

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie  
der Chirurgischen Universitätsklinik Heidelberg,  
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. M.-M. Gebhard

MYOKARDPROTEKTION: EINE BALANCE  
ZWISCHEN ENERGETIK UND MEMBRANFUNKTION

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät Heidelberg  
der Ruprecht-Karls-Universität

vorgelegt von

**Bernhard Niederle**  
aus  
Dresden

Heidelberg 2005



Dekan: Prof. Dr. med. C. R. Bartram  
Referentin: Frau Prof. Dr. med. M.-M. Gebhard



Für meine Eltern, in Dankbarkeit



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>xi</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die globale Myokardischämie . . . . .	2
1.2 Strategien zur Organprotektion in Ischämie . . . . .	4
1.2.1 Kardioplegie . . . . .	4
1.2.2 Hypothermie – Prinzipien und Grenzen . . . . .	4
1.3 Der Winterschlaf . . . . .	5
1.4 Fragestellung . . . . .	6
<b>2 Material und Methodik</b>	<b>7</b>
2.1 Tiere . . . . .	7
2.2 Experimentelle Modelle und Versuchsprotokoll . . . . .	7
2.2.1 Biochemieversuche . . . . .	7
2.2.2 Versuche zur Ischämie-Reperfusion . . . . .	8
2.3 Anästhesie und Narkose . . . . .	8
2.4 Chirurgische Präparation . . . . .	9
2.5 Konservierende Perfusion . . . . .	10
2.6 Ischämische Lagerung . . . . .	11
2.6.1 Biochemieversuche . . . . .	11
2.6.2 Versuche zu Ischämie-Reperfusion . . . . .	11
2.7 Reperfusion . . . . .	12
2.7.1 Vorbereitungen am Herzen . . . . .	12
2.7.2 Apparativer Aufbau . . . . .	12
2.7.3 Ablauf und Strategie . . . . .	13
2.7.4 Chemikalien . . . . .	14
2.8 Messungen und Auswertung . . . . .	14
2.8.1 Geräte und Meßmethodik . . . . .	14
2.8.2 Kontrollparameter . . . . .	16
2.8.3 Auswertung . . . . .	17
2.9 Statistik . . . . .	19

<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>21</b>
3.1	Ausgangsstatus . . . . .	21
3.1.1	Präparation und kardioplegische Perfusion . . . . .	21
3.1.2	Metabolischer Status zu Ischämiebeginn . . . . .	21
3.2	Metabolismus während Ischämie . . . . .	22
3.2.1	Energieäquivalente . . . . .	22
3.2.2	Metabolite der Glykolyse . . . . .	25
3.2.3	pH-Verlauf . . . . .	27
3.3	Reperfusion - Funktionelle Entwicklung . . . . .	28
3.3.1	Herzrhythmus . . . . .	28
3.3.2	Inotropie . . . . .	28
3.3.3	Sauerstoffverbrauch . . . . .	30
3.3.4	Flow - Druck - Koronarwiderstand . . . . .	31
3.4	Metabolismus während Reperfusion . . . . .	32
3.4.1	Glukose . . . . .	32
3.4.2	Laktat . . . . .	32
3.4.3	pH-Verlauf . . . . .	33
3.4.4	Elektrolyte . . . . .	34
3.5	Metabolischer Status am Ende der Reperfusion . . . . .	37
3.5.1	Laktat . . . . .	37
3.5.2	Glukose - Glykogen . . . . .	38
3.5.3	Energiereiche Phosphate . . . . .	38
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
4.1	Möglichkeiten und Grenzen der Methode . . . . .	41
4.1.1	Der Hund als Versuchstier . . . . .	41
4.1.2	Das Langendorff-Modell . . . . .	42
4.1.3	Verwendung saliner Lösungen . . . . .	42
4.2	Problemdefinitionen . . . . .	43
4.2.1	Hypothermie . . . . .	43
4.2.2	Hypoxie . . . . .	44
4.2.3	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	45
4.2.4	Ca <sup>2+</sup> -Homöostase . . . . .	45
4.3	Homöostase von Natrium und Kalium . . . . .	45
4.3.1	Funktion und Regulation der Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	46
4.3.2	Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase in Hypothermie . . . . .	47
4.3.3	Ischämie - Reperfusion . . . . .	48
4.3.4	Auswirkungen reduzierter Aktivität der Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -ATPase . . . . .	49
4.3.5	Eigene Ergebnisse . . . . .	50
4.3.6	Schlußfolgerung . . . . .	51
4.4	Calcium-Homöostase . . . . .	52
4.4.1	Einige physiologische Grundlagen . . . . .	52
4.4.2	Einfluß von Hypothermie auf die Calcium-Homöostase . . . . .	52
4.4.3	Einfluß von Ischämie bzw. Anoxie auf die Calcium-Homöostase . . . . .	54
4.4.4	Besonderheiten der Ca <sup>2+</sup> -Homöostase im Hibernating . . . . .	56
4.4.5	Eigene Ergebnisse . . . . .	58



4.4.6	Zusammenfassung . . . . .	60
4.5	Myokardialer Metabolismus . . . . .	61
4.5.1	Laktattransport . . . . .	62
4.5.2	Anaerobe Glykolyse in Ischämie . . . . .	69
4.5.3	Laktatbilanz während Reperfusion . . . . .	71
4.5.4	Energetische Betrachtungen . . . . .	74
4.6	Funktionelle Entwicklung in Reperfusion . . . . .	76
4.6.1	Kontraktilität - $dp/dt_{max}$ bzw. $dp/dt_{max}:t-dp/dt_{max}$ . . . . .	76
4.6.2	Relaxation - $dp/dt_{min}$ bzw. $dp/dt_{min}:dp/dt_{max}$ . . . . .	77
4.6.3	Rhythmusstabilität . . . . .	78
4.7	Ausblick . . . . .	80
4.7.1	Der Winterschlaf als Vorbild der Natur . . . . .	80
4.7.2	Schlußfolgerungen . . . . .	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>95</b>
	Eigene Publikationen . . . . .	104
	<b>Lebenslauf</b>	<b>105</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>107</b>



# Abkürzungsverzeichnis

A./Aa.	Arteria/ae
ANOVA	Varianzanalyse
avD	arterio-venöse Differenz
ATP/ADP/AMP	Adenosintri-/di-/monophosphat
BMR	basale metabolische Rate
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CICR	calcium-induced calcium release
CK	Kreatinkinase
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
com	communis/e
DADLE	D-Ala-D-Leu-Enkephalin
dext	dexter/a/um
dp/dt <sub>max</sub>	maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
dp/dt <sub>min</sub>	maximale Druckabfallgeschwindigkeit
dp/dt <sub>max</sub> :t-dp/dt <sub>max</sub>	maximale Druckerhöhungsbeschleunigung
DTG	Deutsches Transplantationsgesetz
ER	endoplasmatisches Retikulum
ext	externus/a/um
FG <sub>korrr</sub>	korrigiertes Feuchtgewicht
GAP-DH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
Glukose-6-P-DH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Hb	Hämoglobin
HF	Herzfrequenz
Hist/His·HCl	Histidin/Histidinchlorid
HIT	hibernation induction trigger
HSP	Hitzeschockprotein
HTK	kardioplegische Lösung Custodiol® (nach den Inhaltsstoffen <b>H</b> istidin, <b>T</b> ryptophan, <b>α</b> - <b>K</b> etoglutarat)
inf	inferior/ius
int	internus/a
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
K	Grad Kelvin
K <sup>+</sup>	Kalium
K <sub>m</sub>	Michaelis-Menten-Konstante eines Enzyms
k.A.	keine Angaben
Lakt	Laktat
KOD	kolloidosmotischer Druck

Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
n	Anzahl bzw. Stoffmenge
Na <sup>+</sup>	Natrium
NA	Noradrenalin
NAD/NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCX	Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup> -Tauscher
NHE	Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Tauscher
ns	nicht signifikant
P <sub>O<sub>2</sub></sub>	Partialdruck für Sauerstoff
P <sub>CO<sub>2</sub></sub>	Partialdruck für Kohlendioxid
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PFK	Phosphofruktokinase
PKr	Kreatinphosphat
R <sub>cor</sub>	Widerstand im koronaren Stromgebiet
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RR	Blutdruck
S <sub>O<sub>2</sub></sub>	Hb-O <sub>2</sub> -Sättigung
SD	Standardabweichung
SEM	Fehler des Mittelwertes
sin	sinister/a/um
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
sup	superior/ius
t <sub>a</sub>	Temperatur des Ambientes
t <sub>ATP</sub>	ATP-Zeit (vgl. S. 24)
t <sub>b</sub>	Körpertemperatur
TAG	Triacyl-Glycerol
TEA	Tetraethylammonium
TG	Trockengewicht
V./Vv.	Vena/ae
v <sub>max</sub>	maximale Aktivität eines Enzyms
vs.	versus (gegenüber)
Z.n.	Zustand nach
[x] - [ ] <sub>e</sub> - [ ] <sub>i</sub>	Konzentration von x - extra-/intrazellulär

# Kapitel 1

## Einleitung

Der 20. Bericht der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation (2003) [98], der Daten von weltweit reichlich 200 Zentren zur Herztransplantation beinhaltet, berichtet von 7291 Herztransplantationen im Zeitraum Januar 1999–Juni 2001. Im Jahr 2003 wurden 3020 Transplantationen gemeldet, von denen 764 auf Europa entfielen.<sup>1</sup> Nach Angaben von Eurotransplant, die die Verteilung von Spenderorganen für die Benelux-Länder, Deutschland, die Niederlande, Österreich und Slowenien koordiniert, wurden allein in Deutschland 2003 374 Herzen transplantiert.<sup>2</sup> Dennoch befanden sich zum Stichtag 31. Dez. 2003 noch 473 Patienten auf der Warteliste. Weltweit versterben etwa 20% der Patienten auf der Warteliste, bevor für sie ein adäquates Organ verfügbar wird. Demgegenüber finden ca. 70% der Transplantierten in ein uneingeschränktes gesellschaftliches Leben zurück.<sup>1</sup> Bei entsprechender Indikation kann die Transplantation ein deutliches Benefit in Bezug auf die Lebensqualität der Betroffenen bringen, allerdings werden diese Möglichkeiten durch die weltweite Organknappheit begrenzt. Daran änderte die in Deutschland seit 1999 praktizierte erweiterte Zustimmungslösung leider nur wenig.<sup>3</sup> Nach dieser Regelung sollen bei nicht eruiertem Willen des potentiellen Spenders Angehörige in seinem mutmaßlichen Willen entscheiden (Reihenfolge: Ehegatte, volljährige Kinder, Eltern, volljährige Geschwister, Großeltern, nächste Angehörige). Der Vergleich mit der Situation in Österreich, wo jeder Verstorbene ein potentieller Spender ist, es sei denn, er/sie hat das Gegenteil verfügt oder seine nahen Angehörigen widersprechen, zeigt, daß die Organknappheit eine gesellschaftlich-politische Dimension hat.

Von gleicher Bedeutung sind allerdings medizinische Faktoren, die die Verfügbarkeit von Organen im allgemeinen, und Herzen im speziellen, limitieren. Momentan wird bei Herzen klinisch eine Ischämie von bis zu 4 Stunden, in Ausnahmefällen maximal 6 Stunden akzeptiert. Es ist verständlich, daß nach Abzug der Zeit für Ex- und Implantation des Organs die Reichweite für den Transport sehr begrenzt ist. Ein optimales Matching von Spender und Empfänger ist daher oft nicht möglich. Nach Taylor et al. [98] geht eine Ischämiezeit von 6 Stunden gegenüber nur 2 Stunden mit einem 2,5-fach erhöhten relativen Mortalitätsrisiko im 1-Jahres-Vergleich einher. Die Ischämiezeit hat damit mit einigen peri-

---

<sup>1</sup>Quelle: [www.ishlt.org/registries](http://www.ishlt.org/registries)

<sup>2</sup>Quelle: [www.eurotransplant.nl](http://www.eurotransplant.nl)

<sup>3</sup>§4 DTG

operativen Faktoren (Dialysepflichtigkeit, persistierende maschinelle Beatmung, verlängerte Hospitalisation) den deutlichsten Einfluß auf das Langzeitergebnis der Herztransplantation.

Eine Verlängerung der sicheren Ischämiezeit könnte somit den Pool der infrage kommenden Spender erweitern und eine bessere Spender-Empfänger-Übereinstimmung ermöglichen.

## 1.1 Die globale Myokardischämie

Unter Ischämie eines Organs versteht man die totale, globale und akute Unterbrechung der Sauerstoff- und Substratzufuhr in Verbindung mit einer ebenso vollständigen Unterbrechung des Abtransportes von Endprodukten des zellulären Metabolismus, insbesondere Laktat, Phosphat und Protonen [13, 31]. Nach dieser Definition ist die globale Ischämie gegenüber einer O<sub>2</sub>-Mangelperfusion im Sinne einer Hyp-/Anoxie oder Low-Flow-Ischämie abzugrenzen, bei der zumindest die Spülfunktion des Blutes noch teilweise erhalten ist.

Bei allen größeren Organen homöothermer Organismen ist eine (normotherme) Ischämie in vorgenanntem Sinne nicht mit einer Erhaltung des Gleichgewichtes von energiebereitstellenden und -verbrauchenden Prozessen vereinbar, weil anstelle der oxidativen Phosphorylierung die 18(19)-fach weniger effiziente anaerobe Glykolyse die Versorgung der Zelle mit Energie übernimmt.

Aus Sicht der funktionellen Reversibilität lassen sich drei Phasen einer globalen Organischämie unterscheiden [30]:

1. Die Latenzphase bezeichnet ein störungsfreies Intervall und dauert beim Herz je nach Höhe des präischämischen Energiebedarfes maximal 20 Sekunden. Die Energiegewinnung erfolgt aerob unter Verbrauch physikalisch gelöster oder metabolisch gebundener O<sub>2</sub>-Reserven. Strukturelle oder metabolische Veränderungen ergeben sich noch nicht.
2. Die anschließende Phase wird als Überlebenszeit eines Organs bezeichnet. Die Organfunktion sistiert, die Energiebereitstellung erfolgt anaerob, der Energievorrat des Gewebes verringert sich. Eine Reperfusion führt jedoch ohne nennenswerte Latenz zu einer vollständigen Wiederherstellung der Organfunktion.
3. Veränderungen in Energiestatus und Ultrastruktur erreichen ein deutliches Ausmaß. Eine Reperfusion kann die Organfunktion nicht mehr unmittelbar, sondern erst nach einer postischämischen Erholungslatenz wiederherstellen, die in ihrer Länge von der Ischämiezeit abhängt. Bis zu der praktischen Grenze der Wiederbeleubarkeit dauert die spontane Erholungslatenz bis zu einer *restitutio ad integrum* maximal 20-30 Minuten, im Bereich der prinzipiellen Grenze wird sie theoretisch unendlich lang. Letztere dürfte identisch sein mit der sog. Strukturerhaltungszeit [89].

Folge der Ischämie sind neben dem Verlust energiereicher Phosphate die intrazelluläre – und konsekutiv auch extrazelluläre – Azidose. Beide Faktoren kompromittieren Enzymfunktionen, die für den zellulären Stoffwechsel entscheidende

Bedeutung haben. So inhibiert die Azidose die anaerobe Glykolyse wahrscheinlich schon auf der Stufe der Hexokinase und Phosphofruktokinase [102] und schränkt die Energiebereitstellung weiter ein. Durch den Energiemangel sinkt die Aktivität der Membranpumpen –  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase,  $\text{SR-Ca}^{2+}$ -ATPase u.a. – wodurch Elektrolyt-Homöostase, Membranpotential und zelluläre Volumenregulation gestört werden. Viele weitere strukturelle Veränderungen, etwa Schwellung und Matrixverluste der Mitochondrien, Fragmentierungen der mitochondrialen Cristae sowie Klumpungen des Kernchromatins verlaufen in ihrer Ausprägung parallel zum fortschreitenden Energiedefizit. So konnte man der praktischen Grenze der Wiederbelebarkeit des global-ischämischen Herzens einen ATP-Gehalt von etwa 66% der physiologischen Norm zuordnen, also beim Hund etwa  $4 \mu\text{mol/g}$  ödemfreies Myokardfeuchtgewicht [31].

Die prinzipielle Grenze der Wiederbelebarkeit ist hingegen erreicht, wenn die anaerobe Glykolyse im Myokard sistiert, gewöhnlich bei einem myokardialen ATP-Gehalt von etwa  $1,5 \mu\text{mol/g}$  Gewebe. Nach diesem Zeitpunkt ist die zelluläre Ultrastruktur irreversibel gestört. Bei normothermer Ischämie ohne kardioplegische Protektion dauert die praktische Wiederbelebungszeit beim Myokard des Hundes 10-15 Minuten, die prinzipielle 20-25 Minuten [30].

Das Ausmaß einer Ischämiebelastung des Herzens läßt sich streng genommen nur anhand der Dauer der Erholungslatenz abschätzen. Klinisch ist ein solcher Parameter allerdings nicht verwertbar. Da der ATP-Verfall eine zentrale Rolle im ischämischen Myokard spielt, wird der Verlauf dieses Parameters meist als Indikator für das Ausmaß der Organschädigung herangezogen.

Die Interpretation dieses Parameters hat ihre Grenzen:

1. Gewisse ischämische Veränderungen lassen sich nicht auf einen reduzierten ATP-Spiegel zurückführen. So erfolgt die quantitativ wesentliche Volumenzunahme der Mitochondrien und Kardiomyozyten nicht erst nach Absinken des zellulären Energievorrates, sondern geht diesem zeitlich voraus [31].
2. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß die ATP-Konzentration im Myokard am Ende der Ischämie keinen zuverlässigen Schluß auf die postischämische Funktion des Organs erlaubt. Wohl bedeutet ein geringes ATP ein schlechteres postischämisches Ergebnis, nicht aber ein akzeptabler Gehalt auch eine gute Erholung. Dieser Parameter besitzt somit eine gute Spezifität bei nur geringer Sensitivität. Ausreichende ATP-Level sind also eine erforderliche, aber keine ausreichende Bedingung für eine gute postischämische Restitution der Organfunktion.
3. Eigene, noch unveröffentlichte Ergebnisse zur Ischämie nach Katecholamin-Belastung zeigen, daß diese Vorbehandlung den intraintrischämischen Abfall energiereicher Verbindungen nicht signifikant verändert, wohl aber die postischämische Erholung verschlechtert.

Mit dem ATP-Gehalt erfaßt man somit nicht die (alleinige) zentrale Größe der ischämischen Schädigung. Als Konsequenz wird das Ausmaß der Ischämiebelastung des Herzens in dieser Arbeit abgeschätzt aus der energetischen Situation während der Ischämie und der funktionellen Erholung in der Reperfusion.

## 1.2 Strategien zur Organprotektion in Ischämie

Zwei Hauptstrategien werden, meist in Kombination, zur Myokardprotektion angewandt: Hypothermie und Kardioplegie. Wie hoch der jeweilige Anteil der beiden Prinzipien an der protektiven Wirkung der kardioplegischen Hypothermie ist, wird allerdings noch kontrovers diskutiert. Nach Caputo et al. wird der Sauerstoffbedarf des Herzens durch die Kardioplegie um 90% reduziert, Hypothermie bei 11°C liefert nur einen geringen zusätzlichen Beitrag [16]. Behrendt et al. ziehen ähnliche Schlußfolgerungen [3]. Im Gegensatz dazu hat nach Rosenfeldt et al. [83] die Hypothermie den bedeutenderen Anteil an der protektiven Wirkung. Sowohl das Ausmaß der Hypothermie als auch die chemische Zusammensetzung der Kardioplegie wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert.

### 1.2.1 Kardioplegie

Die protektive Wirkung einer präischämischen Perfusion des Herzens mit einer kardioplegischen Lösung stützt sich auf folgende Prinzipien:

- Schnelle elektrische und mechanische Inaktivierung des Herzens durch Fixierung des Membranpotentials im polarisierten oder gering depolarisierten Zustand. Dazu dienen die erhöhte  $K^+$ - und  $Mg^{2+}$ - sowie erniedrigte  $Na^+$ - und  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Dadurch schnelle Reduktion des Energieverbrauches. Auf diese Weise läßt sich auch die intrazelluläre Elektrolyt-Homöostase verbessern, was die Triebkraft für die Zellschwellung in Ischämie verringert.
- Effektive Pufferung kann die Auswirkungen der sich entwickelnden Azidose abfedern. Anstelle der für die Osmoregulation nicht relevanten aeroben Endprodukte  $CO_2$  und  $H_2O$  entstehen unter Anaerobiose große Mengen an Laktat und nicht unerhebliche an Alanin, Glycerin und weiteren Metaboliten der Glykolyse. Werden diese nicht aus der Zelle entfernt, führen sie zur osmotischen Schwellung und aufgrund der Azidose zur metabolischen Inhibition. Das dabei am stärksten geforderte Transportsystem, der Laktat- $H^+$ -Kotransporter, ist aber sehr azidoseempfindlich. Eine leistungsfähige extrazelluläre Pufferung stärkt somit die Mechanismen für die Aufrechterhaltung eines tolerablen intrazellulären pH-Wertes als auch die Kompensationsmöglichkeiten der Osmo- und Volumenregulation.

### 1.2.2 Hypothermie – Prinzipien und Grenzen

Ein grundlegendes Prinzip zur Verlängerung der Ischämietoleranz eines Organs oder des gesamten Organismus, und wahrscheinlich das älteste, ist die Hypothermie.

Durch die Reduktion der Temperatur werden alle Stoffwechselschritte eines Organismus verlangsamt. Die Kinetik hierzu beschreibt der sog.  $Q_{10}$ -Wert, der für die meisten Prozesse zwischen 2 und 3 liegt [89]. Dadurch sinkt der  $O_2$ -Bedarf der Gewebe, und die Diskrepanz zwischen Energieverbrauch und der in Anaerobiose 18(19)-fach geringeren Energiebereitstellung verringert sich. Allerdings



korreliert der  $Q_{10}$ -Wert mit der Aktivierungsenergie des jeweiligen Stoffwechselschrittes und der absoluten Temperatur. Daraus lassen sich zwei Schlußfolgerungen ableiten: (A) Die Kälteantwort eines Gewebes ist heterogen: passive Prozesse (etwa Ionendiffusion) werden weniger inhibiert als ATP-verbrauchende (Ionenpumpen). Aus diesem Grund könnte in tiefer Hypothermie die Energiebereitstellung in stärkerem Maße gehemmt sein als der Bedarf [44]; und (B) Sinkende  $Q_{10}$ -Werte in Kälte reduzieren den zusätzlichen protektiven Effekt der tiefen Hypothermie [89].

In Bezug auf die optimale Temperatur für die ischämische Lagerung der Herzen unterstützen einige Autoren die Strategie „je kälter, desto besser“ bis zu Lagerungstemperaturen von ca.  $4^{\circ}\text{C}$  [60, 62, 83, 88, 89, 94, 95]. Diese Strategie ist momentan auch gängige klinische Praxis [98, 108]. Demgegenüber stehen allerdings auch viele Anwälte einer moderateren Hypothermie von etwa  $12\text{-}15^{\circ}\text{C}$  [2, 16, 35, 36, 44, 46, 47, 101]. Diese Ergebnisse sind nicht notwendigerweise widersprüchlich, verdeutlichen aber die Heterogenität der vorliegenden Studien sowohl hinsichtlich des experimentellen Modells als auch der betrachteten Parameter. So fanden die Untersuchungen am isolierten Herz von Hund [35, 60, 62, 83, 94, 95] oder Ratte [46, 88, 101] statt, in vivo am Hund [2] bzw. am humanen Myokard [16], humanen Trabekeln [36, 47] oder Biopsaten [44]. Unterschiede bestanden ferner in dem Ausmaß von Ischämie und Hypothermie, der genauen Methodik (Hypothermie allein vs. Kombination mit Kardioplegie, keine, intermittierende oder konstante Perfusion während der Ischämie), der verwendeten Kardioplegie und der untersuchten Parameter (metabolische vs. funktionelle vs. ultrastrukturelle). Somit sind die Ergebnisse der vorliegenden Studien nur mit Vorsicht vergleichbar.

Eine natürliche Grenze der Hypothermie ist diejenige speziesspezifische Temperatur, bei der der Energieumsatz so weit reduziert ist, daß er unter die kritische Marke des zellulären Strukturerhaltungsumsatzes sinkt, der mit  $0,1 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  angegeben wird. Dieser wäre beim Menschen bei Temperaturen zwischen  $10^{\circ}$  und  $15^{\circ}\text{C}$  erreicht [90].

### 1.3 Der Winterschlaf

Die zellulären Veränderungen, die winterschlafende Spezies im Winterschlaf erfahren, ähneln denen bei hypothermer Ischämie eines Organs: intrazelluläre Azidose, Hypoxie, Hypothermie, Energiedefizit, Volumenverschiebungen. Allerdings haben diese Tiere Kompensationsmechanismen entwickelt, mithilfe derer sie diese Veränderungen ohne irreversible Schäden z.T. über Monate tolerieren können. Unter Umständen kann die Physiologie des Winterschläfers also Ansätze für die Organprotektion liefern.

Folgende Besonderheiten des Hibernating sind auffallend und haben eine Beziehung zu dieser Arbeit:

- Kein Winterschläfer unterschreitet die (speziesspezifische) Temperatur, der ein Energieumsatz in Höhe des zellulären Strukturerhaltungsumsatzes (etwa  $0,1 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) entspricht. Daraus ergäbe sich beim Menschen eine Temperatur von  $10\text{-}15^{\circ}\text{C}$ , beim Hund leicht darunter [90].

- Der Stoffwechsel wird nicht global, sondern differenziert verlangsamt, unter Aussparung bestimmter Prozesse in bestimmten Organen. So sind beim Winterschläfer etwa  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Herzen erstaunlich temperaturresistent.
- Es gibt vielfache Hinweise, daß der Aufrechterhaltung des Membranpotentials im Winterschlaf eine entscheidende Bedeutung für den Organschutz zufällt [17, 48, 59].

## 1.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß der Lagerungstemperatur während kardioplegischer Ischämie des Herzens auf dessen postischämische Erholung festzustellen und Aussagen über die hierfür optimale Temperatur abzuleiten.

Als Untersuchungsmodell diente das Langendorff-Präparat des Hundeherzens [53] während kardioplegischer Koronarperfusion, Ischämie und nachfolgender Reperfusion. Variiert wurden dabei Dauer und Temperatur der ischämischen Lagerung. Die Auswertung erfolgte mit Blick auf metabolische und funktionelle Parameter.

## Kapitel 2

# Material und Methodik

### 2.1 Tiere

Als Versuchstiere dienten  $n = 51$  Hunde der Rasse Foxhound. Sie waren in der Tierfarm der Universität Heidelberg zu Versuchszwecken gezüchtet worden. Bis zum Experiment waren sie dort entsprechend den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes von 1998 und des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ des amerikanischen National Institute of Health (NIH-Publikation 85-23, überarbeitet 1995) gehalten worden.

Die Tiere, die zum Experiment kamen, waren älter als 9 Monate und damit ausgewachsen und hatten am Versuchstag ein mittleres Körpergewicht von  $35,6 \pm 0,65 \text{ kg}^1$ . Sie wurden am Tag vor dem Experiment in das Zentrale Tierlabor der Universität Heidelberg, INF 347, gebracht und dort ab 12 Stunden vor Beginn des Versuchs nüchtern gestellt bei freiem Zugang zu Trinkwasser.

Gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes waren die Experimente vom Regierungspräsidium Karlsruhe unter dem AZ 35-9185.81/111/01 genehmigt worden.

### 2.2 Experimentelle Modelle und Versuchsprotokoll

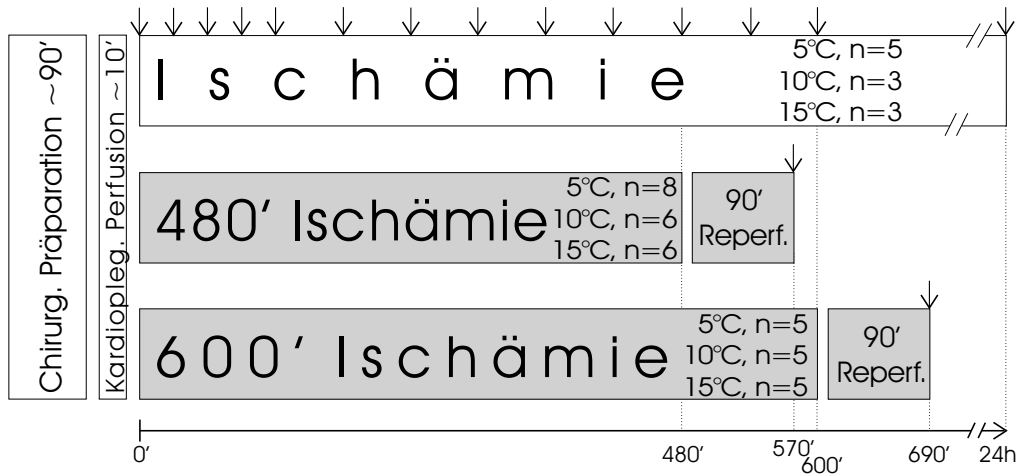
Es wurden Versuche in zwei verschiedenen Modellen durchgeführt (vgl. Abb. 2.1). Inhalt der Biochemieversuche war es, myokardiale Veränderungen während Ischämie zu erfassen. Die Versuche zu Ischämie-Reperfusion dienten dazu, die postischämische Erholung der Herzen zu untersuchen.

#### 2.2.1 Biochemieversuche

Anhand der sog. Biochemieversuche wurde der myokardiale Stoffwechsel während Ischämie untersucht. Dabei wurden insbesondere auch die Bedingungen dokumentiert, die nach 8 bzw. 10 Stunden Ischämie im Myokard herrschten, also zu dem Zeitpunkt, an dem die Herzen der Reperfusionsgruppe wiederbelebt wurden.

---

<sup>1</sup>Angaben zu Mittelwerten und Standardabweichungen beziehen sich in dieser Arbeit grundsätzlich auf das arithmetische Mittel  $\pm$  absoluter mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM)



**Abbildung 2.1:** Protokollschema der Versuche. Biochemieversuche (Zeile 1), und Versuche zur Ischämie-Reperfusion (Zeilen 2 und 3). ↓ steht für Entnahme von Gewebeprobe[n] zur biochemischen Analyse.

Dazu wurden die Herzen nach operativer Vorbereitung durch eine kardioplegische Perfusion mit HTK-Lösung<sup>2</sup> in vivo konserviert und direkt im Anschluß exzidiert und bei 5°C (n=5), 10°C oder 15°C (je n=3) ischämisch gelagert. Während der Ischämie wurden zu bestimmten Zeiten transmurale linksventrikuläre Gewebeprobe[n] entnommen und auf ihren Gehalt an bestimmten biochemischen Metaboliten untersucht. Die Probenentnahme (in Abb. 2.1 mit ↓ gekennzeichnet) erfolgte während der ersten zwei Stunden alle 30 Minuten, danach im stündlichen Intervall bis 10 Stunden, anschließend in größeren Abständen.

### 2.2.2 Versuche zur Ischämie-Reperfusion

In diesem Modell wurden die Auswirkungen verschiedener Ischämietemperaturen auf die postischämische Erholung des Herzens untersucht. Die Herzen wurden nach der konservierenden Perfusion mit HTK-Lösung bei 5, 10 oder 15°C für 480 oder 600 min gelagert. Die Gruppengrößen sind in Abb. 2.1 angegeben.

Im Anschluß an die ischämische Lagerung erfolgte die Reperfusion in Langendorff-Technik über 90 Minuten. Anschließend wurden linksventrikuläre Gewebeprobe[n] zu biochemischen Untersuchungen entnommen.

## 2.3 Anästhesie und Narkose

Alle Tiere wurden eine Stunde vor Narkoseinduktion mit 90 mg Piritramid<sup>3</sup> und 0,5 mg Atropin<sup>4</sup> subkutan prämediziert. Die Einleitung der Narkose erfolgte dann durch intravenöse Injektion von 0,5 mg/kg Midazolam<sup>5</sup> und 15 mg/kg

<sup>2</sup>Custodiol®, Köhler Chemie, Alsbach-Haenlein/Deutschland, zur Zusammensetzung siehe Tabelle 2.1, S. 10

<sup>3</sup>Piritramid (Dipidolor®, Janssen-Cilag, Neuss/Deutschland)

<sup>4</sup>Atropin (Atropin®, Braun, Melsungen/Deutschland)

<sup>5</sup>Midazolam (Dormicum®, Roche, Grenzach-Wyhlen/Deutschland)

Thiopental<sup>6</sup>. Im Anschluß wurden die Tiere orotracheal intubiert und mit einem Gasgemisch aus N<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub> im Verhältnis 1:1 Druck-Volumen-kontrolliert beatmet<sup>7</sup>. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch N<sub>2</sub>O und nach Bedarf durch intravenöse Infusion von im Mittel 0,015 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> Fentanyl<sup>8</sup> und 5 mg·kg<sup>-1</sup>·h<sup>-1</sup> Piritramid<sup>3</sup>. Gegebenenfalls wurde Ringer-Lösung<sup>9</sup> zur Volumensubstitution infundiert.

Zur Steuerung der Narkose und Überwachung der Herz-Kreislauf-Funktion wurden systemischer arterieller Blutdruck (RR) und Herzfrequenz (HF) kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet<sup>10</sup>. In regelmäßigen Abständen wurden Elektrolyte<sup>11</sup> und Hämoglobin-Konzentration<sup>12</sup> im arteriellen Blut bestimmt. Eine suffiziente Beatmung wurde durch die Überwachung der arteriellen Blutgase (pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>)<sup>13</sup> und des endexpiratorischen CO<sub>2</sub>-Partialdrucks (pCO<sub>2</sub>)<sup>14</sup> sichergestellt. Außerdem wurde fortwährend ein EKG abgeleitet<sup>10</sup>.

## 2.4 Chirurgische Präparation

Nach Einleitung der Intubationsnarkose wurde das Tier in Rückenlagerung gelagert. Zuerst erfolgte die Anlage der zentralen Zugänge. Durch eine venae sectio wurde ein zentraler Katheter in die linke V. jugularis externa vorgeschoben und eingebunden. Analog dazu erfolgte die Darstellung der linken A. carotis communis und Anlage eines zentral-arteriellen Druckkatheters.

Anschließend wurde der Thorax durch mediane Sternotomie mit einem Sternummeißel eröffnet. Nach sorgfältiger Blutstillung und Abdichtung der freiliegenden Spongiosa mit Knochenwachs wurde der Thorax mit einem Spreizer geöffnet. Die Präparation der inneren Strukturen begann mit der Lösung mediastinalen Bindegewebes durch Ligaturen und dem Abbinden der A. thoracica interna sin. Danach wurden Vv. cava sup. und inf. mit einem Bändchen und Tourniquet locker angeschlungen. Es folgte die Annaht zweier Haltefäden beidseits paramedian am Perikard und die Eröffnung des Perikardsackes etwa über der anatomischen Herzachse. Kreuzende Gefäße und Fettauflagerungen wurden dabei ligiert und durchtrennt.

Unter manueller Kontrolle wurde ein venöser Katheter via rechte V. jugularis ext. im Sinus coronarius plaziert. Nachfolgend wurden Aorta ascendens und Truncus pulmonalis gemeinsam mit einem im Sinus transversus pericardii liegenden Bändchen angeschlungen. Darauf wurde ein Tourniquet locker aufgesetzt. Analog wurden auch Aorta descendens, distal des Abgangs der A. subclavia sin., und Truncus brachiocephalicus, knapp proximal der Gabelung in A. subclavia dext. und Truncus caroticus, je mit einem Tourniquet versehen.

<sup>6</sup>Thiopental (Trapanal<sup>®</sup>, Byk Gulden, Konstanz/Deutschland)

<sup>7</sup>Respirator (Stephan, Gackenbach/Deutschland)

<sup>8</sup>Fentanyl (Fentanyl-Janssen<sup>®</sup>, Janssen-Cilag, Neuss/Deutschland)

<sup>9</sup>Ringer-Lösung gebrauchsfertig (B. Braun, Melsungen/Deutschland)

<sup>10</sup>8-Kanal-Rekorder (Biobit, Göttingen/Deutschland) mit Variobit-Software (Dr. Langer, Waldkirch/Deutschland)

<sup>11</sup>AVL 984-S Analyzer (Graz, Österreich)

<sup>12</sup>OSM3 (Radiometer, Kopenhagen/Dänemark)

<sup>13</sup>ABL 5 und ABL 50 (Radiometer, Kopenhagen/Dänemark)

<sup>14</sup>Capnomac Ultima Analyzer (Datex, Helsinki/Finnland)

Stoff	Einheit	Custodiol®
Na <sup>+</sup>	mmol/L	15,0
K <sup>+</sup>	mmol/L	10,0
Mg <sup>2+</sup>	mmol/L	4,0
Ca <sup>2+</sup>	mmol/L	< 0,01
Cl <sup>-</sup>	mmol/L	50
Mannitol	mmol/L	30
Histidin/His·HCl	mmol/L	198
Tryptophan	mmol/L	2,0
α-Ketoglutarat	mmol/L	1,0
pH (37°C)		6,8
Osmolarität (rechnerisch)	mosm/L	314
pO <sub>2</sub> (37°C)	mmHg	≈ 250
pCO <sub>2</sub> (37°C)	mmHg	≤ 2

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung der kardioplegischen HTK-Lösung<sup>15</sup>

Zum Abschluß der Vorbereitungen wurde ein doppelumiger Katheter für die kardioplegische Perfusion in die linke A. subclavia eingebunden und retrograd bis vor die Aortenklappe vorgeschoben. Über das größere Lumen erfolgte später die Perfusion des Kardioplegikums, das kleinere diente zur kontinuierlichen Messung des Perfusionsdruckes in der Aortenwurzel. Das Abklemmen der Herzohren mit zwei Klemmen und das Abtrennen der Herzohrspitzen vervollständigte die chirurgische Präparation.

## 2.5 Konservierende Perfusion

Die Konservierung des Herzens erfolgte mit der kardioplegischen HTK-Lösung nach Bretschneider<sup>15</sup>. Die Zusammensetzung dieser Lösung ist in Tabelle 2.1 angegeben.

Zur Einleitung der Kardioplegie wurden die Ligatur der V. cava sup. zugezogen und die V. cava inf. inzidiert. Damit war der Rückstrom von Blut in das rechte Herz beendet. Daraufhin wurden mit dem Tourniquet um Aorta ascendens und Truncus pulmonalis die Ausflußbahnen beider Ventrikel okkludiert. Gleichzeitig wurde die retrograde kardioplegische Koronarperfusion in Langendorff-Technik freigegeben. Sie erfolgte über den Katheter, der via A. subclavia sin. vor die Aortenklappe plaziert worden war, mit einer hydrostatischen Säule von zunächst ca. 110 cm über Herzhöhe. Die Temperatur der HTK-Lösung betrug etwa 5,5°C, eine Oxygenierung erfolgte nicht, der pO<sub>2</sub> lag aufgrund der Äquilibration mit Raumluft bei circa 250 mmHg<sup>16</sup>.

<sup>15</sup>Custodiol®, Köhler Chemie, Alsbach-Haenlein/Deutschland

<sup>16</sup>gemessen bei 37°C, der Unterschied zu den theoretisch zu erwartenden 159 mmHg ergibt sich durch höhere Löslichkeit in Kälte

Die Drainage des koronarvenösen Effluats im rechten Vorhof und die des lungenvenösen Restrückstromes im linken Vorhof war durch die eröffneten Herzohren sichergestellt. Eine eventuelle Füllung des linken Ventrikels, etwa bei insuffizienter Aortenklappe oder durch Vv. Thebesii, konnte sich durch eine Inzision im Bereich des Apex cordis entleeren.

Nach einer durchschnittlichen Zeit von  $27,1 \pm 3,7$  s endete die koordinierte Aktion des Herzens, nach im Mittel  $43,6 \pm 5,0$  s stand es mechanisch still. Ungefähr zwei Minuten nach Perfusionsbeginn wurde der Tourniquet um Aorta und Truncus pulmonalis wieder geöffnet. Wenige Sekunden verstrichen zum Freispülen des Aortenbogens, bis die Ligaturen um die Aorta descendens und den Truncus brachiocephalicus geschlossen wurden. Damit wurden die Verhältnisse dem physiologischen Windkessel angenähert. Der Perfusionsdruck – ständig aufgezeichnet<sup>10</sup> – betrug am Anfang der kardioplegischen Perfusion etwa 80–100 mmHg und fiel durch das Sistieren der mechanischen Aktivität auf 50–70 mmHg. Mit zunehmender Äquilibration des Herzmuskels mit der Konservierungslösung relaxierte das Myokard, der Perfusionsdruck fiel kontinuierlich auf Werte um 30 mmHg am Ende der HTK-Perfusion. Persistierten hohe Perfusionsdrücke als Zeichen einer langsamen Relaxierung des Myokards, wurde die Höhe der hydrostatischen Flüssigkeitssäule in kleinen Schritten von 110 cm auf 80–95 cm gesenkt, um eine Überdehnung des Herzmuskels mittels Gartenschlaucheffect zu vermeiden. Bei Perfusionsdrücken < 30 mmHg wurde die hydrostatische Säule leicht angehoben, um eine homogene Myokardperfusion zu gewährleisten. Die Perfusion endete nach 10 Minuten. Der Verbrauch an HTK-Lösung schwankte zwischen 3,4 und 3,9 L.

## 2.6 Ischämische Lagerung

### 2.6.1 Biochemieversuche

In den Biochemieversuchen wurden die Herzen ohne abgehende Gefäße explantiert. Es wurde sogleich eine transmurale linksventrikuläre Probe entnommen, in der die biochemischen Ausgangswerte ermittelt wurden. Eine weitere Probe aus der Septumregion diente zur kontinuierlichen Bestimmung des pH<sup>17</sup>. Das übrige linksventrikuläre Myokard wurde in einem Becherglas mit HTK-Lösung in einem Thermostat<sup>18</sup> bei der jeweils gewünschten Temperatur gelagert.

Von diesem Gewebe wurden zu festgesetzten Zeitpunkten transmurale linksventrikuläre Proben entnommen und zur Analyse des anaeroben Energiestoffwechsels aufbereitet.

### 2.6.2 Versuche zu Ischämie-Reperfusion

In diesen Gruppen wurden die Herzen nach der Perfusion mit Perikard, Aortenbogen und abgehenden Gefäßen nach der Perfusion entnommen und, in einem Plastikbeutel verpackt, in einem Becherglas mit HTK-Lösung gelagert. Dieses Glas wurde in einem Thermostat<sup>18</sup> aufbewahrt. Lagerungstemperatur und -zeit

<sup>17</sup>Glas-pH-Einstabmeßkette N5800BNC (Schott-Geräte GmbH, Mainz/Deutschland)

<sup>18</sup>Thermostat RM 20 (Lauda, Königshof/Deutschland)

entsprachen dem Versuchprotokoll. Gewebeproben wurden diesen Herzen während der Ischämie nicht entnommen.

## 2.7 Reperfusion

### 2.7.1 Vorbereitungen am Herzen

Die Vorbereitung der Herzen zur Wiederbelebung begann etwa 20 Minuten vor Ablauf der festgesetzten Ischämiezeit. Das Organ wurde aus dem Thermostat entnommen und in einer großen von Eis umgebenen Glasschale bei Raumluft für die Reperfusion vorbereitet.

Zur Entnahme koronarvenösen Effluats wurde ein dünnlumiger Katheter etwa 2–3 cm in den Sinus coronarius eingeführt und eingebunden. Zur Entlüftung eventuell in der Aortenwurzel vorhandener Luft wurde ein Katheter größeren Kalibers in den Truncus brachiocephalicus eingebunden.

Für die Druckmessungen wurde ein Katheter-Tip-Manometer<sup>19,20,21</sup> durch die Inzision in der Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt. Der Druckrezeptor in der Spitze des Katheters war von einem 12 ml fassenden Latexballon<sup>22</sup> umgeben, der mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt wurde, um eine gleichmäßige Druckaufnahme zu erreichen und eine Dislokation des Katheters zu verhindern. Desweiteren wurde ein dünner Kunststoffschlauch als Vent zur Drainage in den linken Ventrikel eingeführt.

Schließlich wurde noch eine Temperatursonde<sup>23</sup> im rechten Vorhof plaziert, um den Prozess der Wiedererwärmung zu verfolgen.

Somit befinden sich am Herzen folgende Zu- und Abgänge:

- Perfusionskatheter in der A. subclavia sin.,
- Überlaufkatheter im Truncus brachiocephalicus,
- koronarvenöser Katheter im Sinus coronarius,
- Temperatursonde im rechten Vorhof,
- Druckabnehmer und Vent via Inzision im Apex cordis im linken Ventrikel.

### 2.7.2 Apparativer Aufbau

Die Reperfusion unterteilte sich in zwei Abschnitte.

- i) In den ersten 10 Minuten erfolgte die Reperfusion mit einer oxygenierten und erwärmten modifizierten Tyrodelösung. Der Lösung wurden keine Kolloide zugesetzt, das koronarvenöse Effluat wurde verworfen.
- ii) Von der 11. Minute an wurde eine mit Kolloiden versetzte modifizierte Tyrodelösung perfundiert. Diese Lösung rezirkulierte in einem Kreislauf bis zum Ende der Reperfusion.

<sup>19</sup>SPC-471A Micro-Tip pressure transducer catheter mit Lumen (Millar Instruments, Inc., Houston/USA)

<sup>20</sup>Transducer Control Unit Modell TC-510 (Millar Instruments, Inc., Houston/USA)

<sup>21</sup>8-Kanal-Rekorder (Biobit, Göttingen/Deutschland) mit Variobit-Software (Dr. Langer, Waldkirch/Deutschland)

<sup>22</sup>Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten/Deutschland

<sup>23</sup>Licox (Ges. f. medizinische Sondentechnik GMS, Kiel-Mielkendorf/Deutschland)



Die Reperfusionslösungen wurden ab etwa zwei Stunden vor Beginn der Wiederbelebung des Herzens in einem Rezirkulationssystem<sup>24</sup> mit Hilfe einer Rollerpumpe<sup>25</sup> oxygeniert und erwärmt. Dafür wurde in die Kreisläufe jeweils ein Oxygenator<sup>26</sup> geschaltet, der mit 3 L/min Sauerstoff begast und über einen Thermostat<sup>27</sup> beheizt wurde. Die kolloidale Lösung stand während dieser Zeit auf einem Magen-Rührer, Lösungstemperaturen<sup>28</sup> sowie pH und  $p_{O_2}$ <sup>13</sup> wurden kontinuierlich gemessen. Am Ende der Vorbereitungsperiode hatten die Lösungen eine Temperatur von 37°C und einen  $p_{O_2}$  von ca. 700 mmHg.

In den arteriellen Schenkel des Perfusionssystems waren vor dem Herzen zwei parallel geschaltete Blutfilter<sup>29</sup> eingebaut, um während der Rezirkulation auftretende Partikel zurückzuhalten. Desweiteren befand sich ein Fluß-Messer<sup>30</sup> im zuführenden Schenkel des Kreislaufes.

Das Herz wurde in einer Schale gelagert, die sich während der Reperfusion mit koronarvenösem Effluat füllte und deren Überlauf in den ersten 10 Minuten verworfen wurde, danach aber in das Vorratsgefäß der Reperfusionslösung zurückgeleitet wurde. Dabei wurde das Organ durch eine kleine Umwälzpumpe mit Perfusionslösung beregnet, um auch den Teil des Herzens zu befeuchten und zu erwärmen, der sich über dem Wasserspiegel des kleinen Beckens befand. Der Vent in der Herzspitze wurde an eine Rollerpumpe<sup>25</sup> angeschlossen, um Flüssigkeit aus dem linken Ventrikel absaugen zu können.

Die Oxygenatoren wurden uns dankenswerterweise von der Herzchirurgie gebraucht zur Verfügung gestellt. Es erfolgte eine ausgiebige Spülung mit kaltem und warmem Leitungswasser, destilliertem und entkeimten<sup>31</sup> Wasser.

### 2.7.3 Ablauf und Strategie

Der Reperfusion liegt das von Langendorff beschriebene Prinzip der retrograden Koronarperfusion durch einen im Aortenbogen liegenden Katheter zugrunde [53].

Die Reperfusion wurde mit sehr geringem Fluß gestartet, um das Herz im kalten Zustand nicht durch den Gartenschlaucheffect zu überdehnen. Zeigten sehr tiefe Perfusionsdrücke oder eine hohe Fördermenge des Vents an, daß die Aortenklappe nicht suffizient schloß, wurden durch plötzliche Kompressionen der Aortenwurzel manuell Druckspitzen erzeugt, die die Klappe meist schnell verschlossen.

Nach wenigen Minuten begannen die Herzen zu flimmern. Die Intensität der Fibrillationen war von der vorausgegangenen Ischämietemperatur abhängig. Nach kälterer Lagerung begann das Flimmern in der Reperfusion tendentiell früher und stärker. Spontane Rhythmisierungen wurden nie beobachtet. Daher wurden die Herzen defibrilliert, sobald die im venösen Schenkel gemessene Tem-

<sup>24</sup>PVC-Schläuche Raumedic S noDOP<sup>®</sup>,  $\varnothing_{\text{innen}}$  9,5 mm (Rehau AG, Rehau/Deutschland)

<sup>25</sup>Rollerpumpe Type Modular (Polystan, Herlev/Dänemark)

<sup>26</sup>Die Oxygenatoren: Trillium Affinity<sup>®</sup>NT (Medtronic Inc., Minneapolis/USA) verdanken wir der Humanchirurgie

<sup>27</sup>Thermostat F6 (Haake, Karlsruhe/Deutschland)

<sup>28</sup>Thermosensor du3s (ellab a-s, Kopenhagen/Dänemark)

<sup>29</sup>IVAUTRANS 40  $\mu\text{m}$  (Biotest Medizintechnik GmbH, Alzenau/Deutschland)

<sup>30</sup>Eigenentwicklung Michael Preuß

<sup>31</sup>Millipore, Milli-QTM<sub>Plus185</sub> (Millipore Corp., Boston/USA)

peratur 35°C erreichte und das Flimmern kräftig genug erschien. Über intrathorakale Paddles eines Defibrillators<sup>32</sup> wurden 20 J (Wiederholung 30 J) etwa in der Längsachse des Herzens appliziert.

Zu Beginn der Reperfusion wurde der linke Ventrikel über den eingelegten Vent und eine schnell laufende Rollerpumpe aktiv drainiert. Nach 10 Minuten wurde das Perfusionsmedium ohne Unterbrechung auf die rezirkulierende kolloidale Lösung umgeschaltet, und der Ballon um den Tip-Katheter mit ca. 9 ml aufgefüllt. Bei dieser Füllung spannte sich die Ballonwand noch nicht und erzeugte folglich keine falsch-hohen Drücke. Die Füllung wurde reduziert, wenn der diastolische Ventrikeldruck 10 mmHg überstieg, um die subendokardiale Perfusion des Myokards nicht zu kompromittieren. In der 11. Minute wurde der Vent gezogen.

Die Perfusion der Koronarien erfolgte fluß- und druckkontrolliert. Da ohne Hämoglobin dem Herzen nur die sehr begrenzte Menge physikalisch gelösten Sauerstoffs zur Verfügung steht, war ein ausreichender Perfusionsfluß nötig. Er wurde so gewählt, daß der koronarvenöse  $p_{O_2}$  Werte von 100 mmHg nicht unterschritt.

#### 2.7.4 Chemikalien

Die Reperfusionlösungen waren in ionaler Zusammensetzung dem Blut weitgehend entsprechende modifizierte Tyrodelösungen ohne zelluläre Bestandteile. Sie wurden am Tag vor dem Versuch angesetzt und anschließend bei 3–5°C gelagert. Etwa zwei Stunden vor Reperfusionbeginn erfolgte die langsame Erwärmung und Begasung der Lösungen.

Der Ansatz der Lösungen erfolgte mit destilliertem und entkeimtem Wasser<sup>33</sup>. Die Zusammensetzung der Lösungen ist in den Tabellen 2.2 und 2.3 wiedergegeben.

## 2.8 Messungen und Auswertung

### 2.8.1 Geräte und Meßmethodik

Folgende Analysen wurden in den arteriell oder venös entnommenen Proben der Perfusionslösung mit den angegebenen Geräten durchgeführt: die Blutgase  $p_{O_2}$ ,  $p_{CO_2}$  und der pH-Wert<sup>40</sup>; die Elektrolyte  $[K^+]$ ,  $[Na^+]$  und  $[Ca^{2+}]$ <sup>41</sup>,  $[Cl^-]$ <sup>42</sup>,

<sup>32</sup>Defibrillator Code Master XL (Hewlett Packard, Böblingen/Deutschland)

<sup>33</sup>AMPUWA® (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H./Deutschland)

<sup>36</sup>NaCl, MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O (J. T. Baker, Deventer/Niederlande)

<sup>35</sup>KCl, CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O, D(+)-Glukose, L-Tryptophan, Pyruvat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (E. Merck, Darmstadt/Deutschland)

<sup>36</sup>Hepes, Na-Hepes, L-Laktat (Fluka, Sigma-Aldrich, Taufkirchen/Deutschland)

<sup>37</sup>Insulin Rapid 40 I.E./ml (Hoechst Marion Roussel, Bad Soden/Deutschland)

<sup>38</sup>GlucaGen (Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz/Deutschland)

<sup>39</sup>Longasteril® 40 (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H./Deutschland)

<sup>40</sup>Blutgase: ABL 59 (Radiometer, Copenhagen/Dänemark)

<sup>41</sup>Elektrolyte: AVL 984-S Analyzer (Graz/Österreich)

<sup>42</sup>Chlorid-Analyzer 925 (Corning-Bayer, Leverkusen/Deutschland)

Substanz	Einheit	Lösung 1	Lösung 2
NaCl <sup>34</sup>	mmol/L	137	137
KCl <sup>35</sup>	mmol/L	4,0	4,0
MgCl <sub>2</sub> <sup>34</sup>	mmol/L	0,5	0,5
CaCl <sub>2</sub> <sup>35</sup>	mmol/L	2,50	2,50
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>35</sup>	mmol/L	0,5	0,5
L-Tryptophan <sup>35</sup>	mmol/L	0,1	0,1
Glukose <sup>35</sup>	mmol/L	5,0	5,0
Hepes <sup>36</sup>	mmol/L	10,0	10,0
Na-Hepes	mmol/L	13,5	13,5
Na-Laktat <sup>36</sup>	mmol/L	5,0	5,0
Na-Pyruvat <sup>35</sup>	mmol/L	0,5	0,5
Insulin <sup>37</sup>	I.E./L	0,1	0,1
Glukagon <sup>38</sup>	μg/L	0,1	0,1
Dextran 40 <sup>39</sup>		–	2%

**Tabelle 2.2:** Zusammensetzung der Reperfusionslösungen (Lösung 1 in den ersten 10 Minuten, Lösung 2 von der 11. bis zur 90. Minute)

Substanz	Einheit	Lösung 1	Lösung 2
Na <sup>+</sup>	mmol/L	156,5	156,5
K <sup>+</sup>	mmol/L	4,0	4,0
Mg <sup>2+</sup>	mmol/L	0,5	0,5
Ca <sup>2+</sup>	mmol/L	2,50	2,50
Cl <sup>-</sup>	mmol/L	147	147
pH (37°C)		7,40	7,40
Osmolarität	mosm/L	345	345
KOD	mmHg	–	≈15
pO <sub>2</sub> (37°C)	mmHg	≈700	≈700
pCO <sub>2</sub> (37°C)	mmHg	≈1	≈1

**Tabelle 2.3:** Ausgewählte Meßwerte der Reperfusionslösungen (Lösung 1 in den ersten 10 Minuten, Lösung 2 von der 11. bis zur 90. Minute)

[Mg<sup>2+</sup>]<sup>43</sup>; Hämoglobin-Konzentration<sup>44</sup>; osmotischer<sup>45</sup> und onkotischer<sup>46</sup> Druck. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Die Bestimmung biochemischer Metabolite erfolgte im optisch-enzymatischen Test als photometrische Endpunktmessung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 340 \text{ nm}$ <sup>47,48,49</sup>. Zur Messung der Werte in Gewebeproben war eine Aufbereitung nötig. Dazu wurden die Proben mit einem Homogenisator<sup>50</sup> in eiskalter Perchlorsäure<sup>51</sup> homogenisiert und zentrifugiert<sup>52</sup>. Das Pellet diente zur Ermittlung des Trockengewichtanteiles der Proben. Der saure Überstand wurde mit einem Puffer<sup>53</sup> neutralisiert und filtriert<sup>54</sup>. In diesem Filtrat wurden die Konzentrationen folgender Substanzen bestimmt (Methoden modifiziert nach Bergmeyer [4])<sup>55</sup>: PKr, ATP, ADP, AMP, Laktat, Glukose, Glykogen, Pyruvat, freies Glycerin, L-Alanin und Kreatin. Das Glykogen wurde zur Analyse enzymatisch in Glukosebausteine zerlegt. Die Konzentrationsangabe erfolgt somit in  $\mu\text{mol}$  Glukoseeinheiten pro Gewichtseinheit.

Als Indikatoren der funktionellen Erholung wurden systolischer und diastolischer Blutdruck mit seinen Ableitungen Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ), Relaxationsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{min}$ ) und Druckanstiegsbeschleunigung ( $dp/dt_{max} : t - dp/dt_{max}$ ) sowie Perfusionsdruck und EKG von einem 8-Kanal-Rekorder<sup>56</sup> gespeichert und mit dem PC ausgewertet.

Weitere verwendete Geräte sind in den jeweiligen Kapiteln spezifiziert.

## 2.8.2 Kontrollparameter

### 2.8.2.1 Konservierende Perfusion

In der Phase der kardioplegischen Perfusion wurden minütlich Proben aus dem arteriellen (Perfusionskatheter) und koronarvenösen (Katheter im Sinus coronarius) Schenkel entnommen. Bestimmt wurden darin der  $pO_2$  sowie die Konzentrationen von  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  und Laktat. Über das zweite Lumen des Perfusionskatheters wurde der Perfusionsdruck vor der Aortenklappe gemessen.

### 2.8.2.2 Ischämische Lagerung

**Biochemieversuche** Während der ischämischen Lagerung erfolgte die Entnahme transmuraler Gewebeproben des linksventrikulären Myokards direkt nach

<sup>43</sup>Electrolyte Analyzer 8 (nova biomedical GmbH, Rödermark/Deutschland)

<sup>44</sup>OSM3 (Radiometer, Kopenhagen/Dänemark)

<sup>45</sup>Osmomat 050 (Gonotec, Berlin/Deutschland)

<sup>46</sup>Osmomat 030 (Gonotec, Berlin/Deutschland)

<sup>47</sup>für ATP: Hitachi U2000 Spectrophotometer (Hitachi, Tokyo/Japan)

<sup>48</sup>für alle anderen Parameter: Photometer EPAC 6140 (Eppendorf, Hamburg/Deutschland)

<sup>49</sup>Halbmikroküvetten (Sarstedt, Numbrecht/Deutschland)

<sup>50</sup>Micra D-8 Homogenisator (Art, Muehlheim/Deutschland)

<sup>51</sup>15 ml Perchlorsäure ( $HClO_4$ ) 3,5%-ig (ausreichend für bis zu 5 g große Gewebeproben)

<sup>52</sup>20000 U/min, 5°C, 10 min; F28/50-Rotor, Sorvall RC 28S Zentrifuge (Du Pont, Bad Hamburg/Deutschland)

<sup>53</sup>1,63 mol/L  $K_2CO_3$  in 0,054 mol/L Triethanolamin-Hydrochlorid

<sup>54</sup>7,5 ml Überstand in 1,5 ml TEA/ $K_2CO_3$ -Puffer

<sup>55</sup>Enzyme: Roche Diagnostics GmbH (Mannheim/Deutschland)

<sup>56</sup>Biobit, Göttingen/Deutschland

der kardioplegischen Perfusion ( $t=0$ ) und zu den Zeitpunkten 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 600, 720 und 840 Minuten. Dieses Schema wird in Abb. 2.1 auf S. 8 verdeutlicht, Probenentnahmen sind dabei mit  $\downarrow$  gekennzeichnet. Nach entsprechender Aufbereitung wurden die Proben auf ihren Gehalt an PKr, ATP, ADP, AMP, Glukose, Glykogen und Laktat untersucht.

In einer Gewebeprobe aus der Septumregion wurde kontinuierlich der pH-Wert gemessen<sup>57</sup> und aufgezeichnet.

**Reperusionsversuche** Hierbei wurde lediglich die Myokardtemperatur<sup>58</sup> fortlaufend kontrolliert.

### 2.8.2.3 Reperfusion

Zur Bestimmung der *Elektrolyte* und verschiedener *Metabolite* im Verlauf der Reperfusion wurden in regelmäßigen Abständen Proben der Reperusionslösung aus dem arteriellen und venösen Schenkel entnommen (je ca. 3 ml). In den ersten zwanzig Minuten erfolgte die Abnahme in Abständen von zwei, danach alle 5 Minuten.

Darin wurden sofort die Blutgase  $pO_2$  und  $pCO_2$ , der pH und die Konzentration der Elektrolyte  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  bestimmt. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben zudem auf ihren Gehalt an Glucose, Laktat und Pyruvat analysiert.

Zur Messung der *funktionellen Erholung* des Herzens wurden über das linksventrikuläre Katheter-Tip-Manometer Druckverlauf im linken Ventrikel und Herzfrequenz gemessen und aufgezeichnet. Über drei Elektroden, die sich in der Reperusionswanne befanden, wurde kontinuierlich ein EKG abgeleitet.

Zur Überwachung und *Steuerung der Reperfusion* wurden die folgenden Größen gemessen: Temperatur der Lösungen in den Vorratsgefäßen, Reperusionsfluß und -druck (letzterer über die Drucklinie im Perfusionskatheter), Temperatur im rechten Vorhof stellvertretend für die Myokardtemperatur.

Direkt im Anschluß an die 90-minütige Wiederbelebung wurden drei transmurale linksventrikuläre Proben aus dem Myokard entnommen. Diese Proben wurden sofort aufbereitet und auf ihren Gehalt an PKr, ATP, ADP, AMP, Laktat, Glucose und Glykogen analysiert. Auch der prozentuale Trockengewichtsanteil des Myokards wurde anhand dieser Proben bestimmt.

## 2.8.3 Auswertung

### 2.8.3.1 Berechnete Parameter

Aus den gemessenen Werten wurden weitere Größen berechnet. Zur detaillierteren Betrachtung des Stoffwechsels in den **Biochemieversuchen** dienten die Größen *anaerober Energieumsatz*  $\dot{E}$ :

$$\dot{E} = \frac{\Delta[\sim P] + 1,5 \cdot \Delta[Laktat]}{\Delta t} \quad \text{mit } \Delta[\sim P] = 2 \cdot \Delta[ATP] + \Delta[PKr];$$

<sup>57</sup>Glas-pH-Einstabmeßkette N5800BNC (Schott-Geräte GmbH, Mainz/Deutschland)

<sup>58</sup>Meßapparatur: Eigenentwicklung Michael Preuß

und Wirkungsgrad  $\eta$  der anaeroben Glykolyse:

$$\eta = \frac{1,5 \cdot \Delta[\text{Laktat}]}{\Delta[\sim P] + 1,5 \cdot \Delta[\text{Laktat}]} \quad \text{mit } \Delta[\sim P] = 2 \cdot \Delta[\text{ATP}] + \Delta[\text{PKr}].$$

In den Versuchen zu **Ischämie-Reperfusion** wurden maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ) und Relaxationsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{min}$ ) und Druckanstiegsbeschleunigung ( $dp/dt_{max} : t - dp/dt_{max}$ ) aus den Druckverlaufskurven des linken Ventrikels errechnet.

Der *Perfusionswiderstand*  $R_{cor}$  im koronaren Stromgebiet ergab sich nach dem Ohm'schen Gesetz:

$$R_{cor} = \frac{\Delta p}{\dot{V}_{Rep}} \quad \left[ \frac{mmHg \cdot min \cdot 100g \text{ FG}_{korrr}}{ml} \right]$$

( $\dot{V}_{Rep}$  Reperfluß  $\left[ \frac{ml}{min \cdot 100g \text{ FG}_{korrr}} \right]$ ,  $\Delta p$  arteriovenöse Differenz im Perfusionsdruck [ $mmHg$ ]).

Diese Formel berücksichtigt nicht die durch Zusatz von Kolloiden höhere Viskosität der Reperflußlösung 2 (ab 11. Minute der Reperfusion) im Vergleich zu Lösung 1 (bis 10. Minute). Die Vergleichbarkeit der Gruppen untereinander wird dadurch nicht beeinträchtigt, da die Lösungszusammensetzung jeweils identisch war. Der Zusatz von 2% Dextran 40 zur Tyrode-Lösung erhöhte deren Viskosität um etwa 40%. Ein Anstieg des koronaren Strömungswiderstandes in dieser Größenordnung ist demnach auf die Methode zurückzuführen.

Der *Sauerstoffverbrauch*  $\dot{V}_{O_2}$  während der Reperfusion wurde wie folgt ermittelt:

$$\dot{V}_{O_2} = avD_{pO_2} \cdot \dot{V}_{Rep} \cdot \sigma_{O_2,37^\circ C} \quad \left[ \frac{ml_{O_2}}{min \cdot 100g \text{ FG}_{korrr}} \right]$$

( $avD_{pO_2}$  arteriovenöse Differenz im  $O_2$ -Partialdruck [ $mmHg$ ],  $\dot{V}_{Rep}$  Reperfluß  $\left[ \frac{ml_{H_2O}}{min \cdot 100g \text{ FG}_{korrr}} \right]$ ,  $\sigma_{O_2,37^\circ C}$   $O_2$ -Löslichkeit bei  $37^\circ C$   $\left[ = 3,343 \cdot 10^{-5} \frac{ml_{O_2}}{ml_{H_2O} \cdot mmHg} \right]$ ).

Das *korrigierte Ventrikelfeuchtgewicht*  $FG_{korrr}$ , das die Bezugsgröße für viele Meßparameter darstellt, wurde berechnet unter der Annahme, daß das Trockengewicht TG des ödemfreien Ventrikels 20% seiner Gesamtmasse beträgt. So ergibt sich mit dem jeweils bestimmten Trockengewichtsanteil  $tg\%$ :

$$FG_{korrr} = TG \cdot 5 = (FG \cdot tg\%) \cdot 5$$

### 2.8.3.2 Programme

Die Auswertung der mit Variobit aufgezeichneten Meßwerte (RR,  $dp/dt$ , EKG, HF) erfolgte mit dem Computer<sup>59</sup>, zur Zusammenfassung der Ergebnisse, Grup-

<sup>59</sup>Software: Eigenentwicklung Dr. Wolfgang Gross

penauswertung und Diagrammerstellung wurden Microsoft<sup>®</sup> Excel 2000 (Version 9.0.3821 SR1), Corel DRAW<sup>®</sup> und Corel PHOTOPAINT<sup>®</sup> 9.337 verwendet.

## 2.9 Statistik

Angaben zu Mittelwerten und Standardabweichungen beziehen sich in dieser Arbeit auf das arithmetische Mittel  $\pm$  absoluter mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM), wenn nicht ausdrücklich anders angegeben. Statistische Signifikanz zwischen Wertepaaren wurden mit dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney ermittelt, bei Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test (H-Test) bzw. Varianzanalyse (ANOVA) und post-hoc-Test nach Scheffé. Dabei wurde bei Verlaufskurven, die ein Plateau erreichten, eine univariate Varianzanalyse des Plateau-Mittel- bzw. -Endwertes durchgeführt. Ergab sich im Beobachtungszeitraum kein Plateau, wurde das Signifikanzniveau über eine Varianzanalyse mit Meßwiederholung ermittelt. Statistische Signifikanz wurde für p-Werte  $< 0,05$  angenommen.





# Kapitel 3

## Ergebnisse

### 3.1 Ausgangsstatus

Alle Versuchstiere erfuhren vor dem Experiment dieselbe Behandlung. In Bezug auf Körpergewicht und korrigiertes Ventrikelfeuchtgewicht gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Alle Versuche fanden zu derselben Tageszeit statt, um einen Einfluß der zirkadianen Rhythmik auf das Versuchsergebnis auszuschließen. Die Versuche wurden den einzelnen Gruppen randomisiert zugewiesen.

#### 3.1.1 Präparation und kardioplegische Perfusion

Die Einleitung der Kardioplegie folgte bei allen Versuchen demselben Protokoll. Menge und Temperatur des Perfusats sowie Perfusionsdauer wurden unverändert beibehalten.

Eine Oxygenierung der HTK-Lösung erfolgte nicht. Aufgrund der Äquilibration mit Raumluft und der besseren O<sub>2</sub>-Löslichkeit in Kälte ergab sich ein pO<sub>2</sub> von etwa 250 mmHg (gemessen bei 37°C). Koronarvenös wurden in der ersten Minute der Perfusion pO<sub>2</sub>-Werte zwischen 30 und 80 mmHg gemessen. Nach 4-5 Minuten betragen sie >100 mmHg, am Ende der 10-minütigen Perfusion 130-180 mmHg. Durch die Kardioplegie wurde der Sauerstoffverbrauch der Herzen von im Mittel 0,68±0,02 auf 0,22±0,01 ml·min<sup>-1</sup>·100g FG<sub>kor</sub><sup>-1</sup> gesenkt. Signifikante Gruppenunterschiede bestanden hierbei nicht. Man kann somit davon ausgehen, daß der Stoffwechsel während kardioplegischer Perfusion aerob war. Das Ende dieser konservierenden Perfusion markiert somit den Beginn der Ischämie am Herzen.

#### 3.1.2 Metabolischer Status zu Ischämiebeginn

Bis zum Ischämiebeginn erfuhren alle Herzen dieselbe Behandlung, danach variierte sie je nach Versuchsprotokoll. Dementsprechend sollten zum Zeitpunkt  $t = 0$  der Ischämie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des myokardialen Gehalts an verschiedenen Metaboliten existieren. Alle intraischämischen Werte entstammen dabei ausschließlich den sog. Biochemieversuchen. Darin fanden sich zum Ischämiebeginn zwischen den drei Temperaturgruppen keine si-

gnifikanten Unterschiede in den Gewebkonzentrationen von ATP, ADP, AMP, Laktat, Glucose und Glykogen. Lediglich der Gehalt an Phosphokreatin war in der 5°C-Gruppe geringer als bei 10 und 15°C ( $p < 0,05$ ). Da das PKr in besonderem Maße ischämiesensitiv ist, sind Unterschiede in diesem Parameter wohl eher auf Verzögerungen in der Probenentnahme als auf eine ungleiche Güte der Herzen zurückzuführen.

## 3.2 Metabolismus während Ischämie

Insgesamt wurden 11 Biochemieversuche bei den Lagerungstemperaturen 5°C ( $n = 5$ ), 10°C und 15°C (je  $n = 3$ ) durchgeführt. Aufgrund sehr geringer Schwankungsbreite schienen diese Versuchszahlen für eine statistische Prüfung ausreichend. In den Grafiken sind zum Vergleich die Ergebnisse einer Gruppe Herzen angegeben, die ohne Kardioplegie stillgestellt und bei 5°C gelagert wurden ( $n = 5$ , sog. Reine Ischämie), um eine Abschätzung des Ausmaßes des protektiven Effekts der HTK-Lösung zu ermöglichen.

### 3.2.1 Energieäquivalente

Als Energieäquivalente wurden PKr, ATP, ADP und AMP bestimmt. Daraus wurden die Gesamtadenylate berechnet. Mit Ausnahme des Phosphokreatins gab es zu Beginn der Ischämie zwischen den drei Temperaturgruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des myokardialen Gehalts an energiereichen Substraten.

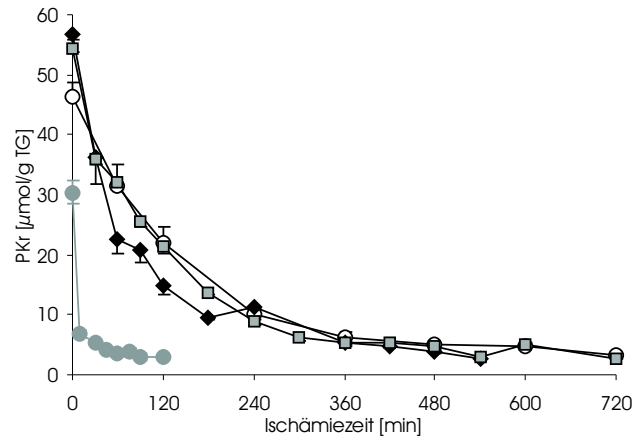
#### 3.2.1.1 Phosphokreatin

PKr ist der in Ischämie am schnellsten verfügbare und am schnellsten erschöpfte Energiespeicher. Es überträgt seine energiereiche Anhydridbindung auf ADP und phosphoryliert es zu ATP. Allerdings ist dieser Parameter auch in hohem Maße ischämiesensitiv, so daß bereits geringe Verzögerungen im Ablauf von Perfusion, Probenentnahme und -aufbereitung zu starken Schwankungen führen.

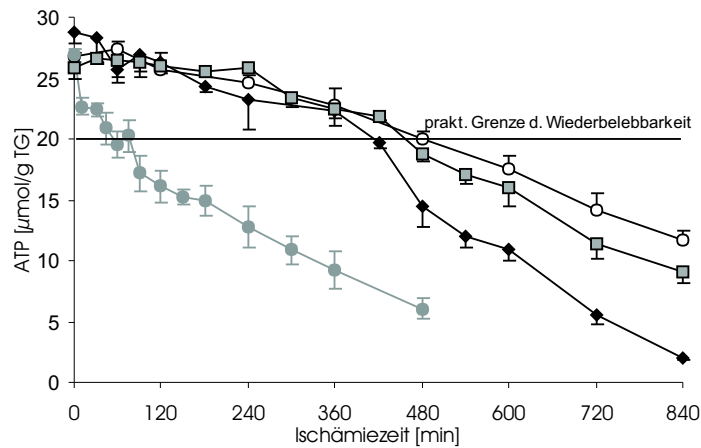
Die Konzentration des PKr (vgl. Abb. 3.1) verfällt in der 15°C-Gruppe am schnellsten (ab 60'  $p < 0,05$  gegenüber 5°C/10°C). Nach 6 Stunden Ischämie ist der PKr-Gehalt in allen konservierten Gruppen im Bereich der Nachweisgrenze. Deutlich wird der protektive Effekt der Kardioplegie. Ohne Protektion ist bereits der Ausgangswert (bei  $t=0'$ ) signifikant erniedrigt und der weitere Abfall des PKr-Spiegels deutlich steiler ( $p < 0,01$ ).

#### 3.2.1.2 ATP

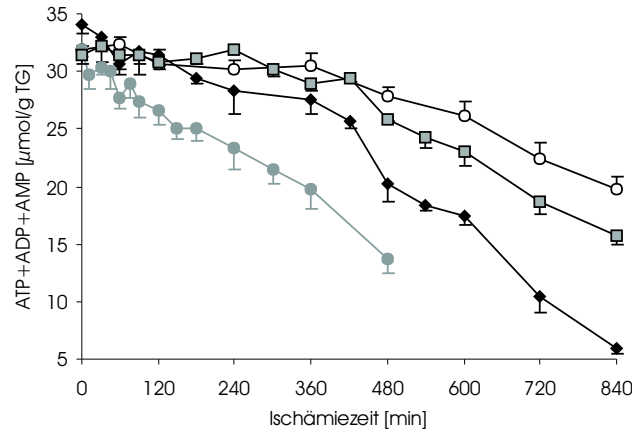
Der ATP-Gehalt hat in allen drei HTK-konservierten Gruppen über ca. 350 Minuten einen analogen Verlauf (vgl. Abb. 3.2). Erst danach fällt er in der wärmeren Gruppe (15°C) steiler ab als in den beiden kälteren. Ein signifikanter Unterschied ergibt sich ab 480 Minuten Ischämie (5° vs. 15°C:  $p < 0,05$ ). Die Werte der 10°C-Gruppe liegen hierbei, wie auch bei den meisten anderen Parametern, zwischen denen der 5°- und der 15°C-Gruppe.



**Abbildung 3.1:** PKr-Verlauf in Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—), 15°C (—◆—) bzw. reine Ischämie 5°C (Herzen ohne Konservierung, —●—). Fehler: SEM, zum Signifikanzniveau s. Text.



**Abbildung 3.2:** ATP-Verlauf in Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—), 15°C (—◆—) bzw. reine Ischämie 5°C (—●—). Fehler: SEM. Reine Ischämie:  $p < 0,001$  gegenüber allen Gruppen, 3-Gruppen-ANOVA: 5° vs. 15° ab 480':  $p < 0,05$ .



**Abbildung 3.3:** Gesamtadenylate ATP+ADP+AMP im Ischämieverlauf. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—), 15°C (—◆—) bzw. reine Ischämie 5°C (—●—), Fehler: SEM. 3-Gruppen-ANOVA (Meßwiederholung): ab  $t=480'$  15°C vs. 5°C ( $p=0,001$ ) und vs. 10°C ( $p<0,05$ ), Verlauf der reinen Ischämie auf Stufe 0,001 signifikant.

### 3.2.1.3 Gesamtadenylate

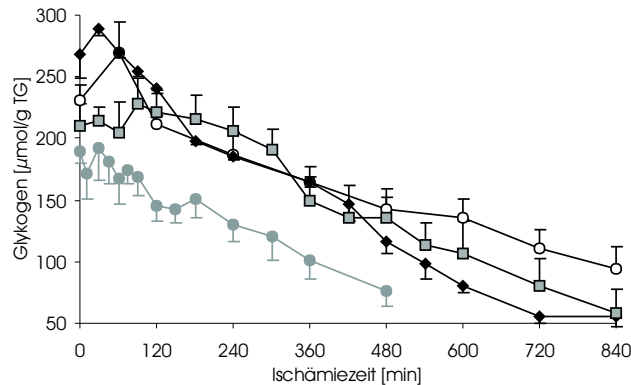
Die Umwandlung  $\text{PKr} \rightarrow \text{ATP} \rightarrow \text{ADP} \rightarrow \text{AMP}$  ist bis zur Stufe des AMP reversibel. Darüber hinaus wird AMP weiter abgebaut zu Produkten (Inosin, Hypoxanthin, Xanthin, Harnsäure), die in der Reperfusion nicht mehr rephosphoryliert werden können, sondern durch Neusynthese ersetzt werden müssen, die allerdings Stunden bis Tagen benötigt [106]. Auf diesem Hintergrund muß die Erholung der energiereichen Phosphate in der Reperfusion bewertet werden. Sie kann auch bei suffizientem Stoffwechsel in der Summe nie den postischämischen Level an Gesamtadenylaten (=ATP+ADP+AMP) übersteigen.

Den Abbau der Adenylate ATP, ADP und AMP zu tiefergelegenen Vorstufen verdeutlicht Abb. 3.3. Die Summe der Adenylate verringert sich in der reinen Ischämie ab Beginn, bei den konservierten Herzen erst nach 4-6 Stunden. Danach ist der Abfall umso stärker, je höher die Lagerungstemperatur ist.

### 3.2.1.4 ATP-Zeit ( $t_{ATP}$ )

Die sogenannte praktische Grenze der Ischämietoleranz und Wiederbelebarkeit ( $t_{ATP}$ ) ist die Ischämiezeit, die eine komplette Restitution von Struktur und Funktion und eine suffiziente Übernahme der Kreislaufarbeit des Herzens innerhalb von 20-30 Minuten Reperfusion erlaubt. Diese Grenze korreliert im Hundehertz mit einem myokardialen ATP-Gehalt von ca. 60% des physiologischen Normwertes [34, 68], i.e. beim Hund  $4 \mu\text{mol/g}$  ödemfreies Myokardfeuchtgewicht [31, 12, 50].

$t_{ATP}$  beträgt  $510 \pm 37$  min,  $467 \pm 20$  min und  $380 \pm 33$  min für eine Lagerung nach HTK-Perfusion bei 5, 10 bzw. 15°C. Auch wenn diese Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichen, ist doch der Trend offensichtlich, daß Wärme die ATP-Zeit verkürzt. Zum Vergleich die ATP-Zeit der 5°C-Hezen ohne Kardioplegie:  $79 \pm 55$  min ( $p < 0,001$  gegenüber allen HTK-Gruppen). Man



**Abbildung 3.4:** Verlauf der Glykogenkonzentration in Ischämie, angegeben in  $\mu\text{mol}$  Glukoseeinheiten bezogen auf das Trockengewicht. HTK  $5^\circ\text{C}$  ( $\circ$ ),  $10^\circ\text{C}$  ( $\square$ ),  $15^\circ\text{C}$  ( $\blacklozenge$ ) bzw. reine Ischämie  $5^\circ\text{C}$  ( $\bullet$ ). Fehler: SEM, Unterschiede nicht signifikant.

beachte, daß mit Ausnahme einer Gruppe (480' Ischämie bei  $5^\circ\text{C}$ ) der Beginn der Reperfusion jeweils jenseits der für diese Gruppe spezifischen ATP-Zeit lag.

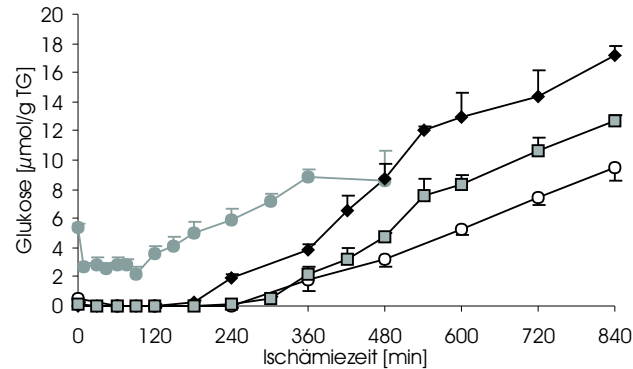
### 3.2.2 Metabolite der Glykolyse

Die anaerobe Glykolyse wird durch den Verlauf verschiedener Intermediate quantifiziert. Der Stoffwechselweg läuft von Glykogen über Glukose-6-P und Pyruvat zu Laktat oder Alanin. Ein Seitenweg mündet in Glycerin und stellt unter aeroben Bedingungen die Verbindung zur Neutralfettsynthese her. Bestimmt wurden der myokardiale Gehalt dieser Metabolite im Verlauf der Ischämie. Dabei ist die Tendenz sichtbar, daß Veränderungen der Konzentrationen dieser Stoffe (Zunahme/Abnahme) umso ausgeprägter sind, je wärmer die Herzen gelagert werden.

#### 3.2.2.1 Glykogen

Über allosterische Aktivierung durch AMP wird die Glykogen-Phosphorylase unter hypoxischen Bedingungen aktiviert und katalysiert verstärkt den Abbau von Glykogen. Das ist einer der Mechanismen, die eine Glykolysesteigerung in Hypoxie bewirken (Pasteur-Effekt). Da Glykogen in Bezug auf die ATP-Produktion effektiver ist als Glukose, ist es das bevorzugte Substrat der anaeroben Glykolyse.

Der Abfall der Glykogenkonzentration in der Ischämie verläuft in allen HTK-konservierten Gruppen ungeachtet der Lagerungstemperatur in den ersten 8 Stunden ähnlich. Erst danach deutet sich ein steilerer Abfall in den wärmeren Gruppen an, ohne daß die Unterschiede ein signifikantes Niveau erreichen (vgl. Abb. 3.4). Im Vergleich sinkt der Gehalt an Glykogen im nichtkonservierten Myokard von Beginn der Ischämie deutlich schneller ab. Aber selbst nach 600 Minuten beträgt die Glykogenreserve noch  $>80 \mu\text{mol/g TG}$ , somit ist der Stoffwechsel in Ischämie nicht substratlimitiert.



**Abbildung 3.5:** Verlauf der Glukosekonzentration in Ischämie, bezogen auf das Trockengewicht. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—), 15°C (—◆—) bzw. reine Ischämie 5°C (—●—), Fehler SEM. 3-Gruppen-ANOVA (Meßwiederholung): reine Ischämie ( $p < 0,001$ ) gegen alle Gruppen, 5° vs. 15° ( $p < 0,001$ ), 5° vs. 10° ( $p < 0,05$ ), 10° vs. 15° ( $p < 0,005$ ).

### 3.2.2.2 Glukose

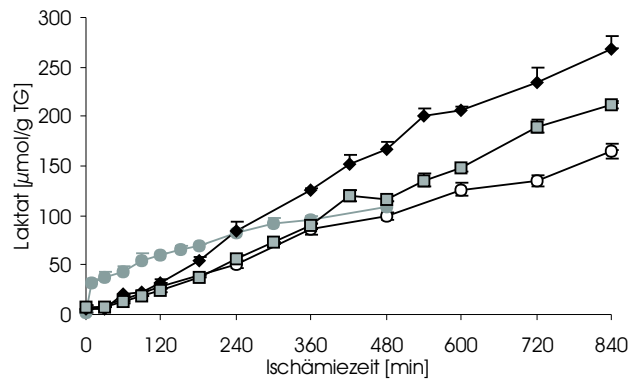
Unter physiologischen Bedingungen ist die Phosphofruktokinase (PFK) das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Glykolyse. Allerdings ist dieser Schritt hypoxiesensibel und erfährt eine Aktivierung unter Energiemangel. In hypothermer Ischämie könnten deswegen evtl. andere Schritte limitierend werden. Azidose und ein hohes  $\text{NADH}^+:\text{NAD}$ -Verhältnis hemmen die GAP-DH [28], Hypothermie inhibiert hauptsächlich den Schritt der Glukose-P-Isomerase [46]. Hieraus folgt, daß während der Ischämie Glukose angehäuft wird.

Mit Ausnahme der reinen Ischämie beginnt der Anstieg der Glukosekonzentration mit einer Latenz von ca. 240 Minuten, im Gegensatz zu der Laktatkonzentration, die ab Ischämiebeginn ansteigt. In 15°C-Herzen erfolgt dieser Anstieg früher und signifikant steiler als bei 10°- und 5°-Lagerung (vgl. Abb. 3.5). Ein Plateau ist im beobachteten Intervall von 24 Stunden nicht zu erkennen.

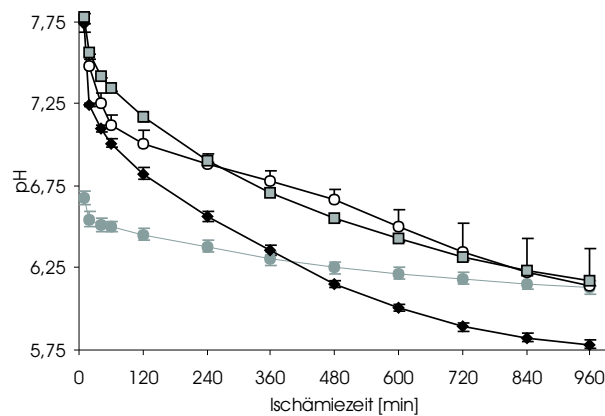
### 3.2.2.3 Laktat

Der Verlauf der Laktatkonzentrationen während ischämischer Lagerung bei 5, 10 oder 15°C ist Abb. 3.6 zu entnehmen. Zum Vergleich sind wieder die Werte einer Gruppe ohne kardioplegische Protektion (reine Ischämie) bei 5°C-Lagerung angegeben.

Die Konzentration von Laktat als Endprodukt der anaeroben Glykolyse steigt in Ischämie kontinuierlich an. Temperaturabhängige Gruppenunterschiede treten hier erst nach >180 Minuten auf: 15° > 10°C > 5°C ( $p < 0,001$ ). Nichtkonservierte Herzen erfahren initial einen deutlich steileren Anstieg als solche mit HTK-Konservierung ( $p < 0,05$ ). Ihr Anstieg verlangsamt sich und zeigt schon früh den Übergang in ein Plateau.



**Abbildung 3.6:** Laktat-Verlauf in Ischämie, bezogen auf das Trockengewicht. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—), 15°C (—◆—) bzw. reine Ischämie 5°C (—●—), Fehler: SEM. Reine Ischämie initial  $p < 0,05$  vs. HTK-Ischämie, HTK-15°C im Verlauf  $p < 0,001$  gegen 10° und 5° (3-Gruppen-ANOVA).



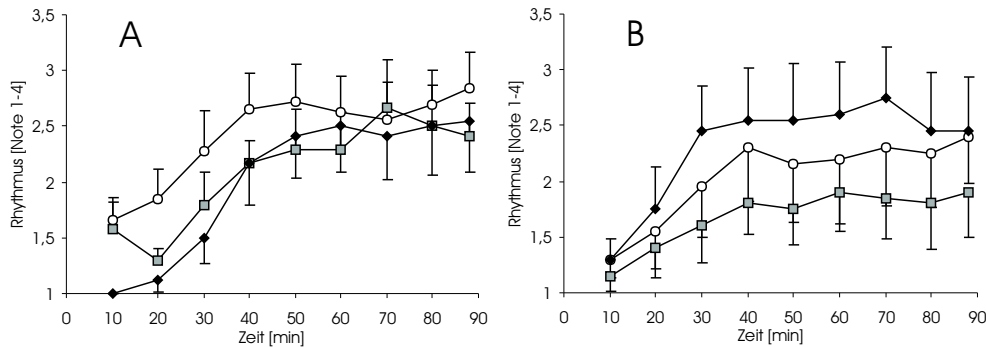
**Abbildung 3.7:** pH-Verlauf in Ischämie, gemessen im interventrikulären Septum. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—), 15°C (—◆—), zum Vergleich reine Ischämie 5°C (—●—). Fehler: SEM, zum Signifikanzniveau s. Text.

### 3.2.3 pH-Verlauf

Der pH-Wert des Myokards wurde mit einer Glas-pH-Einstabmeßkette in der Septumregion gemessen und aufgezeichnet. Erste Ergebnisse gab es nach 10 Minuten (10°/15°-Gruppe) bzw. 20 Minuten (5°C-Gruppe) Ischämie.

Die ersten Werte liegen mit  $\text{pH} > 7,7$  weit im Alkalischen. Das läßt sich zum einen dadurch erklären, daß durch die intensive HTK-Perfusion das gut diffusible  $\text{CO}_2$  ausgewaschen wurde. Zum anderen wird durch den reduzierten Stoffwechsel die Produktion von Säureäquivalenten verringert.

Zum pH-Verlauf vgl. Abb. 3.7. Nach der initialen Alkalisierung fällt der pH bei 5° und 15°-Lagerung steil ab, bei 10° deutlich langsamer. Ab 240 Minuten Ischämie ist allerdings kein Unterschied mehr zwischen 5° und 10° auszumachen. Die 15°C-Gruppe bleibt im gesamten Zeitraum deutlich saurer (3-Gruppen-ANOVA:  $p < 0,001$  vs. 5°C,  $p < 0,01$  vs. 10°C).



**Abbildung 3.8:** Rhythmusstabilität während Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. Vergeben wurden die Noten 1 (sehr gut) bis 4 (sehr schlecht). HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—◆—); Fehler: SEM, Gruppenunterschiede nicht signifikant.

Im Vergleich dazu verschiebt sich bei der reinen Ischämie der Startpunkt des pH deutlich ins Saurere (initial  $p < 0,001$ ), der weitere Abfall über die Zeit ist aber sehr gering, so daß nach 360' Ischämie das Niveau der HTK-15°C-Gruppe, nach 960' das der beiden anderen erreicht wird. Evtl. sind hier schon die Auswirkungen von Autolyseprozessen zu spüren, die die Azidose abfedern.

### 3.3 Reperfusion - Funktionelle Entwicklung

#### 3.3.1 Herzrhythmus

Zur Auswertung des Rhythmus wurden anhand des aufgezeichneten EKGs nach festgelegten Kriterien Noten von 1 = "sehr regelmäßig" (höchstens 3 atypische Schläge pro Minute) bis 4 = "keine Regelmäßigkeit erkennbar" vergeben (vgl. Kap. 4.6.3). Alle 10 Minuten wurden vier 30-Sekunden-Intervalle benotet, die Noten gemittelt und mit den Werten der anderen Versuche der entsprechenden Gruppe verrechnet. Das Ergebnis zeigt Abb. 3.8.

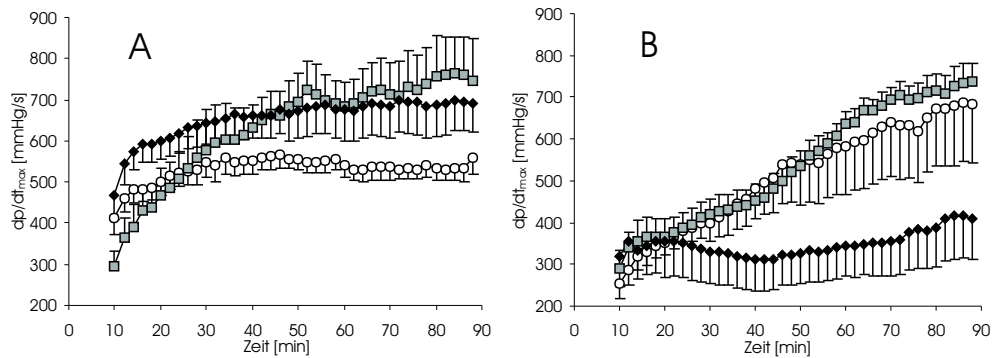
Sowohl nach kurzer als auch nach langer Ischämie verschlechtert sich der Rhythmus in den ersten 30-40 Minuten der Reperfusion. Danach sind Veränderungen nur noch geringfügig. Nach 8-stündiger Ischämie lassen sich die Gruppen am Reperfusionseende nicht trennen. Deutlicher sind die Unterschiede nach 10-stündiger Lagerung. Hier haben 10°-Herzen einen stabileren Rhythmus als 5°, und diese wiederum als 15°C-Herzen (nicht signifikant). Dabei ist der Notenlevel zumindest in den beiden kälteren Gruppen absolut gesehen besser als nach der kürzeren Ischämiebelastung.

Hinsichtlich Herzfrequenz und Rhythmus sind nach der kürzeren Ischämiebelastung eher die beiden wärmeren Gruppen (10-, 15°C) die besseren, nach längerer Lagerung die kälteren (5-, 10°C).

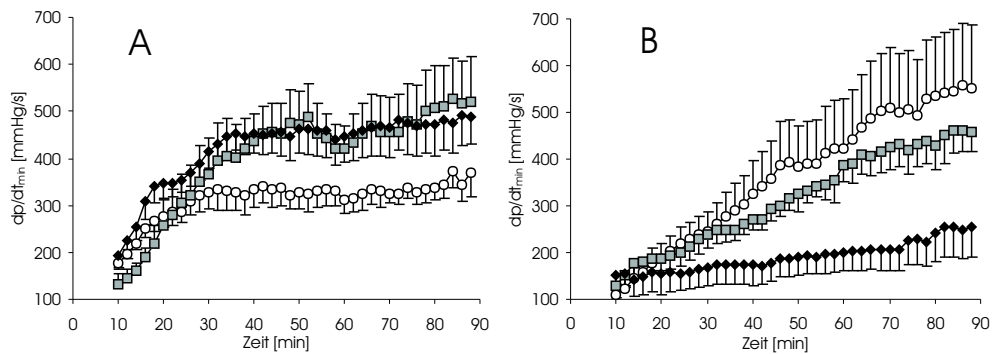
#### 3.3.2 Inotropie

Als Indikatoren für die funktionelle Entwicklung der Herzen in der Reperfusion dienten die Größen Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ) und als Relaxati-





**Abbildung 3.9:** Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt_{max}$  während Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—◆—); Fehler: SEM. Es wurde lediglich eine 2-Gruppen-ANOVA durchgeführt: (A) 5° vs. 10°C; (B) 10° vs. 15°C, je  $p < 0,05$ .



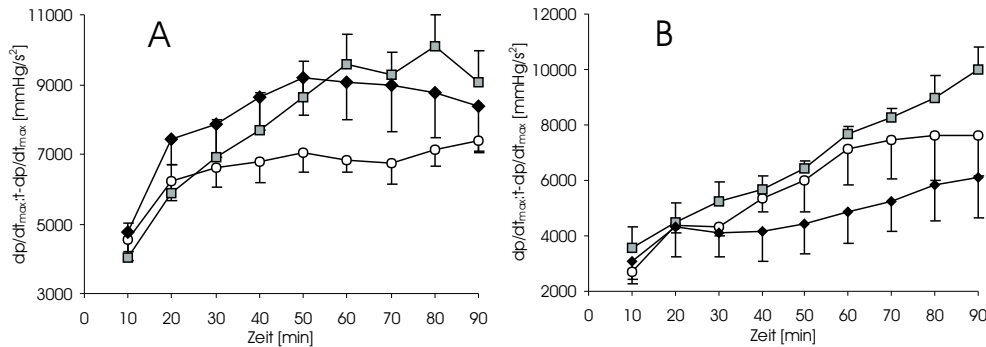
**Abbildung 3.10:** Relaxationsgeschwindigkeit  $dp/dt_{min}$  während Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—◆—); Fehler: SEM, keine statistische Signifikanz.

ongeschwindigkeit  $dp/dt_{min}$ ) als erste Ableitung der linksventrikulären Druckverlaufskurve nach der Zeit, und die weniger Vorlast-abhängige Druckanstiegsbeschleunigung ( $dp/dt_{max} \cdot t - dp/dt_{max}$ ), 2. Ableitung des Druckes.

In Abb. 3.9 ist die Entwicklung der Inotropie in den beobachteten Gruppen aufgetragen. Sowohl nach 8 als auch nach 10 Stunden Ischämie ist es die 10°C-Gruppe, die über 90 Minuten eine dauerhafte Erholung auf die jeweils höchsten Werte aller drei Gruppen zeigt. An zweiter Stelle in Bezug auf Absolutwerte und Kontinuität der Erholung stehen die 15°C-Gruppe (nach 8 h) bzw. die 5°C-Gruppe (nach 10 h). Die jeweils schlechteste Gruppe zeigt nur eine geringfügige Verbesserung und erreicht nach 20-30 Minuten ein Plateau auf niedrigem Niveau.

Es erscheint paradox, daß sich 5°C-Herzen nach 10 h Ischämie funktionell offenbar besser erholen als nach 8 h (nicht signifikant). Eine Vergrößerung der Gruppe auf  $n = 8$  bei 8 h Ischämie stabilisierte allerdings das Ergebnis.

Die Erholung der Relaxationsgeschwindigkeit (Abb. 3.10) verläuft weitgehend analog zu  $dp/dt_{max}$ . Auch hier zeigt die 5°C-Lagerung überraschend eine bessere postischämische Erholung nach der längeren Ischämiezeit. Signifikante Unterschiede ergeben sich in den Gruppen allerdings nicht.



**Abbildung 3.11:** Druckanstiegsbeschleunigung  $dp/dt_{max:t}-dp/dt_{max}$  während Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—◆—); Fehler: SEM, Unterschiede statistisch nicht signifikant.

Die Auswertung der Druckanstiegsbeschleunigung (Abb. 3.11) ergibt ein ähnliches Bild. Nach 8 bzw. 10 Stunden Ischämie ist es jeweils die 10°C-Gruppe, die die beste Erholung aufweist, gefolgt von der 15°- bzw. 5°C-Gruppe.

Die Inotropiewerte unterstützen die Aussage, daß bei einer ischämischen Lagerung über 8 Stunden die Herzen die beste Erholung zeigen, die bei 10° und 15°C aufbewahrt worden waren. Bei Verlängerung der Ischämie verschiebt sich die optimale Temperatur ins Kältere, nach 10 Stunden weisen 10° und 5°C-Herzen die bessere postischämischen Erholung auf.

### 3.3.3 Sauerstoffverbrauch

Anhand des Sauerstoffverbrauches kann abgeschätzt werden, wie suffizient der aerobe Stoffwechsel in Reperfusion ist (Formel auf S. 18).

Nach 8-stündiger Ischämie nehmen alle drei Temperaturgruppen in der ersten Stunde der Reperfusion annähernd gleichviel Sauerstoff auf. Erst danach zeichnen sich Gruppenunterschiede ab: Die 10°C-Kurve steigt am steilsten und erreicht nach 90 Minuten Reperfusion den höchsten Endwert, mit etwas Abstand folgen die 5°C-Herzen. Die 15°C-Herzen haben zu Beginn der Reperfusion zwar einen mit den anderen Gruppen vergleichbaren Anstieg des Sauerstoffverbrauches, erreichen aber schon nach 20 Minuten ein Plateau, das sie bis zum Ende ohne wesentliche Verbesserung halten. Betrachtet man hingegen den frequenzbereinigten Sauerstoffverbrauch pro Herzaktion, liegen die Werte der 10°- und 15°C-Gruppe während der gesamten Reperfusion deutlich über denen der 5°C-Herzen. In der 90. Minute ergibt sich für die einzelnen Gruppen die Sauerstoffaufnahme nach Tab. 3.1.

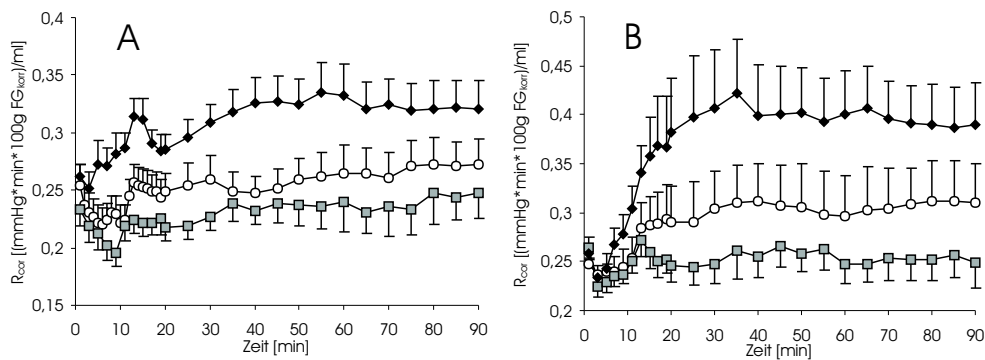
Nach der längeren Ischämiezeit von 10 Stunden fällt die absolute Sauerstoffaufnahme geringer aus (Tab. 3.1). Bei den 15°C-Herzen liegen die Werte dabei deutlich unter denen der beiden kälteren Gruppen. Auch pro Herzaktion bestätigt sich dieses Ergebnis.

Auch wenn die Unterschiede keine statistische Signifikanz aufweisen, wird die Tendenz ersichtlich, daß sich bei längerer Lagerung das Temperaturoptimum hin zu tieferen Temperaturen verschiebt.

Ischämiedauer	5°C	10°C	15°C
	[ml / min / 100g FG <sub>kor</sub> ]		
480 min	4,21 ± 0,31	4,66 ± 0,42	3,73 ± 0,24
600 min	3,30 ± 0,40	3,41 ± 0,18	3,06 ± 0,13
	[ml / min / 100g FG <sub>kor</sub> / Schlag]		
480 min	0,042 ± 0,005	0,053 ± 0,007	0,048 ± 0,005
600 min	0,046 ± 0,009	0,46 ± 0,003	0,034 ± 0,008

**Tabelle 3.1:** O<sub>2</sub>-Verbrauch am Ende der 90' Reperfusion.

Werte in ml·min<sup>-1</sup>·100g FG<sub>kor</sub><sup>-1</sup> ± SEM, absolut und in Bezug zur Herzfrequenz, Unterschiede waren nicht signifikant.



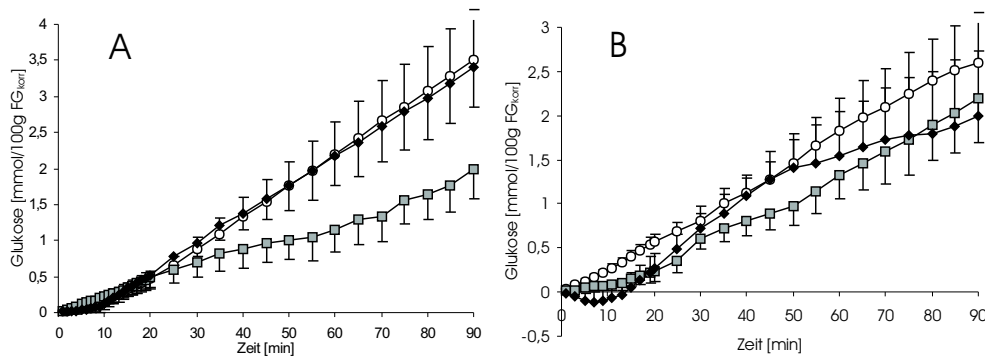
**Abbildung 3.12:** Perfusionswiderstand im koronaren Stromgebiet  $R_{cor}$  während Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—■—) und 15°C (—◆—), Werte in mmHg·min·100g FG<sub>kor</sub>·ml<sup>-1</sup> ± SEM. CAVE: Werte nicht korrigiert um die ca. 40% höhere Viskosität der Reperfusionslösung 2 (ab 10. Minute).

### 3.3.4 Flow - Druck - Koronarwiderstand

Die Höhe des Perfusionsflusses richtete sich in allen Versuchen nach demselben Regime. Ziel war es, eine adäquate Sauerstoffversorgung des Myokards sicherzustellen, ohne durch zu hohe Volumina ein interstitielles Ödem zu verursachen.

Trotz ähnlicher Perfusionsflüsse unterschieden sich die gemessenen Drücke deutlich. Folglich war der Widerstand im koronaren Stromgebiet in den Gruppen unterschiedlich. Abb. 3.12 zeigt den Verlauf dieses Parameters über die Zeit. Er beinhaltet die Verläufe des Perfusionsflusses und -druckes, die Formel ist auf S. 18 angegeben.

In allen Gruppen bleibt der Widerstand nach initialen Veränderungen in den ersten 20 (-30) Minuten der Reperfusion relativ konstant. Dabei haben die 10°C-Herzen jeweils die niedrigsten Werte, und diese liegen sowohl nach 8 als auch nach 10 Stunden Ischämie auf ähnlichem Niveau. Die 5°- und 15°C-Gruppe weisen deutlich höhere Widerstände auf. Nach 10 Stunden Ischämie ist hier nochmals ein Anstieg gegenüber der entsprechenden Kurve nach 8 Stunden zu verzeichnen. Gruppenvergleiche wurden jeweils nur zwischen 10° und 15°C mittels ANOVA (mit Meßwiederholung) angestellt, dabei erreichten die Unterschiede statistische Signifikanz auf der Stufe 0,05.



**Abbildung 3.13:** Myokardiale Glukoseaufnahme während 90' Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—●—), kumulativ aufgetragen, normiert auf 100g korrigiertes Feuchtgewicht; Fehler: SEM. Die Unterschiede erreichen auch in den 8h-Gruppen keine stat. Signifikanz.

### 3.4 Metabolismus während Reperfusion

Gemessen vom Ende der kardioplegischen Perfusion, begann die Reperfusion nach 480 (8h) oder 600 (10h) Minuten Ischämiezeit und endete 90 Minuten später (570 bzw. 690 Minuten). Aus den Biochemieversuchen, die den Verlauf bestimmter Stoffwechselprodukte in Ischämie über ca. 24 Stunden ohne nachfolgende Reperfusion verfolgten, sind die Konzentrationen der Metabolite zu diesen Zeitpunkten bekannt. Auf diesem Hintergrund können Veränderungen dieser Parameter während der Reperfusion genauer bewertet werden.

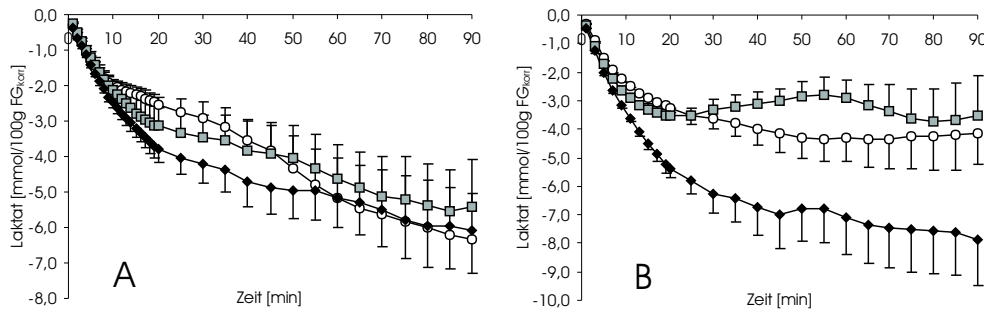
#### 3.4.1 Glukose

Mit der Reperfusionslösung wurden 5 mmol/L Glukose angeboten. Arteriovenöse Differenzen wurden gemessen, auf Perfusionsfluß und korrigiertes Ventrikelfeuchtgewicht normiert und kumulativ aufaddiert. Abb. 3.13 zeigt die myokardiale Glukosebilanz während der Reperfusion.

Alle Herzen zeigen eine Nettoaufnahme von Glukose über den gesamten Reperusionszeitraum. Nach 8 Stunden Ischämie nehmen die 10°C-Herzen in 90 Minuten ca. 2 mmol Glukose pro 100 g korrigiertes Ventrikelfeuchtgewicht auf, in den Gruppen 5° und 15° sind es mit ca. 3,5 mmol jeweils deutlich mehr. Nach 10 Stunden Ischämie lassen sich die Gruppen nicht signifikant voneinander trennen. Hier liegt die kumulative Aufnahme bei 2-2,5 mmol/100g.

#### 3.4.2 Laktat

In Abb. 3.14 ist die kumulative Laktatbilanz der Herzen während 90 Minuten Reperfusion nach 8 bzw. 10 Stunden Ischämie aufgetragen. Negative Werte bedeuten Laktatabgabe. Dabei ist zu beachten, daß insbesondere zu Beginn der Reperfusion in die Laktatbilanz nicht nur die momentane Laktatproduktion, sondern auch das während Ischämie gebildete und angestaute Laktat eingeht. Letzteres wird hier als Äquilibriumsmenge bezeichnet und im Kapitel 4.5.3 quantifiziert.



**Abbildung 3.14:** Laktat-Bilanz des Myokards während Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. Kumulativ aufgetragen, normiert auf 100g  $FG_{kor}$ . HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—◆—), Fehler: SEM. (B) Ab  $t=20'$   $p<0,05$  für 10° vs. 15°C (3-Gruppen-ANOVA).

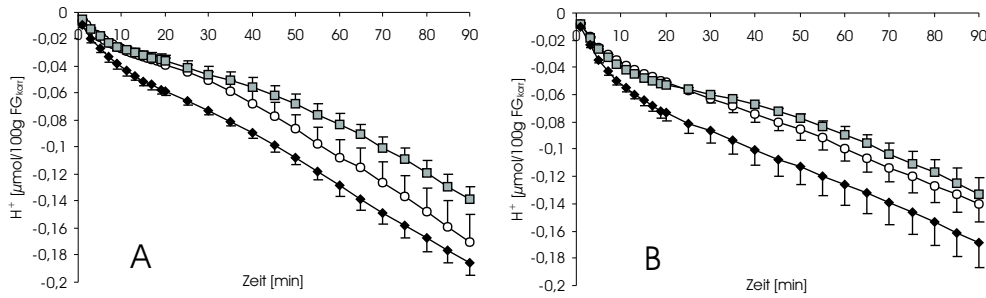
Wie Abb. 3.14 A verdeutlicht, wird Laktat nach 8 Stunden Ischämie kontinuierlich über 90 Minuten Reperfusion aus dem Myokard abgegeben. Dabei ist die Geschwindigkeit der Laktatfreisetzung anfangs deutlich höher (steilere Kurve) und flacht nach 10 bis 20 Minuten ab. In der Gesamtmenge des abgegebenen Laktats unterscheiden sich die Gruppen nicht signifikant.

Nach 10-stündiger Ischämie (Abb. 3.14 B) sieht man ebenfalls eine deutliche Laktatabgabe in den ersten 10-20 Minuten Reperfusion, doch danach zeigen die Herzen, die bei 5 oder 10°C gelagert worden waren, eine ausgeglichene Laktatbilanz, in der 10°C-Gruppe wird Laktat zwischen der 25. und 55. Minute sogar netto verstoffwechselt (Kurve steigt an). Die Werte der 15°C-Gruppe sind inhomogen, im Mittel ergibt sich hier eine kontinuierliche Laktatfreisetzung über 90 Minuten.

Die anfängliche hohe Laktatfreisetzung dürfte zum größten Teil Ausdruck der Anpassung der hohen postischämischen Laktatkonzentration des Myokards an die der Reperfusionslösung sein. Die Menge an Laktatabgabe, die infolge der Äquilibration zu erwarten ist, ist in Kapitel 4.5.3 (S. 71) berechnet.

### 3.4.3 pH-Verlauf

Während der ersten 10 Minuten der Reperfusion wurden große Mengen an sauren Valenzen ausgespült, die während der Ischämie angefallen waren. Der im koronarvenösen Perfusat gemessene pH erholte sich in Richtung Normalwerte, ohne den physiologischen Bereich jedoch ganz zu erreichen. Die 5°C-Versuche kommen ihm am nächsten, die 15°C-Gruppe bleibt am weitesten davon entfernt. Danach fällt der pH wieder kontinuierlich ab, was darauf hindeutet, daß kein rein-aerober Stoffwechsel vorliegt. Berechnet man aus den arteriovenösen pH-Differenzen die kumulative Protonenbilanz des Myokards, wird der Unterschied zwischen den Gruppen deutlicher (vgl. Abb. 3.15). Bei 10°C-Herzen ist ungeachtet der Ischämiedauer die  $H^+$ -Freisetzung am geringsten.



**Abbildung 3.15:** Protonenbilanz des Myokards während Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. Aus arteriovenösen pH-Differenzen berechnet, normiert auf 100g  $FG_{korrr}$  und kumulativ aufgetragen. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—◆—), Fehler: SEM.

### 3.4.4 Elektrolyte

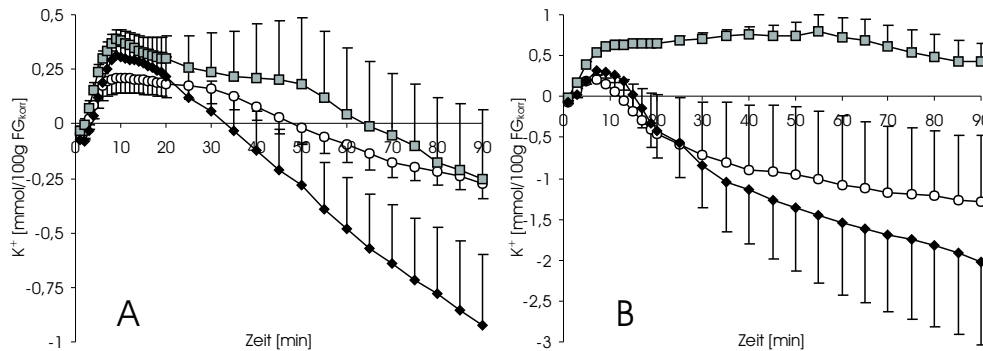
Die folgenden Abbildungen der Elektrolytbilanzen zeigen nicht die Konzentrationen im venösen Effluat oder arteriovenöse Differenzen, sondern die kumulative Aufnahme oder Abgabe der Elektrolyte durch das Myokard während Reperfusion. In dieser Darstellung beeinflussen meßtechnisch bedingte Schwankungen die Kurve weniger stark, gleichzeitig kommen kleine Trends verstärkt zum Ausdruck. Dazu wurden arteriovenöse Differenzen in Beziehung zum Perfusionsfluß und dem korrigierten Ventrikelfeuchtgewicht gestellt und kumulativ aufaddiert. Positive Bilanzen bedeuten Netto-Aufnahme in das Myokard, negative Netto-Abgabe in das Perfusat.

Dabei spiegeln die Bilanzen sowohl Elektrolytverschiebungen wider, die während der kardioplegischen Perfusion und der nachfolgenden Ischämie eingetreten waren (Äquilibrationismengen), als auch momentane Elektrolytbewegungen in Reperfusion selbst.

#### 3.4.4.1 Äquilibration

Eine bestimmte Menge Aufnahme bzw. Abgabe der Elektrolyte ist dadurch zu erklären, daß durch die kardioplegische Perfusion das Ionenmilieu zumindest des extrazellulären Kompartimentes an die Zusammensetzung der HTK-Lösung angepaßt wurde. Im Gegenzug wird sich der Extrazellulärraum zu Beginn der Reperfusion wieder an die physiologische Zusammensetzung der Perfusionslösung anpassen. Daraus resultieren eine Nettoaufnahme von Natrium und Calcium und eine Abgabe von Kalium. Erst Elektrolytverschiebungen, die diese Äquilibrationismenge überschreiten, können als Indikatoren einer zellulären Schädigung verwendet werden. Zur unterschiedlichen Zusammensetzung der verwendeten Lösungen vergleiche die Tabellen 2.1 (S. 10) und 2.2 f. (S. 15).

Die Äquilibrationismenge kann zum einen rechnerisch aus der Differenz der Konzentrationen der HTK- und der Reperfusionslösung und einem geschätzten Extrazellulärvolumen von 20% des Myokardfeuchtgewichtes abgeschätzt werden. Allerdings ist dieser Ansatz nur eine grobe Näherung, weil etwa Elektrolytverschiebungen (intrazellulär  $\longleftrightarrow$  extrazellulär) während der Ischämie, die bei den



**Abbildung 3.16:** Myokardiale Kaliumaufnahme während 90' Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—◆—), kumulativ aufgetragen, normiert auf 100g korrigiertes Feuchtgewicht. Fehler: SEM, Unterschiede nicht signifikant.

verschiedenen Lagerungstemperaturen in unterschiedlichem Ausmaß und Richtung erfolgen, nicht berücksichtigt werden.

Die Berechnungen ergeben für die einzelnen Äquilibrierungsmengen  $n_{Aequi}$  die Werte in Tabelle 3.2:

		Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>2+</sup>
$C_{HTK} = C_e$	[mmol/L]	15,0	10,0	0,00
$C_{Reperf.Lsg.}$	[mmol/L]	156,5	4,00	2,50
$n_{Aequi}$ (rechnerisch)	[mmol/100g FG <sub>korr</sub> ]	2,83	-0,12	0,05

**Tabelle 3.2:** Äquilibrierungsmengen für Elektrolyte, errechnet aus der unterschiedlichen Zusammensetzung der HTK- und der Reperfusionslösung. Details s. Text

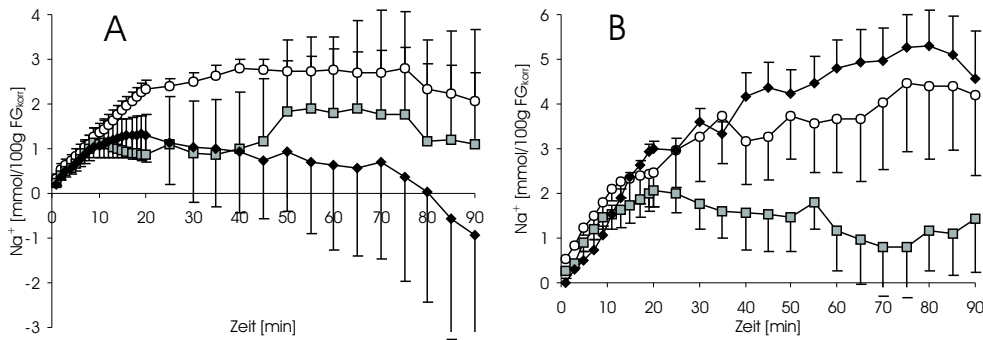
Alternativ lassen sich Äquilibrierungsmengen aus den Bilanzkurven selbst abschätzen. Da Äquilibrierungsvorgänge mit einer eigenen Kinetik ablaufen, läßt sich in den kumulativen Kurven meist an einem Kurvenknick erkennen, wann die Äquilibrierungszeit beendet ist. Gewöhnlich ist das eine Zeit zwischen 8 und 15 Minuten. Die entsprechenden Stoffmengen kann man dann dem Diagramm entnehmen. Allerdings lassen sich auf diese Weise Elektrolytverschiebungen im Sinne der Gewebeäquibrierung nicht differenzieren von solchen, die ihren Ursprung in den metabolischen Gegebenheiten der frühen Reperfusion haben.

#### 3.4.4.2 Bilanzen von K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup>

**Kalium** (Abb. 3.16): Die kumulative Kaliumbilanz beginnt mit einer leichten Abgabe in den ersten 2-3 Minuten. Da die erste Probenentnahme modellbedingt erst nach einer Minute stattfand, muß man vermuten, dabei das Maximum der Kaliumabgabe verpaßt zu haben. Auf die leichte initiale Abgabe folgt eine deutliche Kaliumaufnahme über knapp 10 Minuten. Diese Phase ist nach 10 Stunden Ischämie etwas schneller beendet als nach 8 Stunden.

Die Kaliumausspülung zu Beginn ist wohl am ehesten als Äquibrierung des Extrazellularraumes zu verstehen und entspricht etwa dem errechneten Erwar-





**Abbildung 3.17:** Myokardiale Natriumaufnahme während 90' Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—◆—), kumulativ aufgetragen, normiert auf 100g korrigiertes Feuchtgewicht; Fehler: SEM.

tungswert (vgl. Tab. 3.2). Die darauf folgende Aufnahme geht wahrscheinlich auf die steigende Aktivität der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  und die Glukoseaufnahme zurück, die beide eine  $\text{K}^+$ -Verschiebung nach intrazellulär bewirken. Die Amplitude des steilen Anstiegs ist bei 10° am höchsten, bei 15° kleiner und bei 5° am kleinsten. Das könnte ein Hinweis sein, daß bei 10°C-Herzen die zellulären Transportsysteme postischämisch eine bessere Erholungstendenz aufweisen.

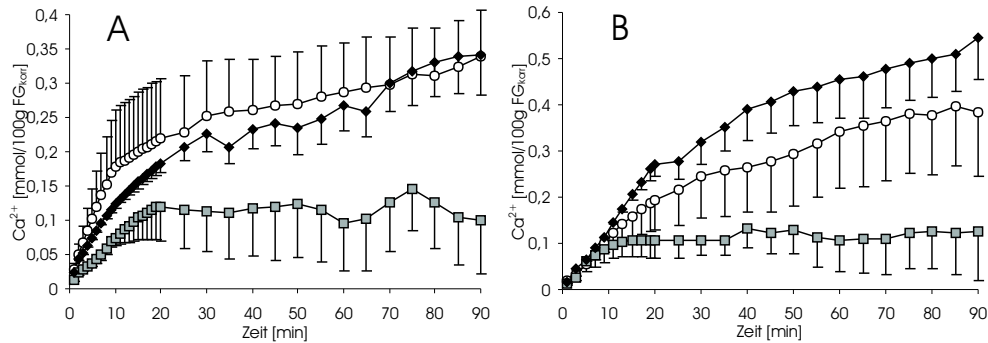
Nach etwa 10 Minuten Reperfusion ist die Äquilibrierungsphase beendet. Daraufhin weist nur eine Gruppe eine ausgeglichene Kaliumbilanz auf - 10h Ischämie bei 10°C - alle anderen verfallen in kontinuierliche Kaliumabgabe. Es ist jeweils die 15°C-Gruppe, die nach kurzer wie langer Ischämie am deutlichsten und schnellsten Kalium verliert.

**Natrium** (Abb. 3.17): Die deutliche Netto-Aufnahme zu Beginn der Reperfusion dauert nach 8 Stunden Ischämie 10 Minuten bei 10° und 15°C, dagegen ca. 20 Minuten in der kältesten Gruppe. In dieser Gruppe liegt auch die Menge an Natriumaufnahme deutlich über der der beiden anderen Gruppen. Danach bleibt die Bilanz einigermaßen ausgeglichen, mit Ausnahme der 15°C-Gruppe, deren Gruppenmittelwert nach ca. einer Stunde wieder Natriumabgabe signalisiert. Aufgrund großer Streubreiten sind die Unterschiede allerdings nicht signifikant.

Nach 10 Stunden Ischämie weisen nur die 10°C-Herzen nach der initialen Äquilibrierungsphase eine ausgeglichene Bilanz auf, die anderen beiden Gruppen nehmen kontinuierlich Natrium auf und erreichen erst gegen Ende der Reperfusion ein Plateau, d.h. eine ausgeglichene Bilanz. Hierbei ergab eine 2-Gruppen-Varianzanalyse ab  $t=60'$  einen signifikanten Unterschied zwischen der 10°- und der 15°C-Gruppe.

**Calcium** (Abb. 3.18): Analog zu den vorherigen Kurven weist auch die Calciumbilanz eine starke Aufnahme zu Beginn der Reperfusion auf. Nach dieser Phase hat die 10°C-Kurve ihr Plateau erreicht und signalisiert damit einen ausgewogenen Calciumhaushalt. Sowohl die wärmere als auch die kältere Lagerung haben in der Reperfusion eine kontinuierliche Calciumaufnahme zur Folge, die in ihrer Menge nach 10 Stunden Ischämie deutlich größer ist als nach 8. Ein Plateau dieser Kurven ist auch nach 90 Minuten Reperfusion noch nicht zu erkennen.





**Abbildung 3.18:** Myokardiale Calciumaufnahme während 90' Reperfusion nach (A) 480' und (B) 600' Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—) und 15°C (—◆—), kumulativ aufgetragen, normiert auf 100g korrigiertes Feuchtgewicht; Fehler: SEM. 2-Gruppen-ANOVA ergab jeweils  $p < 0,05$  für 10° vs. 15°C.

	Start	Ischämie bei 5°C		Ischämie bei 10°C		Ischämie bei 15°C	
		480'	+90' Reperf	480'	+90' Reperf	480'	+90' Reperf
ATP	27.09 ± 0.55	20.06 ± 0.56	19.28 ± 1.01	18.79 ± 0.58	20.43 ± 1.26	14.42 ± 1.66	10.56 ± 1.46*
ATP+ADP+AMP	32.41 ± 0.53	27.82 ± 0.74	21.79 ± 2.70 *	25.87 ± 0.20	25.17 ± 1.25	20.20 ± 1.54	15.25 ± 1.83
PKr	51.36 ± 1.88	5.08 ± 0.30	22.49 ± 3.41 †	4.68 ± 0.49	35.10 ± 2.18 *	3.82 ± 0.38	20.31 ± 3.45*
Laktat	5.23 ± 1.50	99.30 ± 3.26	31.40 ± 2.64 ‡	116.92 ± 3.33	34.13 ± 2.01 *	167.53 ± 7.43	51.35 ± 6.29*
Glukose	0.31 ± 0.18	3.19 ± 0.54	9.68 ± 0.90 ‡	4.70 ± 0.32	13.08 ± 0.51 *	8.66 ± 1.02	12.18 ± 1.24
Glykogen	235.54 ± 11.57	142.25 ± 16.76	162.70 ± 15.79	134.98 ± 16.63	156.22 ± 19.91	116.61 ± 10.58	96.88 ± 17.44

**Tabelle 3.3:** Myokardiale Konzentration einiger Metabolite, sofort nach kardioplegerischer Perfusion („Start“), nach 480' Ischämie, und am Ende der nachfolgenden 90' Reperfusion. Werte sind Mittelwerte ± SEM, in  $\mu\text{mol/g}$  TG. \*  $p < 0,05$ ; †  $p < 0,01$  bzw. ‡  $p < 0,005$  gegenüber dem korrespondierenden postischämischen Wert.

## 3.5 Metabolischer Status am Ende der Reperfusion

Die Konzentrationen einiger Metabolite, die direkt im Anschluß an die 90-minütige Reperfusion in jeweils drei transmuralen linksventrikulären Gewebeproben bestimmt wurden, sind in Tabelle 3.3 (8h Ischämie) und Tabelle 3.4 (10h Ischämie) zusammengestellt. Darin sind auch die Konzentrationen zu Beginn der Ischämie und nach 8 bzw. 10 Stunden ischämischer Lagerung angegeben, die in den Biochemieversuchen ermittelt worden sind. Hierdurch ist es möglich abzuschätzen, inwieweit die intraischämischen Veränderungen in den einzelnen Gruppen durch die Reperfusion rückgängig gemacht werden konnten. Signifikante Veränderungen über den Zeitraum der Reperfusion sind jeweils gekennzeichnet.

### 3.5.1 Laktat

Die Laktatkonzentration im Myokard war in allen Gruppen nach Reperfusion signifikant niedriger als nach Ischämie zu Reperfusionbeginn. Werte lagen nach Reperfusion bei ca. 30-40  $\mu\text{mol/g}$  TG, ungeachtet der Lagerungszeit und -temperatur. Lediglich 15°C-480'-Lagerung resultierte in einem signifikant höhe-

	Start	Ischämie bei 5°C		Ischämie bei 10°C		Ischämie bei 15°C	
		600'	+90' Reperf	600'	+90' Reperf	600'	+90' Reperf
ATP	27.09 ± 0.55	17.51 ± 1.12	18.39 ± 3.22	16.03 ± 1.58	16.45 ± 0.87	10.95 ± 1.00	9.41 ± 2.48
ATP+ADP+AMP	32.41 ± 0.53	26.15 ± 1.17	19.17 ± 4.82	23.11 ± 1.28	21.18 ± 0.69	17.36 ± 0.67	13.36 ± 2.86
PKr	51.36 ± 1.88	4.80 ± 0.47	32.69 ± 9.19	5.15 ± 0.00	46.97 ± 8.86	k.A.	31.40 ± 10.68
Laktat	5.23 ± 1.50	125.97 ± 6.50	33.15 ± 4.18†	147.54 ± 3.90	31.78 ± 6.37*	206.17 ± 4.41	39.33 ± 8.40*
Glukose	0.31 ± 0.18	5.21 ± 0.38	12.80 ± 1.77†	8.35 ± 0.62	12.75 ± 0.39*	12.92 ± 1.72	16.23 ± 2.39
Glykogen	235.54 ± 11.57	135.95 ± 14.56	132.61 ± 31.36	107.24 ± 25.68	162.75 ± 25.92	80.37 ± 5.30	88.30 ± 19.05

**Tabelle 3.4:** Myokardiale Konzentration einiger Metabolite, sofort nach kardioplegischer Perfusion („Start“), nach 600' Ischämie, und am Ende der nachfolgenden 90' Reperfusion. Werte sind Mittelwerte ± SEM, in  $\mu\text{mol/g TG}$ . \*  $p < 0,05$  bzw. †  $p < 0,01$  gegenüber dem korrespondierenden postischämischen Wert.

rem Laktatgehalt nach Reperfusion ( $p < 0,05$ ).

Die rezirkulierende Reperfusionslösung enthielt am Ende der Reperfusion 4-6 mmol/L Laktat. Aufgrund der Äquilibrierungsvorgänge weist der Extrazellulärraum des Herzens eine ähnliche Konzentration auf. Bei den gemessenen Trockengewichtsanteilen von rund 16% und einem geschätzten Extrazellulärvolumen von 30% des Myokards ergeben sich im extrazellulären Kompartiment Laktatkonzentrationen zwischen 7,5 und 12,3  $\mu\text{mol/g TG}$ . Der myokardiale Laktatgehalt nach Reperfusion liegt demnach auch nach Abzug dieser durch die Methode bedingten Menge noch über dem präischämischen Ausgangswert.

### 3.5.2 Glukose - Glykogen

Während der Ischämie stieg der Gehalt an Glukose im Myokard an. Dieser Prozeß wurde in Reperfusion nicht umgekehrt, sondern in allen Gruppen noch verstärkt. Das Signifikanzniveau hierbei ist in den Tabellen 3.3 und 3.4 angegeben. Mit Blick auf die absolute Glukosekonzentration im Gewebe am Ende der Reperfusion zeigen sich allerdings weder nach 8-stündiger, noch nach 10-stündiger Ischämie signifikante Unterschiede zwischen den Temperaturgruppen.

Hingegen konnte der intraischämische myokardiale Glykogenverlust in den Gruppen 480'-5° und -10° sowie 600'-10° und -15° gestoppt und umgekehrt werden ( $p = \text{ns}$ ). Allerdings wurden in der kurzen Reperusionszeit die Konzentrationen vor der Ischämie noch nicht wieder erreicht. Die anderen Gruppen bauten auch während der Reperfusion netto weiter Glykogen ab. Gruppenunterschiede hinsichtlich der Glykogenkonzentration nach Reperfusion erreichten keine statistische Signifikanz, allerdings war der Gehalt in den 15°C-Gruppen in der Tendenz deutlich geringer.

### 3.5.3 Energiereiche Phosphate

In dem kurzen Zeitraum der Reperfusion ist eine de-novo-Synthese von energiereichen Phosphaten nicht möglich, lediglich durch Rephosphorylierung von ADP und AMP kann ATP aufgebaut werden. Das bedeutet, daß die Summe aller Adenylate nach Reperfusion nicht höher sein kann als die Konzentration der Gesamtadenylate am Ende der Ischämie. Damit ist vor allem in den wärmeren Gruppen, die während der Ischämie einen signifikant steileren Abfall der

rephosphorylierungsfähigen ATP-Vorstufen verzeichneten, der ATP-Erholung in der Reperfusion eine deutliche Grenze gesetzt. Vergleiche im ATP-Gehalt der einzelnen Gruppen müssen mit Blick auf das postischämische Gesamtadenylat der jeweiligen Gruppe geschehen.

**PKr** Bei der Bewertung des PKr-Gehaltes ist die absolute Höhe kein Qualitätskriterium, weil ein hoher PKr-Spiegel Hinweis sein kann auf geringe mechanische Leistung des Herzmuskels und damit einen langsameren Verbrauch dieser energiereichen Verbindung. Im Gegensatz dazu können exzellente Herzen mit guten Inotropiewerten aufgrund des hohen Umsatzes auch geringe PKr-Konzentrationen aufweisen.

Alle Gruppen erfahren während Reperfusion eine deutliche Erholung ihres postischämisch stark reduzierten PKr-Gehaltes. Der Anstieg ist nach 8-stündiger Ischämie signifikant, nach 10 Stunden fehlten Ausgangsdaten aus den Biochemieversuchen (die Beobachtung des PKr-Verlaufs wurde abgebrochen, sobald die Werte unter der Nachweisgrenze lagen), so daß die Unterschiede keine Signifikanz erreichten. Die Gewebekonzentration von PKr am Ende der Reperfusion ist, ungeachtet der Ischämiedauer, in den 10°C-Gruppen jeweils größer als in den Gruppen 5°C/15°C, für die 8-stündige Ischämie ist der Unterschied auf der Stufe 0,05 signifikant. Das präischämische Level wird aber mit Ausnahme der Gruppe 10h Ischämie-10°C nicht erreicht.

**ATP** Wie die Tab. 3.3 und 3.4 verdeutlichen, unterscheidet sich der myokardiale ATP-Gehalt am Ende der Reperfusion nur in einer Gruppe signifikant von dem postischämischen Wert. Die 5°C-Herzen erfahren in der Reperfusion einen leichten Abfall (8h Ischämie) bzw. Anstieg (10h Ischämie) der ATP-Konzentration ( $p=ns$ ), die 10°C-Gruppen können sich in beiden Fällen leicht verbessern ( $p=ns$ ), und nach 15°C-Lagerung setzt sich der intraischämische ATP-Verfall in Reperfusion fort. Daraus folgt, daß am Ende der Reperfusion das ATP-Level in den 15°C-Gruppen signifikant niedriger liegt als in den beiden kälteren Gruppen, die sich untereinander in diesem Parameter nicht unterscheiden. Geringe Unterschiede muß man allerdings mit Blick auf die teilweise großen Streuungen der Messungen mit Vorsicht interpretieren.

**Gesamt-Adenylate** Über den Reperfusion-Zeitraum fällt die Konzentration der Gesamt-Adenylate im Myokard in allen Gruppen ab. Das ist zu erwarten, weil eine Neusynthese in diesem Zeitfenster noch nicht erfolgt. Der Abfall erreicht meist keine statistische Signifikanz, ist in der Tendenz aber in den 10°C-Gruppen ungeachtet der Ischämiedauer am geringsten. Daraus folgt, daß diese Gruppen am Ende der Reperfusion den höchsten Spiegel an Gesamtadenylylaten aufweisen (nach 8h Ischämie:  $p<0,05$ , 10h:  $p=ns$ ).



# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Möglichkeiten und Grenzen der Methode

#### 4.1.1 Der Hund als Versuchstier

Während in Bezug auf Gewebe-Histokompatibilität das Schwein dem Mensch am nächsten steht, werden tierexperimentelle Untersuchungen zur Herz-Kreislauf-Forschung und Myokardprotektion im allgemeinen an Ratten oder Hunden durchgeführt. Dabei sprechen ungeachtet des ungleich höheren methodischen Aufwandes mehrere Gründe für die Verwendung des Hundeherzens:

1. Aufgrund der kleinen Muskelmasse des linksventrikulären Myokards der Ratte lassen sich aus diesem nur wenige sehr kleine Proben zur Analyse entnehmen. Die gleichzeitige Messung verschiedener Intermediate des Energiestoffwechsels und der Glykolyse, oder gar deren Verlaufsbeobachtung über die Zeit oder Mehrfachbestimmungen bei größeren Schwankungen der Ergebnisse sind daher nicht möglich.
2. Die Ischämietoleranz des Rattenherzens ist im Vergleich zum Myokard des Hundes und auch des Menschen deutlich erhöht. Gleichzeitig kann der Rattenventrikel dank seiner sehr dünnen Wandstärke während Anaerobiose aus der Atmosphäre bzw. dem umgebenden Medium per diffusionem mit Sauerstoff versorgt werden. Somit könnte auch in Ischämie in einem Teil des Myokards Aerobiose persistieren.
3. Bezogen auf das Myokardfaservolumen ist die Kapillarisierung in Kleintierherzen erheblich höher als im Myokard von Hund oder Mensch. Gewichtskorrigiert identische Flußraten an kardioplegischer Lösung wie auch an Reperfusionsmedium erreichen das Myokard von Ratte und Hund somit in unterschiedlicher Dosierung. Damit sind Ergebnisse von diesen Spezies nicht vergleichbar.
4.  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs- und Transporteigenschaften des myokardialen Sarkolemmes der Ratte scheinen weder qualitativ noch quantitativ mit denjenigen des Hundes vergleichbar, während menschliches myokardiales Sarkolemm große Ähnlichkeiten mit dem des Hundes aufweist. Da der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase aber eine zentrale Rolle in der Pathogenese des ischämischen Myokardschadens [37, 80, 91] sowie des Reperfusionsschadens [6, 66, 72,

74, 75, 76, 77] zukommt, ist die Verwendung der Ratte als Versuchstier hinsichtlich dieser Fragestellung nicht sinnvoll [30].

Aus den genannten Gründen folgt, daß Erkenntnisse aus Rattenherzen nur sehr bedingt auf den Menschen übertragbar sind. Demgegenüber scheinen die Verhältnisse im Myokard des Hundes denjenigen des Menschen in allen hier relevanten Gesichtspunkten vergleichbar. Die Ischämietoleranz des menschlichen Herzens ist dabei eher etwas größer als die des Hundes, woraus sich eine Sicherheitsspanne ergibt, die angesichts der klinisch in der Regel eingeschränkten Qualität der zur Verfügung stehenden Herzen sowieso zu fordern ist.

#### 4.1.2 Das Langendorff-Modell

Dem vorliegenden Versuchsaufbau liegt das von Langendorff 1895 erstmals beschriebene Prinzip der retrograden Perfusion der Aortenwurzel zugrunde [53].

Der Vorteil der Betrachtung des isolierten Herzens ist die klare Definierbarkeit. Die Interpretation energetischer, metabolischer und funktioneller Parameter wird vereinfacht dadurch, daß systemische Einflußfaktoren nicht berücksichtigt werden müssen. Der wesentliche Nachteil liegt darin, daß das bei uns verwendete Modell des leer schlagenden Herzens nur bedingt mit den Verhältnissen im intakten Kreislauf vergleichbar ist, etwa weil die physiologische Vorlast fehlt. Das Langendorff-Herz leistet somit im wesentlichen Druckarbeit anstelle der ökonomischeren und physiologischeren Volumenarbeit [30]. Aus diesem Grund dürften die Ergebnisse tendentiell eher zu ungünstig ausfallen, wodurch sich eine gewisse Sicherheitsmarge ergibt. Die Indikatoren der funktionellen Entwicklung müssen, zumindest was ihre Absolutwerte angeht, mit Vorsicht interpretiert werden. Die qualitative Aussagekraft der Methode sollte dadurch aber nicht beeinträchtigt sein.

#### 4.1.3 Verwendung saliner Lösungen

Die **O<sub>2</sub>-Transportkapazität** saliner Lösungen ist auf den physikalisch gelösten Anteil beschränkt, der etwa 1,5% der im arteriellen Blut transportierten Menge ausmacht. Damit läßt sich der Bedarf eines leer schlagenden Herzens decken, bei Untersuchungen unter den Lastverhältnissen des intakten Kreislaufs oder unter pharmakologischer Stimulation kommt das Modell allerdings an seine Grenzen. Zur adäquaten Versorgung des Herzens sind jedoch je nach Erholungsausmaß dabei hohe Perfusionsflüsse erforderlich. Da außerdem saline Lösungen per se keine Kolloide enthalten, besteht das Risiko eines interstitiellen Ödems. Aus diesem Grund wurde der Reperfusionslösung 2 Dextran (2%) zugesetzt, wodurch sich ein KOD von ca. 15 mmHg ergab.

Die Konzentration des **ionisierten Ca<sup>2+</sup>** in der proteinfreien Reperfusionslösung liegt bis zu Faktor 2 über der physiologischen extrazellulären Konzentration. Das genaue Ausmaß ist dabei abhängig von der Ca<sup>2+</sup>-Bindung an Dextran. Da die Ca<sup>2+</sup>-Homöostase eine kritische Größe des Reperfusionsschadens ist [6, 66, 72, 74, 75, 76, 77], insbesondere bei Ca<sup>2+</sup>-Einführung nach Ca<sup>2+</sup>-freier Perfusion [67, 75], kommt diesem Parameter eine besondere Bedeutung zu.

Ein Vorteil der Verwendung saliner Lösungen, sowohl in der kardioplegischen Perfusion als auch während der Reperfusion, ist die Möglichkeit, Einflüsse potentiell schädlicher **Blutbestandteile** auf das Modell auszuschließen. So spielen Adhäsion und Degranulation polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) eine wichtige Rolle in der Entstehung des Reperfusionsschadens. Unter den durch PMNs freigesetzten bioaktiven Substanzen befinden sich die Proteasen Elastase und Kollagenase (Schädigung der Gefäßwände, Veränderung der Ladungsverteilung auf Membranen), Plättchen-aktivierender Faktor (PAF, bewirkt Neutrophil-Endothel-Interaktion, vermittelt pro-apoptotische Effekte), Leukotriene (chemotaktische proinflammatorische Substanzen, erhöhen Gefäßpermeabilität und bewirken interstitielles Ödem), insbesondere die stabile Form  $LT_{B4}$  (direkter negativ-inotroper Effekt, potenter Induktor ventrikulärer Arrhythmien) [45]. Auch Thrombozyten und Lymphozyten konnten ähnliche Effekte nachgewiesen werden. Gleichzeitig fehlt in einer salinen Lösung der protektive Effekt von Glutathion im Redoxsystem und die günstige Funktion der Erythrozyten als Scavenger freier Radikale, Sauerstofftransporter und Puffer. All diese Charakteristika der salinen Perfusion bedeuten eine schlechtere Übertragbarkeit in den klinischen Kontext.

## 4.2 Problemdefinitionen

Im folgenden sind die Problembereiche orientierend aufgeführt, die in dem vorliegenden Modell von grundlegender Bedeutung für den Prozeß der Myokardprotektion sind. Sie lassen sich nicht streng gegeneinander abgrenzen.

### 4.2.1 Hypothermie

**HTK-Perfusion** Während der kardioplegischen HTK-Perfusion wird das Herz von 37°C auf 5°C abgekühlt. Gleichzeitig verschieben sich die Elektrolytverhältnisse im Extrazellulärraum aufgrund der Äquilibration mit HTK-Lösung von physiologischen Konzentrationen hin zu denen des Kardioplegikums. Der zeitliche Verlauf dieser Veränderungen läßt sich aus den Bilanzen abschätzen, nicht aber deren (In)Homogenität im gesamten Myokard, so daß in dieser Phase im Detail Unklarheiten bezüglich der extrazellulären Elektrolytverhältnisse bestehen bleiben.

Da die HTK-Perfusion nicht zu einer Depolarisierung des Sarkolemmes führt, erfahren die Ionenkonzentrationen im intrazellulären Kompartiment primär keine Veränderungen. Erst durch die in Kälte zunehmende Inhibierung der Membranenzyme ( $Na^+K^+$ -ATPase, SR- $Ca^{2+}$ -Pumpe,  $Na^+Ca^{2+}$ -Tauscher u.a.) und die unphysiologischen extrazellulären Elektrolytkonzentrationen dürften auch intrazelluläre Verhältnisse leicht von der Norm abweichen.

**Ischämie** Während der Ischämie wurden die Herzen je nach Versuchsprotokoll hypotherm bei 5°C, 10°C oder 15°C gelagert. In dieser Phase dürften extrazellulär weitgehend HTK-Bedingungen geherrscht haben. Zunehmende Azidose und Energiemangel durch Anaerobiose und eingeschränkte Membranfunktionen in Kälte könnten zu gewissen Elektrolytverschiebungen intra- ↔ extrazellulär gemäß den Konzentrationsgradienten führen. Wegen des stark abgesenkten Ge-

haltes der HTK-Lösung an Natrium und Calcium bestand ein nennenswerter Gradient allerdings nur für Kalium, aber auch dieser war gegenüber physiologischen Verhältnissen stark reduziert.

**Reperfusion** Mit Beginn der Reperfusion erfolgte die Wiedererwärmung des Herzens. Meist wurde im koronarvenösen Effluat eine Temperatur von 35°C nach 4-5 Minuten erreicht. Man kann davon ausgehen, daß extrazelluläre Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in den ersten Minuten der Reperfusion schnell ansteigen, bei noch deutlicher Hypothermie des Myokards. Da die Permeabilität des Sarkolemmes in Kälte erhöht ist, gleichzeitig die membrangebundenen ATPasen durch Hypothermie und Fortdauer von Energiedefizit und Azidose behindert sind, besteht in dieser Phase ein hohes Risiko der intrazellulären Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Überladung.

### 4.2.2 Hypoxie

**HTK-Perfusion** Die (saline) kardioplegische HTK-Lösung hatte einen pO<sub>2</sub> von etwa 250 mmHg bei 37°C. Ob damit eine adäquate Versorgung des Myokards mit Sauerstoff möglich ist, hängt im wesentlichen davon ab, wie hoch der präischämische Energieverbrauch war und wie schnell dieser durch die Kardioplegie gesenkt wird. Dabei können die O<sub>2</sub>-Reserven des Gewebes (an Myoglobin gebunden und physikalisch gelöst) einen kurzfristigen O<sub>2</sub>-Mangel abfedern.

Eine passagere Sauerstoff-Minderversorgung im Vergleich zum Bedarf des Myokards ist zu Beginn der konservierenden Perfusion in einigen Versuchen nicht auszuschließen, eine initiale erhöhte Laktatfreisetzung und ein stark erniedrigter koronarvenöser pO<sub>2</sub> weisen darauf hin. Ab der 2.-3. Minute der kardioplegischen Perfusion kann man aber in allen Versuchen von einem suffizient aeroben Stoffwechsel ausgehen (vgl. Kap. 3.1.1, S. 21).

Nach den Ergebnissen von Brachmanski et al. [11] muß man allerdings auch im weiteren Verlauf der HTK-Perfusion (regionale) Hypoxien vermuten. In ihren Experimenten an Meerschweinchen beobachtete sie u.a. den Verlauf des intrazellulären NADH-Spiegels während kardioplegischer Perfusion mit HTK (pO<sub>2</sub> ≈ 150 mmHg) als Indikator für zelluläre Hypoxie. Dabei fanden sie einen NADH-Anstieg schon nach dem letzten Herzschlag, ca. 1-2 min nach Beginn der HTK-Perfusion. Offenbar ist nicht nur ein adäquater Sauerstoffgehalt des Perfusionsmediums, sondern auch die rhythmischen Druckveränderungen im myokardialen Gewebe für die homogene Perfusion aller Myozyten notwendig.

**Ischämie** In der folgenden 8- bzw. 10-stündigen Ischämie entfällt neben der Oxygenierungsfunktion einer Perfusionslösung auch deren Spüleffekt.

**Reperfusion** Anschließend sind in der beginnenden Reperfusion hypoxische Zustände in bestimmten Arealen des Myokards durch Inhomogenitäten der Perfusion denkbar. Im weiteren Verlauf könnte bei hoher Stoffwechselaktivität des Myokards die O<sub>2</sub>-Transportkapazität der salinen Lösung limitierend werden. Insbesondere das in der Perfusion nachgeschaltete subendokardiale Myokard ist hierbei als sog. letzte Wiese gefährdet.



### 4.2.3 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase

Bei der Aufrechterhaltung physiologischer intrazellulärer Elektrolytverhältnisse, und damit des Membranpotentials, kommt der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase eine Schlüsselrolle zu.

In hypothermer Ischämie schränken Energiemangel und die tiefen Temperaturen die Aktivität dieser Membranpumpe ein. Gleichzeitig ist aber der transsarkolemmale Gradient für Na<sup>+</sup> fast aufgehoben (12:1 → 1,25:1), der für K<sup>+</sup> stark reduziert (1:40 → 1:16). So wird das Risiko nennenswerter Elektrolytverschiebungen nach intrazellulär reduziert. Die Gefahr einer Ca<sup>2+</sup>-Überladung des Zytosols von extrazellulär infolge eines invers operierenden Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-Tauschers (NCX) bei erhöhtem intrazellulären [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub> wird durch die nominell Ca<sup>2+</sup>-freie HTK-Perfusion verringert.

Zu Beginn der Reperfusion allerdings steigt das Risiko gravierender Elektrolytverschiebungen mit zunehmender Angleichung der extrazellulären Ionenkonzentrationen an die physiologische Norm. Dem gegenüber steht eine über etwa 4-6 min reduzierte Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Pumpe. In den ersten Minuten wird dieses Enzym noch durch die ungenügende Erwärmung gehemmt, danach könnten ein eventuell fortbestehendes Energiedefizit und Azidose inhibierend wirken.

### 4.2.4 Ca<sup>2+</sup>-Homöostase

Hierbei gelten prinzipiell ähnliche Limitationen wie die eben genannten. Während hypothermer Ischämie erfolgt im unprotektionierten Myokard eine gravierende Ca<sup>2+</sup>-Überladung des Zytosols. Das ergibt sich aus der Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und dem konsekutiven Verfall des negativen ( $\approx -90$  mV) Membranpotentials in Richtung der Aktivierungsschwelle der kardialen spannungsgesteuerten L-Typ-Ca<sup>2+</sup>-Kanäle ( $\approx -30$  mV). Bei Protektion mit HTK-Lösung, die nominell Ca<sup>2+</sup>-frei ist, treten diese Verschiebungen zwar retardiert und quantitativ abgeschwächt auf, sind aber doch größer als Null, weil ein Teil des intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs durch Verschiebungen aus dem SR und geringere Proteinbindung in Azidose resultiert [11].

Während Reperfusion erfolgt die zelluläre Ca<sup>2+</sup>-Überladung bei Einführung eines normocalcämischen Mediums allerdings in größerem Ausmaß. Energiemangel und Azidose inhibieren die Ca<sup>2+</sup>-ausschleusenden Systeme, als Folge steigt die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration des Zytosols und konsekutiv der Mitochondrien, wo Ca<sup>2+</sup> die oxidative Phosphorylierung entkoppeln kann. Daraus resultiert letztendlich eine gestörte Funktion des Myozyten. Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Messungen bestätigen diesen Verlauf [11].

## 4.3 Homöostase von Natrium und Kalium

Die sarkolemmale Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase nimmt eine zentrale Stellung in der Aufrechterhaltung physiologischer intrazellulärer Elektrolytkonzentrationen und des Membranpotentials ein. Der aktive Transport von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> geschieht gegen einen Konzentrationsgradienten von etwa 12:1 (Na<sup>+</sup>) bzw. 1:40 (K<sup>+</sup>). Bei ungenügender Aktivität der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase gleichen sich die Konzentrations-

unterschiede zwischen dem extra- und dem intrazellulären Raum an. Während HTK-Ischämie werden solche Ausgleichsbewegungen allerdings verlangsamt, weil die perfundierte HTK-Lösung<sup>1</sup> das Konzentrationsgefälle über das Sarkolemm für  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  aufhebt und für  $\text{K}^+$  auf etwa 1:16 verringert. Die Homöostase von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  ist folglich hauptsächlich ein Problem der beginnenden Reperfusion, wenn physiologische Elektrolytgradienten wiederhergestellt wurden, die Aktivität der Membranpumpe aber noch reduziert ist (ungenügende Erwärmung, Fortdauern von Energiemangel und Azidose).

### 4.3.1 Funktion und Regulation der $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

Die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, synonym  $\text{Na}^+$ -Pumpe, ist ein transmembranes Enzym in der Plasmamembran aller Säugetierzellen. In jedem Zyklus werden drei  $\text{Na}^+$ -Ionen aus der Zelle entfernt, zwei  $\text{K}^+$ -Ionen nach intrazellulär transportiert und ein ATP verbraucht, es fließt also ein repolarisierender Strom. Die Hauptaufgabe der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase ist die Aufrechterhaltung des hohen intrazellulären  $\text{K}^+$  und des niedrigen intrazellulären  $\text{Na}^+$ . Von den Konzentrationsgradienten dieser Elektrolyte sind viele Prozesse abhängig: die zelluläre Aufnahme von Nährstoffen und Aminosäuren, das osmotische Gleichgewicht und die Volumenregulation der Zellen, die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase (über den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Tauscher NCX), und die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung des Ruhe-Membranpotentials, um nur einige zu nennen. Die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase nimmt somit eine zentrale Stellung in der Regulation des zellulären Metabolismus ein. Dies verdeutlicht auch der hohe Energiekonsum dieser Pumpe, der im ruhenden Herzen mit 5-40% [22] und im schlagenden mit 10-20% [32] des zellulären Energieverbrauchs angegeben wird.

Daher ist es nicht verwunderlich, daß die Regulation des Enzyms ähnlich vielfältig ist wie seine Wirkungen. Hohes  $[\text{K}^+]_e$  ist der stärkste Aktivator der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. Neben der ATP-Abhängigkeit wird sie auch durch ihren Phosphorylierungszustand reguliert. Katecholamine (über  $\beta$ -Rezeptoren) hemmen die Aktivität über reversible Phosphorylierung [56]. Einfluß besteht ferner durch die Neurotransmitter Dopamin (inhibitorisch) und Noradrenalin (über  $\alpha$ -Rezeptoren, stimulatorisch), endogene Ouabain- und Digoxin-ähnliche Substanzen (inhibitorisch) und reaktive  $\text{O}_2$ -Spezies (ROS) im oxidativen Streß, etwa in der postischämischen Reperfusion (inhibitorisch). Die Ionenverteilung über die Membran spielt ebenso eine wichtige Rolle. Hohes extrazelluläres  $\text{K}^+$  kann etwa die Pumpe aktivieren. Längerfristig wird die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase auf Ebene der Genexpression durch Insulin, Schilddrüsenhormone und Aldosteron reguliert [112].

Veränderungen der Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese insbesondere von kardiovaskulären, neurologischen, renalen und metabolischen Krankheiten. Dabei wird immer eine Downregulation der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase beobachtet [82, 112]. Der Einfluß der Hypothermie auf den Funktionszustand der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase ist immer inhibitorisch, in seinem Ausmaß aber in verschiedenen Geweben unterschiedlich [56, 59]. Der inhibitorische Effekt von Ischämie und Hypoxie besteht in dem Energiedefizit, der Freisetzung endogener Inhibitoren der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase und einem ROS-Anstieg in der nach-

<sup>1</sup>zur Zusammensetzung vgl. Tab. 2.1, S. 10

folgenden O<sub>2</sub>-haltigen Reperfusion [112]. Diese pathologischen Zustände werden in den folgenden Kapiteln detaillierter diskutiert.

### 4.3.2 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in Hypothermie

In Hypothermie werden Stoffwechselprozesse umso stärker verlangsamt, je höher ihre Aktivierungsenergie ist. Stoffwechselschritte mit hoher Aktivierungsenergie sind zum Beispiel viele (energieliefernde) Phosphorylierungsreaktionen. Sie werden nach Van't Hoffs Gesetz pro 10 K Abkühlung etwa um den Faktor 2-3 verlangsamt. Hingegen haben viele passive Diffusionsvorgänge sehr geringe Aktivierungsenergien, laufen folglich nach der Arrhenius-Gleichung in Hypothermie nur wenig langsamer ab. Das bezeichnet man als die heterogene Kälteantwort eines biologischen Gewebes.

Der Translokationsprozeß der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase hat als ATP-spaltende Reaktion eine hohe Aktivierungsenergie. Somit weist ihre Aktivität eine hohe Temperaturabhängigkeit auf. Darüber hinaus besteht auch eine Abhängigkeit vom Gewebetyp. Schon 1977 postulierten Tyers und Kollegen [101], daß bei Temperaturen <10°C kardiale ATPasen geschädigt sein könnten. Martin et al. [59] zeigten, daß in der Leber bei <20° und im Herzmuskel bei 10°C keine Aktivität der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-Pumpe mehr nachweisbar ist, im Gegensatz zur Niere, die bei dieser Temperatur noch (reduzierte) Aktivität aufweist. Einen ATP-Mangel als Ursache dafür konnten sie ausschließen, dieser würde außerdem vorrangig die wärmeren Gruppen betreffen. Eine Erklärung hierfür kann sein, daß schon in Normothermie die Aktivität des Enzyms in der Niere mindestens 5-fach höher liegt als in Leber, Herz oder Skelettmuskel [56, 59]. Das mag an einem dichteren Enzymbesatz oder an veränderter Kinetik des renalen Isoenzym liegen und vielleicht die bessere Hypothermie-Toleranz der Nieren erklären.

Im Gegensatz zur Na<sup>+</sup>-Pumpe werden passive Diffusionsvorgänge in tiefer Hypothermie wesentlich weniger stark gehemmt. Passiver K<sup>+</sup>-Efflux und Na<sup>+</sup>-Influx persistieren auch in Kälte, wenn die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase, die für den Rücktransport dieser Ionen zuständig wäre, ihre Funktion längst aufgegeben hat. Dadurch kommt es zum zellulären K<sup>+</sup>-Verlust, der bis zu 85% in 10-15 Stunden ausmacht [69, 111]. Auch wenn diese Versuche in Normothermie stattfanden und die Blockade der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase durch Ouabain erreicht wurde, ist abzu-sehen, welche Elektrolytveränderungen die Zelle im Extremfall erleben könnte, sollte die Aktivität der Na<sup>+</sup>-Pumpe bei <10°C vollständig sistieren. Durch Zugabe des K<sup>+</sup>-Kanalblockers Tetraethylammonium (TEA) wurde ein K<sup>+</sup>-Verlust in diesen Versuchen nahezu verhindert. Auch eine Erhöhung der extrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration (25 mmol/L) reduzierte den K<sup>+</sup>-Efflux aufgrund des geringeren Konzentrationsgradienten.

#### 4.3.2.1 Hypothermie in winterschlafenden Spezies: Besonderheiten der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

In Bezug auf die Funktion der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase und die Regulation des Elektrolythaushaltes gibt es einige bedeutende Unterschiede zwischen winterschlafenden Homöothermen und nicht winterschlafenden Spezies. Zum einen ist das Enzym bei Winterschläfern kälteresistenter. Vergleichbare Temperaturabfälle hemmen

die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in Geweben von Winterschläfern weniger stark als die von Nicht-Winterschläfern. Winterschläfer können somit eine größere relative Aktivität dieser Pumpe in Hypothermie bewahren [17, 59]. Dabei ist diese reduzierte Kälteantwort beim Winterschläfer im Ausmaß organabhängig unterschiedlich. Während die Enzymaktivität in Niere, Leber und Skelettmuskel bei  $3,5^\circ\text{C}$  noch 40-60% der Werte in Euthermie beträgt (im Vergleich zu etwa 12% bei nicht-winterschlafenden Spezies), ist sie im Herzen und in intestinalen Epithelzellen auch bei dieser tiefen Hypothermie gegenüber Normothermie nicht (!) reduziert [17, 56]. Die Hemmung der Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe geschieht bei Winterschläfern durch reversible Phosphorylierung und dadurch veränderte Substrataffinität. Dephosphorylierung ist eine sehr schnelle Art, bei den regelmäßigen Phasen des Aufwachens (periodic arousal) jederzeit die normale Funktion und thermogenetische Rolle der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe in allen Geweben zu reaktivieren.

Neben der überraschend hohen Kapazität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe in Hypothermie treten auch die bei Kälte vergleichsweise großen Lecks für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  in den Membranen von nicht-winterschlafenden Spezies bei Winterschläfern nicht auf [17]. Dies sind Hinweise darauf, daß der Hypothermiezustand bei Winterschläfern keine passive Kälteantwort der Gewebe, sondern einen geregelten Zustand darstellt, die sog. 2. Homöothermie. Dabei werden offenbar Prozesse, die für die Funktionsfähigkeit der Zelle notwendig sind, weniger kältesensitiv geregelt, auch wenn das mit einem höheren Energieverbrauch (etwa verstärkte ATP-Hydrolyse durch höhere Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in Kälte) einhergeht.

Ein weiterer protektiver Mechanismus des Winterschlafs, wahrscheinlich über denselben Effektorweg wie die ischämische Präkonditionierung, ist die Öffnung des ATP-abhängigen  $\text{K}^+$ -Kanals, wahrscheinlich (auch) in der mitochondrialen Membran [48]. Offensichtlich ist der Erhalt des physiologischen Membranpotentials ein zentrales Element im Hibernating. Dadurch bleiben das Ionenmilieu intakt und insbesondere kontraktile Zellen in Hypothermie funktionsfähig. Voraussetzung ist natürlich der ausreichende Ionentransport durch die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, die so einen zusätzlich repolarisierenden Strom erzeugt. Durch das Membranpotential wird auch einer Calciumüberladung der Zelle vorgebeugt, die durch Enzymaktivierung ihrerseits den Energieverbrauch steigern würde. So macht sich der Energieaufwand der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase zum Teil wieder bezahlt.

### 4.3.3 Ischämie - Reperfusion

Ischämie ist ein potenter Inhibitor der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase. So konnte im Gehirn nach 30-minütiger Ischämie eine Reduktion der Aktivität der  $\text{Na}^+$ -Pumpe um bis zu 40% nachgewiesen werden, nachfolgend wurde auch eine Abnahme des intrazellulären  $\text{K}^+$  beobachtet [54, 63]. Ähnliche Veränderungen ergaben sich auch in hypoglykämischen und epileptischen Episoden, nach Gabe von Glutamat-Agonisten (excitotoxicity) und bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen [51, 54]. Darüber hinaus ist die spezifische mRNA im Zytosol verringert. Das ist ein Hinweis, daß nicht nur der Aktivitätslevel, sondern auch die Transkriptionsrate der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase unter diesen Bedingungen vermindert ist [18].

Ischämie und Hypoxie führen (a) zu einem zellulären Energiemangel, (b)

zur vermehrten Produktion von ROS in einer nachfolgenden Reperfusion [40, 45, 55] und (c) zur Freisetzung endogener Inhibitoren der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, etwa (hypothalamischem) Digoxin [51]. Alle drei Mechanismen resultieren in einer Inhibition der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase und stellen eine Verbindung dar zwischen Ischämie und dem reduzierten Aktivitätszustand der Membranpumpe.

#### 4.3.4 Auswirkungen reduzierter Aktivität der $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase

Aufgrund der zentralen Stellung in vielen zellulären Prozessen ist bei einer in Ischämie und Hypothermie eingeschränkten oder gar aufgehobenen Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase mit weitreichenden Konsequenzen zu rechnen.

Bedeutende Veränderungen ergeben sich für das Ionenmilieu. Eine in Hypothermie behinderte  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität bei weitgehend normalem  $\text{K}^+$ -Efflux bewirkt signifikante intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Verarmung. Die HTK-Protektion wirkt dem mit seinem hohen  $[\text{K}^+]_i$ -Gehalt entgegen. In der beginnenden Reperfusion dürfte dieser Effekt allerdings deutlicher werden, weil dann der physiologische  $\text{K}^+$  Gradient von etwa 40:1 über das Sarkolemm wiederhergestellt ist. Neuere Studien [9, 10, 38, 64, 113] belegen, daß reduziertes intrazelluläres  $\text{K}^+$  eine notwendige und oftmals allein ausreichende Bedingung zur Induktion von Apoptose ist. Da Ionen, insbesondere  $\text{K}^+$ , die Aktivität einiger apoptotischer Enzyme, unter anderem Nukleasen, hemmen, ist der dramatische Kaliumefflux nicht sekundäre Folge des Schrumpfungsprozesses in Apoptose, sondern dessen Auslöser. Physiologisches intrazelluläres  $\text{K}^+$  hingegen inhibiert Nukleasen direkt und vollständig [38].

Reduziertes  $[\text{K}^+]_i$  kann somit einige apoptotische Prozesse wie Abnahme des Zellvolumens, Caspase-3-Aktivierung, mitochondriale Cytochrom-C-Freisetzung und Aktivierung von Endonukleasen initiieren. Eine gleichzeitige Blockade des  $\text{K}^+$ -Kanals mit TEA verhindert all diese Effekte [111]. Da die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase allein das hohe intrazelluläre  $\text{K}^+$  aufrecht hält, droht bei Hemmung des Enzyms in Hypothermie und Ischämie die Apoptose [69, 111].

Eine weitere Folge reduzierter Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase ist zumindest bei physiologischem extrazellulären  $\text{Na}^+$  die Überladung der Zelle mit  $\text{Na}^+$ . Dadurch werden die durch den  $\text{Na}^+$ -Gradient angetriebenen Transportprozesse für Nährstoffe und Aminosäuren verlangsamt. Darunter fällt auch der  $3\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Tauscher (NCX), der dann weniger Calcium aus dem Zytosol eliminiert. Die Calciumüberladung der Zelle ergibt sich auch über eine Aktivierung der spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle [111]. Denn durch den Verfall der Gradienten von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  sinkt auch das Ruhemembranpotential ab. Überhöhtes  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöht den Energieverbrauch der Zelle durch Aktivierung von Enzymen und des kontraktilen Systems. Das mündet in nekrotischem Zelltod [20].

Bei Blockade der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase mit Ouabain konnte gezeigt werden, daß durch gleichzeitige Hemmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals mit Nifedipin der Umfang des Zelltods reduziert werden kann, ohne daß die ablaufenden apoptotischen Prozesse beeinflußt wurden [112, 111]. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, daß eine ungenügende Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -Pumpe zum Zelltod durch sowohl apoptotische als auch nekrotische Vorgänge, dem sogenannten hybriden Zelltod, führt.

Mit dem Verlust physiologischer Ionenkonzentrationen sind auch osmotische

Balance und Volumenregulation der Zelle gestört. Verfällt das Membranpotential, schwillt die Zelle aufgrund des passiven Chlorideinstroms. Etwa 30 Minuten nach Hemmung der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase durch Ouabain beginnt die Schwellung, mit einem Maximum nach 1-2 Stunden. Die Zellschwellung kompromittiert die Sauerstoff- und Nährstoffdiffusion. Danach verliert die Zelle kontinuierlich an Volumen als Ausdruck der einsetzenden Apoptose [111].

**Zusammenfassung** Die Reduktion der Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase durch Hypothermie, Ischämie oder andere pathologische Vorgänge hat folgende Konsequenzen:

- Verlust der physiologischen Ionenbalancen für  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$ .
- Darauf hin verfällt das Membranpotential, die Zelle und konsekutiv auch die Mitochondrien werden mit  $\text{Ca}^{2+}$  überladen.
- Verlust der Fähigkeit zur Osmoregulation und Zellschwellung. Die behinderte  $\text{O}_2$ -Diffusion bewirkt ein Energiedefizit.
- Apoptotische und nekrotische Prozesse werden initiiert und münden im Zelluntergang.

#### 4.3.5 Eigene Ergebnisse

In den vorliegenden Versuchen werden die zu erwartenden Veränderungen in hypothermer Ischämie – intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -/ $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung,  $\text{K}^+$ -Verlust, Apoptose – in ihrem Ausmaß reduziert sein, weil (a) die HTK-Lösung mit dem unphysiologischen Ionengehalt die Elektrolyt-Gradienten über die Membran abschwächt und Ausgleichsbewegungen hemmt, und (b), weil die tiefe Hypothermie Diffusionsbewegungen selbst verlangsamt. Obwohl die Lösung nominell calciumfrei ist, muß man nach Brachmanski et al. [11] in Ischämie doch mit einem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg rechnen, wenngleich dieser gegenüber einer stop-flow-Ischämie (mit ausgeprägter Azidoseentwicklung) deutlich verzögert auftritt. Trotzdem müßten Veränderungen, die sich auf ungenügende Funktion der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase zurückführen lassen, am ehesten in der Reperfusion zu beobachten sein, weil dann nach Wiederherstellung physiologischer Ionengradienten sofort  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung und Zellschwellung mit konsekutiver Einschränkung des aeroben Stoffwechsels drohen.

In der Reperfusion weisen die Herzen tatsächlich nach 480' Ischämie bei  $5^\circ\text{C}$  in den ersten 10 Minuten die größte Calciumaufnahme auf (vgl. Abb. 3.18, S. 37). Das läßt sich als Hinweis verstehen, daß bei dieser Temperatur die  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase gehemmt war, weswegen die Gradienten für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  verfielen und sich damit das negative Membranpotential in Richtung auf 0 mV hin abschwächte. In Reperfusion stellen dann die spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und der ausgebremste oder invers operierende NCX die Mechanismen für die Calcium-(Über)ladung der Zelle dar. Nach 600' Ischämie weist die  $15^\circ\text{C}$ -Gruppe eine noch höhere initiale Ca-Beladung in Reperfusion auf. Auch hier kommt die Hemmung der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase als Ursache in Betracht, wenn auch nicht primär durch die Temperatur, sondern vielmehr durch den ATP-Mangel. Am Ende

der Ischämie lag [ATP] in dieser Gruppe bei etwa 10 mmol/L, ca. 33% des Normalwertes. Aus diesem Blickwinkel erscheint die 10°C-Gruppe die beste Wahl, ein Mittelweg zwischen ATP-Konservierung (kälter) und weniger Inhibition der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-Pumpe (wärmer).

Ein weiterer Indikator einer ungenügenden Aktivität der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase wäre ein erhöhter K<sup>+</sup>-Verlust des Gewebes zu Beginn der Reperfusion. Da modellbedingt die erste Probenentnahme nach einer Minute stattfand, muß man davon ausgehen, dabei das Maximum der K<sup>+</sup>-Freisetzung verpaßt zu haben. Die Tatsache, daß alle Versuche ab der 2. oder 3. Minute bis etwa zur 10. Minute Kalium netto aufnehmen, zeigt, daß die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-Pumpe in allen Gruppen ihre Aktivität in Reperfusion schnell wiederaufnimmt. Die Menge der Aufnahme ist nach 5 bzw. 15°C-Lagerung deutlich geringer als nach 10°C. Hier kann man wiederum eine Inhibition der ATPase durch die noch ungenügende Erwärmung (nach 5°C) bzw. den ATP-Mangel (nach 15°C) vermuten. Im weiteren Verlauf der Reperfusion weisen nur die 10°C-Herzen eine ausgeglichene K<sup>+</sup>-Bilanz auf. In den anderen Gruppen deutet die kontinuierliche K<sup>+</sup>-Ausschwemmung ab der 10. Minute darauf hin, daß die Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-Pumpe entscheidend beeinträchtigt war. Das weist auf einen Energiemangel infolge eines insuffizienten aeroben Metabolismus hin. Dafür sprechen auch die deutlich größere initiale Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme der Zellen, der stark erhöhte koronare Widerstand, der aus einem Ödem resultieren könnte, welches die O<sub>2</sub>-Diffusion einschränkt, und die im Schnitt geringere O<sub>2</sub>-Utilisation des Gewebes.

Eine ähnliche Aussage ergibt sich aus den Bilanzen für Na<sup>+</sup> nach 10h Ischämie. In den ersten 20 Minuten der Reperfusion zeigen sie keine signifikanten Unterschiede. Danach weisen die 10°C-Herzen eine ausgeglichene Bilanz auf, während die beiden anderen Gruppen kontinuierlich Na<sup>+</sup> aufnehmen. Die Werte der 8h-Gruppen sind in diesem Punkt inhomogen und weisen eine hohe Streubreite auf.

#### 4.3.6 Schlußfolgerung

Die Physiologie des Winterschlafs lehrt, daß die Aufrechterhaltung des Membranpotentials Vorrang hat vor unbedingter Minimierung des Energieverbrauches. Aus diesem Grund ist die gute energetische Bilanz der Ischämie bei 5°C durchaus kritisch zu sehen, weil bei dieser Temperatur eine Funktion der membrangebundenen ATPasen nicht mehr nachweisbar ist. Aus Sicht der Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase sind wärmere Temperaturen vorteilhaft, limitiert durch den schnelleren ATP-Verfall, der die Aktivität des Enzyms ebenso reduzieren kann.

Die Ergebnisse belegen, daß nach einer Ischämie bei 5°C und bei 15°C die Homöostase von Na<sup>+</sup> und K<sup>+</sup> deutlich gestört ist, sowohl als direkte Auswirkung der Ischämie zu Beginn der Reperfusion, als auch als indirekte Auswirkung in Form einer ungenügenden metabolischen Erholung der Myozyten im weiteren Verlauf der Reperfusion.

## 4.4 Calcium-Homöostase

### 4.4.1 Einige physiologische Grundlagen

Die Calcium-Konzentration im Zytosol und in der mitochondrialen Matrix stellt eine zentrale Schaltstelle dar in der Regulation des zellulären Metabolismus und der kontraktiven Funktion.  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert nicht nur den kontraktiven Apparat, sondern kann auch seine eigene Freisetzung aus dem SR fördern (Calcium induced Calcium release, CICR). Schon geringe Mengen an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  steigern im Mitochondrium die oxidative Phosphorylierung, und im Zytosol werden zahlreiche Phospholipasen und Proteasen durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert.

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Zytosol geschieht im Herzmuskel von extrazellulär über spannungsgesteuerte Kanäle im Sarkolemm (hauptsächlich L-Typ: Dihydropyridin-Rezeptor) und konsekutiv über in der Nähe lokalisierte Ryanodin-sensitive SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Bei erhöhtem intrazellulärem  $\text{Na}^+$ , etwa zu Beginn einer Depolarisation, trägt auch der  $3\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Tauscher (NCX) im reversed-mode zum  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle bei. Daneben existieren weitere, quantitativ weniger bedeutende Mechanismen.

Die Entfernung des  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol geschieht hauptsächlich über folgende vier Transportsysteme: die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, der  $3\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Tauscher (NCX), die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe und den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter, wovon die beiden letzteren als langsamer Mechanismus betrachtet werden [80]. Nach Bers [5] liefert die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe mit 92% (Ratte) bzw. 70% (Kaninchen) den quantitativ bedeutendsten Beitrag zur Ausschleusung des Calciums in Normothermie, auf NCX entfallen immerhin 7% (Ratte) bzw. 28% (Kaninchen). Für den langsamen Mechanismus verbleiben die restlichen 1 bzw. 2%.

### 4.4.2 Einfluß von Hypothermie auf die Calcium-Homöostase

Hypothermie bewirkt in kontraktiven Zellen eine Zunahme der Inotropie. Schnelle Abkühlung unprotektionierten Muskelgewebes resultiert gar in der sog. Kältekontraktur. Allerdings sinkt mit zunehmender Hypothermie aufgrund einer geringeren Kanal-Leitfähigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ins Zytosol aus dem SR und von extrazellulär [37, 80]. Sitsapesan et. al [91] geben dafür einen  $Q_{10}$ -Wert von 1,5 an. Trotz der verlangsamten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Inaktivierung in Kälte und der damit verbundenen Verlängerung des Aktionspotentials bleibt die Summe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms von extrazellulär während eines Depolarisations-Vorganges auf 0 mV in Hypothermie erniedrigt [80]. Durch den geringeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom sollte man erwarten, daß auch die CICR-Antwort des SR geringer ausfällt. Darüber hinaus sinkt in Hypothermie die Sensitivität der Myofilamente für Calcium [80]. All diese Faktoren würden die Kontraktion bei tiefen Temperaturen eher verringern als erhöhen. Trotzdem nehmen Kontraktionskraft und  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente bei Depolarisation mit zunehmender Kälte zu.

Dafür lassen sich verschiedene Erklärungen finden.

1. Hypothermie steigert die Offenwahrscheinlichkeit und -dauer des kardialen SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals sowie den  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des SR [80, 91]. Nach der



Nernst'schen Gleichung ist das Gleichgewichtspotentials der Ionen von der absoluten Temperatur abhängig: Kälte bewirkt die sog. Kälte-depolarisation. Als Nettoeffekt einer Abkühlung auf 5°C ergibt sich dadurch trotz geringerer Leitfähigkeit ein signifikanter Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromes durch diesen Kanal. Erhöhtes  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöht seinerseits die Öffnungsfrequenz des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals [91]. Darüber hinaus steigt in Hypothermie infolge der Inhibition der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase auch das intrazelluläre  $\text{Na}^+$ , wodurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über den  $3\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Tauscher, der zu Beginn der Depolarisation im reverse-mode arbeitet, ansteigt. Die hypotherme Inotropie bleibt allerdings bestehen, wenn das SR durch Ryanodin blockiert wird [80]. Daher kann eine verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR allein die Zunahme der Inotropie in Hypothermie nicht ausreichend erklären. Allerdings zeigen die Ergebnisse von Feher et al. [26], daß die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung in Kälte nicht über den Ryanodin-sensitiven Weg, sondern vielmehr über die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase verläuft.

2. Alle  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsysteme sind in ihrer Aktivität temperaturabhängig und werden in Hypothermie zunehmend inhibiert. Für die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe finden sich  $Q_{10}$ -Werte zwischen 2,0 und 2,6 [37, 39, 52, 80], für NCX zwischen 1,7 und 2,5 [80] bzw. zwischen 2,2 und 4,0 [25]. Nach Puglisi et al. [80] hat die geringfügig niedrigere Temperaturabhängigkeit des NCX zur Folge, daß der Beitrag dieses Enzyms zur Relaxation in Hypothermie von 21% (35°C) auf 28% (25°C) steigt. Dem widersprechen allerdings die Ergebnisse von Marengo et al. und Wang et al. [58, 104], nach denen der NCX-Beitrag in Hypothermie durch dessen höheren  $Q_{10}$ -Wert sinkt. Durch die verlangsamte  $\text{Ca}^{2+}$ -Extrusion steigt die Transiente stärker an und bleibt länger auf einem hohen Niveau. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ausschleusenden Reaktionen werden in Hypothermie somit stärker verlangsamt als die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung mit ihrem  $Q_{10}$ -Wert von  $\approx 2$ . Dieser Unterschied leistet einen substantiellen Beitrag zur hypothermen Inotropie [15, 37, 80].
3. Hypothermie <10-20°C inhibiert die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (vgl. Kap. 4.3.2). Dadurch sinkt das Membranpotential, die Aufrechterhaltung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gleichgewichts wird zusätzlich erschwert [6, 66, 94].
4. Bei Temperaturen unter 18°C treten bei Membranlipiden Phasenwechsel auf, unter 10°C ist Lipidkristallisation möglich. Dadurch werden Membranen rupturgefährdeter und durchlässiger u.a. für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen [66, 94].

Ein direkter Effekt von Kälte auf die kontraktilen Proteine konnte ausgeschlossen werden [97].

Durch die präischämische Äquibrierung des Extrazellularraumes mit nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freier HTK-Lösung wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradient über das Sarkolemm deutlich verringert. So wiesen Brachmanski et al. [11] nach, daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle nach HTK-Perfusion deutlich verzögert und quantitativ in geringerem Maße erfolgt als während einer stop-flow-Ischämie. Dennoch stieg auch unter diesen Bedingungen das intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  kontinuierlich an.

Navas et al. [66] fanden heraus, daß der Hauptteil der  $\text{Ca}^{2+}$ -Akkumulation während hypothermer Hypoxie nicht in Hypothermie, sondern in der nachfolgenden Erwärmung erfolgte, und wesentlich deutlicher war als die Akkumulati-

on während und nach normothermer Hypoxie. Zu ähnlichen Aussagen kommen Sunamori et al. [94]. Analog dazu wiesen Bes und Kollegen [6] einen Anstieg der HSP70-mRNA als Indikator des zellulären Stresses ausschließlich in der Erwärmung nach hypothermer Ischämie nach. Das könnte damit zusammenhängen, daß auch die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung hauptsächlich in der Reperfusion erfolgt [67] und dann durch den in Erwärmung steigenden Stoffwechsel bei behinderter mitochondrialer Aktivität die Zelle dekompensiert, während Schäden in Hypothermie aufgrund des langsamen Stoffwechsels noch maskiert sind.

#### 4.4.3 Einfluß von Ischämie bzw. Anoxie auf die Calcium-Homöostase

Die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, der die größte Bedeutung in der Aufrechterhaltung intrazellulärer physiologischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zukommt, ist durch ihre direkte ATP-Abhängigkeit ischämiesensibel. Über den NCX ist die Homöostase des  $\text{Ca}^{2+}$  außerdem direkt an die des  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  gebunden und damit indirekt über die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase ebenfalls abhängig vom Energievorrat der Zelle. Der Anstieg des  $[\text{Na}]_i$  in Hypothermie und/oder Ischämie senkt die Auswärts-Aktivität des NCX ebenso wie ein geringes  $[\text{Na}]_e$ , wie es zum Beispiel durch die Verwendung von HTK-Lösung induziert wird [15, 80, 104]. Zusätzlich wird die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe durch das unter anaeroben Bedingungen verstärkt anfallende Laktat inhibiert [99]. Weil auch die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase abhängig ist vom Energiestatus der Zelle, sind während einer Ischämie alle Mechanismen, die einen substantiellen Beitrag zur zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase leisten können, in ihrer Aktivität eingeschränkt.

##### 4.4.3.1 Einfluß der Ischämie auf Mitochondrien

Unter physiologischen Bedingungen steigt  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei zellulärem Energiemangel, analog auch während einer Ischämie. Dadurch kommt es zur vermehrten Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien über einen ATP-unabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal, woraufhin deren Rephosphorylierungsaktivität steigt [29]. Auf diese Weise sind in Aerobiern gesteigerter metabolischer Bedarf und höherer Metabolismus der Mitochondrien gekoppelt. Ist das Mitochondrium allerdings mit  $\text{Ca}^{2+}$  überladen, werden oxidative Phosphorylierung entkoppelt und nekrotische und apoptotische Kaskaden aktiviert, die in den Zelltod münden [67, 29]. Hier ergeben sich Parallelen zum hybriden Zelltod bei Blockade der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase (vgl. Kap. 4.3.4). Die hohe Stoffwechsellpotenz des  $\text{Ca}^{2+}$  in den Mitochondrien wird verdeutlicht durch das im Vergleich mit dem Zytosol (100:1) sehr hohe Verhältnis von gebundenem zu freiem Calcium (4000-6000:1) [29]. Die Triebkraft für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die Mitochondrien ist deren negatives Membranpotential. Dabei fließt ein depolarisierender Strom, somit ist diese Aufnahme selbst-limitierend.

In normothermer Ischämie wird die starke  **$\text{Ca}^{2+}$ -Überladung** des Zytosols und konsekutiv der mitochondrialen Matrix verursacht durch das schwächer negative Membranpotential und die Insuffizienz  $\text{Ca}^{2+}$ -senkender Enzyme infolge ATP-Mangels. Nach Nayler [67] wird diese Überladung, die einen Anstieg des mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  in 1 Stunde normothermer Ischämie auf das 2,5-fache der

Norm bewirkt, abgeschwächt durch Hypothermie, die Applikation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Antagonisten und die Reduktion der extrazellulären Verfügbarkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ . Sowohl die postischämische Reperfusion als auch die Wiedereinführung von  $\text{Ca}^{2+}$  nach  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Perfusion bewirken hingegen einen signifikanten Anstieg im mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ . Als Gründe lassen sich hierfür wiederum der exzessive zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in der initialen Reperfusion und die Erholung des mitochondrialen Membranpotentials infolge beginnender Aerobiose nennen. Es folgt eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung mit Abfall des  $\text{O}_2$ -Verbrauches und der ATP-Produktion der Mitochondrien [67]. Durch diesen Energiemangel versagen die Mechanismen, die im Dienst der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase stehen.

Die **Abgabe von  $\text{Ca}^{2+}$**  aus den Mitochondrien geschieht unter anderem über den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Tauscher (NCX), einen  $\text{Na}^+$ -abhängigen Weg, und über einen  $\text{Na}^+$  unabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{nH}^+$ -Antiport (n wahrscheinlich  $>2$ ). Dabei scheint ersterer im Herzen der dominierende Mechanismus zu sein [29]. Da beide Prozesse (depolarisierend) elektrogen sind, wird der  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux über beide Wege gehemmt sein, wenn das transmitochondriale Membranpotential verfällt. Auch das zytosolische  $[\text{Na}^+]$  beeinflusst die Rate des  $\text{Ca}^{2+}$ -Effluxes aus den Mitochondrien. Sedova & Blatter [86] geben für Endothelzellen  $[\text{Na}^+]_i=4,4$  mmol/L für die halbmaximale Aktivierung des NCX an, bei  $[\text{Na}^+]_i=20$  mmol/L war der  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux maximal. Das würde bedeuten, daß schon bei physiologischen  $\text{Na}^+$ -Konzentrationen keine große Steigerung der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschleusung über NCX möglich ist und bei dem gesteigerten intrazellulären  $[\text{Na}^+]$  in Ischämie (durch geringe Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase) dieser Prozeß evtl. gesättigt ist. Hinzu kommt, daß in Ischämie durch den Verfall der Ionengradienten und die geringe (fehlende) Phosphorylierungsaktivität das transmitochondriale Membranpotential weit von seinen physiologischen -150 bis -180 mV entfernt sein kann. Dadurch fehlt eine wichtige Triebkraft für die Ausschleusung, allerdings auch für die Aufnahme, von  $\text{Ca}^{2+}$ .

Hieraus ergeben sich folgende Schlußfolgerungen:

1. In Ischämie bewirkt das ansteigende  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  eine höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung der Mitochondrien, das ansteigende  $[\text{Na}^+]_i$  wirkt durch Aktivierung des NCX dagegen. Letzterer Prozeß könnte aber aufgrund des niedrigen  $K_m$ -Wertes schnell an seine Grenzen stoßen.
2. Hypothermie könnte auf mitochondrialem Level  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux (NCX,  $Q_{10}=1,7-2,5$ ) und -Influx (Wege auf molekularem Niveau noch nicht identifiziert) in unterschiedlichem Maße hemmen.
3. Erst die Reperfusion, vor allem nach Ca-freier Perfusion, bewirkt einen deutlichen Anstieg des zytosolischen und mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$  bei deutlich behinderter aerober Phosphorylierungsaktivität.
4. Daraus resultiert ein in Reperfusion fortgesetzter zellulärer Energiemangel, der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase weiterhin behindert. Hohes zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  beschleunigt den Stoffwechsel und verschärft somit die Diskrepanz zwischen Energieangebot und -bedarf.

#### 4.4.3.2 Bedeutung der Azidose in Ischämie

Die in Ischämie auftretende Azidose senkt die Kontraktionskraft des Myokards und wirkt damit tendenziell der durch Hypothermie auftretenden Inotropie entgegen. Verursacht wird dieses Phänomen durch eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Desensitivierung des kontraktile Apparates, die Inhibition des Ryanodin-Rezeptors (und somit der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung, CICR) sowie den dadurch verursachten Anstieg in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR (obwohl auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR durch Azidose gehemmt wird) [21].

In Azidose folgt aus der Kausalkette  $[\text{H}^+]_i \uparrow \rightarrow \text{NHE} \uparrow \rightarrow [\text{Na}^+]_i \uparrow \rightarrow \text{NCX} \downarrow$  bzw. reversed  $\rightarrow [\text{Ca}^{2+}]_i \uparrow$ , daß ein Anstieg der Protonenkonzentration einen Anstieg in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR zur Folge hat. Dadurch kann sich die in Azidose initial abgeschwächte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente auch unter persistierender Azidose langsam erholen [21]. Diese Veränderungen ergeben sich auch, wenn in Hypothermie die Aktivität von NHE und NCX stark reduziert ist: Die Azidose inhibiert CICR, folglich sinkt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente und damit der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel. In der Folge wird weniger  $\text{Ca}^{2+}$  nach extrazellulär ausgeschleust, bei gleichbleibender  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, so daß sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration intrazellulär und konsekutiv auch im SR erhöht. Auf diese Weise stellt sich die alte Transiente dank eines erhöhten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts trotz inhibierten CICR wieder ein. Dabei bewirkt ein pH-Sprung von 7,25 auf 6,91 eine Verdopplung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts [21].

Diese Vorgänge laufen bei Rückkehr zum Norm-pH in entgegengesetzter Richtung ab. Sind CICR und Kontraktilität nicht mehr gehemmt, steigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente aufgrund der höheren SR-Beladung vorübergehend an, bis durch verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux nach extrazellulär das alte Gleichgewicht wiederhergestellt ist.

Da der  $\text{Ca}^{2+}$ -Metabolismus des SR eng an den der Mitochondrien gekoppelt ist [103], kann es ausgerechnet in der sensiblen frühen Phase der Reperfusion bei erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung durch das ER zur erhöhten Aufnahme in die Mitochondrien kommen und dort die oxidative Phosphorylierung kompromittieren [67].

#### 4.4.4 Besonderheiten der $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Hibernating

Winterschlafende Säugetiere sind in besonderem Maße fähig, in Hypothermie eine intakte  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase aufrechtzuerhalten. Dafür finden sich in diesen Spezies bestimmte Modifikationen relevanter Stoffwechselschritte.

So ist etwa die  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation überraschend hypothermieresistent. Eine Reduktion der Körpertemperatur beim Ziesel von 30 auf 10°C führt nicht zu einem signifikanten Anstieg des diastolischen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  [104]. Allerdings steigt in Hypothermie die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente bei Exzitation an und gewährleistet trotz der reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des kontraktile Apparates eine ausreichende Kontraktion des Myokards.

Ein Faktor in der verbesserten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Winterschlaf ist der reduzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx von extrazellulär. L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle im Sarkolemm werden in Hypothermie downreguliert und durch Reduktion der cAMP-unabhängigen Phosphorylierung verstärkt inaktiviert. Zudem ist das Ativie-

rungspotential dieser Kanäle ins Positivere verschoben, so daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über diesen Weg gering ist. Somit sind das Aktionspotential und die Kontraktion des Myokards weitgehend unabhängig vom extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ . Gleichzeitig behält die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase im Hibernating auch in tiefer Hypothermie ein hohes Aktivitätsniveau, stabilisiert die Gradienten für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  und wirkt so dem Verfall des Membranpotentials entgegen (vgl. Kap. 4.3.2.1). Deswegen tritt im Winterschlaf die bei nicht winterschlafenden Spezies beobachtete Kälteedepolarisation mit konsekutivem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Zelle nicht auf.

Zugleich wird der Erregungs-Kontraktions-Ablauf im Winterschlaf so verändert, daß geringerer  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx eine größere  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung im SR auslösen kann. Auf diese Weise steigt die Kontraktilität in Hypothermie trotz des geringeren Stroms über die L-Typ-Kanäle und der reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensitivität des kontraktilen Apparats. Einen Anstieg der Kontraktionskraft in Hypothermie findet man auch im Nicht-Winterschläfer, dort allerdings als Folge einer Überforderung der zellulären Regulationsmechanismen mit erhöhtem Influx von extrazellulär und insuffizienter  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausschleusung. In winterschlafenden Spezies hingegen ist die Transportrate der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in Hypothermie gegenüber Normothermie auch verringert, aber bei jeder Temperatur signifikant größer als bei Nicht-Winterschläfern. Das ist zurückzuführen auf die Volumenvergrößerung des SR im winterschlafenden Myokard (200-300% der Ausgangsgröße), hauptsächlich des longitudinalen Systems mit Sitz der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen, während die junktionalen Anteile des SR mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen im Volumen kaum verändert sind. Die geringere Temperatursensitivität der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase bei Winterschläfern trägt einen gewissen Teil dazu bei [104].

Zur Speicherung des  $\text{Ca}^{2+}$  im SR dient eine für Winterschläfer spezifische Isoform des Calsequestrins. Durch eine molekulare Modifikation, wahrscheinlich Glykosylierung, ist deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung verbessert und somit der passive  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem SR verringert, und gleichzeitig die CICR-Antwort des SR auf geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimuli verstärkt [104].

Der Anteil des  $\text{Ca}^{2+}$ , der über NCX aus der Zelle entfernt wird, ist bei Winterschläfern verringert, evtl. als Anpassungsreaktion auf den kritischen Energiezustand. Denn NCX transportiert ein  $\text{Ca}^{2+}$  pro ATP, wohingegen die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 2  $\text{Ca}^{2+}$  pro hydrolysiertem ATP befördert.

**Zusammenfassung** Winterschlafende Säugetiere können ihre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase auch in Hypothermie aufrechterhalten. Dazu minimieren sie den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx von extrazellulär durch Downregulation der L-Typ-Kanäle und die Aufrechterhaltung des Membranpotentials in Kälte. Zudem ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung im SR verbessert. Durch einen stark erhöhten Besitz mit SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ist die Kapazität dieses Eliminationsweges von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol auch in Hypothermie ausreichend. Die Bedeutung des energetisch insuffizienteren NCX wird dabei im Hibernating gesenkt.

#### 4.4.5 Eigene Ergebnisse

Die Calciumbilanz des Myokards während Reperfusion nach 480 bzw. 600 Minuten Ischämie unter HTK ist in Abb. 3.18 auf S. 37 dargestellt. Dabei läßt die Geschwindigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme zwei Phasen erkennen: eine erste mit hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme, im Anschluß daran eine zweite mit geringerer Aufnahme.

Die *erste Phase* dauert, sofern sie sich überhaupt aus dem Kurvenverlauf abgrenzen läßt, zwischen 10 und 20 Minuten. Diese Zeit wird hauptsächlich bestimmt sein von Äquilibrierungsvorgängen, auch wenn die in dieser Zeit aufgenommenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Mengen deutlich größer sind als die erwarteten Äquilibrierungsmengen (vgl. Tab. 3.2, S. 35). Nach 8-stündiger Ischämie zeigt sich außerdem, daß die 5°C-Gruppe in den ersten 20 Minuten der Reperfusion reichlich doppelt soviel  $\text{Ca}^{2+}$  aufnimmt wie die 10°C-Gruppe. Die 15°C-Herzen liegen zwischen beiden Gruppen.

Nach 10 Stunden Ischämie (Abb. 3.18 B) ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in den ersten 10 Minuten Reperfusion in allen Gruppen gleich hoch, danach trennen sich die Gruppen aber auf. 10°C zeigt wieder die geringste Aufnahme, in ähnlicher Größenordnung wie nach 8 Stunden Ischämie. Die höchste Aufnahme hat die 15°C-Gruppe, mit einer deutlichen Verschlechterung gegenüber 8-stündiger Ischämie. Die 5°C-Herzen nehmen zu Beginn der Reperfusion nach der längeren Ischämiebelastung deutlich weniger  $\text{Ca}^{2+}$  auf als nach der kürzeren. 10°C zeigt also unabhängig von der Ischämiezeit die geringste  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung.

Daraus folgt: Alle Herzen nehmen in der Äquilibrierungsphase zu Beginn der Reperfusion mehr  $\text{Ca}^{2+}$  auf, als zur Anpassung des Extrazellulärraumes an die Konzentrationen der Reperfusionslösung nötig wäre. Das ist nur dadurch zu erklären, daß ein Teil des aufgenommenen  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle wandert. Dafür kann es folgende Gründe geben:

1. ATP-Mangel. Die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase ist verringert, daher kommt es zur  $\text{Na}^+$ -Überladung der Zelle, die die Aktivität des NCX einschränkt oder gar umkehrt. Gleichzeitig verschiebt sich das negative Membranpotential in Richtung der Aktivierungsschwelle der spannungsgesteuerten L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (ca. -30 mV). In diesem Fall würde man auch eine deutliche  $\text{Na}^+$ -Überladung der Zelle und einen  $\text{K}^+$ -Verlust erwarten. Beides bemerkt man indes noch nicht in den ersten 10 Minuten der Reperfusion. Spätere Veränderungen in dieser Richtung kommen als Ursache für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung dann kaum noch in Frage, sondern sind eher Folgen derselben.
2. Unzureichende Erwärmung. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Extrusionsmechanismen sind noch ineffizient. Durch die Hypothermie ist die Speicherkapazität des SR noch erhöht. Hierdurch wären aber weder die Verbesserung der 5°C-Gruppe nach 600 min Ischämie im Vergleich zu 480 min noch das jeweils beste Abschneiden der 10°C-Gruppe zu erklären.
3. Behinderte oxidative Phosphorylierung. Zu Beginn der Reperfusion kommt es bei erhöhtem zytosolischem  $[\text{Ca}^{2+}]$  zur mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung, woraufhin die oxidative Energiegewinnung entkoppelt wird. Als Folge des Energiemangels kommt es zu Membrandepolarisation und

K<sup>+</sup>-Verlust. Tatsächlich sieht man in allen drei Gruppen (8h Ischämie) bzw. in der 5 und 15°C-Gruppe (10h Ischämie) nach initialer K<sup>+</sup>-Aufnahme ein Umschalten auf K<sup>+</sup>-Verlust in der 7. bis 10. Minute. Parallel dazu bricht der Sauerstoffverbrauch etwa ab der 5. Minute der Reperfusion ein, und erholt sich erst nach der 10. Minute. In diesem Parameter sind die Unterschiede zwischen den Gruppen gering, es zeigt sich aber eine Tendenz, daß die Gruppe, die den stärksten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom erfährt, auch die deutlichste Reduktion des O<sub>2</sub>-Verbrauchs aufweist.

4. Vor allem in der 15°C-Gruppen kann es aufgrund der deutlich stärkeren Azidose bei Rückkehr zum Norm-pH zu stark erhöhtem intrazellulären [Ca<sup>2+</sup>] kommen. Das könnte wiederum den mitochondrialen aeroben Stoffwechsel einschränken. 5°-10°C unterscheiden sich nicht in ihrem pH-Verlauf in Ischämie, aber trotzdem in ihrer Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in Reperfusion.
5. In tiefer Hypothermie sind Membranen rupturgefährdeter und permeabler.

Eine *zweite Phase* schließt sich der Äquilibrationsperiode an und beginnt nach etwa 10-20 Minuten Reperfusion. Die Ca<sup>2+</sup>-Bilanz in dieser Zeit ist ein Indikator für die Suffizienz des Stoffwechsels und für einen eventuellen Reperfusionsschaden. Lediglich die 10°C-Herzen weisen hier, unabhängig von der Ischämiedauer, eine ausgeglichene Ca<sup>2+</sup>-Bilanz auf. Alle anderen Gruppen nehmen kontinuierlich Ca<sup>2+</sup> auf, ohne daß sich dabei ein Plateau andeutet. Daraus ergibt sich der Hinweis, daß in diesen Gruppen während der Ischämie oder in der frühen Reperfusion eine zusätzliche Schädigung eintritt.

Die Ca<sup>2+</sup>-Überladung ist bei 15°C-Herzen nach 10 Stunden Ischämie deutlich höher als nach 8 Stunden, d.h. die Schädigung scheint mit der Ischämiezeit zu korrelieren. Auffallend ist bei diesen Herzen der ATP-Verfall während der Reperfusion. Im Gegensatz zu den Gruppen 5°C und 10°C, die den intraischämischen ATP-Verlust in Reperfusion aufhalten oder sogar umkehren, liegt der Gehalt nach Reperfusion hier jeweils deutlich unter dem postischämischen Niveau (vgl. Tab. 3.3 und 3.4, S. 37f.). Aufgrund des Energiedefizits verfällt das Membranpotential, die Zelle ist nicht in der Lage, das physiologische Ionengleichgewicht aufrechtzuerhalten. Das bestätigt sich in einigen Meßwerten: 15°C-Herzen zeigen während Reperfusion den größten K<sup>+</sup>-Verlust (nach 10h deutlicher als nach 8h) und nach 10 Stunden Ischämie die höchste Na<sup>+</sup>-Aufnahme. Mit Verfall der physiologischen Ionengradienten schwillt die Zelle an, die O<sub>2</sub>-Perfusion wird behindert. Als Ausdruck des Ödems haben 15°C-Herzen ungeachtet der Ischämiezeit den größten Perfusionswiderstand im koronaren Stromgebiet, den geringsten Trockengewichtsanteil und Sauerstoffverbrauch. In all diesen Parametern läßt sich nach der längeren Ischämie eine Verschlechterung beim Vergleich mit der kürzeren Lagerung beobachten. Desweiteren ist in der Reperfusion nach einer Lagerung bei 15°C die interstitielle Azidose am stärksten. Bei Rückkehr zum Norm-pH vergrößert sich dann die Ca<sup>2+</sup>-Transiente [21], zudem ist hier auch das meiste Laktat akkumuliert, das die SR-Ca<sup>2+</sup>-ATPase und NCX inhibiert [99]. Dadurch besteht die Gefahr der Überladung der Mitochondrien mit Ca<sup>2+</sup>.

Nach der Ischämie bei 5°C ist die Ca<sup>2+</sup>-Überladung unabhängig von der Lagerungszeit quantitativ ähnlich. Da in dieser Gruppe der ATP-Abfall in Ischämie sehr langsam vonstatten geht, ist zu Beginn der Reperfusion nicht mit Einschränk-

kungen aufgrund eines Energiemangels zu rechnen. Die ATP-Zeit (praktische Grenze der Wiederbelebung), ist selbst nach 10-stündiger Ischämie noch nicht nennenswert überschritten. Trotzdem ist es wahrscheinlich, daß während der Ischämie der Stoffwechsel durch die Hypothermie so weit verlangsamt wurde, daß myokardiale Zellen nicht in der Lage waren, ein physiologisches Ionenmilieu zu bewahren. Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -ausschleusenden Enzymsysteme wie auch die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase bei  $5^\circ\text{C}$  nahezu vollständig inaktiv sein dürften, verfällt das Membranpotential. Durch Verwendung der nominell  $\text{Ca}^{2+}$ -freien HTK-Lösung läßt sich eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols in Ischämie wohl vermeiden. Außerdem kann das darin enthaltene  $\text{Mg}^{2+}$  die Kälteinotropie und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR hemmen und damit bedeutende Auswirkungen der tiefen Hypothermie aufheben [5, 52, 91]. Doch in dieser Gruppe treffen alle Risikofaktoren für eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung in Reperfusion zusammen: tiefe Hypothermie, Zustand nach  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Perfusion und Ischämie.

#### 4.4.6 Zusammenfassung

Hinsichtlich der Calcium-Homöostase im nach hypothermer Ischämie reperfundierten Myokard sind folgende Faktoren bedeutend:

- In Hypothermie erfolgt im nicht-protektionierten Myokard eine Überladung der Zelle mit Calcium. Nach HTK-Konservierung tritt sie verzögert und abgeschwächt auf.
- Die Ischämie behindert durch den Energiemangel direkt (SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) oder indirekt ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase  $\rightarrow$  NCX reversed) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Das geringe  $[\text{Na}^+]$  der HTK-Lösung reduziert die Triebkraft für die normalerweise (aus Sicht des  $\text{Ca}^{2+}$ ) auswärts gerichtete Aktivität des NCX. Obwohl die Lösung nahezu  $\text{Ca}^{2+}$ -frei ist, steigt auch hier im Ischämieverlauf das zytosolische  $[\text{Ca}^{2+}]$ .
- Unabhängig von der Verwendung einer Calcium-Kardioplegie erfolgt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung des Zytosols und der Mitochondrien hauptsächlich in der beginnenden Reperfusion nach Hypothermie und/oder Ischämie. Sie ist nach  $\text{Ca}^{2+}$ -freier kardioplegischer Perfusion besonders ausgeprägt.
- Nach ischämischer Azidose bedeutet die Rückkehr zum Norm-pH vorübergehend eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transiente (NHE aktiver, NCX einwärts aktiv).
- Im Hibernating scheint der Schlüssel zur stabilen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase die Aufrechterhaltung des Membranpotentials und der Funktionsfähigkeit membrangebundener ATPasen zu sein.

Durch die aufgeführten Mechanismen ist das Risiko der Calcium-Überladung zu Beginn der Reperfusion am größten [75]. Kann durch eine behinderte mitochondriale Phosphorylierungsaktivität der Energiemangel der Zelle nicht sofort dem in Normthermie gestiegenen Bedarf angepaßt werden, droht eine weitere Verschlechterung der Ionen-Gleichgewichte. Kann die Zelle ihren erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt nicht eliminieren, bevor die Energiereserven wiederhergestellt sind, besteht das Risiko einer Kontraktur, die in unseren Versuchen allerdings nie auftrat.



Die Ischämie bei 10°C hat gegenüber 5 und 15°C einige Vorteile. Im Vergleich mit 15°C ist der Stoffwechsel verlangsamt, der ATP-Verfall (s. Abb. 3.2, S. 23) deutlich geringer. Gleichzeitig ist die Restaktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase und der SR-Ca<sup>2+</sup>-ATPase gegenüber 5°C noch größer. Deswegen sind es auch die 10°C- Herzen, die sowohl nach 8 als auch nach 10 Stunden Ischämie in Bezug auf die Elektrolyte Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> eine über 90 Minuten Reperfusion ausgeglichene Bilanz aufweisen. Lediglich der K<sup>+</sup>-Wert nach 8 Stunden Ischämie deutet ab ca. 50 Minuten Reperfusion einen K<sup>+</sup>-Verlust an. Darüber hinaus zeigen sich die Vorteile dieser Temperatur in dem geringsten Koronarwiderstand, dem höchsten Sauerstoffverbrauch und der geringsten Azidoseentwicklung. Diese Werte sprechen für eine weitgehend intakte intrazelluläre Homöostase der Elektrolyte in den 10°C-Gruppen.

## 4.5 Myokardialer Metabolismus

Werden dem gesunden Herzen unter homogenen *aeroben* Bedingungen Glukose und Laktat als Substrate angeboten, so wird - solange Glykogenspeicherkapazität frei ist - Glukose in erster Linie zum Aufbau von Glykogen, Laktat dagegen zur oxidativen Energiegewinnung genutzt [24, 30, 49]. Die Laktataufnahme steigt über einen großen Bereich des myokardialen Energiebedarfes proportional mit dem O<sub>2</sub>-Verbrauch des Herzens [30].

Unter *anaeroben* Bedingungen ist die anaerobe Glykolyse einziger Energielieferant der Zelle. Da sie im Vergleich zur oxidativen Phosphorylierung 18-(19-)fach weniger ATP liefert, wird die Energiesituation der Zelle in Ischämie sehr kritisch. Zwei verschiedene Strategien der Protektion versuchen dem Rechnung zu tragen.

(1) Durch tiefe Hypothermie wird der Stoffwechsel verlangsamt und damit der ATP-Verbrauch maximal reduziert. Im nicht schlagenden Herzen wird ein Großteil des zellulären steady-state-Energieumsatzes durch Membranpumpen verursacht (allein die Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase konsumiert 5-40% [56]). Da diese bei Temperaturen unter 10-15°C zunehmend inhibiert sind, ist der myokardiale Stoffwechsel tatsächlich verlangsamt und der ATP-Verlust geringer ausgeprägt. Das läßt sich in den Biochemiversuchen bestätigen (vgl. Abb. 3.2, S. 23). Der Funktionsverlust der Membranpumpen bewirkt allerdings den Verfall der Elektrolyt-Gradienten über dem Sarkolemm und damit auch eine Abschwächung des negativen Membranpotentials. Membrandestabilisierung und Ca<sup>2+</sup>-Überladung mit nachfolgender Enzymaktivierung und Kältekontraktur sind die Folge. Durch Verwendung der HTK-Lösung als Kardioplegikum, deren Ionengehalt eher dem intrazellulären Kompartiment ähnelt, wird die Triebkraft für Elektrolytverschiebungen über die Membran reduziert. Dennoch muß man zu beginnender Reperfusion bei Wiederherstellung physiologischer Ionenkonzentrationen mit einem intrazellulären K<sup>+</sup>-Verlust und Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Überladung rechnen, solange die Aktivität der Membranpumpen noch reduziert ist. Dies ist die pathophysiologische Grundlage von Reperfusionsschaden und -arrhythmie [16].

Durch die heterogene Kälteantwort eines biologischen Gewebes werden nach Van't Hoff's Gesetz Reaktionen mit hoher Aktivierungsenergie (so die meisten energieliefernden Prozesse - hohes Q<sub>10</sub>) in Hypothermie stärker verlangsamt als

solche mit geringer Aktivierungsenergie (viele passive Diffusionsvorgänge haben niedrige  $Q_{10}$ -Werte). Tiefe Hypothermie hemmt somit Energieproduktion in größerem Maße als den Energieverbrauch [16], allerdings läßt sich dieser Effekt in den Biochemieversuchen nicht nachweisen.

(2) Die Strategie der moderaten Hypothermie hingegen versucht einerseits, den Stoffwechsel global zu verlangsamen, doch gleichzeitig die Funktionsfähigkeit der Membranpumpen zu erhalten, die das physiologische Elektrolytmilieu der Zelle aufrechterhalten sollen. Dafür darf auch die Glykolyserate nicht zu sehr reduziert werden, denn sonst würde anstelle der tiefen Hypothermie der Mangel an energiereichen Substraten die Membranpumpen ausbremsen [71]. Dieses Konzept verbessert die postischämische Funktionsfähigkeit des Myokards, allerdings nur in einem gewissen zeitlichen Rahmen, in dem der schneller absinkende zelluläre ATP-Spiegel eine Reperfusion noch zuläßt.

Es zeigt sich, daß die alleinige Betrachtung der Konzentrationsverläufe energiereicher Phosphate in der Ischämie keine adäquate Aussage über die Reperfusion zuläßt. Ausreichendes [ATP] ist somit kein hinreichendes, aber sehr wohl ein notwendiges Kriterium. Die optimale Lagerungstemperatur ist von der Ischämiezeit abhängig, weil auch die ATP-Zeit  $t_{ATP}$ , die die praktische Grenze der Wiederbeleubarkeit bezeichnet (vgl. S. 24), eine Funktion der Temperatur ist. Bei langen Ischämiezeiten muß man tiefere Temperaturen wählen, um bei Reperfusion noch ein ausreichendes [ATP] vorzufinden.

### Zusammenfassung

- Für eine gute postischämische Funktion ist die Aktivität der Membranpumpen während der Ischämie nötig. Die dafür erforderliche Energie muß aus einer gesteigerten anaeroben Glykolyse kommen. Negative Folgen wie Übersäuerung müssen durch die Konservierungslösung abgepuffert werden.
- Der schneller verfallende [ATP]-Spiegel limitiert die moderate gegenüber der tiefen Hypothermie. Bei längeren Aufbewahrungszeiten der Herzen müssen somit tiefere Temperaturen gewählt werden, um die Wiederbeleubarkeit nicht von vorneherein zu kompromittieren.
- Aus der Beobachtung metabolischer Parameter in Ischämie lassen sich nur bedingt Schlüsse auf die postischämische Funktion ziehen.

## 4.5.1 Laktattransport

### 4.5.1.1 Physiologie des Laktattransports

Während im aerob arbeitenden Herz Laktat als wichtiges Substrat aus dem Blut aufgenommen und verstoffwechselt wird, entsteht Laktat unter ischämischen Bedingungen als Endprodukt der anaeroben Glykolyse im Zytosol (myokardialer) Zellen und wird nach extrazellulär abgegeben. Laktattransport über das Sarkolemm ist also prinzipiell in beiden Richtungen möglich. Während unter physiologischen Verhältnissen nur die Laktataufnahme ins Myokard eine Rolle spielt, wird in Ischämie Laktat intrazellulär produziert und nach extrazellulär abgegeben. Im Verlauf der postischämischen Reperfusion würde man bei einem suffizienten aeroben Stoffwechsel einen Übergang von Laktatabgabe zu -aufnahme im

Myokard erwarten. Allerdings zeigten nur wenige der vorliegenden Experimente eine solche Charakteristik.

Viele Eigenschaften des Laktattransportes sind bekannt. Durch den  $pK_s$ -Wert von 3,86 liegen bei einem physiologischen intrazellulären pH von ca. 6,8 etwa 99,9% des Laktats in anionischer, nur 1 Promille in undissoziierter Form vor. Aber sogar undissoziiert ist die Lipidlöslichkeit des Laktats aufgrund seiner Carboxyl- und Hydroxylgruppe und der Kürze des alifatischen Restes gering, so daß freie Permeation durch die Lipiddoppelschicht zumindest bei physiologischen pH-Verhältnissen vernachlässigbar gering ist.

Der Fluß von Laktat über die Zellmembran ist sättigbar, leicht stereospezifisch für L-Laktat über D-Laktat und hemmbar durch proteinmodifizierende Substanzen wie etwa  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-Cinnamat ( $\alpha$ HC,  $[\alpha$ HC]=5 mmol/L), mersalyl acid (0,5 mmol/L) und Stilben-Disulfonate [87, 105]. Er ist nicht elektrogen.

Es besteht eine Abhängigkeit vom  $H^+$ -Gradient mit verstärktem Laktatfluß in Richtung geringerer  $H^+$ -Konzentration [87]. Hingegen haben der  $Na^+$ - und  $K^+$ -Gradienten im Herzen keinen nennenswerten Einfluß auf den Laktatfluß, im Gegensatz zum Bürstensaum der Niere, wo der  $Na^+$ -Kotransport eine vorherrschende Rolle spielt [78, 100]. Zellulärer  $K^+$ -Efflux steigt zwar, ebenso wie der Laktat-Efflux und sogar im gleichen zeitlichen Verlauf wie dieser, in Folge einer metabolischen Beeinträchtigung des Herzens, wie z.B. während Ischämie, dramatisch an. Aber die Mengen des ausgeschleusten Laktats übersteigen die des Kaliums doch um ein Mehrfaches [61, 107]. Bei physiologischem zytosolischem  $[K^+]$  und  $[H^+]$  werden schätzungsweise  $<10\%$  des L-Laktats mit  $K^+$  kotransportiert. Hohe  $K^+$ -Konzentrationen können den Laktattransport sogar behindern, weil sie anstelle des  $H^+$  an den Carrier binden, aber nur ineffizient transportiert werden [87].

Es scheint somit wahrscheinlich, daß Laktat im Myokard im Kotransport mit  $H^+$  befördert wird, und zwar im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 [105]. Dieser Prozeß ist hinsichtlich seiner Geschwindigkeit und Konzentrationsabhängigkeit nicht symmetrisch, wie Spencer et al. 1976 postulierten [93], sondern weist für den Efflux von L-Laktat ein höheres  $K_m$  und  $v_{max}$  auf als für den Influx<sup>2</sup>.

Der Laktat- $H^+$ -Kotransport ist sättigbar. Nach Taegtmeier et al. [96] oxidiert ein arbeitendes Rattenherz angebotenes Laktat (5 mmol/L) mit einer Rate von  $1400 \mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g TG}^{-1}$ . Das entspricht bei  $37^\circ\text{C}$  einer Transportrate von  $12 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  intrazelluläres Volumen [79]. Mit den eben genannten Werten für  $K_m$  und  $v_{max}$  kann man absehen, daß der Transporter bei diesem hohen Laktatstoffwechsel keine große Reservekapazität hat und evtl. sogar der limitierende Faktor der Laktatoxidation ist. Ähnliche Überlegungen gelten für den Laktat-Efflux. Während unter normoxischen Bedingungen Laktat mit einer Rate von bis zu  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g TG}^{-1}$  abgegeben wird bei intrazellulärem [Laktat] von  $\approx 2$  mmol/L, steigt diese Rate in Hypoxie bis auf  $60\text{--}70 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g TG}^{-1}$  bei  $[\text{Lakt}]_i \approx 5\text{--}6$  mmol/L [84, 109]. Das entspräche einer

<sup>2</sup>In der Literatur lassen sich folgende Werte finden: *Influx* nach [105]  $K_m=2,74$  mmol/L,  $v_{max}=5,21 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  (bei  $23^\circ\text{C}$ ), nach [87]  $K_m\approx 5,0$  mmol/L; *Efflux* nach [105]  $K_m=8,27$  mmol/L,  $v_{max}=11,3 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  ( $23^\circ\text{C}$ ). Durch eine Temperaturerhöhung von  $23^\circ$  auf  $37^\circ\text{C}$  wird die Geschwindigkeit des Laktattransportes etwa verdreifacht [79, 105].

Transportrate von  $35 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{l}^{-1}$  ( $37^\circ\text{C}$ ). Vergleicht man diese wiederum mit dem  $K_m$  und  $v_{max}$  für Laktatefflux, ist es wahrscheinlich, daß der Laktattransport aus der Zelle heraus unter diesen Bedingungen der limitierende Schritt ist. Staut sich intrazellulär Laktat an, fällt aufgrund des Kotransportes mit  $\text{H}^+$  auch der pH ab. Der dann höhere Protonengradient stimuliert die Transportrate des Carriers, und der größere Anteil an nicht dissoziiertem Laktat erhöht den Efflux über freie Diffusion [78, 105].

Der Laktattransport wird stimuliert durch einen azidotischeren pH auf der Seite der Membran, wo Laktat verstärkt anfällt, und ebenso durch einen alkalotischeren pH auf der gegenüberliegenden Seite [43]. Dabei soll der extrazelluläre pH einen starken, der intrazelluläre hingegen nur einen schwachen Einfluß auf den Laktat/ $\text{H}^+$ -Carrier haben [42]. Eine treibende Kraft ist also der pH-Gradient, schon ein Unterschied von 0,3 ist ausreichender Antrieb für Laktattransport in das alkalischere Kompartiment [105].

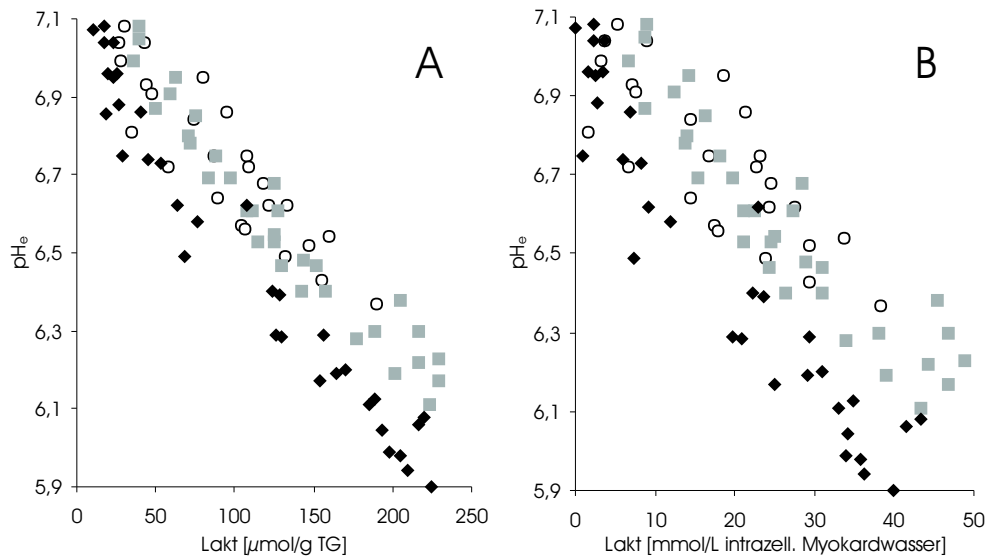
Der pH-Gradient beeinflußt aber nicht nur die Aktivität des Monocarboxylat-Carriers, sondern auch die Laktatproduktion selbst. Durch einen fehlenden pH-Gradient würde Laktat nicht mehr aus der Zelle ausgeschleust werden können. Das sich anstauende Laktat könnte dann über einen Feedback-Mechanismus die glykolytische enzymatische Aktivität senken und zum Anstau anderer Intermediärprodukte der Glykolyse führen. Damit wäre die Glykolyse insgesamt ausgebremst und der energetische Zustand der Zelle kritisch. Geschwindigkeitsbestimmend wären in diesem Fall wahrscheinlich die Schritte der Hexokinase und Phosphofruktokinase [102].

Neben dem pH-Gradient ist auch der Laktatgradient selbst eine, wenn nicht die wichtige Triebkraft für die Aktivität der Laktat- $\text{H}^+$ -Carriers [41].

Ein weiterer wichtiger Faktor im Blick auf Laktatproduktion und -transport ist die Temperatur. Zum einen ist das Transportprotein selbst temperatursensibel. Wang et al. [105] beschrieben eine 2,5-fache Erhöhung der Laktat-Transportgeschwindigkeit, wenn die Temperatur von  $11^\circ\text{C}$  auf  $23^\circ\text{C}$  erhöht wurde. Darüber hinaus haben Vezzoli et al. [102] festgestellt, daß der eben beschriebene Einfluß des extrazellulären pH-Wertes auf Laktattransport und Glykolyserate bei  $25^\circ\text{C}$  sehr deutlich, bei  $15^\circ\text{C}$  aber schon kaum noch nachzuweisen ist.

**Zusammenfassung** Der Laktattransport erfüllt die üblichen Kriterien für einen Carrier-vermittelten Membrantransportmechanismus: Sättigbarkeit, Stereospezifität, Temperaturabhängigkeit und Hemmbarkeit. Folgende Schlüsse über den Laktattransport lassen sich aus den dargestellten Eigenschaften ableiten:

- Er ist im wesentlichen ein Carrier-vermittelter  $\text{H}^+$ -Kotransport, passive Diffusion spielt eine untergeordnete Rolle, ebenso wie der Kotransport mit  $\text{K}^+$ .
- Er ist nicht elektrogen und nicht vom Membranpotential abhängig.
- Ein pH-Gradient verstärkt den Transport in Richtung des alkalischeren Kompartiments.



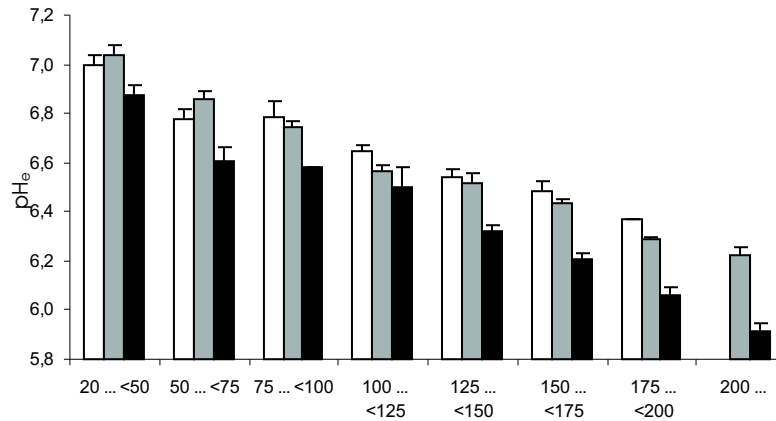
**Abbildung 4.1:** (A) Extrazellulärer pH in Abhängigkeit vom Gesamtlaktat, (B)  $pH_e$  in Abhängigkeit vom (berechneten) intrazellulären Laktat, korrigiert um temperaturabhängige Pufferkapazität. HTK-Ischämie bei 5°C (○), 10°C (■), 15°C (◆), beachte unterschiedliche Einheiten der Abszisse.

- Hohe  $K^+$ -Konzentrationen hemmen den Transport partiell, weil  $K^+$  an den Transporter bindet, aber nur ineffizient mit Laktat kotransportiert wird (pharmakolog. Modell des partiellen Agonisten).
- Bei stärkerer Azidose nimmt die Geschwindigkeit des Laktattransportes aufgrund des höheren  $H^+$ -Konzentrationsgefälles und des dann größeren Anteils an undissoziiertem Laktat zu.
- Hohe Laktatkonzentrationen stimulieren den Transporter. Zellauswärts ist die Kapazität größer als zelleinwärts.
- Die Temperaturabhängigkeit des Monocarboxylat-Carriers kann mit einem  $Q_{10}$ -Wert von  $\approx 2,5$  charakterisiert werden.

#### 4.5.1.2 Laktattransport während Ischämie

Nach der Physiologie des Laktattransportes muß man vermuten, daß ischämisch gebildetes Laktat je nach Ischämietemperatur in unterschiedlichem Ausmaß nach extrazellulär befördert wird. Die Betrachtung des extrazellulären pH-Wertes in Abhängigkeit von der myokardialen Laktatkonzentration erlaubt Rückschlüsse auf den Laktattransport über die Zellgrenzen. Dabei kann man davon ausgehen, daß Protonen, die bei der Dissoziation von ATP entstehen und im stöchiometrischen Verhältnis 1  $Lakt^-$  : 1  $H^+$  anfallen die wichtigste Einflußgröße für den extrazellulären pH darstellen.

In Abb. 4.1 A sind myokardiale Laktatkonzentrationen in Ischämie und jeweils zeitgleich gemessene extrazelluläre pH-Werte der Biochemieversuche einander gegenübergestellt. Es fällt auf, daß die Meßpunkte der 5°- und 10°C-Gruppen kaum voneinander abzugrenzen sind, die der 15°C-Gruppe doch deutlich tiefer



**Abbildung 4.2:** Mittlerer extrazellulärer pH im Verhältnis zur Laktatkonzentration. Laktatwerte wurden in Gruppen geordnet und korrespondierende pH-Werte gemittelt. Abszisse: [Lakt<sup>-</sup>] in mmol/L. HTK-Ischämie bei 5°C (□), 10°C (▒), 15°C (■), angegeben als Mittelwert ± SEM.

liegen. Bei gleichem Laktatgehalt weisen Herzen bei 15°C-Lagerung einen saueren extrazellulären pH auf als bei kälterer Lagerung. Diese Aussage wird durch Abb. 4.2 unterstützt.

Hierbei ist allerdings noch nicht berücksichtigt, daß Histidin, der (einzige) Puffer der HTK-Lösung, in seiner Pufferkapazität von der Temperatur abhängig ist. In Kälte steigt sein  $pK_s$ -Wert und mit ihm die Pufferkapazität. Daher würde man erwarten, daß gleiche Laktatmengen bei tieferer Temperatur einen geringeren pH-Sprung bewirken als bei höheren. Um die Meßpunkte in Abb. 4.1 A um die unterschiedlichen Pufferkapazitäten zu bereinigen, wurde der pH-Wert der HTK-Lösung bei verschiedenen Temperaturen gemessen und über Henderson-Hasselbalch die temperaturabhängigen  $pK_s$ -Werte des Histidins errechnet<sup>3</sup>. Es ergaben sich folgende Werte:

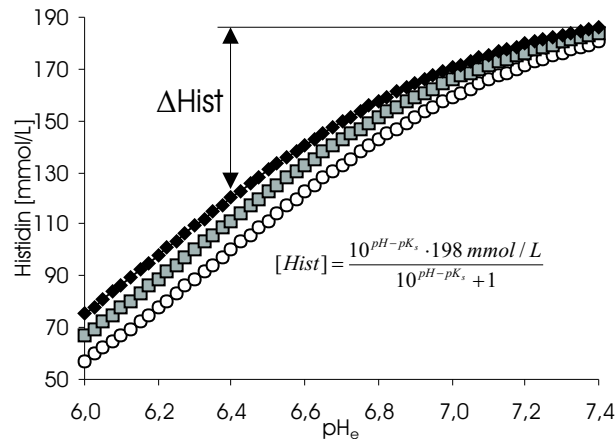
Temperatur	5°C	10°C	15°C	37°C
pH	7,39	7,29	7,21	6,85
$pK_s$	6,39	6,29	6,21	5,85

Diese Veränderung entspricht ziemlich genau dem Verhalten von Wasser, das für jedes °C Abkühlung seinen Neutralpunkt um 0,017 pH-Einheiten ins Alkalischere verschiebt [1].

Abb. 4.3 zeigt die erwartete extrazelluläre Histidinkonzentration in Abhängigkeit von extrazellulärem pH und Ischämietemperatur<sup>4</sup>. Auf diese Weise läßt sich für alle extrazellulär gemessenen pH-Werte der korrespondierende Verbrauch der Pufferbase Histidin ( $\Delta$ Hist) bestimmen. Dieser ist identisch mit der Menge

$$^3 pH = pK_s + \lg \frac{[Base]}{[Säure]} \rightarrow \text{mit } [Base]=[Histidin]=180 \text{ mmol/L; } [Säure]=[Histidin \cdot Cl^-]=18 \text{ mmol/L, ergo } [Base]:[Säure]=10:1 \rightarrow pK_s = pH - \lg \frac{[Histidin]}{[Histidin \cdot Cl^-]} = pH - 1.$$

$$^4 pH = pK_s + \lg \frac{[Hist]}{[Hist \cdot Cl^-]} \rightarrow \frac{[Hist]}{[Hist \cdot Cl^-]} = 10^{pH - pK_s} \text{ mit } [Hist] + [Hist \cdot Cl^-] = 198 \text{ mM} \rightarrow [Hist] = \frac{10^{pH - pK_s} \cdot 198 \text{ mmol/L}}{10^{pH - pK_s} + 1}.$$



**Abbildung 4.3:** Errechnete extrazelluläre Histidinkonzentration in Abhängigkeit von extrazellulärem pH und temperaturabhängigem  $pK_s$ -Wert<sup>4</sup>. Exemplarisch angegeben der Verbrauch von Histidin ( $\Delta\text{Hist}$ ) bei einem pH-Sprung von 7,4  $\rightarrow$  6,4 bei 15°C. 5°C ( $\circ$ ), 10°C ( $\square$ ), 15°C ( $\diamond$ ).

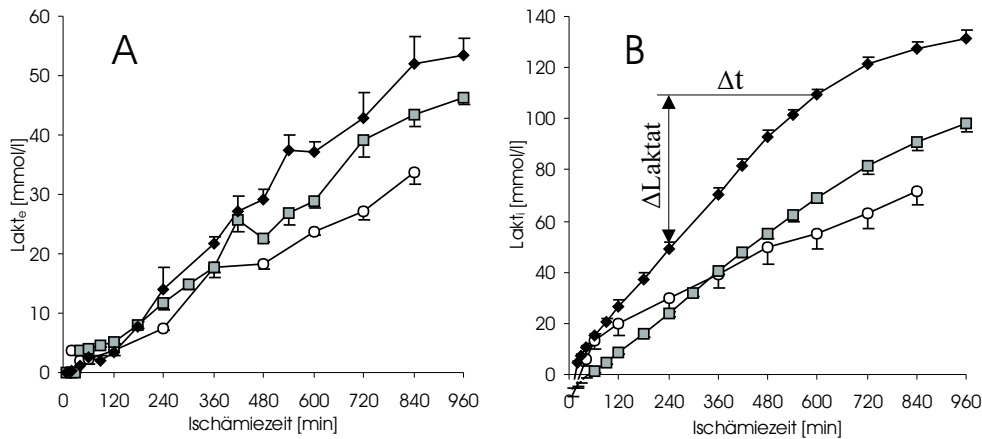
anfallender Protonen (ein  $\text{H}^+$  überführt genau ein Molekül Histidin in  $\text{Hist}\cdot\text{Cl}^-$ ). Daraus erhält man die Konzentration des extrazellulären Laktats unter den folgenden Annahmen:

1. Milchsäure und Protonen fallen intrazellulär im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 an. Auch wenn das Proton strenggenommen nicht vom Laktat stammt, sondern erst durch ATP-Hydrolyse frei wird, bleibt das Verhältnis 1:1 gewahrt. Auch der Laktat-Proton-Kotransport nach extrazellulär transportiert im stöchiometrischen Verhältnis 1:1.
2. Diese Prozesse sind die einzigen, die nennenswerte Mengen an extrazellulärem  $[\text{H}^+]_e$  produzieren. Von Fettsäuren stammende Protonen bewegen sich im  $\mu\text{mol}$ -Bereich.
3. Histidin puffert nur extrazellulär. Ohkado et al. [71] behaupten zwar, daß Histidin leicht in die Zelle eindringen kann. Da Histidin im Kotransport mit  $\text{Na}^+$  befördert wird, stimmt diese Behauptung nur unter der Annahme eines  $\text{Na}^+$ -Gradienten über das Sarkolemm, den diese Arbeitsgruppe durch Verwendung einer Konservierungslösung mit  $[\text{Na}^+]=80 \text{ mmol/L}$  auch hatte. Bei Verwendung von HTK-Lösung ist dieser Gradient hingegen minimal.

$$[\text{Lakt}^-]_e = [\text{H}^+]_e = \Delta[\text{Hist}] = [\text{Hist}]_{\text{pH:7,4}} - [\text{Hist}]_{\text{pH:Messwert}}$$

Aus dem Gesamtgehalt an Laktat und seiner extrazellulären Konzentration läßt sich das intrazelluläre Laktat berechnen<sup>5</sup>. Die Größe des Extrazellulärraumes im intakten Myokard soll hierfür in grober Näherung mit 20% angenommen

<sup>5</sup>  $\frac{1}{5} [\text{Lakt}^-]_e + \frac{4}{5} [\text{Lakt}^-]_i = [\text{Lakt}^-]_{\text{ges}} \rightarrow [\text{Lakt}^-]_i = \frac{5}{4} \left( [\text{Lakt}^-]_{\text{ges}} - \frac{1}{5} [\text{Lakt}^-]_e \right)$ .  
Für  $[\text{Lakt}^-]_{\text{ges}}$  Umrechnung der Einheit:  $\frac{[\mu\text{mol/gTG}]}{5} \cdot 1,25 = [\text{mmol/L Myokardwasser}]$  (physiologischer Trockengewichtsanteil des ödemfreien Myokards: 20%).



**Abbildung 4.4:** Verlauf des (A) intrazellulären und (B) extrazellulären Laktats. HTK-Ischämie bei 5°C (—○—), 10°C (—□—), 15°C (—●—), angegeben als Mittelwert ± SEM.

werden. Sie wird in der Literatur mit Werten zwischen 10 und 40% des Feuchtgewichtes des linken Ventrikels angegeben, variiert aber sehr in Abhängigkeit vom benutzten Indikator und dessen Äquilibrierungszeit [27, 57, 73, 92, 30].

So lassen sich die Meßwerte für intrazelluläres Laktat, die um die temperaturspezifische Pufferkapazität bereinigt worden sind, in Abhängigkeit vom extrazellulären pH auftragen: Abb. 4.1 B. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind im Vergleich zu Abb. 4.1 A nur unwesentlich kleiner geworden sind. Das liegt daran, daß der Unterschied in der Pufferkapazität zwischen 5 und 15°C bei einem Pufferbereich von 1,5 pH-Einheiten bei < 10% liegt.

Die durchgeführten Berechnungen ermöglichen es, den Verlauf des Gesamtlaktats (Abb. 3.6, S. 27) aufzuschlüsseln in extra- und intrazelluläres Laktat: Abb. 4.4. Vergleicht man die Geschwindigkeit des extrazellulären Laktatanstiegs  $\Delta\text{Laktat}:\Delta t$  bei den verschiedenen Temperaturen, ergeben sich folgende apparente Q-Werte des Laktattransportes:  $Q_5$  (5°-10°)=1,74,  $Q_5$  (10°-15°)=1,37 und  $Q_{10}$  (5°-15°)=2,38. Unter 10°C nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit also stärker ab als zwischen 15° und 10°C.

Aus diesen Betrachtungen ergibt sich die Schlußfolgerung, daß der Laktattransport aus der Zelle heraus bei gleichem Laktatgehalt bei 15°C besser funktioniert als in den beiden kälteren Gruppen, die sich in diesem Parameter allerdings nicht deutlich unterscheiden. Eine mögliche Erklärung wäre die zunehmende Hemmung des Laktat-Proton-Kotransporters bei Temperaturen unter 15°C, die sich nach diesen Experimenten mit einem  $Q_{10}$ -Wert von 2,38 charakterisieren.

Die besondere Bedeutung dieser Laktatverhältnisse in Ischämie liegt auch darin, daß sie Aussagen über die Entwicklung des intrazellulären pH-Wertes ermöglichen, weil Laktat und Protonen sowohl intrazellulär im Verhältnis 1:1 anfallen als auch im Verhältnis 1:1 nach extrazellulär transportiert werden. So muß man davon ausgehen, daß in Ischämie bei 15°C trotz größerer Aktivität des  $\text{Lakt}^- - \text{H}^+$ -Kotransporters der intrazelluläre pH deutlich azidotischer ist als bei kälteren Temperaturen. Bei 10°C liegt die intrazelluläre Konzentration von



Laktat und analog Protonen lange Zeit auf dem Niveau der 5°C-Herzen, die Aktivität des Monocarboxylat-Carriers ist aber noch deutlich höher als bei jenen. 10°C vereint somit die Vorteile geringer Azidoseentwicklung und größerer Aktivität der Membranpumpen.

#### 4.5.2 Anaerobe Glykolyse in Ischämie

Folgende Faktoren haben Einfluß auf die Glykolyserate: Temperatur, Laktatefflux und Pufferkapazität.

##### 4.5.2.1 Temperatur

Der Anstieg der Laktatkonzentration im ischämischen Myokard korreliert mit der Lagerungstempertur (vgl. Abb. 3.6, S. 27). Das bedeutet, daß die Rate der anaeroben Glykolyse bei 15°C höher ist als bei 5°C. Der  $Q_{10}$ -Wert wird hierzu mit ca. 2,3 angegeben [102]. Bei 15°C kann also im Vergleich mit 5°C etwa die 2,3-fache Menge Glukose verstoffwechselt werden. Dementsprechend höher sind bereitgestellte Energie und, da auch die Aktivität anderer (energieverbrauchender) ATPasen um einen ähnlichen Faktor erhöht ist, auch der Energieverbrauch.

Der bei 15°C gesteigerte Stoffwechsel hat zur Folge, daß das zelluläre Ionenmilieu besser aufrechterhalten werden kann und das Membranpotential stabilisiert wird. Diese Vorteile sind allerdings aufgrund des schnelleren ATP-Verfalls zeitlich limitiert.

##### 4.5.2.2 Laktatefflux

Der Monocarboxylat-Carrier hat einen  $Q_{10}$ -Wert von ca. 2,5 [105]. Nach eigenen Berechnungen liegt er bei 2,38 (5°C-15°C), wobei der Aktivitätsverlust zwischen 5° und 10°C größer ist als der zwischen 10° und 15°C. Durch diese direkte Temperaturabhängigkeit und den bei 15°C erhöhten intrazellulären Laktatspiegel ist der Laktat- $H^+$ -Kotransport aus der Zelle heraus in dieser Gruppe am größten. Vezzoli et al. [102] zeigten, daß die Laktatakkumulation unter Bedingungen, die eine hohe Aktivität des Monocarboxylat-Carriers ermöglichten, am größten war. In diesen Fällen sei durch ein konsequentes Ausschleusen von Laktat und Protonen die Hemmung der Glykolyse durch diese Produkte am geringsten.

Doch welche Vorteile hat der bei höheren Temperaturen verstärkte Laktattransportes aus der Zelle?

1. Durch Produktentzug wird die höhere Glykolyserate aufrechterhalten.
2. Durch den gleichzeitigen Auswärtstransport von Protonen entfällt auch deren hemmende Wirkung auf die Glykolyse. Gleichzeitig wird einer übermäßigen Aktivierung des  $Na^+-H^+$ -Antiport (NHE) vorgebeugt, der eine  $Na^+$ - und in der Reperfusion über den  $Na^+-Ca^{2+}$ -Tauscher (NCX) auch  $Ca^{2+}$ -Überladung der Zelle bewirkt, mit den Konsequenzen Zellschwellung, erschwerte  $O_2$ -Diffusion, Enzymaktivierung, Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung.

3. Nach Coetzee [23] hat eine verstärkte Auswärtsaktivität des Monocarboxylat-Carriers über einen noch unbekanntem Mechanismus einen stimulierenden Einfluß auf den  $K^+$ -Strom  $i_{K,ATP}$  durch den ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanal. Eine Öffnung dieses Kanals in der mitochondrialen Membran gilt gleichzeitig auch als gemeinsame Endstrecke des kardioprotektiven  $\delta$ -opioid-gekoppelten Transduktionsweges im Hibernating und der ischämischen Präkonditionierung [48]. Laktattransport nach extrazellulär könnte also über die Stabilisierung des Membranpotentials eine ähnliche Protektion bewirken.

Die Abbildungen 4.1 und 4.2 zeigen, daß bei gleichen Laktatkonzentrationen der (extrazelluläre) pH bei 15°C Lagerung saurer ist als in den Gruppen 5°/10°. Geht man davon aus, daß der Laktat- $H^+$ -Kotransport der einzige ist, der nennenswerte Mengen an  $[H^+]$  aus der Zelle transportiert (aufgrund des extrazellulären HTK-Milieus mit niedrigem  $[Na^+]_e$  ist NHE kaum oder in Gegenrichtung aktiv), kann man schlußfolgern, daß bei der wärmeren Lagerung mehr Laktat ausgeschleust wird als in den beiden kälteren Gruppen, die sich in diesem Punkt kaum unterscheiden. Durch die größere Pufferkapazität des Histidins in Kälte wird dieselbe Laktatmenge bei 15° einen größeren pH-Abfall bewirken als bei 5°C. Abb. 4.1 B trägt dem Rechnung. Hier wurde berechnet, welches  $[Lakt]_e$  nötig ist, um bei der jeweiligen Temperatur den gemessenen pH-Wert zu erklären. Unterschiedliche Pufferkapazitäten spielen in dieser Abbildung keine Rolle mehr.

Es stellt sich die Frage, ob durch den langsameren Auswärtstransport von Laktat bei 5°C die Konzentration intrazellulär stärker ansteigt. Das könnte neben dem Temperatureffekt ein weiterer Grund für die langsamere Glykolyse und den schwächeren Laktatanstieg in dieser Gruppe sein. Abbildung 4.4 zeigt, daß bei 15°C nicht nur  $[Lakt]_e$  erhöht ist, sondern auch  $[Lakt]_i$ . Wenn die Glykolyse durch Laktat gehemmt wird, dann eher in dieser Gruppe. Anders gesprochen, auch wenn bei 5°C die Transportkapazität des Monocarboxylat-Carriers geringer ist, ist die Laktatproduktion mindestens in demselben Maße verringert, so daß sich Laktat nicht stärker anstaut als bei 15°C. Die Transportaktivität des Laktat- $H^+$ -Kotransportes bei 5°C scheint somit die Glykolyserate nicht direkt über einen Produktstau zu limitieren.

Nach 480-600' Ischämie liegt die Konzentration des intrazellulären Laktats in der 15°C-Gruppe bei Werten  $>30$  mmol/L (vgl. Abb. 4.4). Der  $K_m$ -Wert von 8,27 mmol/L (23°C) für Laktatefflux [105] läßt vermuten, daß der Carrier gesättigt und für die höhere intrazelluläre Laktatkonzentration verantwortlich sein könnte. Das kann aus unseren Daten nicht abschließend geklärt werden. Da aber auch die extrazelluläre Konzentration des Laktats bei 15°C gegenüber 10°C deutlich höher war, ist zumindest davon auszugehen, daß bei 10°C der Transporter noch Reservekapazität hat.

#### 4.5.2.3 Pufferkapazität der HTK-Lösung

Sie beträgt für einen pH-Sprung von 7,4  $\rightarrow$  6,4 bei 5°C 80,23 mmol/L, bei 10°C 72,27 mmol/L und bei 15°C 65,67 mmol/L. Bei 5°C können also in diesem pH-Bereich im Vergleich zu 15°C reichlich 20% mehr Protonen abgepuffert werden.

### 4.5.3 Laktatbilanz während Reperfusion

Im Normalfall bedeutet eine myokardiale Netto-Aufnahme von Laktat, daß die oxidative Energiegewinnung aus Laktat in allen Teilschritten intakt und in der Lage ist, den Energiebedarf des Herzens zu decken. Demgegenüber ist eine Netto-Abgabe von Laktat Zeichen einer lokal oder global insuffizienten aeroben Energiegewinnung. Ausnahmen sind jeweils die Situationen, in denen ein deutlicher Unterschied der Laktatkonzentrationen zwischen Myokard und Perfusionslösung besteht, weil dann die eigentliche Laktatbilanz überdeckt wird durch Äquilibrationvorgänge.

Die postischämische Laktatbilanz gliedert sich in unseren Experimenten in zwei Phasen, eine Äquilibrations- und eine Post-Äquilibrationsphase.

#### 4.5.3.1 Äquilibrationsphase

Laktat entsteht unter Anoxie intrazellulär und wird nach extrazellulär transportiert. Während der Ischämie häufen sich also erhebliche Mengen Laktat im intrazellulären und interstitiellen Raum des Herzens an (vgl. Abb. 4.4, S. 68). Diese werden mit Beginn der Reperfusion ausgespült, so daß sich die Laktatkonzentration im Myokard der Reperfusionslösung (=5 mmol/L) annähert. Diese Anpassung – Äquilibration des Gewebes – dauert etwa 10-15 Minuten. Dabei ist die zu erwartende Menge an freizusetzendem Laktat abhängig von der Gewebekonzentration zu Reperfusionbeginn und der Laktatkonzentration der Reperfusionslösung.

Die Laktatabgabe  $n_{Aequi}$ , die rechnerisch nötig ist, um die postischämisch hohe Laktatkonzentration des Gewebes  $c_{Lakt-Ischaem}$  an die der Reperfusionslösung  $c_{Lakt-Rep.Lsg}$  anzupassen, ergibt sich nach der Formel (normiert auf 100g  $FG_{korr}$ ):

$$n_{Aequi} = (c_{Lakt-Rep.Lsg} - c_{Lakt-Ischaem}) \cdot 100g \cdot FG_{korr}$$

Hierbei bleibt unberücksichtigt, daß ein Teil des intrazellulären Laktats bei einsetzender Aerobiose nicht abgegeben, sondern verstoffwechselt wird. Die im folgenden berechneten Äquilibrationismengen für Laktat sind um diesen Anteil zu hoch: (Tab. 4.1)

	$c_{Lakt-Rep.Lsg}$ [mmol/l]	Ischämie bei 5°C		Ischämie bei 10°C		Ischämie bei 15°C	
		$c_{Lakt-Ischaem}$ [mmol/100g $FG_{korr}$ ]	$n_{Aequi}$	$c_{Lakt-Ischaem}$ [mmol/100g $FG_{korr}$ ]	$n_{Aequi}$	$c_{Lakt-Ischaem}$ [mmol/100g $FG_{korr}$ ]	$n_{Aequi}$
480 min	5,0	1,986 ± 0,065	-1,486	2,338 ± 0,067	-1,838	3,351 ± 0,149	-2,851
600 min	5,0	2,519 ± 0,13	-2,019	2,951 ± 0,078	-2,451	4,123 ± 0,088	-3,623

**Tabelle 4.1:** Äquilibrationismengen  $n_{Aequi}$  für Laktat,  $c_{Lakt-Ischaem}$  postischämische Laktatkonzentration im Gewebe,  $c_{Lakt-Rep.Lsg}$  Laktatgehalt der Reperfusionslösung.

Negative Werte bedeuten Laktatabgabe. Diese Abgabemengen sind dem Herzen somit „erlaubt“, d.h. lassen noch keinen Schluß auf einen insuffizienten aeroben Stoffwechsel zu. Vergleicht man diese Mengen mit der kumulativen Lak-

tatbilanz des Herzens in Reperfusion (Abb. 3.14, S. 33), fällt auf, daß die Äquilibrationen etwa mit den Laktatmengen übereinstimmen, die das Herz in den ersten 10 Minuten der Reperfusion abgibt. Genau genommen dauert die Abgabe nach 8h Ischämie 7, 9 bzw. 12 Minuten (in 5-10-15°C-Gruppe), nach 10h Lagerung 9, 10 bzw. 12 Minuten. Man kann somit davon ausgehen, daß die Veränderungen im Laktathaushalt des Myokards in den ersten 10 Minuten äquilibrationsbedingt sind und keine Aussage über die Qualität des Stoffwechsels zulassen.

Folgende Faktoren beeinflussen die Äquilibrationen:

1. Die Laktatkonzentration des Myokards. Diese ist eine Funktion von Lagerungsdauer, -temperatur und Protektionsverfahren (reine Ischämie vs. Kardioplegie). Hier wäre zu erwarten, daß warme Gruppen, die entsprechend viel Laktat angehäuft haben, länger brauchen, bis sie das Gewebelaktat an den niedrigen Spiegel der Reperfusionslösung angepaßt haben.
2. Die Temperatur in der Äquilibrationsphase. Der größere Teil des Laktats liegt intrazellulär und muß über den Monocarboxylat-Carrier nach außen befördert werden. Dieser Transporter ist charakterisiert durch einen  $Q_{10}$ -Wert von 2,5, würde also in der Anfangsphase der Reperfusion nach 5°C-Lagerung langsamer arbeiten.
3. Der Energiebedarf des Herzens und die Stoffwechselsituation (aerob-anaerob). Bei hohem Energieumsatz und schneller Erholung der oxidativen Phosphorylierung wird ein guter Teil des Laktats intrazellulär verstoffwechselt und nicht ausgeschleust. Bei global oder lokal unzureichender Perfusion und somit gesteigerter anaerober Glykolyse fallen in der beginnenden Reperfusion zusätzliche Mengen Laktat an, die mit dem Konzentrationsgradienten (vgl. Abb. 4.4) nach außen gelangen. Es ist zu vermuten, daß der aerobe Stoffwechsel nach 15°C-Lagerung schneller anläuft, weil der Prozeß des Aufwärmens schneller abgeschlossen ist.

Da in der Äquilibrationsphase die Laktatbilanz des Myokards dominiert wird von der Freisetzung des angehäuften Laktats, ist nicht erkennbar, ob das Herz in dieser Phase aerob oder anaerob arbeitet. In dieser Zeit erlaubt die Laktatbilanz noch keinen Schluß auf eine Insuffizienz des oxidativen Stoffwechsels. Auch der Sauerstoffverbrauch ist hier kein adäquater Parameter, da bei Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung ein hohes  $\dot{V}_{O_2}$  mit geringer Energiebereitstellung einhergeht.

#### 4.5.3.2 Post-Äquilibrationsphase

Erst nach Abschluß der Äquilibration, also in der Regel nach 10-12 Minuten Reperfusion, ist die Laktatbilanz ein zulässiger, und dann auch sehr bedeutender, Indikator für die Erholung der oxidativen Energiegewinnung.

Zur Bestimmung der Menge an Laktat, die das Herz während 90 Minuten Reperfusion *netto* aufgenommen=verbraucht (positive Bilanz) oder abgegeben=produziert (negative Bilanz) hat, dienen folgende Überlegungen: Die kumulative Gesamtmenge des aufgenommenen bzw. abgegebenen Laktats ergibt

sich aus Abbildung 3.14 (S. 33). Abgezogen werden hiervon die Äquilibrationen (vgl. Tab. 4.1), da dieses Laktat bereits während Ischämie produziert und in der Reperfusion lediglich ausgespült wurde. Diese Korrektur geht davon aus, daß der Laktatspiegel im Myokard nach Abschluß der Äquilibration auf Niveau der Reperfusion (d.h. 5 mmol/L) liegt. Tatsächlich ist er gegen Ende der Reperfusion aber höher. Die Differenz zwischen dem tatsächlichen Spiegel und dem vermeintlichen muß als zusätzliche Laktatproduktion gewertet werden.

Die Nettoproduktion errechnet sich für die Gruppen wie folgt: (Tab. 4.2)

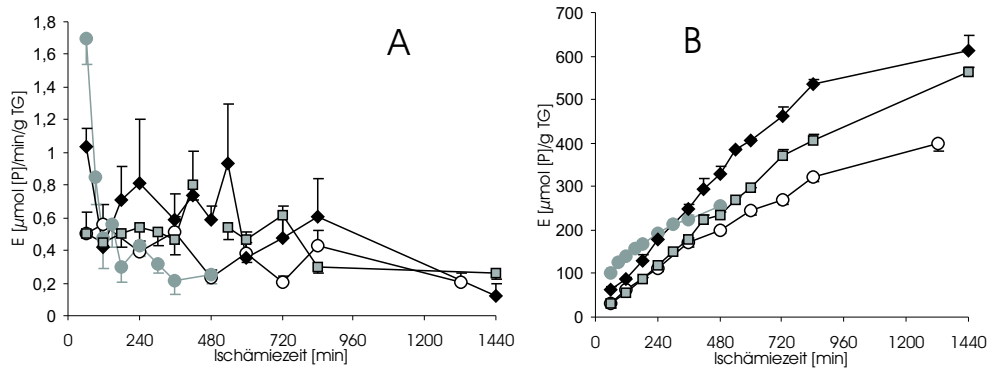
	480' Ischämie			600' Ischämie		
	5°C	10°C	15°C	5°C	10°C	15°C
	[mmol/100g FG <sub>cor</sub> ]			[mmol/100g FG <sub>cor</sub> ]		
Bilanz über 90'	-6,340	-5,428	-6,070	-4,119	-3,531	-7,869
Äquilibration	-1,486	-1,838	-2,851	-2,019	-2,451	-3,623
[Laktat] 90. min	$0,628 \pm 0,053$	$0,683 \pm 0,040$	$1,027 \pm 0,126$	$0,663 \pm 0,084$	$0,635 \pm 0,127$	$0,787 \pm 0,168$
Korrektur	-0,128	-0,183	-0,527	-0,163	-0,136	-0,287
Produktion in 90'	-4,982	-3,773	-3,746	-2,263	-1,216	-4,533

**Tabelle 4.2:** Nettoproduktion an Laktat über 90 Minuten Reperfusion, positive Werte bedeuten Aufnahme, negative Abgabe aus den Myozyten. Laktatproduktion = (Bilanz – Äquilibration) + Korrektur. Der Korrekturwert entsteht durch Subtraktion der Laktatkonzentration der HTK-Lösung (5 mmol/L) von der Konzentration im Gewebe nach 90' Reperfusion.

Nach diesen Werten liegt die Lagerungstemperatur, die in der Reperfusion die geringste Laktatproduktion zur Folge hätte, bei 8-stündiger Ischämie zwischen 10° und 15°C, nach 10 Stunden Ischämie hingegen zwischen 5° und 10°C.

Keine Gruppe, mit Ausnahme der 600'-10°C-Herzen zwischen der 25. und 55. Minute der Reperfusion, verstoffwechselt in nennenswertem Umfang Laktat (Abb. 3.14, S. 33). Obwohl Laktat ein bevorzugtes Substrat des myokardialen Stoffwechsels ist, zeigen nur wenige Versuche eine Laktatumskehr, also den Übergang von initialer Laktatabgabe zu Laktataufnahme. Nach 8 Stunden Ischämie setzt sich die Laktatabgabe in allen Gruppen kontinuierlich über 90 Minuten fort. Nach 10 Stunden Ischämie schaffen es immerhin die Gruppen 5° und 10°C, eine ausgeglichene Laktatbilanz vorzuweisen. Die 15°C-Herzen setzen wiederum während der gesamten Reperfusion Laktat frei.

Die fortgesetzte Laktatproduktion spricht für einen insuffizienten aeroben Stoffwechsel. Dieser betrifft entweder global das gesamte Herz oder im Sinne der „letzten Wiesen“ lediglich das subendokardiale Myokard. Dabei ist es unwahrscheinlich, daß eine Schädigung der Enzyme der Atmungskette hierfür verantwortlich ist. Das tendentiell bessere Abschneiden der Gruppen nach der längeren Ischämiezeit spricht dagegen. Man muß vielmehr vermuten, daß ein gegenüber dem Bedarf mangelhaftes O<sub>2</sub>-Angebot der limitierende Faktor war. Der Vergleich mit der Gesamt-Sauerstoffaufnahme (vgl. Tab. 3.1, S. 31) bestätigt allerdings die Vermutung nicht, daß eine hohe Laktatproduktion in der Reperfusion hauptsächlich die Herzen mit niedriger O<sub>2</sub>-Aufnahme betrifft. Somit scheint keine globale Unterversorgung stattgefunden zu haben, sondern eher lokale Inhomogenitäten in der Perfusion eine Rolle zu spielen. Es ist wahrscheinlich, daß neben suffizient aeroben Bereichen (mit vermutlich Laktataufnahme) auch minderperfundierte



**Abbildung 4.5:** Energieumsatz in Ischämie. (A) im Verlauf, (B) kumulativ aufgetragen, angegeben in  $\mu\text{mol} [\sim P] \cdot \text{gTG}^{-1} \cdot (\text{min}^{-1})$ . HTK  $5^\circ\text{C}$  (—○—),  $10^\circ\text{C}$  (—□—),  $15^\circ\text{C}$  (—●—) bzw. reine Ischämie  $5^\circ\text{C}$  (—●—). Fehler: SEM.

(mit Laktatabgabe) vorlagen, etwa die in der Perfusion nachgeschalteten Innenschichten des Myokards. In der Laktatbilanz des Herzens überlagern sich diese verschiedenen Areale.

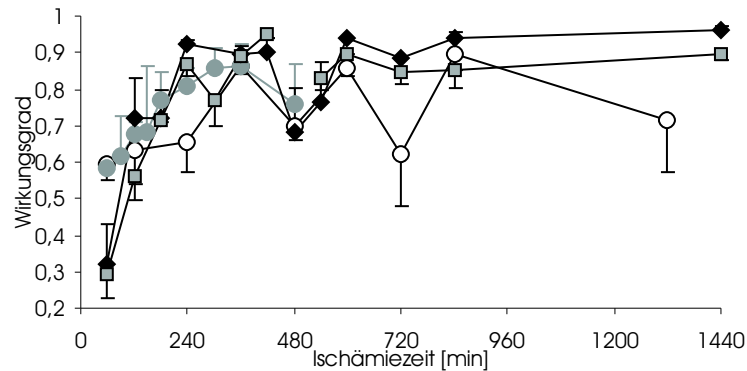
Der Vergleich von Laktatproduktion und Calcium-Bilanz in Reperfusion (vgl. Abb. 3.18, S. 37) zeigt, daß Gruppen mit persistierender Laktatproduktion auch eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme aufweisen. In diesen Gruppen könnte eine zytosolische und konsekutiv mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung die oxidative Phosphorylierung entkoppelt und damit die energetische Situation der Zelle verschlechtert haben, so daß zumindest lokal der Stoffwechsel anaerob war.

#### 4.5.4 Energetische Betrachtungen

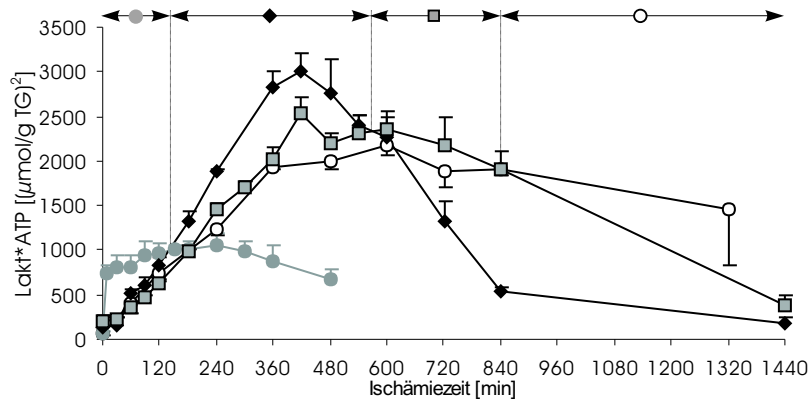
Aus den Konzentrationsverläufen von Laktat, ATP und PKr lassen sich myokardialer Energieumsatz und Wirkungsgrad der anaeroben Glykolyse in der Ischämie verfolgen (Formeln siehe S. 17). Der Energieumsatz in Abhängigkeit von der Ischämiezeit ist in Abb. 4.5 wiedergegeben. Die zum Teil erheblichen Schwankungen zwischen einzelnen Meßpunkten werden durch die kumulative Darstellung geglättet.

Der Wirkungsgrad der anaeroben Glykolyse unterliegt meßbedingt ebenso erheblichen Schwankungen. Unterschiede zwischen den Gruppen sind nach Abb. 4.6 kaum festzustellen. Werden diese Werte wiederum kumulativ berechnet, was in diesem Fall zwar ohne inhaltliche Aussage bleibt, doch dauerhafte geringe Differenzen zwischen den Gruppen zu erkennen hilft, trennen sich die Kurven signifikant. Ab etwa 12 Stunden Ischämie ist der mittlere Wirkungsgrad bei  $15^\circ\text{C}$  signifikant höher als bei  $10^\circ\text{C}$ , dieser wiederum signifikant höher als bei  $5^\circ\text{C}$ -Lagerung.

Ein Indikator, der eine Abschätzung postischämischer Funktion aus intraischämisch gemessenen Werten zuläßt, muß folgende Faktoren berücksichtigen: 1. Ein gewisser Energieumsatz in der Ischämiephase ist nötig, um die zelluläre Struktur und ein Elektrolytmilieu aufrechtzuerhalten. 2. Ein adäquater Level an ATP ist für eine Wiederbelebung essentiell.



**Abbildung 4.6:** Wirkungsgrad der anaeroben Glykolyse. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—), 15°C (—◆—) bzw. reine Ischämie 5°C (—●—). Fehler: SEM.



**Abbildung 4.7:** [Laktat·ATP]-Produkt in Ischämie. HTK 5°C (—○—), 10°C (—□—), 15°C (—◆—) bzw. reine Ischämie 5°C (—●—). Fehler: SEM.

Das Produkt aus ATP und Laktat hat folgende Eigenschaften: Es wird zum einen sehr klein, wenn bei kalter Lagerung die anaerobe Glykolyse sehr langsam abläuft (wenig Laktat) bei guter ATP-Bewahrung, zum anderen aber auch, wenn etwa bei warmer Lagerung und hoher Glykolyse ATP rasch verfällt. Ein hohes [ATP·Laktat] bedeutet folglich intakte Glykolyse bei möglichst geringem ATP-Verfall.

Abb. 4.7 verdeutlicht den Verlauf des [Laktat·ATP]-Produktes. Innerhalb der ersten zwei Stunden führt die reine Ischämie (ohne Konservierung) bei 5°C, nach diesem Zeitpunkt bis etwa 8 Stunden hat die HTK-15°C-Gruppe die höchsten Werte, dann übernimmt 10°C die Führung bis ca. 14 Stunden, danach 5°C-Herzen. Hieraus folgt, daß die optimale Temperatur abhängig ist von der geplanten Lagerungszeit der Herzen. Je länger die Aufbewahrung, desto kälter die erforderliche Temperatur.

## 4.6 Funktionelle Entwicklung in Reperfusion

Die postischämische Entwicklung der Inotropie und Kontraktilität sowie die Rhythmusstabilität sind Indizes für die funktionelle Erholung des Myokards nach einer Ischämiebelastung.

Die Druckanstiegsgeschwindigkeit  $dp/dt$ , und somit auch die Größen  $dp/dt_{max}$  und, als Maß für die Relaxation,  $dp/dt_{min}$ , sind abhängig von den Arbeitsbedingungen des Herzens, insbesondere von seiner Vor- und Nachlast [14, 65, 85]. Sie steigen sowohl in Folge einer vermehrten Vordehnung des Ventrikels - etwa durch ein erhöhtes enddiastolisches Volumen oder einen höheren koronaren Perfusionsdruck, als auch mit zunehmender Inotropie an.

Ein von diesen Bedingungen weitgehend unabhängiger Parameter ist die 2. Ableitung des Ventrikeldrucks nach der Zeit, die maximale Druckanstiegsbeschleunigung  $dp/dt_{max} \cdot t - dp/dt_{max}$  [14, 30, 65]. Dieser Quotient erscheint daher als geeigneter Parameter zur Bewertung der Erholung der mechanischen Aktivität des Herzens nach einer Ischämie. Die korrekte Erhebung dieses Wertes kann allerdings im Einzelfall schwierig werden, wenn die Kurvencharakteristik atypisch wird und in dem auszuwertenden Intervall starken Schwankungen unterliegt.

Da die hämodynamischen Bedingungen während der Reperfusion in allen Versuchen nahezu identisch waren, dürfen die „problematischen“ Parameter  $dp/dt_{max}$ ,  $dp/dt_{min}$  und  $dp/dt_{min} : dp/dt_{max}$  dennoch als Maß der funktionellen Erholung des Myokards angesehen werden.

Der funktionelle Aspekt der Erholung des postischämischen Myokards ist der klinisch relevante, erlaubt er doch am ehesten Rückschlüsse auf die Fähigkeit des Herzens, eine suffiziente Kreislaufarbeit zu übernehmen. Dabei spiegeln sich in den funktionellen Parametern die oben diskutierten - Homöostase der Elektrolyte sowie metabolischer Status des Myokards - als notwendige Voraussetzung wider.

### 4.6.1 Kontraktilität - $dp/dt_{max}$ bzw. $dp/dt_{max} \cdot t - dp/dt_{max}$

In unseren Versuchen zeigten die Parameter  $dp/dt_{max}$  (vgl. Abb. 3.9, S. 29) und  $dp/dt_{max} \cdot t - dp/dt_{max}$  (Abb. 3.11, S. 30) während Reperfusion nach 8 bzw. 10 Stunden Ischämie stets einen analogen Verlauf, wobei ersterer eine höhere statistische Trennschärfe zwischen den Gruppen erreichte.

Übereinstimmend ergeben sich aus beiden Parametern folgende Aussagen: Nach 8-stündiger Ischämie zeigt die 5°C-Gruppe trotz passabler Ausgangswerte die quantitativ und im zeitlichen Ausmaß geringste Erholungstendenz, ein Sistieren der Erholung ab ca. der 20. Minute und die geringsten Werte am Ende der Reperfusion. Diese Charakteristika treffen nach 10-stündiger Ischämie für die 15°C-Gruppe zu, wobei hier das absolute Niveau leicht tiefer liegt als das der 5°C Herzen nach 8h Ischämie. Die beste Erholung - sowohl im Hinblick auf die Werte am Ende der Reperfusion als auch auf die Kontinuität der Verbesserung - zeigen ungeachtet der Ischämiezeit die 10°C-Herzen. Auch wenn sie nach 8-stündiger Lagerung auf sehr niedrigem Niveau starten, zeigen sie doch den stärksten Anstieg der Kontraktilität über 90 Minuten, ohne daß in dieser Zeit schon ein Plateau ersichtlich wäre.



Es ist nicht einfach, das Verhalten dieser beiden Parameter der Inotropie mit dem Verlauf anderer während der Reperfusion gemessener Größen zu korrelieren. Zwar zeigen die 10°C-Herzen nicht nur die besten Ergebnisse in Bezug auf  $dp/dt_{max}$  und  $dp/dt_{max}:t-dp/dt_{max}$ , sondern haben - ungeachtet der Lagerungszeit - auch den geringsten Koronarwiderstand, den höchsten Sauerstoffverbrauch und eine nahezu ausgeglichene Bilanz der Elektrolyte  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Ca^{2+}$ . Für die relative Verbesserung der 5°C-Gruppe im Verhältnis zu 15°C nach der größeren Ischämiebelastung liefern aber nur die  $Ca^{2+}$ - und Laktatbilanzen während und der Trockengewichtsanteil nach Reperfusion Hinweise.

Unverständlich scheint die Tatsache, daß die funktionelle Erholung in den 5°C-Gruppen nach längerer Ischämiezeit tendentiell verbessert ist ( $p=ns$ ). Nach 10h ischämischer Lagerung erreichen die Herzen bis zum Ende der 90-minütigen Reperfusion höhere Werte für  $dp/dt_{max}$ ,  $dp/dt_{min}$  und  $dp/dt_{min}:t-dp/dt_{max}$  als nach 8h. Navas et al. [66] berichten von ähnlichen Ergebnissen und führen diese auf eine nach längerer Hypothermie verringerte  $Ca^{2+}$ -Überladung der Zellen zurück. Diese Beobachtung läßt sich in unseren Versuchen jedoch nicht bestätigen, denn die Elektrolytverschiebungen -  $Ca^{2+}$ - und  $Na^+$ -Aufnahme,  $K^+$ -Abgabe - sind nach größerer Ischämiebelastung (10h vs. 8h) jeweils deutlicher ausgeprägt, wenngleich die Verschlechterung bei 5°C wesentlich geringer ausfällt als bei 15°C-Herzen. Lediglich die Laktatbilanz, der pH-Verlauf und der Trockengewichtsanteil weisen innerhalb der 5°C-Gruppen nach 10h Ischämie in absoluten Zahlen ein besseres Ergebnis auf als nach 8h.

Allerdings kann das schlechte Abschneiden der 5°C-Herzen nach 480 min Ischämie auch eine Auswirkung der hohen Arrhythmierate dieser Gruppe sein. Als Ursache dafür kommt in Frage, daß in dieser Gruppe der initiale AV-Block in Reperfusion dank der geringeren Ischämiebelastung und der tieferen Hypothermie relativ schnell reversibel war und Vorhofarrhythmien auf die Kammer übergeleitet wurden. Tatsächlich bemerkte man in dieser Gruppe einige Male den Übergang von einem ventrikulären Ersatzrhythmus auf Sinusrhythmus. Rhythmusstabilität ist eine der Voraussetzungen für die Erholung der Kontraktilität, weil sie eine koordinierte mechanische Aktivität erlaubt und den Energiebedarf des Herzens senkt, was insbesondere zu Beginn der postischämischen Erholung von Bedeutung ist, wenn der Energievorrat noch reduziert ist.

Es bleibt aber zu vermuten, daß neben den beobachteten Parametern weitere Faktoren existieren, die die postischämische funktionelle Erholung des Myokards beeinflussen. Vorstellbar sind etwa das Ausmaß der HSP70-Expression, das mit der Dauer der Hypothermie positiv korreliert [6]. Steigende Konzentrationen an HSP70-Protein könnten durch ihren zytoprotektiven Effekt die funktionelle Erholung der Kardiomyozyten nach längerer Hypothermie verbessern.

#### 4.6.2 Relaxation - $dp/dt_{min}$ bzw. $dp/dt_{min}:dp/dt_{max}$

Die Relaxationsgeschwindigkeit des Myokards,  $dp/dt_{min}$  (vgl. Abb. 3.10, S. 29) ist unter anderem abhängig von einem adäquaten zytosolischen ATP-Spiegel, der die Voraussetzung für die Lösung der Querbrücken ist, und von der Suffizienz der  $Ca^{2+}$ -ausschleusenden Mechanismen. Beide Faktoren sind in besonderem Maße ischämie- und hypothermiesensibel. Physiologischerweise beträgt  $dp/dt_{min}$  etwa

80% von  $dp/dt_{max}$ .

Folgende Beobachtungen fallen bei unseren Versuchen auf:

1.  $dp/dt_{min}$  ist im Gruppenmittel immer kleiner als  $dp/dt_{max}$ ;
2. nach 8-stündiger Ischämie ist das  $dp/dt_{min}$  der 5°C-Gruppe mit Abstand am geringsten, weil sich aber auch  $dp/dt_{max}$  in dieser Gruppe schlecht erholt, lassen sich die Gruppenunterschiede bei Betrachtung von  $dp/dt_{min}:dp/dt_{max}$  nicht nachweisen;
3. nach 10-stündiger Ischämie zeigt die 5°C-Gruppe in beiden Darstellungsweisen die besten Werte.

Systematisch korreliert die Relaxationsgeschwindigkeit mit keinem der weiteren beobachteten Parameter. Insbesondere können weder die  $Ca^{2+}$ -Bilanz während Reperfusion noch der ATP-Gehalt des Myokards, der in Reperfusion nur abgeschätzt werden kann aus postischämischen Gruppenwert und dem Meßwert am Ende der Reperfusion, die Erholung der Relaxation vor allem der 5°C-Gruppe erklären.

#### 4.6.3 Rhythmusstabilität

Neben Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit gehört die Stabilität des Herzrhythmus zu den klinisch wichtigsten Parametern bei der Bewertung der postischämischen Organfunktion. Da kardiale Rhythmusstörungen die Koronardurchblutung im wesentlichen zu Lasten der Innenschichten des Myokards beeinträchtigen, den energetischen Wirkungsgrad wie auch den Wirkungsgrad der Pumpfunktion der Ventrikel herabsetzen und mit erhöhtem Flimmerrisiko einhergehen [30], gefährden sie die Wiederbelebbarkeit des Herzens.

Zur Bewertung der Rhythmusqualität in der Reperfusion wurden für jeden Versuch im 10 Minuten-Abstand 4 Sichtfenster à 30 sec. nach folgenden Kriterien mit Noten von 1-4 bewertet:

1. Regelmäßiger Rhythmus aus einem Fokus. Höchstens 5% Extrasystolen.
2. Regelmäßiger Rhythmus aus einem Fokus, mehr als 5% atypische Erregungen.
3. Unregelmäßiger Rhythmus, evtl. mehrere Foci, mit rhythmischen Abschnitten.
4. Keine Regelmäßigkeit im Rhythmus erkennbar.

Die Schwierigkeit besteht hierbei in der objektiven und reliablen Benotung. Durch die Auswertung aller Versuche innerhalb weniger Tage durch einen einzigen Untersucher sollten auswertungsbedingte Schwankungen minimiert werden.

Das Ergebnis (vgl. Abb. 3.8, S. 28) zeigt, daß die Rhythmusstabilität qualitativ ein ähnliches Verhalten zeigt wie Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit. Dabei fällt auf, daß der Rhythmus nach größerer Ischämiebelastung in den Gruppen 5°C und 10°C im Schnitt bessere Noten erhält als nach der kürzeren Ischämiezeit. 15°C-Herzen können immerhin ihr Niveau halten. Folgende Überlegungen können zur Erklärung dieses scheinbar paradoxen Verhaltens beitragen:

- Analog zu dem Gesagten über die Herzfrequenz könnten die schlechteren Rhythmusnoten nach 8h Ischämie bei 5°- und 10°C-Herzen Ausdruck einer funktionierenden Vorhof-Kammer-Überleitung sein, während nach der größeren Ischämiebelastung oder höheren Lagerungstemperatur der AV-Block zumindest im 90-minütigen Reperfusionszeitraum nicht reversibel war. Hinweis auf den persistierenden AV-Block liefert die Herzfrequenz, die meist deutlich unter  $90 \text{ min}^{-1}$ , der Sinusfrequenz des denervierten Hundeherzens, liegt.
- Das Reizleitungssystem des Herzens ist aufgrund morphologischer und energetischer Besonderheiten in besonderem Maße ischämiesensibel (kein transversales SR, veränderte Energetik). Daher ist verständlich, daß auch seine postischämische Erholung einer eigenen Kinetik folgt. Aus den Kurven für Herzfrequenz und Rhythmusqualität ergäbe sich eine Erholungszeit des AV-Knotens (bzw. des Reizleitungssystems) von 30-40 min.
- Terminale Nervenendigungen des Sympathikus im Herzen enthalten Katecholamine, die in Ischämie und Reperfusion freigesetzt werden und die Herzfrequenz und Ektopierate im Myokard steigern können. Da ihre Synthese energieaufwendig ist, dürfte ihre Konzentration mit zunehmender Ischämiedauer abnehmen.

Dem letzten Argument kommt besondere Bedeutung zu. Die Entspeicherung sympathischer Endvarikositäten in Ischämie ist vielfach nachgewiesen [33, 110]. Noradrenalin (NA) kann aus Nervenendigungen zum einen durch Depolarisation über  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Exozytose freigesetzt werden, zum anderen über einen Carrier-vermittelten Prozeß, der  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig nichtexozytotisch arbeitet. Während HTK-Kardioplegie die exozytotische NA-Freisetzung deutlich reduziert, wird der Carrier-vermittelte Mechanismus durch HTK stimuliert [33]. Wie im Myokard von Ratte und Mensch nachgewiesen werden konnte, ist letzterer Weg der hauptsächliche Mechanismus in Ischämie [33]. Dabei findet der NA-Auswärtstransport über den neuronalen Katecholamin-Transporter (uptake<sub>1</sub>-carrier) statt, der durch Desipramin hemmbar ist. Er benötigt einen  $\text{Na}^+$ -Gradienten über das Axolemm nach extrazellulär. Dieser ist in der beginnenden Reperfusion durch das niedrige  $\text{Na}^+$  des extrazellulären HTK-Milieus und die verstärkte Aktivität des  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ -Tauschers (NHE) bei intrazellulärer Azidose gegeben. Allerdings läßt sich die NA-Entspeicherung unter HTK auch mit Desipramin nicht vollständig hemmen, so daß man davon ausgehen muß, daß noch ein dritter, derzeit unbekannter Mechanismus existiert [33]. Eine Blockade des NHE mit Amilorid oder Cariporid hingegen kann sowohl das Ausmaß der ischämischen NA-Freisetzung als auch die Inzidenz von Reperfusionsarrhythmien deutlich senken [33].

Die Noradrenalin-Freisetzung während Reperfusion folgt einer Kinetik 1. Ordnung. Das weist darauf hin, daß NA bereits in Ischämie in den interstitiellen Raum abgegeben wurde und in Reperfusion lediglich ausgespült wird. Entspeichertes NA führt über eine  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation am Myokard zur Bildung von Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ), welches  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freizusetzen vermag und auf diese Weise proarrhythmogen wirkt. Voraussetzung für die  $\text{IP}_3$ -Bildung ist ein im reverse-mode operierender  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Tauscher (NCX)

[110], der seinerseits die Zelle auch von extrazellulär mit  $\text{Ca}^{2+}$  überladen kann. Die Ionenverhältnisse während der Reperfusion nach HTK-Ischämie begünstigen die NCX-Funktion im reversed-mode. Die Inhibition des reverse-mode-NCX mit KB-R7943 reduziert zwar Reperfusionsarrhythmien, hat aber keinen Einfluß auf die NA-Freisetzung, weil sie nicht in den  $\text{Na}^+$ -Haushalt eingreift [110].

Weiterhin führt Noradrenalin an den Koronarien zu prolongierter Unterbrechung der Kapillarperfusion und somit zu regionaler Minderversorgung des Myokards. Das begünstigt die Entstehung arrhythmogener Foci. Das belegen auch die Ergebnisse von Remme et al. [81], bei denen nur in Herzen mit erhöhter NA-Freisetzung ventrikuläre Tachykardien und Kammerflimmern auftraten.

In den vorliegenden Versuchen gehen nach 10-stündiger Ischämie ein schlechterer Rhythmus mit einem größeren  $\text{K}^+$ -Verlust und einer höheren Nettoaufnahme von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  einher. Nach 8-stündiger Ischämie lassen sich solche systematischen Parallelen nicht erkennen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Eigenschaften der HTK-Kardioplegie eine neuronale Entspeicherung von Katecholaminen begünstigen, wodurch sich die beobachteten Arrhythmien in Reperfusion erklären lassen. Deren Ausmaß korreliert nur bei kurzen Ischämiezeiten (bis ca. 30 min, nach [33]) mit der Ischämiedauer, so daß man bei den vorliegenden Versuchen nicht ohne weiteres von der Qualität des Herzrhythmus auf das Ausmaß der Schädigung des Myokards schließen kann. Vielmehr muß man davon ausgehen, daß der neuronale Katecholamingehalt im Ischämieverlauf langsam abnimmt, weil die Neusynthese energieaufwendig ist. Allerdings korreliert die Stabilität des Herzrhythmus mit der Erholung der Kontraktilität und ist vielleicht sogar dessen Voraussetzung. Auf diesem Hintergrund läßt sich verstehen, warum die längere Ischämiezeit z.T. sehr gute Ergebnisse in Bezug auf Rhythmusstabilität und Inotropie aufweist.

## 4.7 Ausblick

### 4.7.1 Der Winterschlaf als Vorbild der Natur

Der Winterschlaf ist ein Adaptationsprozeß einiger homöothermer Säugetiere in der kalten Jahreszeit. Durch Veränderungen, deren molekulare Mechanismen noch größtenteils unbekannt sind, kann der Winterschläfer eine längere Periode ohne Nahrungsaufnahme ohne (irreversible) Schäden überdauern. Dabei werden viele für das Überleben nicht unabdingbare physiologische Prozesse angehalten - etwa renale und intestinale Aktivität, Immunsystem, Zellteilung, Transkription und Translation, einige notwendige allerdings auf reduziertem Niveau beibehalten. So findet man bei Winterschläfern eine Herzfrequenz von etwa  $3\text{-}5 \text{ min}^{-1}$  und eine Atemfrequenz von  $4\text{-}6 \text{ min}^{-1}$  bei längeren Apnoeperioden. Das Herzzeitvolumen wird deutlich zugunsten von ZNS, Herz und Leber umverteilt.

Die subzellulären Veränderungen, die der Winterschläfer erfährt - intrazelluläre Azidose, Hypoxie, Hypothermie, Verlust energiereicher Phosphate, Volumenverschiebungen - ähneln denen bei hypothermer Organkonservierung, werden im Gegensatz zu dieser aber zum Teil über Monate gut toleriert.

Es stellt sich daher die Frage, welche Unterschiede bei der Hypothermie im Hibernating bestehen, die die größere Toleranz dieser Gewebe gegenüber

Ischämie, Azidose und Hypothermie erklären könnten. Das Ausmaß von Organschäden durch Hypoxie und Hypothermie nimmt in folgender Reihenfolge ab: Nicht-winterschlafende Spezies > sommeraktive Winterschläfer >> winterschlafende Winterschläfer [17]. Das läßt den Schluß zu, daß die Schutzmechanismen im Winterschlaf zum einen auf veränderte Konstitution der Gewebe zurückzuführen sind, zum (bedeutenderen) Teil aber auch auf induzierbare Prozesse, die man im klinischen Kontext der Organprotektion evtl. imitieren kann.

Im folgenden sollen einige Parameter genauer betrachtet werden, bei denen sich Unterschiede zu den Verhältnissen bei der hypothermen Organprotektion ergeben.

#### 4.7.1.1 Körpertemperatur im Winterschlaf

Die Körpertemperatur  $T_b$  (b...body) der Organismen im Winterschlaf ist eine ebenso präzise regulierte Größe wie  $T_b$  im sommeraktiven Zustand. Ein bestimmter Abfall in der ambientalen Temperatur  $T_a$  kann den Übergang des Organismus in den Winterschlaf induzieren. In der Phase der Abkühlung, solange  $T_a$  größer ist als die jeweilige Zielgröße für  $T_b$ , wird die Körpertemperatur bis auf wenige Grade der Umgebung angepaßt, bis eine spezies-spezifische Temperatur erreicht wird, die auch bei weiterem Abfall von  $T_a$  nicht unterschritten wird. Somit ist das Hibernating kein Rückfall in ein poikilothermes Regulationsmuster, sondern eine sog. zweite Homöothermie, eine Sollwertverstellung zugunsten einer tieferen Körpertemperatur.

Der Zielwert für  $T_b$  im Winterschlaf orientiert sich an der Stoffwechselaktivität der jeweiligen Spezies. Gemeinsam ist allen Winterschläfern vom arktischen Ziesel bis zum Schwarzbär eine spezifische metabolische Rate im Winterschlaf von etwa  $0,1 \text{ kcal} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Nun hängt der Energie-Grundumsatz (basale metabolische Rate BMR) eines jeden Säugetiers nach dem sog. *surface rule of metabolism* vom Körpergewicht ( $m$ , in kg) ab [89, 90]:

$$BMR = 63,3 \cdot m^{-0,38} \left[ \frac{\text{kcal}}{\text{kg} \cdot \text{day}} \right]$$

Kleinere Tiere haben also aufgrund ihres ungünstigeren Verhältnisses von Körperoberfläche zu Körpergewicht gewichtsbezogen einen größeren Grundumsatz. Sie erreichen die erwähnte allgemeine basale metabolische Rate des Winterschlafs bei sehr tiefen Körpertemperaturen, wohingegen größeren Organismen dazu eine geringere Hypothermie ausreicht. Auf diese Weise ergeben sich Temperaturen zwischen  $-3^\circ\text{C}$  (bzw.  $-2^\circ\text{C}$ ) für den arktischen Ziesel und  $+34^\circ\text{C}$  für den Schwarzbär, sie liegen meist aber zwischen  $+2^\circ$  und  $+10^\circ\text{C}$  [8, 17, 90]. Sinkt  $T_a$  unter die jeweilige Zielgröße für  $T_b$  ab, steigt der Energieumsatz des Tieres, um eine weitere Reduktion der Körpertemperatur entgegenzuwirken. Auf weiteres Abkühlen reagieren die Tiere mit einem induzierten Erwachen [90].

Die so eingestellte basale metabolische Rate im Winterschlaf von ca.  $0,1 \text{ kcal} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  entspricht etwa dem zellulären Strukturhaltungsumsatz. Daraus ergibt sich der Hinweis, daß es einen spezifischen Energieumsatz gibt, unterhalb dessen Säugetiere nicht längere Zeit ohne irreversiblen Schaden überleben können. Der Mensch würde diese Rate bei einer Körpertemperatur von

etwa 10-15°C [90] erreichen, beim Hund läge sie leicht darunter.

#### 4.7.1.2 Säure-Base-Haushalt

Wechselwarme Organismen passen ihren Blut-pH in Hypothermie, zumindest in dem Temperaturbereich, in dem sie ihre physische Aktivität aufrechterhalten, an den Neutralpunkt des Wassers an. Diese sog. alpha-stat-Regulation bewahrt durch ein konstantes Protonierungsverhältnis der Proteine die Funktionsfähigkeit der Enzyme. Auf diese Weise verändert sich auch der pH in einem in Hypothermie gelagerten Organ.

Im Übergang zum Winterschlaf bewahren winterschlafende Spezies hingegen die absolute  $H^+$ -Konzentration von  $10^{-7,4}$  mol/L, was im Vergleich mit der temperaturabhängigen Erhöhung des Neutralpunktes von Wasser eine relative Azidose bedeutet. Diese „respiratorische“ Azidose resultiert aus der stark reduzierten Atemfrequenz und reduziert die Stoffwechselaktivität zusätzlich zu dem Effekt durch Kälte. Einige Organe, deren Aktivität weniger stark abgesenkt werden soll, werden jedoch auch im Winterschlaf nach dem poikilothermen Muster reguliert. So verhält sich der intrazelluläre pH in Herz und Leber nach der alpha-stat-Theorie [90]. Die Perioden des Aufwachens beginnen mit einer erhöhten Atemfrequenz, die die systemische Azidose beendet.

Eine essentielle Bedingung für anaerobes Überleben ist eine effiziente Pufferung. Nur dann kann ein übermäßiger Abfall des pH verhindert werden und eine Funktionsfähigkeit der Organe, die für das jederzeit induzierbare Erwachen garantiert sein muß, aufrechterhalten werden.

#### 4.7.1.3 Elektrolytgleichgewicht und Membranpotential

Ein zentrales Problem der Hypothermie bei Nicht-Winterschläfern ist die zunehmende Depolarisation der Membranen durch Sistieren der membrangebundenen ATPasen, vergrößerte Permeabilität der Membranen und als Folge einen allmählichen Verlust der Elektrolytgradienten [17, 66, 94][vgl. Nernst'sche Gleichung]. Einige Adaptationen des Winterschläfers tragen dem Rechnung:

- Veränderte Zusammensetzung der Membran. Ein erhöhter Anteil ungesättigter Fettsäuren zur Erhöhung der Fluidität wurde nur in manchen Organen nachgewiesen (etwa Gehirn), in anderen jedoch nicht [17]. Gleichwohl gibt es Hinweise, daß der passive Efflux von Elektrolyten durch das Sarkolemm im winterschlafenden Myokard bei 5°C reduziert ist [17, 19, 70, 90].
- Die  $Ca^{2+}$ -Homöostase ist beim Winterschläfer überraschend temperaturresistent. Auch in tiefer Hypothermie wird der  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle minimiert und die  $Ca^{2+}$ -Entfernung aus dem Zytosol durch Hochregulation der SR- $Ca^{2+}$ -ATPase verbessert. Eine veränderte Öffnungskinetik des L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanals und des Ryanodin-Rezeptors sowie eine effizientere  $Ca^{2+}$ -Speicherung durch ein modifiziertes Calsequestrin im SR verbessern die  $Ca^{2+}$ -Homöostase in Hypothermie weiter. Zu Details siehe Kap. 4.4.4.
- Auch die  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase ist im Hibernating in Hypothermie in den meisten Organen aktiver als bei nicht winterschlafenden Spezies. In manchen

Organen - etwa Herz und intestinales Epithel - ist sie sogar nahezu vollständig temperaturinsensitiv. Gleichzeitig wird durch die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit des ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanals das Membranpotential stabilisiert (vgl. Kap. 4.3.2.1) und die Noradrenalin-Entscheidung der sympathischen Endvarikositäten deutlich reduziert, wodurch die Inzidenz von Arrhythmien sinkt [81].

Winterschlafende Säugetiere sind in größerem Maße als Nicht-Winterschläfer in der Lage, in tiefer Hypothermie physiologische Gradienten für  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Ca^{2+}$  aufrechtzuerhalten. Dadurch wird das Membranpotential stabilisiert. Der dafür notwendige erhöhte Energieverbrauch, insbesondere der  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase, wird in Kauf genommen.

#### 4.7.1.4 Veränderte Genexpression

Im Winterschlaf können verschiedene Stoffwechselwege unterschiedlich reguliert werden. Für das Überleben kritische Prozesse können hochreguliert und die Expression schädlicher oder unnützer Mechanismen entsprechend inhibiert werden. Die steady-state-Level von mRNA und Proteinen der großen Mehrheit der Gene bleibt im Winterschlaf allerdings unverändert, in Übereinstimmung mit der Beobachtung, daß eine Wiederaufnahme des normalen zellulären Stoffwechsels bei den häufigen Phasen des Aufwachens jederzeit gegeben ist. Allerdings gibt es Hinweise auf eine verlängerte Halbwertszeit der mRNA in der Wintersaison [17].

Eine verstärkte Expression im Winterschlaf - auf Ebene der mRNA und des Proteins - findet sich etwa beim  $\alpha_2$ -Makroglobulin, einem in der Leber produzierten Breitspektrum-Proteaseinhibitor. Dieses Protein kontrolliert die Gerinnungsfunktionen und verhindert deren Aktivierung in der langen Ruhephase bei geringem Herz-Zeit-Volumen [17, 70]. Gerinnungszeiten sind im winterschlafenden Zustand im Gegensatz zum sommeraktiven stark verlängert. Weitere Beispiele für verstärkte Genexpression sind das Thyroxin-bindende Globulin (TBG), Apolipoprotein A1, Cathepsin H, Neuropeptide Y, Cytochrom C-Oxidase Untereinheit 1 und ATP-Synthase 6/8 in Niere, braunem Fettgewebe und Herz, NADH-Ubichinon-Reduktase Untereinheit 2 in Herz, Skelettmuskel und Leber, und die Myosin-Leichtkette in Herz und Skelettmuskel [17]. Die spezifische Bedeutung dieser Proteine im winterschlafenden Stoffwechsel ist vielfach noch unbekannt.

Eine Reihe anderer Stoffwechselmodifikationen stellt den Organismus von Kohlenhydrat- auf Fettsäuremetabolismus als wichtigste Energiequelle um. Eine verstärkte Expression von PDK4 (Pyruvat Dehydrogenase Kinase Isoenzym 4) supprimiert glykolytische Aktivität, während die TAG-Lipase, normalerweise eine Domäne des Pankreas, im Winterschlaf in hohem Maße auch im Herz exprimiert wird [17]. Auch das Fettsäurebindungsprotein (FABP) ist im braunen Fettgewebe im Hibernating in höheren Konzentrationen nachweisbar. Die so erhöhten Serumlipide und -ketone sollen selbst eine ischämie-protective Funktion besitzen [17].

Im Dienst einer adäquaten  $Ca^{2+}$ -Homöostase in Hypothermie werden L-Typ- $Ca^{2+}$ -Kanäle im Sarkolemm downreguliert, die SR- $Ca^{2+}$ -ATPase hingegen ver-

stärkt exprimiert [17].

Eine weitere Möglichkeit der Regulation von Stoffwechselwegen ist die der posttranslationalen Modifikation, etwa durch reversible Phosphorylierung. So wird etwa in den meisten Organen mit Ausnahme des Herzens die Aktivität der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, des größten zellulären Einzelverbrauchers an Energie [56], im Winterschlaf auf diese Weise reduziert [56, 17].

#### 4.7.1.5 Erhöhte Toleranz gegenüber zellulärem Streß

Zellulärer Streß in Form freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist bei Winterschläfern vor allem beim Übergang in die Hypothermie und in den Phasen des Aufwachens relevant. Dann werden Gewebe u.U. minder oder inhomogen perfundiert, der sprunghafte Anstieg der mitochondrialen Aktivität bedeutet zusätzliche ROS-Produktion. Im Sinne einer Adaptation werden im Winterschlaf die Konzentrationen der Antioxidantien Ascorbat, Superoxid-Dismutase und Glutathione-Peroxidase in einigen Organen erhöht. Zusätzlich wird das Glukose-regulierte Protein GRP-75 induziert, ein Mitglied der protektiven HSP-70-Familie. Auf diese Weise erklärt sich die erhöhte Streß-Toleranz der Organismen im Winterschlaf [17]. Auch die Induktion des NF- $\kappa$ B soll bei winterschlafenden Spezies, im Gegensatz zur Wirkung bei Nicht-Winterschläfern, zumindest im Darm durch die Aktivierung anderer Ziel-Gene eine protektive und antiapoptotische Rolle spielen [17].

#### 4.7.1.6 Grenzen der metabolischen Reduktion

Die Tatsache, daß winterschlafende Tiere in regelmäßigen Abständen für 12-24 Stunden zum Wachzustand zurückkehren müssen, zeigt, daß der verlangsamte Stoffwechsel im Hibernating kein neues steady-state erreicht, sondern auf Kompensationsmechanismen angewiesen bleibt, die niemals unerschöpflich sein können. Die Akkumulation toxischer Metabolite oder eine fortschreitende Depolarisation wären denkbare Induktoren des regelmäßig einsetzenden Erwachens [90].

Hierdurch wird die Wichtigkeit einer effizienten Pufferung verdeutlicht, die den pH-Abfall in den Perioden des Winterschlaf limitiert und die Fähigkeit der Zellen, zumindest auf niedrigem Niveau anaerob stoffwechselaktiv zu bleiben, aufrechterhält.

#### 4.7.1.7 Zusammenfassung

Die Reduktion der Körpertemperatur ist eine effiziente Weise, den Energieverbrauch des Organismus in Zeiten der Nahrungsknappheit temporär abzusenken. Im Winterschlaf ergeben sich jenseits des bloßen Temperatureffekts weitere Adaptationen:

- Alle Winterschläfer regulieren ihre Körpertemperatur im Winterschlaf auf den Wert, dem ein basaler Energieumsatz in Höhe des Strukturerhaltungsumsatzes der Zellen entspricht. Eine weitere Reduktion der Körpertemperatur findet nicht statt. Beim Menschen entspräche dieser Umsatz einer Körpertemperatur von 10-15°C.



- Eine limitierte respiratorische oder metabolische Azidose ist ein zusätzlicher protektiver Faktor, weil der Stoffwechsel weiter verlangsamt wird. Bestimmte Gewebe werden von dieser Inhibition ausgenommen und abweichend nach alpha-stat geregelt, um auch in Hypothermie eine Restaktivität zu behalten (Herz, Leber).
- Viele Adaptationsmechanismen zielen auf die Aufrechterhaltung physiologischer Elektrolytgradienten und des Membranpotentials in Hypothermie. Diese energieintensiven Prozesse haben Vorrang vor unbedingter Minimierung des Energieverbrauchs.
- Stoffwechselschritte werden nicht global durch die Hypothermie verlangsamt, sondern differentiell reguliert. Wichtige Funktionen behalten oder steigern sogar ihre Aktivität in winterschlafenden Geweben.
- Der Winterschlaf zeichnet sich durch eine besondere Toleranz gegenüber zellulärem Streß aus.
- Ein metabolisches steady-state wird im Winterschlaf nicht erreicht. Kompensationsmechanismen sind erforderlich und führen bei Überlastung zum Aufwachen der Tiere.

Bei Nicht-Winterschläfern – und so auch bei hypothermer Organprotektion – bedeutet Hypothermie eine globale Verlangsamung aller zellulärer Vorgänge in Abhängigkeit von ihrem jeweiligen  $Q_{10}$ -Wert. Bei winterschlafenden Spezies ist die Antwort der Gewebe auf die Reduktion der Körpertemperatur keine passive Funktion der Thermodynamik, sondern aktiv reguliert und sehr heterogen. Dadurch kann einerseits der Energieverbrauch effektiv reduziert werden, in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Säugetiers um bis zu 99% (Haselmaus), selektive Prozesse bestimmter Organe von diesem Sparprogramm aber ausgenommen werden. Auf diese Weise wird die Funktionsfähigkeit des Organismus unter Bedingungen garantiert, die der Nicht-Winterschläfer nur in sehr kurzen Zeitspannen tolerieren kann.

#### 4.7.1.8 Bedeutung für eine hypotherme Organprotektion

Aus dem Gesagten ergibt sich, daß der Wahl der Tiefe der Hypothermie eine besondere Bedeutung zukommt. Man muß sich fragen, ob bei Temperaturen  $< 10^{\circ}$ - $15^{\circ}$ C beim Menschen (beim Hund entsprechend leicht kälter) der Energieumsatz für die Strukturhaltung der Zellen noch ausreicht. Die Literatur ist in diesem Punkt heterogen. Einige Untersucher beobachteten strukturelle Schäden nach tiefer Hypothermie  $< 10^{\circ}$ C [35, 44, 66, 94], andere berichten jedoch von morphologischer Integrität nach hypothermer Lagerung [2, 46, 88, 95]. Desweiteren ist eine ausreichende Pufferung obligat und in der angewendeten HTK-Lösung auch berücksichtigt.

Das physiologische Profil von Winterschläfern im sommeraktiven Zustand ist nahezu identisch mit dem nicht winterschlafender Spezies [17]. Daher kann man vermuten, daß die protektiven Adaptationsmechanismen im Winterschlaf induzierbar sind und im klinischen Kontext evtl. imitiert werden können.

Die Mechanismen der Protektion müssen noch im Detail erforscht werden. Es gibt allerdings Hinweise darauf, daß der *hibernation induction trigger* (HIT)

in seiner Natur ein Opioid oder ein Neuropeptid ist und seine Signalkaskade die Aktivierung der  $\delta$ -opioid-Rezeptoren einbezieht [8, 70]. Die Literatur über die protektive Wirkung synthetischer  $\delta$ -opioid-Agonisten wie Pentazozin, DADLE o.a. ist mannigfaltig [8, 7, 70]. Kevelaitis et al. [48] postulierten, daß die Öffnung des - wahrscheinlich mitochondrialen - ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanals die gemeinsame Endstrecke des Hibernatings und der ischämischen Präkonditionierung sei. Somit sind auch direkte Kanalöffner wie Nicorandil, Diazoxid und Isofluran in diesem Kontext interessant.

Die Physiologie des Winterschlafs lehrt also, daß die Reduktion der Körpertemperatur unter das für die jeweilige Spezies charakteristische Maß sehr kritisch ist, weil dann die zelluläre Strukturhaltung ebenso infrage gestellt ist wie die Aktivität der Membranpumpen, die das Membranpotential garantieren. Zu berücksichtigen ist bei der Interpretation der Ergebnisse, daß die spezifische Winterschlaf-Temperatur rechnerisch beim Hund noch wenige Grade tiefer liegt als beim Menschen mit 10-15°C.

#### 4.7.2 Schlußfolgerungen

Hinsichtlich der myokardialen Veränderungen in Ischämie ergibt sich erwartungsgemäß eine positive Korrelation zwischen Lagerungstemperatur und Stoffwechsellaktivität des Myokards. Die Bewahrung des Status quo ist daher umso besser, je tiefer die Hypothermie ist. Die somit gute energetische Bilanz der Ischämie bei 5°C ist allerdings kritisch zu sehen, weil bei dieser Temperatur ein für die Strukturhaltung der Zelle notwendiger Mindestumsatz nicht mehr gewährleistet scheint.

Gegen die tiefe Hypothermie spricht auch die Physiologie des Winterschlafs. Danach hat die Aufrechterhaltung der Elektrolyt-Homöostase und des Membranpotentials in Hypothermie Vorrang vor unbedingter Minimierung des Energieverbrauches. Zudem wird dort die Körpertemperatur nur so weit abgesenkt, daß eine spezifische metabolische Rate von  $0,1 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  nicht unterschritten wird. Diese Grenze entspricht etwa dem zellulären Strukturhaltungsumsatz und wäre beim Menschen etwa bei 10-15°C erreicht.

Betrachtet man die postischämische Reperfusion, spricht die Mehrheit der Kontrollparameter hingegen für eine Überlegenheit der ischämischen Lagerung bei 10°C. Manche Meßgrößen legen darüber hinaus die Vermutung nahe, daß sich dieses Temperaturoptimum bei größerer Ischämiebelastung hin zu kälteren Temperaturen verschiebt. In diesem Sinne verhalten sich sowohl funktionelle Parameter wie Inotropie, Sauerstoffaufnahme des Myokards und tendentiell auch Rhythmusqualität, als auch metabolische Größen wie etwa das Ausmaß der Laktatproduktion.

Bei 15°C könnte der schnelle Abfall der Energiereserven insbesondere nach längeren Ischämiezeiten eine postischämische Reperfusion kompromittieren.

Ausreichender Energieumsatz (Indikator: Laktat) und ATP-Konservierung haben eine entgegengesetzte Temperaturabhängigkeit, sind aber beide für eine postischämische Wiederbelebbarkeit des Herzens essentiell. Der Verlauf des theoretischen Produktes [Laktat·ATP] (vgl. Abb. 4.7, S. 75) gibt einen Hinweis auf die Temperatur, die hierfür abhängig von der Ischämiedauer den besten

Kompromiß darstellen könnte.

Die vorliegende Studie unterstützt die These, daß die optimale Temperatur bei ischämischer Lagerung des Herzens von der Dauer der Ischämiebelastung abhängt. Dabei scheint in jedem Fall eine moderatere Hypothermie als die klinisch angewandten  $5^{\circ}\text{C}$  in einer besseren postischämischen metabolischen und funktionellen Erholung zu resultieren. Für 480 min Ischämie erscheint eine Temperatur von  $10\text{-}15^{\circ}\text{C}$  optimal, für 600 min von  $5\text{-}10^{\circ}\text{C}$ . Diese beim Hund ermittelten Werte lägen beim Menschen einige Grad höher.



## Kapitel 5

# Zusammenfassung

**Einleitung** Im Kontext der Organtransplantation werden in der klinischen Praxis beim Herzen gegenwärtig Ischämiezeiten von bis zu 4, maximal 6 Stunden toleriert. Eine Verlängerung dieser relativ kurzen sicheren Ischämiezeit könnte sowohl den Pool der infrage kommenden Spenderherzen erweitern, etwa um Organe von suboptimaler Qualität, als auch die Möglichkeiten verbessern, den „optimalen“ Empfänger zu ermitteln und ihm das Organ auch über weite Distanzen zukommen zu lassen.

Während der Ischämie des Herzens entfällt nicht nur die Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen, sondern auch die Spülfunktion des Blutes. Bei allen größeren Organen homöothermer Organismen ist eine solche (normotherme) Ischämie nicht mit einer Erhaltung des Gleichgewichtes von energiebereitstellenden und -verbrauchenden Prozessen vereinbar, weil anstelle der oxidativen Phosphorylierung die 18(19)-fach weniger effiziente anaerobe Glykolyse die Versorgung der Zelle mit Energie übernimmt. Folge sind neben dem Verlust energiereicher Phosphate die intrazelluläre – und konsekutiv auch extrazelluläre – Azidose. Diese Veränderungen kompromittieren zentrale Stellglieder der zellulären Homöostase: Stoffwechselprozesse, Elektrolyt-Gleichgewicht, Membranpotential und zelluläre Volumenregulation.

Derzeitige Strategien zur Organprotektion in Ischämie sind Kardioplegie und Hypothermie, meist in Kombination. Erstere reduziert den Energiebedarf des Herzens in Ischämie durch schnelle elektrische und mechanische Inaktivierung, letztere durch einen global verlangsamten Metabolismus. Sowohl die genaue Zusammensetzung und Applikation der Kardioplegie als auch das Ausmaß der Hypothermie sind momentan noch Gegenstand der Forschung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß der Lagerungstemperatur während kardioplegischer Ischämie des Herzens auf dessen postischämische Erholung festzustellen und Aussagen über die hierfür optimale Temperatur abzuleiten.

**Methodik** Als Versuchstiere dienten 51 ausgewachsene Hunde der Rasse Foxhound. Nach dem von Langendorff beschriebenen Prinzip der Koronarperfusion durch einen retrograd in die Aortenwurzel vorgeschobenen Katheter wurden die Herzen mit Bretschneiders HTK-Lösung als Kardioplegikum stillgestellt und konserviert und daraufhin explantiert. Das weitere Vorgehen hing von dem gewählten Modell ab. Die sog. *Biochemieversuche* dienten zur Untersuchung des

myokardialen Stoffwechsels während Ischämie. Dabei betrug die Lagerungstemperatur des linksventrikulären Myokards 5°, 10° oder 15°C. Über 14 Stunden wurde regelmäßig der interstitielle pH-Wert gemessen und Gewebeproben zur Bestimmung des Gehalts an energiereichen Phosphaten und Laktat entnommen.

Die Versuche zur *Ischämie-Reperfusion* hatten die postischämische Erholung von Stoffwechsel und Funktion zum Gegenstand. Nach 480 bzw. 600 min ischämischer Lagerung bei 5, 10° oder 15°C erfolgte die Reperfusion der Herzen in Langendorff-Technik. Über 90 Minuten wurden Herzrhythmus und Kontraktionskraft aufgezeichnet sowie im Perfusat pH-Wert, Laktat und die Elektrolyte  $K^+$ ,  $Na^+$  und  $Ca^{2+}$  gemessen.

**Ergebnisse** In Ischämie zeigte sich erwartungsgemäß eine positive Korrelation zwischen Lagerungstemperatur und Stoffwechselaktivität des Myokards. Sowohl der Verfall an energiereichen Phosphaten, der Anstau der glykolytischen Stoffwechselprodukte Glukose und Laktat, als auch der Abfall des pH-Wertes im Myokard war bei 15°C-Lagerung am deutlichsten und bei 5°C am schwächsten ausgeprägt.

Bei der Betrachtung der postischämischen Erholung der Herzen ergab sich hingegen ein anderes Bild. Die Mehrheit der Kontrollparameter sprach für eine Überlegenheit der ischämischen Lagerung bei 10°C. Manche Meßgrößen legten darüber hinaus die Vermutung nahe, daß sich dieses Temperaturoptimum bei größerer Ischämiebelastung hin zu kälteren Temperaturen verschiebt.

Hinsichtlich funktioneller Parameter erreichten die 10°C-Herzen ungeachtet der Ischämiedauer in der Reperfusion die besten Ergebnisse. Sie wiesen eine kontinuierliche Erholung auf, die Herzfrequenzen waren niedriger und der Rhythmus stabiler als in den anderen Gruppen. Die Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt_{max}$ ) des linken Ventrikels erreichte hier im Mittel 750 mmHg/s, das höchste Niveau aller Gruppen. Nach 8-stündiger Ischämie erreichte die 15°C-Gruppe Platz 2 sowohl hinsichtlich der Inotropie ( $dp/dt_{max} \approx 700$  mmHg/s) als auch in Bezug auf Herzfrequenz und Rhythmusstabilität, 5°C-Herzen waren deutlich schlechter ( $dp/dt_{max} \approx 500$  mmHg/s). Nach 10-stündiger Ischämie hingegen erholten sich die 5°C-Herzen wesentlich besser als die der 15°C-Gruppe ( $dp/dt_{max} \approx 650$  vs. 400 mmHg/s, auch stabilerer Rhythmus).

Auch die metabolische Erholung in Reperfusion erschien nach Ischämie bei 10°C am günstigsten. Laktatproduktion und pH-Abfall lagen hier auf dem niedrigsten Niveau, die Gewebekonzentrationen energiereicher Phosphate und Glykogen erholten sich über den Zeitraum der Reperfusion besser als in den anderen Gruppen. Diese Ergebnisse sprechen für einen suffizienten aeroben Stoffwechsel. Noch deutlicher zeigt sich die Güte der 10°C-Herzen in den Elektrolyt-Bilanzen. Ungeachtet der vorangegangenen Ischämiedauer wiesen sie in der Reperfusion nach initialen Äquilibrierungsvorgängen eine nahezu ausgeglichene Bilanz für  $Na^+$ ,  $K^+$  und  $Ca^{2+}$  auf. Hingegen waren bei den 5°- und 15°C-Herzen die Elektrolytverschiebungen nicht nur wesentlich ausgeprägter, sondern stabilisierten sich auch im Reperfusionszeitraum nicht. Das weist auf Schädigungen hin, die auch bei fortgesetzter Erholung nicht reversibel waren. So zeigte sich etwa in der  $Ca^{2+}$ -Bilanz nach Ischämie bei 10°C ungeachtet der Ischämiedauer in den ersten 15-20 min der Reperfusion eine  $Ca^{2+}$ -Aufnahme von ca. 0,1 mmol/100g  $FG_{korr}$

(was in der Nähe der rechnerisch zu erwartenden Äquilibrierungsmenge liegt), danach fanden keine weiteren Netto-Verschiebungen statt. Die anderen Gruppen zeigten hingegen nicht nur eine ausgeprägtere initiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung, sondern auch eine bis zum Ende der Reperfusion fortgesetzte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in der Größenordnung von 0,3-0,5 mmol/100g  $\text{FG}_{\text{korrr}}$ .

**Diskussion** In den vorliegenden Modellen sind zwei Problembereiche von grundlegender Bedeutung: Hypothermie und Ischämie. Aufgrund der heterogenen Kälteantwort biologischer Gewebe werden verschiedene Stoffwechselschritte durch Hypothermie in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert, so daß das physiologische Gleichgewicht des Metabolismus verloren geht. In Folge der Ischämie entfällt die Versorgung der Myozyten mit Sauerstoff und Nährstoffen, so daß das Gewebe auf die energetisch ineffiziente anaerobe Glykolyse angewiesen ist.

Diese Veränderungen wirken sich besonders in folgenden Bereichen aus:

1. *Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.* Inhibieren Kälte oder Energiemangel dieses für die zelluläre Homöostase zentrale Enzym, verliert die Zelle die Möglichkeit der Regulation ihres Ionenmilieus. Die Gradienten für  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  verfallen und mit ihnen das Membranpotential, es folgt eine zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung. Die resultierende Stoffwechselaktivierung verschärft die Energiekrise, der Verlust der Osmoregulation bedeutet Zellschwellung und behinderte Nährstoff- und Sauerstoffdiffusion. Diese Prozesse münden schließlich in den hybriden Zelltod. Während der Ischämie kann die kardioplegische HTK-Lösung diese Veränderungen verlangsamen. Treffen in der beginnenden Reperfusion hingegen physiologische Ionengradienten auf eine noch insuffiziente Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase, steigt das Risiko für einen Reperfusionsschaden.

Die vorliegenden Ergebnisse weisen für die 10°C-Herzen je die geringste zytosolische Überladung mit  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  in Reperfusion aus. Auch die  $\text{K}^+$ -Aufnahme ist hier initial am höchsten, was für eine ausreichende Aktivität der Membranpumpen spricht. Später sind die Elektrolytbilanzen nahezu ausgeglichen. Demgegenüber weisen die gestörten Bilanzen nach 5°C bzw. 15°C-Ischämie auf eine ungenügende metabolische Erholung des Myokards hin.

Die Physiologie des Winterschlafs lehrt, daß eine ausreichende Aktivität der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (und auch der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) in Hypothermie und Bewahrung des Membranpotentials Vorrang haben vor unbedingter Minimierung des Energieverbrauches. Die gute energetische Bilanz der Ischämie bei 5°C ist somit kritisch zu sehen, weil bei dieser Temperatur eine Funktion membrangebundener ATPasen nicht mehr nachweisbar ist. Bei 15°C könnte der schnelle Abfall der Energiereserven limitierend wirken.

2.  *$\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase.* Im Verlauf von Ischämie und Hypothermie, insbesondere aber zu Beginn der postischämischen Reperfusion steigt die intrazelluläre (und mitochondriale)  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Das liegt darin begründet, daß alle  $\text{Ca}^{2+}$ -ausschleusenden Systeme durch Kälte, Verfall energetischer

Reserven ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase im SR und Sarkolemm) und unphysiologische Ionengradienten (NCX) insuffizient sind, bei gleichzeitig gesteigerter Permeabilität der Zellmembranen für Ionen. Unphysiologisch hohes  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht seinerseits den zellulären Energiebedarf durch enzymatische und kontraktile Aktivierung der Zelle, senkt gleichzeitig aber das Energieangebot durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien.

Im Gegensatz zu der ausgeglichenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bilanz der  $10^\circ\text{C}$ -Gruppen nehmen die  $5^\circ\text{C}$ - und  $15^\circ\text{C}$ -Herzen in der Reperfusion kontinuierlich  $\text{Ca}^{2+}$  auf. Jene Gruppen zeigen ferner eine reduzierte Sauerstoffaufnahme, fortgesetzten Verlust energetischer Reserven, erhöhter Koronarwiderstand und deutlichere Azidoseentwicklung. Das spricht für einen insuffizienten aeroben Stoffwechsel. Bei  $10^\circ\text{C}$  scheint der Mittelweg zwischen Restaktivität der ATPasen (Wärme) und langsamerem ATP-Verlust (Kälte) am günstigsten.

3. *Metabolismus.* Die Aktivität gewisser Membranpumpen in hypothermer Ischämie ist für eine gute postischämische Erholung der Herzen erforderlich. Die dafür erforderliche Energie muß während der Ischämie aus der anaeroben Glykolyse kommen, eine vollständige metabolische Inaktivierung der Myozyten, wie dies annähernd bei  $5^\circ\text{C}$  geschieht, erscheint daher nicht sinnvoll. Der schnellere Verfall der Energiereserven limitiert allerdings die moderate gegenüber der tiefen Hypothermie.

Während der Reperfusion deutet die kontinuierliche Laktatabgabe der meisten Versuche auf einen (regional) insuffizienten aeroben Stoffwechsel hin. Die Netto-Produktion an Laktat ist nach 480 min Ischämie in den wärmeren Gruppen ( $10^\circ\text{C}$ - $15^\circ\text{C}$ ) am geringsten. Dieses Optimum verschiebt sich bei 600 min Ischämie zu kälteren Temperaturen ( $5^\circ\text{C}$ - $10^\circ\text{C}$ ). Die Vorteile der moderaten Hypothermie sind somit zeitlich begrenzt.

4. *Funktionelle Erholung.* Dieser für die Klinik relevantesten Aspekt ist eine Funktion von energetischem Status, Metabolismus und Elektrolythomöostase des Myokards. Wie auch für einige metabolische Parameter zeigt sich mit Blick auf die Erholung der Kontraktilität eine Verlagerung der optimalen Ischämietemperatur zu kälteren Werten bei längerer Ischämiebelastung.

Die Physiologie des Winterschlafs unterstützt diese Beobachtungen. Um Hypothermie und Hypoxie über längere Zeiträume tolerieren zu können, werden zum einen entbehrliche Stoffwechselschritte konsequent verlangsamt, zum anderen aber einige relevante Prozesse in bestimmten Organen von diesem Sparprogramm ausgenommen. Membranpotential und Elektrolythomöostase bleiben so auch in Hypothermie intakt. Auch wird die Körpertemperatur nur so weit abgesenkt, daß eine spezifische metabolische Rate von  $0,1 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  nicht unterschritten wird. Diese Grenze entspricht etwa dem zellulären Strukturerhaltungsumsatz. Sie wäre beim Menschen etwa bei  $10$ - $15^\circ\text{C}$  erreicht und läge beim Hund leicht darunter.

Ausreichender Energieumsatz (Indikator in Anaerobiose: Laktat) und ATP-Konservierung stehen im Widerspruch zueinander, sind aber beide für eine po-



stischämische Wiederbelebarkeit des Herzens essentiell. Der Verlauf des theoretischen Produktes [Laktat·ATP] (vgl. Abb. 4.7, S. 75) gibt einen Hinweis auf die Temperatur, die hierfür abhängig von der Ischämiedauer den besten Kompromiß darstellen könnte.

**Schlußfolgerung** Aus der vorliegenden Studie ergibt sich die These, daß die optimale Temperatur bei ischämischer Lagerung des Herzens abhängig ist von der Dauer der Ischämiebelastung. Dabei scheint in jedem Fall eine moderatere Hypothermie als die klinisch angewandten  $5^{\circ}\text{C}$  in einer besseren postischämischen metabolischen und funktionellen Erholung zu resultieren. Für 480 min Ischämie erscheint eine Temperatur von  $10\text{-}15^{\circ}\text{C}$  optimal, für 600 min von  $5\text{-}10^{\circ}\text{C}$ . Diese beim Hund ermittelten Werte lägen beim Menschen einige Grad höher.



# Literaturverzeichnis

- [1] AUSTIN, J. H. und G. E. CULLEN: *Hydrogen ion concentration of the blood in health and disease*. *Medicine*, 4:275, 1925.
- [2] BALDERMAN, S. C., J. P. BINETTE, A. W. CHAN und A. A. GAGE: *The optimal temperature for preservation of the myocardium during global ischemia*. *Ann Thorac Surg*, 35(6):605–614, 1983.
- [3] BEHRENDT, D. M. und K. E. JOCHIM: *Effect of temperature of cardioplegic solution*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 76(3):353–357, 1978.
- [4] BERGMAYER, U.: *Methoden der enzymatischen Analyse*, Band 2. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 3. Auflage Auflage, 1974.
- [5] BERS, D. M.: *Cardiac excitation-contraction coupling*. *Nature*, 415(6868):198–205, 2002.
- [6] BES, S., P. ROUSSEL, A. LAUBRIET, D. VANDROUX, C. TISSIER, L. ROCHETTE und P. ATHIAS: *Influence of deep hypothermia on the tolerance of the isolated cardiomyocyte to ischemia-reperfusion*. *J Mol Cell Cardiol*, 33(11):1973–1988, 2001.
- [7] BOLLING, S. F., T. P. SU, K. F. CHILDS, X. H. NING, N. HORTON, K. KILGORE und P. R. OELTGEN: *The use of hibernation induction triggers for cardiac transplant preservation*. *Transplantation*, 63(2):326–329, 1997.
- [8] BOLLING, S. F., N. L. TRAMONTINI, K. S. KILGORE, T. P. SU, P. R. OELTGEN und H. H. HARLOW: *Use of natural hibernation induction triggers for myocardial protection*. *Ann Thorac Surg*, 64(3):623–627, 1997.
- [9] BORTNER, C. D. und J. A. CIDLOWSKI: *A necessary role for cell shrinkage in apoptosis*. *Biochem Pharmacol*, 56(12):1549–1559, 1998.
- [10] BORTNER, C. D., JR. HUGHES, F. M. und J. A. CIDLOWSKI: *A primary role for  $K^+$  and  $Na^+$  efflux in the activation of apoptosis*. *J Biol Chem*, 272(51):32436–32442, 1997.
- [11] BRACHMANSKI, M., M. M. GEBHARD und R. NOBILING: *Separation of fluorescence signals from  $Ca^{2+}$  and NADH during cardioplegic arrest and cardiac ischemia*. *Cell Calcium*, 35(4):381–391, 2004.

- [12] BRETSCHNEIDER, H. J.: *Überlebenszeit und Wiederbelebenszeit des Herzens bei Normo- und Hypothermie*. Verh dtsh Ges Kreisf-Forsch, 30:11–34, 1964.
- [13] BRETSCHNEIDER, H. J.: *Organübergreifende Prinzipien zur Verlängerung der Ischämietoleranz*. In: *Jahrbuch 1991 der Dt. Akademie der Naturforscher Leopoldina*, Band 37, Seiten 161–174, 1992.
- [14] BRETSCHNEIDER, H. J. und G. HELBIGE: *Pathophysiologie der Ventrikelkontraktion - Kontraktilität, Inotropie, Suffizienzgrad und Arbeitsökonomie des Herzens*. Verh Dtsch Ges Kreislaufforsch, 42:14–30, 1976.
- [15] BRIDGE, J. H.: *Relationships between the sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal calcium transport revealed by rapidly cooling rabbit ventricular muscle*. J Gen Physiol, 88(4):437–473, 1986.
- [16] CAPUTO, M., R. ASCIONE, G. D. ANGELINI, M. S. SULEIMAN und A. J. BRYAN: *The end of the cold era: from intermittent cold to intermittent warm blood cardioplegia*. Eur J Cardiothorac Surg, 14(5):467–475, 1998.
- [17] CAREY, H. V., M. T. ANDREWS und S. L. MARTIN: *Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature*. Physiol Rev, 83(4):1153–1181, 2003.
- [18] CHAUHAN, N. B., J. M. LEE und G. J. SIEGEL: *Na,K-ATPase mRNA levels and plaque load in Alzheimer's disease*. J Mol Neurosci, 9(3):151–166, 1997.
- [19] CHIEN, S., P. R. OELTGEN, J. N. DIANA, X. SHI, S. P. NILEKANI und R. SALLEY: *Two-day preservation of major organs with autoperfusion multiorgan preparation and hibernation induction trigger. A preliminary report*. J Thorac Cardiovasc Surg, 102(2):224–234, 1991.
- [20] CHOI, D. W.: *Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage*. Trends Neurosci, 11(10):465–469, 1988.
- [21] CHOI, H. S., A. W. TRAFFORD, C. H. ORCHARD und D. A. EISNER: *The effect of acidosis on systolic Ca<sup>2+</sup> and sarcoplasmic reticulum calcium content in isolated rat ventricular myocytes*. J Physiol, 529 Pt 3:661–668, 2000.
- [22] CLAUSEN, T.: *Regulation of active Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> transport in skeletal muscle*. Physiol Rev, 66(3):542–580, 1986.
- [23] COETZEE, W. A.: *Regulation of ATP sensitive potassium channel of isolated guinea pig ventricular myocytes by sarcolemmal monocarboxylate transport*. Cardiovasc Res, 26(11):1077–1086, 1992.
- [24] DRAKE, A. J.: *Substrate utilization in the myocardium*. Basic Res Cardiol, 77(1):1–11, 1982.

- [25] ELIAS, C. L., X. H. XUE, C. R. MARSHALL, A. OMELCHENKO, L. V. HRYSHKO und G. F. TIBBITS: *Temperature dependence of cloned mammalian and salmonid cardiac Na(+)/Ca(2+) exchanger isoforms*. Am J Physiol Cell Physiol, 281(3):C993–C1000, 2001.
- [26] FEHER, J. J. und I. M. REBEYKA: *Cooling and pH jump-induced calcium release from isolated cardiac sarcoplasmic reticulum*. Am J Physiol, 267(3 Pt 2):H962–969, 1994.
- [27] FRANK, J. S. und G. A. LANGER: *The myocardial interstitium: its structure and its role in ionic exchange*. J Cell Biol, 60(3):586–601, 1974.
- [28] GABEL, S. A., H. R. CROSS, R. E. LONDON, C. STEENBERGEN und E. MURPHY: *Decreased intracellular pH is not due to increased H+ extrusion in preconditioned rat hearts*. Am J Physiol, 273(5 Pt 2):H2257–2262, 1997.
- [29] GANITKEVICH, V. Y.: *The role of mitochondria in cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> cycling*. Exp Physiol, 88(1):91–97, 2003.
- [30] GEBHARD, M. M.: *Organprotektion. Korrelation und Diskrepanzen zwischen Energiestatus, Ultrastruktur und Wiederbelebarkeit des Herzens nach Ischämiebelastung*. Med. Habilitation, Göttingen, 1985.
- [31] GEBHARD, M. M.: *Pathophysiologie der globalen Ischämie des Herzens*. Z Kardiol, 76 Suppl 4:115–129, 1987.
- [32] GEBHARD, M. M., H. J. BRETSCHNEIDER und P. A. SCHNABEL: *Cardioplegia - Principles and Problems*. Physiology and Pathophysiology of the Heart. Nicholas Speclakis, Boston, 3 Auflage, 1995.
- [33] GERBER, S. H., C. HEYER, C. KRÜGER, S. HAGL, W. KÜBLER und M. HAASS: *Influence of Bretschneider's Cardioplegia on Norepinephrine Release from Isolated Perfused Guinea-pig Hearts*. J Mol Cell Cardiol, 31:89–99, 1999.
- [34] HEARSE, D. J., M. V. BRAIMBRIDGE und P. JYNGE: *Protection of the Ischemic Myocardium: Cardioplegia*. In: Raven Press, New York, 1981.
- [35] HENDRY, P. J., M. P. ANSTADT, M. D. PLUNKETT, JR. PACIFICO, A. D., E. M. MIKAT, JR. MENIUS, J. A. und J. E. LOWE: *Optimal temperature for preservation of donor myocardium*. Circulation, 82(5 Suppl):IV306–312, 1990.
- [36] HENDRY, P. J., R. S. LABOW und W. J. KEON: *A comparison of intracellular solutions for donor heart preservation*. J Thorac Cardiovasc Surg, 105(4):667–673, 1993.
- [37] HORIUTI, K.: *Mechanism of contracture on cooling of caffeine-treated frog skeletal muscle fibres*. J Physiol, 398:131–148, 1988.

- [38] HUGHES, F. M., JR. und J. A. CIDLOWSKI: *Potassium is a critical regulator of apoptotic enzymes in vitro and in vivo*. Adv Enzyme Regul, 39:157–171, 1999.
- [39] INESI, G., M. MILLMAN und S. ELETR: *Temperature-induced transitions of function and structure in sarcoplasmic reticulum membranes*. J Mol Biol, 81(4):483–504, 1973.
- [40] JOHNSON, K. J. und J. M. WEINBERG: *Postischemic renal injury due to oxygen radicals*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2(4):625–635, 1993.
- [41] JUEL, C.: *Muscle lactate transport studied in sarcolemmal giant vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1065(1):15–20, 1991.
- [42] JUEL, C.: *Regulation of cellular pH in skeletal muscle fiber types, studied with sarcolemmal giant vesicles obtained from rat muscles*. Biochim Biophys Acta, 1265(2-3):127–132, 1995.
- [43] JUEL, C.: *Symmetry and pH dependency of the lactate/proton carrier in skeletal muscle studied with rat sarcolemmal giant vesicles*. Biochim Biophys Acta, 1283(1):106–110, 1996.
- [44] KAIJSER, L., E. JANSSON, W. SCHMIDT und V. BOMFIM: *Myocardial energy depletion during profound hypothermic cardioplegia for cardiac operations*. J Thorac Cardiovasc Surg, 90(6):896–900, 1985.
- [45] KAMINSKI, K. A., T. A. BONDA, J. KORECKI und W. J. MUSIAL: *Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia/reperfusion injury*. Int J Cardiol, 86(1):41–59, 2002.
- [46] KAO, R. L., V. R. CONTI und E. H. WILLIAMS: *Effect of temperature during potassium arrest on myocardial metabolism and function*. J Thorac Cardiovasc Surg, 84(2):243–249, 1982.
- [47] KEON, W. J., P. J. HENDRY, G. C. TAICHMAN und G. W. MAINWOOD: *Cardiac transplantation: the ideal myocardial temperature for graft transport*. Ann Thorac Surg, 46(3):337–341, 1988.
- [48] KEVELAITIS, E., J. PEYNET, C. MOUAS, J. M. LAUNAY und P. MENASCHE: *Opening of potassium channels: the common cardioprotective link between preconditioning and natural hibernation?* Circulation, 99(23):3079–3085, 1999.
- [49] KOBAYASHI, K. und J. R. NEELY: *Control of maximum rates of glycolysis in rat cardiac muscle*. Circ Res, 44(2):166–175, 1979.
- [50] KUBLER, W. und P. G. SPIECKERMANN: *Regulation of glycolysis in the ischemic and the anoxic myocardium*. J Mol Cell Cardiol, 1(4):351–377, 1970.

- [51] KUMAR, A. R. und P. A. KURUP: *Inhibition of membrane Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase activity: a common pathway in central nervous system disorders*. J Assoc Physicians India, 50:400–406, 2002.
- [52] LAHORRA, J. A., D. F. TORCHIANA, JR. TOLIS, G., C. A. BASHOUR, C. HAHN, J. S. TITUS, G. A. GEFFIN und W. M. DAGGETT: *Rapid cooling contracture with cold cardioplegia*. Ann Thorac Surg, 63(5):1353–1360, 1997.
- [53] LANGENDORFF, O.: *Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen*. Pflügers Arch Ges Physiol, 61:291–332, 1895.
- [54] LEES, G. J.: *Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology*. Brain Res Brain Res Rev, 16(3):283–300, 1991.
- [55] LI, C. und R. M. JACKSON: *Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury*. Am J Physiol Cell Physiol, 282(2):C227–241, 2002.
- [56] MACDONALD, J. A. und K. B. STOREY: *Regulation of ground squirrel Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>-ATPase activity by reversible phosphorylation during hibernation*. Biochem Biophys Res Commun, 254(2):424–429, 1999.
- [57] MACKNIGHT, A. D. und A. LEAF: *Regulation of cellular volume*. Physiol Rev, 57(3):510–573, 1977.
- [58] MARENGO, F. D., S. Y. WANG und G. A. LANGER: *The effects of temperature upon calcium exchange in intact cultured cardiac myocytes*. Cell Calcium, 21(4):263–273, 1997.
- [59] MARTIN, D. R., D. F. SCOTT, G. L. DOWNES und F. O. BELZER: *Primary cause of unsuccessful liver and heart preservation: cold sensitivity of the ATPase system*. Ann Surg, 175(1):111–117, 1972.
- [60] MASTERS, T. N., F. ROBICSEK, J. SCHAPER, S. JENKINS und H. RICE: *Effects of canine donor heart preservation temperature on posttransplant left ventricular function and myocardial metabolism*. Transplantation, 57(6):807–811, 1994.
- [61] MATHUR, P. P. und R. B. CASE: *Phosphate loss during reversible myocardial ischemia*. J Mol Cell Cardiol, 5(4):375–393, 1973.
- [62] MINTEN, J., W. FLAMENG und W. DYSZKIEWICZ: *Optimal storage temperature and benefit of hypothermic cardioplegic arrest for long-term preservation of donor hearts: a study in the dog*. Transpl Int, 1(1):19–25, 1988.
- [63] MINTOROVITCH, J., G. Y. YANG, H. SHIMIZU, J. KUCHARCZYK, P. H. CHAN und P. R. WEINSTEIN: *Diffusion-weighted magnetic resonance imaging of acute focal cerebral ischemia: comparison of signal intensity with*

- changes in brain water and Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity.* J Cereb Blood Flow Metab, 14(2):332–336, 1994.
- [64] MONTAGUE, J. W., C. D. BORTNER, JR. HUGHES, F. M. und J. A. CIDLOWSKI: *A necessary role for reduced intracellular potassium during the DNA degradation phase of apoptosis.* Steroids, 64(9):563–569, 1999.
- [65] MORGENSTERN, C., G. ARNOLD, U. HOLJES und W. LOCHNER: *Die Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel als Maß für die Kontraktilität unter verschiedenen hämodynamischen Bedingungen.* Pflugers Arch, 315(2):173–186, 1970.
- [66] NAVAS, J. P., W. ANDERSON und J. D. MARSH: *Hypothermia increases calcium content of hypoxic myocytes.* Am J Physiol, 259(2 Pt 2):H333–339, 1990.
- [67] NAYLER, W. G.: *The role of calcium in the ischemic myocardium.* Am J Pathol, 102(2):262–270, 1981.
- [68] NEELY, J. R. und L. W. GROTYOHANN: *Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts.* Circ Res, 55(6):816–824, 1984.
- [69] NOBEL, C. S., J. K. ARONSON, D. J. VAN DEN DOBBELSTEEN und A. F. SLATER: *Inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase may be one mechanism contributing to potassium efflux and cell shrinkage in CD95-induced apoptosis.* Apoptosis, 5(2):153–163, 2000.
- [70] OELTGEN, P. R., N. D. HORTON, S. F. BOLLING und T. P. SU: *Extended lung preservation with the use of hibernation trigger factors.* Ann Thorac Surg, 61(5):1488–1493, 1996.
- [71] OHKADO, A., H. CAO-DANH, K. E. SOMMERS und P. J. DEL NIDO: *Evaluation of highly buffered low-calcium solution for long-term preservation of the heart. Comparison with University of Wisconsin solution.* J Thorac Cardiovasc Surg, 108(4):762–771, 1994.
- [72] O’ROURKE, B.: *Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection.* Circ Res, 94(4):420–432, 2004.
- [73] PAGE, E.: *Ion movement in heart muscle: tissue compartments and the experimental definition of driving forces.* Ann N Y Acad Sci, 127(1):34–48, 1965.
- [74] PIERCE, G. N. und M. P. CZUBRYT: *The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury.* J Mol Cell Cardiol, 27(1):53–63, 1995.
- [75] PIPER, H. M., Y. ABDALLAH und C. SCHAFER: *The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection.* Cardiovasc Res, 61(3):365–371, 2004.



- [76] PIPER, H. M. und D. GARCIA-DORADO: *Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion*. Ann Thorac Surg, 68(5):1913–1919, 1999.
- [77] PIPER, H. M., K. MEUTER und C. SCHAFER: *Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury*. Ann Thorac Surg, 75(2):S644–648, 2003.
- [78] POOLE, R. C. und A. P. HALESTRAP: *Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes*. Am J Physiol, 264(4 Pt 1):C761–782, 1993.
- [79] POOLE, R. C., A. P. HALESTRAP, S. J. PRICE und A. J. LEVI: *The kinetics of transport of lactate and pyruvate into isolated cardiac myocytes from guinea pig. Kinetic evidence for the presence of a carrier distinct from that in erythrocytes and hepatocytes*. Biochem J, 264(2):409–418, 1989.
- [80] PUGLISI, J. L., R. A. BASSANI, J. W. BASSANI, J. N. AMIN und D. M. BERS: *Temperature and relative contributions of Ca transport systems in cardiac myocyte relaxation*. Am J Physiol, 270(5 Pt 2):H1772–1778, 1996.
- [81] REMME, C. A., C. A. SCHUMACHER, J. W. DE JONG, J. W. FIOLET, J. R. DE GROOT, R. CORONEL und A. A. WILDE: *K(ATP) channel opening during ischemia: effects on myocardial noradrenaline release and ventricular arrhythmias*. J Cardiovasc Pharmacol, 38(3):406–416, 2001.
- [82] ROSE, A. M. und JR. VALDES, R.: *Understanding the sodium pump and its relevance to disease*. Clin Chem, 40(9):1674–1685, 1994.
- [83] ROSENFELDT, F. L.: *The relationship between myocardial temperature and recovery after experimental cardioplegic arrest*. J Thorac Cardiovasc Surg, 84(5):656–666, 1982.
- [84] ROVETTO, M. J., J. T. WHITMER und J. R. NEELY: *Comparison of the effects of anoxia and whole heart ischemia on carbohydrate utilization in isolated working rat hearts*. Circ Res, 32(6):699–711, 1973.
- [85] SCHAPER, W. K., P. LEWI und A. H. JAGENEAU: *The Determinants of the Rate of Change of the Left Ventricular Pressure (Dp/Dt)*. Arch Kreislaufforsch, 46:27–41, 1965.
- [86] SEDOVA, M. und L. A. BLATTER: *Intracellular sodium modulates mitochondrial calcium signaling in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 275(45):35402–35407, 2000.
- [87] SHIEH, R. C., J. I. GOLDBERGER, J. S. STUART und J. N. WEISS: *Lactate transport in mammalian ventricle. General properties and relation to K<sup>+</sup> fluxes*. Circ Res, 74(5):829–838, 1994.
- [88] SHRAGGE, B. W., S. B. DIGERNESS und E. H. BLACKSTONE: *Complete recovery of the heart following exposure to profound hypothermia*. J Thorac Cardiovasc Surg, 81(3):455–458, 1981.

- [89] SINGER, D. und H. J. BRETSCHNEIDER: *Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natural examples—Part 1*. Thorac Cardiovasc Surg, 38(4):205–211, 1990.
- [90] SINGER, D. und H. J. BRETSCHNEIDER: *Metabolic reduction in hypothermia: pathophysiological problems and natural examples—Part 2*. Thorac Cardiovasc Surg, 38(4):212–219, 1990.
- [91] SITSAPESAN, R., R. A. MONTGOMERY, K. T. MACLEOD und A. J. WILLIAMS: *Sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channels: modification of conductance and gating by temperature*. J Physiol, 434:469–488, 1991.
- [92] SMITH, Q. R., L. K. PERSHING und C. E. JOHANSON: *A comparative analysis of extracellular fluid volume of several tissues as determined by six different markers*. Life Sci, 29(5):449–456, 1981.
- [93] SPENCER, T. L. und A. L. LEHNINGER: *L-lactate transport in Ehrlich ascites-tumour cells*. Biochem J, 154(2):405–414, 1976.
- [94] SUNAMORI, M., J. AMANO und A. SUZUKI: *The effects of a temperature below 15 degrees C on the myocardial calcium and ultrastructure in donor heart preservation in a canine model*. Surg Today, 24(9):809–814, 1994.
- [95] SWANSON, D. K., J. H. DUFEK und D. R. KAHN: *Improved myocardial preservation at 4 degrees C*. Ann Thorac Surg, 30(6):518–526, 1980.
- [96] TAEGTMEYER, H., R. HEMS und H. A. KREBS: *Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart*. Biochem J, 186(3):701–711, 1980.
- [97] TALON, S., C. HUCHET-CADIOU und C. LEOTY: *Rapid cooling-induced contractures in rat skinned skeletal muscle fibres originate from sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release through ryanodine and inositol trisphosphate receptors*. Pflugers Arch, 441(1):108–117, 2000.
- [98] TAYLOR, D. O., L. B. EDWARDS, P. J. MOHACSI, M. M. BOUCEK, E. P. TRULOCK, B. M. KECK und M. I. HERTZ: *The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twentieth official adult heart transplant report—2003*. J Heart Lung Transplant, 22(6):616–624, 2003.
- [99] TERRACCIANO, C. M. und K. T. MACLEOD: *Effects of lactate on the relative contribution of Ca<sup>2+</sup> extrusion mechanisms to relaxation in guinea-pig ventricular myocytes*. J Physiol, 500 ( Pt 3):557–570, 1997.
- [100] TROSPER, T. L. und K. D. PHILIPSON: *Lactate transport by cardiac sarcolemmal vesicles*. Am J Physiol, 252(5 Pt 1):C483–489, 1987.
- [101] TYERS, G. F., E. H. WILLIAMS, H. C. HUGHES und G. J. TODD: *Effect of perfusate temperature on myocardial protection from ischemia*. J Thorac Cardiovasc Surg, 73(5):766–771, 1977.

- [102] VEZZOLI, A., M. GUSSONI, F. GRECO und L. ZETTA: *Effects of temperature and extracellular pH on metabolites: kinetics of anaerobic metabolism in resting muscle by  $^{31}\text{P}$ - and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy.* J Exp Biol, 206(Pt 17):3043–3052, 2003.
- [103] WANG, H. J., G. GUAY, L. POGAN, R. SAUVE und I. R. NABI: *Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum.* J Cell Biol, 150(6):1489–1498, 2000.
- [104] WANG, S. Q., E. G. LAKATTA, H. CHENG und Z. Q. ZHOU: *Adaptive mechanisms of intracellular calcium homeostasis in mammalian hibernators.* J Exp Biol, 205(Pt 19):2957–2962, 2002.
- [105] WANG, X., A. J. LEVI und A. P. HALESTRAP: *Kinetics of the sarcolemmal lactate carrier in single heart cells using BCECF to measure  $\text{pH}_i$ .* Am J Physiol, 267(5 Pt 2):H1759–1769, 1994.
- [106] WARD, H. B., J. A. ST CYR, J. A. COGORDAN, D. ALYONO, R. W. BIANCO, J. M. KRIETT und J. E. FOKER: *Recovery of adenine nucleotide levels after global myocardial ischemia in dogs.* Surgery, 96(2):248–255, 1984.
- [107] WEISS, J. N., S. T. LAMP und K. I. SHINE: *Cellular  $\text{K}^+$  loss and anion efflux during myocardial ischemia and metabolic inhibition.* Am J Physiol, 256(4 Pt 2):H1165–1175, 1989.
- [108] WHEELDON, D., L. SHARPLES, J. WALLWORK und T. ENGLISH: *Donor heart preservation survey.* J Heart Lung Transplant, 11(5):986–993, 1992.
- [109] WILLIAMSON, J. R.: *Glycolytic control mechanisms. II. Kinetics of intermediate changes during the aerobic-anoxic transition in perfused rat heart.* J Biol Chem, 241(21):5026–5036, 1966.
- [110] WOODCOCK, E. A., J. F. ARTHUR, S. N. HARRISON, X. M. GAO und X. J. DU: *Reperfusion-induced  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}(3)$  generation and arrhythmogenesis require activation of the  $\text{Na}(+)/\text{Ca}(2+)$  exchanger.* J Mol Cell Cardiol, 33(12):2071–2074, 2001.
- [111] XIAO, A. Y., L. WEI, S. XIA, S. ROTHMAN und S. P. YU: *Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons.* J Neurosci, 22(4):1350–1362, 2002.
- [112] YU, S. P.:  *$\text{Na}(+)$ ,  $\text{K}(+)$ -ATPase: the new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death.* Biochem Pharmacol, 66(8):1601–1609, 2003.
- [113] YU, S. P. und D. W. CHOI: *Ions, cell volume, and apoptosis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 97(17):9360–9362, 2000.

**Eigene Publikationen**

MÜLLER, C., B. NIEDERLE, P. FRÖHLING, H. REICHEL, H. MÜLLER, H. J. ROTH, J. HALLEEN, M. SAMMER UND H. SCHMIDT-GAYK: *What is the target value for intact PTH in patients on chronic haemodialysis?* Poster, Balk J Clin Lab, IX(1):104, 2002.

# Lebenslauf

*Name:* **Bernhard Niederle**  
*Geburtsdatum, -ort:* 22. Juli 1977, Dresden  
*Staatsangehörigkeit:* deutsch  
*Familienstand:* ledig  
*Eltern:* Wolfgang Niederle, Diplomingenieur  
Dorothea Niederle, Apothekerin

## SCHULBILDUNG

*1984 - 1991* Polytechnische Oberschule Kreischa (b. Dresden)  
*1991 - 1997* jesuitische Internatsschule Kolleg St. Blasien  
*19. Juni 1997* Abitur

*Aug. 1997 - März 1999* Anderer Dienst im Ausland nach §14b ZDG  
Cochabamba, Bolivien

## UNIVERSITÄRE AUSBILDUNG

*seit April 1999* Medizinstudium an der Ruprecht-Karls-Universität  
zu Heidelberg  
*5. Dez. 1999* Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes  
*30. März 2001* Physikum  
*Okt. 2001 - Dez. 2005* Promotion, Abt. für experimentelle Chirurgie,  
Universitätsklinikum Heidelberg  
*21. März 2002* 1. Staatsexamen  
*31. März 2005* 2. Staatsexamen



# Danksagung

Ich möchte sehr herzlich allen danken, die mich bei der sehr zeitaufwendigen Durchführung der Versuche und der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

Frau Prof. Dr. med M.-M. Gebhard für die Bereitstellung des Themas und des hervorragenden experimentellen Umfeldes, sowie für die vielen wertvollen Anregungen zur Verbesserung der Experimente und dieser Arbeit;

Herrn Dr. Ackemann für die gute Zusammenarbeit im OP und bei der Auswertung der Versuche und für die exzellente Einführung in wissenschaftliches Arbeiten;

Herrn Dr. Gross, Herrn Dr. Schäfer und Herrn Preuß für ihren unermüdlichen Einsatz, sei es bei Modellentwicklung, Versuchsplanung und -durchführung, Entwicklung eigener Geräte und Software, und auch für ihre konstruktive Kritik und die ständige Bereitschaft, Antworten auf meine Probleme zu finden;

allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen in der Abteilung für experimentelle Chirurgie, die eine Arbeitsatmosphäre schafften, die mir über drei Jahre lang die Freude an der Arbeit bewahrte, und für ihre kraftvolle Unterstützung bei der Durchführung der Experimente;

und nicht zuletzt meinen Eltern und Freunden, die mich während dieser Zeit unterstützt haben, ohne die ich die Arbeit in dieser Form nicht hätte anfertigen können.

Heidelberg, im Dezember 2005

Bernhard Niederle