

**Aus der Universitätsklinik für
Thorax-, Herz-, und Gefäß-Chirurgie Tübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. G. Ziemer**

**Ischämische und pharmakologische
Präkonditionierung von Schweineherzen im
Working-Heart-Modell**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**vorgelegt von
JENS STEFAN HAAS
aus Reutlingen**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. M. Scheule

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Hofbeck

Abstraktum

Die kardiale Ischämietoleranz wird durch ischämische Präkonditionierung erhöht. Hitzeschockproteine (HSP) initiieren diesen Mechanismus. Patienten mit Infarkttrisiko könnten von einer Präkonditionierung vor therapeutischen Eingriffen wie Koronarangioplastien und koronaren Bypassoperationen profitieren. Die pharmakologische HSP-Induktion ist derzeit in vivo nicht praktikabel. Herbimycin A eignet sich in vitro zur HSP-Induktion in Kardiomyozyten. Nach Vorbehandlung mit Herbimycin A wird an Schweineherzen im Working-Heart-Modell untersucht, ob dies auch in vivo erreichbar ist.

21 Ferkel ($10,6 \pm 1,2$ kg) werden in die Gruppen *Kontrolle (K)*, *ischämische (I)* und *pharmakologische (P) Präkonditionierung* ($n =$ jeweils 7) eingeteilt. Letztere erhalten 16 h präoperativ 0,1 mg Herbimycin A pro kg Körpergewicht i.v.. Alle Tiere werden unter standardisierter Vollnarkose sternotomiert. In der Ischämiegruppe wird vor der 5-minütigen, kalten, antegraden Blutkardioplegie ein Ramus diagonalis im Abstand von 5 min $3 \times$ je für 3 min okkludiert. Alle explantierten Herzen werden einer 84 min Ischämie unterbrochen durch 2 Intervalle mit 5 min Kardioplegie ausgesetzt. Nach 31 min Reperfusion mit 38°C physiologisch konditioniertem homologem Schweineblut erfolgt über 120 min die kontinuierliche Messung der Herzfunktion (Stroke-Work-Index, SWI) im ex situ Working-Heart-Modell. Vor und unmittelbar nach Ischämie sowie am Versuchsende werden Proben für die Untersuchung morphologischer und biochemischer Parameter entnommen (Wassergehalt, Beurteilung myokardialer Kontraktionsbanden und apoptotischer Zellkerne, Caspase-3, HSP70, Troponin-I, Laktat).

Der SWI ist während der ersten 30 min Working Heart in der Ischämiegruppe mit 9,38 (IQB: 6,66-13,29) $\text{dyn} \times \text{cm} \times \text{beats}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ signifikant höher (P 6,4; K 6,3; $p < 0,001$). Der Laktatwert ist am Versuchsbeginn in der Pharmagruppe mit 0,75 (IQB: 0,55-1,23) mmol/l signifikant höher (I 1,4; K 2,1; $p < 0,05$). Der Rückgang des HSP-Gehalts ist in der Pharmagruppe signifikant höher als in den Vergleichsgruppen ($p < 0,05$). Alle übrigen Werte unterscheiden sich nicht zwischen den Gruppen. Ischämisch präkonditionierte Herzen zeigen frühpostischämisch die besten Parameter. Eine pharmakologische Präkonditionierung scheint mit Herbimycin A in der verwendeten Dosierung nicht möglich zu sein.

MEINEN ELTERN

1	EINLEITUNG.....	10
1.1	Myokardiale Präkonditionierung.....	10
1.2	Ablauf der Präkonditionierung.....	10
1.2.1	First Window of Preconditioning (FWOP).....	12
1.2.2	Second Window of Preconditioning (SWOP).....	13
1.3	Induktion von Hitzeschockproteinen.....	15
1.3.1	Die Entdeckung der Hitzeschockproteine.....	15
1.3.2	Induktion von Hitzeschockproteinen.....	16
1.3.3	Die protektive Wirkung von Hitzeschockproteinen.....	16
1.3.4	Induktion von Hitzeschockproteinen im Herzen und deren therapeutisches Potential	17
1.3.5	Induktion von Hitzeschockproteinen durch Herbimycin A.....	18
1.4	Wirkungen der Präkonditionierung und ihr Nachweis	19
1.4.1	Working Heart Modell.....	19
1.4.2	Biochemie und Metabolismus.....	20
1.4.3	Morphologie.....	21
1.5	Fragestellung	23
2	MATERIAL UND METHODEN.....	24
2.1	Tierschutz und Versuchstiere	24
2.2	Versuchsablauf im Überblick	25
2.3	Operatives Vorgehen	25
2.3.1	Prämedikation und Narkose	25
2.3.2	Organgewinnung.....	27
2.4	Perfusionsmodell	29
2.4.1	Kardioplegie	32
2.4.2	Langendorff	32
2.4.3	Working Heart.....	32
2.4.4	Weitere Geräte	33
2.5	Perfusate	33
2.5.1	Blut	33
2.5.2	Kardioplegie	34
2.6	Datenverarbeitung.....	34

2.7	Funktionelle Parameter	35
2.8	Biochemische Parameter	36
2.8.1	Blutgase und Entnahme der Blutproben.....	36
2.8.2	Troponin I.....	37
2.8.3	Caspase 3.....	38
2.8.4	Hitzeschockproteine.....	39
2.9	Morphologische Parameter	40
2.9.1	Herzgewicht und myokardialer Wassergehalt.....	40
2.9.2	Histologie im Hinblick auf Kontraktionsbanden und Apoptose.....	40
3	ERGEBNISSE	44
3.1	Funktionelle Parameter	44
3.1.1	Stroke-Work-Index.....	44
3.2	Working-Heart-Dauer	46
3.3	Biochemische Parameter	46
3.3.1	Troponin I.....	46
3.3.2	Caspase 3.....	49
3.3.3	Laktat.....	49
3.4	Morphologische Parameter	52
3.4.1	Kontraktionsbanden.....	52
3.4.2	Apoptose.....	53
3.4.3	Myokardialer Wassergehalt.....	55
3.5	Hitzeschockprotein 70 (HSP 70)	55
4	DISKUSSION	59
4.1	Diskussion der Ergebnisse	59
4.1.1	Modell und Übertragbarkeit.....	59
4.1.2	Stroke-Work-Index.....	65
4.1.3	Zeiten.....	66
4.1.4	Dauer des Working Heart Modus.....	66
4.1.5	Troponin I.....	67
4.1.6	Caspase 3.....	68
4.1.7	Laktat.....	69
4.1.8	Kontraktionsbanden.....	70
4.1.9	Apoptose.....	71
4.1.10	Myokardialer Wassergehalt.....	72
4.1.11	Hitzeschockproteine.....	73

4.2	Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Präkonditionierung ..	74
4.2.1	Erstes und zweites Fenster der Präkonditionierung	74
4.2.2	Klinische Bedeutung der Präkonditionierung	76
4.3	Ausblick	77
5	ZUSAMMENFASSUNG, SCHLUSSFOLGERUNG	78
5.1	Klinische Problemstellung	78
5.2	Zielsetzung.....	78
5.3	Material und Methoden	78
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	79
5.5	Schlussfolgerung	79
6	LITERATURVERZEICHNIS	80
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	105

Abbildung 1: Ablauf der Präkonditionierung	11
Abbildung 2: Strukturformel von Herbimycin A	18
Abbildung 3: Versuchsablauf	25
Abbildung 4: Das kanülierte Herz	28
Abbildung 5: Schema des Perfusionsmodells	29
Abbildung 6: Bild des Perfusionsmodells	31
Abbildung 7: Stroke-Work-Index.....	45
Abbildung 8: Entwicklung des Troponin I-Gehalts in ng/ml	48
Abbildung 9: Entwicklung des Laktatgehalts in mmol/l	51
Abbildung 10: Vergleich ungeschädigtes Myokard und Kontraktionsbanden .	52
Abbildung 11: Verteilung der Kontraktionsbanden	53
Abbildung 12: Apoptotische Zellkerne	53
Abbildung 13: Auftreten von apoptotische Zellkernen am Versuchsende	54
Abbildung 14: Entwicklung des HSP-Gehalts in ng/ml	57

1 Einleitung

1.1 Myokardiale Präkonditionierung

Das Myokard besitzt die Fähigkeit, sich an Streßsituationen anzupassen. Dies kommt im Phänomen der Präkonditionierung (PK) zum Ausdruck. Die PK hat einen großen Anteil an der kardiologischen Forschung der letzten 15 Jahre. Seit der Publikation von Murry et al. im Jahre 1986¹³⁹, die sich dem Thema erstmals widmete, sind bis ins Jahr 2003 mehr als 2000 Veröffentlichungen erschienen, die direkt diesem Thema zugeschrieben werden können. Murrys Originalartikel aus dem Jahre 1986 ist der am häufigsten zitierte Artikel, den *Circulation* je publizierte.

Bei der Präkonditionierung wird ein subletaler, z.B. ischämischer Stress dazu benutzt, um die Toleranz des Myokards gegenüber einem nachfolgenden ischämischen Stress zu verbessern. Anfangs ging man von einer sofortigen Anpassung des Herzens an einen kurzen Verschluss der Koronararterien aus¹³⁹, heute gilt die PK als ein biphasisches Phänomen mit einer frühen Phase der Protektion (first window of protection - FWOP), die innerhalb weniger Minuten einsetzt und für 2 - 3 Stunden anhält, und einer späten Phase (second window of protection - SWOP), die nach 12 - 24 Stunden auftritt und 3 - 4 Tage anhält^{105,121}.

Die PK reduziert die Infarktgröße^{35,105,121,139}, das myokardiale Stunning¹⁹³, Arrhythmien⁹⁷ und endotheliale Fehlfunktionen⁹⁶. Hiervon können Patienten mit instabiler Angina pectoris und einem hohen Infarktrisiko profitieren. Weitere potentielle Anwendungsgebiete stellen herzchirurgische Eingriffe mit kontrollierter induzierter ischämischer Phase wie zum Beispiel aortokoronare Bypassoperationen oder die Protektion von Spenderorganen dar²¹⁹.

1.2 Ablauf der Präkonditionierung

Abbildung 1 zeigt den zeitlichen Ablauf der zum Phänomen der PK führenden Mechanismen.

1.2.1 First Window of Preconditioning (FWOP)

1.2.1.1 Trigger

Ischämie und Stickstoffmonoxid (NO). Klassischerweise ist die kritische Reduktion des myokardialen Blutflusses der Stimulus für die PK¹⁸⁰. Direkt nach der präkonditionierenden Ischämie kommt es zu einer NO-Produktion durch Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS). NO reagiert während der Reperfusion mit Superoxid-Anionen. Diese Reaktion führt zu Peroxynitrit, welches die ϵ -Isoform der Proteinkinase C (PKC) aktiviert²⁸. PKC öffnet K⁺_{ATP}-Kanäle, was letztlich über eine sarkolemmale Hyperpolarisation und/oder eine mitochondriale Depolarisation zum FWOP führt¹¹¹.

Adenosin ist ein weiterer Trigger, der den gleichen Signalweg wie NO aktiviert¹¹¹.

1.2.1.2 Signalwege

Proteinkinase C.

Die Entstehung von NO während des initialen ischämischen Stresses führt zu einer selektiven Translokation und Aktivierung von PKC _{ϵ} ^{28,155,158}. Die aktivierte PKC _{ϵ} führt über den o.g. K⁺_{ATP}-Kanal-abhängigen Mechanismus zum FWOP¹¹¹. Eine Hemmung der PKC _{ϵ} -Translokation und -aktivierung verhindert die PK¹⁶⁶. Bei Gabe von NO-Donatoren unter Ausschluß von Ischämie zeigt sich eine selektive Aktivierung der PKC _{ϵ} , die quantitativ gleich ausfällt wie bei der ischämisch-induzierten PK¹⁵⁵.

1.2.1.3 Mediatoren

K_{ATP}-Kanäle. Einen der letzten Schritte zum FWOP bringen zahlreiche Studien mit der sarkolemmalen Hyperpolarisation und/oder der mitochondrialen Depolarisation durch das Öffnen der K⁺_{ATP}-Kanäle in Verbindung^{4,111,117}. Diese Hypothese wird dadurch gestärkt, daß die K⁺_{ATP}-Kanäle mit Glibenclamid oder 5HD blockiert werden können und die Wirkung der ischämische PK in Hunden und Ratten verhindert wird^{5,68,104,179}.

1.2.2 Second Window of Preconditioning (SWOP)

1.2.2.1 Trigger

Das SWOP benötigt analog zur PKC-abhängigen Induktion des FWOP Trigger, die die nachfolgenden Signalwege aktivieren. Neben Ischämie/NO sind Adenosin, reaktive Sauerstoffradikale (ROS), Opioide und weitere Pharmaka als Proteinkinase C (PKC)/Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) aktivierende Stimuli bekannt.

Auf die Bedeutung des Pharmakons *Herbimycin A* wird im Kapitel 1.3.5 eingegangen.

Stickstoffmonoxid (NO). Zahlreiche Autoren beschreiben die Beteiligung des NO am SWOP^{27,28,88,167,197,198}. Die Bildung von Peroxynitrit führt zu einer Aktivierung der ϵ -Isoform der PKC (s. Kapitel 1.2.1.1). Der zum FWOP führende Signalweg über die PKC aktiviert zusätzlich die Signalkaskade über Tyrosinkinase (PTK) und Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK). Diese zusätzlich ausgelöste Kaskade führt verzögert zur Aktivierung von iNOS²⁸, die vorwiegend mitochondriale Kaliumkanäle¹⁷⁶ beeinflusst. Dies öffnet letztlich das zweite Fenster der Präkonditionierung⁹.

In Untersuchungen an Kaninchenherzen, die 24 Stunden zuvor einer präkonditionierenden Ischämie unterworfen worden waren, zeigte sich eine Reduzierung der Infarktgröße um 50% nach 30-minütiger Koronarokklusion und 3-tägiger Reperfusion¹⁶⁷. Exogen verabreichtes NO reicht ebenfalls aus, um die Ausbildung des SWOP zu induzieren, und zwar sowohl gegen das Stunning als auch gegen den Myokardinfarkt^{9,69,80,198}. Die Applikationsart spielt hierbei keine Rolle. Sowohl intravenös^{9,80} als auch transdermal⁸⁰ läßt sich der Effekt erzielen. Darüber hinaus unterliegt dieser Prozeß nicht der Entwicklung einer Nitrattoleranz⁸⁰.

Adenosin. Die Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren führt wie in Kapitel 1.2.1.1 genannt hauptsächlich zum FWOP^{4,111,116}. Gemäß der Untersuchungen von Baxter et al.¹⁶ läßt sich durch Adenosin-Agonisten auch im SWOP nach 24 Stunden eine Protektion nachweisen.

Reaktive Sauerstoffradikale sollen über den in Kapitel 1.2.1.1 genannten Peroxinitrit-Weg ebenfalls eine Protektion sowohl im FWOP als auch im SWOP triggern können¹⁹⁴.

Opioide. Versuche an Ratten⁵⁹ und Mäusen⁷⁰ deuten darauf hin, daß eine pharmakologische Aktivierung der δ_1 -Opioidrezeptoren eine Abnahme der Infarktgröße nach 24-48 Stunden bewirkt.

1.2.2.2 Mediatoren

Hitzeschockproteine. Die Auswirkungen von Hitzeschockproteinen (HSP) auf die Präkonditionierung werden im Kapitel 1.3 abgehandelt.

NO spielt eine Doppelrolle in der Physiologie der PK. Initial tritt es als Trigger auf^{9,27,80,167,198,198}, später als Mediator^{71,88,197,206}. Man nennt diesen Mechanismus auch die „NO-Hypothese der Präkonditionierung“²⁸. Die NO-Synthasen (NOS) werden zu den Mediatoren gezählt²⁹.

Mitochondriale Superoxid-Dismutase (MnSOD). Die Aktivität der MnSOD steigt 24 Stunden nach ischämischer PK an. Die MnSOD-Induktion findet zeitlich parallel zum SWOP statt²¹⁸. Die Zunahme der MnSOD-Aktivität nach Ischämie und Bewegung scheint durch die Bildung von Sauerstoffradikalen, TNF- α und Interleukin-1 β verursacht zu sein^{214,215,217}. Dieselbe Verknüpfung wurde nach Hyperthermie²¹⁷ und Belastung²¹⁴ beobachtet.

K_{ATP}-Kanäle. Ebenso wie die Aktivierung von PTK, MAPK und iNOS führt Diazoxid durch eine selektive Aktivierung der mitochondrialen K⁺_{ATP}-Kanäle zum SWOP in Ratten- und Kaninchenherzen^{63,167}. Die Vermeidung einer Ca²⁺-Überladung könnte hierfür ursächlich sein¹⁷⁶. Die Blockade der mitochondrialen K⁺_{ATP}-Kanäle kann das SWOP verhindern^{58,63,81,132,151,199}.

1.2.2.3 Signalwege

Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK). Es wurden mehr als 1000 verschiedene PTK entdeckt. Imagawa et al. zeigten durch den PTK-Inhibitor Genistein, daß PTK eine inhibitorische Rolle bei der ischämisch induzierten PK spielen⁸⁷. Genistein ist ein Inhibitor der meisten bekannten PTK. In Studien an Kaninchen^{49,158}

zeigte sich, daß die ischämische PK selektiv zwei Mitglieder der PTK-Familie (Src und Lck) aktiviert^{49,158}.

Proteinkinase C. Die Aktivierung des PKC-Signalweges durch beispielsweise Dioctanoyl-*sn*-Glycerol¹⁷ oder Hitze-Induktion²¹³ hat eine kardioprotektive Wirkung, die sich durch dessen Inhibition mit beispielsweise Chelerythrin aufheben läßt¹³. Die ischämische PK führt zu einer selektiven Translokation und Aktivierung von PKC_ε¹⁵⁸. Von NO abgeleitete Sauerstoffradikale aktivieren die PKC_ε entweder durch direkte oxidative Modifikationen oder durch Aktivierung von Phospholipiden^{155,198}.

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK). Ein weiterer Ansatzpunkt der PKC-abhängigen Kaskade ist die MAPK-Familie, die durch kurze Ischämiephasen in isolierten Herzen aktiviert werden kann^{154,192}. Das SWOP ist allerdings nur von kurzer Dauer^{156,157}. Die selektive Überexpression der PKC_ε in Kaninchenmyozyten bewirkt eine MAPK-Aktivierung und wirkt kardioprotektiv. Dieser Effekt kann durch selektive Inhibitoren aufgehoben werden¹⁵⁶.

Transkriptionsfaktoren. Die verstärkte Aktivierung von PKC und PTK induziert Transkriptionsfaktoren, die kardioprotektive Gene exprimieren. Einer dieser Faktoren ist der Nukleus-Faktor κB (NF-κB)²¹¹, der als Hauptmodulator der iNOS-Genexpression bekannt ist. Xuan et al. zeigten, daß ischämische PK eine schnelle Aktivierung von NF-κB nach sich zieht, und daß diese Wirkung durch die Gabe von NO-Donatoren imitiert wird²¹¹.

1.3 Induktion von Hitzeschockproteinen

1.3.1 Die Entdeckung der Hitzeschockproteine

1962 isolierte Ritossa aus hitzebehandelten Chromosomen von Speicheldrüsenzellen der Drosophila-Larven Proteine¹⁶⁹, die später als Hitzeschockproteine bezeichnet wurden^{115,149}. Neben Hitze können auch andere Streßfaktoren wie Virusinfektionen^{37,99,106}, Steroidhormone¹⁴⁵, Natriumarsenit¹¹³, Ethanol¹⁶² und Schwermetalle wie Kadmium¹¹⁴ diese Proteine induzieren. In Kardiomyozyten können darüber hinaus Ischämie und freie Radikal-Bildner diese Proteine induzieren¹⁶³.

Es zeigten sich Interaktionen der Proteine auf molekularer Ebene innerhalb der Zelle, beispielsweise am Steroidrezeptor⁵⁵ oder beim Ablauf des programmierten Zelltodes. Robertson et al. gelang der Nachweis, daß bei gehemmter HSP-Synthese die Apoptoserate stieg¹⁷⁰.

1.3.2 Induktion von Hitzeschockproteinen

Eine *in vitro*-Induktion von HSP70 gelang in der von Rattenherzen abgeleiteten H9c2-Zellreihe^{75,135} in nativen Myokardzellen⁴² und in Zellen des Koronarendothels der Ratte¹⁹⁶. Sowohl HSP27 als auch HSP70 zeigen dabei einen kardioprotektiven Effekt auf isolierte Myokardzellen¹²⁶. Zusätzlich wird eine ganze Reihe anderer Hitzeschockproteine wie HSP90, HSP60, und HSP56 induziert^{47,129,136}.

Eine *in vivo*-Induktion von HSP in der Langendorff-Perfusionsapparatur⁴³ zeigt sich auf verschiedene Stimuli wie Druck- oder Volumenüberlastung⁵¹, Exposition gegenüber Schwermetallen¹¹⁸ sowie Medikamenten wie Vasopressin, Angiotensin¹³⁶ oder Isopropenerol²⁰⁹. Sowohl durch Hitze- als auch durch Ischämievorbehandlung läßt sich eine Reduktion der Infarktgröße durch HSP-Synthese erzielen^{53,121}. Die induzierte HSP-Menge korreliert dabei mit der Ausprägung des kardioprotektiven Effekts^{123,82}.

Bei der spezifischen HSP70-Induktion in gentechnisch veränderten Mäusen¹²² zeigten sich kardioprotektive Effekte, die durch Reduktion der Infarktgröße und verringerter Creatinkinase-Expression verifiziert wurden. Die alleinige Überexpression von HSP70 reicht demnach *in vivo* aus, um die myokardiale Protektion zu erreichen.

1.3.3 Die protektive Wirkung von Hitzeschockproteinen

Die protektive Wirkung der HSP im Herzen entspricht dem in anderen Geweben und Zelltypen^{108,109}. Neben einer Beteiligung am Faltprozeß anderer Proteine² spielen die HSP auch bei weiteren biologischen Prozessen eine Rolle¹¹⁰ (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Aktivierungskaskade der HSP und deren protektiver Effekt

<u>Stimulus</u>	<u>Transkriptions – Faktor</u>		<u>Protektiver Effekt</u>
‚Stress‘ →	HSF-1	↘	↗ zunehmende Proteinfaltung ↗ Abbau abnormaler Proteine
Zytokine →	NF-IL6 STAT	↗	→ Inhibition von Apoptose ↘ Protektion des Zytoskeletts ↘ gesteigerte NO-Synthese
		Gen-Transkription → HSP-Synthese	

1.3.3.1 Hitzeschockproteine und Apoptose

Am Beginn der Apoptosekaskade steht freigesetztes mitochondriales Cytochrom C, das das Protein Apaf-1 oligomerisiert, welches wiederum Caspase-9 aktiviert.

HSP70 inhibiert die Verstärkung von Pro-Caspase-9 durch das oligomerisierte Apaf-1^{20,174} und kann darüber hinaus die Apoptose unabhängig von der Caspase hemmen^{60,91}. HSP27 bindet an Cytochrom C und verhindert dessen Bindung an Apaf-1^{32,64}. HSP90 bindet an Apaf-1 und verhindert somit dessen Bindung an Cytochrom C¹⁴⁸.

1.3.3.2 Hitzeschockproteine und das NO-System

Eine Überexpression von HSP70 erhöht die NO-Produktion²¹ und HSP90 stimuliert direkt eNOS⁶².

1.3.4 Induktion von Hitzeschockproteinen im Herzen und deren therapeutisches Potential

Pharmakologische Methoden. HSP können durch streßfreie Verfahren induziert werden, beispielsweise durch die Zytokine Interleukin-6¹⁸⁸ und Interleukin-10¹⁶⁸. Es wurde gezeigt, daß diese Induktoren nicht über den HSF-1-Weg sondern über NF-IL6 und STAT3 eine HSP-Expression bewirken^{189,190} (siehe Tabelle 1). Auch die HSP-Induktion durch den Tyrosinkinase-Inhibitor

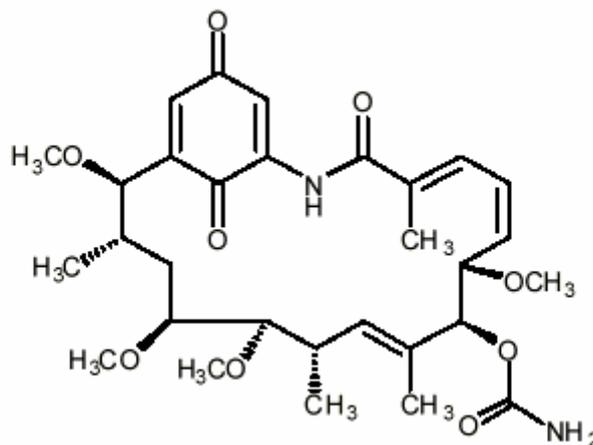
Herbimycin A in Myozytenkulturen verläuft über den selben Mechanismus^{38,137} (s. Kapitel 1.3.5).

Eine Induktion von HSP zeigte sich im perfundierten ex situ-Herzen durch Bimoclolomol²⁰⁴, Norepinephrin¹³⁴ und die Aktivierung des Adenosin A₁-Rezeptors⁴⁶. Demnach besteht eine Beziehung zwischen Adenosin und HSP.

Ischämische Präkonditionierung. In frühen Untersuchungen zeigte sich ein Anstieg des myokardialen HSP70-Gehalts innerhalb von 24 Stunden nach ischämischer PK^{102,121}. In darauf folgenden Studien konnte keine HSP70-Induktion in ischämisch präkonditionierten^{15,221} Kaninchenherzen nachgewiesen werden, obwohl es zur Ausbildung eines SWOP kam¹⁹. In anderen Studien wurde entweder Glibenclamid oder 5-Hydroxydecanoat (5HD) vor der hyperthermen oder der ischämischen Präkonditionierung verabreicht. In beiden Fällen konnte ein Anstieg des HSP-Gehalts nachgewiesen werden. Eine Infarktreduzierung zeigte sich aber nur, wenn eine der Substanzen 30 Minuten vor der Ischämie/Reperfusion gegeben wurde.

1.3.5 Induktion von Hitzeschockproteinen durch Herbimycin A

Abbildung 2: Strukturformel von Herbimycin A



Das Benzochinoid-Ansamycin Antibiotikum Herbimycin A hat die Molekularformel C₃₀H₄₂N₂O₉ (s. Abbildung 2) und ein Molekulargewicht von 574,3 Dalton. Herbimycin A inaktiviert die p^{60v}-src Tyrosinkinase durch eine

Reaktion mit den Thiolgruppen. Dieser Mechanismus wurde in einer ganzen Reihe von Zelltypen, wie beispielsweise Myozyten³⁸, Fibroblasten und humanen epidermalen Karzinomzellen¹³⁸ nachgewiesen. Eine Wirksamkeit hat sich auch an anderen Tyrosinkinasen gezeigt²⁰³.

Herbimycin A kann die Expression von Hitzeschockproteinen im Myokard erhöhen^{38,137}. Es kommt zu einer gesteigerten Expression von HSP durch die Bindung des Hitzeschockfaktors (HSF) an das Hitzeschockelement (HSE), das sich in der Promoterregion des HSP-Gens befindet³⁸.

Conde et al. zeigten, daß in Myokardzellen HSP70, HSP90 und HSP27 auf die Herbimycin A-Gabe exprimiert werden³⁸. Darüber hinaus wurde in dieser Studie nachgewiesen, daß Herbimycin A vorbehandelte, isolierte Kardiomyozyten gegenüber einem nachfolgenden ischämischen Streß widerstandsfähiger sind. Diese Toleranz war wirksamer als bei hyperthermisch präkonditionierten Kardiomyozyten. Zusätzlich wurde untersucht, ob Herbimycin A zu zellulären Schäden führt. Der fehlende Anstieg der gemessenen Creatinkinase widerlegte aber diese Vermutung, die sich auch in einer zusätzlichen Studie nicht bestätigte. Dort traten bei in vivo Anwendung in Mäusen keine unerwünschten toxischen Wirkungen dieser Substanz auf²²⁰.

Für den Tyrosinkinase-Inhibitor wird eine Wirksamkeit ab einer Konzentration von 0,3 bis 500 ng/ml, entsprechend 0,2 bis 333 µg/kg Körpergewicht (KG)¹⁸² mit einer Latenz von 16 bis 20 Stunden angegeben¹³⁷.

1.4 Wirkungen der Präkonditionierung und ihr Nachweis

1.4.1 Working Heart Modell

Das eingesetzte Working Heart Modell ist eine Weiterentwicklung des Langendorff'schen Verfahrens zur Perfusion isolierter Herzen¹⁰⁷. Der linke Ventrikel wird über den kanülierten linken Vorhof gefüllt und wirft das Blutperfusat aktiv in die Aorta ascendens aus, wodurch es der natürlichen Situation eines arbeitenden Herzens nahe kommt.

1.4.2 Biochemie und Metabolismus

Grundlage der Muskelkontraktion ist das Zusammenspiel von Aktin- und Myosinfilamenten. Das Aktinfilament besteht aus zwei spiralförmig ineinander verdrehten Aktinketten, dem in den Windungen dieser Ketten liegenden Tropomyosin sowie dem in quergestreifter Muskulatur vorkommenden Troponinkomplex. Er dient zur Steuerung der calciumabhängigen Wechselwirkung zwischen Aktin und Myosin, welche schließlich zur Kontraktion der Muskulatur führt.

Das kardiale Troponin-I gilt wegen seiner Freisetzung bei Myokardnekrosen und wegen seiner höheren Kardiospezifität als die Creatinkinase-MB als ein wichtiger Indikator für myokardiale Defekte nach herzchirurgischen Operationen und bei Verdacht auf akute myokardiale Infarzierung.

1.4.2.1 Caspase

Piot et al. beschreiben eine Verminderung der Apoptose nach Ischämie und Reperfusion durch eine Hemmung der Caspase-Aktivität im FWOP¹⁵⁹. Yadav et al. zeigten in Versuchen mit ischämischer Leber, daß die PK sowohl zu einer Reduzierung der apoptotischen Zellen als auch zu einer verbesserten Überlebensrate durch die Downregulation der Caspase 3-Aktivität führt²¹².

Die Bindung von TNF- α und Fas-L an ihre Rezeptoren führt zur Aktivierung von Procaspase 8 und 10. Aktivierte Caspase 8 und 10 bringen dann Caspase 3, 6 und 7 in ihre aktive Form, die dann den apoptotischen Zelltod auslösen. Außerdem steigt die mitochondriale Permeabilität und die Cytochrom C-Freisetzung durch zellulären Streß in einem rezeptorunabhängigen Signalweg. Cytochrom C bildet dann einen Komplex mit Apaf-1 und Procaspase 9 und aktiviert anschließend Caspase 3, die die Kaskade des apoptotischen Zelltods initiiert.

Studien belegen, daß ab einer Ischämiezeit von 45 Minuten 30% der Myozyten aktivierte Caspase 3 aufweisen, die sich leicht nachweisen läßt⁵⁷.

1.4.3 Morphologie

1.4.3.1 Kontraktionsbanden

Durch Ischämie und Reperfusion geschädigte Kardiomyozyten sind gekennzeichnet durch die Entstehung lichtmikroskopisch erkennbarer Kontraktionsbanden (KB). Diese bilden sich in nahezu allen Regionen des Myokards sowie in den Papillarmuskeln beider Ventrikel aus und sind potentiell reversibel. Der subendokardiale Anteil des Myokards ist von den Kontraktionsbanden am wenigsten betroffen.

Es handelt sich hierbei um Areale intensiver Kontraktion, die an die Disci intercalares angrenzen. Diese Kontraktionen führen zur sichtbaren Zerstörung von Sarkomeren mit Verschiebung der Myofilamente und Translokation der Mitochondrien, wobei das Sarkolemm intakt bleibt. Es resultiert eine geschwollene transversale Bande von ca. 10-20 µm Länge. Enzymhistochemisch läßt sich in diesen Arealen eine verminderte oder aufgehobene enzymatische Aktivität nachweisen, wobei die angrenzenden intakten Areale eine gesteigerte enzymatische Aktivität aufweisen¹²⁴.

1.4.3.2 Nekrose- und Apoptoserate

Zwei Mechanismen sind für den myokardialen Zelltod während Ischämie und Reperfusion verantwortlich: Nekrose und Apoptose. Die betroffenen Myozyten zeigen charakteristische morphologische und biologische Merkmale:

Nekrose ist die schnell auftretende Form des Zelltodes mit möglicher Entzündungsreaktion. Hierbei treten typischerweise eine starke zelluläre Schwellung, eine Denaturierung mit Koagulation der zytoplasmatischen Proteine und ein Zusammenbruch der Zellorganellen auf. Ultrastrukturelle Veränderungen beziehen sich auf den Mangel an Sauerstoff, die ATP-Erschöpfung, den Ausfall der Calciumhomöostase und den Defekt in der Membranpermeabilität. Zusätzlich kann eine Kontraktur die Membranzerstörung und den Zelltod beschleunigen⁴¹.

Apoptose ist ein energieabhängiger Prozeß, bei dem der Zelltod einem genetisch kontrollierten Programm folgt. Die hauptsächlichen morphologischen

Merkmale beinhalten eine Störung der Zellmembran-Phospholipide, der Kondensation des Chromatins und der Bildung cytoplasmatischer Blasen. Im letzten Schritt der Apoptose werden aus zellulären Fragmenten membrangebundene apoptotische Körperchen („apoptotic bodies“) gebildet, die den intrazellulären Inhalt umschließen und den Beginn einer Entzündungsreaktion verhindern^{12,72,73,120}.

Das gleichzeitige Vorkommen beider Zelltodtypen könnte die letzte Stufe des letalen myokardialen Schadens nach Ischämie und Reperfusion mitbestimmen^{12,92,161}. Es ist unklar, ob die Apoptose der Nekrose vorausgeht oder ihr nachfolgt. Eventuell laufen beide Mechanismen auch parallel auf verschiedenen Wegen ab. Den zeitlichen Ablauf der Apoptose-Entstehung in Bezug zur Nekrose wurde von Zhao et al. durch eine Studie an Kaninchen untersucht²²². Hier folgte einer einstündigen regionalen Ischämie eine Reperfusion von 6, 24, 48 oder 72 Stunden. Es zeigte sich, daß das Ausmaß der Nekrose nach 24 Stunden Reperfusion einen Höhepunkt erreicht und anschließend konstant bleibt. Dagegen stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen im perinekrotischen Gebiet bis 72 Stunden Reperfusion an. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß Nekrose und Apoptose gleichzeitig auftreten, die Nekrose in einer frühen Phase der Reperfusion und die Apoptose in einer späten Phase der Reperfusion.

Als Trigger der Apoptose kommen sowohl Zell-Zell-Interaktionen zwischen Blutzellen und Endothelzellen der Gefäße, als auch das Freiwerden von reaktiven Sauerstoffradikalen durch aktivierte Neutrophile, Endothelzellen und Myozyten in Frage²²³. Diese Wechselwirkungen beginnen schon zu Anfang der Reperfusion und dauern in den folgenden Stunden und Tagen an.

Der Ablauf der Apoptose beinhaltet rezeptorabhängige und –unabhängige Signalwege^{50,72}. Die Bindung der pro-apoptotischen Liganden an ihre Rezeptoren leitet einen Prozess ein, der in einem gestörten Gleichgewicht an Proteinbildungen (z.B. Bcl-2-Familie) und in einer Aktivierung von zytosolischen Proteasen (z.B. Caspase-Familie) endet. Die direkte Stimulierung des rezeptorunabhängigen Weges (z.B. die Aktivierung der Mitochondrien) bewirkt eine Freisetzung von Cytochrom C und bildet einen Komplex mit Apaf-1 und

Procaspase 9. Durch Haunstetter et al. wurde bestätigt, daß die Wandlung der Caspase von der inaktiven zur aktiven Form der entscheidende Schritt im Apoptoseablauf ist⁷³ (s. 1.4.2.1).

1.4.3.3 Reduktion der Apoptose durch die Präkonditionierung

In den bisher durchgeführten Studien mit Tieren zeigte sich ein Rückgang der experimentell induzierten Nekrose durch ischämische Präkonditionierung^{116,164,178}.

Es wurde gezeigt, daß das FWOP neben der Nekrosereduzierung sowohl in vivo als auch in vitro zu einer Apoptoseminderung führen kann^{56,128,131,141,160}.

Einige Studien zeigen eine geringere Apoptoserate auch im SWOP. Baghelai et al. demonstrierten, daß die Anzahl der apoptotischen Zellen in isoliert perfundierten Rattenherzen 24 Stunden nach der Stimulation der α 1-Adrenorezeptoren durch Phenylephrin signifikant zurückgeht⁶. Obwohl einige Untersuchungen eine Verminderung der Apoptose im SWOP zeigen, gibt es keinen Beweis für die apoptosehemmende Wirkung des SWOP.

1.5 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung beitragen, ob der Tyrosinkinase-Inhibitor Herbimycin A auch in vivo in der Lage ist, mittels Induktion von HSP zu einer pharmakologischen Präkonditionierung zu führen. Die Durchführbarkeit dieser Methode wurde bisher nur in vitro nachgewiesen.

Weiterhin soll untersucht werden, ob für die klinische Anwendbarkeit in der Herzchirurgie die präkonditionierende Wirkung des zweiten Fensters der PK der Wirkung des ersten Fensters entspricht.

Außerdem soll geprüft werden, ob die Präkonditionierung Nekrose und Apoptose sowie biochemische Parameter günstig beeinflusst.

2 Material und Methoden

2.1 Tierschutz und Versuchstiere

Alle Experimente wurden nach den Vorschriften und in Übereinstimmung mit den Richtlinien der „Internationalen Ethik-Kommission für Medizinische Wissenschaften und den Deutschen Gesetzen zum Schutz der Tiere für experimentelle Zwecke“ behandelt.

Die Studie wurde gemäß den gesetzlichen Vorschriften über den Tierschutzbeauftragten der Universität Tübingen der örtlichen Tierschutzkommission gemeldet (Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998, BGB S. 1105) und von ihr genehmigt. Es handelt sich um einen Terminalversuch unter permanenter Analgesie.

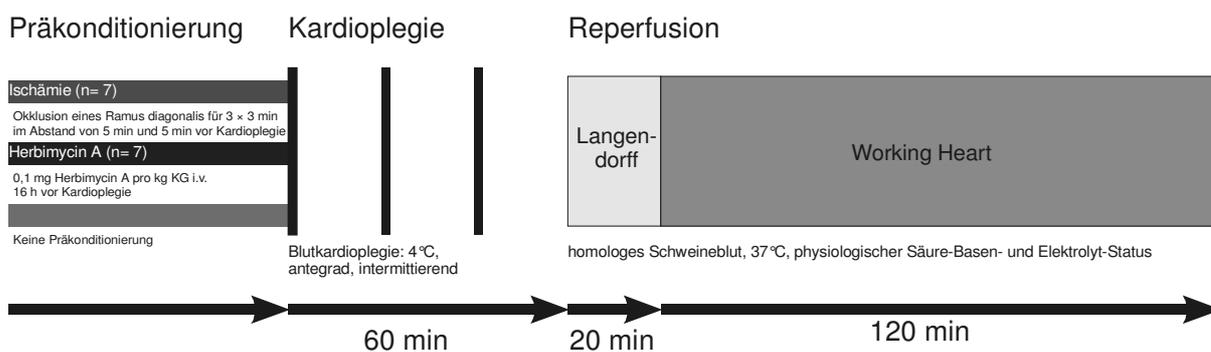
Die Herzen werden aus Ferkeln der Deutschen Landrasse mit einem Körpergewicht von etwa 12 kg entnommen. Die Tiere stammen aus einem Versuchsgut der Universität Hohenheim. Nach Adaptation von 7-14 Tagen werden die Tiere präoperativ bei freier Trinkmenge für 24 Stunden nüchtern gehalten. Die Tiere der Herbimycin A-Gruppe wurden 16 Stunden vor Versuchsbeginn bereits einer Kurznarkose unterzogen, um die Vorbehandlung mit Herbimycin A durchzuführen.

Die Herzen werden einer Ischämie von 80 min. Dauer im kalten, blutkardioplegischen Herzstillstand unterworfen. Je sieben Herzen sind vorgesehen für die drei folgenden Gruppen: Kontrolle, Ischämie, Herbimycin A. Nur die Herzen der Ischämie-Gruppe erhalten drei dreiminütige Ischämiephasen durch Okklusion eines Ramus diagonalis des Ramus interventricularis anterior in situ. Alle Herzen werden wie in Abbildung 3 gezeigt mit kalter, antegrader Blutkardioplegie nach Buckberg perfundiert. Postischämisch folgte bei allen Herzen eine zwanzigminütige Langendorff-Reperfusion mit homologem, physiologisch konditioniertem Schweineblut. Unmittelbar nach der Reperfusionsphase wird in die Phase des Working Heart

Modus übergegangen. Es werden die in den Kapitel 2.7 - 2.9 genannten Parameter bestimmt.

2.2 Versuchsablauf im Überblick

Abbildung 3: Versuchsablauf



2.3 Operatives Vorgehen

2.3.1 Prämedikation und Narkose

2.3.1.1 Prämedikation und Sedierung

Die Tiere stehen ab 24 Stunden vor Narkose-Einleitung unter Nahrungs-, nicht jedoch Flüssigkeitskarenz. Am Operationstag werden sie etwa ½ Stunde vor Narkose-Einleitung mit Atropinsulfat 0,1% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen; 0,05 mg/kg Körpergewicht (KG)) und Azaperon (Stresnil[®], Bayer Vital, Leverkusen; 4,0 mg/kg KG) intramuskulär prämediziert. Unter Sedierung mit Diazepam (Valium[®], Hoffmann-La Roche AG, Wyhlen; 1,0 mg/kg KG) und Ketaminhydrochlorid (Ketamin[®], Parke-Davis GmbH, Berlin; 10%; 7,0 mg/kg KG) kontralateral intramuskulär folgt der Auto-Transport im Transportcontainer über etwa 20 Minuten vom Tierstall zum Operationssaal.

Es schließt sich die u.g. Narkose-Einleitung an. Alle weiteren Eingriffe erfolgen unter Vollnarkose.

2.3.1.2 Besonderheit bei Tieren der Herbimycin A-Gruppe

Die Tiere der Herbimycin A-Gruppe werden bereits 16 Stunden vor Beginn des Versuchs mit Diazepam (1,0 mg/kg KG) und Ketaminhydrochlorid (7,0 mg/kg KG) durch intramuskuläre Injektion kurznarkotisiert. 0,1 mg pro kg KG Herbimycin A wird in 100 ml NaCl gelöst und über eine Ohrvene als Kurzinfusion über 20 – 30 Minuten appliziert. Die Tiere verbleiben bis zur Prämedikation und Sedierung im Tierstall.

2.3.1.3 Einleitung und Narkose

Zur Narkoseeinleitung wird in eine Ohrvene ein peripher venöser Zugang gelegt. Zeitgleich erfolgt die Präoxygenierung mit 100 % Sauerstoff für mindestens 3 Minuten über eine Beatmungsmaske. Die folgenden Schritte sind: Präkurarisierung mit 0,025 mg/kg KG Vecuronium (Norcuron[®], Organon-Teknika Medizinische Produkte GmbH, Eppelheim), Narkoseeinleitung über den venösen Zugang durch Bolusgabe von 0,006 mg/kg KG Fentanyl (Fentanyl-Janssen[®], Janssen-Cilag GmbH, Neuss) und nach 2 Minuten 2 mg/kg KG Propofol (Disoprivan[®] 1%, Astra Zeneca GmbH, Wedel) (Erlöschen des Nasenseptumreflexes).

Es erfolgt die endotracheale Intubation mit Lo-Contour[™] Magill Tubus 5,0 (Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland) mit anschließender volumenkontrollierter Beatmung (F_{iO_2} 0,4; Atemzugvolumen 15 ml/kg KG, Atemfrequenz 12 min⁻¹, *Respirator*: Sullia 800V, Dräger AG, Lübeck).

Die Narkose wird mit Flunitrazepam (Rohypnol[®], Hoffmann-La Roche AG, Wyhlen; 32 µg/kg KG/h) und Propofol (2,5 mg/kg KG/h) aufrechterhalten. Die kontinuierliche Analgesie wird mit Fentanyl (8 µg/kg KG/h) gewährleistet.

Unmittelbar vor der Kardioplegie erfolgt die tiefe Sedierung und Analgesierung der Tiere mit einer Bolusgabe von Rohypnol/Fentanyl und Propofol, die der dreifachen Induktionsdosis entspricht.

2.3.1.4 Arterieller Druckmeßkatheter und venöser Katheter

In einem ersten Schritt werden über eine Freilegung der rechtsseitigen Halsgefäße ein arterieller Druckmeßkatheter 20 G Abbocath[®] (Abbott, Sligo,

Irland) und ein zentraler Venenkatheter platziert. Die Narkotika werden dann über den zentralen Zugang appliziert.

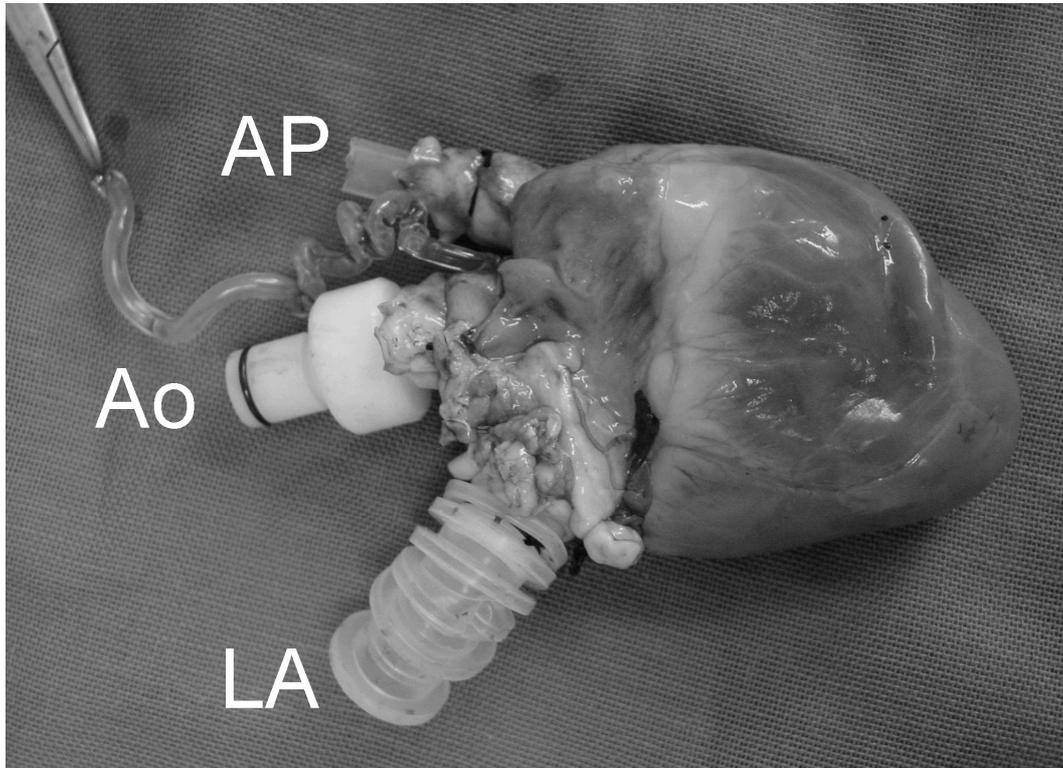
2.3.2 Organgewinnung

Über eine mediane Sternotomie erfolgt nach Eröffnung des Herzbeutels die Freilegung der großen Gefäße. Eine Kardioplegiekanüle (Jostra, Hirrlingen) wird in die Aorta ascendens eingeführt. Anschließend werden 2500 I.E. Heparin (Liquemin N, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen) sowie der Bolus von Rohypnol/Fentanyl und Propofol verabreicht.

In tiefster Narkose wird die Vena cava caudalis weit distal eröffnet. Unter kontinuierlicher Saugung wird nach Kollabieren des rechten Ventrikels die Aorta ascendens distal der Kardioplegiekanüle geklemmt und die erste Kardioplegiegabe erfolgt mit 40 mmHg für 5 Minuten. Währenddessen wird das Herz von außen mit eiskalter Kochsalz-Lösung gekühlt.

Die Explantation läuft nach Eintritt des Herzstillstandes und nach Dekonnektion vom Respirator in folgenden Schritten ab: Durchtrennung von Aorta, Arteria pulmonalis, Venae cavae cranialis et caudalis und der Venae pulmonales entlang der Trachea unter Schonung des Sinus coronarius.

Die Aorten-, Pulmonalis- und Vorhofanschlußstücke werden eingebracht und durch Ligaturen befestigt.

Abbildung 4: Das kanülierte Herz

AP: Arteria pulmonalis; Ao: Aorta; LA: linker Vorhof

Der rechte Vorhof wird zur Inspektion des interatrialen Septums eröffnet. Bei persistierendem Foramen ovale wird dieses durch eine Direktnaht verschlossen. Die Rechtsatriotomie wird mit einer fortlaufenden Nahtreihe wieder verschlossen. Zusätzlich werden überzählige Pulmonalvenenöffnungen sowie die Venae cavae ligiert. Die gesamte Präparation wird auf Eis durchgeführt.

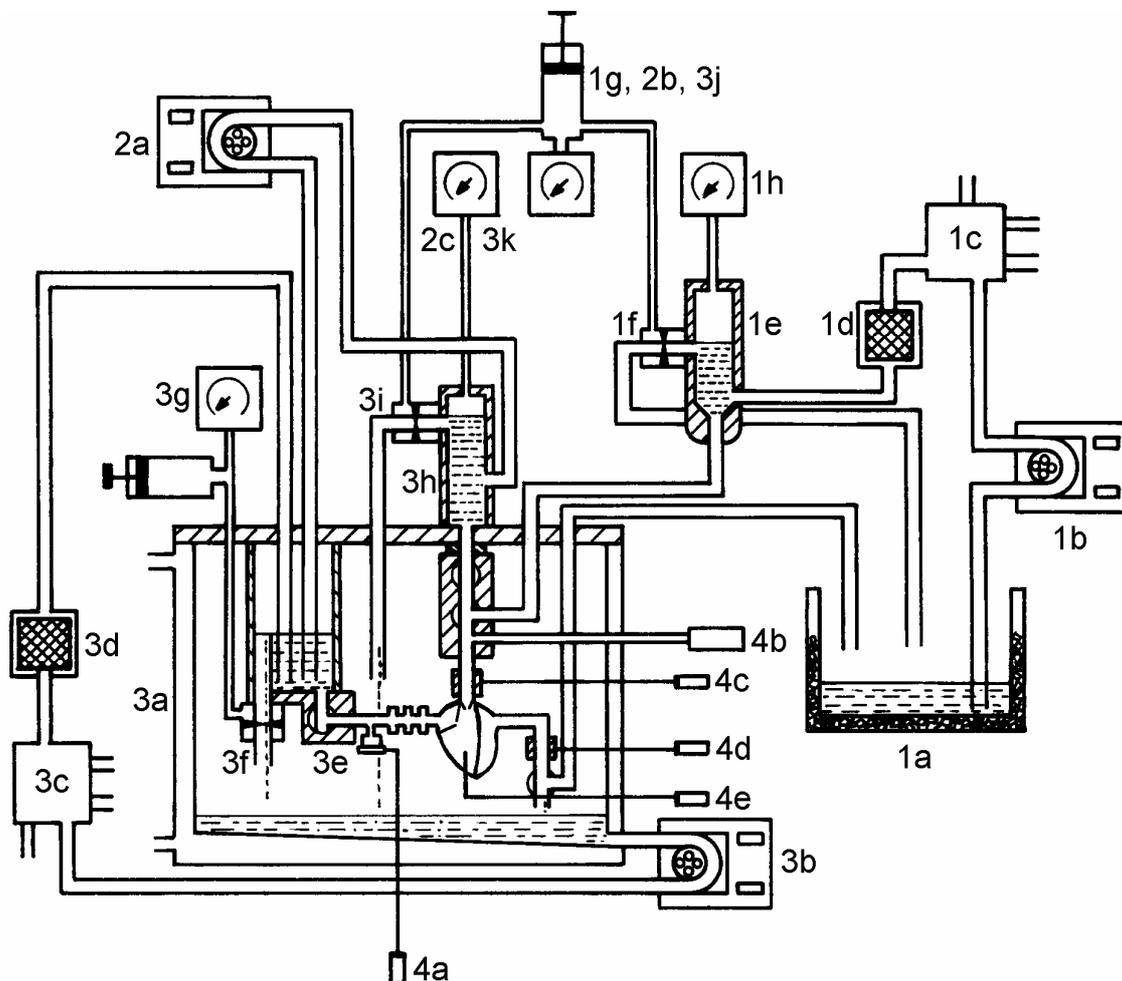
2.3.2.1 Besonderheit bei Tieren der ischämischen Versuchsgruppe

In den Herzen der Ischämie-Gruppe erfolgt vor der Bolusgabe von Rohypnol-Fentanyl und Propofol die ischämische Präkonditionierung. Hierfür wird ein umschriebenes linksmyokardiales Areal durch Okklusion des jeweils größten Ramus diagonalis wiederholten Ischämieperioden unterzogen. Auf drei intermittierende dreiminütige Ischämiephasen folgt jeweils eine fünfminütige Reperusionsphase. Anschließend erfahren die Herzen die identische Behandlung wie die Herzen der anderen Versuchsgruppen.

Die nachfolgenden Biopsien werden aus dem Ischämieareal gewonnen.

2.4 Perfusionsmodell

Abbildung 5: Schema des Perfusionsmodells



(Perfusionsmodell für isolierte Herzen, Größe 9, Hugo Sachs Elektronik, Harvard-Apparatus GmbH, March-Hugstetten)

Kardioplegiekreislauf

- 1a Kardioplegie Reservoir, eisgekühlt
- 1b Pumpe BVP (Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz)
- 1c Oxygenator Monolyth (Sorin Biomedica, Mirandola, Modena, Italien)
- 1d Partikelfilter, 38 μ Arterial Filter (Affinity; Medtronic, Minneapolis, MN, USA)
- 1e Kardioplegieblock
- 1f Kardioplegie Überlauf mit Membran zur Druckeinstellung
- 1g Einstellung des Kardioplegie-Perfusionsdruckes mit Anzeige
- 1h Anzeige des wirksamen Kardioplegie Perfusionsdruckes

Langendorffkreislauf

- 2a Pumpe BVP (Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz)
 - 2b Einstellung des Langendorff Perfusionsdruckes mit Anzeige
 - 2c Anzeige des wirksamen Langendorff Perfusionsdruckes
-

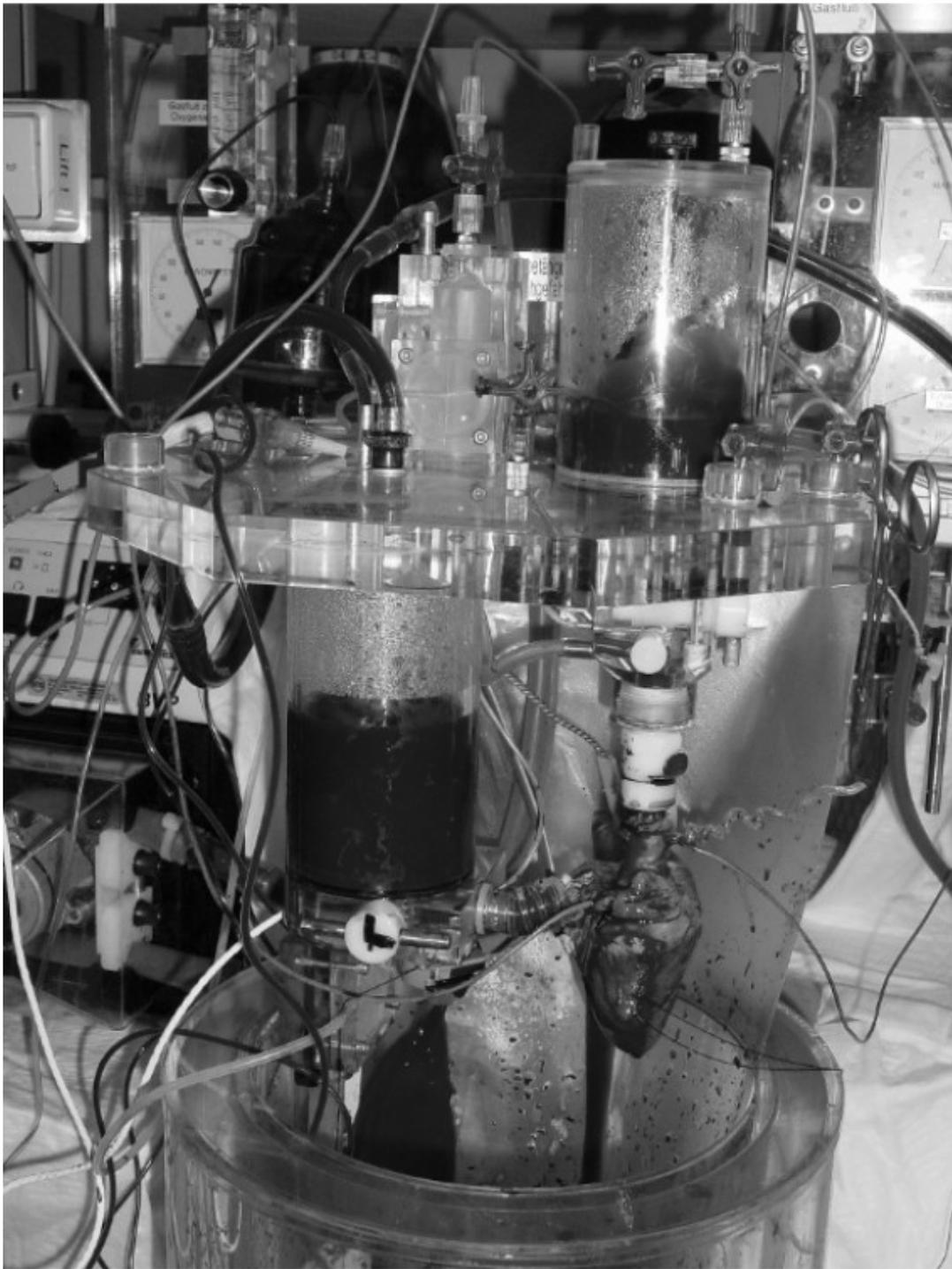
Working Heart Kreislauf

- 3a Perfusat Reservoir mit Anschluß zur Erwärmung
 - 3b Pumpe BVP (Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz)
 - 3c Oxygenator Monolyth (Sorin Biomedica, Mirandola, Modena, Italien)
 - 3d Partikelfilter, 38 μ Arterial Filter (Affinity; Medtronic, Minneapolis, MN, USA)
 - 3e Vorlastbehälter
 - 3f Vorlastbehälter Überlauf mit Membran zur Druckeinstellung
 - 3g Einstellung der Vorlast mit Anzeige der wirksamen Vorlast
 - 3h Nachlastbehälter
 - 3i Nachlastbehälter Überlauf mit Membran zur Druckeinstellung
 - 3j Einstellung der Nachlast mit Anzeige
 - 3k Anzeige der wirksamen Nachlast
-

Druckaufnehmer und Meßsensoren

- 4a Druckaufnehmer für Vorlast (Medex Merdical GmbH, Ratingen)
 - 4b Druckaufnehmer für Nachlast sowie Kardioplegie- und Langendorff Perfusionsdruck Typ IsotecTM (Hugo Sachs Elektronik, Harward Apparatus GmbH, March-Hugstetten)
 - 4c Aortenflußsensor Typ 20 A 309 (Transonic Systems Inc., Ithaca, USA)
 - 4d Koronarflußsensor Typ 4 N RB 819 (Transonic Systems Inc., Ithaca, USA),
konnectiert mit Anschlußstück der A. pulmonalis
 - 4e Mikro-TIP Katheter Typ SPC-350 (Millar Instruments Inc., Houston, USA)
über einen Biopsiekanal in der Herzspitze in den linken Ventrikel
eingebracht zur Registrierung des links-ventrikulären Druckes sowie
dessen Änderungsfrequenz
-

Abbildung 6: Bild des Perfusionsmodells



2.4.1 Kardioplegie

Die zwei im Perfusionsmodell verabreichten Kardioplegiegaben erfolgen über jeweils fünf Minuten in zwanzigminütigen Abständen über die Aortenwurzel mit konstant 40 mmHg Perfusionsdruck. Zwischenzeitlich wird das Herz mit eiskalter Kochsalzlösung gekühlt.

2.4.2 Langendorff

Während der Kardioplegiezyklen wird das vorbereitete Blutperfusat im Perfusionsmodell oxygeniert und auf 38 °C erwärmt. Unmittelbar vor Beginn der Langendorff-Perfusion werden die Koronarien mit Blutperfusat entlüftet. Die antegrade Perfusion der Koronarien erfolgt über eine retrograde Perfusion der Aortenwurzel mit konstant 60 mmHg. Bei Einsetzen von Kammerflimmern wird mit 10-20 Joule defibrilliert. Der zuvor rechts epimyokardial aufgenähte Schrittmacher wird im VVI-Modus auf eine Frequenz von 100/min eingestellt.

Während der Langendorff-Perfusion werden Blutgase und Elektrolyte engmaschig kontrolliert und gegebenenfalls auf physiologische Werte korrigiert.

2.4.3 Working Heart

Noch vor Erreichen des Working Heart-Modus wird über einen bestehenden Biopsiekanal in der Herzspitze der TIP-Katheter (Millar Instruments Inc., Houston, USA) in den linken Ventrikel vorgeschoben, um die linksventrikulären Drücke und Indices sowie deren Änderungen aufzunehmen.

Es folgt die Umstellung von der Langendorff-Perfusion in die Working-Heart-Phase, wofür über das Vorhofanschlußstück eine Vorlast von 10 mmHg angelegt wird. Die Nachlast wird auf 60 mmHg eingestellt. Der Aortenfluß wird über den Flußmeßkopf registriert.

Der Working-Heart-Modus wird fortgeführt bis ein Aortenfluß nicht mehr nachzuweisen ist, maximal jedoch zwei Stunden.

Auch während dieses Versuchabschnittes wird die Bluttemperatur konstant auf 38 °C gehalten und die Blutgase sowie die Elektrolyte ständig durch Blutgasanalysen auf die in Kapitel 2.5 genannten Werte eingestellt.

2.4.4 Weitere Geräte

- *Druckmeßgerät:* Plugsys Rack Typ 603 (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) zur Registrierung der Vorlast, der Nachlast, des linksventrikulären Druckes und dessen Änderungsfrequenz sowie des Kardiolegie- und Langendorff Perfusionsdruckes.
- *Blutgasanalysegerät:* Mit dem STAT profile 9 (NOVA biomedical GmbH, Rödermark) werden pH, pCO₂, pO₂, Hämatokrit, Natrium-, Kalium-, Kalzium (ionisiertes)- und Chloridkonzentration, Glukose sowie Laktat gemessen und daraus die Sauerstoffsättigung, Basenabweichung/Blut und Plasma, Anionen-Lücke, Osmolarität, das aktuelle und Standard Bikarbonat, Gesamtkarbonat, normalisierte Kalzium, Hämoglobin und der Sauerstoffgehalt errechnet.
- *Waage:* Mettler P1200N (Colora Messtechnik GmbH, Lorch)
- *Defibrillator:* HP43120A Defibrillator (Hewlett Packard, McMinnville, USA)
- *Zentrifuge:* Varifuge RF inert (Heraeus Holding GmbH, Stuttgart)
- *Herzschrittmacher:* Medtronic® 5375 (Medtronic, Minneapolis, MN, USA)

2.5 Perfusate

2.5.1 Blut

Hierfür wird frisches Stichblut von Schlachtschweinen mit 5000 I.E./l Heparin antikoaguliert und mit 160 mg Gentamycin (Refobacin, Merck KGaA, Darmstadt) versetzt. Das Perfusat wird bei 38°C mit den in Tabelle 2 genannten Additiven auf die ebenfalls dort genannten Zielgrößen eingestellt.

Tabelle 2: Additive des Blutperfusats

Zielgröße	Additive
Hämatokrit: 20-25 Hämoglobin: ~8 g/dl	Krebs-Henseleit-Lösung (kaliumfrei, Universitätsapotheke Tübingen)
Heparin: 5000 i.E.	Heparin-Natrium (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen)
Glukose: ~180 mg/dl	Glukose 40% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen)
Hydrokortison: 100 mg	Hydrocortison (Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen)
Kalium: ~5 mmol/l	Kaliumchlorid (1 mmol/ml, Delta-Pharma GmbH, Pfullingen)
Alt-Insulin: 20 i.E./l	Alt-Insulin (Aventis, Frankfurt/Main)
pH: ~7,35-7,45	Regulierung über Gasfluß, ggf. Titration mit NaHCO ₃ 8,4% oder HCl 0,3 molar

2.5.2 Kardioplegie

Perfusat und Blutkardioplegielösung nach Buckberg (Lösung A und B, Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein) werden 4:1 gemischt und auf 4°C abgekühlt.

2.6 Datenverarbeitung

Zur Erfassung der hämodynamischen Parameter wird die Software Haemodyn[®] W für Microsoft[®] Windows[®] 95/98/NT (Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten) verwendet. Aufgezeichnet werden die in Tabelle 3 genannten Parameter.

Die Rohdaten werden in einer Excel 97-Tabelle (Microsoft Corporation, Redmond WA, USA) gesammelt. Die statistischen Berechnungen werden mit Jump Version 3.2.2 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) durchgeführt. Die Werte sind als Median mit Interquartilbereich dargestellt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen werden mit der im Programm Jump bereitgestellten Varianzanalyse (ANOVA) auf Signifikanz getestet. P-Werte von weniger als 0,05 werden als signifikant betrachtet. Der Stroke-Work-Index wird während der Working Heart Periode alle 2 Sekunden berechnet, das Rollende Mittel über eine Minute wird gegen die Zeit aufgetragen, die resultierenden Steigungen werden mit ANOVA auf Gruppenunterschiede untersucht.

In allen Gruppen werden bei allen statistischen Erhebungen die Werte von jeweils sieben Versuchen berücksichtigt.

2.7 Funktionelle Parameter

Die in Tabelle 3 genannten Parameter werden kontinuierlich registriert.

Tabelle 3: Registrierung funktioneller Parameter

	Operation	Kardioplegie	Langendorff	Working Heart
Aortendruck, AP	×	×	×	×
		(40 mmHg)	(60 mmHg)	(60 mmHg)
ZVD	×			×
LVP _{syst., diast., enddiast.}	×			×
HR	×			×
AF	×			×
CF		×	×	×
LAP _{max, min, mittel}				×
				(10 mmHg)
dLVP/dt				×

ZVD: zentralvenöser Druck; LVP: linksventrikulärer Druck; HR: Herzfrequenz; AF: Aortenfluß; CF: Koronarfluß; LAP: linksatrialer Druck; HG: Herzgewicht; dLVP/dt: Änderung des linksventrikulären Druckes über die Zeit

Aus den ermittelten Parametern läßt sich der Stroke-Work-Index (Schlag-Arbeits-Index; SWI) als Maß für die Arbeit des Herzens wie folgt ermitteln:

$$\text{SWI} = \frac{(\text{AP}_{\text{mittel}} - \text{LVP}_{\text{enddiast.}}) \times \text{AF}}{\text{HR} \times \text{HG}} \times 1333,3$$

2.8 Biochemische Parameter

2.8.1 Blutgase und Entnahme der Blutproben

Die Blut- und Gewebeprobenentnahmen werden nach dem folgenden Schema durchgeführt:

Zur Bestimmung der Hämolyse werden Proben in 9 ml Citratmonovetten (Saarstedt, Nümbrecht) zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

- nach dem 1. Ischämiezyklus (nur bei Schweinen der Ischämiegruppe)
- vor Beginn der Kardioplegie
- unmittelbar, fünf und zehn Minuten nach dem Beginn der Langendorff-Reperfusion
- eine und zwei Stunden nach Beginn des Working Heart-Modus

In einer 9 ml Serum-Monovette[®] (Saarstedt) zur Gewinnung von Troponin I:

- nach dem 1. Ischämiezyklus (nur bei Schweinen der Ischämiegruppe)
- unmittelbar nach Beginn der Langendorff-Reperfusion
- eine sowie zwei Stunden nach Beginn des Working Heart-Modus

Zusätzlich werden in kurzen, regelmäßigen Abständen arterielle und venöse Blutabnahmen gewonnen.

Biopsien aus dem Myokard des linken Ventrikels (bei der Ischämiegruppe aus dem Ischämieareal des linken Ventrikels) werden zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

- nach Eröffnung des Perikards
- unmittelbar vor Beginn der Langendorff-Reperfusion
- am Versuchsende, also nach zwei Stunden Working Heart-Modus

2.8.1.1 Verarbeitung und Lagerung

Zur Gerinnung und Sedimentation werden die Proben für die Troponin I-Bestimmung bei Raumtemperatur eine Stunde stehengelassen und anschließend für fünf Minuten zentrifugiert und schließlich bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die arteriellen und venösen Blutproben werden sofort nach Entnahme im Blutgasanalysegerät (NOVA biomedical GmbH, Rödermark) auf Blutgase, pH-Wert, Elektrolytstatus (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}), Glukose, Laktat, Hämatokrit, Hämoglobin, Basenstatus und Sauerstoffsättigung untersucht.

Zu jedem genannten Abnahmezeitpunkt werden vier Biopsien gewonnen. Drei dieser Biopsien werden umgehend nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei -70°C gelagert. Eine Probe wird sofort in 5 %-igem Formalin diffusionsfixiert und bei 4°C gelagert. Zusätzlich werden am Versuchsende die Herzen in Formalin fixiert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.8.2 Troponin I

Die in Serummonovetten entnommenen Blutproben werden nach Versuchsende über 5 min. bei ca. 4700 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wird auf drei Eppendorf-Küvetten verteilt und diese werden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Nach Wiederauftauen der Seren werden mit dem Advia Centaur (Bayer AG, München) die Troponinwerte im Zweistufen-Sandwich-Immunoassay bestimmt:

- Dispension von 100 μl Serum in eine Küvette
- Dispension von 100 μl Lite Reagenz (polyklonaler Ziege-Anti-Troponin I Antikörper, markiert mit Acridiniumester) und Inkubation der Reagenzien 2,5 Minuten bei 37°C
- Dispension von 200 μl Solid Phase Reagenz (Kombination monoklonaler Maus-Anti-Troponin I Antikörper, welche an paramagnetische Partikel kovalent gebunden sind) und Inkubation 5 Minuten bei 37°C
- Dispension von jeweils 300 μl Reagenz A (Säure) und Reagenz B (Base), um die Chemolumineszenz-Reaktion auszulösen

2.8.3 Caspase 3

Aus dem linken Ventrikel wird ein Gewebestückchen entnommen, in einem Kryogefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -70 °C gelagert.

Zunächst wird die Konzentration des Gesamtproteins bestimmt, um später den Anteil der Caspase 3 in ng/ml zu berechnen. Dazu wird aus dem Gewebestückchen eine ca. 8 mm³ große Probe entnommen und in einer Eppendorf Küvette mit 10 Umdrehungen zermörsert. Mittels des BCA-200 Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) wird die Gesamtproteinkonzentration im MR 7000 Photometer (Dynatech GmbH, Denkendorf) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen.

Die Gesamtproteinkonzentration wird mit Calibrator Diluent RD5-20 (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Norderstadt) auf 800 µg/ml eingestellt.

Die Bestimmung der Caspase 3 erfolgt mittels Quantikine[®] (R&D Systems GmbH), einem quantitativen Sandwich-Enzym-Immunoassay:

Eine Mikroplatte wird zunächst mit einem monoklonalen Caspase 3 spezifischen Antikörper imprägniert. Aktiver Caspase 3-Biotin-Inhibitor, Standardlösungen und die zermörserten Zellextrakte, welche kovalent gebundene aktive 3-Biotin Caspase enthalten, werden in die Kammern der Platte pipettiert, wodurch jegliche in den Extrakten enthaltene Caspase 3 von dem Antikörper gebunden wird. Inaktives Caspase 3 Zymogen wird nicht durch den Biotin-Inhibitor modifiziert und daher auch nicht gemessen.

Nach einem Waschgang wird an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltes Streptavidin in die Kammern pipettiert und bindet an das Biotin des Inhibitors.

Nach Auswaschen des ungebundenen Streptavidin HRP Reagenz wird Substratlösung zugegeben. Die enzymatische Reaktion ergibt ein blaues Produkt, welches nach Zugabe von Stopp-Lösung gelb wird.

Die Intensität der Farbe wird im Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Hilfe von durch Verdünnungsreihen ermittelten Standardkurven gemessen und ist proportional zur Menge der Caspase 3, die im ersten Schritt gebunden wird.

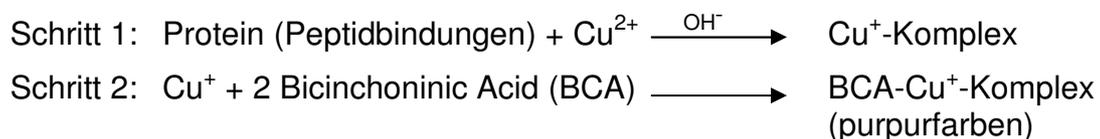
2.8.4 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine wurden mittels Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantifiziert (HSP70 EIA Kit, StressGen, Victoria, Kanada; EKS-700).

Die eingefrorenen Biopsien werden nach Herstellerangaben mit 300 µl Lysis und Binding Puffer anbehandelt und durch Ultraschallapplikation aufgelöst, bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert und während allen Verarbeitungsschritten auf Eis gekühlt.

Zur Gesamtproteinbestimmung und –angleichung der Proben wurde der BCA-200 Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, USA) verwendet.

Dieser Test läuft nach dem folgendem Prinzip ab:



Die Purpurfärbung der Proben durch Chelatbildung der Bicinchoninid-Säure (BCA) mit den im alkalischen Medium von Cu^{2+} zu Cu^+ reduzierten Kupferionen wird bei 562 nm kolorimetrisch quantitativ bestimmt.

Der Nachweis der induzierten HSP70 erfolgt mittels eines quantitativen „Sandwich Immunoassay“. Hierfür werden mit HSP70-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatten verwendet. Gebundene HSP70 werden in einem zweiten Reaktionsschritt mit HSP70-spezifischen, biotinylierten polyklonalen Kaninchen-Antikörpern gesättigt. Nach Bindung einer Avidin-Meerrettich Peroxidase wird eine zum HSP70-Gehalt proportionale Blaufärbung durch Tetramethylbenzidin erzeugt, die durch Zugabe einer sauren Lösung gestoppt wird. Die Intensität der nun nach gelb wechselnden Färbung wird bei 450 nm gemessen. Die Quantifizierung der HSP70-Konzentration geschieht mit Hilfe einer Standardlösungsreihe.

2.9 Morphologische Parameter

2.9.1 Herzgewicht und myokardialer Wassergehalt

Unmittelbar nach Explantation und Präparation wird das Herzgewicht (HG) bestimmt. Dieser Wert wird als präischämisch ($HG_{\text{prä}}$) herangezogen und am Versuchsende erneut bestimmt (HG_{post}). Zur Bestimmung des myokardialen Wassergehaltes wird das Gewicht je eines Gewebestückes aus dem rechten Ventrikel und aus der Herzspitze (linker Ventrikel) bestimmt. Nach Trocknung über eine Woche bei 60 °C wird das Trockengewicht bestimmt. Der myokardiale Wassergehalt berechnet sich folgendermaßen:

$$\text{Myokardialer Wassergehalt} = 1 - \frac{\text{Herz-Trockengewicht}}{\text{Herz-Feuchtgewicht}} \times 100\%$$

2.9.2 Histologie im Hinblick auf Kontraktionsbanden und Apoptose

Das in Formaldehyd gelagerte Herz wird horizontal in 2-5 mm dicke Scheiben geschnitten.

Jeweils ein Areal (2×2 cm) aus Vorder-, Hinter- und Seitenwand des linken Ventrikels sowie aus dem Septum und der Herzspitze werden in Einbettkassetten (R. Langenbrinck, Emmendingen) in PBS Spezial Lösung (Life Technologies GmbH, Karlsruhe) gelagert. Bei den Herzen der Ischämiegruppe werden speziell die Ischämieareale zur weiteren Beurteilung verwendet.

Der voll automatische Einbettvorgang beginnt mit der Inkubation der Proben in 5%igem Formalin bei Raumtemperatur mittels Patchcentre (Shandon GmbH, Frankfurt/M.).

Danach werden in dem Hypercenter XP (Shandon GmbH, Frankfurt/M.) folgende Entfettungszyklen durchlaufen: 2 Zyklen in 70%-igem Alkohol bei 37 °C, 2 Zyklen in 96%-igem Alkohol bei 37 °C, 3 Zyklen in 100%-igem Alkohol bei 37 °C, 2 Zyklen in Xylol bei 37 °C, 2 Zyklen in Paraplast Plus (Sherwood Medical Co., St. Louis, USA) bei 60 °C.

Die eingebetteten Proben werden über Nacht bei 65 °C gelagert.

Anschließend werden sie mit dem Paramat (Pool of scientific instruments, Laudenbach) bei 60 °C in natürlichem Paraffin (Labonord, Mönchengladbach) gegossen. Die Objektträger (R. Langenbrinck, Emmendingen) werden mit verdünnter Poly-L-Lysine Lösung (1 Teil Poly-L-Lysine 0,1%-ig, Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, USA und 9 Teile Aqua ad injectabilia, Delta-Pharma GmbH, Pfullingen) beschichtet und über Nacht getrocknet.

Die Paraffinblöcke werden bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 °C gelagert. Von jedem Gewebblock werden im Rotationsmikrotom Typ Autocut 2040 (Reichert-Jung GmbH, Nußloch) und mit Klingen des Typs MB 35, 35°/80 mm (Shandon Inc., Pittsburgh, USA) 5-7 5µm-Schnitte angefertigt.

In zwei Wasserbädern mit Aqua dest. (erst Raumtemperatur, dann ca. 58 °C) werden die Schnitte geglättet, auf die beschichteten Objektträger aufgezogen, und über Nacht bei 50 °C getrocknet.

2.9.2.1 Apoptosehistologie

In Dünnschnittschnitten werden mit Hilfe des Cardio TACS™ in situ Apoptosis Detection Kit (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) die apoptotische Zellkerne selektiv angefärbt.

Testprinzip:

Während des Apoptosevorgangs spalten spezifische kalziumabhängige Endonukleasen die DNS. Fragmente mit Doppelstrangbrüchen entstehen. Die DNS Fragmentierung wird in den apoptotischen Zellen durch die Aufdeckung der biotinylierte Nukleotide sichtbar, die mit dem freien 3´-Hydroxyl-Ende dieser DNS Fragmente eng verbunden sind.

Der verwendete Cardio TACS™ in situ Apoptosis Detection Kit beinhaltet die Reagenzien für die Erkennung von DNS-Fragmenten in situ und wird ergänzt durch einen Marker, der spezifisch das Vorhandensein von apoptotischen Kardiomyozyten hervorhebt.

Kardiomyozyten und Gewebeproben werden fixiert, um zu verhindern, daß niedermolekulare DNS-Fragmente verloren gehen. Um die DNS für Marker-Enzyme sichtbar zu machen, werden die Zellmembranen mit Proteinkinase K oder CytoPore™-Reagenz permeabilisiert. Die endogene Peroxidaseaktivität

wird durch Wasserstoffperoxid ausgeschaltet. Anschließend heftet das Enzym TdT (terminale desoxynukleotidyl Transferase) biotinylierte Nukleotide an die freien 3'-Hydroxyl-Enden der DNS. Im nächsten Schritt bindet eine mit Streptavidin konjugierte Peroxidase spezifisch an die biotinylierten Fragmente und erzeugt nach Zugabe des TACS Blue Label™-Substrates eine Blaufärbung der 3'-Hydroxyl-Enden der DNS-Fragmente.

Um apoptotische von nekrotischen Zellen zu unterscheiden, werden die Proben gegengefärbt. Nur die apoptotischen Zellen werden hierbei nicht rot gefärbt.

Der Kit beinhaltet außerdem eine Positivkontrolle. Hierbei wird eine Probe vor dem Zusatz des Marker-Enzyms mit TACS-Nuklease™ inkubiert. Dadurch werden in praktisch jeder Zelle DNS-Doppelstrangbrüche induziert.

Die Proben werden anschließend eingedeckt.

Unter dem Lichtmikroskop Sartorius (Carl Zeiss GmbH, Jena) werden die apoptotischen Zellen mit 400-facher Vergrößerung ausgezählt und fotografiert.

Anschließend wurden die Gewebeproben per Softwareunterstützung exakt vermessen, um somit endgültig die Zahl der apoptotischen Zellkerne pro mm³ zu bestimmen.

2.9.2.2 Kontraktionsbanden

Masson-Trichrom-Färbung:

Für die Bestimmung der Kontraktionsbanden durchlaufen die Proben im Färbeautomat Tissue Stainer TST 50 (medite GmbH, Burgdorf) zur Färbung nach Masson-Trichrom folgende Zyklen: Entparaffinieren in einer absteigenden Alkoholreihe, Hämatoxylin nach Weigert, Wässern in Leitungswasser, Aqua dest.-Spülung, Biebrich-Scharlachrot und Säurefuchsinlösung, Aqua dest.-Spülung, Phosphorwolframsäure und Phosphormolybdänsäurelösung, Aqua dest.-Spülung, Anilinblaulösung, einprozentige Essigsäure, aufsteigende Alkoholreihe, Xylol, Eindecken mit Pertex (medite GmbH, Burgdorf).

Unter dem Lichtmikroskop Sartorius (Carl Zeiss GmbH, Jena) werden die Schnitte mit 100- bzw. 400-facher Vergrößerung von zwei unabhängigen

Untersuchern auf Kontraktionsbanden untersucht und nach folgenden Kriterien beurteilt:

0 = keine Kontraktionsbanden erkennbar

1 = an einer Stelle Kontraktionsbanden vorhanden

2 = an mehreren Stellen mehrere Kontraktionsbanden vorhanden

3 = großflächig Kontraktionsbanden vorhanden

3 Ergebnisse

3.1 Funktionelle Parameter

3.1.1 Stroke-Work-Index

Der SWI wurde kontinuierlich gemessen und das Rollende Mittel über eine Minute über die Zeit aufgetragen.

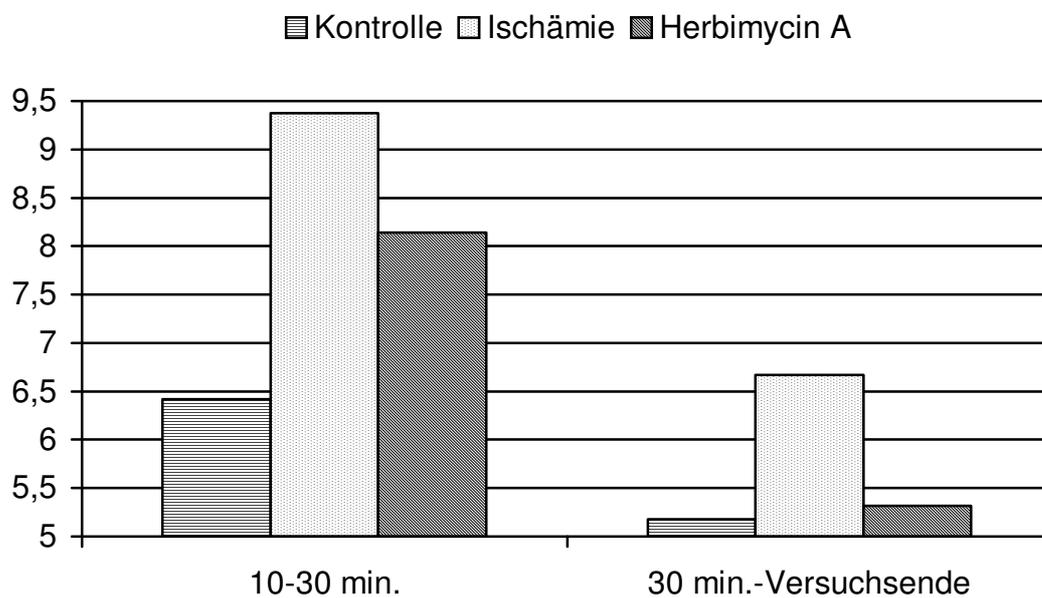
Tabelle 4: Stroke-Work-Index im Zeitraum von 10 – 30 min nach Beginn des Working Heart-Modus

Gruppe	dynes×cm×Schläge⁻¹×g⁻¹
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i> <i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	6,42 5,11 - 9,46
Ischämie	9,38 6,66 - 13,29
Herbimycin A	8,14 4,17 - 8,78
P	< 0,0001

Tabelle 5: Stroke-Work-Index im Zeitraum von 30 min nach Beginn des Working Heart-Modus bis zum Versuchsende

Gruppe <i>jeweils n=7</i>	dynes×cm×Schläge⁻¹×g⁻¹ <i>Median</i> <i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	5,18 4,22 - 6,76
Ischämie	6,67 2,74 - 8,28
Herbimycin A	5,32 1,90 - 7,65
P	0,7327

Abbildung 7: Stroke-Work-Index



3.2 Working-Heart-Dauer

Tabelle 6: Working-Heart-Dauer

Gruppe	min.
	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	121 120 - 126
Ischämie	120 117 - 122
Herbimycin A	120 95 - 120

Die Working-Heart-Zeit beginnt nach der Langendorff-Reperfusion und dauert bis zum Versiegen des Aortenflusses an, längstens jedoch zwei Stunden.

3.3 Biochemische Parameter

3.3.1 Troponin I

Tabelle 7: Troponin I-Gehalt zum Zeitpunkt der Perikarderöffnung

Gruppe	ng/ml
	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
<i>jeweils n=7</i>	
Kontrolle	0,15 0 - 1
Ischämie	0 0 - 0,63
Herbimycin A	0,25 0,05 - 1,13
p	0,6963

Tabelle 8: Troponin I-Gehalt bei Beginn der Reperfusion

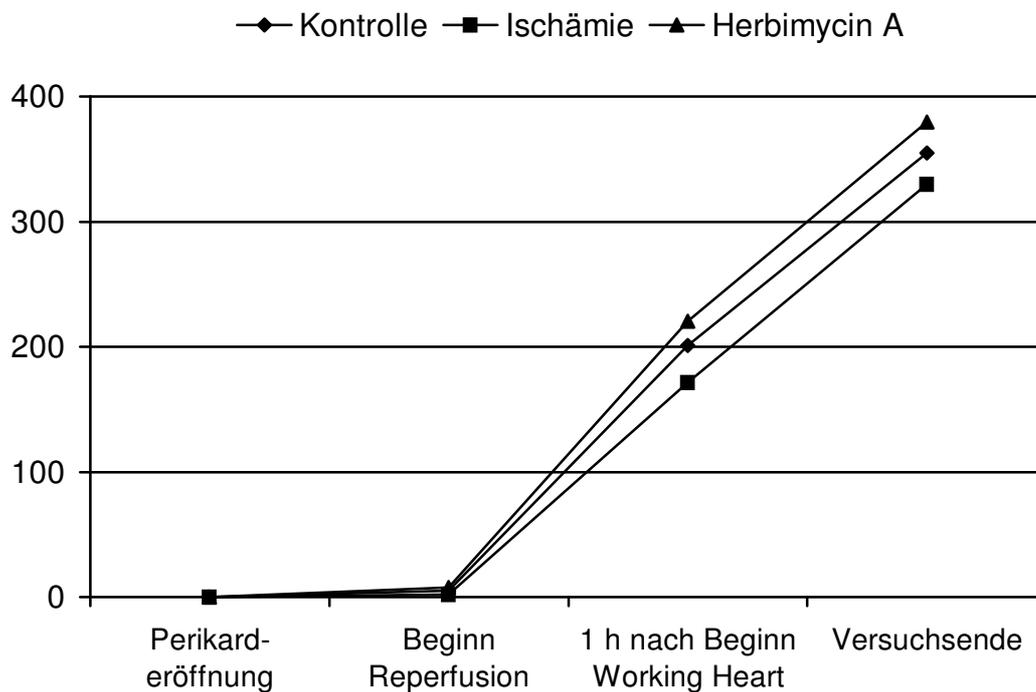
Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	5,3 2,8 - 13
Ischämie	2,25 1,5 - 3,1
Herbimycin A	7,65 2,18 - 14,50
p	0,1648

Tabelle 9: Troponin I-Gehalt 1 h nach Beginn des Working Heart-Modus

Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	200,80 157,8 - 203,6
Ischämie	171,5 144,78 - 278,55
Herbimycin A	220,45 134,08 - 362,43
p	0,6274

Tabelle 10: Troponin I-Gehalt am Versuchsende

Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	354,8 273,8 - 423,8
Ischämie	330 222,03 - 537,8
Herbimycin A	379,45 193,33 - 736,98
p	0,6139

Abbildung 8: Entwicklung des Troponin I-Gehalts in ng/ml

3.3.2 Caspase 3

Tabelle 11: Caspase 3-Gehalt am Versuchsende

Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	3,51 3,32 - 3,64
Ischämie	3,52 3,29 - 3,84
Herbimycin A	3,37 3,16 - 3,62
p	0,5138

Die angegebenen Werte für die Caspase 3 beziehen sich auf eine Gesamtproteinmenge von 400 µg/ml im Probenansatz. Der Ausgangswert der Caspase 3-Konzentration wurde bei einem Kontrollversuch nach sechs minütiger Kardioplegiegabe (ohne anschließende Ischämie-, Reperfusion- und Working Heart Phase) mit 3,55 ng/ml bestimmt.

3.3.3 Laktat

Tabelle 12: Laktatgehalt bei der Perikarderöffnung

Gruppe	mmol/l
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	2,1 1,8 - 3,3
Ischämie	1,4 1,8 - 3,3
Herbimycin A	0,75 0,55 - 1,23
p	0,0133

Tabelle 13: Laktatgehalt bei Beginn der Reperfusion

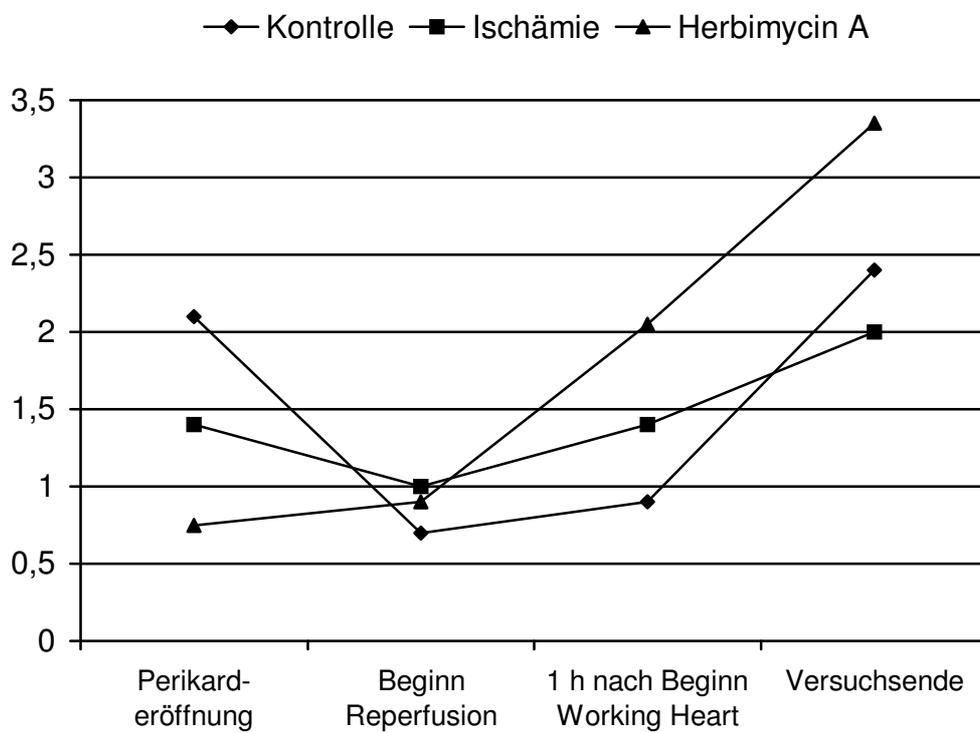
Gruppe	mmol/l
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i> <i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	0,7 0,5 - 1,8
Ischämie	1 0 - 2,5
Herbimycin A	0,9 0,55 - 1,1
p	0,8066

Tabelle 14: Laktatgehalt 1 h nach Beginn des Working Heart-Modus

Gruppe	mmol/l
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i> <i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	0,9 0,2 - 1,8
Ischämie	1,4 0,53 - 3,18
Herbimycin A	2,05 1,3 - 3,85
p	0,3517

Tabelle 15: Laktatgehalt am Versuchsende

Gruppe	mmol/l
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	2,4 1,9 - 5,3
Ischämie	2 0,45 - 4,63
Herbimycin A	3,35 2,15 - 7,05
p	0,5808

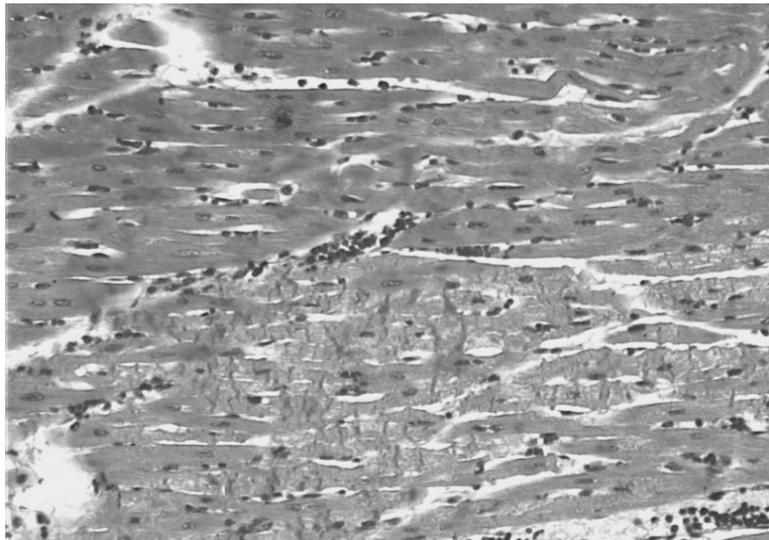
Abbildung 9: Entwicklung des Laktatgehalts in mmol/l

3.4 Morphologische Parameter

3.4.1 Kontraktionsbanden

Schweregrade: 0 = keine, 1 = solitär, 2 = disseminiert, 3 = konfluierend

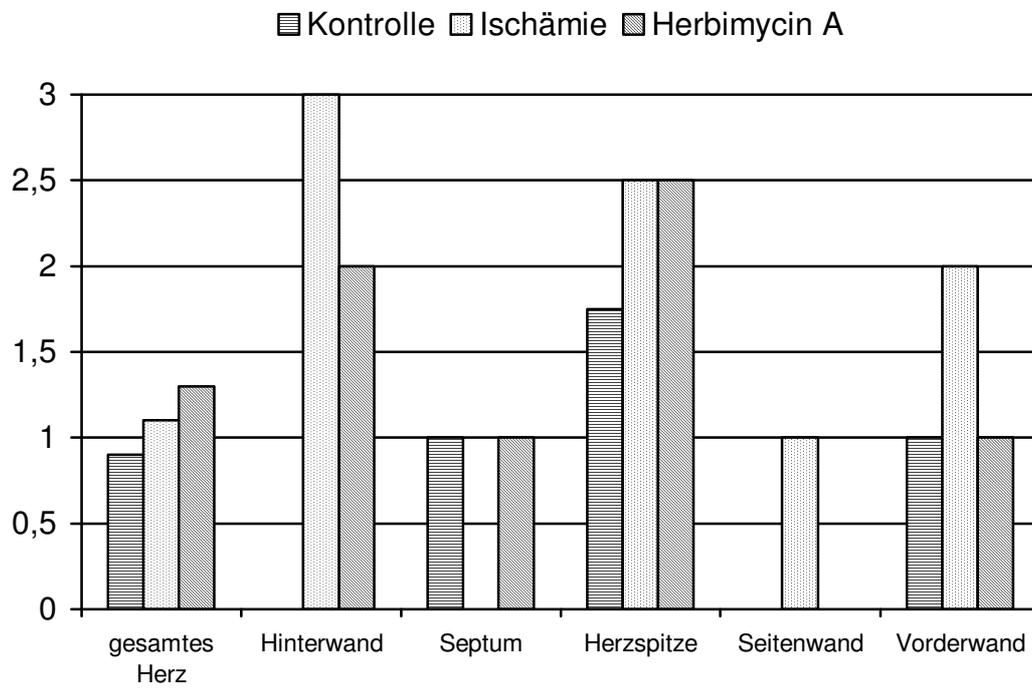
Abbildung 10: Vergleich ungeschädigtes Myokard und Kontraktionsbanden



Im oberen Bereich der Abbildung erkennt man ungeschädigtes Myokard, im unteren Teil sieht man flächenhaft auftretende Kontraktionsbanden-Nekrosen.

Tabelle 16: Kontraktionsbanden im gesamten Herz

Gruppe	Schweregrad
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	0,9 0,25 - 1,63
Ischämie	1,1 1 - 2
Herbimycin A	1,3 1,13 - 1,83
p	0,3052

Abbildung 11: Verteilung der Kontraktionsbanden

3.4.2 Apoptose

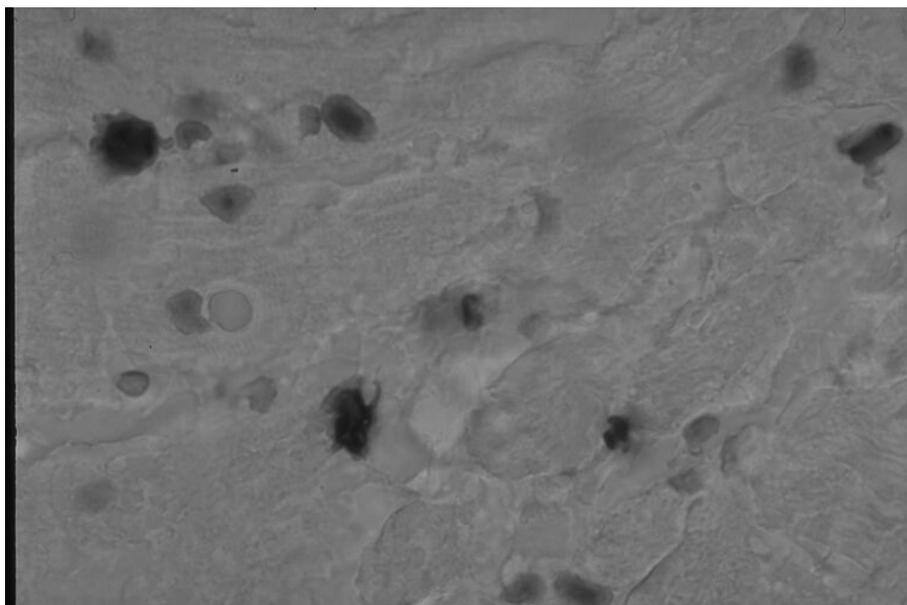
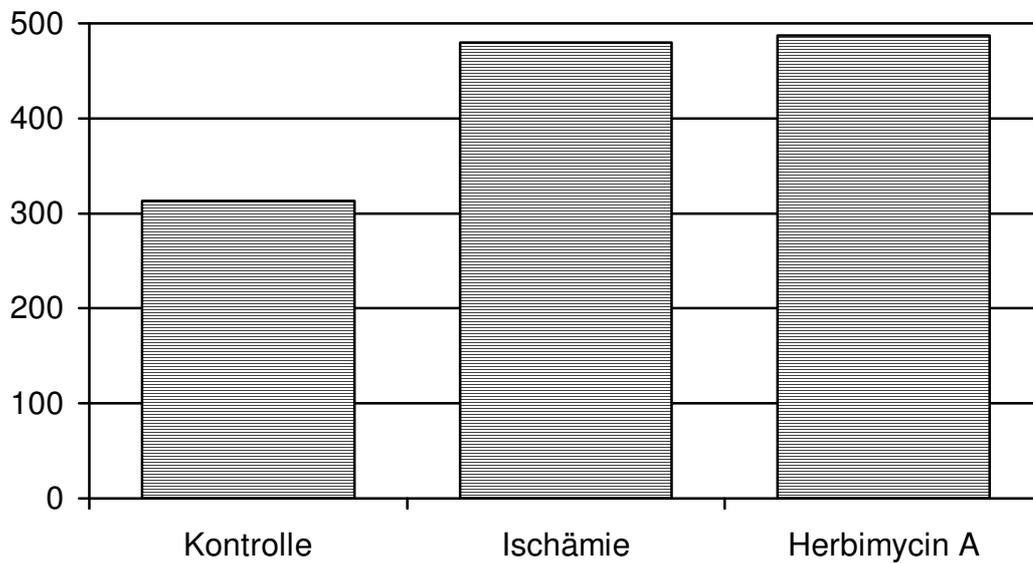
Abbildung 12: Apoptotische Zellkerne

Tabelle 17: Apoptotische Zellkerne

Gruppe	n/mm³
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i> <i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	313 128,5 - 592,25
Ischämie	480 284 - 1129
Herbimycin A	487,5 272,5 - 738,5
p	0,5733

Abbildung 13: Auftreten von apoptotische Zellkernen am Versuchsende

3.4.3 Myokardialer Wassergehalt

Tabelle 18: Veränderung des myokardialen Wassergehaltes (präoperativ – postoperativ)

Gruppe	%
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	7,65 5,1 - 12,21
Ischämie	7,92 6,3 - 9,33
Herbimycin A	7,92 5,3 - 12,0
p	0,9428

3.5 Hitzeschockprotein 70 (HSP 70)

Tabelle 19: HSP-Gehalt zum Zeitpunkt der Perikarderöffnung

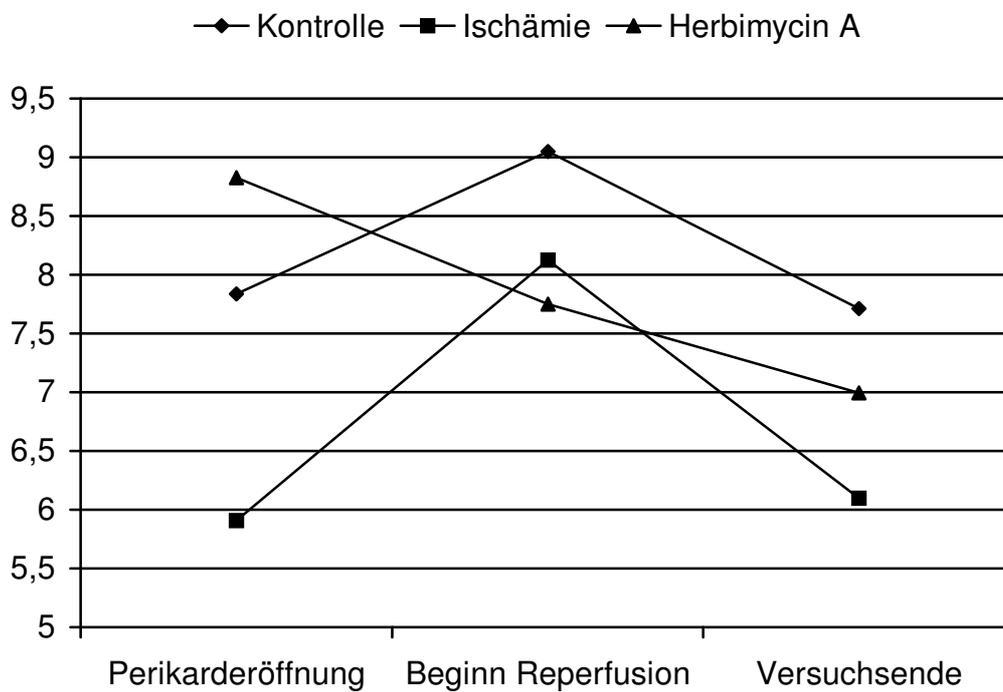
Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	7,84 4,9 - 9,81
Ischämie	5,91 4,38 - 10,03
Herbimycin A	8,83 6,97 - 11,65
p	0,4322

Tabelle 20: HSP-Gehalt kurz vor Beginn der Reperfusion

Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	9,05 8,27 - 13,9
Ischämie	8,12 6,75 - 10,75
Herbimycin A	7,75 6,78 - 12,47
p	0,5769

Tabelle 21: HSP-Gehalt am Versuchsende

Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	7,71 6,73 - 8,74
Ischämie	6,1 5,35 - 9,42
Herbimycin A	7,0 5,33 - 8,04
p	0,7202

Abbildung 14: Entwicklung des HSP-Gehalts in ng/ml**Tabelle 22:** Entwicklung des HSP-Gehalts von der Perikarderöffnung bis zum Beginn der Reperfusion

Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	1,94 0,47 - 4,13
Ischämie	1,91 1,0 - 2,71
Herbimycin A	-1,39 -1,98 - 0,24
p	0,0417

Tabelle 23: Entwicklung des HSP-Gehalts von der Perikardöffnung bis zum Versuchsende

Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	-1,11 -3,2 - 3,27
Ischämie	-0,41 -1,46 - 1,72
Herbimycin A	-2,94 -5,25 - 0,47
p	0,1784

Tabelle 24: Entwicklung des HSP-Gehalts von Beginn der Reperfusion bis zum Versuchsende

Gruppe	ng/ml
<i>jeweils n=7</i>	<i>Median</i>
	<i>1. Quartil - 3. Quartil</i>
Kontrolle	-1,89 -5,14 - -0,56
Ischämie	-1,83 -2,73 - 0,7
Herbimycin A	-1,56 -4,81 - 1,6
p	0,4996

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

4.1.1 Modell und Übertragbarkeit

Die Ergebnisse dieser Studie wurden an gesunden Ferkeln im Alter von wenigen Wochen erhoben. Deshalb lassen sich die Resultate auf gesundes jugendliches Myokard beziehen. Somit sind die erzielten Ergebnisse nicht auf vorbelastetes Myokard übertragbar, denn dort handelt es sich um völlig andere physiologische Situationen^{76,90,186}.

Die pharmakologische Präkonditionierung bewirkt eine für das Myokard streßfreie Induktion der HSP^{38,137,168,188}, so daß davon auszugehen ist, daß auch multimorbide Patienten, die sich für die Durchführung einer ischämischen Präkonditionierung nicht qualifizieren, davon profitieren könnten.

Beim Vergleich der Ergebnisse dieser Untersuchung mit Patienten höheren Lebensalters, die den Großteil des herzchirurgischen Patientengutes ausmachen, sind wesentliche Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, langjährige arterielle Hypertonie, Nierenerkrankungen oder pulmonale Probleme zu berücksichtigen. Diese zusätzlichen Faktoren können eine Einschränkungen im Bereich der kardialen Mikrozirkulation und damit des Sauerstoffverbrauchs im Myokard bedingen^{31,185}, wodurch die Myokardfunktion zusätzlich beeinträchtigt sein kann.

4.1.1.1 Das Schwein als Versuchstier

Die Anatomie des Schweins entspricht im Hinblick auf Koronaranatomie²⁰⁷, Kollateralisierung und Größe²⁰⁸ bis auf die Vena azygos sinistra, die direkt in den Koronarsinus mündet, weitgehend der des Menschen¹⁴².

In der Mehrzahl der Studien über die Präkonditionierung wurden bisher Kleintiere, z.B. Ratten und Kaninchen als Versuchstiere verwendet^{18,46,199,216}, auch die Untersuchungen, die den Zusammenhang von HSP70 und der

Präkonditionierung untersuchen, beschränken sich die meistens auf Ratten^{130,221}. Die Verhältnisse im Großtiermodell dürften folglich denen beim Menschen sehr viel näher kommen.

4.1.1.2 Langendorff - Perfusionsmodell

Das 1895 etablierte Perfusionsmodell von Langendorff¹⁰⁷ ist die akzeptierte Methode, um Herzen auf ihre Mechanik und ihren Stoffwechsel hin zu untersuchen. Im Laufe der Zeit wurde es verbessert^{67,79,83,100}. Das Perfusionsmodell erlaubt die isolierte Untersuchung der Herzfunktion frei von extrakardialen Einflüssen unter weitestgehend kontrollierten, und bei Verwendung von Blut als Perfusat auch physiologischen Bedingungen.

Während des Versuchsablaufs können jedoch anfallende, schädliche Substanzen und Stoffwechselprodukte wie beispielsweise Laktat nicht wie im menschlichen Organismus abgebaut werden. Eine Kumulation dieser Substanzen kann negative Einflüsse auf die Herzfunktion haben.

Beim Einsatz von Rollerpumpen zur Blutzirkulation kann es zur Freisetzung von Laktat und Kalium kommen. Bei massiven Hämolyse mit Abfall des Hämoglobins könnte auch eine ausreichende Oxygenierung des Blutes nicht mehr gewährleistet werden. Dies wird durch eine korrekte Einstellung der Pumpenokklusion minimiert. Das Ausmaß der Hämolyse wird durch die Bestimmung des freien Hb's kontrolliert.

Durch die Stase des Blutes im Reservoir und dessen Kontakt mit Fremdoberflächen können Thromben entstehen, die zu ischämischen Embolien im Herzen führen können. Durch die Vollheparinisierung des Blutperfusats wird dieser Effekt verhindert. Gehäufte Mikroembolien wären im histologischen Präparat zu sehen gewesen.

4.1.1.3 Versuchsablauf

Das Modell orientiert sich an gängigen Operations- und Narkoseverfahren bzw. an in vivo Zirkulations- und Druckverhältnissen. Die hämodynamischen Verhältnisse sind mit denen in kindlichen Herzen vergleichbar. Verschiedene manuelle und pharmakologische Manipulationen können während der

Operation und auch während des maschinellen Perfusionsablaufs zu den nachfolgend genannten anatomischen und physiologischen Veränderungen führen.

4.1.1.3.1 Veränderung der Herzanatomie

Durch das Anbringen der Anschlußstücke und die hängende Position des Herzens in der Perfusionsapparatur kann es zu Klappeninsuffizienzen- oder stenosen, sowie zu Kompression von Koronarfluß und Ausflußtrakten kommen. Diese Fehler werden aber Dank der kontinuierlichen Messung des Aorten- und Koronarflusses sowie der Vor- und Nachlast sofort erkannt und können umgehend korrigiert werden.

4.1.1.3.2 Beeinflussung morphologischer und biochemischer Parameter

Durch manuelle Manipulationen, insbesondere dem Einbringen des TIP-Katheters durch den Biopsiekanal in der Herzspitze in den linken Ventrikel, kann es zum Anstieg von Troponin I kommen. Auch die Myokardpunktionen können diese Auswirkung haben. Eine zweite Möglichkeit wäre das Anbringen des TIP-Katheters über die Aortenwurzel. Dies kann allerdings zur Aorteninsuffizienz führen. Im vorliegenden Versuchsmodell hat man sich für die Platzierung via Herzspitze entschieden, da der Biopsiekanal ohnehin vorhanden war und somit die Provokation einer Aortenklappeninsuffizienz vermieden werden konnte. Eine erhöhte Rate der Kontraktionsbanden ist durch die Biopsieentnahmen vor allem an der Herzspitze und bei den Herzen der ischämischen Gruppe im Ischämieareal zu erwarten (s. Kapitel 3.4.1).

4.1.1.3.3 Beeinflussung durch Pharmaka

Angestrebt wurde eine möglichst wenig kardiotrop wirksame Medikation. Durch eine exakte an die erforderliche Narkosetiefe angepaßte Dosierung wurde die mögliche negativ inotrope Wirkung minimiert. Wie in der Herzchirurgie üblich erlaubt die kombinierte Anwendung der aufgeführten Narkotika und Sedativa im Sinne einer total intravenösen Anästhesie (TIVA)

eine geringst mögliche Dosierung des einzelnen Medikamentes und verringert somit die Rate von Nebenwirkungen.

Atropin besitzt eine neurovegetativ dämpfende Wirkung, verhindert störende Reflexe und hebt die Vagusstimulierung auf. Es hat allerdings auch eine positiv bathmotrope Wirkung³³.

Diazepam bewirkt eine Sedierung mit Amnesie. Bei hoher Dosierung kann es atemdepressiv wirken, was bei zeitgerechter Intubation und kontrollierter Beatmung jedoch bedeutungslos ist.

Azaperon kann zu einer Abnahme des peripheren Widerstandes mit entsprechendem Blutdruckabfall führen, was Reflextachykardien auslösen kann, und besitzt zusätzlich noch eine neuroleptische Wirkung⁸⁹.

Ketamin kann neben der Sedierung zu Blutdruck- und Pulsanstieg um ca. 30% der Norm führen³³.

Vecuronium kann zur Blockade von kardialen Muscarinrezeptoren führen. Diese unerwünschte Wirkung ist aber in der verwendeten geringen Dosis von 0,025 mg/kg KG nicht zu erwarten¹⁸⁷.

Fentanyl findet Verwendung bei der Analgesie und hat eine stark atemdepressive Wirkung⁹⁵.

Propofol kann durch Vasodilatation und negativ inotroper Wirkung zu einer reflektorischen Tachykardie führen. Durch TIVA wird dies vermieden. Aufgrund seiner kurzen An- und Abflutdauer und der daraus resultierenden guten Steuerbarkeit wurde es eingesetzt.

Flunitrazepam entspricht in Wirkung und Nebenwirkung weitgehend dem Diazepam³³, hat allerdings eine kürzere Halbwertszeit.

Heparin wird aus Schweinemukosa hergestellt. Es sind keine kardialen Einflüsse zu erwarten.

Gentamycin zeigt in klinisch verwendeten Dosen keinerlei Auswirkungen auf das Myokard⁷⁸.

Kortison kann zu einer Verringerung des myokardialen Ödems führen, wird eingesetzt, um die durch Verwendung von Fremdblut möglichen immunologischen Prozesse zu dämpfen.

4.1.1.3.4 Besonderheit der Herbimycin A-Gruppe

Herbimycin A sollte 16 Stunden vor Beginn des Versuchs appliziert werden, um seine volle Wirkung entfalten zu können¹³⁷. Daher wurden die Tiere der Herbimycin A-Gruppe bereits am Vortag des Versuchs mit Diazepam und Ketaminhydrochlorid durch intramuskuläre Injektion kurznarkotisiert. Das Herbimycin A wurde als Kurzinfusion über 20-30 Minuten appliziert. Dieses Verfahren setzte die entsprechenden Tiere einer zusätzlichen Streßsituation aus. Außerdem wurden sie dem Risiko und den möglichen unerwünschten Nebenwirkungen der verwendeten Medikamente ausgesetzt.

Eine solche Streßsituation kann per se schon zur Induktion von HSP führen¹⁷⁵ und auch die Entwicklung einer kardialen Schädigung ist bei den vulnerablen Schweineherzen nicht auszuschließen. Hierzu kam es nicht, wie die Ergebnisse in Kapitel 3.5 zeigen.

4.1.1.4 Kardioplegielösung

In der vorliegenden Studie sind die Kardioplegie in situ und auch die Kardioplegiezyklen im Modell mit einer auf 4°C gekühlten Blutkardioplegie nach Buckberg durchgeführt worden. In verschiedenen Studien zeigen sich Vorteile der Blutkardioplegie im Vergleich zu einer kristallinen Kardioplegie. Die Blutkardioplegie führte nicht nur zu einer geringeren histochemischen Schädigung, sondern auch zu einer besseren postoperativen funktionellen Erholung. Julia et al. zeigten, daß Blutkardioplegie aufgrund der vorhandenen Radikalfänger zu geringerem myokardialen Schaden durch freie Sauerstoffradikale führt⁹⁴. Auch Acar et al.¹ zeigten die Vorteile der Blutkardioplegie auf. Die initiale Gabe einer Blutkardioplegie verbessert die Sauerstoffverwertung und die lokale Wiederherstellung der Herzfunktion und führt zu weniger zellulären Schäden. Die ermittelte Troponin I-Menge unterscheidet sich hingegen nicht zwischen Blut- und kristalliner Kardioplegie⁷⁷.

Aufgrund der aufgeführten Vorteile vor allem im Hinblick auf den geringeren zellulären Schaden bei Verwendung der Blutkardioplegie wurden sämtliche Kardioplegiezyklen im vorliegenden Modell nach dieser Technik durchgeführt.

4.1.1.5 Perfusat

Die Verwendung von Blut als Perfusat zeigt Vorteile gegenüber kristallinen Perfusaten bezüglich der Physiologie und der Untersuchung von Ischämie-Reperfusionsschäden^{66,205}. Isolierte Herzen, die mit Blut reperfundiert wurden, zeigten signifikant weniger Ödembildung^{52,165}, einen geringeren myokardialen Wassergehalt, einen geringeren ultrastrukturellen Schaden, eine bessere Kontraktilität¹¹ und einen niedrigen enddiastolischen linksventrikulären Druck²². Manche Autoren bemängeln deshalb die verminderte Aussagekraft von Studien, in denen nicht mit Blut perfundiert wurde⁸⁵. Eine Rolle könnte auch noch die Herkunft des Blutperfusats spielen. Es handelt sich um homologes Fremdblut vom Schlachthof. In einer vergleichbaren Studie zeigte sich trotzdem keine vermehrte Hämolyse. Dies könnte daran liegen, daß Schweine keine Antikörper gegen Blutgruppenfaktoren besitzen⁶⁵.

In ähnlichen Versuchsreihen werden häufig rein kristalline Lösungen für die Langendorff-Perfusion verwendet¹⁰³. Im Vergleich zur Perfusion mit Blut enthalten sie keine schwer kontrollierbaren endogenen Substanzen, die die Funktion des Herzens beeinflussen können. Außerdem sind sie billiger, einfacher zu handhaben und die Gefahr der Thrombenbildung entfällt²². Zumeist hat man außerdem keinen Einfluß auf die Qualität des Fremdblutes. Die gemessenen Mengen an Laktat beispielsweise schwankten in der Versuchsreihe deutlich, obwohl immer Blut von zwei Spendertieren gewonnen wurde und das mit den günstigsten Werten verwendet wurde.

Das Perfusat wird im Verlauf des Versuchs mechanisch belastet. Die Rollerpumpen führen zu einer Hämolyse mit Laktat- und Kaliumanstieg. Solche Einflüsse können den Ischämie-/Reperfusionsschaden und die Ausbildung eines Ödems, das zur Beeinträchtigung des Koronarflusses führt, verstärken. Dadurch werden funktionelle, biochemische und morphologische Parameter beeinträchtigt. Deshalb wurde das Perfusat mit Kortison versetzt und physiologisch konditioniert. Die Okklusion der Rollerpumpen wurde optimal eingestellt.

4.1.2 Stroke-Work-Index

Auf eine in situ Bestimmung des SWI noch vor der ersten Kardioplegie wurde im vorliegenden Versuchsmodell verzichtet. Aufgrund der im Vergleich zum Perfusionsmodell unterschiedlichen physiologischen und vor allem anatomischen Voraussetzungen in situ ist eine Vergleichbarkeit der prä- und postkardioplegischen SWI-Werte nicht gegeben.

Deshalb wurden zwei Zeitabschnitte betrachtet. Die erste Phase stellt die wichtige frühe Reperfusionphase dar (10-30 min nach Beginn der Reperfusion). In diesem Zeitabschnitt zeigt sich in der Ischämiegruppe ein signifikanter Unterschied der SWI-Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,0001$). In der zweiten Phase (30 min. nach Beginn Reperfusion bis zum Versuchsende) gleichen sich die Werte aller Gruppen einander an. Es kommt dabei jeweils zu einer deutlichen Abnahme des SWI im Versuchsverlauf.

Die Signifikanz in der Ischämiegruppe bestätigt die bereits bekannte Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung im ersten Fenster der Präkonditionierung. Diese Beobachtungen wurden bereits von anderen Untersuchern sowohl für nicht-pharmakologische^{44,139} als auch für pharmakologische^{16,58,194,198} Stimuli nachgewiesen. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen verschiedener Arbeitsgruppen^{25,26,105,121,139}.

Der SWI in der Herbimycin A-Gruppe zeigt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe in der frühen Reperfusionphase. Eine präkonditionierende Wirkung des Herbimycin A mittels HSP auf die Herzfunktion läßt sich nicht nachweisen. Die vorliegende Großtierstudie bestätigt die in den in vitro-Versuchen mit Kardiomyozyten²²⁰ erzielte präkonditionierende Wirkung des Herbimycin A.

Verantwortlich für den Abfall des SWI in allen Gruppen sind einerseits der zunehmende Adenosintriphosphat-Mangel (ATP) und die intrazelluläre Ca^{2+} -Akkumulation, die die Myokardrelaxation frühzeitig einschränken, sowie die strukturelle myokardiale Schädigung, die im Kapitel 4.1.8 ausführlich diskutiert wird¹⁹¹. Es ist davon auszugehen, daß der myokardiale ATP-Gehalt während der fast dreistündigen Ischämie- und Reperfusionphase relevant abnimmt. An isolierten menschlichen Kardiomyozyten wurde gezeigt, daß der myokardiale

Gehalt an energiereichen Phosphaten in blutkardioplegierten Herzen um 20% sinkt¹⁸³. Diese Beobachtungen wurden während humanen Herztransplantationen gemacht, eine Erneuerung der ATP-Reserven war demnach gewährleistet. In unserem Modell wurde jedoch kein ATP substituiert, so daß von einem weitaus größeren Verlust ausgegangen werden muß.

Wu et al. zeigten in einer Studie, in der ischämische Präkonditionierung bei koronaren Herzoperationen am Menschen durchgeführt wurde, daß es wie bei der vorliegenden Studie in der frühen Phase der Reperfusion zu einem signifikanten Anstieg des SWI im Vergleich zur Kontrollgruppe kam²¹⁰. Auch bei Wu et al. kam es im weiteren Beobachtungsverlauf zu einer Angleichung der SWI-Werte bis hin zu nicht-signifikanten Ergebnissen. In dieser Studie wurde nicht nur die Auswirkung der ischämischen Präkonditionierung auf den linken Ventrikel untersucht. Auch der erhobene SWI des rechten Ventrikels zeigte in der Ischämie-Gruppe signifikant höhere Werte als in der Kontrollgruppe. Der Beobachtungszeitraum bei Wu et al. erstreckte sich bis zum ersten postoperativen Tag. Diese Beobachtungen sind wichtig, da die maximale Einschränkung der Myokardfunktion häufig nicht unmittelbar nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation auftreten soll, sondern erst 4-6 Stunden postoperativ⁵⁴.

4.1.3 Zeiten

4.1.4 Dauer des Working Heart Modus

Der Working Heart-Modus schließt sich an die Langendorff-Reperfusion an. Erst in diesem Versuchsabschnitt beginnt das Herz Arbeit zu verrichten, da es einer Vor- und Nachlast ausgesetzt wird. Die Vorlast wird dabei konstant auf 10 mmHg und die Nachlast konstant auf 60 mmHg eingestellt. Damit soll eine Vergleichbarkeit in allen Gruppen durch identische Druckverhältnisse im Kreislauf erreicht werden. Die erbrachte Leistung spiegelt sich dann im SWI wieder. Am Abfall des SWI läßt sich das Ausmaß der Herzinsuffizienz ablesen, die im Versuchsverlauf immer stärker eintritt. Als Abbruchkriterium wird in diesem Modell das Versiegen des Aortenflusses gewählt.

In der vorliegenden Studie werden in allen drei Gruppen nicht signifikant unterschiedliche Reperfusionzeiten in der Langendorff-Reperusionsphase erzielt.

In den Working Heart-Zeiten unterscheiden sich die Gruppen nicht untereinander. In allen drei Versuchsgruppen wurde die geplante Working Heart-Zeit von 2 Stunden erreicht. Dies hat eine in allen Gruppen identische Gesamtversuchsdauer (von Beginn Kardioplegie bis Versuchsende) von knapp 4 Stunden zur Folge. Es lassen sich somit alle Gruppen in allen Stadien des Versuchs vergleichen.

In ähnlichen Studien unseres Labors wurden weitaus geringere Working Heart-Zeiten erreicht. In den meisten Fällen erfolgte bereits nach einer Stunde der Versuchsabbruch. Diese Unterschiede lassen sich auf die schrittweise Verbesserung der Perfusionsapparatur und des optimierten Ablaufs zurückführen. Auch in anderen Studien werden geringere Working Heart-Phasen erreicht, wobei hier die genauen Zeiten und Abbruchkriterien nicht genannt werden^{48,150}.

Es gibt mehrere limitierende Faktoren für die Dauer des Working-Heart-Modells: zunehmender struktureller Myokardschaden, Rückgang des ATP-Gehalts, zunehmendes myokardiales Ödem. Ausdruck hierfür sind neben der Abnahme des SWI auch der Troponin I-Anstieg und der histologische Nachweis von Kontraktionsbanden sowie der zunehmende myokardiale Wassergehalt (s. Kapitel 4.1.2, 4.1.5, 4.1.8 und 4.1.10)⁷⁷.

4.1.5 Troponin I

Troponin I hat eine höhere Kardiospezifität, zeigt einen früheren Anstieg und ein längeres diagnostisches Fenster als die CK-MB. Daher wurde in dieser Studie die Bestimmung des Troponin-I der Bestimmung der CK-MB vorgezogen³. Troponin I stammt aus den kardialen Aktinfilamenten und ist somit herzspezifisch. Außerdem werden die erhobenen Werte nicht wie bei der CK-MB durch gesteigerte Hämolyse verfälscht¹⁹¹. Diese Tatsache ist in der vorliegenden Studie besonders zu berücksichtigen, da eine Hämolyse durch die verwendeten Rollerpumpen und die extrakorporale Zirkulation gegeben ist.

Im Moment der Perikarderöffnung lagen die Troponinwerte aller drei Versuchsgruppen im Normbereich. Diese Beobachtung ist besonders bezüglich der Herbimycin A-Gruppe wichtig, da eine myokardiale Fröhschädigung durch Herbimycin A damit ausgeschlossen werden kann. Auch bei Yoneda et al., der die Wirkung von Herbimycin A auf die Kardiomyozyten durch Bestimmung der CK-MB nachwies, zeigte sich keine zelluläre Schädigung²²⁰.

Bei der Troponin-Bestimmung direkt nach Beginn der Reperfusion fällt der vergleichsweise niedrige Wert der Ischämiegruppe auf. Diese Beobachtung ist überraschend, da Kaukoranta et al.⁹⁸ in ihrem Versuch beschrieben, daß es in ischämisch präkonditionierten Herzen zu einem stärkeren Anstieg des Troponin I kommt als in der Kontrollgruppe. Es bleibt unklar, warum in dieser Studie die Ischämiegruppe frühpostischämisch die niedrigsten Troponin I-Werte aufweist.

Der starke Anstieg der Troponinwerte im weiteren Verlauf des Versuchs bis auf über 300 ng/ml im Vergleich zu den präischämischen Werten in allen Gruppen läßt sich auf die starke Schädigung des Myokards zurückführen. Außer der langen Ischämiezeit wurde der Versuch auch bis zur terminalen Herzinsuffizienz mit fehlendem Aortenfluß fortgeführt. Eine maximale Schädigung aller Herzen ist die Folge. Signifikante Unterschiede unter den Gruppen lassen sich während des Versuchs und am Versuchsende nicht nachweisen.

4.1.6 Caspase 3

Die Rolle der Caspase 3 in der Kaskade, die zur Apoptose führt, wird in den Kapiteln 2.8.3 und 1.4.2.1 in der Einleitung sowohl für den rezeptorunabhängigen als auch für den rezeptorabhängigen Weg beschrieben.

Im vorliegenden Modell kommt es mit Caspase 3-Werten zwischen 3,37 ng/ml (Herbimycin A) und 3,52 ng/ml (Ischämie) zu keinen signifikanten Unterschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe. In einem Kontrollversuch in unserem Labor zeigte sich ohne Ischämie und Reperfusion ein Caspase-Wert von 3,6 ng/ml. Eine signifikante Reduktion der Caspase-Aktivität durch ischämische und pharmakologische Präkonditionierung bleibt in dieser Studie aus. Betrachtet man das Ausmaß der mikroskopisch fassbaren Nekrose in der

vorliegenden Studie kann man annehmen, daß die Apoptose im Vergleich zur Nekrose eine untergeordnete Rolle in diesem Ischämie/Reperfusionversuch spielt. Diese Beobachtung wird durch eine Studie von Freude et al. bestätigt⁵⁷. Insgesamt wird die Rolle der Caspase bei der Präkonditionierung kontrovers diskutiert. Untersuchungen von Piot et al zeigen im Gegensatz zu Freude et al. eine Reduktion der Caspase-Aktivität bei der ischämischen Präkonditionierung¹⁵⁹.

In der vorliegenden Studie werden die Beobachtungen von Freude et al. bestätigt, da weder die ischämische noch die pharmakologische Präkonditionierung einen Einfluß auf die Caspase 3-Aktivität gezeigt haben.

4.1.7 Laktat

Die Bestimmung des Laktatgehalts erlaubt Rückschlüsse auf die Sauerstoffversorgung und damit die Stoffwechsellage des Myokards. Laktat entsteht bei Sauerstoffmangel durch anaerobe Glykolyse¹¹⁹, aber auch im Rahmen der Hämolyse¹⁵³.

In der vorliegenden Studie wurden die Tiere der Herbimycin A-Gruppe am Vortag des Versuchs zusätzlichem Streß durch die Verabreichung des Herbimycin A ausgesetzt, was zu einer Expression von Laktat führen könnte.

Tatsächlich aber sind die Unterschiede der Laktatwerte zum Zeitpunkt der Perikarderöffnung in der Herbimycin A-Gruppe signifikant niedriger im Vergleich zu den anderen Gruppen ($p < 0,0133$). Im Versuchsverlauf kam es dann zu einem Anstieg der Laktatwerte in allen Gruppen. Der Anstieg war in der Herbimycin A-Gruppe am ausgeprägtesten, signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen traten aber nicht mehr auf.

Auch im Hinblick auf die ischämische Präkonditionierung zeigen Ikonomidis et al., daß der Laktatanstieg in Kardiomyozyten einer Kontrollgruppe wesentlich deutlicher ausgeprägt war als in ischämisch präkonditionierten Myokardzellen⁸⁴. Die von Ikonomidis vorgestellten Ergebnisse bezogen sich auf einen Zeitpunkt 90 Minuten nach der Ischämie.

In einer vergleichbaren Studie zeigten Nomura et al.¹⁴⁴, daß in Herzen, in denen es zu einer hyperthermie-induzierten HSP-Ausschüttung kam, im

Reperusionsverlauf ein signifikant niedriger Laktatanstieg zu verzeichnen war als in den Kontrollgruppen. Die Ergebnisse von Nomura et al. konnten in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich keine Auswirkung der pharmakologischen Präkonditionierung bzw. der HSP-Induktion auf die Entwicklung des Laktatgehalts. Der Anstieg des Laktatgehalts in der Ischämiegruppe zeigt zwar im Gruppenvergleich keine Signifikanz, dennoch sind Vorteile gegenüber den anderen Gruppen erkennbar, so daß die Ergebnisse von Ikonomidis nachvollziehbar sind.

Im vorliegenden Modell wurden sowohl der kardioplegen Lösung als auch dem Perfusat ausreichend Glukose zugesetzt. Außerdem wurde auf eine suffiziente Oxygenierung geachtet. Der Laktatanstieg läßt sich somit am ehesten auf einen zunehmenden Endothelschaden, besonders im terminalen Stromgebiet zurückführen, wodurch eine ausreichende myokardiale Sauerstoffversorgung nicht mehr gewährleistet ist^{1,171}. Eine weitere Möglichkeit ist die Freisetzung des Laktats aus Erythrozyten, beispielsweise durch die in Kapitel 4.1.1.2 genannte mechanische Hämolyse durch die Rollerpumpen¹⁵³.

Der Mechanismus, der zu einem geringeren Laktatanstieg in ‚HSP-Herzen‘ führen soll, ist nach wie vor noch nicht vollständig geklärt^{140,144}.

4.1.8 Kontraktionsbanden

Als Kontraktionsbanden bezeichnet man Aggregate von eosinophilen, hyperkontrahierten Sarkomeren. Sie entstehen bei der Reperfusion eines für längere Zeit ischämischen Myokardgebietes¹¹². Kontraktionsbanden treten im Gegensatz zur Koagulationsnekrose schon wenige Minuten nach Beginn der Reperfusion auf¹⁰. Sie sind das morphologische Korrelat der intrazellulären Kalziumüberladung^{61,93,143,181}.

Die Präkonditionierung reduziert die intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung durch Aktivierung der $K^+_{ATP^-}$ Kanäle^{8,63,176,199}. Präkonditionierte Herzen zeigen weniger Nekrose und eine Reduktion der Infarktgröße¹³⁹.

Betrachtet man die verschiedenen Areale im Herzen fällt auf, daß in allen Regionen (Hinterwand, Septum, Herzspitze, Seitenwand, Vorderwand) die

Herzen der Ischämiegruppe die meisten Kontraktionsbanden zeigen. Signifikante Unterschiede lassen sich hier allerdings nicht ableiten.

Die meisten Kontraktionsbanden traten im Bereich der Herzspitze auf. Dies läßt sich auf die Manipulationen in diesem Areal zurückführen. Dort wurden mehrmals während des Versuchsablaufs Biopsien entnommen. Zusätzlich war von dort aus der TIP-Katheter während der Reperfusionphase und in situ per Biopsiekanal in den linken Ventrikel eingeführt worden.

Auffällig ist vor allem, daß es im subendokardialen Gebiet kaum zur Ausbildung von Kontraktionsbanden kommt. Diese Beobachtungen konnten bereits häufiger bei ähnlichen Versuchsmodellen in unserem Labor gemacht werden^{177,191}. Bei einer der genannten Studien zeigte sich in der Kernspintomographie im subendokardialen Bereich deutlich weniger ausgeprägte Ödembildung. Aufgrund der verminderten subendokardialen Reperfusion kommt es hier wohl nicht zu einem zusätzlich zum Ischämieschaden auftretenden Reperfusionsschaden. Eine Ausbildung von Kontraktionsbanden scheint daher ausbleiben. Darüber hinaus gilt die subendokardiale Region als ‚letzte Wiese‘ der Perfusion. Der ischämische Streiß ist hier deutlicher ausgeprägt. In Herzen kommt es bei langer ischämischer Phase zu einer vollständigen Entleerung der ATP-Speicher, eine Bildung von Kontraktionsbanden ist in der Reperfusion nicht mehr möglich^{112,127}.

4.1.9 Apoptose

In dieser Studie kam es bei der Apoptose mit Werten zwischen 330 und 487 apoptotischen Zellkernen pro mm³ zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen. Eine Reihe von Studien hat gezeigt, daß es in vivo und in vitro sowohl im FWOP^{56,131,160}, als auch im SWOP⁷ zu einer Reduktion der Apoptose in präkonditionierten Herzen kommt. Eine reduzierte Apoptoserate als Mechanismus für die Präkonditionierung ist noch nicht nachgewiesen und die Ergebnisse dieser Studie sprechen eher für die fehlende Bedeutung der Apoptose bei der Präkonditionierung.

Der verwendete Apoptose-Detection-Kit brachte zudem das Problem mit sich, daß das verwendete Marker-Enzym außer der intranukleären

Doppelstrangbrüche auch extrazelluläres Material anfärbte. Eine sichere Differenzierung zwischen Apoptose und Artefakt war im Einzelfall schwierig.

Mehrere Studien zeigten, daß es oftmals erst nach mehreren Stunden oder Tagen zur Ausprägung der Apoptose kam, insbesondere dann, wenn es sich um die Ausbildung von Reperfusionsschäden handelt^{30,34}. Eine dieser Studien zeigte das Höchstmaß an Nekrose nach 24 Stunden Reperfusion, wobei der Höhepunkt der Apoptose erst nach 72 Stunden Reperfusion auftrat²²². Es ist somit denkbar, daß im vorliegenden Fall ein unzureichender Beobachtungszeitraum nach dem Beginn der Reperfusion zugrunde lag.

Nach wie vor ist nicht geklärt, in welchem zeitlichen Verhältnis Nekrose und Apoptose stehen. Möglicherweise laufen beide Prozesse parallel ab.

4.1.10 Myokardialer Wassergehalt

In der vorliegenden Studie kommt es zwischen den Gruppen zu keinem signifikanten Unterschied im Anstieg des myokardialen Wassergehaltes. Der Anstieg liegt in dieser Versuchsreihe mit Werten zwischen 7,7% und 7,9% nur unwesentlich höher als in vergleichbaren Studien¹. Im genannten Versuch von Acar et al. kam es aber nicht zur Durchführung eines Working Heart Modus. Ein anderes Modell zeigte eine Zunahme des myokardialen Wassergehaltes von fast 30%²⁴. Hier fand eine 24-stündige kontinuierliche Perfusion mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung statt. Durch die geringe Perfusionszeit von zwei Stunden in unserem Modell erklärt sich auch die nur geringe Zunahme des myokardialen Wassergehaltes.

Die Ursache der Ödemausbildung im Myokard wird auf die Ischämie und die Reperfusion zurückgeführt. Entscheidend für die Bildung des Ödems ist die myokardiale Hypoxie und Hyperkaliämie, die durch Schädigung der Zellmembranen entstehen und zu einer erhöhten Zellpermeabilität führen^{1,171}. Zusätzlich zeigt sich ein Ödem als Konsequenz der hypothermen Perfusion^{39,40}.

4.1.11 Hitzeschockproteine

4.1.11.1 HSP70 und ischämische PK

Zu allen Zeitpunkten des Versuchs zeigten sich in der Ischämiegruppe unseres Modells keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten.

In vielen Untersuchungen wurde die Möglichkeit einer HSP-Induktion durch Ischämie beschrieben^{102,121}. Neuere Studie widersprechen diesen Aussagen sowohl für ischämisch als auch für pharmakologisch präkonditionierte Herzen^{15,18,19}. In diesen Studien kam es zwar zu einer Induktion des zweiten Fensters der Präkonditionierung, ein Anstieg des myokardialen HSP-Gehalts war aber nicht nachweisbar. Auch die vorliegende Untersuchung klärt die Beziehung zwischen HSP und dem SWOP nicht¹⁷³.

Die leichte Zunahme des HSP-Gehalts zu Beginn des vorliegenden Versuchs könnte eher ein Marker für die Antwort der Zellen auf Streß sein. Dabei werden bereits vorhandene, gespeicherte HSP ausgeschüttet²⁶. In einer Studie von Snoeck et al.¹⁸⁴ zeigte sich ebenfalls bereits ein Anstieg des HSP-Gehalts in einem frühen Stadium nach einer Hyperthermie-Phase.

4.1.11.2 HSP und Präkonditionierung durch Herbimycin A

Die vorliegende Studie untersuchte die HSP70-Expression durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Herbimycin A in einem ex situ Perfusionsmodell, da sich in mehreren Studien die Wirksamkeit dieser Substanz in isolierten Myokardzellen bereits gezeigt hat^{38,137}. Nach einer 16-stündigen Latenzzeit nach der i.v.-Applikation zeigt die erste Messung der HSP70-Konzentration nach der Perikarderöffnung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bis zur zweiten Bestimmung des HSP-Gehalts zu Beginn der Reperfusion kommt es dann zu einem signifikanten Abfall des HSP70-Gehaltes in der Herbimycin A-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Auch im weiteren Verlauf des Versuchs nimmt der HSP-Gehalt in den pharmakologisch präkonditionierten Herzen kontinuierlich ab. Diese Ergebnisse korrelieren mit Beobachtungen der Yellon- und anderen Arbeitsgruppen^{15,18,19,23,74,221}, die das SWOP, aber keine zunehmende Expression von HSP beobachteten.

Die Expression von HSP auf pharmakologischem Weg wurde zuerst in nicht-myokardialen Zellen nachgewiesen, ehe dann Stephanou et al.¹⁸⁹ eine Expression in Zellkulturen myokardialer Zellen gelang. Auch im perfundierten ex vivo-Herzen gelang durch Bimoclolol, Norepinephrin und Aktivierung der Adenosin A₁-Rezeptoren eine HSP-Ausschüttung^{46,134,204}.

Herbimycin A ist auch noch für weitere HSP-Induktionen verantwortlich. Conde et al. wiesen außer HSP70 auch HSP27 und HSP90 in Herbimycin A-behandelten Kardiomyozyten nach³⁸. HSP90 zeigte zwar einen kardioprotektiven Effekt bei thermischem, nicht aber bei ischämischem Streß⁴². In weiteren Versuchen wurde belegt, daß HSP27 ebenso protektiv sein kann wie HSP70^{125,126}. In der vorliegenden Studie wird nur die Bestimmung von HSP70 durchgeführt. Eine zusätzliche Bestimmung von HSP27 bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Die Applikation von Herbimycin A kann allerdings in Bezug auf das zweite Fenster der Präkonditionierung auch hemmende Auswirkungen haben. Wie Untersuchungen mit dem PKC-Inhibitor Chelerythrin gezeigt haben, kann eine NO-induzierte Verminderung des Stunnings⁹, eine ischämieinduzierte Infarktreduzierung¹³ und eine ischämische Präkonditionierung mittels Tyrosinkinase¹⁵⁸ aufgehoben werden. Es ist denkbar, daß auch Herbimycin A als Tyrosinkinase-Inhibitor die zum SWOP führende Kaskade hemmen kann (s. Abbildung 1).

Die vorliegende Studie konnte weder eine HSP-Induktion noch eine Auswirkung auf die Herzfunktion (s. Kapitel 3.1, 3.3 und 3.4) durch Herbimycin A nachweisen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse hinsichtlich der Präkonditionierung

4.2.1 Erstes und zweites Fenster der Präkonditionierung

In dieser Arbeit werden direkt die Auswirkungen des ersten Fensters der Präkonditionierung durch die ischämische Präkonditionierung und des zweiten Fensters durch die pharmakologische Präkonditionierung mittels Herbimycin A verglichen, um die Möglichkeit einer klinischen Anwendung der

Präkonditionierung in der Herzchirurgie zu überprüfen. Im Weiteren sollen die grundlegenden Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Mechanismen kurz erläutert werden.

Sowohl das FWOP wie auch das SWOP führen zu einer Reduzierung der Infarktgröße, wobei sich die Effekte des FWOP als ausgeprägter darstellen^{35,105,121,139}. Andererseits mildert das SWOP das myokardiale Stunning, was für das FWOP nicht zutrifft²⁵. Die Dauer der Schutzwirkung ist deutlich unterschiedlich (2-3 Stunden (FWOP))³⁵; 24-72 Stunden ((SWOP)^{14,18,200}). Diese Erkenntnisse unterstützen das Konzept, daß das SWOP für die klinische Anwendbarkeit besser geeignet ist, zumal die Dauer des FWOP sich weder durch pharmakologische Trigger²⁰² noch durch wiederholte ischämische Phasen³⁶ ausdehnen läßt. Diese Einschränkung zeigt sich beim SWOP nicht. Die Arbeitsgruppe um Yellon zeigte, daß sich die infarktreduzierende Wirkung durch weitere Applikation von pharmakologisch präkonditionierenden Maßnahmen auf mindestens 10 Tage ausdehnen läßt und zu keiner Toleranzentwicklung führt⁴⁵.

Herbimycin A wurde 16 Stunden vor der Ischämie appliziert. Der Moment der Datenerhebung liegt also am Anfang der postulierten Wirkung des Pharmakons. Möglicherweise erfolgte die Messung der Parameter zu früh.

Die Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung konnte in dieser Versuchsreihe bestätigt werden. Frühpostischämisch zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Werten des Stroke-Work-Index. Eine Verminderung der Infarktgröße konnte im vorliegenden Modell nicht nachgewiesen werden. Das Ausmaß der Kontraktionsbanden-Nekrosen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die pharmakologische Präkonditionierung konnte durch Herbimycin A nicht gezeigt werden. Sowohl für funktionelle als auch für morphologische und biochemische Parameter konnten keine signifikanten Unterschiede erzielt werden. Die in Kapitel 4.1.11.2 genannte parallele Blockade der Tyrosinkinase könnte hierfür ursächlich sein.

4.2.2 Klinische Bedeutung der Präkonditionierung

Ischämische Präkonditionierung. Das menschliche Herz ist für die ischämische Präkonditionierung zugänglich. Sie zeigt sich auch als natürlich vorkommendes Phänomen. Beispielsweise erfahren Patienten mit stabiler Angina pectoris eine „natürliche Präkonditionierung“ durch wiederholte ischämische Episoden. Nur neun Prozent dieser Patienten erleiden innerhalb der nächsten vier Wochen einen Myokardinfarkt²⁰¹. Die therapeutische Anwendung solcher ischämischen Episoden bleibt aber schwierig, da das Zeitintervall von Beginn der Ischämie-Symptome bis zum Start der Reperfusion kritisch ist.

Viele Studien zeigten, daß Patienten, die an stabiler Angina pectoris leiden eine bessere Prognose besitzen als Patienten, die ohne „Vorwarnung“ ein kardiales Ereignis erleiden. Ein folgender Myokardinfarkt bleibt beispielsweise auf ein kleineres Myokardareal beschränkt mit besserer linksventrikulärer Funktion^{101,146}. Auch die 1-Jahres-Mortalitätsrate ist laut diesen Studien geringer als in der Vergleichsgruppe.

Positive Ergebnisse zeigten sich auch im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen. Patienten, bei denen intraoperativ eine ischämische Präkonditionierung durchgeführt wurde, zeigten postoperativ eine bessere linksventrikuläre Funktion und einen geringeren Bedarf an positiv inotropen Substanzen⁸⁶.

Dennoch bleibt die Gefahr einer negativen Auswirkung der Ischämie, da Kriterien für eine sichere Dosierung der ischämischen Intervalle fehlen. Daher wird die ischämische Präkonditionierung nur im Rahmen von Studien und nicht im klinischen Alltag angewendet.

Pharmakologische Präkonditionierung. Aufgrund der möglichen Komplikationen einer ischämischen Präkonditionierung wird versucht eine möglichst gefahrenlose Methode der Präkonditionierung zu ermitteln. Hier kommen vor allem medikamentöse Ansätze in Betracht. Für Opioide konnte bereits eine präkonditionierende Wirkung nachgewiesen werden^{59,70}. Eine mögliche Schlüsselrolle bei der pharmakologischen Präkonditionierung wird dabei den HSP zugesprochen. Bisher gibt es jedoch keine Studie, die einen

direkten Zusammenhang zwischen der Induktion von Hitzeschockproteinen und einer kardioprotektiven Wirkung nachweist¹¹⁰. Auch in der vorliegenden Studie konnte dies nicht gezeigt werden. Bevor die kardioprotektive Wirkung einer pharmakologischen Substanz klinisch ausgenutzt werden kann, muß ausgeschlossen sein, daß dieser Effekt auch negative Nebeneffekte hat. So hat sich mittlerweile gezeigt, daß Herbimycin A wahrscheinlich direkte Auswirkungen auf das Zellwachstum und die Zellteilung besitzt¹⁵², so daß seiner Anwendung als Therapeutikum Grenzen gesetzt sind.

4.3 Ausblick

Das zweite Fenster der Präkonditionierung entspricht in seiner Auswirkung auf die Herzfunktion weitgehend dem ersten Fenster. Die exakten Mechanismen dieser späten Phase sind unbekannt. Ihr Verständnis ist aber Voraussetzung, um daraus potentielle Therapien ableiten zu können.

Es kommen in erster Linie medikamentöse Wirkstoffe in Betracht. Auch genetische Verfahren wie beispielsweise der Transfer von kardioprotektiven Genen könnten Möglichkeiten eröffnen.

Gentechnische Methoden spielen auch in der Induktion von Hitzeschockproteinen eine Rolle. Es wurde bereits gezeigt, daß intrakoronare Infusionen von HSP70-Genen mit Hilfe von Plasmiden als Trägersubstanz positive Auswirkungen haben^{133,195}. Die Nebenwirkungen sind allerdings erheblich. Virale Trägersubstanzen könnten zukünftig diese Probleme umgehen.

5 Zusammenfassung, Schlussfolgerung

5.1 Klinische Problemstellung

Viele Patienten in der Herzchirurgie sind in fortgeschrittenem Alter und als Hochrisikopatienten einzustufen, da Begleiterkrankungen wie Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie oder Niereninsuffizienz vorliegen.

Bei den meisten herzchirurgischen Eingriffen werden die Herzen einer Ischämiephase unterzogen. Diese Ischämie führt zu Nekrose und Apoptose, möglicherweise auch zur Ausbildung eines Myokardinfarktes. Das Myokard dieser Patienten ist postoperativ anfälliger für Herzrhythmusstörungen, erleidet eine höhere intrazelluläre Übersäuerung während der Ischämie und Reperfusion, zeigt eine schlechtere postischämische myokardiale kontraktile Funktion und hat einen höheren Bedarf an inotropiesteigernden Maßnahmen.

Das Phänomen der myokardialen Präkonditionierung bietet einen Ansatz zur Verbesserung der postoperativen Verhältnisse bei diesen Patienten. Die Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung ist in vielen Studien bewiesen. Jedoch kommen Hochrisikopatienten nicht für eine zusätzliche ischämische oder hypertherme Phase in Betracht. Andere Verfahren (pharmakologisch, gentechnisch) sind vonnöten, um eine Präkonditionierung zu erreichen.

5.2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit soll zur Klärung beitragen, ob der Tyrosinkinase-Inhibitor Herbimycin A in der Lage ist mittels Induktion von HSP zu einer pharmakologischen Präkonditionierung zu führen.

5.3 Material und Methoden

In der tierexperimentellen Studie werden 21 Ferkel in drei Gruppen (Kontrolle, Ischämie, Herbimycin A) untersucht. Die Tiere der Herbimycin A-Gruppe erhalten 16 Stunden präoperativ 0,1 mg Herbimycin A pro kg KG i.v.. In

allen Gruppen werden die Schweineherzen nach standardisierter Sternotomie unter Vollnarkose einer Ischämie mit drei Kardioplegiezyklen unterworfen. In der Ischämiegruppe wird vor dem blutkardioplegischen Herzstillstand ein Ramus diagonalis im Abstand von 5 Minuten 3 × jeweils für 3 min okkludiert.

Nach der Reperfusion mit homologem Schweineblut erfolgt die kontinuierliche Messung der Herzfunktion (Stroke-Work-Index) im ex situ Working Heart-Modell. Im Versuchsverlauf werden regelmäßig Proben für die Untersuchung von morphologischen und biochemischen Parameter entnommen.

5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Eine Induktion von HSP70 durch Herbimycin A ist nicht nachweisbar.

Die Herzen der Ischämiegruppe zeigen frühpostischämisch eine signifikant bessere kontraktile Funktion.

Alle anderen funktionellen, morphologischen und biochemischen Parameter unterscheiden sich zu den übrigen Zeitpunkten nicht zwischen den Gruppen.

5.5 Schlussfolgerung

Eine pharmakologische Präkonditionierung durch Herbimycin A mittels HSP kann in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden.

Die Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung kann in der frühpostischämischen Phase bestätigt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Acar, C., Partington, M. T., Buckberg, G. D. (1991)
Studies of controlled reperfusion after ischemia. XIX. Reperfusate composition: benefits of blood cardioplegia over fluosol DA cardioplegia during regional reperfusion-importance of including blood components in the initial reperfusate
J Thorac.Cardiovasc.Surg 101(2),284-293.
2. Agashe, V. R. and Hartl, F. U. (2000)
Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding
Semin.Cell Dev.Biol. 11(1),15-25.
3. Alyanakian, M. A., Dehoux, M., Chatel, D., Seguret, C., Desmonts, J. M., Durand, G., Philip, I. (1998)
Cardiac troponin I in diagnosis of perioperative myocardial infarction after cardiac surgery
Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia 12(3),288-294.
4. Auchampach, J. A. and Gross, G. J. (1993)
Adenosine A1 receptors, K_{ATP} channels, and ischemic preconditioning in dogs
American Journal of Physiology 264(5 Pt 2),H1327-H1336.
5. Auchampach, J. A., Grover, G. J., Gross, G. J. (1992)
Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate
Cardiovascular Research 26(11),1054-1062.
6. Baghelai, K., Graham, L. J., Wechsler, A. S., Jakoi, E. R. (1999a)
Cardiopulmonary support and physiology. Delayed myocardial preconditioning by α 1-adrenoreceptors involves inhibition of apoptosis.
The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 117,980-986.
7. Baghelai, K., Graham, L. J., Wechsler, A. S., Jakoi, E. R. (1999b)
Delayed myocardial preconditioning by alpha1-adrenoreceptors involves inhibition of apoptosis
The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery 117(5),980-986.
8. Baines, C. P., Liu, G. S., Birincioglu, M., Critz, S. D., Cohen, M. V., Downey, J. M. (1999)
Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial K_{ATP} channels and actin cytoskeleton
American Journal of Physiology 276(4 Pt 2),H1361-H1368.

-
9. Banerjee, S., Tang, X. L., Qiu, Y., Takano, H., Manchikalapudi, S., Dawn, B., Shirk, G., Bolli, R. (1999)
Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial stunning via a PKC-dependent pathway
American Journal of Physiology 277(6 Pt 2),H2488-H2494.
 10. Barrabes, J. A., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Piper, H. M., Soares, J., Gonzalez, M. A., Oliveras, J., Herrejon, M. P., Soler, J. (1996)
Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis
Pflugers Arch. 431(4),519-526.
 11. Barsotti, A., Di Napoli, P., Dini, F. L., Soccio, M., Di Iorio, P., Gallina, S., Di Muzio, M., Modesti, A. (1998)
Effect of acute increase of interstitial myocardial fluid on ventricular function in isolated working rat hearts
J Med. 29(3-4),137-158.
 12. Bartling, B., Holtz, J., Darmer, D. (1998)
Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction?
Basic Research in Cardiology 93(2),71-84.
 13. Baxter, G. F., Goma, F. M., Yellon, D. M. (1995)
Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischaemia in rabbit myocardium
Br.J.Pharmacol. 115(2),222-224.
 14. Baxter, G. F., Goma, F. M., Yellon, D. M. (1997)
Characterisation of the infarct-limiting effect of delayed preconditioning: timecourse and dose-dependency studies in rabbit myocardium
Basic Research in Cardiology 92(3),159-167.
 15. Baxter, G. F., Goodwin, R. W., Wright, M. J., Kerac, M., Heads, R. J., Yellon, D. M. (1996)
Myocardial protection after monophosphoryl lipid A: studies of delayed anti-ischaemic properties in rabbit heart
Br.J.Pharmacol. 117(8),1685-1692.
 16. Baxter, G. F., Marber, M. S., Patel, V. C., Yellon, D. M. (1994)
Adenosine receptor involvement in a delayed phase of myocardial protection 24 hours after ischemic preconditioning
Circulation 90(6),2993-3000.
 17. Baxter, G. F., Mocanu, M. M., Yellon, D. M. (1997)
Attenuation of myocardial ischaemic injury 24 h after diacylglycerol treatment in vivo
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29(7),1967-1975.

-
18. Baxter, G. F. and Yellon, D. M. (1997)
Time course of delayed myocardial protection after transient adenosine A1-receptor activation in the rabbit
J.Cardiovasc.Pharmacol. 29(5),631-638.
 19. Baxter, G. F. and Yellon, D. M. (1998)
Delayed preconditioning against lethal ischaemic injury.
Baxter GF, Yellon DM. *Delayed Preconditioning and Adaptive Cardio-protection.* Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers ,1-28.
 20. Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M., Green, D. R. (2000)
Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome
Nat.Cell Biol. 2(8),469-475.
 21. Bellmann, K., Burkart, V., Bruckhoff, J., Kolb, H., Landry, J. (2000)
p38-dependent enhancement of cytokine-induced nitric-oxide synthase gene expression by heat shock protein 70
The Journal of Biological Chemistry 275(24),18172-18179.
 22. Bendjelid, K., Canet, E., Gasche, Y., Andre-Fouet, X., Revel, D., Janier, M. (2003)
Slaughterhouse blood as a perfusate for studying myocardial function under ischemic conditions
Braz.J Med.Biol.Res. 36(1),39-44.
 23. Bernardo, N. L., Okubo, S., Maaieh, M. M., Wood, M. A., Kukreja, R. C. (1999)
Delayed preconditioning with adenosine is mediated by opening of ATP-sensitive K⁺ channels in rabbit heart
American Journal of Physiology 277(1 Pt 2),H128-H135.
 24. Bethencourt, D. M. and Laks, H. (1981)
Importance of edema and compliance changes during 24 hours of preservation of the dog heart
J Thorac.Cardiovasc.Surg 81(3),440-449.
 25. Bolli, R. (1996)
The early and late phases of preconditioning against myocardial stunning and the essential role of oxyradicals in the late phase: an overview
Basic Research in Cardiology 91(1),57-63.
 26. Bolli, R. (2000)
The late phase of preconditioning
Circulation Research 87(11),972-983.

-
27. Bolli, R., Bhatti, Z. A., Tang, X. L., Qiu, Y., Zhang, Q., Guo, Y., Jadoon, A. K. (1997)
Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide
Circulation Research 81(1),42-52.
 28. Bolli, R., Dawn, B., Tang, X. L., Qiu, Y., Ping, P., Xuan, Y. T., Jones, W. K., Takano, H., Guo, Y., Zhang, J. (1998)
The nitric oxide hypothesis of late preconditioning
Basic Research in Cardiology 93(5),325-338.
 29. Bolli, R., Manchikalapudi, S., Tang, X. L., Takano, H., Qiu, Y., Guo, Y., Zhang, Q., Jadoon, A. K. (1997)
The protective effect of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is mediated by nitric oxide synthase. Evidence that nitric oxide acts both as a trigger and as a mediator of the late phase of ischemic preconditioning
Circulation Research 81(6),1094-1107.
 30. Braunwald, E. and Kloner, R. A. (1985)
Myocardial reperfusion: a double-edged sword?
J Clin Invest 76(5),1713-1719.
 31. Bretschneider, H. J. (1980)
Myocardial protection
Thorac.Cardiovasc.Surg 28(5),295-302.
 32. Bruey, J. M., Ducasse, C., Bonniaud, P., Ravagnan, L., Susin, S. A., Diaz-Latoud, C., Gurbuxani, S., Arrigo, A. P., Kroemer, G., Solary, E., Garrido, C. (2000)
Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c
Nat.Cell Biol. 2(9),645-652.
 33. Büch, H. P. and Büch, U. (1992)
Narkotika.
in: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie* 6. Aufl., Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich,232-253.
 34. Byrne, J. G., Appleyard, R. F., Lee, C. C., Couper, G. S., Scholl, F. G., Laurence, R. G., Cohn, L. H. (1992)
Controlled reperfusion of the regionally ischemic myocardium with leukocyte-depleted blood reduces stunning, the no-reflow phenomenon, and infarct size
J Thorac.Cardiovasc.Surg 103(1),66-71.
 35. Cohen, M. V., Baines, C. P., Downey, J. M. (2000)
Ischemic preconditioning: from adenosine receptor of K_{ATP} channel
Annu.Rev.Physiol. 62,79-109.

-
36. Cohen, M. V., Yang, X. M., Downey, J. M. (1994)
Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic preconditioning
Circulation Research 74(5),998-1004.
 37. Collins, P. L. and Hightower, L. E. (1982)
Newcastle disease virus stimulates the cellular accumulation of stress (heat shock) mRNAs and proteins
J.Virol. 44(2),703-707.
 38. Condeelis, A. G., Lau, S. S., Dillmann, W. H., Mestril, R. (1997)
Induction of heat shock proteins by tyrosine kinase inhibitors in rat cardiomyocytes and myogenic cells confers protection against simulated ischemia
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29(7),1927-1938.
 39. Cooper, D. K., Wicomb, W. N., Rose, A. G., Barnard, C. N. (1983)
Orthotopic allotransplantation and autotransplantation of the baboon heart following 24-hr storage by a portable hypothermic perfusion system
Cryobiology. 20(4),385-394.
 40. Copeland, J. G., Jones, M., Spragg, R., Stinson, E. B. (1973)
In vitro preservation of canine hearts for 24 to 28 hours followed by successful orthotopic transplantation
Ann.Surg 178(6),687-692.
 41. Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T. (1999)
Cellular pathology I: cell injury and cell death.
Robbins pathologic basis of disease, Philadelphia, PA: Saunders ,1-29.
 42. Cumming, D. V. E., Heads, R. J., Watson, A., Latchman, D. S., Yellon, D. M. (1996)
Differential protection of primary rat cardiocytes by transfection of specific heat stress proteins
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 28(12),2343-2349.
 43. Currie, R. W. (1987)
Effects of ischemia and perfusion temperature on the synthesis of stress-induced (heat shock) proteins in isolated and perfused rat hearts
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 19(8),795-808.
 44. Currie, R. W., Karmazyn, M., Kloc, M., Mailer, K. (1988)
Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery
Circulation Research 63(3),543-549.

-
45. Dana, A., Baxter, G. F., Walker, J. M., Yellon, D. M. (1998)
Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A₁ receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state
American College of Cardiology: Journal of the American College of Cardiology 31(5),1142-1149.
 46. Dana, A., Jonassen, A. K., Yamashita, N., Yellon, D. M. (2000)
Adenosine A₁ receptor activation induces delayed preconditioning in rats mediated by manganese superoxide dismutase
Circulation 101(24),2841-2848.
 47. Das, D. K., Engelman, R. M., Kimura, Y. (1993)
Molecular adaptation of cellular defences following preconditioning of the heart by repeated ischaemia
Cardiovascular Research 27(4),578-584.
 48. Davtyan, H. G., Corno, A. F., Laks, H., Bhuta, S., Flynn, W. M., Laidig, C., Chang, P., Drinkwater, D. (1988)
Long-term neonatal heart preservation
J Thorac.Cardiovasc.Surg 96(1),44-53.
 49. Dawn, B., Xuan, Y. T., Qiu, Y., Takano, H., Tang, X. L., Ping, P., Banerjee, S., Hill, M., Bolli, R. (1999)
Bifunctional role of protein tyrosine kinases in late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits
Circulation Research 85(12),1154-1163.
 50. DeFily, D. V. and Chilian, W. M. (1993)
Preconditioning protects coronary arteriolar endothelium from ischemia-reperfusion injury
American Journal of Physiology 265(2 Pt 2),H700-H706.
 51. Delcayre, C., Samuel, J. L., Marotte, F., Best-Belpomme, M., Mercadier, J. J., Rappaport, L. (1988)
Synthesis of stress proteins in rat cardiac myocytes 2-4 days after imposition of hemodynamic overload
The Journal of Clinical Investigation 82(2),460-468.
 52. Deng, Q., Scicli, A. G., Lawton, C., Silverman, N. A. (1995)
Coronary flow reserve after ischemia and reperfusion of the isolated heart. Divergent results with crystalloid versus blood perfusion
J Thorac.Cardiovasc.Surg 109(3),466-472.
 53. Donnelly, T. J., Sievers, R. E., Visser, F. L., Welch, W. J., Wolfe, C. L. (1992)
Heat shock protein induction in rat hearts. A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion?
Circulation 85(2),769-778.

-
54. Doyle, A. R., Dhir, A. K., Moors, A. H., Latimer, R. D. (1995)
Treatment of perioperative low cardiac output syndrome
Ann.Thorac.Surg 59(Suppl II),S3-11.
 55. Ellis, R. J. (1990)
The molecular chaperone concept
Semin.Cell Biol. 1(1),1-9.
 56. Fliss, H. and Gattinger, D. (1996)
Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium
Circulation Research 79(5),949-956.
 57. Freude, B., Masters, T. N., Robicsek, F., Fokin, A., Kostin, S.,
Zimmermann, R., Ullmann, C., Lorenz-Mayer, S., Schaper, J. (2000)
Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during
reperfusion.
J Mol.Cell Cardiol. 32,197-208.
 58. Fryer, R. M., Hsu, A. K., Eells, J. T., Nagase, H., Gross, G. J. (1999)
Opioid-induced second window of cardioprotection: potential role of
mitochondrial K_{ATP} channels
Circulation Research 84(7),846-851.
 59. Fryer, R. M., Hsu, A. K., Nagase, H., Gross, G. J. (2000)
Opioid-induced cardioprotection against myocardial infarction and
arrhythmias: mitochondrial versus sarcolemmal ATP-sensitive potassium
channels
The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics 294(2),451-
457.
 60. Gabai, V. L., Yaglom, J. A., Volloch, V., Meriin, A. B., Force, T.,
Koutroumanis, M., Massie, B., Mosser, D. D., Sherman, M. Y. (2000)
Hsp72-mediated suppression of c-Jun N-terminal kinase is implicated in
development of tolerance to caspase-independent cell death
Mol.Cell Biol. 20(18),6826-6836.
 61. Ganote, C. E. (1983)
Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury
J Mol.Cell Cardiol. 15(2),67-73.
 62. Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G.,
Papapetropoulos, A., Sessa, W. C. (1998)
Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90
Nature (London) 392(6678),821-824.

-
63. Garlid, K. D., Paucek, P., Yarov-Yarovoy, V., Murray, H. N., Darbenzio, R. B., D'Alonzo, A. J., Lodge, N. J., Smith, M. A., Grover, G. J. (1997)
Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection
Circulation Research 81(6),1072-1082.
 64. Garrido, C., Bruey, J. M., Fromentin, A., Hammann, A., Arrigo, A. P., Solary, E. (1999)
HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9
FASEB J. 13(14),2061-2070.
 65. Gorge, G., Erbel, R., Dobbertin, A., Hanggi, M., Hake, U., Meyer, J. (1994)
Isolated in-vitro perfusion of pig hearts obtained from the abattoir: an alternative to animal experiments?
Eur.Heart J 15(6),851-857.
 66. Goto, Y., Slinker, B. K., LeWinter, M. M. (1988)
Accuracy of volume measurement of rabbit left ventricle by balloon method
Am.J Physiol. 255(2 Pt 2),H394-H396.
 67. Gottlieb, R. and Magnus, R. (1904)
Digitalis und Herzarbeit. Nach Versuchen am überlebenden Warmblüterherzen.
Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 51,30-63.
 68. Gross, G. J. and Auchampach, J. A. (1992)
Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs
Circulation Research 70(2),223-233.
 69. Guo, Y., Bao, W., Tang, X. L., Wu, W. J., Bolli, R. (1999)
Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial infarction in mice.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 31(A11)
 70. Guo, Y., Bao, W., Tang, X. L., Wu, W. J., Takano, H., Bolli, R. (2000)
Pharmacologic preconditioning (PC) with adenosine A₁ and opioid δ₁ receptor agonists is iNOS-dependent.
Circulation 102(suppl. II),II-121.
 71. Guo, Y., Jones, W. K., Xuan, Y. T., Tang, X. L., Bao, W., Wu, W. J., Han, H., Laubach, V. E., Ping, P., Yang, Z., Qiu, Y., Bolli, R. (1999)
The late phase of ischemic preconditioning is abrogated by targeted disruption of the inducible NO synthase gene
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 96(20),11507-11512.
 72. Haunstetter, A. and Izumo, S. (1998)
Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease
Circulation Research 82(11),1111-1129.

-
73. Haunstetter, A. and Izumo, S. (2000)
Toward antiapoptosis as a new treatment modality
Circulation Research 86(4),371-376.
 74. Heads, R. J., Baxter, G. F., Latchman, D. S., Marber, M. S., Yellon, D. M. (1998)
Hsp and cytoskeletal protein expression and localization during delayed preconditioning in the rabbit heart.
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 30(A20)
 75. Heads, R. J., Latchman, D. S., Yellon, D. M. (1994)
Stable high level expression of a transfected human HSP70 gene protects a heart-derived muscle cell line against thermal stress
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 26(6),695-699.
 76. Hein, S., Scheffold, T., Schaper, J. (1995)
Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium
J Thorac.Cardiovasc.Surg 110(1),89-98.
 77. Hendrikx, M., Jiang, H., Gutermann, H., Toelsie, J., Renard, D., Briers, A., Pauwels, J. L., Mees, U. (1999)
Release of cardiac troponin I in antegrade crystalloid versus cold blood cardioplegia
J Thorac.Cardiovasc.Surg 118(3),452-459.
 78. Hendry, P. J., Taichman, G. C., Taichman, S. J., Keon, W. J. (1988)
Human myocardial responses to antibiotics: gentamicin, tobramycin and cephalothin
Can.J Cardiol. 4(5),219-222.
 79. Heubner, W. and Mancke, R. (1928)
Ein Apparat für vergleichende Untersuchungen am Warmblüterherzen in der Versuchsanordnung nach Langendorff.
Arch.exper.Path.u.Pharmakol. 137,257-263.
 80. Hill, M., Kodani, E., Shinmura, K., Tang, X. L. (2000)
Nitroglycerin induces late preconditioning against myocardial infarction despite nitrate tolerance.
Circulation 102(suppl. II),II-25.
 81. Hoag, J. B., Qian, Y. Z., Nayeem, M. A., D'Angelo, M., Kukreja, R. C. (1997)
ATP-sensitive potassium channel mediates delayed ischemic protection by heat stress in rabbit heart
American Journal of Physiology 273(5 Pt 2),H2458-64.

-
82. Hutter, M. M., Sievers, R. E., Barbosa, V., Wolfe, C. L. (1994)
Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection
Circulation () 89(1),355-360.
 83. Hyde, I. H. (1898)
The effect of distension of the ventricle on the flow of blood through the walls of the heart.
Am.J Physiol. 1,215-224.
 84. Ikonomidis, J. S., Tumiati, L. C., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Li, R. K. (1994)
Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischaemia
Cardiovascular Research 28(8),1285-1291.
 85. Illes, R. W., Asimakis, G. K., Inners-McBride, K., Buckingham, E. D. (1995)
Recovery of nonbeating donor hearts
J Heart Lung Transplant. 14(3),553-561.
 86. Illes, R. W. and Swoyer, K. D. (1998)
Prospective, randomized clinical study of ischemic preconditioning as an adjunct to intermittent cold blood cardioplegia
The Annals of Thoracic Surgery 65(3),748-752.
 87. Imagawa, J., Baxter, G. F., Yellon, D. M. (1997)
Genistein, a tyrosine kinase inhibitor, blocks the "second window of protection" 48 h after ischemic preconditioning in the rabbit
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29(7),1885-1893.
 88. Imagawa, J., Yellon, D. M., Baxter, G. F. (1999)
Pharmacological evidence that inducible nitric oxide synthase is a mediator of delayed preconditioning
Br.J.Pharmacol. 126(3),701-708.
 89. Institut für Veterinärpharmakologie -und toxikologie. (2001)
Stresnil ad us. vet., Injektionslösung, in: Tierarzneimittelkompendium der Schweiz.
Institut für Veterinärpharmakologie -und toxikologie, Zürich, Schweiz
 90. Isoyama, S. (1996)
Age-related changes before and after imposition of hemodynamic stress in the mammalian heart
Life Sciences 58(19),1601-1614.

-
91. Jaattela, M., Wissing, D., Kokholm, K., Kallunki, T., Egeblad, M. (1998)
Hsp70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases
EMBO J. 17(21),6124-6134.
 92. James, T. N. (1998)
The variable morphological coexistence of apoptosis and necrosis in human myocardial infarction: significance for understanding its pathogenesis, clinical course, diagnosis and prognosis
Coron.Artery.Dis. 9(5),291-307.
 93. Jennings, R. B. and Ganote, C. E. (1974)
Structural changes in myocardium during acute ischemia
Circulation Research 35(Suppl. 3),156-172.
 94. Julia, P. L., Buckberg, G. D., Acar, C., Partington, M. T., Sherman, M. P. (1991)
Studies of controlled reperfusion after ischemia. XXI. Reperfusate composition: superiority of blood cardioplegia over crystalloid cardioplegia in limiting reperfusion damage--importance of endogenous oxygen free radical scavengers in red blood cells
J Thorac.Cardiovasc.Surg 101(2),303-313.
 95. Jurna, I. (1992)
Analgetika.
in: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 6. Aufl., Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich,200-224.
 96. Kaeffer, N., Richard, V., Thuillez, C. (1997)
Delayed coronary endothelial protection 24 hours after preconditioning: role of free radicals
Circulation 96(7),2311-2316.
 97. Kaszala, K., Vegh, A., Papp, J. G., Parratt, J. R. (1996)
Time course of the protection against ischaemia and reperfusion-induced ventricular arrhythmias resulting from brief periods of cardiac pacing
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 28(10),2085-2095.
 98. Kaukoranta, P. K., Lepojarvi, M. P., Ylitalo, K. V., Kiviluoma, K. T., Peuhkurinen, K. J. (1997)
Normothermic retrograde blood cardioplegia with or without preceding ischemic preconditioning
The Annals of Thoracic Surgery 63(5),1268-1274.
 99. Khandjian, E. W. and Turler, H. (1983)
Simian virus 40 and polyoma virus induce synthesis of heat shock proteins in permissive cells
Mol.Cell Biol. 3(1),1-8.

-
100. Kjekshus, J. K., Henry, P. D., Sobel, B. E. (1971)
Activation of phosphorylase by cyclic AMP without augmentation of contractility in perfused guinea pig heart
Circulation Research 29(5),468-478.
 101. Kloner, R. A., Shook, T., Przyklenk, K., Davis, V. G., Junio, L., Matthews, R. V., Burstein, S., Gibson, M., Poole, W. K., Cannon, C. P. (1995)
Previous angina alters in-hospital outcome in TIMI 4. A clinical correlate to preconditioning?
Circulation 91(1),37-45.
 102. Knowlton, A. A., Brecher, P., Apstein, C. S. (1991)
Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia
The Journal of Clinical Investigation 87(1),139-147.
 103. Krebs, H. A. (1932)
Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper.
Z.Physiol.Chem. 210,33-66.
 104. Kukreja, R. C., Qian, Y. Z., Okubo, S., Flaherty, E. E. (1999)
Role of protein kinase C and 72 kDa heat shock protein in ischemic tolerance following heat stress in the rat heart
Molecular and Cellular Biochemistry 195(1-2),123-131.
 105. Kuzuya, T., Hoshida, S., Yamashita, N., Fuji, H., Oe, H., Hori, M., Kamada, T., Tada, M. (1993)
Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia
Circulation Research 72(6),1293-1299.
 106. La Thangue, N. B. and Latchman, D. S. (1988)
A cellular protein related to heat-shock protein 90 accumulates during herpes simplex virus infection and is overexpressed in transformed cells
Experimental Cell Research 178(1),169-179.
 107. Langendorff, O. (1895)
Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen.
Pflugers Arch. 61,291-307.
 108. Latchman, D. S. (1998a)
Heat shock proteins: Protective effect and potential therapeutic use
(Review)
Int.J.Mol.Med. 2(4),375-381.
 109. Latchman, D. S. (1998b)
Stress Proteins
Springer (editor) ,422.

-
110. Latchman, D. S. (2001)
Heat shock proteins and cardiac protection
Cardiovascular Research 51(4),637-646.
 111. Lawson, C. S. and Downey, J. M. (1993)
Preconditioning: state of the art myocardial protection
Cardiovascular Research 27(4),542-550.
 112. Lee, J. A. (1995)
The pathology of cardiac ischaemia: cellular and molecular aspects
J Pathol. 175(2),167-174.
 113. Li, G. C. (1983)
Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis
in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol
J.Cell Physiol. 115(2),116-122.
 114. Li, G. C. and Laszlo, A. (1985)
Amino acid analogs while inducing heat shock proteins sensitize CHO
cells to thermal damage
J.Cell Physiol. 122(1),91-97.
 115. Lindquist, S. and Craig, E. A. (1988)
The heat-shock proteins
Annu.Rev.Genet. 22,631-677.
 116. Liu, G. S., Thornton, J., Van Winkle, D. M., Stanley, A. W., Olsson, R. A.,
Downey, J. M. (1991)
Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1
adenosine receptors in rabbit heart
Circulation 84(1),350-356.
 117. Losano, G., Gattullo, D., Pagliaro, P. (1996)
Myocardial, neural and vascular aspects of ischemic preconditioning
Life Sciences 59,1185-1192.
 118. Low, I., Friedrich, T., Schoeppe, W. (1989)
Synthesis of shock proteins in cultured fetal mouse myocardial cells
Experimental Cell Research 180(2),451-459.
 119. Löffler, G. (1997)
Stoffwechsel der Kohlenhydrate.
in: Löffler, G., Petrides, P.E.,: Biochemie und Pathobiochemie 5. Aufl.;
Springer; Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong,
London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio,377-424.

-
120. MacLellan, W. R. and Schneider, M. D. (1997)
Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease
Circulation Research 81(2),137-144.
 121. Marber, M. S., Latchman, D. S., Walker, J. M., Yellon, D. M. (1993)
Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction
Circulation 88(3),1264-1272.
 122. Marber, M. S., Mestril, R., Chi, S. H., Sayen, M. R., Yellon, D. M., Dillmann, W. H. (1995)
Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury
The Journal of Clinical Investigation 95(4),1446-1456.
 123. Marber, M. S., Walker, J. M., Latchman, D. S., Yellon, D. M. (1994)
Myocardial protection after whole body heat stress in the rabbit is dependent on metabolic substrate and is related to the amount of the inducible 70-kD heat stress protein
The Journal of Clinical Investigation 93(3),1087-1094.
 124. Martin, A. M. J., Hackel, D. B., Entman, M. L., Capp, M. P., Spach, M. S. (1969)
Mechanisms in the development of myocardial lesions in hemorrhagic shock.
Ann.N.Y.Acad.Sci. 156,79-90.
 125. Martin, J. L., Hickey, E., Weber, L. A., Dillmann, W. H., Mestril, R. (1999)
Influence of phosphorylation and oligomerization on the protective role of the small heat shock protein 27 in rat adult cardiomyocytes
Gene Expr. 7(4-6),349-355.
 126. Martin, J. L., Mestril, R., Hilal-Dandan, R., Brunton, L. L., Dillmann, W. H. (1997)
Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes
Circulation 96(12),4343-4348.
 127. Matsuda, M., Fujiwara, H., Onodera, T., Tanaka, M., Wu, D. J., Fujiwara, T., Hamashima, Y., Kawai, C. (1987)
Quantitative analysis of infarct size, contraction band necrosis, and coagulation necrosis in human autopsied hearts with acute myocardial infarction after treatment with selective intracoronary thrombolysis
Circulation 76(5),981-989.

-
128. Maulik, N., Engelman, R. M., Rousou, J. A. (1999)
Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2.
Circulation 100(II),369-375.
 129. Maulik, N., Engelman, R. M., Wei, Z., Liu, X., Rousou, J. A., Flack, J. E., Deaton, D. W., Das, D. K. (1995)
Drug-induced heat-shock preconditioning improves postischemic ventricular recovery after cardiopulmonary bypass
Circulation 92(Suppl. IX),II381-8.
 130. Maulik, N., Engelman, R. M., Wei, Z., Lu, D., Rousou, J. A., Das, D. K. (1993)
Interleukin-1 alpha preconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury
Circulation 88(5 Pt 2),II387-II394.
 131. Maulik, N., Yoshida, T., Engelman, R. M., Deaton, D., Flack, J. E., Rousou, J. A., Das, D. K. (1998)
Ischemic preconditioning attenuates apoptotic cell death associated with ischemia/reperfusion
Molecular and Cellular Biochemistry 186(1-2),139-145.
 132. Mei, D. A., Elliott, G. T., Gross, G. J. (1996)
K_{ATP} channels mediate late preconditioning against infarction produced by monophosphoryl lipid A
American Journal of Physiology 271(6 Pt 2),H2723-H2729.
 133. Meldrum, D. R., Meng, X., Shames, B. D., Pomerantz, B., Donnahoo, K. K., Banerjee, A., Harken, A. H. (1999)
Liposomal delivery of heat-shock protein 72 into the heart prevents endotoxin-induced myocardial contractile dysfunction
Surgery 126(2),135-141.
 134. Meng, X., Brown, J. M., Ao, L., Banerjee, A., Harken, A. H. (1996)
Norepinephrine induces cardiac heat shock protein 70 and delayed cardioprotection in the rat through alpha 1 adrenoceptors
Cardiovascular Research 32(2),374-383.
 135. Mestral, R., Chi, S. H., Sayen, M. R., O'Reilly, K., Dillmann, W. H. (1994)
Expression of inducible stress protein 70 in rat heart myogenic cells confers protection against simulated ischemia-induced injury
The Journal of Clinical Investigation 93(2),759-767.

-
136. Moalic, J. M., Bauters, C., Himbert, D., Bercovici, J., Mouas, C., Guichenev, P., Baudoin-Legros, M., Rappaport, L., Emanoil-Ravier, R., Mezger, V. (1989)
Phenylephrine, vasopressin and angiotensin II as determinants of proto-oncogene and heat-shock protein gene expression in adult rat heart and aorta
J.Hypertens. 7(3),195-201.
137. Morris, S. D., Cumming, D. V., Latchman, D. S., Yellon, D. M. (1996)
Specific induction of the 70-kD heat stress proteins by the tyrosine kinase inhibitor herbimycin-A protects rat neonatal cardiomyocytes. A new pharmacological route to stress protein expression?
The Journal of Clinical Investigation 97(3),706-712.
138. Murakami, Y., Uehara, Y., Yamamoto, C., Fukazawa, H., Mizuno, S. (1991)
Induction of hsp 72/73 by herbimycin A, an inhibitor of transformation by tyrosine kinase oncogenes
Experimental Cell Research 195(2),338-344.
139. Murry, C. E., Jennings, R. B., Reimer, K. A. (1986)
Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium
Circulation 74(5),1124-1136.
140. Murry, C. E., Richard, V. J., Reimer, K. A., Jennings, R. B. (1990)
Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode
Circulation Research 66(4),913-931.
141. Nakamura, M., Wang, N. P., Zhao, Z. Q. (2000)
Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart.
Cardiovascular Research 45,661-670.
142. Nickel, R., Schummer, A., Seiferle, E. (1984)
Kreislaufsystem, Haut, Hautorgane
Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Berlin u.Hamburg Band 3
143. Nishida, M., Borzak, S., Kraemer, B., Navas, J. P., Kelly, R. A., Smith, T. W., Marsh, J. D. (1993)
Role of cation gradients in hypercontracture of myocytes during simulated ischemia and reperfusion
Am.J Physiol. 264(6 Pt 2),H1896-H1906.
144. Nomura, F., Aoki, M., Forbess, J. M., Mayer, J. E. Jr. (1999)
Myocardial self-preservative effect of heat shock protein 70 on an immature lamb heart
Ann.Thorac.Surg 68(5),1736-1741.

-
145. Norton, P. M. and Latchman, D. S. (1989)
Levels of the 90kd heat shock protein and resistance to glucocorticoid-mediated cell killing in a range of human and murine lymphocyte cell lines
J.Steroid Biochem. 33(2),149-154.
146. Ottani, F., Galvani, M., Ferrini, D., Sorbello, F., Limonetti, P., Pantoli, D., Rusticali, F. (1995)
Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning
Circulation 91(2),291-297.
147. Pagliaro, P., Gattullo, D., Rastaldo, R., Losano, G. (2001)
Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection
Life Sciences 69(1),1-15.
148. Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S. M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E. S., Kufe, D., Kharbanda, S. (2000)
Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90
EMBO J. 19(16),4310-4322.
149. Parsell, D. A. and Lindquist, S. (1993)
The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins
Annu.Rev.Genet. 27,437-496.
150. Pearl, J. M., Hiramoto, J., Laks, H., Drinkwater, D. C., Jr., Chang, P. A. (1994)
Fumarate-enriched blood cardioplegia results in complete functional recovery of immature myocardium
The Annals of Thoracic Surgery 57,1636-1641.
151. Pell, T. J., Yellon, D. M., Goodwin, R. W., Baxter, G. F. (1997)
Myocardial ischemic tolerance following heat stress is abolished by ATP-sensitive potassium channel blockade
Cardiovascular Drugs and Therapy 11(5),679-686.
152. Pennica, D., King, K. L., Shaw, K. J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S. M., Darbonne, W. C., Knutzon, D. S., Yen, R., Chien, K. R. (1995)
Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 92(4),1142-1146.
153. Petrides, P. E. (1997)
Blut.
in: Löffler, G., Petrides, P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie* 5. Aufl.; Springer; Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hong Kong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio,879-948.

-
154. Ping, P. and Murphy, E. (2000)
Role of p38 mitogen-activated protein kinases in preconditioning: a detrimental factor or a protective kinase?
Circulation Research 86(9),921-922.
 155. Ping, P., Takano, H., Zhang, J., Tang, X. L., Qiu, Y., Li, R. C., Banerjee, S., Dawn, B., Balafonova, Z., Bolli, R. (1999)
Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits: a signaling mechanism for both nitric oxide-induced and ischemia-induced preconditioning
Circulation Research 84(5),587-604.
 156. Ping, P., Zhang, J., Cao, X., Li, R. C., Kong, D., Tang, X. L., Qiu, Y., Manchikalapudi, S., Auchampach, J. A., Black, R. G., Bolli, R. (1999)
PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits
American Journal of Physiology 276(5 Pt 2),H1468-H1481.
 157. Ping, P., Zhang, J., Huang, S., Cao, X., Tang, X. L., Li, R. C., Zheng, Y. T., Qiu, Y., Clerk, A., Sugden, P., Han, J., Bolli, R. (1999)
PKC-dependent activation of p46/p54 JNKs during ischemic preconditioning in conscious rabbits
American Journal of Physiology 277(5 Pt 2),H1771-H1785.
 158. Ping, P., Zhang, J., Zheng, Y. T., Li, R. C., Dawn, B., Tang, X. L., Takano, H., Balafanova, Z., Bolli, R. (1999)
Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of Src and Lck tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits
Circulation Research 85(6),542-550.
 159. Piot, C. A., Martini, J. F., Bui, S. K., Wolfe, C. L. (1999)
Ischemic preconditioning attenuates ischemia/reperfusion-induced activation of caspases and subsequent cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase in rat hearts in vivo.
Cardiovascular Research 44,536-542.
 160. Piot, C. A., Padmanaban, D., Ursell, P. C., Sievers, R. E., Wolfe, C. L. (1997)
Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo
Circulation 96(5),1598-1604.
 161. Piper, H. M., Garcia-Dorado, D., Ovize, M. (1998)
A fresh look at reperfusion injury
Cardiovascular Research 38(2),291-300.

-
162. Plesset, J., Palm, C., McLaughlin, C. S. (1982)
Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*
Biochem.Biophys.Res.Commun. 108(3),1340-1345.
 163. Polla, B. S. (1988)
A role for heat shock proteins in inflammation?
Immunol.Today 9(5),134-137.
 164. Przyklenk, K. and Kloner, R. A. (1998)
Ischemic preconditioning: exploring the paradox
Prog.Cardiovasc.Dis. 40(6),517-547.
 165. Qiu, Y. and Hearse, D. J. (1992)
Comparison of ischemic vulnerability and responsiveness to cardioplegic protection in crystalloid-perfused versus blood-perfused hearts
J Thorac.Cardiovasc.Surg 103(5),960-968.
 166. Qiu, Y., Ping, P., Tang, X. L., Manchikalapudi, S., Rizvi, A., Zung, J., Takano, H., Wu, W. J., Teschner, S., Bolli, R. (1998)
Direct evidence that protein kinase C plays an essential role in the development of late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits and that ϵ is the isoform involved.
J Clin Invest 101,2182-2198.
 167. Qiu, Y., Rizvi, A., Tang, X. L., Manchikalapudi, S., Takano, H., Jadoon, A. K., Wu, W. J., Bolli, R. (1997)
Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits
American Journal of Physiology 273(6 Pt 2),H2931-H2936.
 168. Ripley, B. J., Stephanou, A., Isenberg, D. A., Latchman, D. S. (1999)
Interleukin-10 activates heat-shock protein 90beta gene expression
Immunology 97(2),226-231.
 169. Ritossa, F. (1962)
A new puffing pattern induced and temperature shock and DNP in *Drosophila*
Experientia 18,571-573.
 170. Robertson, J. D., Datta, K., Biswal, S. S., Kehrer, J. P. (1999)
Heat-shock protein 70 antisense oligomers enhance proteasome inhibitor-induced apoptosis
Biochem.J. 344 Pt 2:477-85.,477-485.
 171. Rousou, J. H., Engelman, R. M., Dobbs, W. A. (1983)
Experimental evaluation of secondary blood cardioplegia
J Surg Res. 34(2),104-110.

-
172. Rubino, A. and Yellon, D. M. (2000)
Ischaemic preconditioning of the vasculature: an overlooked phenomenon for protecting the heart?
Trends in Pharmacological Sciences 21(6),225-230.
173. Saganek, L. J., Ignasiak, D. P., Batley, B. L., Potoczak, R. E., Dodd, G., Gallagher, K. P. (1997)
Heat stress increases cardiac HSP72i but fails to reduce myocardial infarct size in rabbits 24 hours later
Basic Research in Cardiology 92,331-338.
174. Saleh, A., Srinivasula, S. M., Balkir, L., Robbins, P. D., Alnemri, E. S. (2000)
Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70
Nat.Cell Biol. 2(8),476-483.
175. Salo, D. C., Donovan, C. M., Davies, K. J. (1991)
HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise
Free Radic.Biol.Med. 11(3),239-246.
176. Sasaki, N., Sato, T., Ohler, A., O'Rourke, B., Marban, E. (2000)
Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide
Circulation 101(4),439-445.
177. Scheule, A. M., Miller, S., Vogel, U., Michels, F., Strotmann, C., Kloor, D., Wendel, H. P., Ziemer, G. (1998)
Successful Resuscitation of Pig Hearts from Non-Heart-Beating-Donors (NHBD): Assessment of Reperfusion Injury by MR Imaging after 25 Minutes of Warm Ischemia and 4 Hours of Perfusion with Cold UW-solution
European Surgical Research 30(suppl 1),52.
178. Schott, R. J., Rohmann, S., Braun, E. R., Schaper, W. (1990)
Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium
Circulation Research 66(4),1133-1142.
179. Schultz, J. E., Qian, Y. Z., Gross, G. J., Kukreja, R. C. (1997)
The ischemia-selective K_{ATP} channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29(3),1055-1060.
180. Schulz, R., Post, H., Sakka, S., Wallbridge, D. R., Heusch, G. (1995)
Intraischemic preconditioning: Increased tolerance to sustained low-flow ischemia by a brief episode of no-flow ischemia without intermittent reperfusion
Circulation Research 76,942-950.

-
181. Siegmund, B., Zude, R., Piper, H. M. (1992)
Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca^{2+} overload
Am.J Physiol. 263(4 Pt 2),H1262-H1269.
 182. Sigma Chemical Company. (1997)
Data sheet herbimycin A (H6649)
 183. Smolenski, R. T., Suitters, A., Yacoub, M. H. (1992)
Adenine nucleotide catabolism and adenosine formation in isolated human cardiomyocytes
J Mol.Cell Cardiol. 24(1),91-96.
 184. Snoeck, L. H., Contard, F., Samuel, J. L., Marotte, F., Rappaport, L. (1991)
Expression and cellular distribution of heat-shock and nuclear oncogene protein in rat hearts.
American Journal of Physiology 261(5Pt2),H1443-51.
 185. Sonnenblick, E. H., Ross, J. Jr, Braunwald, E. (1968)
Oxygen consumption of the heart. Newer concepts of its multifactoral determination
Am.J Cardiol. 22(3),328-336.
 186. Sprengel, U., Munkel, B., Robicsek, F., Masters, T. N., Schaper, J. (1995)
Ischemia affects cardiac proteins in healthy animals less severely than in human patients
Ann.Thorac.Surg 60(3),767-772.
 187. Starke, K. (1992)
Pharmakologie cholinergere Systeme.
in: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K.: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 6. Aufl., Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich,125-147.
 188. Stephanou, A., Amin, V., Isenberg, D. A., Akira, S., Kishimoto, T., Latchman, D. S. (1997)
Interleukin 6 activates heat-shock protein 90 beta gene expression
Biochem.J. 321(Pt 1),103-106.
 189. Stephanou, A., Brar, B., Heads, R., Knight, R. D., Marber, M. S., Pennica, D., Latchman, D. S. (1998)
Cardiotrophin-1 induces heat shock protein accumulation in cultured cardiac cells and protects them from stressful stimuli
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 30(4),849-855.
 190. Stephanou, A. and Latchman, D. S. (1999)
Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by STAT family transcription factors
Gene Expr. 7(4-6),311-319.

-
191. Strotmann, C. (2002)
Evaluation eines In situ Protektionsverfahrens im Hinblick auf eine Erweiterung des Spenderpools für die Herztransplantation.
Medizinische Dissertation, Universität Tübingen
192. Sugden, P. H. and Clerk, A. (1998)
"Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium
Circulation Research 83(4),345-352.
193. Sun, J. Z., Tang, X. L., Knowlton, A. A., Park, S. W., Qiu, Y., Bolli, R. (1995)
Late preconditioning against myocardial stunning. An endogenous protective mechanism that confers resistance to postischemic dysfunction 24 h after brief ischemia in conscious pigs
The Journal of Clinical Investigation 95(1),388-403.
194. Sun, J. Z., Tang, X. L., Park, S. W., Qiu, Y., Turrens, J. F., Bolli, R. (1996)
Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs
The Journal of Clinical Investigation 97(2),562-576.
195. Suzuki, K., Sawa, Y., Kaneda, Y., Ichikawa, H., Shirakura, R., Matsuda, H. (1997)
In vivo gene transfection with heat shock protein 70 enhances myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in rat
The Journal of Clinical Investigation 99(7),1645-1650.
196. Suzuki, K., Sawa, Y., Kaneda, Y., Ichikawa, H., Shirakura, R., Matsuda, H. (1998)
Overexpressed heat shock protein 70 attenuates hypoxic injury in coronary endothelial cells
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 30(6),1129-1136.
197. Takano, H., Manchikalapudi, S., Tang, X. L., Qiu, Y., Rizvi, A., Jadoon, A. K., Zhang, Q., Bolli, R. (1998)
Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits
Circulation 98(5),441-449.
198. Takano, H., Tang, X. L., Qiu, Y., Guo, Y., French, B. A., Bolli, R. (1998)
Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism
Circulation Research 83(1),73-84.
199. Takashi, E., Wang, Y., Ashraf, M. (1999)
Activation of mitochondrial K_{ATP} channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway
Circulation Research 85(12),1146-1153.

-
200. Tang, X. L., Qiu, Y., Park, S. W., Sun, J. Z., Kalya, A., Bolli, R. (1996)
Time course of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs
Circulation Research 79(3),424-434.
201. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO) IIb investigators. (1996)
A comparison of recombinant hirudin with heparin for the treatment of acute coronary syndromes.
N.Engl.J Med. 335(11),775-782.
202. Tsuchida, A., Thompson, R., Olsson, R. A., Downey, J. M. (1994)
The anti-infarct effect of an adenosine A1-selective agonist is diminished after prolonged infusion as is the cardioprotective effect of ischaemic preconditioning in rabbit heart
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 26(3),303-311.
203. Uehara, Y. and Fukazawa, H. (1991)
Use and selectivity of herbimycin A as inhibitor of protein- tyrosine kinases
Methods in Enzymology 201,370-379.
204. Vigh, L., Literati, P. N., Horvath, I., Torok, Z., Balogh, G., Glatz, A., Kovacs, E., Boros, I., Ferdinandy, P., Farkas, B., Jaszlits, L., Jednakovits, A., Koranyi, L., Maresca, B. (1997)
Bimoclolmol: a nontoxic, hydroxylamine derivative with stress protein-inducing activity and cytoprotective effects
Nat.Med. 3(10),1150-1154.
205. Walters, H. L., Digerness, S. B., Naftel, D. C., Waggoner, J. R., Blackstone, E. H., Kirklin, J. W. (1992)
The response to ischemia in blood perfused vs. crystalloid perfused isolated rat heart preparations
J Mol.Cell Cardiol. 24(10),1063-1077.
206. Wang, Y., Zhang, S., Guo, Y., Bao, W., Wu, J., Bolli, R. (2000)
Ischemic preconditioning (PC) upregulates inducible nitric oxide synthase (iNOS), but not eNOS, in cardiac myocytes in vivo.
Circulation 102(suppl. II),II-93.
207. White, F. C. and Bloor, C. M. (1981)
Coronary collateral circulation in the pig: correlation of collateral flow with coronary bed size
Basic Res.Cardiol. 76(2),189-196.
208. White, F. C., Roth, D. M., Bloor, C. M. (1986)
The pig as a model for myocardial ischemia and exercise
Lab.Anim.Sci. 36(4),351-356.

-
209. White, F. P. and White, S. R. (1986)
Isoproterenol induced myocardial necrosis is associated with stress protein synthesis in rat heart and thoracic aorta
Cardiovascular Research 20(7),512-515.
210. Wu, Z. K., Tarkka, M. R., Eloranta, J., Pehkonen, E., Kaukinen, L., Honkonen, E. L., Kaukinen, S. (2001)
Effect of ischemic preconditioning on myocardial protection in coronary artery bypass graft patients : can the free radicals act as a trigger for ischemic preconditioning?
Chest 119(4),1061-1068.
211. Xuan, Y. T., Tang, X. L., Banerjee, S., Takano, H., Li, R. C., Han, H., Qiu, Y., Li, J. J., Bolli, R. (1999)
Nuclear factor- κ B plays an essential role in the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits
Circulation Research 84(9),1095-1109.
212. Yadav, S. S., Sindram, D., Perry, D. K., Clavien, P. A. (1999)
Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway.
Hepatology 30,1223-1231.
213. Yamashita, N., Hoshida, S., Nishida, M., Igarashi, J., Aoki, K., Hori, M., Kuzuya, T., Tada, M. (1997)
Time course of tolerance to ischemia-reperfusion injury and induction of heat shock protein 72 by heat stress in the rat heart
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29(7),1815-1821.
214. Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Asahi, M., Kuzuya, T., Hori, M. (1999)
Exercise provides direct biphasic cardioprotection via manganese superoxide dismutase activation
Journal of Experimental Medicine (New York) 189(11),1699-1706.
215. Yamashita, N., Hoshida, S., Otsu, K., Taniguchi, N., Kuzuya, T., Hori, M. (2000)
Involvement of cytokines in the mechanism of whole-body hyperthermia-induced cardioprotection
Circulation 102(4),452-457.
216. Yamashita, N., Hoshida, S., Taniguchi, N., Kuzuya, T., Hori, M. (1998a)
A "second window of protection" occurs 24 h after ischemic preconditioning in the rat heart
Journal of Molecular and Cellular Cardiology 30(6),1181-1189.

-
217. Yamashita, N., Hoshida, S., Taniguchi, N., Kuzuya, T., Hori, M. (1998b)
Whole-body hyperthermia provides biphasic cardioprotection against
ischemia/reperfusion injury in the rat
Circulation 98(14),1414-1421.
218. Yamashita, N., Nishida, M., Hoshida, S., Kuzuya, T., Hori, M., Taniguchi,
N., Kamada, T., Tada, M. (1994)
Induction of manganese superoxide dismutase in rat cardiac myocytes
increases tolerance to hypoxia 24 hours after preconditioning
The Journal of Clinical Investigation 94(6),2193-2199.
219. Yellon, D. M., Baxter, G. F., Garcia Dorado, D., Heusch, G., Sumeray, M.
S. (1998)
Ischaemic preconditioning: present position and future directions
Cardiovascular Research 37,21-33.
220. Yoneda, T., Lowe, C., Lee, C. H., Gutierrez, G., Niewolna, M., Williams, P.
J., Izbicka, E., Uehara, Y., Mundy, G. R. (1993)
Herbimycin A, a pp60c-src tyrosine kinase inhibitor, inhibits osteoclastic
bone resorption in vitro and hypercalcemia in vivo
The Journal of Clinical Investigation 91(6),2791-2795.
221. Yoshida, K. I., Maaieh, M. M., Shipley, J. B., Doloresco, M., Bernardo, N.
L., Qian, Y. Z., Elliott, G. T., Kukreja, R. C. (1996)
Monophosphoryl lipid A induces pharmacologic 'preconditioning' in rabbit
hearts without concomitant expression of 70-kDa heat shock protein
Molecular and Cellular Biochemistry 156(1),1-8.
222. Zhao, Z. Q., Velez, D. A., Wang, N. P., Hewan-Lowe, K. O., Nakamura, M.,
Guyton, R. A., Vinten-Johansen, J. (2001)
Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase
of reperfusion
Apoptosis 6(4),279-290.
223. Zhao, Z. Q. and Vinten-Johansen, J. (2002)
Myocardial apoptosis and ischemic preconditioning
Cardiovascular Research 55(3),438-455.

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	G	Gravitationskraft
°C	Grad Celsius	G	Gramm
µl	µ-Liter	H	Stunde
5HD	5-Hydroxydecanoat	HCl	Salzsäure
A ₁ /A ₃	Adenosin 1/3	HSP	Hitzeschockprotein
AF	Aortic Flow (=Aortenfluss)	HV	Herzvolumen
AP	Atrial Pressure (=Druck im Vorhof)	I.E.	internationale Einheit
Apaf-1	Apoptose-Protease aktivierender Faktor 1	i.v.	intravenös
AR	Aldolase Reduktase	iNOS	induzierbare NO-Synthase
ATP	Adenosintriphosphat	IQB	Interquartilbereich
BGB	Bundesgesetzbuch	K ⁺	Kalium
bzgl.	bezüglich	K ⁺ _{ATP}	Kalium-ATP
bzw.	beziehungsweise	Kg	Kilogramm
Ca ²⁺	Calcium	KG	Körpergewicht
CCPA	2-Chloro-N ⁶ -Cyclopentiladenosin	L	Liter
CF	Coronary Flow (=Koronarfluss)	LAP	Left Atrial Pressure (=linksatrialer Druck)
Cl ⁻	Chlorid	LVP	Left ventricular pressure (=linksventrikulärer Druck)
cm	Zentimeter	MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
Cu ²⁺	Kupfer	max.	maximal
Cu-ZnSOD	Kupfer-Zink-SOD	mg	Milligramm
diast.	diastolisch	min	Minute
dl	Deziliter	min.	minimal
dLVP/dt	Änderung des linksventrikulären Drucks über die Zeit	ml	Milliliter
DNS	Desoxyribonukleinsäure	MLA	Monophosphoryl Lipid A
enddiast.	enddiastolisch	mm	Millimeter
eNOS	endotheliale NO-Synthase	mm ³	Kubikmillimeter
F _i O ₂	O ₂ -Konzentration inspiratorisch	mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
FWOP	First Window of Protection (frühe Phase der PK)	mmol	Millimol

MnSOD	Mitochondriale Superoxid-Dismutase	prä	präoperativ
mod.	Modifiziert	PTK	Protein Tyrosin Kinase
Na ⁺	Natrium	s.	siehe
NaCl	Natriumchlorid	S.	Seite
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat	SOD	Superoxid Dismutase
NF-κB	Nukleus Faktor κB	SWI	Stroke Work Index
NF-IL6	Nukleus Faktor Interleukin-6	SWOP	Second Window of Protection (späte Phase der PK)
nm	Nanometer	syst.	systolisch
NO	Stickstoffoxid	TdT	terminale desoxynucleotidyl Transferase
pCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck	TM	Trade Mark
pH	Wasserstoffpartialdruck	u.g.	unten genannt
PK	Präkonditionierung	VVI	Ventrikelschrittmacher
PKC	Protein Kinase C	z.B.	zum Beispiel
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck	ZVD	Zentraler Venendruck
post	postoperativ		

Ich danke

Herrn Dr. med Beierlein für die hervorragende Betreuung, die herausragende Zusammenarbeit, die Möglichkeit von seiner Begeisterung für die Forschung profitieren zu dürfen und vor allem für seine Freundschaft.

Herrn PD Dr. med. Scheule für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit auch vom Mitwirken an zahlreichen anderen Studien profitieren zu können.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Ziemer für die Schaffung der Voraussetzungen zur Verwirklichung der Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Wendel für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Herrn Neumann für seine uneingeschränkte Hilfe, seinen unermüdlichen Einsatz und für seinen Humor.

meinen Eltern durch deren Unterstützung ich den Weg in dieses Studium wählen und nach meinen Vorstellungen gestalten konnte.

und Anja die immer für mich da ist.

für die geistige, materielle und organisatorische Unterstützung danke ich

dem *fortüne*-Programm

dem Team des Forschungslabors der THG-Chirurgie

Herrn Dr. med. Dominik Jost, Vorgänger-Doktorand

Frau Wolf, Tier-OP

Herrn Biesinger, Tierpfleger

Herrn Dr. med. Vogel, Pathologisches Institut

dem Labor der Hautklinik

dem Labor des Pathologischen Instituts

dem Labor der ZMK-Klinik

Lebenslauf

Jens Stefan Haas, geboren am 13. April 1976 in Reutlingen
als erstes der drei Kinder
von Helga Haas-Riesterer und Oberstudiendirektor Bernhard Haas

Allgemeine Hochschulreife am 21.06.1995
Gymnasium des Bildungszentrums Nord, Reutlingen

Zivildienst von September 1995 bis Oktober 1996
Werkstatt für Behinderte in Reutlingen-Rappertshofen

Medizinstudium ab dem Wintersemester 1995/1996 in Tübingen
Ärztliche Vorprüfung August 1997
1. Staatsexamen August 1998
2. Staatsexamen April 2002
Praktisches Jahr mit Wahlfach Radiologie
Ärztliche Prüfung am 13.05.2003

Arzt im Praktikum
von Juli 2003 bis September 2004 und

Assistenzarzt
seit Oktober 2004 in der Klinik für Innere Medizin des Klinikums am
Steinenberg in Reutlingen
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. B. Braun)

Reutlingen, den 13. Mai 2005

Jens Haas