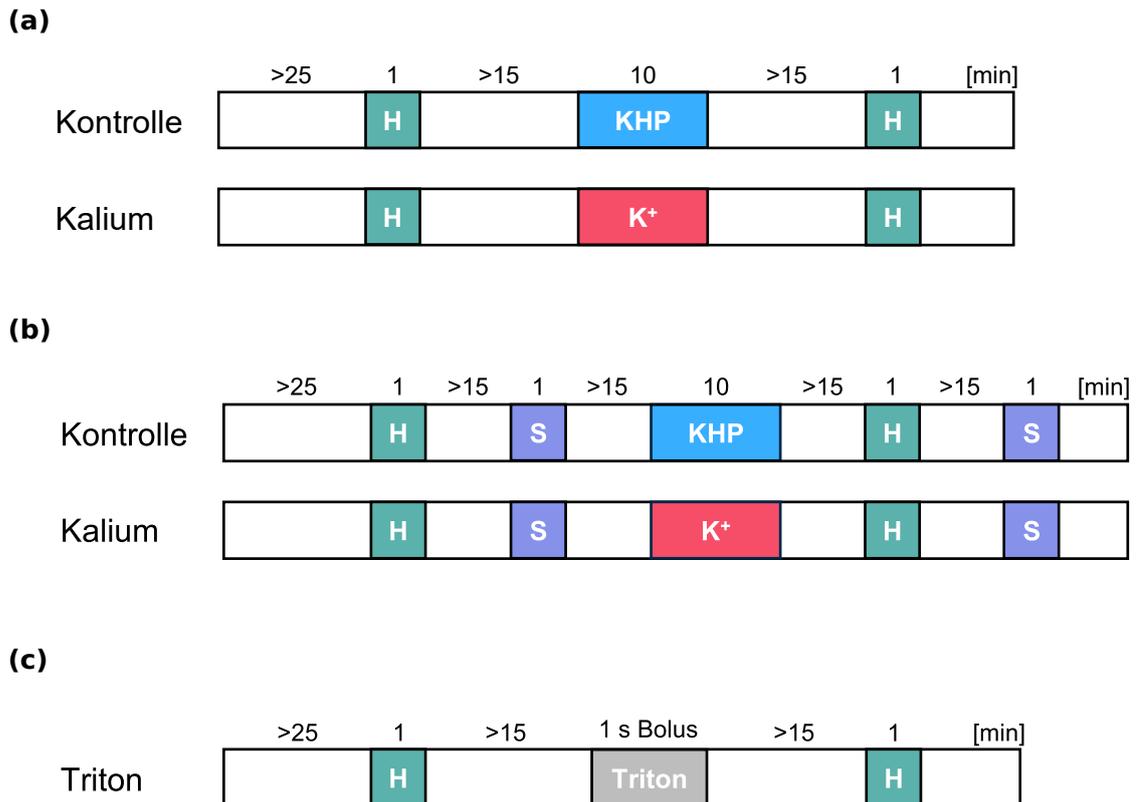


Abbildung 10: Versuchsablauf: Flusskonstante Methodikversuche

(a) Versuchsablauf ohne Natriumnitroprussid (SNP) für VR B (flusskonstante Methodikversuche mit 8,5 ml/min Kaliumperfusion). **(b)** Versuchsablauf mit SNP für VR C (Versuche mit angepasstem Fluss). **(c)** Versuche mit Triton.

Zeitangaben über dem Zeitstrahl in Minuten, mit Ausnahme des einsekündigen Bolus von 1 % Triton X-100 (separat gekennzeichnet als 1 s). H = 800 nmol Histamin, S = 1 μ M SNP, KHP = flusskonstante Perfusion mit regulärem Puffer, K⁺ = flusskonstante Perfusion mit 60 mM Kaliumpuffer; der restliche Versuchsaufbau war ebenfalls flusskonstant (Langendorff-Version 4). **(a)** n=3-4, **(b)** n=4 (SNP und Histamin) sowie n=3 (nur Histamin), **(c)** n=4.

perfundiert und über zehn Minuten eine minütliche CF-Messung durchgeführt.

Im flusskonstanten Modell wurde vor und nach Perfusion mit Kaliumpuffer entweder nur Histamin (800 nmol, in VR B, s. Abbildung 10a) oder Histamin (800 nmol) und SNP (1 μ M, in VR C, s. Abbildung 10b) perfundiert und die jeweiligen CPP-Messungen vor und nach Perfusion zur Auswertung herangezogen. Als Positivkontrolle wurden zudem Versuche im flusskonstanten Modus mit Triton durchgeführt, in denen Histamin (800 nmol) vor und nach einem einsekündigen Bolus mit 1 % Triton appliziert wurde; deren Ablauf ist in Abbildung 10c dargestellt. Die Konzentration von 1 % Triton wurde z. B. von Filice *et al.* übernommen. [88]

Zur Auswertung der ED in VR B und C wurde die folgende Formel ver-

wendet:

$$\text{Effekt Kalium} = \frac{\text{Wert A} - \text{Wert B}}{\text{Wert A}}$$

Es wurde die durch 800 nmol Histamin oder 1 μM SNP induzierte Vasodilatation vor Kaliumperfusion als prozentualer Druckabfall berechnet (*Wert A*). Analog wurde der CPP-Abfall durch Histamin bzw. SNP nach Perfusion mit Kaliumpuffer berechnet (*Wert B*) und beide Werte mithilfe der obenstehenden Formel verrechnet. Die durch den Kaliumpuffer entstehende prozentuale Verminderung wurde als primäre Zielgröße der Versuche definiert und stellte somit den Parameter zur Bewertung der Endothelschädigung dar.

Zudem wurde die Korrelation der Höhe des CPP mit der Ausprägung des vasodilatierenden Effekts der jeweiligen Substanzen analysiert.

2.6.3 Angleichung des flusskonstanten Koronarflusses

Für die in Kapitel 2.6.2 beschriebene VR C wurde der CF zur flusskonstanten Kaliumperfusion (bzw. analog der Perfusion des KHP in den Kontrollversuchen) an den vorher im Versuch gemessenen CF angeglichen. Konkret wurde also zur Baseline des Versuches der CF gemessen und dieselbe Flussrate auch ($\pm 0,5 \text{ ml/min}$) an der zweiten peristaltischen Pumpe eingestellt. Diese regulierte im flusskonstanten Versuchsteil den CF. Hierfür wurde außerhalb der Versuche gemessen, welchem CF die jeweilige Einstellung an der Pumpe in Umdrehungen pro Minute (RPM)

Tabelle 9: Einstellung des Koronarflusses an der Pumpe

Laufrate (LR, in $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$) des Koronarflusses, eingestellt an der Peristaltikpumpe (in Umdrehungen pro Minute, RPM), um den richtigen Koronarfluss für jedes Herz zu erreichen. Eine Umdrehung mehr entsprach in der Regel $0,42 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ mehr. Messungen für den Pumpenschlauch der Firma VWR International GmbH mit 1,65 mm Innendurchmesser, der für den flusskonstanten Anlagenteil in allen Versuchen verwendet wurde.

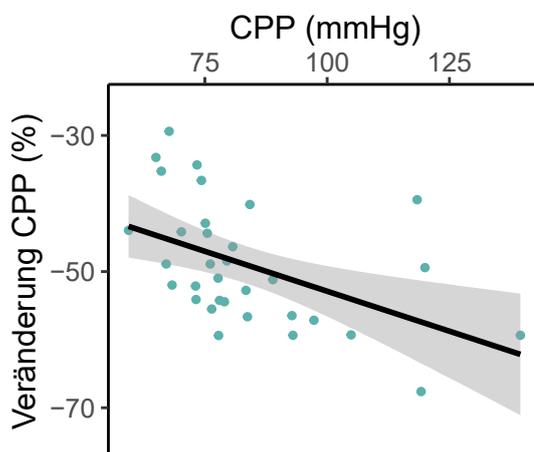
RPM (min^{-1})	LR ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)						
25	10,50	31	13,03	37	15,55	43	18,07
26	10,92	32	13,45	38	15,97	44	18,49
27	11,35	33	13,87	39	16,39	45	18,91
28	11,77	34	14,29	40	16,81	46	19,33
29	12,19	35	14,71	41	17,23	47	19,75
30	12,61	36	15,13	42	17,65	48	20,17

entsprach; gemessen wurden diese Werte für den Pumpenschlauch der Firma VWR International GmbH mit 1,65 mm Innendurchmesser, der über alle flusskonstanten Versuche hinweg für die Perfusion an der zweiten Pumpe verwendet wurde. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 9 dargestellt. An dieser Pumpe wurde dann die passende Umdrehungszahl vor Beginn der flusskonstanten Perfusion eingestellt.

2.6.4 Korrelation von CPP und prozentualem CPP-Abfall

Im Laufe der flusskonstanten Versuche wurde die Höhe des CPP vor der Perfusion vasodilatierender Substanzen und deren Einfluss auf das Ausmaß der Vasodilatation analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass bei hohem initialen CPP auch der prozentuale Druckabfall höher als bei niedrigem CPP war. Ausgewertet wurde hierzu die Perfusion der Substanz zur Baseline eines Versuches, also vor jeglicher anderer Intervention. In den Kontrollversuchen, in denen lediglich KHP perfundiert wurde, wurden alle Messungen einbezogen. Sowohl für Histamin als auch für SNP zeigte sich eine signifikante Korrelation im Pearson-Test (Histamin: Konfidenzintervall (KI) [-0,71; -0,16], $p < 0,01$; SNP: KI [-0,88; -0,2], $p < 0,05$), die in Abbildung 11a für Histamin und in Abbildung 11b für

(a) Histamin



(b) SNP

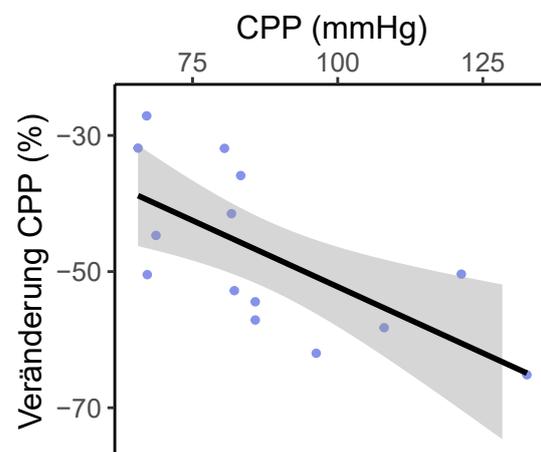


Abbildung 11: Korrelation der Perfusionsdruck (CPP)-Verminderung nach Histamin/Natriumnitroprussid (SNP) und vor Perfusion gemessenem CPP.

Die Korrelation stellt dar, dass das Ausmaß der CPP-Verminderung nach Perfusion von Histamin/SNP mit der zuvor gemessenen Höhe des CPP korreliert.

Eingeschlossen wurden Messungen zur Baseline eines Versuches, also ohne vorherige Interventionen, und Kontrollversuche, in denen nur KHP perfundiert wurde.

Korrelationsdarstellung mittels generalisierten linearen Modells (GLM), die graue Fläche stellt den Standardfehler dar. $n=33$ (Histamin) bzw. $n=15$ (SNP).

SNP dargestellt ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden in den Versuchen mit L-Name (Kapitel 3.1.3) und in den flusskonstanten Versuchen zur ED mit angepasster Perfusion (Kapitel 3.3.4) nur Messungen mit gleichbleibendem Ruhe-CPP in die Auswertung eingeschlossen. Dies bedeutet, dass der Ruhe-CPP nach Intervention (vgl. Abbildung 12c: zweite Gabe von Histamin/SNP nach KHP/K⁺) auf dem gleichen Niveau wie zur ersten Histamin-/SNP-Gabe (vgl. erste Perfusion von Histamin/SNP vor KHP/K⁺, Abbildung 12a) lag. Der Toleranzbereich wurde $\pm 10\%$ definiert.

In Abbildung 12 ist zudem die exemplarische Aufzeichnung der Perfusion von Histamin vor (Abbildung 12a) und nach Kontrollintervention (flusskonstanter KHP-Perfusion) dargestellt. Sichtbar ist der Effekt eines erhöhten Ausgangs-CPP (Abbildung 12b) im Vergleich zu einem konstantem Ausgangs-CPP (Abbildung 12c). Während die basale Vasodilatation 52 % beträgt, gemessen bei einem Ausgangs-CPP min von 68 mmHg, beträgt die Vasodilatation nach Kontrollintervention bei einem CPP von 91 mmHg 63 %, entsprechend einem Unterschied von

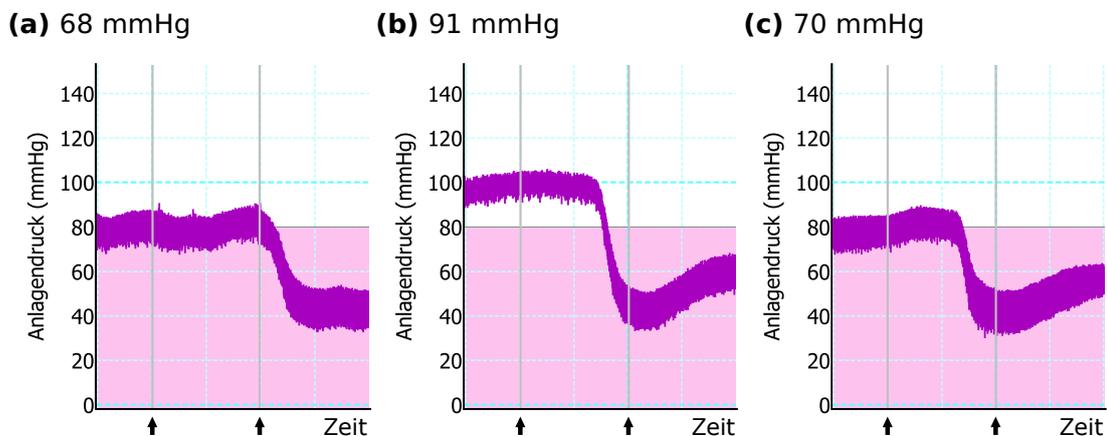


Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung des Perfusionsdrucks (CPP) unter Histamin bei verschiedenen Perfusionsdrücken

Perfusionsdruck (CPP)-Verlauf (in mmHg) unter Histamin. (a) CPP zur Baseline des Versuchs: Ruhe-CPP min 68 mmHg, Vasodilatation nach Histamingabe: 52 % (auf 33 mmHg). (b) Erste Histaminperfusion nach Kontrollperfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHP); Ruhe-CPP min 91 mmHg. Vasodilatation nach Histamingabe: 63 % (auf 34 mmHg); Steigerung zu (a): 21 %. (c) Zweite Histaminperfusion nach Kontrollperfusion mit (KHP); Ruhe-CPP min 70 mmHg. Vasodilatation nach Histamingabe: 55 % (auf 31 mmHg); Steigerung zu (a): 7 %. Alle drei Messungen sind demselben Kontrollversuch entnommen. Der Einfluss eines höheren CPP auf das Ausmaß der Vasodilatation (i. S. einer verstärkten Vasodilatation) ließ sich über die Gesamtheit der Versuche reproduzieren und hing nicht von der Reihenfolge der Messungen im Versuch ab. Schwarze Pfeile markieren Anfang und Ende der Histaminperfusion. Ein horizontaler Abschnitt entspricht einer halben Minute. n=1.

21 % zur Baselinemessung. Bei Verminderung des CPP auf 70 mmHg beträgt die Vasodilatation lediglich 55 %; ein Unterschied von 7 % zur Baselinemessung. Die Darstellung verdeutlicht, warum eine Messung bei gleichen Ausgangswerten des CPP relevant war.

2.7 Ischämie-Reperfusionsexperimente zur Infarktgrößenbestimmung

Im Anschluss an die Etablierung des ED-Modells wurde dessen Effekt auf IS im I/R-Versuch getestet. In Abbildung 13 ist der zeitliche Verlauf der I/R-Versuche gezeigt. Im Versuch wurde nach einer zehnmütigen Einpendelung der Kaliumpuffer über zehn Minuten flusskonstant perfundiert, bevor das Herz nach 50 Minuten einer Ischämie von 33 Minuten unterzogen wurde. Die Dauer der Reperfusion betrug eine Stunde. Zudem wurden die IS mit einer Referenzgruppe verglichen, die über fünfzig Minuten druckkonstant mit 80 mmHg perfundiert, dann ebenfalls einer 33-minütigen Ischämie unterzogen und über eine Stunde reperfundiert wurde. Die I/R-Versuche gliedern sich ebenfalls in drei VR:

- **VR 1:** In der Ersten wurde der Kaliumpuffer mit 8,5 ml/min perfundiert,
- **VR 2:** in der Zweiten mit dem gleichen CF wie im druckkonstanten Aufbau des vorherigen Versuchsablaufs,
- **VR 3:** in der Dritten mit verbesserten Wärmeverhältnissen im Versuch.

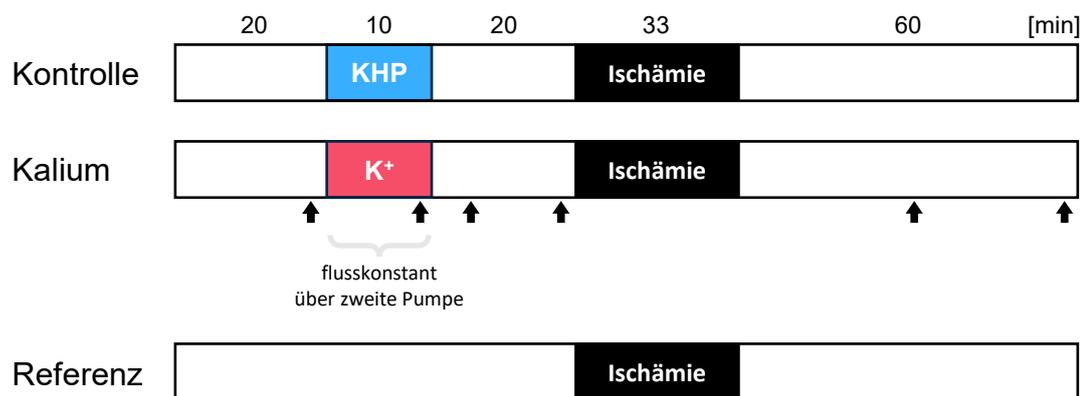


Abbildung 13: Versuchsablauf: Infarktkontrollversuche

KHP = flusskonstante Perfusion mit regulärem Puffer, K⁺ = flusskonstante Perfusion mit Kaliumpuffer. Referenz: nur druckkonstante Perfusion. Der restliche Versuchsaufbau war druckkonstant. Zeitangaben über dem Zeitstrahl in Minuten. Schwarze Pfeile stellen Zeitpunkte der Auswertung von hämodynamischen Daten dar. n=3-6.

2.7.1 Auswertung der Versuche

Zur Auswertung der I/R-Versuche wurde die IS als primäres Outcome definiert. Außerdem wurden hämodynamische Parameter ausgewertet: Herzfrequenz (HF), linksventrikulär entwickelter Druck (LVDP, errechnet als $LVE\text{SP} - LVE\text{DP}$), LVEDP, Kontraktilität ($dP/dt \text{ max}$), CF und CPP. Darüber hinaus wurden auch das Gewicht der Ratten und deren Herztrockengewicht analysiert. Zur Bewertung der Kontraktur der Herzen während der Ischämie wurden die maximale Kontraktion und deren Zeitpunkt ausgewertet.

2.7.2 Bestimmung der Infarktgrößen

Am Ende eines Versuches wurde das Herz bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mindestens zwölf Stunden eingefroren. Anschließend wurde es in acht ca. 1 mm dicke Scheiben geschnitten und mit einer TTC-Färbelösung (Triphenyltetrazoliumchlorid 22 mM, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan 116 mM, NaCl 0,9 %) [76] über 15 Minuten bei einem pH von 7,42 und einer Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefärbt. Zur Fixierung wurden die gefärbten Herzscheiben 24 Stunden in 4 % Formaldehyd eingelegt und dann zur Auswertung eingescannt. Die Auswertung der Scans erfolgte verblindet durch ein unabhängiges Mitglied der AG Kardioprotektion. Hierbei wurde die Fläche des linken Ventrikelmyokards und der infarzierten Areale quantitativ mittels Planimetrie im Programm SigmaScan Pro 5 erfasst und der prozentuale Anteil der infarzierten Areale am LV ermittelt. In der TTC-Färbung erscheinen infarzierte Areale weiß, während vitale Bereiche eine rote Farbe annehmen. [95]

2.8 Zellkultur

2.8.1 Bewertung der Zellschädigung durch Kalium und Triton

Zur Überprüfung eines möglichen Schadens auf zellulärer Ebene durch die ED-Induktion wurde die Zellintegrität in einem Zellkultur-Experiment mit Caco-2-Zellen geprüft. Caco-2-Zellen sind humane Adenokarzinomzellen des Colons, die in ihren Eigenschaften epithelialen bzw. endothelialen Zellen gleichen und bei Differenzierung eine konfluente Einzellschicht bilden. Als Medium diente ein *Minimum Essential Medium* nach Eagle, welches mit 20 % fetalem Kälberserum, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin sowie 2 mM Glutamax angereichert wurde. Alle 2-3 Tage wurde das Medium ausgetauscht. [96]

2.8.2 Permeabilitätsmessung

Durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) konnten Aussagen über die Permeabilität bzw. Zellintegrität getroffen werden. [97]

Die Zellen wurden auf kollagenisierte Inserts ausgesät ($2 \cdot 10^5$ Zellen), die in 12 Loch-Platten eingehängt waren. Beide Kompartimente enthielten das gleiche Kultivierungsmedium und wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ über 21 Tage zur Ausdifferenzierung kultiviert, bis sie eine solide Zellschicht ausgebildet hatten. Anschließend wurde die Messung durchgeführt. Die Messung des Widerstandes erfolgte mittels eines Voltmeters und einer Elektrodenkammer in Ωcm^2 aus den gemessenen Widerstandswerten und der Fläche der verwendeten Filtermembran. [98]

Nach einer Basismessung wurden zwei Kulturen in einem Medium mit 60 mM Kalium und zwei in einem Medium mit einprozentigem Triton inkubiert; eine Kultur verblieb als Kontrolle. Nach 15 Minuten und nach zwei Stunden wurde eine erneute Messung des TEER durchgeführt.

2.9 Statistische Auswertung und Programme

Die hämodynamischen Variablen der Herzen wurden mittels Lab-Chart 8 Pro aufgezeichnet. Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mithilfe von individuell erstellten R-Skripten und Microsoft Excel. Zur Visualisierung der Ergebnisse dienten ebenfalls individuell erstellte R-Skripte und Auszüge aus den Aufzeichnungen in LabChart. Statistische Vergleiche zwischen zwei Gruppen/Zeitpunkten erfolgten durch Student's T-Test. Statistische Auswertungen zwischen drei oder mehr Gruppen erfolgten mittels ANOVA und Tukey Post-hoc-Test. Das Signifikanzniveau lag bei 5 %, Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Die Adjustierung der p-Werte erfolgte mittels False Delivery Rate (FDR). Korrelationen wurden mittels Spearman-Test, einem generalisierten linearen Modell (GLM) oder eines Locally Estimated Scatterplot Smoothing (LOESS) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Physiologische Endothelfunktion

3.1.1 Vasodilatation durch Histamin

Zur Bewertung der physiologischen Endothelfunktion und der Bestimmung der vasodilatativ wirksamsten Stoffmenge von Histamin dienten Konzentrationsreihen. Hierbei wurden 100 nmol bis 3,2 μ mol Histamin perfundiert und die prozentuale Verminderung des CPP verglichen. Außerdem wurde der Einfluss auf weitere hämodynamische Parameter untersucht. Die Ergebnisse lassen sich Abbildung 14a entnehmen. In Abbildung 14b-e sind weitere hämodynamische Variablen dargestellt (HF, LVDP, LVEDP und Kontraktilität). Zusätzlich sind die Messwerte für den durchschnittlichen und minimalen CPP in Abbildung 14f und 14g dargestellt. Gezeigt ist jeweils der Vergleich des Ausgangswerts (grau, prä) mit dem nach Histamingabe gemessenen Wert (grün, post).

Die Perfusion von Stoffmengen über 200 nmol Histamin führte zu einer Vasodilatation im Sinne einer CPP-Verminderung, wobei 200 nmol eine Vasodilatation von 21 ± 8 % hervorriefen. Eine weitere Steigerung des CPP-Abfalls, also eine verstärkte Vasodilatation, konnte bis zur Gabe von 800 nmol Histamin gemessen werden (25 ± 5 % CPP-Abfall; CPP min: 68 mmHg vs. 51 mmHg, $p < 0,05$, s. Abbildung 14g). Bei weiterer Dosissteigerung nahm der Effekt des Histamins auf die Vasodilatation wieder ab, sodass bei 3,2 μ mol Histamin die CPP-Verminderung nur noch bei 10 ± 2 % lag. Somit wurde die Dosis von 800 nmol Histamin zum Hervorrufen einer maximalen Endothelantwort festgelegt.

In den Messungen der HF, die zwischen 273 ± 34 bpm und 287 ± 45 bpm lag (Abbildung 14b), zeigten sich keine Unterschiede durch Histamin. Ab einer Stoffmenge von 200 nmol Histamin ließ sich ein nicht-signifikantes Absinken des LVDP von durchschnittlich 127 ± 9 mmHg um etwa 5 % (auf durchschnittlich 120 ± 8 mmHg) durch die Histamingabe beobachten (s. Abbildung 14c). In der Messung des LVEDP ergab sich nur unter 3,2 μ mol Histamin ein Anstieg, von 4 ± 3 mmHg auf 6 ± 4 mmHg (s. Abbildung 14d). Zudem lag die Kontraktilität (dP/dt max) der Herzen nach Gabe von 200 nmol bis 3,2 μ mol Histamin etwas unter ihrem Ausgangswert (4883 ± 721 vs. 4682 ± 707 mmHg \cdot s $^{-1}$), jedoch ebenfalls ohne signifikanten Unterschied (s. Abbildung 14e).

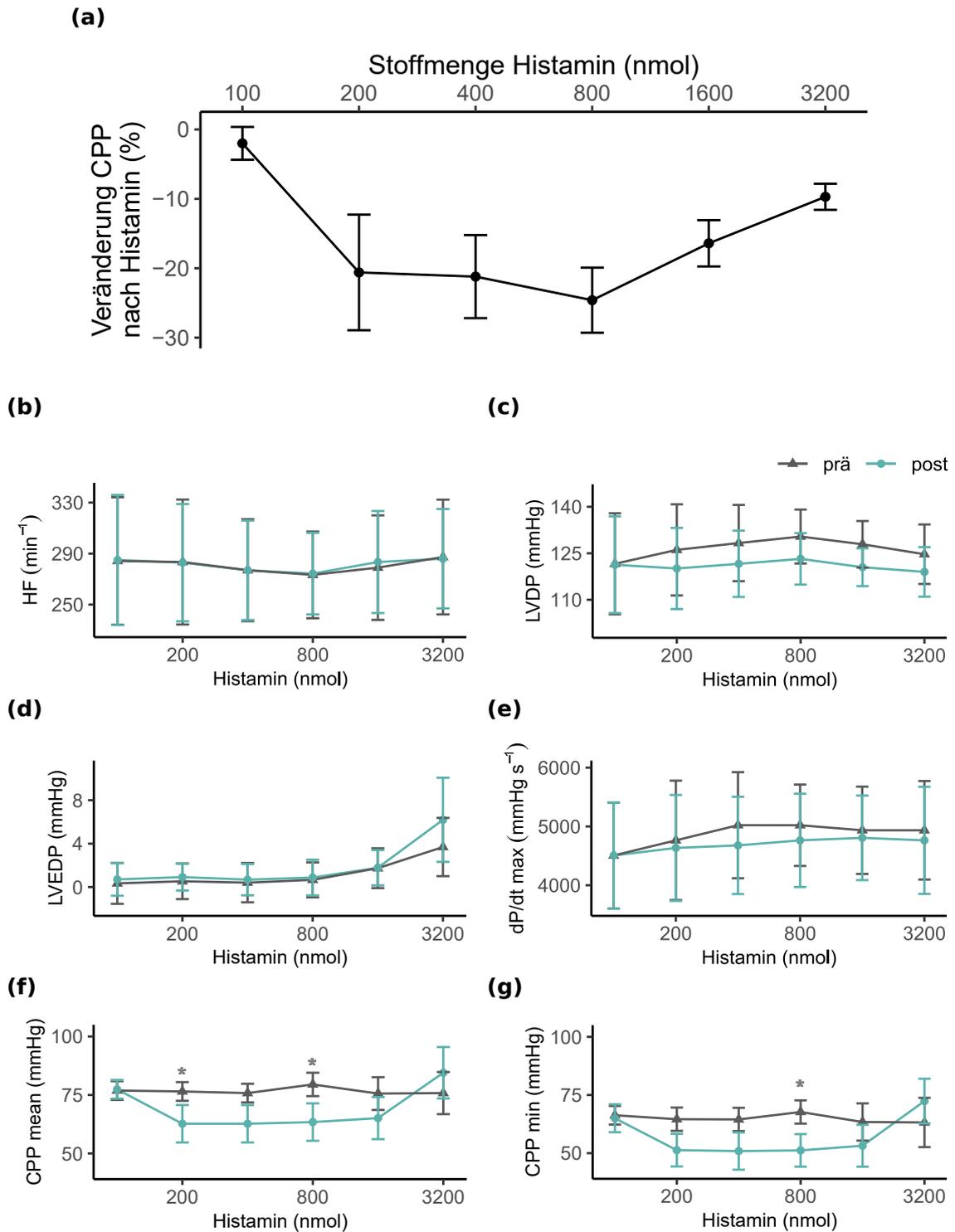


Abbildung 14: Hämodynamische Variablen unter Histamin

(a) Verminderung des CPP min in Abhängigkeit von der perfundierten Stoffmenge Histamin in nmol **(b)** Herzfrequenz (HF) in Schlägen pro Minute **(c)** Linksventrikulär entwickelter Druck (LVDP) in mmHg **(d)** Enddiastolischer linksventrikulärer Druck (LVEDP) in mmHg **(e)** Kontraktilität des linken Ventrikels (dP/dt max) in mmHg pro Sekunde **(f)** Durchschnittlicher koronarer Perfusionsdruck (CPP (mean)) in mmHg **(g)** Minimaler koronarer Perfusionsdruck (CPP (min)) in mmHg

„Prä“: Messwert vor Perfusion von Histamin der entsprechenden Stoffmenge, „post“: Messwert nach Perfusion von Histamin. Prä/Post-Wert für CPP min sind in **(a)** zu einem prozentualen Druckabfall verrechnet. * = $p < 0,05$. Angaben in MW \pm SD. n=3.

Histamin kann also in einer Konzentration von 800 nmol zur endothelabhängigen Vasodilatation perfundiert werden, ohne einen Einfluss auf weitere hämodynamische Variablen auszuüben.

3.1.2 Vasodilatation durch SNP

Zur Beurteilung der endothelunabhängigen Vasodilatation und somit der Funktion der glatten Gefäßmuskulatur dienten Konzentrationsreihen mit SNP. Auch hier wurden darüber hinaus die Einflüsse der Substanz auf weitere hämodynamische Variablen untersucht. Das cGMP-stimulierende SNP wurde in Konzentrationen von 45 nM bis 8 μ M perfundiert. Abbildung 15a zeigt die prozentuale Vasodilatation durch die jeweilige Stoffmenge SNP, gemessen am CPP min. Die Abbildungen 15b-g zeigen Messwerte der hämodynamischen Variablen; dargestellt ist jeweils der Ruhe-Wert vor Perfusion von SNP (grau, prä) und die Messung nach Perfusion von SNP (lila, post). Die Abbildungen 15b-e stellen die hämodynamischen Variablen HF, LVDP, LVEDP und Kontraktilität dar. In Abbildung 15f und 15g sind zudem die Werte des durchschnittlichen und minimalen CPP vor und nach Perfusion mit SNP gezeigt.

Bei Gabe von 90 nM SNP oder mehr wurde in den Versuchen eine Vasodilatation im Sinne einer CPP-Ver minderung beobachtet (s. Abbildung 15a, f-g). Die Gabe von 180 nM bis 1 μ M SNP induzierte jeweils eine Vasodilatation auf einem vergleichbaren Niveau von über 20 %: Bei Gabe von 180 nM SNP betrug der Effekt 24 ± 10 %, bei Perfusion von 1 μ M SNP waren es 23 ± 12 %. Höhere Konzentrationen als 1 μ M SNP führten zu einer schwächeren Antwort der Gefäßmuskulatur, also einer schwächeren CPP-Ver minderung. In den hämodynamischen Variablen ließen sich in diesen Versuchen keine signifikanten Unterschiede durch SNP feststellen. Weder die HF (Abbildung 15b), noch der LVDP (Abbildung 15c), LVEDP (Abbildung 15d) oder die Kontraktilität (Abbildung 15e) veränderten sich durch Perfusion von SNP.

SNP induziert also eine Vasodilatation, die im Bereich von Stoffmengen zwischen 180 nM und 1 μ M SNP am stärksten ausgeprägt ist. Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde die Konzentration von 1 μ M SNP für die folgenden Versuchsreihen bestimmt. Hierbei handelt es sich zwar nicht um die niedrigste und maximal effektive Dosis von SNP, jedoch handelt es sich um eine in der Literatur häufig verwendete Konzentration. Diese

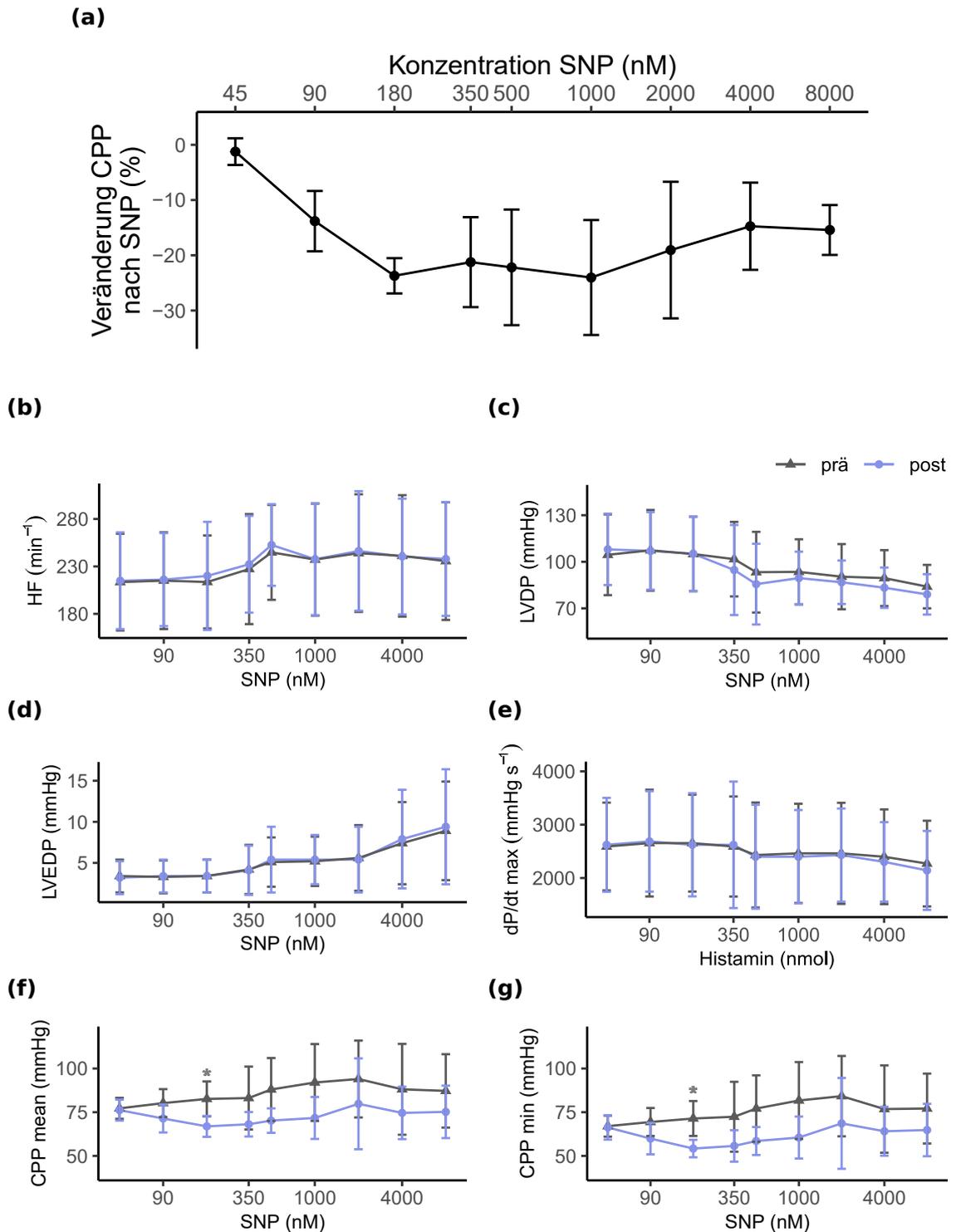


Abbildung 15: Hämodynamische Variablen unter Natriumnitroprussid (SNP)

(a) Verminderung des CPP min in Abhängigkeit von der perfundierten Konzentration SNP in nM **(b)** Herzfrequenz (HF) in Schlägen pro Minute **(c)** Linksventrikulär entwickelter Druck (LVDP) in mmHg **(d)** Enddiastolischer linksventrikulärer Druck (LVEDP) in mmHg **(e)** Kontraktilität des linken Ventrikels (dP/dt max) in mmHg pro Sekunde **(f)** Durchschnittlicher koronarer Perfusionsdruck (CPP (mean)) in mmHg **(g)** Minimaler koronarer Perfusionsdruck (CPP (min)) in mmHg

„Prä“: Messwert vor Perfusion von SNP in der entsprechenden Konzentration, „post“: Messwert nach Perfusion von SNP. Prä/Post-Wert für CPP min sind in **(a)** zu einem prozentualen Druckabfall verrechnet. * = $p < 0,05$. Angaben in $MW \pm SD$. $n=4$.

erlaubt somit eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse dieser Studie mit Daten aus der Literatur (beispielsweise Klabunde *et al.*). [79] Mit einem Einfluss von SNP auf weitere hämodynamische Variablen ist anhand der Auswertung der Konzentrationsreihen nicht zu rechnen.

3.1.3 Histamin- oder SNP-induzierte Vasodilatation unter der Gabe von L-Name

Um zu überprüfen, ob die Vasodilatationsantwort durch Histamin oder SNP endothelvermittelt ist, wurde die Vasodilatation nach Gabe beider Stoffe unter gleichzeitiger Perfusion von 100 μM L-Name untersucht. L-Name ist ein Inhibitor der eNOS, sodass gezeigt werden konnte, welche Effekte eNOS-vermittelt sind und dementsprechend durch L-Name abgeschwächt werden. Zum Vergleich wurden Kontrollgruppen herangezogen, die statt 100 μM L-Name gewöhnlichen KHP erhielten. Der jeweils gemessene CPP vor und nach Gabe von Histamin und SNP in den beiden Versuchsgruppen ist in Tabelle 10 dargestellt. Hierbei beschreiben BL_1 und BL_2 jeweils den CPP-Wert vor Perfusion der vasodilatierenden Substanz, P_1 und P_2 die Messung nach Vasodilatation. Als Δ/BL_1 und Δ/BL_2 wurde die resultierende Vasodilatation berechnet. Abbildung 16 zeigt die sich daraus ergebenden Effekte von L-Name auf die Vasodilatation durch SNP und Histamin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Grundlage der Darstellung ist die Veränderung der Vasodilatation zwischen den Versuchszeitpunkten Δ/BL_1 und Δ/BL_2 .

Tabelle 10: CPP unter Gabe von 100 μM N ^{ω} -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-Name)

Durchschnittlicher minimaler Perfusionsdruck zur Baselinemessung (BL_1) und nach einminütiger Perfusion mit Histamin bzw. Natriumnitroprussid (SNP) (P_1) sowie unter Perfusion mit L-Name oder Puffer (in der Kontrollgruppe) nach dreißig Minuten (BL_2). Die letzte Messung fand nach einminütiger Perfusion mit Histamin bzw. SNP unter anhaltender Perfusion mit L-Name statt (P_2). Δ/BL_1 und Δ/BL_2 beschreiben die prozentuale Veränderung der Messungen BL_1 und P_1 bzw. BL_2 und P_2 als $BL-P/BL$. Werte in $MW \pm SD$. $n=3$.

	BL_1 (mmHg)	P_1 (mmHg)	Δ/BL_1 (%)	BL_2 (mmHg)	P_2 (mmHg)	Δ/BL_2 (%)
<i>Kontrolle</i>						
Histamin	76 \pm 7	39 \pm 6	47 \pm 13	77 \pm 8	40 \pm 6	47 \pm 13
SNP	73 \pm 9	39 \pm 5	46 \pm 10	75 \pm 9	44 \pm 3	41 \pm 10
<i>L-Name</i>						
Histamin	83 \pm 1	49 \pm 7	40 \pm 9	85 \pm 1	66 \pm 0	22 \pm 1
SNP	82 \pm 1	47 \pm 6	43 \pm 7	83 \pm 2	50 \pm 1	40 \pm 3

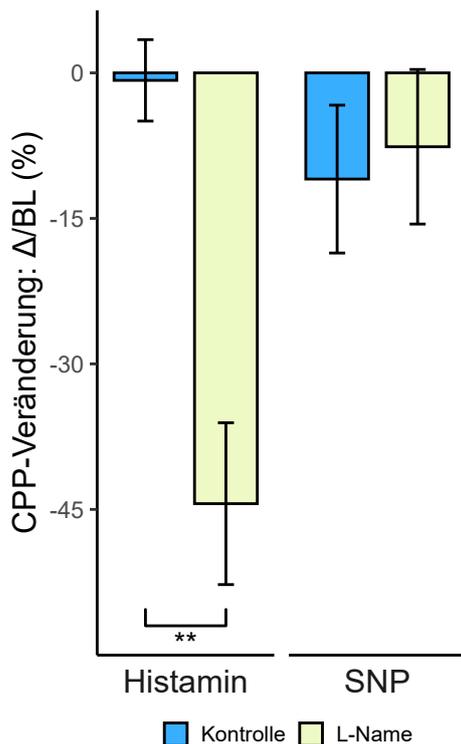


Abbildung 16: Histamin und Natriumnitroprussid (SNP) unter N^{ω} -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-Name)

Gabe von 800 nmol Histamin und 1 μ M SNP unter 100 μ M L-Name. Jeder Balken fasst die prozentuale Veränderung des Effekts von Histamin oder SNP, den die Gabe von L-Name induzierte, zusammen: Histamin/SNP wurden jeweils vor und unter Gabe von L-Name perfundiert und die prozentuale Perfusionsdruck (CPP)-Verminderung berechnet. Aus beiden prozentualen Verminderungen wurde erneut eine prozentuale Veränderung zwischen beiden Versuchszeitpunkten errechnet. Diese beschreibt somit, wie sich der Effekt durch L-Name verändert. ** = $p < 0,01$. Werte als $MW \pm SD$. $n=3$.

Die Vasodilatation unter Histamin war in den Kontrollversuchen vor und nach KHP-Gabe (Kontrollintervention) nicht relevant unterschiedlich. Vor Intervention betrug der Druckabfall nach 800 nmol Histamin 47 ± 13 % (bei einer Druckveränderung von 76 ± 7 mmHg (BL_1) auf 39 ± 6 mmHg (P_1)). Nach KHP-Perfusion wurde weiterhin eine durchschnittliche Druckveränderung von 47 ± 13 % nach Histamingabe gemessen, die aus Messwerten von 77 ± 8 mmHg zu BL_2 und 40 ± 6 mmHg zu P_2 resultierte (s. Tabelle 10). Ebenso wenig veränderte sich in diesen Kontrollversuchen die Reaktion auf SNP. Vor Kontrollintervention konnte nach 1 μ M SNP eine Druckverminderung von 46 ± 10 % gemessen werden, da der CPP von initial 73 ± 9 mmHg (BL_1) auf 39 ± 5 mmHg (P_1) sank. Nach der Kontrollintervention betrug die durchschnittliche Druckverminderung noch 41 ± 10 %: Zu BL_2 betrug der CPP hier 75 ± 9 mmHg, nach SNP (P_2) waren es noch 44 ± 3 mmHg (s. Tabelle 10).

Bei gleichzeitiger Perfusion von L-Name nahm der Effekt des Histamins hingegen deutlich ab: Die Messung zu BL_1 betrug 83 ± 1 mmHg, zu P_1 49 ± 7 mmHg, woraus sich eine CPP-

Veränderung von 40 ± 9 % vor Intervention ergibt. Diese steht einer histaminbedingten Druckveränderung von 22 ± 1 % unter L-Name entgegen. Hier sank der CPP von 85 ± 1 mmHg (BL_2) nur noch auf 66 ± 0 mmHg (P_2).

Unter SNP zeigte sich eine Druckabnahme von 82 ± 1 mmHg (BL_1) auf

47 ± 6 mmHg (P_1) um 43 ± 7 % (Δ/BL_1). Durch L-Name gab es keine deutliche Abweichung: SNP bewirkte eine Druckverminderung um 40 ± 3 % (Δ/BL_2), von 83 ± 2 mmHg (BL_2) auf 50 ± 1 mmHg (P_2).

Die Werte Δ/BL_1 und Δ/BL_2 sind in Abbildung 16 für jede Gruppe als eine Veränderung des prozentualen Druckabfalls grafisch dargestellt. Unter L-Name veränderte sich die Vasodilatations-Antwort auf Histamin im Vergleich von Δ/BL_1 und Δ/BL_2 um 44 ± 8 % (vs. 1 ± 4 % in der Kontrollgruppe, $p < 0,01$) Die Antwort auf SNP veränderte sich um 8 ± 8 % (vs. 11 ± 8 % in der Kontrollgruppe, s. Abbildung 16).

Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Vasodilatation durch Histamin über das Endothel vermittelt wird, da L-Name sie signifikant abschwächt. Die Vasodilatation durch SNP hingegen zeigte sich nicht durch L-Name beeinflussbar und somit endothelunabhängig. Histamin und SNP können also zur Prüfung der endothelabhängigen und -unabhängigen Vasodilatation verwendet werden.

3.2 Endotheliale Dysfunktion: Druckkonstante Kaliumperfusion

Zu Beginn der Etablierung des ED-Modells war es das Ziel, den hochmolekularen Kaliumpuffer durch druckkonstante Perfusion mit 80 mmHg in das bestehende druckkonstante Langendorff-Modell zu integrieren. Nach Umstellung der Perfusion auf den Kaliumpuffer dauerte es im Schnitt $3,6 \pm 0,7$ Minuten, bis der Kaliumpuffer, der durch Luftfalle und Wärmespirale floss, am Herzen angekommen war. Sichtbar war dies daran, dass das Herz asystol wurde. Die Dauer bis zur Asystolie ist in Abbildung 17 Größe des Datenpunktes dargestellt. Die Abbildung zeigt zudem, wie lang die Asystolie in Abhängigkeit von der Länge der Kaliumperfusion anhielt. Auch das Vorkommen von Ischämie oder Washout ist in Form bzw. Farbe der Datenpunkte gezeigt. In Abbildung 17 sind Datenpunkte aus den folgenden beiden Unterkapiteln, also beiden Versuchsreihen zur druckkonstanten Kaliumperfusion, gemeinsam dargestellt. Auf die Details der Beobachtungen sowie deren Konsequenzen wird somit in den kommenden Kapiteln näher eingegangen.

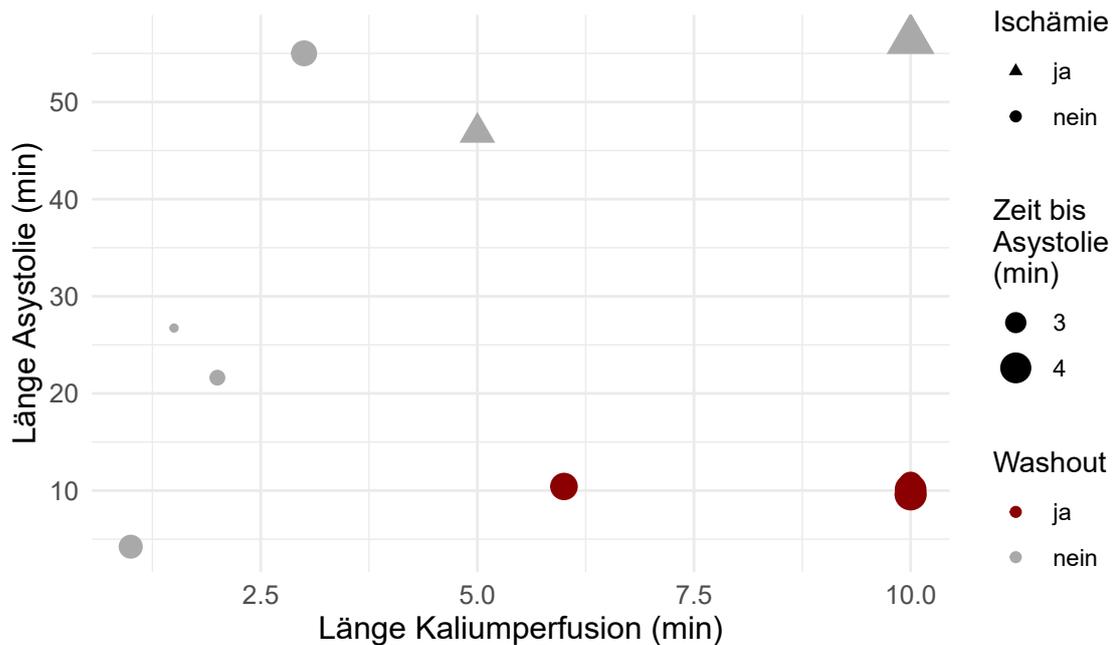


Abbildung 17: Verhalten der Herzen unter Kaliumpuffer

Dauer der Asystolie unter Kalium in Abhängigkeit von der Dauer der Kaliumperfusion. Dargestellt ist außerdem, ob das Herz einer Ischämie unterzogen wurde (Form, Dreieck bzw. Kreis) und ob der Kaliumpuffer nach der Perfusion ausgewaschen bzw. aus der Anlage abgelassen wurde (Farbe, grau bzw. rot). Die Größe der Datenpunkte zeigt an, wie lange die Kaliumperfusion lief, bevor das Herz asystol wurde; je größer der Punkt, desto länger die Dauer. $n=10$, davon $n=2$ mit Ischämie, $n=4$ mit Washout.

3.2.1 Druckkonstante Implikation ohne Washout

Die erste Versuchsreihe zur druckkonstanten Kaliumperfusion zielte auf eine Implikation der hochmolaren Kaliumlösung ohne Veränderungen im Anlagenaufbau ab. Hierzu wurde der Kaliumpuffer aus einem zweiten Reservoir durch das gleiche System wie der gewöhnliche KHP in das System eingespeist, indem lediglich der Ansaugschlauch der peristaltischen Pumpe vom KHP-Reservoir in das Kaliumpuffer-Reservoir überführt wurde. In dieser rein druckkonstanten Implikation des Kaliumpuffers zeigten sich diverse Probleme. Das größte Problem stellte zunächst die unvorhersehbare Länge der Asystolie dar. Das Ziel war eine insgesamt zehnmünütige Asystolie bzw. Kaliumperfusion, da diese Länge der Kaliumperfusion von He *et al.* als effizient zur Endothelschädigung vorbeschrieben wurde. [73] Im Versuch entsprach der Beginn der Asystolie dem Einwaschen des Kaliumpuffers, das Ende der Asystolie dem Auswaschen. Sobald das Herz wieder mit einer normalen ($5,7 \pm 0,1$ mmol/l) bis leicht erhöhten Konzentration von Kalium perfundiert wurde, zeigte sich wieder eine regelmäßige Frequenz. Abhängig von der Länge der Perfusion mit Kaliumpuffer im Versuchs-

protokoll variierte die Dauer der Asystolie zwischen 4,2 und 56,4 min. Die Variabilität lässt sich durch die Asystolie durch den Kaliumpuffer selbst sowie durch die strukturellen Gegebenheiten der Langendorff-Anlage erklären. Bedingt durch die Asystolie betrug der CF nur noch durchschnittlich $1,5 \pm 0,5$ ml/min; in der Wärmespirale über dem Herzen standen allerdings ca. 35 ml Kaliumpuffer, die durch das Herz fließen mussten, bevor es wieder mit regulärem KHP perfundiert werden konnte, der die Asystolie beendete. Aus diesem Umstand ergaben sich variable und zu lange Dauern der Kaliumperfusion. Deshalb wurde die Dauer der Kaliumgabe im Versuchsprotokoll schrittweise von zehn Minuten reduziert; so betrug sie zunächst fünf und schließlich eine Minute, um die zehninütige Perfusion zu erreichen. Auch diese Daten sind in Abbildung 17 als „Länge der Kaliumperfusion“ erfasst. Die genaue Dauer der Asystolie variierte somit von Versuch zu Versuch in Abhängigkeit vom genauen CF und in Abhängigkeit von der Dauer der Kaliumperfusion; durchschnittlich waren es $25,2 \pm 19,2$ Minuten.

In den Versuchen zeigte sich ein wiederkehrendes Muster in den hämodynamischen Variablen nach Kaliumperfusion; die Herzen entwickelten häufig zunächst wieder einen langsamen Herzschlag mit hohem LVEDP und LVESP sowie vielen Extrasystolen, bevor sie sich im Verlauf wieder ihren hämodynamischen Ausgangswerten näherten.

Zusammenfassend war die Kaliumperfusion in diesen Versuchen also nicht zuverlässig steuerbar. Die Herzen brauchten unterschiedlich lange, um asystol zu werden und wiesen anschließend unterschiedliche Dauern der Asystolie auf. Somit war es nicht möglich, konsistente Versuchsbedingungen zu schaffen. Aufgrund dieser Probleme wurde das Versuchsprotokoll weiterentwickelt.

lie deutlich besser steuern, wie auch in Abbildung 17 sichtbar wird: Alle Versuche mit Washout (rot) zeigen zehn Minuten Asystolie. Im Anschluss an das Washout dauerte es etwa eine Minute, bis die Herzen nach Kaliumgabe wieder Kontraktionen zeigten. Durch Beginn des 50-sekündigen Washouts nach acht Minuten Asystolie konnte also eine Kaliumperfusionsdauer von zehn Minuten sichergestellt werden. In den Kontrollversuchen war sichtbar, dass das Washout zu einem Abfall des LVDP führte (in Abbildung 19 dargestellt); in vielen Versuchen fiel zudem die Herzfrequenz ab. Die veränderte Perfusion begünstigte eine unregelmäßige Herzfrequenz im Sinne von Extrasystolen. Zudem musste zum Ablassen des Puffers der Schlauch zwischen Luftfalle und Pufferreservoir abgeklemmt werden, was zu einer kurzen Druckerhöhung führte, die ebenfalls in der hämodynamischen Aufzeichnung der Versuche sichtbar wurde. In der Versuchsgruppe mit Kaliumperfusion sah man lediglich letztere Druckveränderung (s. Abbildung 20). Insgesamt war somit jedoch das Problem der inkonsistenten Kaliumperfusion zunächst gelöst. Die Veränderung der Methodik brachte nur geringfügige hämodynamische Auffälligkeiten mit sich.

Anschließend erfolgte zur Einschätzung des entstandenen Endothelschadens eine einminütige Perfusion von 100 nmol Histamin nach der Perfusion von Kaliumpuffer. Diese Stoffmenge wurde von He *et al.* übernommen. [73] Vor, während und nach der Perfusion wurde minütlich der CF gemessen, um Unterschiede im Vasotonus daraus abzuleiten. Die Auswertung des CF ist in Abbildung 21 als relative Veränderung zum Baselinewert vor Beginn der Histamingabe dargestellt. Die Messungen zeigten zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Kaliumgruppe. Am stärksten stieg der CF zur zweiten Minute nach Histaminperfusion an, nämlich um $15,2 \pm 6,2$ %

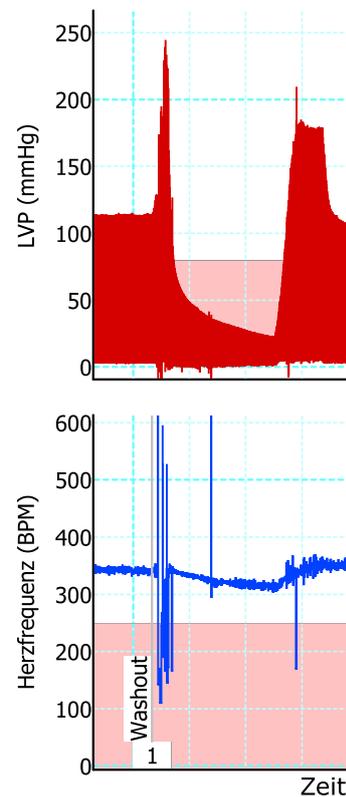


Abbildung 19: KHP-Washout

Beispielhafte Aufzeichnung von linksventrikulärem Druck (LVP) und Herzfrequenz (HF) bei Ablassen von Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) als Washout aus der Anlage. Ein horizontaler Abschnitt entspricht einer halben Minute. Angabe der HF in Schlägen pro Minute (bpm), Angabe des LVP in mmHg.

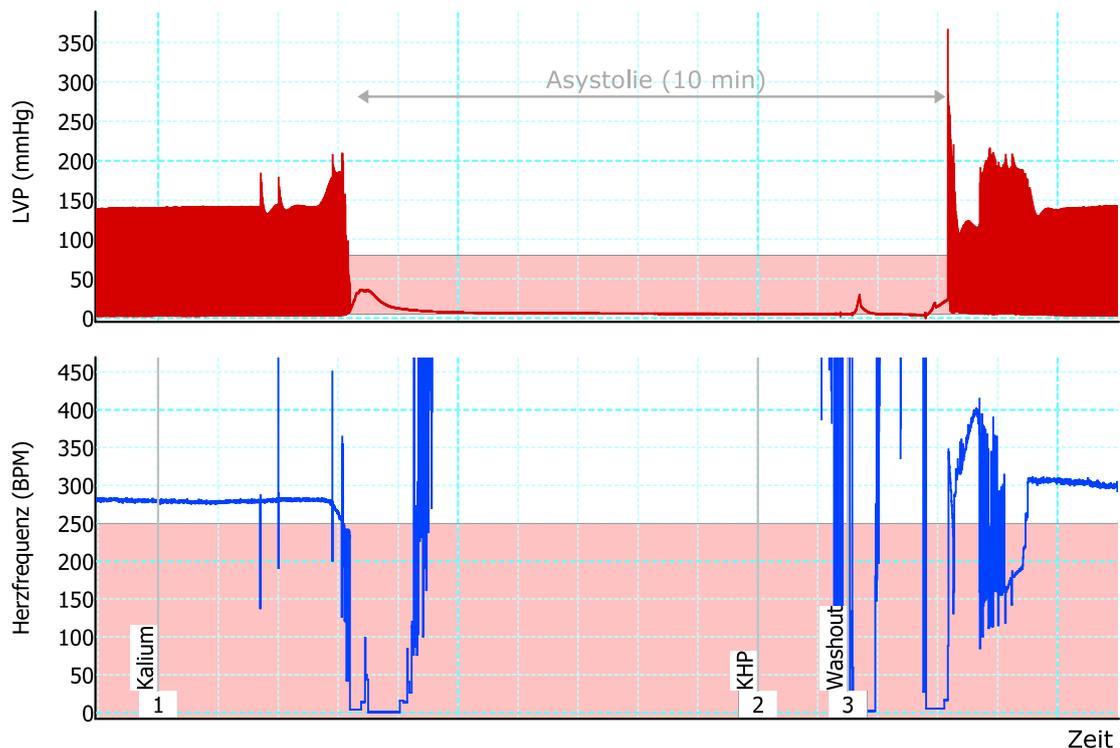


Abbildung 20: Beispielhafte Aufzeichnung des linksventrikulären Drucks und der Herzfrequenz in LabChart

Zu Beginn wird die Perfusion mit Kaliumpuffer (Kalium) gestartet, die nach zehn Minuten wieder beendet wird. Kurz nach Beginn der Perfusion wird das Herz asystol. Dann wird über einen Dreiwegehahn der Kaliumpuffer für eine Minute abgelassen, sodass normaler Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) nachfließen kann und die Asystolie so beendet wird. Ein horizontaler Abschnitt entspricht einer Minute. Angabe der Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (bpm), Angabe des linksventrikulären Drucks (LVP) in mmHg.

in der Kontrollgruppe und um $20,7 \pm 6,2$ % in der Kaliumgruppe im Vergleich zur jeweiligen Baselinemessung. Anschließend sank der CF wieder; in der Kontrollgruppe ab der sechsten, in der Kaliumgruppe ab der siebten Minute nach Histamingabe sogar unter den Ausgangswert. Zwar ließ sich also die Kaliumperfusion in diesen Versuchen besser steuern, jedoch hatte sie keinen Einfluss auf die durch Histamin induzierte Vasodilatation. Somit konnte auch in dieser VR keine ED erzeugt werden.

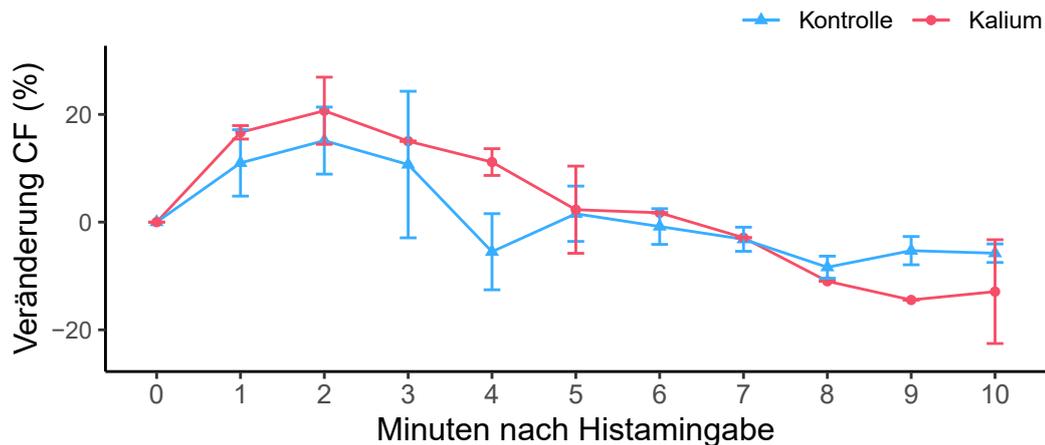


Abbildung 21: Koronarfluss nach druckkonstanter Kaliumperfusion und Histamingabe

Dargestellt ist die prozentuale Steigerung des Koronarflusses (CF) nach Histaminperfusion im Anschluss an Kaliumperfusion (rot) oder Kontrollintervention (blau). Als Referenzzeitpunkt ("0 Minuten") wurde der CF zu Minute 39 im Versuch (vgl. Abbildung 9), also unmittelbar vor der Histamingabe und kurz nach der Gabe von hochmolarem Kaliumpuffer, festgelegt. In Abhängigkeit davon wurde die prozentuale Steigerung pro Minute über die Versuche hinweg ermittelt. Die Gruppen unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Angaben in $MW \pm SD$. $n=3-4$.

3.3 Endotheliale Dysfunktion: Flusskonstante Kaliumperfusion

3.3.1 Flusskonstante Perfusion mit 8,5 ml/min im druckkonstanten Modell ohne Perfusionsdruckmessung

Durch eine weitere Veränderung des Langendorff-Modells sollte in der nächsten Versuchsreihe getestet werden, ob eine flusskonstante Kaliumperfusion das Endothel schädigen kann (VR A). Da diese Schädigung mit einer druckkonstanten Kaliumperfusion nicht gelang, wurde die These entwickelt, dass die ED durch hochmolaren Kaliumpuffer mit höheren Scherkräften induziert werden muss. Deshalb wurde der Perfusionsmodus des Kaliumpuffers in ein flusskonstantes Modell geändert, während der übrige Anlagenaufbau weiterhin druckkonstant blieb. Dieser Aufbau ist Version 3 des verwendeten Langendorff-Modells und wird in Abbildung 22 gezeigt.

Die Umstellung des Kaliumpuffers in einen flusskonstanten Perfusionsmodus brachte den Vorteil, dass die Asystolie fast unmittelbar nach Umstellen des Puffers eintrat; umgekehrt endete sie auch nach erneuter Umstellung in die druckkonstante Perfusion mit KHP sehr schnell wieder. Dies lässt sich damit erklären, dass sich in der Anlage nur we-

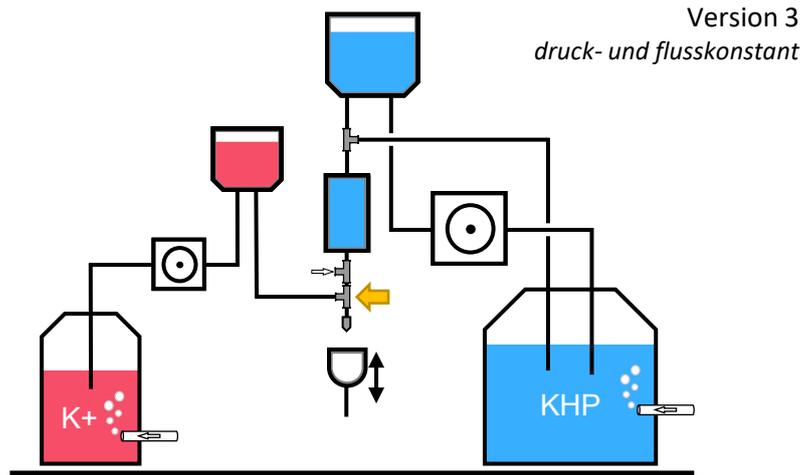


Abbildung 22: Aufbau der Langendorff-Anlage zur flusskonstanten Kaliumperfusion im druckkonstanten Versuch

KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, K⁺ = Kaliumpuffer. Der Kaliumpuffer wurde hier flusskonstant mit einer zweiten Pumpe in den Versuch eingebracht. Hierfür wurde zudem eine zweite Luftfalle (rot) installiert, die über einen Dreiwegehahn über dem Herzen in die Anlage mündete. Zur druckkonstanten Perfusion im Hauptversuch wurde der Rückfluss bzw. die Wassersäule zwischen Luftfalle 1 (blau) und Pufferreservoir 1 (blau) im Aufbau belassen. In einer späteren Anpassung wurde zudem ein Rückfluss zwischen Luftfalle 2 (rot) und Reservoir 2 (rot) etabliert, der mit Beginn der flusskonstanten Perfusion ausgeschaltet wurde und lediglich der Zirkulation von Wärme und Sauerstoff diente. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und fehlenden Relevanz im Versuchsablauf ist dieser nicht dargestellt.

nig Kaliumpuffer (im Schlauch unterhalb der Wärmespirale) befand, der zunächst noch das Herz passieren musste, bevor es wieder mit KHP perfundiert wurde. Durch die fehlende CPP-Messung, die Nulllinien von LVP und HF und den zuvor fest eingestellten CF ließ sich während der Asystolie jedoch keine Aussage über den hämodynamischen Zustand des Herzens und über die Perfusion treffen.

Um die Vasodilatation durch Histamin nach der Kaliumperfusion und somit die Endothelschädigung zu beurteilen, wurden erneut 100 nmol Histamin perfundiert und der CF engmaschig gemessen. Die Ergebnisse zur Vasodilatation nach Histamingabe in VR A zeigt Abbildung 23. Die Messung des CF zur Überprüfung einer ED ergab auch in dieser VR mit flusskonstanter Kaliumperfusion zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Kaliumgruppe. Jedoch konnte in der Kaliumgruppe ein nicht-signifikanter Trend zur deutlicheren Steigerung des CF beobachtet werden; am größten war diese Steigerung zu Minute 2 mit 48 ± 21 %.

Zusammenfassend ließ sich auch in dieser Versuchsreihe keine Endothelschädigung feststellen, was die Notwendigkeit weiterer Anpassun-

gen im Versuchsaufbau mit sich brachte. Jedoch erwies sich die flusskonstante Kaliumperfusion als sehr gut steuerbar, sodass darauf abgezielt wurde, diesen Aufbau weiter zu optimieren.

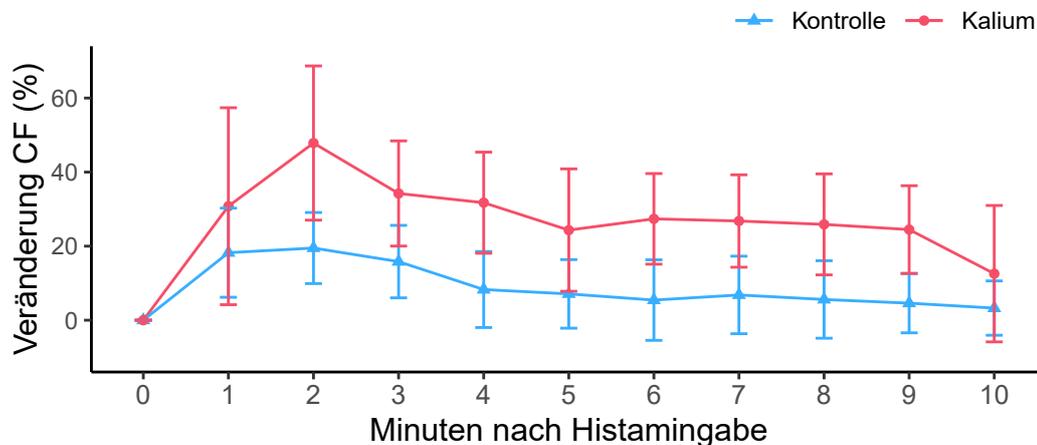


Abbildung 23: Koronarfluss nach Histamingabe in Versuchen mit flusskonstanter Kaliumperfusion (VR A)

Dargestellt ist die prozentuale Steigerung des Koronarflusses (CF) nach Histaminperfusion im Anschluss an Kaliumperfusion (rot) oder Kontrollintervention (blau). Als Referenzzeitpunkt ("0 Minuten") wurde der CF zu Minute 39 im Versuch (vgl. Abbildung 9), also unmittelbar vor Histamingabe und kurz nach der Gabe von hochmolarem Kaliumpuffer, festgelegt. In Abhängigkeit davon wurde die prozentuale Steigerung pro Minute über die Versuche hinweg ermittelt. Die Gruppen unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Angaben in $MW \pm SD$. $n=3-4$ pro Gruppe.

3.3.2 Perfusion mit 8,5 ml/min im flusskonstanten Modell

Nachdem die flusskonstante Implikation des Kaliumpuffers zu einer verbesserten Steuerbarkeit geführt hat, sollte nun der Effekt auf das Endothel, also die Induktion einer ED, besser messbar gemacht werden. Um die Endothelschädigung durch den Kaliumpuffer effektiver und effizienter prüfen zu können, wurde deshalb der gesamte Langendorff-Apparat in einen flusskonstanten Aufbau überführt (VR B). Zur kontinuierlichen CPP-Messung wurde ein zweiter Druckaufnehmer in die Anlage eingebaut, der knapp über dem Herzen den CPP ableitete und so eine bessere Einschätzung der hämodynamischen Variablen bzw. des CPP ermöglichte. Abbildung 24 zeigt diese weitere Anpassung des Langendorff-Modells zu Version 4.

Während die zuvor in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Vorteile der flusskonstanten Perfusion erhalten blieben, konnte durch den CPP außerdem ein valides hämodynamisches Monitoring über den gesamten Versuch, also auch während der kaliumbedingten Asystolie, etabliert werden. Zudem

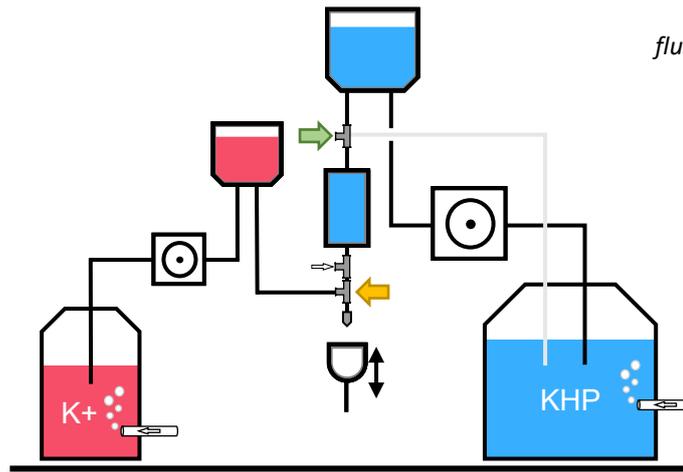


Abbildung 24: Aufbau der Langendorff-Anlage zur flusskonstanten Perfusion

KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, K+ = Kaliumpuffer. Der Kaliumpuffer wurde hier flusskonstant mit einer zweiten Pumpe in den Versuch eingebracht. Hierfür wurde zudem eine zweite Luftfalle (rot) installiert, die über einen Dreiwegehahn über dem Herzen in die Anlage mündete (orangener Pfeil). Der Rückfluss vom ersten Wärmebad (blau) zum Reservoir wurde aus der Perfusion ausgeschaltet (grüner Pfeil), um den gesamten Versuch flusskonstant zu gestalten.

brachte die Umstellung des restlichen Versuchs in einen flusskonstanten Aufbau den Vorteil einer deutlich detaillierteren Auswertung der Vasodilatation, da eine kontinuierliche CPP-Messung anstelle einer minütlichen CF-Messung ausgewertet wurde.

Vor dem Versuchsstart wurde zunächst eine Stabilisierungsphase abgewartet, in der die Einstellung eines gleichbleibenden CPP mean von 80 mmHg ($\pm 10\%$) erfolgte bzw. der CPP entsprechend adjustiert wurde. Nach der zehnmütigen flusskonstanten Perfusion mit 8,5 ml/min Kalium konnte anschließend ein deutlicher Einfluss auf den Effekt von 800 nmol Histamin auf das Endothel gezeigt werden. Dieser ist in Tabelle 11 und Abbildung 25 sichtbar: Während der CPP in der Kaliumgruppe zur Baselinemessung noch um $57 \pm 2\%$ (von 84 ± 9 mmHg auf 36 ± 3 mmHg) abfiel, sank er nach der Gabe von Kaliumpuffer nur noch um $33 \pm 10\%$ (von 72 ± 1 mmHg auf 48 ± 7 mmHg, s. Tabelle 11). Es ergab sich also eine um $41 \pm 18\%$ abgeschwächte Antwort auf Histamin (s. Abbildung 25). In den Kontrollversuchen hingegen betrug die CPP-Abnahme durch Histamin zur Baselinemessung $47 \pm 5\%$, da hier der CPP von 85 ± 24 mmHg auf 46 ± 18 mmHg sank. Nach zehnmütiger Kontrollintervention mit 8,5 ml flusskonstanter KHP-Perfusion betrug der histaminbedingte Druckabfall $49 \pm 10\%$; der CPP sank von 91 ± 28 mmHg auf 47 ± 20 mmHg. Der prozentuale Unterschied in der Kontrollgruppe

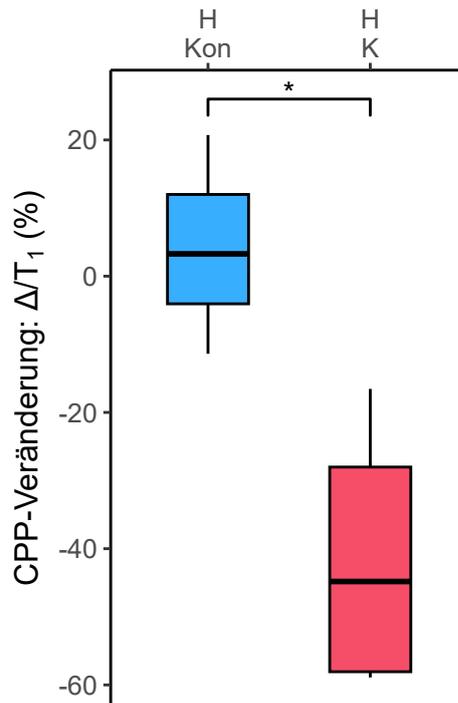


Abbildung 25: Endothelschädigung durch hochmolaren Kaliumpuffer bei einer flusskonstanten Laufrate von 8,5 ml/min (VR B)

*Darstellung der Perfusionsdruck (CPP)-Veränderung durch Gabe von 800 nmol Histamin (H) oder 1 μ M SNP (S) in Versuchen mit und ohne Kaliumperfusion. Δ bezeichnet die Differenz aus $T_1 - T_2$ (vgl. Tabelle 11). Der prozentuale Wert, den die Abbildung zeigt, vergleicht somit die Messung vor (T_1) und nach (T_2) Intervention mittels Puffer (Kon) oder 60 mM Kaliumpuffer (K), indem die Differenz zwischen den Messungen T_1 und T_2 als prozentualer Anteil des Ausgangswertes T_1 berechnet wurde ($(T_1 - T_2)/T_1$). Resultierend entstand also eine prozentuale Verminderung der Vasodilatations-Antwort. Die Messwerte, die der Berechnung zugrunde liegen, lassen sich Tabelle 11 entnehmen. Dadurch kann ausgesagt werden, wie stark die Intervention den vasodilatativen Effekt abschwächt. * = $p < 0,05$. $n=3-4$.*

entsprach einer Zunahme um 4 ± 13 %; der Vergleich der prozentualen Veränderung der Histaminantwort zwischen Kontroll- und Kaliumgruppe zeigte sich signifikant ($p < 0,05$). Somit kann anhand der signifikant stärkeren Abschwächung der Vasodilatation durch Histamingabe in der Kaliumgruppe von einer ausreichenden Endothelschädigung durch dieses Modell ausgegangen werden; es konnte in dieser VR also eine ED etabliert werden.

Tabelle 11: Perfusionsdruck (CPP) unter Kaliumperfusion mit 8,5 ml/min (VR B)

Durchschnittlicher minimaler CPP zur Baseline vor (BL_1) und nach (P_1) einminütiger Perfusion mit 800 nmol Histamin bzw. 1 μ M Natriumnitroprussid (SNP). Zudem Messung vor (BL_2) und nach (P_2) Histamin bzw. SNP im Anschluss an zehninütige flusskonstante Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer oder 60 mM Kaliumpuffer. T_1 und T_2 beschreiben die prozentuale Verminderung von BL_1 zu P_1 bzw. BL_2 zu P_2 ; Δ bezeichnet die Differenz von P_1-BL_1 bzw. P_2-BL_2 . $n=3-4$.

	BL_1 (mmHg)	P_1 (mmHg)	Δ/BL_1 = T_1 (%)	BL_2 (mmHg)	P_2 (mmHg)	Δ/BL_2 = T_2 (%)
<i>Kontrolle</i>						
Histamin	85 \pm 24	46 \pm 18	47 \pm 5	91 \pm 28	47 \pm 20	49 \pm 10
<i>Kalium</i>						
Histamin	84 \pm 9	36 \pm 3	57 \pm 2	72 \pm 1	48 \pm 7	33 \pm 10

3.3.3 Ischämie-Reperfu-sionsversuche bei flusskonstanter Perfusion mit 8,5 ml/min

Mittels eines I/R-Versuchs sollte anschließend abgeschätzt werden, ob das zuvor entwickelte Modell zur Endothelschädigung einen Einfluss auf die IS aufweist, welche die spätere Implikation in andere Studien beeinflussen könnten. Die Hauptanlage wurde dazu wieder in ein druckkonstantes Langendorff-Modell überführt, wie es bereits in Abbildung 22 als Version 3 dargestellt wurde. Dann wurde im Langendorff-Versuch zunächst das Endothel nach dem etablierten Protokoll aus Kapitel 3.3.2 geschädigt, also in einem flusskonstanten Perfusionsmodus bei 8,5 ml/min mit Kaliumpuffer perfundiert (VR 1). Dann wurde das Herz einer 33-minütigen Ischämie unterzogen und für 60 Minuten reperfundiert.

Die Ergebnisse zeigt Abbildung 26. Hierbei ist in Abbildung 26a die Aufzeichnung der hämodynamischen Variablen während der flusskonstanten Perfusion im Kontrollversuch gezeigt. Durch die Perfusion mit Kaliumpuffer bei einer Laufrate von 8,5 ml/min zeigt sich ein deutlicher Abfall von LVP, HF und CPP. Abbildung 26b zeigt die resultierenden IS als prozentualen Anteil des linken Ventrikels. Im Vergleich der IS zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe mit 34 \pm 8 % und der Kaliumgruppe mit 33 \pm 14 %. Beide Versuchsgruppen wichen jedoch in ihren IS signifikant von der Referenzgruppe mit 55 \pm 8 %, in der abgesehen von der Ischämie keinerlei Intervention vorgenommen wurde, ab.

In den hämodynamischen Variablen zeigte sich eine signifikant niedrigere HF während der Kaliumperfusion ($p < 0,001$) als in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der flusskonstanten Perfusion, da die Herzen mit Kalium im Gegensatz zu den Kontrollherzen asystol wurden (HF $176 \pm 18 \text{ min}^{-1}$ in den Kontrollversuchen vs. $0 \pm 0 \text{ min}^{-1}$ in den Kaliumversuchen). Zugleich zeigte sich auch im Vergleich von der Baselinemessung zur flusskonstanten Perfusion ein hochsignifikanter Abfall der HF in der Kontrollgruppe mit KHP ($283 \pm 13 \text{ min}^{-1}$ vs. $176 \pm 18 \text{ min}^{-1}$, $p < 0,001$). Dies könnte mit einer gemessenen Perfusionstemperatur von ca. $30 \text{ }^\circ\text{C}$ zu Beginn der flusskonstanten Temperatur zusammenhängen. Abbildung 26a zeigt zudem einen langsamen Anstieg der HF

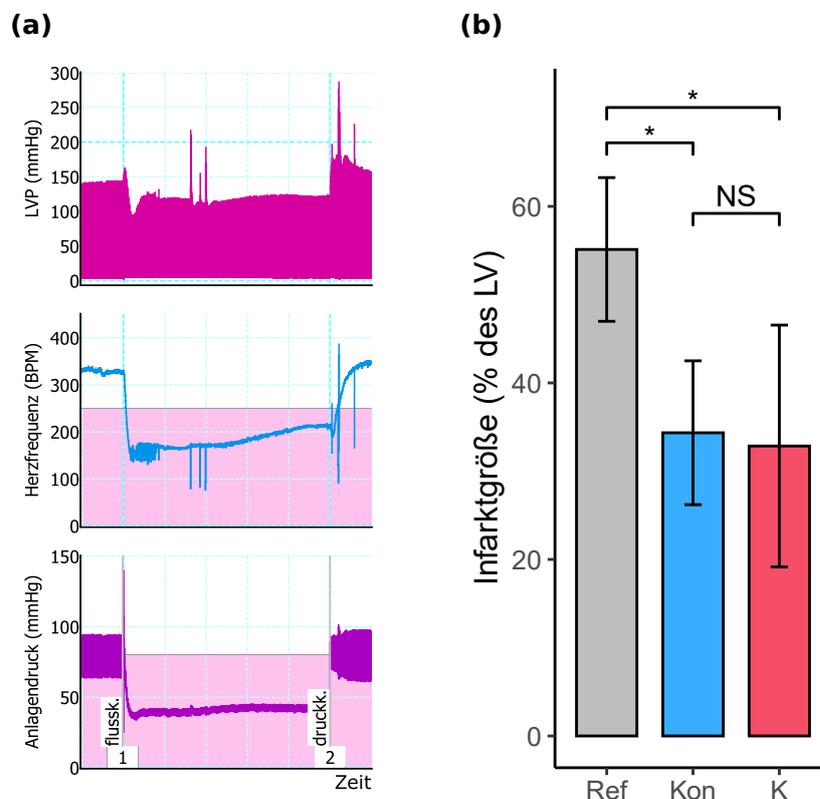


Abbildung 26: Ischämie/Reperfuionsversuche mit flusskonstanter Perfusion von 8,5 ml/min (VR 1)

(a) Exemplarische Abbildung von Herzfrequenz (HF), linksventrikulärem Druck (LVP) und Perfusionsdruck (CPP) in den Ischämie-/Reperfuionsversuchen während der zehnminütigen flusskonstanten Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHP); diese erfolgte zwischen Markierung 1 (flussk.) und Markierung 2 (druckk.). Gezeigt sind der linksventrikuläre Druck (pink, LVP in mmHg), die HF (blau, in bpm) und der CPP (lila, in mmHg). Ein horizontaler Abschnitt entspricht zwei Minuten. **(b)** Infarktgrößen in Versuchsreihe 1. Angabe der infarzierten Fläche als Prozent des linken Ventrikelmyokards (LV). Ref = Referenzgruppe, Kon = Kontrollgruppe mit flusskonstantem KHP, K = Kaliumgruppe. Angabe als $MW \pm SD$. $n=4$ pro Gruppe bzw. $n=6$ für die Referenzversuche. * = $p < 0,05$; NS = nicht signifikant.

über die zehnmünütige Perfusion, analog stieg auch die Perfusionstemperatur mit nachfließendem Puffer aus dem warmen Reservoir bis auf 37 °C an.

Außerdem konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Kaliumgruppe im LVDP zum Zeitpunkt der Kaliumperfusion gemessen werden (138±19 mmHg vs. 2±1 mmHg, $p < 0,01$). Auch zum Zeitpunkt nach der Perfusion mit Kalium (139±7 mmHg vs. 90±17 mmHg, $p < 0,001$) und vor der Ischämie (141±4 mmHg vs. 97±26 mmHg, $p < 0,05$, s. Tabelle 12) war ein Unterschied im LVDP zwischen beiden Gruppen detektierbar. Auch der LVEDP lag zur Kaliumperfusion in der Kaliumgruppe signifikant über der Kontrollgruppe, erklärbar durch

Tabelle 12: Hämodynamische Variablen: VR 1 (I/R-Versuche mit 8,5 ml/min Kaliumperfusion).

Messungen der Hämodynamik in der Kontrollgruppe (Kon) sowie der Kaliumgruppe (K+). Erfasst wurden die Herzfrequenz (HF, in min^{-1}), der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP, in mmHg), der enddiastolische linksventrikuläre Druck (LVEDP, in mmHg), die Kontraktilität ($dP/dt \text{ max}$, in $\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$), der Koronarfluss (CF, in ml/min) sowie der durchschnittliche CPP (CPP mean, in mmHg). Messwerte zu den Zeitpunkten: vor Kaliumgabe (BL), während der Kaliumperfusion (K^+), 4 Minuten nach Kaliumperfusion (Post K^+), 1 Minute vor Ischämie (Prä I), nach 30 Minuten Reperfusion (Rep 30) und nach 60 Minuten Reperfusion (Rep 60). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ K^+ vs. Kon zum gleichen Messzeitpunkt; ### = $p < 0,001$ vs. BL Kon. Angaben in $MW \pm SD$. $n=4$.

	BL	K^+	Post K^+	Prä I	Rep 30	Rep 60
<i>HF (min^{-1})</i>						
Kon	283±13	176±18###	301±28	281±36	273±39	234±35
K^+	336±56	0±0***	365±74	326±98	255±118	269±108
<i>LVDP (mmHg)</i>						
Kon	144±11	138±19	139±7	141±4	36±16	38±16
K^+	122±17	2±1***	90±17***	97±26*	35±13	38±17
<i>LVEDP (mmHg)</i>						
Kon	4±2	3±1	4±1	3±2	84±10	78±9
K^+	6±1	29±4***	6±2	7±3	88±11	80±13
<i>$dP/dt \text{ max}$ ($\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$)</i>						
Kon	5909±1331	4631±1358	6196±1659	6802±2027	1182±316	1309±581
K^+	5362±1458	702±381**	4118±844*	4373±999*	1724±332	1789±625
<i>CF ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)</i>						
Kon	14±1	9±0###	16±3	15±3	9±1	7±1
K^+	16±3	9±0	16±2	14±2	10±2	8±1
<i>CPP mean (mmHg)</i>						
Kon	80±1	44±6###	80±1	80±1	80±2	81±2
K^+	80±1	143±8***	80±2	80±1	81±0	81±0

die Asystolie ($p < 0,001$). Für den weiteren Verlauf der Versuche bis zur Ischämie zeichnete sich zwar kein signifikant geringerer LVDP ab, jedoch zeigte sich eine Tendenz zum geringeren LVDP in der Kaliumgruppe (vgl. Tabelle 12). Während der CF sich zu keinem Zeitpunkt zwischen den beiden Gruppen signifikant unterschied, zeigte die Kaliumgruppe während der Perfusion mit Kalium einen hochsignifikant höheren CPP als die Kontrollgruppe (143 ± 8 mmHg). Der CPP in der Kontrollgruppe sank zu diesem Zeitpunkt auf 44 ± 6 mmHg ($p < 0,001$); auch im Vergleich zu den zur Baseline gemessenen 80 mmHg veränderte sich CPP der Kontrollgruppe somit unter flusskonstanter Perfusion hochsignifikant ($p < 0,001$). Dies könnte mit der Verminderung des CF zum flusskonstanten Versuchszeitpunkt zusammenhängen: Der Vergleich des CF der Kontrollgruppe zwischen Baselinemessung (BL) und Messung während der flusskonstanten Perfusion (K^+) war ebenfalls hochsignifikant ($p < 0,001$). Ursächlich ist die Festlegung der Perfusion auf 8,5 ml/min, während der CF zuvor 14 ± 1 ml/min betrug.

Unter Kaliumperfusion nahm die dp/dt max signifikant ab ($p < 0,01$) und zeigte auch im Anschluss an die zehnminütige Perfusion noch geringere Werte als zuvor: Unmittelbar nach der Intervention betrug die Kontraktilität 4118 ± 844 mmHg/s, 15 Minuten später 4373 ± 999 mmHg/s. Diese Messungen zeigten sich jeweils signifikant geringer als die der Kontrollgruppe mit 6196 ± 1659 mmHg und 6802 ± 2027 mmHg ($p < 0,05$ für beide Vergleichszeitpunkte).

Die Ischämie-Kontrakturen der Kalium- und Kontrollgruppe zeigten weder in Bezug auf den Zeitpunkt, noch auf den Druck der maximalen Kontraktur Unterschiede; genauso wenig unterschied sich das Gewicht der Tiere oder der Herzen (s. Tabelle 13).

Insgesamt scheint es durch den Wechsel auf die flusskonstante Perfusion also zu einem reduzierenden Effekt auf die IS zu kommen. Auch die hämodynamische Aufzeichnung veränderte sich durch die flusskonstante Perfusion, vor allem die HF und der CPP in der Kontrollgruppe

Tabelle 13: Ischämieparameter und Tiergewicht in den Ischämie/Reperfuersionsversuchen mit 8,5 ml/min flusskonstant (VR 1)

RG = Körpergewicht der Ratten, HTG = Herztrockengewicht, I-K = Ischämie-Kontraktur (Peak in mmHg, Zeitpunkt des Peaks in min). Angaben in $MW \pm SD$. $n=4$.

	RG (g)	HTG (mg)	I-K (mmHg)	I-K (min)
Kon	293 ± 14	119 ± 7	64 ± 6	16 ± 3
K+	303 ± 29	122 ± 12	60 ± 5	14 ± 2

deuten auf eine Minderperfusion bzw. einen Temperaturabfall hin. Darüber hinaus scheint es mildere Einflüsse der Kaliumperfusion auf die hämodynamischen Variablen zu geben, die sich auch im Anschluss an die Kaliumperfusion noch zeigen. Aufgrund dieser Feststellungen war eine weitere Optimierung des Modells, die auf Minderperfusion und Temperaturmanagement abzielt, notwendig.

3.3.4 Angepasste Perfusion im flusskonstanten Modell

In einer weiteren Anpassung sollten Minderperfusion und Temperatur im flusskonstanten Versuchsteil des zuvor etablierten ED-Modells verbessert werden. Hierzu sollte statt 8,5 ml/min im flusskonstanten Versuchsteil nun ein gleichbleibender CF angestrebt werden (VR C). Dies geschah aufgrund der beschriebenen hämodynamischen Observationen in den I/R-Versuchen in VR 1, die als Zeichen einer Minderperfusion gedeutet wurden, und sollte zu stabileren hämodynamischen Variablen über den Versuch führen. Das verwendete Langendorff-Modell entsprach wieder Abbildung 24 bzw. Version 4; der ganze Versuch wurde also erneut flusskonstant gestaltet. So konnten wieder verlässliche Aussagen über die Vasodilatation nach Gabe von Histamin oder SNP anhand der CPP-Messung getroffen werden. Nach einer Stabilisierungsphase wurden Histamin und SNP perfundiert, anschließend über zehn Minuten flusskonstanter Kaliumpuffer (bzw. KHP als Kontrolle) verabreicht und zuletzt erneut Histamin und SNP perfundiert. Die zehnmütige Perfusion wurde so eingestellt, dass ihre Laufrate dem CF zur Baseline des Versuchs entsprach.

Wie in Tabelle 14 zu sehen ist, fiel der CPP in der Kaliumgruppe zur Baselinemessung (BL_1 zu P_1) unter Histamin deutlich ab, nämlich um 47 ± 7 % (von ursprünglich 79 ± 5 mmHg auf 42 ± 6 mmHg); nach Kaliumgabe kam es lediglich zu einer Abnahme von 28 ± 9 % (von 78 ± 5 mmHg auf 57 ± 8 mmHg). In der Kontrollgruppe zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Zeitpunkten der Histaminperfusion: Vor Kontrollintervention sank der CPP um 46 ± 11 % (von 78 ± 12 mmHg auf 41 ± 5 mmHg); im Anschluss an die Kontrollintervention um 43 ± 11 % (von 79 ± 12 mmHg auf 44 ± 6 mmHg, (s. Tabelle 14)). Der Kaliumpuffer verminderte die Vasodilatation durch Histamin um 41 ± 15 %, während die Verminderung in der Kontrollgruppe 6 ± 6 % betrug. Die beiden Gruppen unterschieden sich in dieser Verminderung ihrer relativen Antwort auf Histamin hochsignifikant voneinander ($p < 0,001$, s. Abbildung 27).

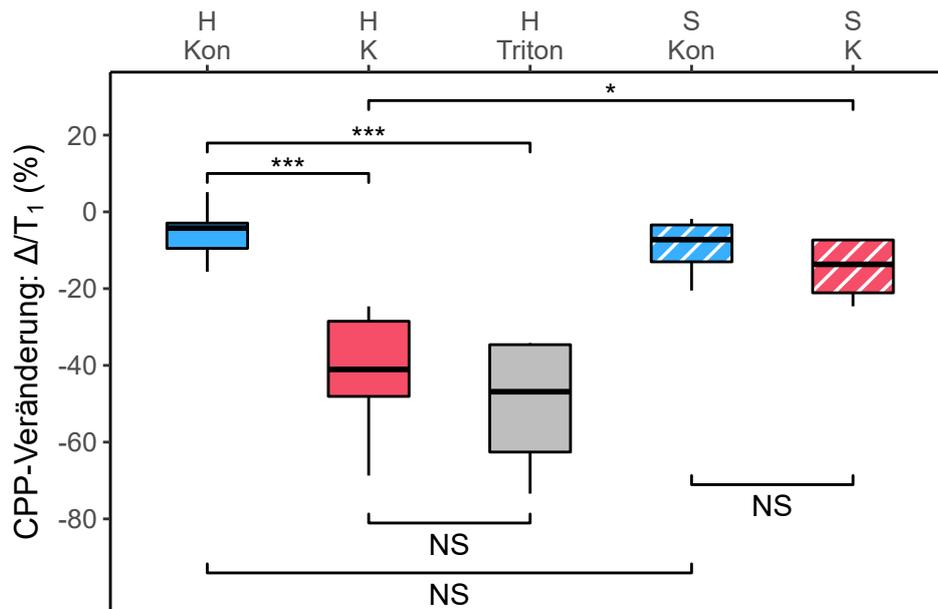


Abbildung 27: Perfusionsdruckveränderungen unter Histamin und Natriumnitroprussid (SNP) nach Endothelschädigung mittels Kalium oder Triton (VR C)

Darstellung der CPP-Veränderung durch Gabe von 800 nmol Histamin (H) oder 1 μ M SNP (S) unter verschiedenen Interventionen. Δ bezeichnet die Differenz aus $T_1 - T_2$ (vgl. Tabelle 14). Der prozentuale Wert, den die Abbildung zeigt, vergleicht somit die Messung vor (T_1) und nach (T_2) Intervention mittels KHP (Kon), 60 mM Kaliumpuffer (K) oder 1 % Triton, indem die Differenz zwischen den Messungen T_1 und T_2 als prozentualer Anteil des Wertes T_1 berechnet wurde ($(T_1 - T_2)/T_1$). Resultierend entstand also eine prozentuale Verminderung der Vasodilatations-Antwort. Die Messwerte, die der Berechnung zugrunde liegen, lassen sich Tabelle 14 entnehmen. Dadurch kann ausgesagt werden, wie stark die Intervention den vasodilatativen Effekt abschwächt. $n=4$ (SNP Kalium/Kontrolle sowie Histamin Triton) bzw. $n=7$ (Histamin Kalium/Kontrolle). * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$; NS = nicht signifikant.

Die Vasodilatation nach Perfusion von SNP veränderte sich sowohl in der Kaliumgruppe als auch in der Kontrollgruppe kaum (s. Tabelle 14). In der Kontrollgruppe lag sie zur ersten Messung bei 49 ± 10 % (von 82 ± 17 auf 41 ± 5 mmHg); nach der zehnminütigen Kontrollintervention betrug sie noch 44 ± 11 % (von 84 ± 17 auf 45 ± 4 mmHg). Die Kaliumgruppe zeigte zu Beginn des Versuches eine Vasodilatation von 41 ± 13 % (von 78 ± 12 auf 45 ± 8 mmHg), nach Perfusion mit Kaliumpuffer lag diese weiterhin bei 36 ± 13 % (von 79 ± 10 auf 50 ± 7 mmHg). Zusammenfassend nahm in der Kontrollgruppe die Vasodilatation um 9 ± 7 % ab, in der Kaliumgruppe um 15 ± 8 %; es gab hier keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen (s. Abbildung 27). Jedoch gab es einen signifikanten Unterschied in der Veränderung der Vasodilatation zwischen Histamin und SNP in der Kaliumgruppe ($p < 0,05$), der auf eine alleinige Schädigung des Endothels ohne Funktionsbeeinträchtigung der glatten Mus-

Tabelle 14: Perfusionsdruck (CPP) unter Kaliumperfusion mit angepasster Perfusion (VR C)

Durchschnittlicher minimaler CPP zur Baseline vor (BL_1) und nach (P_1) einminütiger Perfusion mit 800 nmol Histamin bzw. 1 μ M Natriumnitroprussid (SNP). Zudem Messung vor (BL_2) und nach (P_2) Histamin bzw. SNP im Anschluss an zehnminütige flusskonstante Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer oder 60 mM Kaliumpuffer bzw. mit einem Bolus von 1 % Triton X-100. T_1 und T_2 beschreiben die prozentuale Verminderung von BL_1 zu P_1 bzw. BL_2 zu P_2 ; Δ bezeichnet die Differenz von P_1-BL_1 bzw. P_2-BL_2 . Angaben in $MW \pm SD$. $n=4$ (SNP) bzw. $n=7$ (Histamin).

	BL_1 (mmHg)	P_1 (mmHg)	Δ/BL_1 = T_1 (%)	BL_2 (mmHg)	P_2 (mmHg)	Δ/BL_2 = T_2 (%)
<i>Kontrolle</i>						
Histamin	78 \pm 12	41 \pm 5	46 \pm 11	79 \pm 12	44 \pm 6	43 \pm 11
SNP	82 \pm 17	41 \pm 5	49 \pm 10	84 \pm 17	45 \pm 4	44 \pm 11
<i>Kalium</i>						
Histamin	79 \pm 5	42 \pm 6	47 \pm 7	78 \pm 5	57 \pm 8	28 \pm 9
SNP	78 \pm 12	45 \pm 8	41 \pm 13	79 \pm 10	50 \pm 7	36 \pm 13
<i>Triton</i>						
Histamin	86 \pm 26	50 \pm 18	43 \pm 3	104 \pm 27	81 \pm 18	21 \pm 6

kulatur hindeutet (s. Abbildung 27).

Als Positivkontrolle einer ED dienten Versuche mit 1 % Triton, in denen ebenfalls die Perfusion von 800 nmol Histamin vor und nach Triton untersucht wurde. Hier zeigte sich zur Baselinemessung eine CPP-Verminderung um 43 \pm 3 % (von 86 \pm 26 mmHg auf 50 \pm 18 mmHg); nach Tritongabe waren es lediglich 21 \pm 6 % (von 104 \pm 27 mmHg auf 81 \pm 18 mmHg). Somit verminderte Triton den Effekt von Histamin um 50 \pm 17 %. Dieser Wert unterschied sich hochsignifikant von dem in der Kontrollgruppe unter Histamin (6 \pm 6 % in der Kontrollgruppe vs. 50 \pm 17 % in der Tritongruppe, $p < 0,001$), jedoch nicht von dem in der Kaliumgruppe (41 \pm 15 %).

Schlussfolgernd lässt sich damit feststellen, dass in VR C eine hochsignifikante Endothelschädigung durch die Kaliumperfusion erreicht werden konnte. Das Ausmaß dieser Schädigung unterschied sich nicht von einer Schädigung durch Triton. Die endothelunabhängige Vasodilatation, die durch Gabe von SNP gemessen wurde, blieb durch die Kaliumperfusion hingegen unverändert, was für eine intakte Gefäßmuskulatur spricht.

3.4 Ischämie-Reperfusionversuche zur Infarktgrößenbestimmung mit angepasstem Koronarfluss

3.4.1 Ischämie-Reperfusionversuche mit angepasstem Fluss

Zur Überprüfung, ob die flusskonstante Perfusion mit angepasstem CF (VR C) weiterhin einen Einfluss auf die IS hat, wurde das zuvor etablierte Protokoll zur Kaliumperfusion aus Kapitel 3.3.4 verwendet und in einen I/R-Versuch integriert. Die resultierende Eliminierung der Minderperfusion sollte eine Annäherung der IS an gewöhnliche Kontrollversuche erreichen. Die Hauptanlage wurde zur Durchführung der I/R-Versuche wieder

Tabelle 15: Hämodynamische Variablen: VR 2 (I/R-Versuche mit adaptierter flusskonstanter Perfusion und verbesserter Wärmezirkulation)

Messungen der Hämodynamik in der Kontrollgruppe (Kon) sowie der Kaliumgruppe (K+). Erfasst wurden die Herzfrequenz (HF, in min^{-1}), der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP, in mmHg), der enddiastolische linksventrikuläre Druck (LVEDP, in mmHg), die Kontraktilität ($dP/dt \text{ max}$, in $\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$), der Koronarfluss (CF, in ml/min) sowie der durchschnittliche CPP (CPP mean, in mmHg). Messwerte zu den Zeitpunkten: vor Kaliumgabe (BL), während der Kaliumperfusion (K^+), 4 Minuten nach Kaliumperfusion (Post K^+), 1 Minute vor Ischämie (Prä I), nach 30 Minuten Reperfusion (Rep 30) und nach 60 Minuten Reperfusion (Rep 60). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ vs. Kon. Angaben in $MW \pm SD$. $n=4-5$.

	BL	K^+	Post K^+	Prä I	Rep 30	Rep 60
<i>HF (min^{-1})</i>						
Kon	302±36	249±25	292±35	280±48	284±145	282±53
K+	305±45	0±0***	299±26	269±34	234±61	239±49
<i>LVDP (mmHg)</i>						
Kon	126±23	157±11	135±20	125±20	18±10	26±14
K+	119±40	3±1***	113±39	95±43	41±24	42±17
<i>LVEDP (mmHg)</i>						
Kon	4±1	6±1	6±3	8±5	104±10	90±8
K+	4±2	42±17*	4±2	6±3	75±23	68±19
<i>$dP/dt \text{ max}$ ($\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$)</i>						
Kon	4493±605	5070±275	5038±517	4621±686	899±332	1515±1527
K+	4553±828	489±247***	4115±1085	3626±1148	1314±607	1493±523
<i>CF ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)</i>						
Kon	13±1	13±1	14±2	13±3	7±1	7±1
K+	13±2	13±2	14±4	12±3	8±2	6±1
<i>CPP (mmHg)</i>						
Kon	80±2	77±12	80±2	80±2	79±1	80±1
K+	80±1	164±24**	79±1	80±1	80±1	80±1

in ein druckkonstantes Langendorff-Modell überführt, wie es bereits in Abbildung 22 als Version 3 dargestellt wurde. Zudem wurde hier die in Kapitel 2.4.3 beschriebene Pufferzirkulation des Kaliumpuffers etabliert, um Oxygenierung und Temperaturmanagement zu verbessern. Dann wurde im Langendorff-Versuch zunächst das Endothel nach dem etablierten Protokoll aus Kapitel 3.3.4 geschädigt, bevor das Herz einer 33-minütigen Ischämie unterzogen und für 60 Minuten reperfundiert wurde (VR 2).

Die hämodynamischen Variablen zeigten sich in diesem Modus der flusskonstanten Perfusion stabiler als zuvor in VR 1; die HF und der CPP sanken in der Kontrollgruppe unter dem flusskonstanten KHP nicht

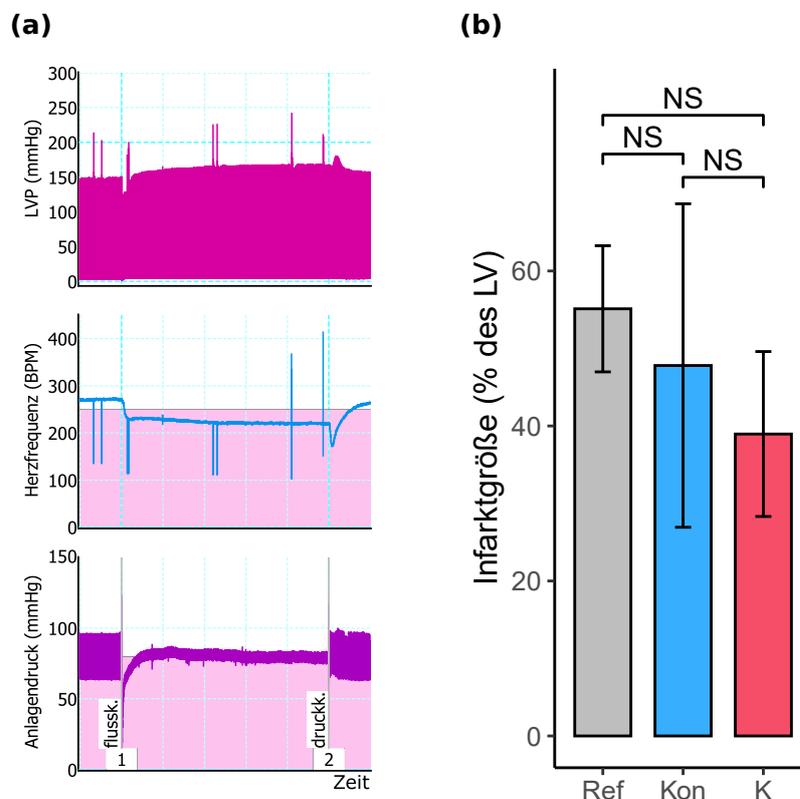


Abbildung 28: Ischämie/Reperfusionsexperimente mit flusskonstanter Perfusion mit angepasstem Fluss (VR 2)

(a) Exemplarische Abbildung von Herzfrequenz (HF), linksventrikulärem Druck (LVP) und Perfusionsdruck (CPP) in den Ischämie-/Reperfusionsexperimenten während der zehnteiligen flusskonstanten Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHP); diese erfolgte zwischen Markierung 1 (flussk.) und Markierung 2 (druckk.). Gezeigt sind der linksventrikuläre Druck (pink, LVP in mmHg), die HF (blau, in bpm) und der CPP (lila, in mmHg). Ein horizontaler Abschnitt entspricht zwei Minuten. **(b)** Infarktgrößen in Versuchsreihe 2. Angabe der infarzierten Fläche als Prozent des linken Ventrikelmyokards (LV). Ref = Referenzgruppe, Kon = Kontrollgruppe mit flusskonstantem KHP, K = Kaliumgruppe. Angabe als $MW \pm SD$. $n=4-5$ pro Gruppe bzw. $n=6$ für die Referenzversuche. NS = nicht signifikant.

mehr signifikant ab (s. Tabelle 15). In Abbildung 28a ist eine exemplarische Aufzeichnung der hämodynamischen Variablen in VR 2 dargestellt, in der diese Verbesserung ebenfalls sichtbar wird. Zwar war während der flusskonstanten Perfusion mit KHP in der Kontrollgruppe noch immer ein Abfall der HF sichtbar (von $302 \pm 36 \text{ min}^{-1}$ zur Baseline auf $249 \pm 25 \text{ min}^{-1}$ zur Kaliumperfusion), jedoch war dieser im Gegensatz zu VR 1 nicht mehr signifikant. Auch der CPP veränderte sich zwischen Baselinemessung in der Kontrollgruppe und flusskonstanter KHP-Perfusion nicht; genauso wenig gab es in den anderen untersuchten hämodynamischen Parametern der Kontrollgruppe einen Unterschied zwischen Baselinemessung und flusskonstanter Perfusion.

In der Kaliumgruppe zeigte sich während der Perfusion mit hochmolarem Kaliumpuffer auch in VR 2 ein Abfall der Herzfrequenz auf $0 \pm 0 \text{ min}^{-1}$ und ein Absinken des LVDP auf $3 \pm 1 \text{ mmHg}$, was sich durch die Asystolie unter dem Kaliumpuffer begründen lässt. Beide Parameter unterschieden sich hochsignifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,001$). Zum Zeitpunkt der Kaliumperfusion lag der LVEDP der Kaliumgruppe signifikant über dem der Kontrollgruppe ($42 \pm 17 \text{ mmHg}$ vs. $6 \pm 1 \text{ mmHg}$, $p < 0,01$).

Ein ebenfalls hochsignifikanter Unterschied konnte erneut beim CPP zum Zeitpunkt der Kaliumperfusion beobachtet werden. In der Kontrollgruppe betrug der CPP $77 \pm 12 \text{ mmHg}$, in der Kaliumgruppe lag er bei $164 \pm 24 \text{ mmHg}$ ($p < 0,001$). In VR 2 zeigte sich im Anschluss an die Kaliumperfusion kein signifikant veränderter LVDP, lediglich eine leicht sinkende Tendenz blieb sichtbar. Eine umgekehrte Tendenz zeigte sich im LVDP während der Reperfusion; hier bauten die Kaliumherzen einen etwas höheren Druck auf. Diese Tendenz konnte in VR 1 (Tabelle 12 bzw. Kapitel 3.3.3) noch nicht gesehen werden. Darüber hinaus lag in VR 2 nur noch zum Zeitpunkt der Kaliumperfusion die Kontraktilität der Kaliumgruppe ($489 \pm 247 \text{ mmHg/s}$) signifikant unter dem der Kontrollgrup-

Tabelle 16: Ischämieparameter und Tiergewicht der Ischämie/Reperfusionsversuche mit angepasstem Fluss (VR 2)

*RG = Rattengewicht, HTG = Herztrockengewicht, I-K = Ischämie-Kontraktur (Peak in mmHg, Zeitpunkt des Peaks in min). ** = $p < 0,01$. Angaben in $MW \pm SD$. $n=4-5$.*

	RG (g)	HTG (mg)	I-K (mmHg)	I-K (min)
Kon	293 ± 27	115 ± 6	72 ± 5	14 ± 2
K+	284 ± 21	115 ± 7	$53 \pm 8^{**}$	15 ± 2

pe (5070 ± 275 mmHg/s). Zudem zeigte die Kaliumgruppe, wie in Tabelle 16 zu sehen, eine signifikant verminderte Ischämie-Kontraktur im Vergleich zur Kontrollgruppe (53 ± 8 mmHg vs. 72 ± 5 mmHg, $p < 0,01$). Die Tierdaten (Gewicht der Ratten und Herztrockengewicht) unterschieden sich nicht voneinander.

In der Auswertung der IS ergaben sich auch bei gleichbleibender Perfusion im flusskonstanten Versuchsteil keine signifikanten Unterschiede zwischen den IS der beiden Versuchsgruppen (s. Abbildung 28b): In der Kontrollgruppe von VR 2 betrug die IS 48 ± 21 %, in der Kaliumgruppe 39 ± 11 %. Ebenso wenig signifikant war jeweils der Vergleich zur Referenzgruppe mit 55 ± 8 %, sodass in VR 2 von einer Annäherung an gängige IS in Kontrollversuchen ausgegangen werden kann. Dies spricht für eine Verringerung des reduzierenden Effekts auf IS, was sich auch an etwas größeren IS als in VR 1 zeigt. Jedoch zeigte sich vor allem in der Kontrollgruppe auch eine sehr hohe Standardabweichung von 21 %, was den sichtbaren Effekt beeinflussen könnte.

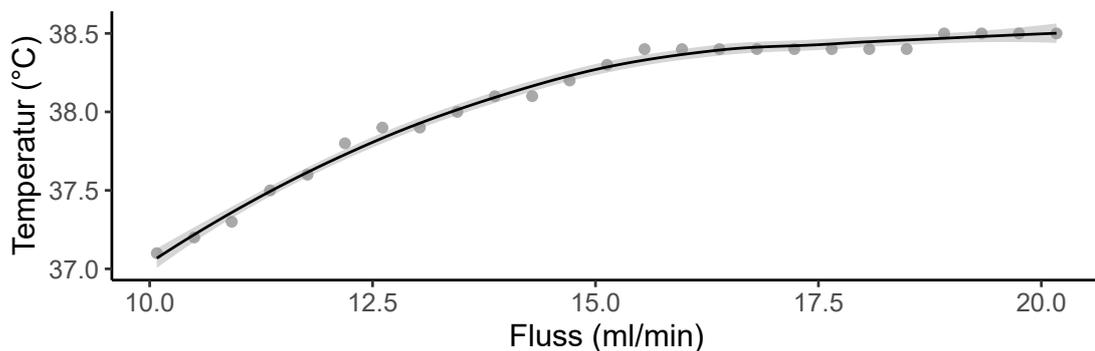
3.4.2 Anpassung der Wärmeverhältnisse

Als Nächstes wurden die Wärmeverhältnisse im Versuch optimiert, da vermutet wurde, dass ein Teil der IS-reduzierenden Effekte auf eine Hypothermie zurückzuführen ist. Da die Temperatur des Puffers im flusskonstanten Aufbau vom CF abhängt, konnte zuvor keine stabile Temperatur um $37,5$ °C erhalten werden; zudem benötigten die niedrigeren Flüsse im flusskonstanten Versuchsteil wärmere Einstellungen am Wärmebad als der konstant zirkulierende KHP in der druckkonstanten Hauptanlage. Um eine weitere Annäherung der IS der Versuchsgruppen an die IS der Referenzversuche anzustreben, wurden also weitere Optimierungen des Modells vorgenommen, um dessen IS-reduzierende Effekte zu verringern bzw. zu eliminieren.

Diese Veränderungen umfassten die Installation eines zweiten Wärmebads, das den Kaliumpuffer im Reservoir auf höhere Temperaturen als zuvor erwärmte. Zunächst sollte ein möglichst genauer Eindruck über das Verhalten der Puffertemperatur erlangt werden, um daraus Rückschlüsse auf die benötigte Puffertemperatur zu ziehen. Dazu wurde bestimmt, wie sich die Temperatur entwickelte, wenn das Wärmebad auf 42 °C eingestellt wurde und der Fluss pro Minute anstieg. Diese Versuche zeigten eine hochsignifikante Korrelation ($\rho=0,98$; $p < 0,001$), die in Abbildung 29a abgebildet ist; je geringer der CF pro Minute, desto

niedriger war die Temperatur des Perfusats. Darauf aufbauend wurde ermittelt, welche Wärmebadtemperatur abhängig vom jeweiligen CF notwendig war, um eine konstante, physiologische Puffertemperatur von 37,5 °C ($\pm 0,1$ °C) zu gewährleisten. Hierzu wurde die Temperatur des Puffers knapp oberhalb der Kanüle für das Herz gemessen und die Wärmebadtemperatur so lange angepasst, bis die Messung im Zielbereich lag. Es bestätigte sich die zuvor festgestellte, hochsignifikante Korrelation von CF und Temperatur ($\rho = -0,98$; $p < 0,001$). Die Ergebnisse sind in Abbildung 29b dargestellt. Bei niedrigerem CF waren deutlich höhere Temperaturen notwendig, um 37,5 °C am Herzen zu erreichen. Mittels dieser Messungen wurde dann, abhängig vom CF zum Versuchsbeginn, die optimale Temperatur des Wärmebads für die jeweilige Perforationsrate eines Versuchs eingestellt. Daraus ergab sich eine deutlich bessere Temperaturkontrolle und eine Vermeidung von Hypothermien. Um eine weitere Optimierung der IS zu erreichen, wurden die neuen Ergebnisse zur Wärmeoptimierung anschließend in den I/R-Versuch im-

(a)



(b)

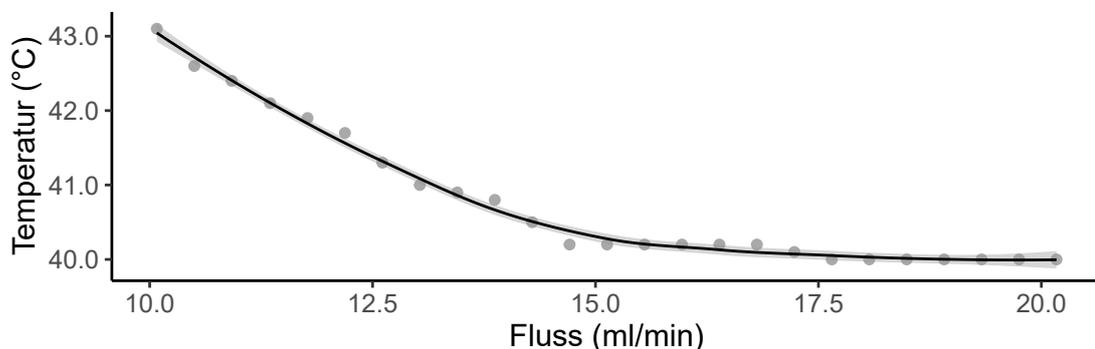


Abbildung 29: Einstellungen des Wärmebads

(a) Temperatur des Perfusats in Abhängigkeit des Flusses pro Minute.

(b) Wärmebadtemperatur, die in Abhängigkeit vom Fluss pro Minute benötigt wird, um das Perfusat bei 37 °C zu halten.

Korrelationsdarstellung mittels Locally Estimated Scatterplot Smoothing (LOESS), die graue Fläche stellt den Standardfehler dar. $n=25$.

pliziert. Darauf aufbauend wurde das Protokoll der ED-Methodik im I/R-Versuch bzw. der Anlagenaufbau also erneut leicht verändert, um die Temperatur konstant zu halten (VR 3).

Nach dieser Optimierung der Temperatur im Versuch kam es zu einer weiteren Verbesserung der HF und des LVDP im flusskonstanten Versuchsteil. Tabelle 17 zeigt die hämodynamischen Variablen von VR 3, während Abbildung 30a eine exemplarische Aufzeichnung aus VR 3 zeigt, um die konstanteren hämodynamischen Parameter zu verdeutlichen. HF und LVDP blieben in dieser VR während der flusskonstanten Perfusion mit KHP auf nahezu identischem Niveau. Es zeigten sich in der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Baselinemessung mit der Messung zur flusskonstanten Perfusion; somit

Tabelle 17: Hämodynamische Variablen: VR 3 (I/R-Versuche mit adaptierter flusskonstanter Perfusion und zweitem Wärmebad).

Messungen der Hämodynamik in der Kontrollgruppe (Kon) sowie der Kaliumgruppe (K+). Erfasst wurden die Herzfrequenz (HF, in min^{-1}), der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP, in mmHg), der enddiastolische linksventrikuläre Druck (LVEDP, in mmHg), die Kontraktilität ($dP/dt \text{ max}$, in $\text{mmHg}\cdot\text{s}^{-1}$), der Koronarfluss (CF, in ml/min) sowie der durchschnittliche CPP (CPP mean, in mmHg). Messwerte zu den Zeitpunkten: vor Kaliumgabe (BL), während der Kaliumperfusion (K^+), 4 Minuten nach Kaliumperfusion (Post K^+), 1 Minute vor Ischämie (Prä I), nach 30 Minuten Reperfusion (Rep 30) und nach 60 Minuten Reperfusion (Rep 60). * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ vs. Kon. Angaben in $\text{MW}\pm\text{SD}$. $n=3-4$.

	BL	K^+	Post K^+	Prä I	Rep 30	Rep 60
<i>HF (min^{-1})</i>						
Kon	304±38	291±29	299±26	301±41	216±70	231±36
K+	279±31	0±0***	268±124	280±34	244±31	245±48
<i>LVDP (mmHg)</i>						
Kon	139±6	139±8	136±11	129±10	29±7	33±7
K+	122±16	3±1***	96±54	102±18	57±36	61±28
<i>LVEDP (mmHg)</i>						
Kon	2±0	2±0	2±0	2±0	91±18	83±16
K+	4±1*	50±8**	15±22	4±1	71±25	66±19
<i>$dP/dt \text{ max}$ (mmHg)</i>						
Kon	4916±139	4705±139	4958±445	4579±304	1177±512	1345±409
K+	4156±500	441±162***	3997±972	3652±664	1824±1161	2202±945
<i>CF ($\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$)</i>						
Kon	16±2	16±2	16±2	15±2	8±1	7±1
K+	15±3	15±3	17±2	14±2	10±1	9±1
<i>CPP (mmHg)</i>						
Kon	80±0	69±5	80±0	80±0	80±0	80±0
K+	80±0	156±11***	80±0	80±0	80±0	80±0

konnte der Einfluss der flusskonstanten Perfusion auf die hämodynamischen Variablen weiter minimiert werden.

Weiterhin gab es während der Kaliumperfusion einen signifikanten Unterschied in der HF zwischen Kalium- und Kontrollgruppe (0 ± 0 mmHg in der Kaliumgruppe vs. 291 ± 29 mmHg in der Kontrollgruppe), jedoch begründet dieser sich durch die kaliumbedingte Asystolie. Ebenfalls signifikant unterschiedlich war der Unterschied im LVDP zu diesem Zeitpunkt; während mit Kalium perfundierte Herzen nur noch 3 ± 1 mmHg LVDP aufbauten, zeigte die Kontrollgruppe einen zum Vorwert nahezu unveränderten Druckaufbau von 139 ± 8 mmHg (s. Tabelle 17). Auch in VR 3 lag der LVEDP zur Kaliumperfusion hochsignifikant über dem der

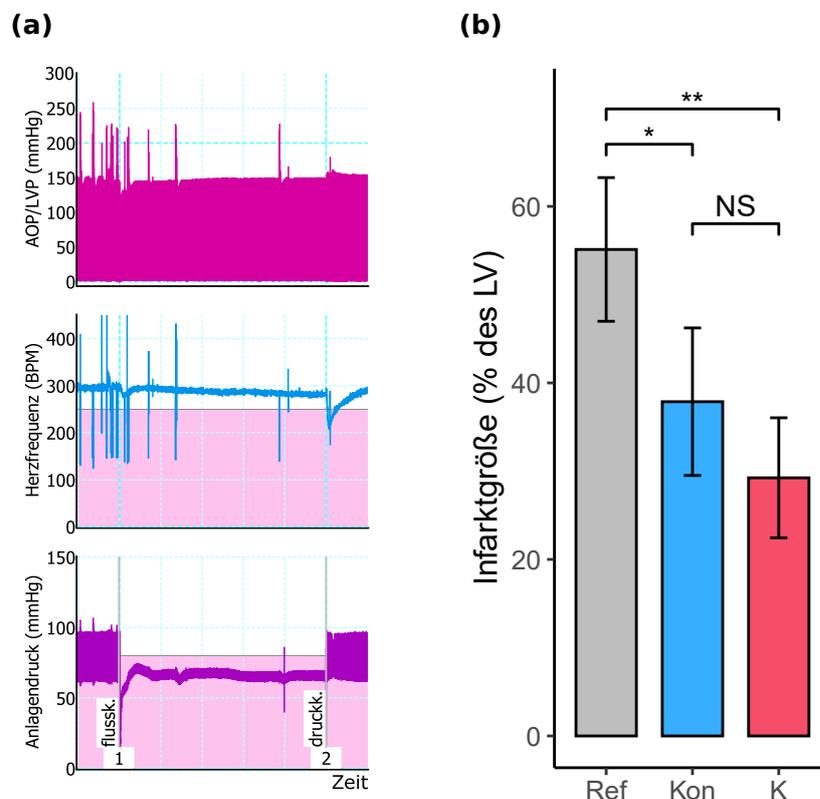


Abbildung 30: Ischämie/Reperfusionsversuche mit angepasster flusskonstanter Perfusion und verbessertem Wärmemanagement (VR 3)

(a) Exemplarische Abbildung von Herzfrequenz (HF), linksventrikulärem Druck (LVP) und Perfusionsdruck (CPP) in den Ischämie-/Reperfusionsversuchen während der zehnminütigen flusskonstanten Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer (KHP); diese erfolgte zwischen Markierung 1 (flussk.) und Markierung 2 (druckk.). Gezeigt sind der linksventrikuläre Druck (pink, LVP in mmHg), die HF (blau, in bpm) und der CPP (lila, in mmHg). Ein horizontaler Abschnitt entspricht zwei Minuten. **(b)** Infarktgrößen in Versuchsreihe 1. Angabe der infarzierten Fläche als Prozent des linken Ventrikelmyokards (LV). Ref = Referenzgruppe, Kon = Kontrollgruppe mit flusskonstantem KHP, K = Kaliumgruppe. Angabe als MW \pm SD. n=3-4 pro Gruppe bzw. n=6 für die Referenzversuche. * = p < 0,05; ** = p < 0,01; NS = nicht signifikant.

Kontrollgruppe ($p < 0,001$).

Ebenso lag in VR 3 lag die Kontraktilität zum Zeitpunkt der Kaliumperfusion mit 441 ± 162 mmHg/s signifikant unter jener der Kontrollgruppe (4705 ± 139 mmHg/s, $p < 0,001$). VR 3 zeigte zwischen Kontroll- und Kaliumgruppe keine Unterschiede in der Ischämie-Kontraktur (s. Tabelle 18).

Außerdem ergab sich nach wie vor kein signifikanter Unterschied zwischen den IS in der Kontroll- und Kaliumgruppe. Die Kontrollgruppe zeigte eine Infarzierung von 38 ± 8 %; die Kaliumgruppe von 29 ± 7 %. Beide Gruppen unterschieden sich signifikant von der Referenzgruppe mit 55 ± 8 % ($p < 0,05$ für Kontrolle vs. Referenz, $p < 0,01$ für Kalium vs. Referenz; s. Abbildung 30b).

Die Optimierung des Modells konnte somit zu einer weiteren Verbesserung der hämodynamischen Variablen während der flusskonstanten Perfusion beitragen; jedoch scheint weiterhin ein reduzierender Effekt auf die IS durch das Modell zu bestehen. Diese ist in Abbildung 30b sowohl unter Kaliumpuffer als auch unter KHP sichtbar. Somit scheint sie nicht vom Perfusat abzuhängen. Auffällig ist, dass die Kaliumgruppe (in VR 3 sowie auch in VR 1 und 2) einen Trend zu geringeren IS als die Kontrollgruppe zeigte. Dieser Trend war jedoch in keiner VR signifikant. In den Daten zum Tiergewicht und Herztrockengewicht konnten keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (s. Tabelle 18).

Tabelle 18: Ischämieparameter und Tiergewicht der Ischämie/Reperfuionsversuche mit angepasstem Fluss und verbessertem Wärmemanagement (VR 3)

*RG = Rattengewicht, HTG = Herztrockengewicht, I-K = Ischämie-Kontraktur (Peak in mmHg, Zeitpunkt des Peaks in min). ** = $p < 0,01$. Angaben in $MW \pm SD$. $n=3-4$.*

	RG (g)	HTG (mg)	I-K (mmHg)	I-K (min)
Kon	323 ± 6	129 ± 2	76 ± 7	12 ± 1
K+	326 ± 9	126 ± 5	68 ± 10	14 ± 2

Zusammenfassend zeigten sich trotz Verwendung dieses optimierten Protokolls und der weiteren Anpassungen im Anlagenaufbau noch immer verminderte IS durch die Induktion der ED. Es gelang also nicht vollkommen, die protektiven Effekte des Modells zu eliminieren. Die Aufzeichnung der hämodynamischen Variablen verdeutlicht jedoch, dass die flusskonstante Perfusion insgesamt optimiert werden konnte.

3.5 Zellschädigung durch Kaliumpuffer und Triton

Zur Überprüfung, ob eine hochmolare Kaliumlösung auf zellulärer Ebene eine Schädigung hervorruft, wurde in einem Zellkulturexperiment ein Vergleich zur Gabe von Triton hergestellt. Damit sollte geprüft werden, ob die ED durch Kalium auf zellulärer Ebene schonender als die durch Triton ist. Zur Beurteilung einer solchen zellulären Schädigung durch 1 % Triton und 60 mM Kaliumpuffer wurde die Messung der Zellintegrität mittels TEER von Caco-2-Zellen, einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie, in einem Kontrollmedium, mit 60 mM Kalium und mit 1 % Triton durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 31.

Zur Baseline konnte in allen drei Versuchsgruppen ein TEER von über 500 Ωcm^2 gemessen werden, der auf eine intakte Einzellschicht hinweist. Nach 15 Minuten Inkubation in 1 % Triton sank der gemessene Flächenwiderstand auf $10\pm 0 \Omega\text{cm}^2$, nach zwei Stunden auf $11\pm 1 \Omega\text{cm}^2$. Unter hochmolarem Kalium sank der TEER lediglich auf $420\pm 2 \Omega\text{cm}^2$ nach 15 Minuten bzw. $423\pm 11 \Omega\text{cm}^2$ nach zwei Stunden Inkubation. Im Kontrollmedium betrug der gemessene Widerstand nach 15 Minuten $533 \Omega\text{cm}^2$ und nach zwei Stunden $534 \Omega\text{cm}^2$.

Es zeigte sich also eine vollständige Abnahme der Zellintegrität unter 1 % Triton, welche mit einer vollständigen Zerstörung der Zellschicht gleichgesetzt werden kann. Die sehr geringe Verminderung der Zellintegrität unter 60 mM Kalium spricht hingegen für eine intakte Zell-

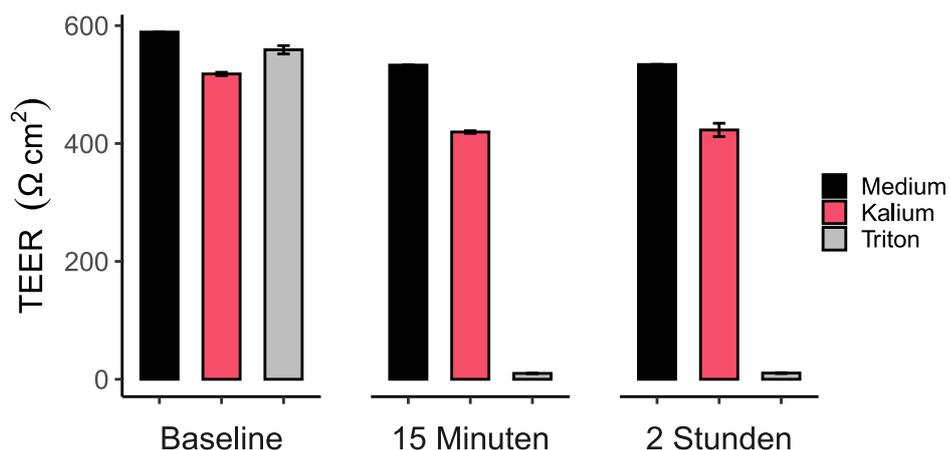


Abbildung 31: Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) unter Kalium und Triton

Messung des TEER in der Zellkultur an Caco-2-Zellen zur Beurteilung der zellulären Schädigung durch 60 mM Kaliumlösung und 1 % Tritonlösung. Messung zum Versuchsbeginn (Baseline), nach 15 Minuten und nach zwei Stunden. Angaben in $MW\pm SD$. $n=1$ (Medium) bzw. $n=2$ (Kalium und Triton).

schicht. Daraus lässt sich ableiten, dass lediglich Triton massive zelluläre Schäden induziert, während hochmolares Kalium eine zellschonendere Variante der ED darstellt.

4 Diskussion

4.1 Ziele der Arbeit

4.1.1 Physiologische Endothelfunktion

Als Grundlage zur Beurteilung einer ED sollte zunächst die Endothelphysiologie untersucht werden. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die physiologische Endothelfunktion in Bezug auf Vasodilatation und Vasokonstriktion im Langendorff-Versuch adäquat darstellen lässt. Histamin, das zur endothelvermittelten Vasodilatation führt, bewirkte im flusskonstanten Versuch in einer Konzentration von 800 nmol Histamin einen messbaren Effekt im Sinne einer Abnahme des CPP um 25 ± 5 %. Genau wie die endothelvermittelten Effekte, ließ sich auch die endothelunabhängige Vasodilatation mittels $1 \mu\text{M}$ SNP durch die CPP-Messung darstellen und bewegte sich im gesunden Herzen durch beide Substanzen auf einem ähnlichen Niveau. Unter Zugabe von $100 \mu\text{M}$ L-Name, einem eNOS-Inhibitor, nahm die endothelvermittelte Vasodilatation durch Histamin signifikant ab, während die endothelunabhängige Vasodilatation durch SNP unbeeinträchtigt blieb. Es bestätigte sich also, dass die beiden Substanzen zur Darstellung von endothelabhängiger und -unabhängiger Vasodilatation geeignet sind.

4.1.2 Endothelschädigung

Aufbauend auf die physiologische Endothelfunktion sollte anschließend eine ED im Langendorff-Versuch induziert werden. Die Perfusion von hochmolarem Kaliumpuffer führte in den vorliegenden Versuchen zu einer signifikanten Endothelschädigung, die an der abgeschwächten Reaktion des CPP auf Histamin nachvollziehbar wurde. Die glatte Gefäßmuskulatur wurde dabei nicht relevant beeinträchtigt, was sich aus der unveränderten Reaktion auf SNP als endothelunabhängigen Vasodilatator ableiten lässt. Der Schädigungsgrad bewegte sich auf einem vergleichbaren Niveau wie eine durch Triton induzierte ED; im Vergleich der Abschwächung der Histamin-induzierten Vasodilatation zwischen 60 mM Kalium und 1 % Triton gab es keinen signifikanten Unterschied. Zusammenfassend wurde also eine reproduzierbare ED induziert. Diese setzt neuartige Ansätze im Langendorff-Modell um, wie z. B. die Kombination einer fluss- und druckkonstanten Perfusion, und kann verlässlich zur Endothelschädigung eingesetzt werden, ohne andere Zellen wie die

glatte Muskulatur zu beeinträchtigen.

Nachweisbar war die ED nach Kaliumgabe nur bei flusskonstanter Perfusion. Unter druckkonstanter Perfusion von Kaliumpuffer, also bei Messung des CF vor und nach Perfusion mit Histamin, war keine Schädigung feststellbar. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Prüfung der ED in den druckkonstanten Versuchen mit nur 100 nmol Histamin durchgeführt wurde. Diese Stoffmenge wurde von He *et al.* übernommen und zeigte in deren Versuchen eine signifikante Vasodilatation. In den flusskonstanten Versuchen zur physiologischen Endothelfunktion in dieser Arbeit hingegen wies sie keinen Effekt auf. Zudem ist auch zu debattieren, ob die fehlende Detektion der Schädigung an der lediglich minutlichen Flussmessung lag, sodass eine kontinuierliche Flussmessung möglicherweise durch exaktere Ergebnisse doch eine Schädigung hätte anzeigen können. Die Implikation einer flusskonstanten Perfusion mit 8,5 ml/min im ansonsten druckkonstanten Modell (VR B) führte zu keinem nachweisbaren Endothelschaden führte; gleichzeitig führte selbige Kaliumperfusion im flusskonstanten Aufbau (VR C) mit größerer Menge Histamin zu einer nachweisbaren ED. Deshalb ist naheliegend, dass die fehlende Detektion einer Schädigung in VR B entweder an einer zu niedrigen Stoffmenge von Histamin oder an einer nicht ausreichend exakten Messung der Schädigung mittels CF liegt. Angesichts der eindeutigen Ergebnisse, die eine ED ausschließlich in den Versuchen mit einer flusskonstanten Perfusion von Kaliumpuffer zeigen, ist jedoch auch naheliegend, dass die Schädigung unter anderem mit dem hohen CPP und dem resultierenden Scherstress in der flusskonstanten Perfusion zusammenhängt. Auch die in Kapitel 1.4.3 ausführlich beschriebenen Ergebnisse von Cartier *et al.*, die nur bei 160 cmH₂O CPP eine ED durch druckkonstante Perfusion mit hochmolarer Kaliumlösung zeigen konnten [82], sprechen für die Notwendigkeit eines hohen CPP, um durch Kaliumlösung eine ED auszulösen. Zudem konnte mittels der TEER-Messungen gezeigt werden, dass es durch Kalium auf zellulärer Ebene keinen relevanten zytotoxischen Effekt gibt. Somit ist es plausibel, dass die druckkonstante Perfusion von Kaliumpuffer keine Endothelschädigung auslöst, die flusskonstante Perfusion mit hohem CPP hingegen schon, wie es auch mit dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

4.1.3 Ischämie/Reperfusionsversuche unter ED

Zuletzt sollte das etablierte ED-Modell auch im I/R-Versuch getestet werden. Ziel war kein oder ein möglichst geringer Einfluss auf gemessene IS. Die Etablierung eines Modells für die ED im I/R-Versuch an der Langendorff-Apparatur konnte in dieser Arbeit mit einer innovativen Kombination von fluss- und druckkontrolliertem Langendorff-Aufbau durch die Perfusion von hochmolarem Kaliumpuffer erreicht werden. Die Integration der flusskonstanten Perfusion von Kaliumpuffer (bzw. KHP in der Kontrollgruppe) in den druckkonstanten Standard-Langendorff-Aufbau ließ sich gut realisieren und optimal steuern. So konnten die strengen zeitlichen Vorgaben zur Gewährleistung reproduzierbarer Bedingungen im Protokoll eines Langendorff-Versuchs erfüllt und eine zehnminütige Perfusion verlässlich durchgeführt werden. Nach Optimierung des Modells ist zudem eine erfolgreiche Endothelschädigung möglich, ohne dass sich in den Kontrollversuchen signifikante Abweichungen der hämodynamischen Variablen HF, LVDP oder CPP unter der flusskonstanten Perfusion zeigten.

4.2 Endothelschädigung

4.2.1 Endotheliale Dysfunktion durch hochmolare Kaliumlösungen

Die Etablierung einer ED im Langendorff-Modell ist bereits Gegenstand diverser Studien und Experimente (vgl. Kapitel 1.4.3) und wird häufig durch Lyse der Endothelzellen mittels Applikation von Triton X-100 erreicht. [80, 87, 89] Ein großer Nachteil dieser Methode ist die unspezifische Zerstörung zellulärer Strukturen durch Triton, die nicht nur zur Lyse des Endothels führt, sondern auch die Integrität des restlichen Langendorff-Herzens bedroht. Die mit Triton behandelten Zellen werden lysiert [87], somit kann davon ausgegangen werden, dass das mit Triton behandelte Endothel ebenfalls lysiert wird und somit die Symptomatik einer ED induziert. Stützen lässt sich diese These, neben den Daten aus den Zellkulturversuchen dieser Arbeit, in denen Triton eine massive Schädigung der Zellintegrität induzierte (s. Kapitel 3.5), auch durch elektronenmikroskopische Daten von Wang *et al.*, die einen Verlust der Zellstruktur des Endothels nach Tritoninjektion in Rattenherzen im Langendorff-Modell zeigten. [99] In der Literatur finden sich im allgemeinen zahlreiche Daten zu den lysierenden Eigenschaften von Tri-

ton. [87, 99]

Als mildere Variante der Endothelschädigung bietet sich eine hochmolare Kaliumlösung an [73, 82, 91], zu welcher sich keine Daten zu einer lysierenden Zellschädigung finden lassen. Auch in den Zellkulturversuchen dieser Arbeit zeigte sich keine relevante Schädigung der Zellen unter 60 mM Kaliumlösung (s. Kapitel 3.5). Für eine Schädigung durch einen anderen Mechanismus als Lyse spricht auch eine Publikation von Cartier *et al.*, in welcher eine Abhängigkeit der Schädigung durch Kaliumpuffer vom CPP gezeigt werden konnte. [82] Die Abhängigkeit der kaliuminduzierten Endothelschädigung von physikalischen Variablen wie dem CPP spricht für eine Schädigung durch Scherstress. Angesichts dessen, dass das Kalium in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zudem in druckkonstanter Perfusion keine messbare Schädigung verursacht hat, ist der naheliegendste Pathomechanismus für die Endothelschädigung auf Scherkräfte in der flusskonstanten Perfusion zurückzuführen. Dies lässt sich auch anhand des deutlich gestiegenen CPP während der Kaliumperfusion nachvollziehen (s. z. B. Tabelle 17: Initialer CPP von 80 ± 0 mmHg, steigt unter Kaliumperfusion auf 156 ± 11 mmHg an). Für das Langendorff-Modell ist eine Schädigung der Koronarien durch hohen Scherstress zudem vorbeschrieben [75], sodass diese als naheliegender Schädigungsmechanismus des vorliegenden Modells angenommen werden kann.

Im menschlichen Gefäßsystem entsteht eine ED z. B. unter pathophysiologischen Verhältnissen durch Atherosklerose oder chronisch erhöhte Scherkräfte bei Hypertonie. [2, 26] Der CPP-basierte Pathomechanismus der ED durch Perfusion mit Kalium lässt sich somit auf zellulärer Ebene besser mit der Scherstress-induzierten ED im Menschen vergleichen [26], sodass durch hochmolare Kaliumperfusion eine bessere Imitation des menschlichen Pathomechanismus der ED gegeben sein könnte als durch die Perfusion von Triton.

Dies könnte einen potenziellen Vorteil in der Übertragbarkeit aus dem experimentellen Design in die Klinik mit sich bringen.

Ein weiterer Vorteil des ED-Modells mit Kaliumpuffer ist, dass nach Anpassung von Perfusion und Temperatur im Versuch zwischen Kontroll- und Kaliumgruppe kein signifikanter Unterschied in den hämodynamischen Variablen im Anschluss an die flusskonstante Perfusion mehr bestand (vgl. Tabelle 17). Während der Perfusion mit Kaliumpuffer traten dabei zwar weiterhin die beschriebenen Unterschiede in Herzfrequenz und LVDP (im Sinne einer Asystolie in der Kaliumgruppe) sowie

der deutlich erhöhte CPP unter Kaliumpuffer auf. Nach Beendigung der flusskonstanten Perfusion stellten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr dar. Daraus lässt sich die Aussage ableiten, dass der Kaliumpuffer an sich keinen längerfristigen Einfluss auf die gemessenen hämodynamischen Variablen hinaus zu haben scheint.

4.2.2 Methodische Umsetzung

Zur Umsetzung einer ED im Langendorff-Versuch existieren zwei verschiedene Ansätze: Triton und hochmolarer Kaliumpuffer. Die Verwendung von Kaliumpuffer und Triton zur Endothelschädigung im Langendorff-Versuch wurde bereits in Kapitel 1.4.3 näher beleuchtet: Während viele Publikationen Triton zur ED-Induktion nutzen [80, 88, 89], ist die schonendere Verwendung von Kaliumpuffer zur ED weniger verbreitet [73]. Ein Großteil der Studien zur Endothelschädigung durch hochmolare Kaliumlösungen untersucht primär mit dem Effekt kardiopleger Lösungen in einem kardiochirurgischen Kontext, anstatt eine Implikation in weiterführende Langendorff-Versuche anzustreben. [82, 91] Ein möglicher Nachteil der ED-Methodik mit Kaliumpuffer liegt im komplizierteren Versuchsaufbau, denn Triton kann mit minimalem Aufwand über eine Perfusorpumpe in den Versuchsablauf eingebracht werden. Wie in Abbildung 22 gezeigt, benötigt der flusskonstante Anlagenteil eine eigene Pumpe, eine eigene Luftfalle und einen zusätzlichen Druckaufnehmer für den CPP. Für Labore, die regulär mit einem druckkonstanten Modell arbeiten, stellt sich somit ein geringer Mehraufwand dar, der sich jedoch durch die vermutlich bessere Imitation der menschlichen Pathophysiologie rechtfertigen lässt (s. Kapitel 4.2.1).

Hochmolarer Kaliumpuffer stellt angesichts der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse eine mindestens ebenso geeignete Art der Endothelschädigung dar wie das in der Literatur häufig verwendete Triton; dabei ist der Schädigungsmechanismus mutmaßlich deutlich sanfter als die lysebasierte Schädigung durch Triton.

4.3 Auswahl von Methodik und Substanzen

4.3.1 Physiologische Endothelfunktion

Zur Testung der Endothelfunktion wurde in den vorliegenden Versuchen der Vasodilatator Histamin verwendet. Histamin ist ein bekannter Induktor der eNOS, der seine Wirkung über H₁-Rezeptoren vermittelt. [83]

Die Substanz wurde auch von anderen Studien bereits zur Feststellung einer ED verwendet. [73, 80] Zur Diskussion gestellt werden kann, ob für die verminderte Vasodilatation nach Kaliumperfusion eine Interaktion von Kalium mit den Histaminrezeptoren verantwortlich ist. Entsprechende Hinweise lassen sich in der Literatur jedoch nicht finden; zudem spricht gegen eine solche Interaktion, dass der Effekt sowohl bei der Verwendung von Kaliumpuffer (in dieser Arbeit und in den Versuchen von He *et al.* [73]) als auch nach Schädigung durch Triton (sowohl in dieser Arbeit als auch durch z. B. Giraldez *et al.* [80]) nachweisbar ist. Man hätte somit eine weitere Validierung der Ergebnisse durch Verwendung einer anderen, endothelvermittelt vasodilatierenden Substanz wie Bradykinin [89] oder Acetylcholin [8] durchführen können, doch aufgrund eines mutmaßlich geringen Erkenntnisgewinns hätte dies die Anzahl der Versuchstiere unnötig erhöht.

Neben der Auswahl von Histamin als Vasodilatator ist auch dessen Dosierung als Stoffmenge anzusprechen. In dieser Arbeit wurde Histamin in einer Stoffmenge von 800 nmol Histamin anstelle einer bestimmten Stoffkonzentration eingesetzt; dies resultiert daraus, dass sich die Bestimmung der Dosis an einer Studie von He *et al.* orientierte, in der eine Stoffmenge anstelle einer Konzentration verwendet wurde. [73] Aufgrund der CF-abhängigen Schwankungen des ausgelösten vasodilatativen Effekts wurde für die weiteren Substanzen mit Stoffkonzentrationen gearbeitet. Aus praktischen und tierethischen Gründen wurden die Versuche mit Histamin jedoch nicht wiederholt, sondern weiterhin mit der zuvor bestimmten Stoffmenge von 800 nmol Histamin durchgeführt. Zwar steht zur Debatte, ob dies einen Einfluss auf die weiteren Ergebnisse haben könnte. Jedoch liegt hier eher eine Unter-, als eine Überschätzung der Effekte z. B. in der Endothelschädigung nahe, denn die Stoffmenge wurde hoch gewählt und zu hohe Mengen von Histamin (ab 1,6 μmol Histamin) können einen schwächeren Effekt hervorrufen, wie die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1 zeigen.

4.3.2 Korrelation von Ausgangsdruck und prozentualem Druckabfall

Im Verlauf der Auswertung der Versuche zur ED fiel schnell eine Korrelation zwischen Ruhe-CPP und CPP-Abfall auf. Um valide Ergebnisse zu erzielen, wurden deshalb bei Auswertungen, die eine CPP-Verminderung beinhalteten, nur Versuche in die Auswertung eingeschlossen, in de-

nen der CPP vor und nach Intervention innerhalb einer zehnpromtigen Differenz zueinander lag (s. Kapitel 2.6.4). Die festgestellte Korrelation lässt sich physiologisch mit dem Hagen-Poiseuille-Gesetz erklären. [100]

Die Gleichung lautet folgendermaßen:

$$Q = \Delta P \frac{\pi r^4}{8\mu l}$$

Dabei bezeichnet Q die Flussrate, ΔP die Druckdifferenz, r den Radius, μ die Viskosität und l die Länge des Gefäßes. [100]

Eine geringe Änderung des Radius führt somit durch die vierfache Potenzierung zu einer größeren Änderung des Widerstands. Der Radius des Gefäßes korreliert mit dem Gefäßwiderstand und somit auch mit dem CPP. Physiologisch lässt sich die Korrelation zwischen dem CPP-Abfall und dem Ruhe-CPP also mit dieser Gleichung erklären, da das Gefäß bei gleicher Perfusion und hohem CPP einen sehr geringen Radius hat. Um den Effekt derselben Konzentration oder Stoffmenge eines Vasodilatators vergleichen zu können, sollten demnach die Ausgangsbedingungen (CPP und somit korrelierend der Gefäßdurchmesser) konstant gehalten werden. Bei einem bereits zuvor enger gestellten Gefäß mit einem hohen Vasotonus kann die gleiche Änderung des Radius relativ berechnet mehr Effekt zeigen. Die in Abbildung 11 gezeigte signifikante Korrelation von Ruhe-CPP und Ausmaß der Vasodilatation bzw. des CPP-Abfalls bestätigt diese Überlegungen und zeigt, dass eine Eingrenzung der inkludierten CPP-Ausgangswerte sinnvoll ist.

4.3.3 Berechnungen mittels Differenz und Baseline

Zur Auswertung der Messungen und Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden in dieser Arbeit vor allem prozentuale Veränderungen zwischen Messzeitpunkten ausgewertet. Die Berechnungen des Ausmaßes der Endothelschädigung erfolgten als Verrechnung der jeweiligen prozentualen Vasodilatation vor und nach Intervention. Möglich wäre zwar eine Verzerrung von Ergebnissen durch diese Datenverarbeitung; jedoch ließ sich so auch eine deutlich bessere Vergleichbarkeit zwischen den Rohdaten herstellen.

Zur Verbesserung der Auswertung wurden in den späteren VR die Ausgangswerte des CPP vor Vasodilatation konstant gehalten, sodass ein direkter Vergleich der absoluten CPP-Vermindeung eher möglich gew-

sen wäre. Jedoch war die prozentuale Auswertung weiterhin notwendig, um kleinere Unterschiede in den CPP-Ausgangswerten aus den Auswertungen des Vasodilatationseffekts herauszurechnen.

Beim Vergleich zwischen verschiedenen Gruppen wiederum hat es sich erneut als praktikabel erwiesen, die Werte vor und nach Intervention prozentual miteinander zu verrechnen, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen und zwischen Messreihen mit unterschiedlichen Ausgangswerten herstellen zu können.

4.4 Infarktgrößenreduktion durch die Methodik

Über die verschiedenen VR der vorliegenden Arbeit ließ sich trotz Optimierung diverser Parameter ein reduzierender Effekt auf die IS im Sinne einer Präkonditionierung im I/R-Versuch nicht eliminieren. Dieser Effekt wurde nicht nur in den Versuchen mit Kaliumpuffer beobachtet, sondern auch in den Kontrollversuchen mit KHP. Naheliegend ist somit eine Ursache im Versuchsaufbau, die nicht direkt mit dem Kaliumpuffer zusammenhängt. Möglich ist jedoch überdies auch eine schwache Präkonditionierung durch den Kaliumpuffer bzw. Kalium als Substanz; diese würde die geringfügig niedrigeren IS in den Kaliumgruppen erklären, die sich jedoch in keiner VR signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden. Für die Ursachen der Präkonditionierung lassen sich hieraus verschiedene Hypothesen aufstellen:

1. Eine Temperaturdifferenz zwischen den Puffern des fluss- und druckkonstanten Systems hat präkonditionierende Effekte.
2. Hypoxische oder ischämische Phasen im Versuchsaufbau haben präkonditionierende Effekte:
 - a) Die Flussrate des Kalium- bzw. Kontrollpuffers konnte nicht exakt genug an die Flussrate des übrigen Versuchs angepasst werden, was zu einer zehnmütigen milden Minderperfusion führte.
 - b) Die Umstellung zwischen beiden Pufferreservoirs induzierte eine kurze Ischämie, die präkonditionierend wirkt.
3. Kalium hat einen präkonditionierenden Effekt.

4.4.1 Temperaturbedingte Konditionierung

Eine mögliche Erklärung für die IS-Reduktion könnte eine Hypothermie sein, die durch unterschiedliche Puffertemperaturen im fluss- und

Tabelle 19: Veröffentlichungen zur Hypothermie in der Kardioprotektion

Exemplarische Übersicht über einige Studien zur Hypothermie (HT) und ihrer Bedeutung für die Kardioprotektion. Viele wenden die Hypothermie während Ischämie und Reperfusion an; für die vorliegende Studie sind vor allem jene interessant, die eine hypotherme Präkonditionierung untersuchen (Ghadhanfar & Juggi, Khaliulin et al. [101, 102]). IPC = Ischämische Präkonditionierung, IS = Infarktgröße, EF = Ejektionsfraktion, LDH = Laktatdehydrogenase, NO = Stickstoffmonoxid.

Autor	Protokoll	Art der HT	Dauer der HT	Temperatur	Ergebnis	Jahr
Chien et al. [103]	Kaninchen, <i>in vivo</i>	Während Ischämie + Reperfusion	210 min	35-42 °C	IS korreliert positiv mit Temperatur	1994
Ghadhanfar & Juggi [101]	Ratte, <i>ex vivo</i>	Hypotherme IPC	2x5 min	10, 20, 30 oder 34 °C	Schlechtere Ischämietoleranz unter Hypothermie	2007
Khaliulin et al. [102]	Ratte, <i>ex vivo</i>	Vor Ischämie	3x2 oder 1x6 min	26 °C	Weniger LDH in ersten 10 min nach Reperfusion; weniger Arrhythmien	2007
Mochizuki et al. [104]	Ratte, <i>ex vivo</i>	Während Ischämie und Reperfusion	210 min	34 °C	Reduzierte IS; kein Effekt unter NO-Inhibitoren	2012
Dash et al. [105]	Schwein, <i>in vivo</i>	30 min Ischämie + Reperfusion	90 min	32 oder 35 °C	Reduzierte IS und erhaltene EF bei 32 °C	2018
Knoop et al. [106]	Maus, <i>in vivo</i>	Während Ischämie	30 oder 60 min	34-36 °C	Reduzierte IS für beide Ischämiedauern	2018

druckkonstanten Versuchsteil zustande kommt. Die Hypothermie ist in der Medizin eine gängige Methode zur Zytoprotektion [107]; klinisch wird sie bereits seit den 1950er Jahren und bis heute als therapeutische Hypothermie zur Neuroprotektion nach Herz-Kreislaufstillstand genutzt. [108, 109] Einige Studien stellen einen Zusammenhang von Kardioprotektion und Hypothermie her; Tabelle 19 stellt einen exemplarischen Überblick über einige dieser Veröffentlichungen dar. Eine Hypothermie über einen längeren Zeitraum konnte in einer Studie von Dash *et al.* mit einer IS-Reduktion assoziiert werden, wenn sie während eines ischämischen Ereignisses im Schweineherz induziert wurde. [105] Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Knoop *et al.*; in ihrer Studie am Herzen von Mäusen, deren normotherme Perfusion bei 37,5 °C liegt, konnte sogar eine sehr milde Hypothermie von 34 bis 36 °C die nach Okklusion der linken Koronararterie gemessenen IS halbieren. [106] Die Präkonditionierung durch Hypothermie untersuchte eine weitere Studie von Khaliulin *et al.* an den Herzen männlicher Wistar-Ratten; sie zeigte primär, dass durch fraktionierte, kurze Hypothermien ein protektiver Effekt erzielt werden kann, der der RIPC ähnelt. Zur Quantifizierung der Myokardschädigung nutzen die Autoren Messungen der LDH-Aktivität im CF. Im Vergleich der LDH-Messungen fünf Minuten nach Beginn der Reperfusion wurde in der Kontrollgruppe (ohne Intervention) eine LDH-Aktivität von $58,8 \pm 3,7$ mU/ml gemessen; in der Gruppe mit fraktionierten Hypothermien hingegen zeigte sich eine signifikant niedrigere LDH-Aktivität von $16,2 \pm 4,1$ mU/ml ($p < 0,001$). Ein geringerer protektiver Effekt ($37,0 \pm 5,7$ mU/ml nach fünf Minuten Reperfusion) konnte auch nach einer längeren hypothermen Episode von sechs Minuten bei 26 °C festgestellt werden; dieser zeigte sich allerdings nicht signifikant. [102] Die Resultate dieser hypothermen Versuche mit 26 °C können begrenzt auf die hier vorliegenden Daten übertragen werden. Da in der vorliegenden Studie über insgesamt zehn Minuten mit potenzieller Hypothermie perfundiert wurde, während Khaliulin *et al.* nur über sechs Minuten hypotherm perfundierten. [102] Jedoch betrug die niedrigste gemessene Temperatur in den Versuchen dieser Arbeit 30 °C, nicht wie bei Khaliulin *et al.* 26 °C; die Temperatur stieg zudem über die zehn Minuten der Perfusion kontinuierlich an (s. Kapitel 3.3.3). Das von Khaliulin *et al.* beschriebene Ergebnis lässt sich auch nur eingeschränkt mit dem hier beobachteten kardioprotektiven Effekt vergleichen, da ihre Zielgröße nicht die IS, sondern die LDH-Aktivität war. [102] Ihre Untersuchung zur hypothermen Perfusion über sechs Minuten zeigt eine Verminde-

rung der LDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe um 36 %. Zwar lassen sich diese Zahlen nicht direkt miteinander vergleichen, jedoch bewegen sich die von Khaliulin *et al.* gemessenen Differenzen in einem ähnlichen Rahmen wie die in dieser Arbeit gemessenen Unterschiede zwischen den IS der einzelnen Gruppen. In der vorliegenden Arbeit liegt der Unterschied in den IS zwischen Referenz- und Kontroll- bzw. Kaliumgruppe in VR 1 (8,5 ml/min) bei ca. 40 %. In der Gruppe mit angepasster Kaliumperfusion sind es 13 % in der Kontroll- und 29 % in der Kaliumgruppe.

Aufgrund der weitgehenden Elimination des Faktors Minderperfusion in VR 2 (mit angepasster Perfusionsrate) lässt sich vor allem für diese Versuche mit Kaliumpuffer ein Vergleich ziehen: Zwar zeigt sich in der VR 2 dieser Arbeit ein geringerer Unterschied zwischen Referenz- und Versuchsgruppen (13 bzw. 29 % im Vergleich der Kontroll- bzw. Kaliumgruppe vs. Referenzgruppe) als in der Arbeit von Khaliulin *et al.* zwischen Kontroll- und Hypothermiegruppe (36 %). Dieser Unterschied lässt sich allerdings auch gut mit der geringeren Hypothermie in VR 2 begründen, in der die Wärmezirkulation im Vergleich zu VR 1 bereits verbessert wurde.

Gegen die Hypothese der Hypothermie als Einflussfaktor sprechen die IS der VR 3 (mit verbessertem Wärmemanagement). Hier wurden 38 ± 10 % in den Kontrollversuchen und 29 ± 8 % in den Kaliumversuchen gemessen. Andererseits muss in diesem Vergleich berücksichtigt werden, dass die IS in VR 2 deutlich höhere Standardabweichungen zeigen, die die Ergebnisse beeinflussen und durchschnittlich größere IS vortäuschen könnten.

In Kontrast zu diesen Ergebnissen sei hier auch erwähnt, dass Ghadhanfar & Juggi zu dem Schluss kamen, dass eine hypotherme IPC von zweimal fünf Minuten zu einem verschlechterten Ischämietoleranz führt. Auch sie nutzten männliche Wistar-Ratten. Die Datenlage zur hypothermen Kardioprotektion ist also nicht vollkommen eindeutig. [101]

Interessant ist darüber hinaus eine von Mochizuki *et al.* durchgeführte Studie, in der Hypothermie unter Inhibition der NO-Synthase keinen kardioprotektiven Effekt in männlichen Sprague-Dawley-Ratten hatte. Dies bedeutet für die vorliegende Arbeit weiteren Anhalt dafür, dass sich die kardioprotektiven Effekte vermutlich nicht ausschließlich durch eine Hypothermie erklären lassen. Anhand dieser Ergebnisse wären ansonsten größere IS in den Kaliumgruppen zu erwarten gewesen, da hier die ED zur Abschwächung der hypothermen Protektion hätte führen müs-

sen. [104]

Zukünftig sollte die noch bestehende Hypothermie besser vermieden werden können. Hierzu wäre der Einbau einer zweiten Wärmespirale in den Versuch möglich, um ein besseres Wärmemanagement zu ermöglichen (s. Abbildung 32); dies entspräche Version 5 des verwendeten Langendorff-Modells.

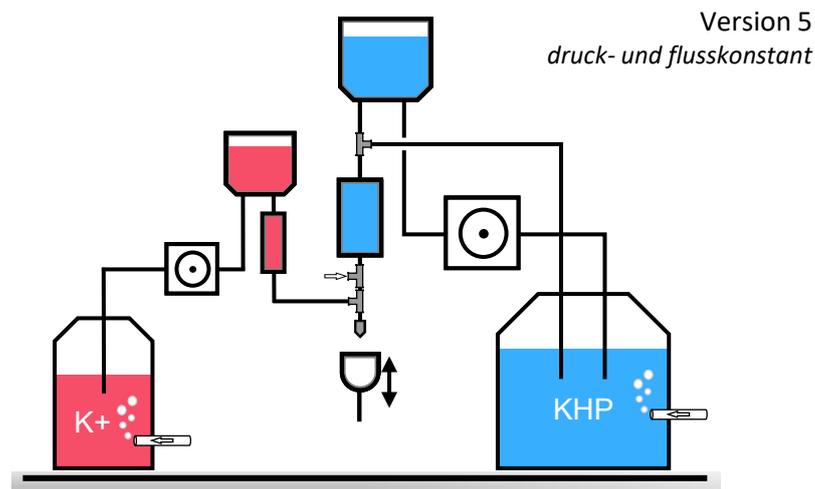


Abbildung 32: Entwurf eines wärmeoptimierten kombinierten Langendorff-Modells

KHP = Krebs-Henseleit-Puffer, K+ = Kaliumpuffer. Entwurf für ein Langendorff-Modell mit kombiniert druck- und flusskonstantem Anlagenteil und einer zweiten Wärmespirale im flusskonstanten Teil (rot), die für ein optimales Temperaturmanagement sorgen soll. Darüber hinaus sollte, wie in den Versuchen der flussadaptierten und wärmeoptimierten Versuchsreihen, eine Zirkulation des Puffers im flusskonstanten Teil etabliert werden (als Verbindung zwischen Wärmespirale und Pufferreservoir), um ein Abkühlen des Puffers vor dem Hinzuschalten des flusskonstanten Anlagenteils zu verhindern. Diese Zirkulation ist der Übersicht halber weiterhin nicht abgebildet.

4.4.2 Hypoxische und ischämische Konditionierung

4.4.2.1 Konditionierung durch Minderperfusion

Eine der Hypothesen zu den Ursachen der geringen IS in den I/R-Versuchen dieser Studie ist, dass es während der flusskonstanten Perfusion zu einer Minderperfusion kam, die am Herzen eine relative Ischämie induziert haben könnte. Durch diesen relativen Mangel an Sauerstoff könnte die Minderperfusion eine Präkonditionierung und somit Reduktion von IS bewirkt haben. [48] In den Versuchen mit angepasster Perfusion (VR 2 und 3) lag jedoch nur noch eine sehr milde, wenn überhaupt eine Hypoperfusion vor, da die Pumpenlaufrate an den zuvor gemessenen CF angepasst wurde. Wie zuvor beschrieben (vgl.

Tabelle 15 und 17) ließ sich nach dieser Anpassung kein signifikanter Unterschied in der Messung des CF zwischen Baseline und flusskonstanter Perfusion mehr feststellen. In diesen VR wurde außerdem die Pufferzirkulation zwischen Luftfalle und Reservoir im flusskonstanten Anlagenteil etabliert. Diese verbesserte die Sauerstoffsättigung des Puffers im flusskonstanten Anlagenteil und diente somit der weiteren Minimierung einer möglicherweise bestehenden Hypoxie. Die Überlegungen zur Minderperfusion betreffen also primär die Konditionierung in der VR 1 (flusskonstante Perfusion mit 8,5 ml/min). Hier kam es durch die festgelegte Perfusionsrate von 8,5 ml/min zur deutlicheren Hypoperfusion. Durch die fehlende Pufferzirkulation liegt zudem nahe, dass der Puffer zu Beginn der flusskonstanten Perfusion nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff aufgesättigt war. In den folgenden Ausführungen sollen deshalb die Ergebnisse aus VR 1 dieser Arbeit mit anderen Methoden und Ergebnissen zur ischämischen Konditionierung aus der Literatur verglichen werden. Eine der gängigsten Arten der ischämischen Präkonditionierung ist die IPC, bei der das Herz vor einer längeren Ischämie mehreren Episoden kurzer Ischämie ausgesetzt wird. [45, 48] Auf das Versuchsprotokoll der Versuche aus VR 1 (mit einer Perfusion von 8,5 ml/min) lassen sich diese Methoden nur begrenzt übertragen: Zum einen fand keine vollständige Ischämie statt, sondern lediglich eine Minderperfusion und somit nur eine relative Ischämie bzw. Hypoxie. Zum anderen fand diese Minderperfusion nicht in mehreren Abschnitten statt, sondern als einmaliges, zehnminütiges Ereignis. Bei der IPC wiederum sind beispielsweise drei Zyklen mit je fünf Minuten gängig. [49] Eine Arbeit, deren Ansatz sich mit einer ähnlichen Art von Hypoxie auseinandersetzt, wurde von Hong *et al.* umgesetzt. Anstelle einer Minderperfusion oder Ischämie untersuchte diese Studie eine periodische Perfusion mit hypoxischer Perfusionslösung, die 8 % statt 21 % Sauerstoff enthielt. In Konsequenz wurde auch hier eine relative Ischämie als Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -verbrauch hergestellt. Die Autoren stellten eine signifikante Verminderung der IS im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Intervention fest; somit scheint eine Präkonditionierung durch Hypoxie zu funktionieren. [110]

Schlussfolgernd ist naheliegend, dass auch eine Minderperfusion zur Präkonditionierung führen kann. Fraglich bleibt jedoch, ob eine einmalige, längere Episode in VR 1 für einen Effekt ausreicht. Ob mögliche minimale Unterschiede im CF in den VR 2 und 3 noch für eine rele-

vante Hypoperfusion reichen könnten ist unklar, aber unwahrscheinlich.

4.4.2.2 Induktion einer kurzen Ischämie beim Pufferwechsel

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der kardioprotektiven Effekte des ED-Modells ist die Umstellung zwischen druck- und flusskonstanter Perfusion, die eine sehr kurze Ischämie von unter einer Sekunde auslöste. Sichtbar war dies an einem kurzen Einbruch von HF und CPP. Ob eine Ischämie dieser Dauer tatsächlich einen kardioprotektiven Effekt hat, lässt sich nicht abschließend beantworten, da sich in der Literatur keine entsprechenden Daten finden lassen. Eine Studie von Barbosa *et al.* hat jedoch durch Induktion einer ischämischen Präkonditionierung zwischen 1,25 und zehn Minuten gezeigt, dass die Länge der Ischämie mit dem Ausmaß der Präkonditionierung korreliert. Zwar war bereits bei 1,25 Minuten Ischämiedauer eine signifikante IS-Reduktion zu beobachten, mit Verlängerung der IPC-Zyklen wurde diese Reduktion in ihrer Studie jedoch exponentiell stärker. [111]

Schlussfolgernd kann davon ausgegangen werden, dass die hier erzeugte Ischämie von unter einer Sekunde höchstens einen sehr geringen Effekt auf die resultierenden IS hat. Wahrscheinlich stellt sie nicht den entscheidenden Faktor im Versuchsaufbau dar.

4.4.3 Präkonditionierung durch Kalium

Eine weitere mögliche Erklärung für die IS-Reduktion durch das Modell könnte ein direkter protektiver Effekt der hochmolaren Kaliumlösung sein. Wie beschrieben, verhielt sich der Unterschied in den IS zwischen Kalium- und Kontrollgruppe in keiner Gruppe signifikant, jedoch ließ sich in allen VR ein Trend zu geringfügig kleineren IS nach Kaliumperfusion beobachten.

Ein kardioprotektiver Effekt durch Hyperkaliämie bzw. hochmolare Kaliumlösungen wird in der Literatur unter anderem von Takata *et al.* und Habertheuer *et al.* beschrieben und klinisch beispielsweise in kardioplegen Lösungen genutzt. Erklären lässt er sich durch die Verminderung des kardialen Sauerstoffverbrauchs und durch die Aktivierung der Natrium-Kalium-ATPase, was nach der Ischämie zu einer besseren kardialen Funktion führt. Die verwendeten Konzentrationen in diesen kardioplegen Lösungen liegen bei 16 bis 20 mM Kalium, also einem Bruchteil der in dieser Arbeit verwendeten Dosis von 60 mM. [112, 113] Bei

der Verwendung höherer Dosen könnte die protektive Wirkung also vor allem in Bezug auf die Natrium-Kalium-ATPase eher stärker ausgeprägt sein.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Kardioprotektion ist die Beteiligung von Kaliumkanälen. Über diverse Kaliumkanäle der inneren Mitochondrienmembran, beispielsweise den ATP-sensitiven $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ oder den Calcium-sensitiven $\text{mitoSK}_{\text{Ca}}$, wird während der ischämischen Konditionierung ein kardioprotektiver Effekt vermittelt. [114] In der Literatur lassen sich keine Daten zu einem Einfluss der Kaliumkonzentration auf die Öffnungswahrscheinlichkeit dieser Kaliumkanäle finden; diese hängt von Faktoren wie ATP oder Calcium ab [114]. Jedoch könnte eine so unphysiologisch hohe Konzentration wie 60 mM Kalium auch an der Mitochondrienmembran einen verstärkten Ionenfluss begünstigen.

Insgesamt ist es jedoch unwahrscheinlich, dass der Kaliumpuffer an sich den relevanten Faktor zur Präkonditionierung im Versuchsaufbau darstellt. Zum einen aufgrund der fehlenden Vorbeschreibung von Kaliumlösungen als kardioprotektive Substanz, zum anderen aufgrund der ebenfalls verminderten IS in der Kontrollgruppe, die nicht mit Kaliumpuffer perfundiert wurde. Allein für den geringen, aber konstanten Unterschied zwischen Kontroll- und Kaliumgruppe hingegen könnte eine sehr milde Protektion durch den Kaliumpuffer eine Erklärung darstellen.

4.5 Einordnung und Relevanz der Ergebnisse

4.5.1 Das Langendorff-Modell im 21. Jahrhundert

Obwohl das von Oskar Langendorff 1895 etablierte Langendorff-Modell inzwischen weit über hundert Jahre alt ist, wird es nach wie vor in zahlreichen Studien verwendet und spielt eine relevante Rolle in der modernen kardiovaskulären Forschung. [115] Die Technik bietet diverse Vorteile in der Beobachtung pharmakologischer Eigenschaften; sie ist simpel strukturiert, hat wenige Störfaktoren und bietet die Möglichkeit der Messung diverser Parameter in der Herzfunktion. Gleichzeitig lässt sie sich ausreichend modifizieren, um an Forschungsprojekte angepasst zu werden (beispielsweise die Möglichkeit druck- oder flusskonstanter Perfusion je nach Zielgröße bzw. Fokus der Versuche). [75] Limitationen der Methodik liegen einerseits in der Natur des Tiermodells begründet, da die Physiologie von Ratten und Menschen zwar sehr ähnlich ist, sich aber dennoch Unterschiede ergeben; außerdem fehlen durch die Isolati-

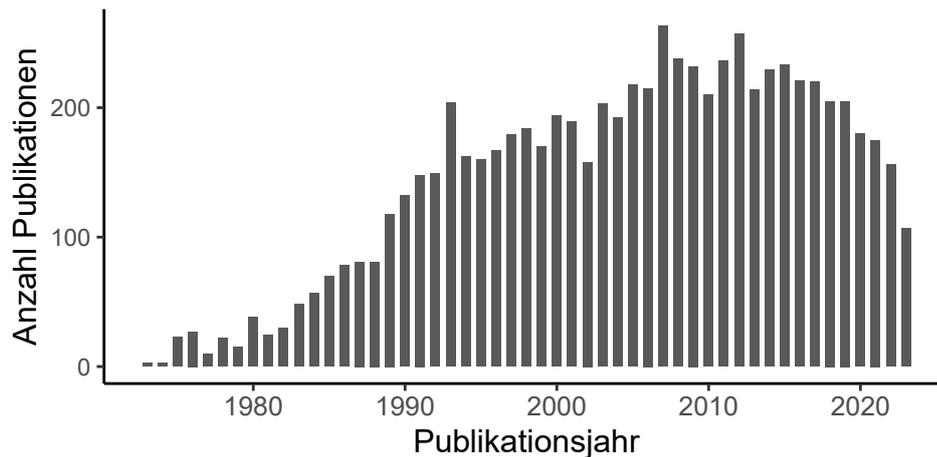


Abbildung 33: Wissenschaftliche Studien am Langendorff-Herzen seit 1973

PubMed-Suchergebnisse für den Terminus „Langendorff Heart“ nach Jahr in den letzten fünfzig Jahren (seit 1973). Abgerufen am 13.09.23.

on des Herzens Einflussfaktoren wie humorale und neuronale Regulation. [115] Nichtsdestotrotz bleibt das Langendorff-Herz auch heute eine sehr relevante und in vielen Bereichen ersatzlose Forschungsmethode am Übergang von *in vitro*- zu *in vivo*-Forschung. [75] Nachvollziehbar ist dies auch an den PubMed-Einträgen der letzten fünfzig Jahre (s. Abbildung 33); für die Suche nach „Langendorff Heart“ ergibt sich eine seit Jahren konstante dreistellige Zahl an Ergebnissen pro Jahr, die seit den 1970er Jahren deutlich angestiegen ist. [116]

4.5.2 Endothelfunktion im Langendorff-Modell

Um eine bestimmte Eigenschaft wie die Funktion des Endothels zu untersuchen, ist natürlich zunächst die Frage zu beantworten, ob sich das gewählte Modell für diese Untersuchungen bzw. zur Beantwortung weiterführender Fragen eignet. Aufgrund der kontinuierlichen CPP-Messung im flusskonstanten Langendorff-Modell lassen sich sehr detaillierte und zeitlich präzise Rückschlüsse auf den vaskulären Tonus ziehen; dies macht es zu einer geeigneten Apparatur für Versuche zur Abbildung der Endothelfunktion und somit auch zu einer geeigneten Apparatur für die Versuche in dieser Arbeit. In dem so gewählten Ansatz im Langendorff-Modell fehlt die Möglichkeit zur Überprüfung der Endothelfunktion in anderen Bereichen als dem cGMP-vermittelten Signalweg zur Vasodilatation; jedoch werden auch andere Funktionen des Endothels wie Thrombozytenaggregation, Immunregulation etc. mittels S-Nitrosierung primär über NO vermittelt [6, 14]. Relevant wird dies bei-

spielsweise, wenn das etablierte ED-Modell in einem Kontext verwendet werden soll, dessen Hintergründe diese weiteren NO-vermittelten Prozesse involvieren. Zwar lässt sich in den vorliegenden Versuchen nicht testen, ob diese durch S-Nitrosierung vermittelten Effekte unter der hier etablierten ED noch nachweisbar sind, jedoch lässt sich zumindest vermuten, dass die Abschwächung der NO-vermittelten Vasodilatation auch auf die Beeinträchtigung anderer NO-abhängiger Prozesse hindeutet. Dies spielt eine Rolle, da es darauf hindeutet, dass die Endothelfunktion in großem Ausmaß beeinträchtigt wird. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass diese Funktionen in ähnlichem Ausmaß wie die Vasodilatation beeinträchtigt sind. Die Vasodilatation lässt sich jedoch einfach und sehr präzise messen. Darüber hinaus sind diese weiteren Signalwege des Endothels eher langfristig in der klinischen Pathophysiologie der ED von Relevanz und ihre Konsequenzen in einem zeitlich begrenzten und isolierten tierexperimentellen Versuch dieser Art schwer zu implementieren und zu analysieren.

4.5.3 Relevanz von Komorbiditäten im Langendorff-Modell

In einer alternden Gesellschaft, deren führende Todesursache im Bereich der Herz-Kreislauf-Erkrankungen liegt [37], wird es zunehmend wichtiger, im Kontext dieser Erkrankungen zu forschen. Die Darstellung von Komorbiditäten im Langendorff-Modell ermöglicht solche weitergehende Forschung, speziell die Erforschung kardioprotektiver Maßnahmen unter dem Einfluss von Komorbiditäten. So konnten Studien z. B. zeigen, dass die IPC an alten Herzen keine protektiven Effekte mehr auslösen kann [117]; auch Komorbiditäten wie ein Diabetes mellitus Typ 2 schwächen oder verhindern protektive Effekte z. B. der IPostC [118]. Im Falle der ED kommt zu diesen möglichen Interaktionen mit Komorbiditäten, die den kardioprotektiven Effekt einer Intervention abschwächen können, noch dazu, dass das Endothel durch NO an vielen kardioprotektiven Signalwegen direkt beteiligt ist. [54, 61] Somit führt zusätzlich auch der NO-Mangel direkt zu einer Abschwächung kardioprotektiver Effekte, die im gesunden Individuum über NO vermittelt werden. In Kapitel 1.1.4 wurde die ED bereits als häufige Komorbidität des Menschen über sechzig Jahren eingeordnet, obwohl genaue Zahlen aufgrund des Fehlens eines Screenings nicht zu benennen sind. [2, 6, 28, 29] Aufgrund der wichtigen Rolle von NO in der Kardioprotektion, die in Kapitel 1.3.2.2 beleuchtet wurde, ist die Untersuchung kardio-

protektiver Maßnahmen im Hinblick auf NO-abhängige Wirkmechanismen von großer Relevanz. Auch die Frage nach dem Erhalt ihrer protektiven Wirkung bei Pathologien des Endothels steht im Fokus. Aufgrund des fehlenden Screenings auf eine ED empfehlen sich in der Forschung zur Kardioprotektion endothelunabhängige Protektionsmaßnahmen, welche auch bei Patienten mit einer unerkannten ED ihre Wirkung entfalten. Im Allgemeinen ist das Kollektiv, das auf eine Protektionsmaßnahme ansprechen kann, größer, wenn die Maßnahme nicht durch gängige Komorbiditäten abgeschwächt wird. Deshalb ist es von großem Vorteil, Protektionsmechanismen auf eine Interaktion mit Komorbiditäten wie der ED zu testen. Die Möglichkeit hierzu bietet das in dieser Arbeit beschriebene ED-Modell.

Die vorliegende Methodik zur Endothelschädigung kann auch mit anderen Komorbiditäten, beispielsweise einer Hyperglykämie, kombiniert werden. So kann das Kollektiv an Patienten, auf das die Ergebnisse entsprechender Studien zur Kardioprotektion übertragbar sind, noch weiter spezifiziert bzw. erweitert werden.

4.5.4 Kombination von druck- und flusskonstantem Langendorff-Modell

In den VR 1-3 zur IS-Bestimmung nach den I/R-Versuchen konnte das flusskonstante Modell zur ED in einen ansonsten druckkonstanten Langendorff-Aufbau integriert werden (s. Abbildung 22, Version 3 des Langendorff-Modells). Diese Integration ist eine Innovation, die sich in dieser Form in der bestehenden Literatur nicht finden lässt: Zwar sind Kombinationen beider Perfusionsmodi beispielsweise von Swift *et al.* vorbeschrieben, jedoch werden sie in einem vollständig anderen Kontext verwendet. Swift *et al.* verwenden die flusskonstante Perfusion einer einzelnen Koronararterie in ihrem druckkonstanten Langendorff-Modell, um so einen regionalen Infarkt im Herz adulter Sprague-Dawley-Ratten zu modellieren. [119] Ein Vergleich zum in dieser Arbeit vorgestellten Aufbau ist somit nicht sinnvoll.

Die neue Kombination beider Modi bietet vielversprechende Möglichkeiten für weitere Forschung und für die Kombination der Vorteile beider Perfusionsarten. So lassen sich beispielsweise die Möglichkeiten der CPP-Messung und der Beurteilung des koronaren Widerstands, der Endothelfunktion etc. in den Kontext des druckkonstanten Langendorff-Modells mit seinen Vorteilen in der Erforschung von Kardioprotektion

integrieren. [75] Der Ansatz bildet somit die Grundlage und einen strukturellen Ansatz für weitere Modelle, die zur Darstellung von Pathologien der Gefäße und des Vasotonus im Kontext der Kardioprotektion etabliert werden können.

Für die Forschung zur Kardioprotektion im I/R-Versuch bietet die Verwendung eines ansonsten druckkonstanten Apparates deutliche Vorteile. Flusskontrollierte Aufbauten weisen den Nachteil eines Überangebots an Perfusion in weniger infarzierten Bereichen des Herzens in der Reperfusion auf; dadurch kommt es in diesem Versuchsabschnitt durch Scherstress zur zusätzlichen Schädigung der Herzen. Dies impliziert das Risiko einer Verfälschung der eigentlichen kardioprotektiven Effekte, welche die Verwendung eines druckkonstanten Modells empfehlenswert macht. [75]

4.6 Limitationen

Trotz der erfolgreichen Implikation der ED in das Langendorff-Modell müssen einige Limitationen der Arbeit erwähnt werden. Die Langendorff-Anlage ist ein wichtiges Instrument in der Grundlagenforschung, um Fragen zur Herzfunktion und -physiologie zu beantworten. Natürlich besitzt sie von Natur aus Limitationen, die sich vor allem aus dem tierexperimentellen Rahmen und der Isolation des Herzens ergeben. Versuche an Rattenherzen bilden die menschliche Physiologie zwar sehr gut ab, jedoch muss immer kritisch hinterfragt werden, ob sich die Ergebnisse exakt übertragen lassen. In Langendorff-Versuchen lassen sich außerdem humorale Einflüsse und die Interaktion der Maßnahmen im ganzen Organismus nicht nachvollziehen. [115]

In den vorliegenden Versuchen lassen sich dadurch Effekte von NO bzw. der ED auf herzferne Organe oder Gewebe nicht nachvollziehen, da die notwendigen Effektorproteine nicht im Versuch vorliegen. Die Experimente beschränken sich somit auf den vasodilatativen, cGMP-vermittelten Effektorweg, der jedoch auch zuverlässig zu testen ist und der gängigen Methode zum Nachweis einer ED in der Literatur entspricht ([73, 80, 82]). Zudem zeigt eine Beeinträchtigung dieser NO-vermittelten Wirkung, dass die Effektvermittlung durch die Substanz gestört wurde, was auch auf eine Schädigung weiterer Signalwege schließen lässt.

Darüber hinaus limitierend ist auch die kurze Zeitspanne der ED. Bei den Herzen wurde eine „akute“ ED mittels zehnmütiger Induktion

erzeugt. Dies unterscheidet sich stark von der Pathologie einer ED des Menschen, da hier die Schädigung und ihre Auswirkungen sich langsam und über Jahre entwickeln. [2] Längerfristige Kompensationsmechanismen, beispielsweise zur Blutdruckregulation, können somit im ED-Modell nicht funktionieren. Eine sinnvolle Lösung dafür könnte zukünftig ein Tiermodell *in vivo* sein; um die 3 R (*replacement, reduction, refinement*) der Arbeit mit Tierversuchen zu erfüllen, ist es jedoch sinnvoll, zunächst ein *ex vivo* Modell zu etablieren. [120]

Eine momentan noch schwerwiegende Limitation ist die Präkonditionierung durch die Induktion der ED, mit der sich in Kapitel 4.4 bereits eingehend beschäftigt wurde. Dieser präkonditionierende Effekt muss bei einer Verwendung des Modells in Versuchen zur Konditionierung durch Medikamente oder andere Maßnahmen berücksichtigt werden. Angesichts der ähnlichen IS in ED- und Kontrollversuchen ist jedoch eine Vergleichbarkeit der jeweiligen Gruppen gegeben.

4.7 Schlussfolgerungen und Fazit

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass die Ziele dieser Arbeit weitgehend erreicht wurden: Die physiologische Endothelfunktion konnte im Langendorff-Versuch dargestellt werden, darauf aufbauend konnte das Endothel mittels hochmolarem Kaliumpuffer geschädigt und das entstandene Modell in einen I/R-Versuch integriert werden.

Auf Grundlage der Testung der Vasodilatation durch endothelabhängige und -unabhängige Substanzen wurde so ein funktionierendes Modell zur ED-Induktion etabliert, welches es erlaubt, mittels einer Langendorff-Anlage Einflüsse einer ED auf kardioprotektive Interventionen und Mechanismen zu untersuchen.

Durch die spezifische Schädigung mit hochmolarem Kaliumpuffer, die in einem hohen Scherstress und hohen CPP resultiert, grenzt das Modell sich von vielen Veröffentlichungen ab, die eine unspezifische Schädigung des Endothels mittels Lyse durch Triton induzieren [80, 88, 89]. Dadurch lässt sich eine ED etablieren, die den pathophysiologischen Prozessen im Menschen mutmaßlich näher als eine Triton-basierte Schädigung kommt und eine bessere Übertragbarkeit in die Klinik bieten könnte.

Darüber hinaus hebt sich der Aufbau in den I/R-Versuchen mit ED durch Kombination von fluss- und druckkonstantem Aufbau auf inno-

vative Art von gängigen Modellen ab, die nur einen der beiden Perfu-sionsmechanismen wählen. Diese Kombination erlaubt die Verwendung der beschriebenen physikalischen Einflüsse in einem sonst gleichmäßig druckkontrolliert perfundierten Aufbau. Die Integration in einen druck-konstanten Langendorff-Aufbau verbessert zudem die Möglichkeit der Forschung mit der ED im I/R-Versuch, für die ein rein flusskonstanter Aufbau weniger gut geeignet wäre. [75]

Zu berücksichtigen ist an diesem Punkt noch die Präkonditionierung durch das ED-Modell. Jedoch gab es keinen signifikanten Unterschied im Vergleich der IS von Kontroll- und Kaliumgruppe; die Präkonditionie-rung scheint also im Versuchsaufbau an sich begründet zu sein und sollte somit für alle Versuchs- und Kontrollgruppen gleich sein. Der ge-naue Mechanismus und Möglichkeiten, den Effekt zu reduzieren, sind Gegenstand weiterer Forschung. Aktuell muss die Präkonditionierung jedoch in weiterführenden Untersuchungen zur Auswirkung der ED auf konditionierende Maßnahmen lediglich bedacht und in die Auswertung der IS einbezogen werden.

Insgesamt zeigt sich also eine valide, gut funktionierende Methodik, die zuverlässig in Studien zur Kardioprotektion unter ED verwendet und dabei auch gut mit Modellen für weitere Komorbiditäten kombiniert werden kann. Der Ansatz der Kombination verschiedener Langendorff-Aufbauten bietet eine neue Perspektive auf das bewährte Modell.

Abbildungsverzeichnis

1	Vasodilatative Wirkung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase	3
2	S-Nitrosierung von Cystein	4
3	Entstehung der Atherosklerose	5
4	Entkopplung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS)	6
5	Aufbau der Langendorff-Anlage	14
6	Versuchsablauf: (a) Histamin und (b) SNP	30
7	Versuchsablauf: N ^ω -Nitro-L-Arginin-Methylester	31
8	Aufbau der Langendorff-Anlage zur druckkonstanten Kaliumperfusion	32
9	Versuchsablauf: Druckkonstante Methodikversuche	33
10	Versuchsablauf: Flusskonstante Methodikversuche	34
11	Korrelation der Perfusionsdruck (CPP)-Verminderung nach Histamin/Natriumnitroprussid (SNP) und vor Perfusion gemessenem CPP.	36
12	Beispielhafte Darstellung des Perfusionsdrucks (CPP) unter Histamin bei verschiedenen Perfusionsdrücken	37
13	Versuchsablauf: Infarktkontrollversuche	38
14	Hämodynamische Variablen unter Histamin	42
15	Hämodynamische Variablen unter Natriumnitroprussid (SNP)	44
16	Histamin und Natriumnitroprussid (SNP) unter N ^ω -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-Name)	46
17	Verhalten der Herzen unter Kaliumpuffer	48
18	Aufbau der Langendorff-Anlage zur druckkonstanten Kaliumperfusion mit Washout	50
19	KHP-Washout	51
20	Beispielhafte Aufzeichnung des linksventrikulären Drucks und der Herzfrequenz in LabChart	52
21	Koronarfluss nach druckkonstanter Kaliumperfusion und Histamingabe	53
22	Aufbau der Langendorff-Anlage zur flusskonstanten Kaliumperfusion im druckkonstanten Versuch	54
23	Koronarfluss nach Histamingabe in Versuchen mit flusskonstanter Kaliumperfusion (VR A)	55
24	Aufbau der Langendorff-Anlage zur flusskonstanten Perfusion	56

25	Endothelschädigung durch hochmolaren Kaliumpuffer bei einer flusskonstanten Laufrate von 8,5 ml/min (VR B)	57
26	Ischämie/Reperusionsversuche mit flusskonstanter Perfusion von 8,5 ml/min (VR 1)	59
27	Perfusionsdruckveränderungen unter Histamin und Natriumnitroprussid (SNP) nach Endothelschädigung mittels Kalium oder Triton (VR C)	63
28	Ischämie/Reperusionsversuche mit flusskonstanter Perfusion mit angepasstem Fluss (VR 2)	66
29	Einstellungen des Wärmebads	69
30	Ischämie/Reperusionsversuche mit angepasster flusskonstanter Perfusion und verbessertem Wärmemanagement (VR 3)	71
31	Transepithelialer elektrischer Widerstand (TEER) unter Kalium und Triton	73
32	Entwurf eines wärmeoptimierten kombinierten Langendorff-Modells	86
33	Wissenschaftliche Studien am Langendorff-Herzen seit 1973	90

Tabellenverzeichnis

1	Ausgewählte Veröffentlichungen zur Endothelschädigung mittels hochmolarer Kaliumpuffer	19
2	Geräte	22
3	Software	23
4	Materialien	23
5	Gase	23
6	Chemikalien	24
7	Krebs-Henseleit-Puffer	27
8	Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) mit hochmolarem Kalium . . .	27
9	Einstellung des Koronarflusses an der Pumpe	35
10	CPP unter Gabe von 100 μM N^ω -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-Name)	45
11	Perfusionsdruck (CPP) unter Kaliumperfusion mit 8,5 ml/min (VR B)	58
12	Hämodynamische Variablen: VR 1 (I/R-Versuche mit 8,5 ml/min Kaliumperfusion).	60
13	Ischämieparameter und Tiergewicht in den Ischämie/Reperfuionsversuchen mit 8,5 ml/min flus- skonstant (VR 1)	61
14	Perfusionsdruck (CPP) unter Kaliumperfusion mit angepas- ster Perfusion (VR C)	64
15	Hämodynamische Variablen: VR 2 (I/R-Versuche mit adap- tierter flusskonstanter Perfusion und verbesserter Wärme- zirkulation)	65
16	Ischämieparameter und Tiergewicht der Ischämie/Reperfuionsversuche mit angepasstem Fluss (VR 2)	67
17	Hämodynamische Variablen: VR 3 (I/R-Versuche mit adap- tierter flusskonstanter Perfusion und zweitem Wärmebad). .	70
18	Ischämieparameter und Tiergewicht der Ischämie/Reperfuionsversuche mit angepasstem Fluss und verbessertem Wärmemanagement (VR 3)	72
19	Veröffentlichungen zur Hypothermie in der Kardioprotektion	83

Literatur

1. SoRelle, R. Nobel Prize Awarded to Scientists for Nitric Oxide Discoveries. *Circulation* **98**, 2365–2366. ISSN: 0009-7322, 1524-4539. (2023) (Dez. 1998).
2. Xu, S. *et al.* Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacological Reviews* **73** (Hrsg. Ma, Q.) 924–967. ISSN: 0031-6997, 1521-0081. (2023) (Juli 2021).
3. Furchgott, R. F. & Zawadzki, J. V. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376. ISSN: 0028-0836, 1476-4687. (2023) (Nov. 1980).
4. Cherry, P. D., Furchgott, R. F., Zawadzki, J. V. & Jothianandan, D. Role of Endothelial Cells in Relaxation of Isolated Arteries by Bradykinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**, 2106–2110. ISSN: 0027-8424, 1091-6490. (2023) (März 1982).
5. Aggarwal, S., Randhawa, P. K., Singh, N. & Jaggi, A. S. Preconditioning at a Distance: Involvement of Endothelial Vasoactive Substances in Cardioprotection against Ischemia-Reperfusion Injury. *Life Sciences* **151**, 250–258. ISSN: 00243205. (2023) (Apr. 2016).
6. Alexander, Y. *et al.* Endothelial Function in Cardiovascular Medicine: A Consensus Paper of the European Society of Cardiology Working Groups on Atherosclerosis and Vascular Biology, Aorta and Peripheral Vascular Diseases, Coronary Pathophysiology and Microcirculation, and Thrombosis. *Cardiovascular Research* **117**, 29–42. ISSN: 0008-6363, 1755-3245. (2023) (1. Jan. 2021).
7. Münzel, T. *et al.* Physiology and Pathophysiology of Vascular Signaling Controlled by Cyclic Guanosine 3',5'-Cyclic Monophosphate-Dependent Protein Kinase. *Circulation* **108**, 2172–2183. ISSN: 0009-7322, 1524-4539. (2023) (4. Nov. 2003).
8. Wu, K. K. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity and Gene Expression. *Annals of the New York Academy of Sciences* **962**, 122–130. ISSN: 00778923, 17496632. (2023) (Mai 2002).

9. Förstermann, U. Janus-Faced Role of Endothelial NO Synthase in Vascular Disease: Uncoupling of Oxygen Reduction from NO Synthesis and Its Pharmacological Reversal. *Biological Chemistry* **387**. ISSN: 1431-6730, 1437-4315. (2023) (1. Jan. 2006).
10. Hattori, Y., Nakanishi, N., Akimoto, K., Yoshida, M. & Kasai, K. HMG-CoA Reductase Inhibitor Increases GTP Cyclohydrolase I mRNA and Tetrahydrobiopterin in Vascular Endothelial Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **23**, 176–182. ISSN: 1079-5642, 1524-4636. (2023) (Feb. 2003).
11. Karbach, S., Wenzel, P., Waisman, A., Munzel, T. & Daiber, A. eNOS Uncoupling in Cardiovascular Diseases - the Role of Oxidative Stress and Inflammation. *Current Pharmaceutical Design* **20**, 3579–3594. ISSN: 13816128. (2023) (2014-06-31).
12. Alderton, W. K., Cooper, C. E. & Knowles, R. G. Nitric Oxide Synthases: Structure, Function and Inhibition. *Biochemical Journal* **357**, 593–615. ISSN: 0264-6021, 1470-8728. (2023) (1. Aug. 2001).
13. Behrends, J. C. *et al.* *Duale Reihe Physiologie* 4. Aufl., b000000462. ISBN: 978-3-13-243862-0 978-3-13-243865-1. (2023) (Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2021).
14. Lima, B., Forrester, M. T., Hess, D. T. & Stamler, J. S. S - Nitrosylation in Cardiovascular Signaling. *Circulation Research* **106**, 633–646. ISSN: 0009-7330, 1524-4571. (2023) (5. März 2010).
15. Heinrich, T. A. *et al.* Biological Nitric Oxide Signalling: Chemistry and Terminology: NO Chemical Biology and Terminology. *British Journal of Pharmacology* **169**, 1417–1429. ISSN: 00071188. (2023) (Aug. 2013).
16. Fernando, V. *et al.* S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling. *Antioxidants* **8**, 404. ISSN: 2076-3921. (2023) (17. Sep. 2019).
17. Lai, T. S. *et al.* Calcium Regulates S-Nitrosylation, Denitrosylation, and Activity of Tissue Transglutaminase. *Biochemistry* **40**, 4904–4910. ISSN: 0006-2960, 1520-4995. (2023) (1. Apr. 2001).

18. Lima, B. *et al.* Endogenous S -Nitrosothiols Protect against Myocardial Injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 6297–6302. ISSN: 0027-8424, 1091-6490. (2023) (14. Apr. 2009).
19. Vedder, V. L., Aherrahrou, Z. & Erdmann, J. Dare to Compare. Development of Atherosclerotic Lesions in Human, Mouse, and Zebrafish. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **7**, 109. ISSN: 2297-055X. (2023) (30. Juni 2020).
20. Hunt, B. J. & Jurd, K. M. Endothelial Cell Activation. *BMJ* **316**, 1328–1329. ISSN: 0959-8138, 1468-5833. (2023) (2. Mai 1998).
21. Herrera-Zelada, N., Zuñiga-Cuevas, U., Ramirez-Reyes, A., Lavandero, S. & Riquelme, J. A. Targeting the Endothelium to Achieve Cardioprotection. *Frontiers in Pharmacology* **12**, 636134. ISSN: 1663-9812. (2023) (2. Feb. 2021).
22. Maruhashi, T. & Higashi, Y. Pathophysiological Association between Diabetes Mellitus and Endothelial Dysfunction. *Antioxidants* **10**, 1306. ISSN: 2076-3921. (2023) (18. Aug. 2021).
23. Xia, Y., Tsai, A.-L., Berka, V. & Zweier, J. L. Superoxide Generation from Endothelial Nitric-oxide Synthase. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 25804–25808. ISSN: 00219258. (2023) (Okt. 1998).
24. Janaszak-Jasiecka, A., Płoska, A., Wierońska, J. M., Dobrucki, L. W. & Kalinowski, L. Endothelial Dysfunction Due to eNOS Uncoupling: Molecular Mechanisms as Potential Therapeutic Targets. *Cellular & Molecular Biology Letters* **28**, 21. ISSN: 1689-1392. (2023) (9. März 2023).
25. Forstermann, U. & Sessa, W. C. Nitric Oxide Synthases: Regulation and Function. *European Heart Journal* **33**, 829–837. ISSN: 0195-668X, 1522-9645. (2023) (1. Apr. 2012).
26. Higashi, Y., Kihara, Y. & Noma, K. Endothelial Dysfunction and Hypertension in Aging. *Hypertension Research* **35**, 1039–1047. ISSN: 0916-9636, 1348-4214. (2023) (Nov. 2012).
27. He, L., Zhang, C.-L., Chen, Q., Wang, L. & Huang, Y. Endothelial Shear Stress Signal Transduction and Atherogenesis: From Mechanisms to Therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics* **235**, 108152. ISSN: 01637258. (2023) (Juli 2022).

28. Flammer, A. J. *et al.* The Assessment of Endothelial Function: From Research Into Clinical Practice. *Circulation* **126**, 753–767. ISSN: 0009-7322, 1524-4539. (2023) (7. Aug. 2012).
29. Herold. *Innere Medizin 2023* (De Gruyter, 2023).
30. Landmesser, U. & Drexler, H. The Clinical Significance of Endothelial Dysfunction. *Current Opinion in Cardiology* **20**, 547–551. ISSN: 0268-4705. (2023) (Nov. 2005).
31. Goloroush, P., Yellon, D. M. & Davidson, S. M. Mouse Models of Atherosclerosis and Their Suitability for the Study of Myocardial Infarction. *Basic Research in Cardiology* **115**, 73. ISSN: 0300-8428, 1435-1803. (2023) (Dez. 2020).
32. Fischer, D. *et al.* Endothelial Dysfunction in Patients with Chronic Heart Failure Is Independently Associated with Increased Incidence of Hospitalization, Cardiac Transplantation, or Death. *European Heart Journal* **26**, 65–69. ISSN: 1522-9645, 0195-668X. (2023) (1. Jan. 2005).
33. Landmesser, U. *et al.* Statin-Induced Improvement of Endothelial Progenitor Cell Mobilization, Myocardial Neovascularization, Left Ventricular Function, and Survival After Experimental Myocardial Infarction Requires Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation* **110**, 1933–1939. ISSN: 0009-7322, 1524-4539. (2023) (5. Okt. 2004).
34. Ibanez, B. *et al.* 2017 ESC Guidelines for the Management of Acute Myocardial Infarction in Patients Presenting with ST-segment Elevation. *European Heart Journal* **39**, 119–177. ISSN: 0195-668X, 1522-9645. (2023) (7. Jan. 2018).
35. De Gennaro Colonna, V. *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin AT1-receptor Antagonism Equally Improve Endothelial Vasodilator Function in L-NAME-induced Hypertensive Rats. *European Journal of Pharmacology* **516**, 253–259. ISSN: 00142999. (2023) (Juni 2005).
36. Landmesser, U. & Drexler, H. Effect of Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonism on Endothelial Function: Role of Bradykinin and Nitric Oxide. *Journal of Hypertension* **24**, S39–S43. ISSN: 0263-6352. (2023) (Suppl 1 März 2006).

37. Dicker, D. *et al.* Global, Regional, and National Age-Sex-Specific Mortality and Life Expectancy, 1950–2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* **392**, 1684–1735. ISSN: 01406736. (2023) (Nov. 2018).
38. Dai, Z. & Nomura, S. Recent Progress in Cardiovascular Research Involving Single-Cell Omics Approaches. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **8**, 783398. ISSN: 2297-055X. (2023) (16. Dez. 2021).
39. Lu, D. & Thum, T. RNA-based Diagnostic and Therapeutic Strategies for Cardiovascular Disease. *Nature Reviews Cardiology* **16**, 661–674. ISSN: 1759-5002, 1759-5010. (2023) (Nov. 2019).
40. Kubzansky, L. D. *et al.* Positive Psychological Well-Being and Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology* **72**, 1382–1396. ISSN: 07351097. (2023) (Sep. 2018).
41. McClellan, M., Brown, N., Califf, R. M. & Warner, J. J. Call to Action: Urgent Challenges in Cardiovascular Disease: A Presidential Advisory From the American Heart Association. *Circulation* **139**. ISSN: 0009-7322, 1524-4539. (2023) (26. Feb. 2019).
42. Banerjee, M. N., Bolli, R. & Hare, J. M. Clinical Studies of Cell Therapy in Cardiovascular Medicine: Recent Developments and Future Directions. *Circulation Research* **123**, 266–287. ISSN: 0009-7330, 1524-4571. (2023) (6. Juli 2018).
43. Mack, M. J. Minimally Invasive and Robotic Surgery. *JAMA* **285**, 568. ISSN: 0098-7484. (2023) (7. Feb. 2001).
44. Roth, S., Torregroza, C., Huhn, R., Hollmann, M. W. & Preckel, B. Perioperative Cardioprotection: Clinical Implications. *Anesthesia & Analgesia* **131**, 1751–1764. ISSN: 0003-2999. (2023) (Dez. 2020).
45. Torregroza, C. *et al.* Perioperative Cardioprotection: General Mechanisms and Pharmacological Approaches. *Anesthesia & Analgesia* **131**, 1765–1780. ISSN: 0003-2999. (2023) (Dez. 2020).
46. Baine, K. R. & Armstrong, P. W. Clinical Perspectives on Reperfusion Injury in Acute Myocardial Infarction. *American Heart Journal* **167**, 637–645. ISSN: 00028703. (2023) (Mai 2014).

47. Hausenloy, D. J., Tsang, A., Mocanu, M. M. & Yellon, D. M. Ischemic Preconditioning Protects by Activating Prosurvival Kinases at Reperfusion. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **288**, H971–H976. ISSN: 0363-6135, 1522-1539. (2023) (Feb. 2005).
48. Sharma, A. & Singh, M. POSSIBLE MECHANISM OF CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF ISCHAEMIC PRECONDITIONING IN ISOLATED RAT HEART. *Pharmacological Research* **41**, 635–640. ISSN: 10436618. (2023) (Juni 2000).
49. Feige, K. *et al.* Influence of Short and Long Hyperglycemia on Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning—A Translational Approach. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 14557. ISSN: 1422-0067. (2023) (22. Nov. 2022).
50. Caricati-Neto, A., Errante, P. R. & Menezes-Rodrigues, F. S. Recent Advances in Pharmacological and Non-Pharmacological Strategies of Cardioprotection. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 4002. ISSN: 1422-0067. (2023) (16. Aug. 2019).
51. Calmettes, G. *et al.* Hexokinases and Cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **78**, 107–115. ISSN: 00222828. (2023) (Jan. 2015).
52. Lecour, S. Activation of the Protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) Pathway against Reperfusion Injury: Does It Go beyond the RISK Pathway? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **47**, 32–40. ISSN: 00222828. (2023) (Juli 2009).
53. Hadebe, N., Cour, M. & Lecour, S. The SAFE Pathway for Cardioprotection: Is This a Promising Target? *Basic Research in Cardiology* **113**, 9. ISSN: 0300-8428, 1435-1803. (2023) (März 2018).
54. Jones, S. P. & Bolli, R. The Ubiquitous Role of Nitric Oxide in Cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **40**, 16–23. ISSN: 00222828. (2023) (Jan. 2006).
55. Ebner, B. *et al.* Uncoupled eNOS Annihilates Neuregulin-1 β -Induced Cardioprotection: A Novel Mechanism in Pharmacological Postconditioning in Myocardial Infarction. *Molecular and Cellular Biochemistry* **373**, 115–123. ISSN: 0300-8177, 1573-4919. (2023) (Jan. 2013).

56. Nandagopal, K., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Critical Role for Nitric Oxide Signaling in Cardiac and Neuronal Ischemic Preconditioning and Tolerance. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **297**, 474–478. ISSN: 0022-3565. pmid: 11303032 (Mai 2001).
57. Andelová, E., Barteková, M., Pancza, D., Styk, J. & Ravingerová, T. The Role of NO in Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart. *General Physiology and Biophysics* **24**, 411–426. ISSN: 0231-5882. pmid: 16474186 (Dez. 2005).
58. Bolli, R. Cardioprotective Function of Inducible Nitric Oxide Synthase and Role of Nitric Oxide in Myocardial Ischemia and Preconditioning: An Overview of a Decade of Research. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **33**, 1897–1918. ISSN: 00222828. (2023) (Nov. 2001).
59. Fender, A. C. & Dobrev, D. Nitric Oxide as a Fragile Switch between Cardioprotection and Cardiac Injury. *International Journal of Cardiology* **343**, 102–103. ISSN: 01675273. (2023) (Nov. 2021).
60. Jones, S. P. *et al.* Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury Is Exacerbated in Absence of Endothelial Cell Nitric Oxide Synthase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **276**, H1567–H1573. ISSN: 0363-6135, 1522-1539. (2023) (1. Mai 1999).
61. Jones, S. P. *et al.* Endothelial Nitric Oxide Synthase Overexpression Attenuates Myocardial Reperfusion Injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **286**, H276–H282. ISSN: 0363-6135, 1522-1539. (2023) (Jan. 2004).
62. Li, K., Rouleau, J. L., Andries, L. J. & Brutsaert, D. L. Effect of Dysfunctional Vascular Endothelium on Myocardial Performance in Isolated Papillary Muscles. *Circulation Research* **72**, 768–777. ISSN: 0009-7330, 1524-4571. (2023) (Apr. 1993).
63. Sun, J. *et al.* Regulation of the Cardiac Muscle Ryanodine Receptor by O₂ Tension and S-Nitrosoglutathione. *Biochemistry* **47**, 13985–13990. ISSN: 0006-2960, 1520-4995. (2023) (30. Dez. 2008).

64. Xu, L., Eu, J. P., Meissner, G. & Stamler, J. S. Activation of the Cardiac Calcium Release Channel (Ryanodine Receptor) by Poly-S-Nitrosylation. *Science* **279**, 234–237. ISSN: 0036-8075, 1095-9203. (2023) (9. Jan. 1998).
65. Luedike, P. *et al.* Cardioprotection Through S -Nitros(YI)Ation of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Circulation* **125**, 1880–1889. ISSN: 0009-7322, 1524-4539. (2023) (17. Apr. 2012).
66. Rassaf, T. *et al.* Circulating Nitrite Contributes to Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning. *Circulation Research* **114**, 1601–1610. ISSN: 0009-7330, 1524-4571. (2023) (9. Mai 2014).
67. Ferdinandy, P., Schulz, R. & Baxter, G. F. Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacological Reviews* **59**, 418–458. ISSN: 0031-6997, 1521-0081. (2023) (Dez. 2007).
68. Giricz, Z. *et al.* Hyperlipidaemia Induced by a High-Cholesterol Diet Leads to the Deterioration of Guanosine-3',5'-Cyclic Monophosphate/Protein Kinase G-dependent Cardioprotection in Rats: Role of cGMP-PKG Signalling in Cardioprotection. *British Journal of Pharmacology* **158**, 1495–1502. ISSN: 00071188. (2023) (Nov. 2009).
69. Wagner, C., Ebner, B., Tillack, D., Strasser, R. H. & Weinbrenner, C. Cardioprotection by Ischemic Postconditioning Is Abrogated in Hypertrophied Myocardium of Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **61**, 35–41. ISSN: 0160-2446. (2023) (Jan. 2013).
70. Gori, T. *et al.* Tolerance to Nitroglycerin-Induced Preconditioning of the Endothelium: A Human in Vivo Study. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **298**, H340–H345. ISSN: 0363-6135, 1522-1539. (2023) (Feb. 2010).
71. Fekete, V. *et al.* Myocardial Postconditioning Is Lost in Vascular Nitrate Tolerance: *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **62**, 298–303. ISSN: 0160-2446. (2023) (Sep. 2013).
72. Riquelme, J. A. *et al.* Dexmedetomidine Protects the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury by an Endothelial eNOS/NO Dependent Mechanism. *Pharmacological Research* **103**, 318–327. ISSN: 10436618. (2023) (Jan. 2016).

73. He, L. *et al.* Dexmedetomidine Preconditioning Attenuates Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Hearts with Endothelial Dysfunction. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **114**, 108837. ISSN: 07533322. (2022) (Juni 2019).
74. Kleinbongard, P., Bøtker, H. E., Ovize, M., Hausenloy, D. J. & Heusch, G. Co-morbidities and Co-medications as Confounders of Cardioprotection—Does It Matter in the Clinical Setting? *British Journal of Pharmacology* **177**, 5252–5269. ISSN: 0007-1188, 1476-5381. (2023) (Dez. 2020).
75. Bell, R. M., Mocanu, M. M. & Yellon, D. M. Retrograde Heart Perfusion: The Langendorff Technique of Isolated Heart Perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **50**, 940–950. ISSN: 00222828. (2023) (Juni 2011).
76. Raupach *et al.* Milrinone-Induced Pharmacological Preconditioning in Cardioprotection: Hints for a Role of Mitochondrial Mechanisms. *Journal of Clinical Medicine* **8**, 507. ISSN: 2077-0383. (2023) (12. Apr. 2019).
77. Dhein, S. in *Practical Methods in Cardiovascular Research* (Hrsg. Dhein, S., Mohr, F. W. & Delmar, M.) 155–172 (Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, 2005). ISBN: 978-3-540-40763-8. (2023).
78. Ferdinandy, P., Hausenloy, D. J., Heusch, G., Baxter, G. F. & Schulz, R. Interaction of Risk Factors, Comorbidities, and Comedications with Ischemia/Reperfusion Injury and Cardioprotection by Preconditioning, Postconditioning, and Remote Conditioning. *Pharmacological Reviews* **66** (Hrsg. Levy, F. O.) 1142–1174. ISSN: 0031-6997, 1521-0081. (2023) (Okt. 2014).
79. Klabunde, R. E., Ryan, K. M. & Paxson, C. E. Acute Hyperglycaemia Does Not Alter Coronary Vascular Function in Isolated, Perfused Rat Hearts. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **9**, 697–705. ISSN: 1462-8902, 1463-1326. (2023) (Sep. 2007).
80. Giraldez, R. R., Panda, A. & Zweier, J. L. Endothelial Dysfunction Does Not Require Loss of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **278**, H2020–H2027. ISSN: 0363-6135, 1522-1539. (2023) (1. Juni 2000).

81. Vitorino, P. R. *et al.* Coronary Vasodilation Impairment in Pilocarpine Model of Epilepsy. *Epilepsy & Behavior* **90**, 7–10. ISSN: 15255050. (2023) (Jan. 2019).
82. Cartier, R., Pellerin, M., Hollmann, C. & Pelletier, L. Effects of Pressure and Duration of Hyperkalemic Infusions on Endothelial Function. *The Annals of Thoracic Surgery* **55**, 700–705. ISSN: 00034975. (2023) (März 1993).
83. Kelm, M., Feelisch, M., Krebber, T., Motz, W. & Strauer, B. E. Mechanisms of Histamine-Induced Coronary Vasodilatation: H₁-Receptor-Mediated Release of Endothelium-Derived Nitric Oxide. *Journal of Vascular Research* **30**, 132–138. ISSN: 1423-0135, 1018-1172. (2023) (1993).
84. Farah, C. *et al.* Exercise-Induced Cardioprotection: A Role for eNOS Uncoupling and NO Metabolites. *Basic Research in Cardiology* **108**, 389. ISSN: 0300-8428, 1435-1803. (2023) (Nov. 2013).
85. Liu, Y., Song, Y., Li, S. & Mo, L. Cardioprotective Effect of Quercetin against Ischemia/Reperfusion Injury Is Mediated Through NO System and Mitochondrial K-ATP Channels. *Cell Journal (Yakhteh)* **23**. (2023) (Mai 2021).
86. Ranadive, S. M., Eugene, A. R., Dillon, G., Nicholson, W. T. & Joyner, M. J. Comparison of the Vasodilatory Effects of Sodium Nitroprusside vs. Nitroglycerin. *Journal of Applied Physiology* **123**, 402–406. ISSN: 8750-7587, 1522-1601. (2023) (1. Aug. 2017).
87. Cornett, J. B. & Shockman, G. D. Cellular Lysis of *Streptococcus Faecalis* Induced with Triton X-100. *Journal of Bacteriology* **135**, 153–160. ISSN: 0021-9193, 1098-5530. (2023) (Juli 1978).
88. Filice, E. *et al.* Crucial Role of Phospholamban Phosphorylation and S-Nitrosylation in the Negative Lusitropism Induced by 17 β -Estradiol in the Male Rat Heart. *Cellular Physiology and Biochemistry* **28**, 41–52. ISSN: 1421-9778, 1015-8987. (2023) (2011).
89. Hassanabad, Z., Furman, B., Parratt, J. & Aughey, E. Coronary Endothelial Dysfunction Increases the Severity of Ischaemia-Induced Ventricular Arrhythmias in Rat Isolated Perfused Hearts. *Basic Research in Cardiology* **93**, 241–249. ISSN: 0300-8428, 1435-1803. (2023) (20. Aug. 1998).

90. Griffith, T. M., Henderson, A. H., Edwards, D. H. & Lewis, M. J. Isolated Perfused Rabbit Coronary Artery and Aortic Strip Preparations: The Role of Endothelium-Derived Relaxant Factor. *The Journal of Physiology* **351**, 13–24. ISSN: 00223751. (2023) (1. Juni 1984).
91. Mankad, P. S., Chester, A. H. & Yacoub, M. H. Role of Potassium Concentration in Cardioplegic Solutions in Mediating Endothelial Damage. *The Annals of Thoracic Surgery* **51**, 89–93. ISSN: 00034975. (2023) (Jan. 1991).
92. Qian, J.-Q., Liu, S.-B., He, Y.-Y., Lee, W.-H. & Zhang, Y. α -Crystallin, a Non-Lens α -Crystallin and Trefoil Factor Complex from Amphibian Skin Secretions, Caused Endothelium-Dependent Myocardial Depression in Isolated Rabbit Hearts. *Toxicol* **52**, 285–292. ISSN: 00410101. (2023) (Aug. 2008).
93. Wilderer, P., Bräutigam, J. & Sekoulov, I. Application of Gas Permeable Membranes for Auxiliary Oxygenation of Sequencing Batch Reactors. *Conservation & Recycling* **8**, 181–192. ISSN: 03613658. (2023) (1985).
94. Hájos, N. *et al.* Maintaining Network Activity in Submerged Hippocampal Slices: Importance of Oxygen Supply. *European Journal of Neuroscience* **29**, 319–327. ISSN: 0953816X, 14609568. (2023) (Jan. 2009).
95. Scherrer-Crosbie, M., Rodrigues, A. C. T., Hataishi, R. & Picard, M. H. Infarct Size Assessment in Mice. *Echocardiography* **24**. ISSN: 0742-2822, 1540-8175. (2023) (Jan. 2007).
96. Speckmann, B. *et al.* Proinflammatory Cytokines Down-Regulate Intestinal Selenoprotein P Biosynthesis via NOS2 Induction. *Free Radical Biology and Medicine* **49**, 777–785. ISSN: 08915849. (2023) (1. Sep. 2010).
97. Sun, H., Chow, E. C., Liu, S., Du, Y. & Pang, K. S. The Caco-2 Cell Monolayer: Usefulness and Limitations. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **4**, 395–411. ISSN: 1742-5255, 1744-7607. (2023) (Apr. 2008).
98. Truse, R. *et al.* Topical Melatonin Improves Gastric Microcirculatory Oxygenation During Hemorrhagic Shock in Dogs but Does Not Alter Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers. *Frontiers in Medicine* **7**, 510. ISSN: 2296-858X. (2023) (28. Aug. 2020).

99. Wang, M. *et al.* Oxytocin Mediated Cardioprotection Is Independent of Coronary Endothelial Function in Rats. *Peptides* **130**, 170333. ISSN: 01969781. (2023) (Aug. 2020).
100. Pisano, A. in. *Physics for Anesthesiologists* 55–61 (Springer International Publishing, Cham, 2017). ISBN: 978-3-319-57329-8 978-3-319-57330-4. (2023).
101. Ghadhanfar, E. A. & Juggi, J. S. Effect of Preconditioning Temperature on Cardioprotection during Global Ischemia-Reperfusion in the Rat Heart. *Experimental and Clinical Cardiology* **12**, 11–16. ISSN: 1205-6626. pmid: 18650974 (2007).
102. Khaliulin, I. *et al.* Temperature Preconditioning of Isolated Rat Hearts - a Potent Cardioprotective Mechanism Involving a Reduction in Oxidative Stress and Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition Pore: Cardioprotection by Temperature Preconditioning. *The Journal of Physiology* **581**, 1147–1161. ISSN: 00223751. (2023) (15. Juni 2007).
103. Chien, G. L., Wolff, R. A., Davis, R. F. & Winkle, D. M. V. "Normothermic Range Temperature Affects Myocardial Infarct Size. *Cardiovascular Research* **28**, 1014–1017. ISSN: 0008-6363. (2023) (1. Juli 1994).
104. Mochizuki, T., Yu, S., Katoh, T., Aoki, K. & Sato, S. Cardioprotective Effect of Therapeutic Hypothermia at 34°C against Ischaemia/Reperfusion Injury Mediated by PI3K and Nitric Oxide in a Rat Isolated Heart Model. *Resuscitation* **83**, 238–242. ISSN: 03009572. (2023) (Feb. 2012).
105. Dash, R. *et al.* Dose-Dependent Cardioprotection of Moderate (32°C) Versus Mild (35°C) Therapeutic Hypothermia in Porcine Acute Myocardial Infarction. *JACC: Cardiovascular Interventions* **11**, 195–205. ISSN: 19368798. (2023) (Jan. 2018).
106. Knoop, B. *et al.* Cardioprotection by Very Mild Hypothermia in Mice. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy* **9**, 64–67. ISSN: 22233652, 22233660. (2023) (Feb. 2019).
107. Tang, X. N. & Yenari, M. A. Hypothermia as a Cytoprotective Strategy in Ischemic Tissue Injury. *Ageing Research Reviews* **9**, 61–68. ISSN: 15681637. (2023) (Jan. 2010).

108. Williams, G. R. & Spencer, F. C. The Clinical Use of Hypothermia Following Cardiac Arrest: *Annals of Surgery* **148**, 462–468. ISSN: 0003-4932. (2023) (Sep. 1958).
109. Colls Garrido, C. *et al.* The Effect of Therapeutic Hypothermia after Cardiac Arrest on the Neurological Outcome and Survival—A Systematic Review of RCTs Published between 2016 and 2020. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **18**, 11817. ISSN: 1660-4601. (2023) (11. Nov. 2021).
110. Hong, X.-Y., Hong, X., Gu, W.-W., Lin, J. & Yin, W.-T. Cardioprotection and Improvement in Endothelial-Dependent Vasodilation during Late-Phase of Whole Body Hypoxic Preconditioning in Spontaneously Hypertensive Rats via VEGF and Endothelin-1. *European Journal of Pharmacology* **842**, 79–88. ISSN: 00142999. (2023) (Jan. 2019).
111. Barbosa, V., Sievers, R. E., Zaugg, C. E. & Wolfe, C. L. Preconditioning Ischemia Time Determines the Degree of Glycogen Depletion and Infarction Size Reduction in Rat Hearts. *American Heart Journal* **131**, 224–230. ISSN: 00028703. (2023) (Feb. 1996).
112. Takata, K., Tomiyama, Y., Tanaka, K. & Oshita, S. Cardioprotective Effects of Hyperkalemia during Simulated Ischemia/Reperfusion in Neonatal Rat Cardiomyocytes-Preservation of Na⁺/K⁺-ATPase Activity-. *The Journal of Medical Investigation* **60**, 66–76. ISSN: 1343-1420, 1349-6867. (2023) (2013).
113. Habertheuer, A. *et al.* Cardioprotection: A Review of Current Practice in Global Ischemia and Future Translational Perspective. *Bio-Med Research International* **2014**, 1–11. ISSN: 2314-6133, 2314-6141. (2023) (2014).
114. Testai, L., Rapposelli, S., Martelli, A., Breschi, M. & Calderone, V. Mitochondrial Potassium Channels as Pharmacological Target for Cardioprotective Drugs: MITOCHONDRIAL POTASSIUM CHANNELS AS PHARMACOLOGICAL TARGET. *Medicinal Research Reviews* **35**, 520–553. ISSN: 01986325. (2023) (Mai 2015).
115. Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelağ, A. & Schulz, R. Isolated Heart Perfusion According to Langendorff—Still Viable in the New Millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **55**, 113–126. ISSN: 10568719. (2023) (März 2007).

116. PubMed, National Library of Medicine. Suchergebnisse Nach Jahr Für "Langendorff Heart". (2023). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=langendorff+heart>
117. Schulman, D., Latchman, D. S. & Yellon, D. M. Effect of Aging on the Ability of Preconditioning to Protect Rat Hearts from Ischemia-Reperfusion Injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **281**, H1630–H1636. ISSN: 0363-6135, 1522-1539. (2023) (1. Okt. 2001).
118. Przyklenk, K. Ischaemic Conditioning: Pitfalls on the Path to Clinical Translation: Ischaemic Conditioning and Clinical Translation. *British Journal of Pharmacology* **172**, 1961–1973. ISSN: 00071188. (2023) (Apr. 2015).
119. Swift, L. *et al.* Controlled Regional Hypoperfusion in Langendorff Heart Preparations. *Physiological Measurement* **29**, 269–279. ISSN: 0967-3334, 1361-6579. (2023) (1. Feb. 2008).
120. Graham, M. L. & Prescott, M. J. The Multifactorial Role of the 3Rs in Shifting the Harm-Benefit Analysis in Animal Models of Disease. *European Journal of Pharmacology* **759**, 19–29. ISSN: 00142999. (2023) (Juli 2015).

5 Danksagungen

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Benedikt Pannen für die Möglichkeit bedanken, die vorliegende Studie an seiner Klinik durchführen zu können. Ebenso bei Prof. Dr. Dr. Ragnar Huhn-Wientgen für den Platz in seiner Arbeitsgruppe.

Mein ganz besonderer Dank gilt PD Dr. Annika Raupach, für die umfassende und engagierte wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, ihre stetige Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen.

Außerdem möchte ich Prof. Dr. Dr. André Heinen für die Mitbetreuung und seine wertvollen Ratschläge danken.

Bei Dr. Martin Ströthoff bedanke ich mich für die verblindete Auswertung der Infarktgrößen dieser Studie.

Ich bedanke mich bei Dr. Jan Cieslik, für seinen unendlichen Rückhalt, Diskussionen über Statistik und Forschung, das Korrekturlesen dieser Arbeit und besonders für seinen unerschütterlichen Glauben an mich.

Weiterhin danke ich meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinem Bruder Christoph, für ihre Unterstützung, ihre Liebe, ihre Weisheiten und Ratschläge sowie für ihr Verständnis. Außerdem meinen beiden Omas, die mir vieles ermöglicht haben.

Bei Simon Meierkord möchte ich mich für wissenschaftlichen Austausch und Textkorrekturen bedanken.

Ich danke Sophie Denig, für ihre Korrekturen an dieser Arbeit sowie für ihr offenes Ohr und ihren moralischen Beistand.

Mein Dank gilt außerdem Claudia Dohle und Birgitt Berke für ihre zuverlässige und freundliche Hilfe im Laboralltag sowie Sarah König für die angenehme Zusammenarbeit im Langendorff-Labor.