

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
des Deutschen Herzzentrums München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. Lange)

**Etablierung und Validierung eines neuartigen Modells der Kleintier-Herz-Lungen-
Maschine mit kardioplegischem Herzstillstand an der Ratte –**
Einfluss der Matrix-Metalloproteinase-2 und -9 und inflammatorischer Zytokine auf die
myokardiale kontraktile Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion

Manuela Angelika Gurdan

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. St. M. Wildhirt
2. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann
3. Univ.-Prof. Dr. H.-H. G. U. Eckstein

Die Dissertation wurde am 29.09.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Humanmedizin am 24.03.2010 angenommen.

Im Herzen des Menschen ruht der Anfang und das Ende aller Dinge.

(Lew Nikolajewitsch Tolstoi)

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung	6
I.1 Herz-Lungen-Maschine	6
I.1.1 Entwicklung und Bedeutung der Herz-Lungen-Maschine.....	6
I.1.2 Aufbau und Funktion der HLM	7
I.1.3 Pathophysiologie der extrakorporalen Zirkulation.....	11
I.2 Kardioplegie	12
I.2.1 Prinzipien der Kardioplegie	12
I.2.2 Ischämie und Reperfusion	13
I.3 Kleintiermodell der HLM	13
I.3.1 Vorteil des Kleintiermodells.....	13
I.3.2 Aktuelle Modelle und Probleme	14
I.4 Matrix-Metalloproteinasen.....	14
I.4.1 Grundlagen.....	14
I.4.2 Funktion der Matrix-Metalloproteinasen im Myokard.....	15
I.4.3 Matrix-Metalloproteinasen und extrakorporale Zirkulation	16
I.5 Problemstellung.....	16
II Material und Methoden	18
II.1 Chirurgische Arbeitsschritte	18
II.1.1 Allgemeine Vorbereitungen.....	18
II.1.2 Beatmung	18
II.1.3 Kanülierung für arterielle Blutdruckmessung, venösen Zugang und Konduktanz-Katheter.....	19
II.1.4 Anschluss der Herz-Lungen-Maschine.....	19
II.2 Kleintier-Herz-Lungen-Maschine.....	212
II.2.1 Venöses Reservoir.....	23
II.2.2 Rollerpumpe	23
II.2.3 Wärmetauscher	24
II.2.4 Oxygenator	25
II.2.5 Arteriell und venöses Schlauchmaterial.....	26
II.2.6 Vorbereitung des Kreislaufs, Priming	27
II.3 Konduktanz-Katheter-Technik	27
II.3.1 Grundlagen.....	27
II.3.2 Durchführung.....	28
II.3.3 Kalibrierung des Systems	29
II.3.4 Messwerte	30
II.4 Kardioplegie	32
II.5 Experimentelles Protokoll	32

II.5.1 Datenerfassung	33
II.5.2 Probengewinnung.....	33
II.5.3 Versuchsgruppen.....	34
II.6 Zymographie.....	34
II.6.1 Grundlagen.....	34
II.6.2 Proteinisolierung	35
II.6.3 Herstellung der Zymogrammgele	36
II.6.4 Elektrophorese.....	37
II.6.5 Färben und Entfärben	38
II.7 PCR.....	39
II.7.1 RNA-Isolierung und Aufbereitung.....	39
II.7.2 Durchführung der RT-PCR.....	40
II.7.3 Elektrophorese.....	41
II.8 Nachweis von Zytokinen in Myokard und Plasma	42
II.8.1 Real-time RT-PCR der Myokardproben	42
II.8.2 Bestimmung der Zytokin-Plasmakonzentrationen	43
II.9 Statistische Methoden	43
III Ergebnisse	44
III.1 Verbesserungen des Versuchsaufbaus im Laufe der Experimente	44
III.1.1 Etablierung der Präparationstechnik	44
III.1.2 Etablierung der Konduktanz-Katheter-Technik und Kardioplegie	45
III.2 Daten der Blutgasanalysen	45
III.3 Daten der Konduktanz-Katheter-Messungen	46
III.3.1 Kalibrierung des Systems	46
III.3.2 Hämodynamische Daten.....	48
III.3.3 Kardioplegischer Herzstillstand.....	50
III.4 Molekularbiologische Daten.....	51
III.4.1 Matrix-Metalloproteinasen in der Zymographie	51
III.4.2 Matrix-Metalloproteinasen in der RT-PCR.....	55
III.4.3 Entzündungsparameter.....	60
IV Diskussion	62
IV.1 Entwicklung der Ratten-Herz-Lungen-Maschine.....	62
IV.1.1 Das Kleintiermodell.....	62
IV.1.2 Konduktanz-Katheter-Technik	66
IV.1.3 Der Membranoxygenator	66
IV.1.4 Kardioplegischer Herzstillstand.....	67
IV.1.5 Blutgasanalysen	67
IV.2 Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation und des kardioplegischen Herzstillstandes	68

Inhaltsverzeichnis

IV.2.1 Linkshentrikuläre Funktion	68
IV.2.2 Systemische Entzündungsreaktion.....	69
IV.2.3 Matrix-Metalloproteinasen	70
IV.3 Ausblick.....	72
IV.3.1 Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen.....	72
IV.3.2 Möglichkeiten des Kleintiermodells	73
V Zusammenfassung	74
VI Literaturverzeichnis	76
VII Abkürzungsverzeichnis	85
VIII Abbildungsverzeichnis	87
IX Tabellenverzeichnis	89
Lebenslauf.....	90
Danksagung	91

I Einleitung

I.1 Herz-Lungen-Maschine

I.1.1 Entwicklung und Bedeutung der Herz-Lungen-Maschine

Die extrakorporale Zirkulation und der kardiopulmonale Bypass, durchgeführt unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine, sind seit über 50 Jahren ein fester Bestandteil der herzchirurgischen Praxis. Durch die von John H. Gibbon entworfene und am 06. Mai 1953 erstmals erfolgreich eingesetzte Herz-Lungen-Maschine wurden Operationen am offenen Herzen möglich, die zuvor nicht denkbar waren, so zum Beispiel die Korrektur der Fallot'schen Tetralogie oder von ventrikulären und atrialen Septumdefekten (Nolan et al., 1997; Cooley und Frazier, 2000).

Durch stetige Verbesserungen auf dem Gebiet der Diagnose und präoperativen Vorbereitung, durch die Einführung einer einheitlichen Antikoagulation und einer verbesserten postoperativen Versorgung erhielt die Herzchirurgie einen Aufschwung am Ende der 50er und Anfang der 60er Jahre (Cohn, 2003). Zu den folgenden Weiterentwicklungen zählten zudem der Einsatz des Membranoxygenators anstelle des „bubble-oxygenators“ und eines Filters für Luftblasen, was zu einer deutlichen Reduktion von Gas-Embolien führte (Edmunds, 2003). Eine Grundfüllung der HLM ohne Bedarf an Fremdblut vereinfachte die Benutzung (Cooley und Frazier, 2000) und die Entwicklung kardioplegischer Lösungen ermöglichte die Myokardprotektion während des KPB.

Aufgrund all dieser Neuerungen ist die Mortalität des kardiopulmonalen Bypasses in den vergangenen Jahrzehnten enorm gesunken (Nolan et al., 1997).

Dennoch wird weiterhin eine erheblich eingeschränkte Myokardfunktion nach der extrakorporalen Zirkulation beobachtet. Schon in den 70er Jahren war man sich der schädigenden Wirkung der Oberflächen der Herz-Lungen-Maschine mit Aktivierung des Gerinnungssystems und einer systemischen Entzündungsreaktion bewusst, welche bis heute Gegenstand der Forschung sind und in großem Maße zur Morbidität und Mortalität nach herzchirurgischen Eingriffen beitragen (Kirklin et al., 1983; Wan et al., 1997; Parparella et al., 2002.).

Zudem beeinflusst die Aufeinanderfolge von Ischämie und Reperfusion beim kardioplegischen Herzstillstand während der extrakorporalen Zirkulation, welcher ein entscheidender Faktor für präzises chirurgisches Arbeiten ist, die kontraktile myokardiale Funktion beträchtlich (Vinten-Johansen et al., 1993; Gross et al., 1999; Zahler et al., 1999). Die hier zugrunde liegenden Mechanismen sind nur teilweise geklärt und müssen zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze und technischer Verbesserungen weiterführend am Modell untersucht werden.

Die Verwendung der Herz-Lungen-Maschine wird trotz der Weiterentwicklung minimal-invasiver und endovaskulärer Techniken auch in den nächsten 20-30 Jahren ein fester Bestandteil der Herzchirurgie bleiben und somit wird auch weiterhin die Minimierung der postoperativen Risiken durch Grundlagenforschung am Tiermodell von enormer Bedeutung sein.

I.1.2 Aufbau und Funktion der HLM

Die Herz-Lungen-Maschine ersetzt vorübergehend die Pumpfunktion des Herzens und die Gasaustauschfunktion der Lunge. Begrifflich unterschieden werden hierbei:

die „extrakorporale Zirkulation“ (EKZ) = partieller Bypass, Kreislaufunterstützung durch die HLM ohne Umgehung von Herz und Lunge und

der „kardiopulmonale Bypass“ (KPB) = totaler Bypass, alleinige Blutzirkulation durch die HLM ohne Blutfluss über Herz und Lunge (Lange, 2001).

Die standardmäßig in der Herzchirurgie verwendete HLM besteht aus einer venösen Ableitung, einem venösem Reservoir, einer Rollerpumpe, einem Membran-Oxygenator mit Gasaustauschfunktion und Wärmetauscher, einem arteriellen Filter und einer arteriellen Zuleitung. Kanüliert für Zu- und Ableitung werden je nach Operationsverfahren entweder A. und V. femoralis (bei minimal-invasiven Eingriffen, bei Aneurysmen der Aorta im Kanülierungsbereich, bei Reoperationen oder akuter Blutungsgefahr) oder Aorta ascendens und V. cava superior und inferior bzw. rechter Vorhof bei den Standardeingriffen (Lorenz und Erhardt, 2002). So kann das venöse Blut über eine Leitung der Schwerkraft folgend ins Reservoir fließen. Von dort wird es mittels der Rollerpumpe zum Oxygenator transportiert, wo es mit Sauerstoff angereichert, CO₂ eliminiert und die Temperatur reguliert wird. Danach gelangt es durch den arteriellen Filter zurück ins arterielle Gefäßsystem.

Zusammenfassend übernimmt die Herz-Lungen-Maschine somit folgende Funktionen des kardiopulmonalen Systems:

1. Zirkulation des Blutes durch die Rollerpumpe (Funktion des Herz-Kreislaufsystems)
2. Elimination von Kohlendioxid und Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff durch den Oxygenator (Funktion der Lunge) und
3. Wärmeregulation durch den Wärmeaustauscher (Lauterbach, 2002).

I.1.2.1 Schlauchsystem

Das Schlauchsystem der Herz-Lungen-Maschine besteht aus industriell gefertigten Silikonschläuchen, welche die einzelnen Komponenten der HLM untereinander verbinden. Standardmäßig werden für die arterielle Linie Schläuche mit einem Durchmesser von 0,95

cm und für die venösen Leitungen mit einem Durchmesser von 1,27 cm verwendet. Die Gesamtlänge der Schläuche variiert je nach Operationsfeld und -technik, sodass in Kombination mit dem Membranoxygenator ein Gesamtfüllungsvolumen von 1000-2000 ml erreicht wird (Lauterbach und Meyer, 2002).

I.1.2.2 Venöses Reservoir

Das venöse Reservoir dient dem Ausgleich von Volumenschwankungen während der EKZ. Über eine Leitung mit separater Rollerpumpe, Partikelfilter und Entschäumer ist zusätzlich ein Sauger mit dem Reservoir verbunden, sodass auch das Blut aus dem Operationsbereich über die Herz-Lungen-Maschine rezirkuliert werden kann. Zur Vermeidung von Luftembolien wird der Flüssigkeitspegel im venösen Reservoir kontrolliert und bei einem Abfall unter einen definierten Minimalspiegel Alarm gegeben (Lauterbach, 2002).

I.1.2.3 Rollerpumpe

Die Rollerpumpe besteht aus einem halbrunden Gehäuse, durch das ein Silikonschlauch geführt wird, und mehreren, an einem Kolben befestigten Rollen, die durch permanente Rotation den Schlauch intermittierend komprimieren und somit das darin enthaltene Blut fortbewegen.

Im Gegensatz zur Zentrifugalpumpe, bei der der Blutstrom durch die Zentrifugalkraft eines rotierenden Kreisels bewegt wird, ist die Rollerpumpe wieder verwendbar, weniger kostenaufwändig und wird bei Standardeingriffen daher häufiger eingesetzt. Bei Pumpenstillstand oder Gegendruck wirkt die Rollerpumpe durch die den Schlauch komprimierenden Rollen okklusiv, sodass kein Rückfluss möglich ist, was bei der Zentrifugalpumpe auftreten kann (Lange, 2001; Lauterbach, 2002).

Allerdings fördert die Rollerpumpe im Gegensatz zur Zentrifugalpumpe alle Komponenten im Blut, so z.B. auch Luft.

In klinischen Studien zeigte sich ein Vorteil der Zentrifugalpumpe gegenüber der Rollerpumpe lediglich bei Eingriffen mit EKZ-Zeiten von mehr als vier Stunden hinsichtlich Hämolyserate und Postperfusionssyndrom (Lauterbach, 2002; Schmid, 2006).

I.1.2.4 Membranoxygenator und Wärmetauscher

Der Oxygenator dient in der extrakorporalen Zirkulation der Anreicherung des Blutes mit Sauerstoff und der Elimination von Kohlendioxid. Standardmäßig werden in der heutigen herzchirurgischen Praxis Membranoxygenatoren eingesetzt, da die früher verwendeten

Blasenoxxygenatoren durch die Bildung von Mikro-Blasen und durch den direkten Blut-Gas-Kontakt ein erhöhtes Gefährdungspotential für den Patienten hinsichtlich des Auftretens eines Apoplex und des Kontaminationsrisikos darstellen (Schmid, 2006).

Im Membranoxygenator sind Blut und Gas durch die Membran voneinander getrennt. Das Blut wird durch ein kapilläres Hohlfasersystem geleitet und der Gasaustausch erfolgt mittels Diffusion von O₂ und CO₂ entlang eines Konzentrationsgradienten über die Membran (Lange, 2001; Lauterbach, 2002).

Einen weiteren Vorteil des Membranoxygenators stellt das geringere Füllvolumen dar (Schmid, 2006).

Der Wärmeaustauscher ist häufig an der Eingangsseite in den Oxygenator integriert. Das in der Herz-Lungen-Maschine zirkulierende Blut und entsprechend temperiertes Wasser fließen hier über ein unmittelbar nebeneinander liegendes Zweikammersystem. Der Wärmeaustausch findet über die Oberflächen des Systems statt und ermöglicht sowohl eine Abkühlung als auch Erwärmung der Körpertemperatur (Lauterbach, 2002).

I.1.2.5 Arterieller Filter

Der arterielle Filter, welcher der Elimination von Mikropartikeln aus dem zirkulierenden Blut dient, wird standardmäßig mit einer Porengröße von 20-40 µm verwendet. Die Filteroberfläche sollte einen Blutfluss von 6-7 l/min ermöglichen.

Mikropartikel entstehen durch Luftintritt ins Perfusionssystem, durch Fremdeinbringung von autologen und fremden Materialien aus dem Operationsbereich, durch Zellaggregation oder Fibrinbildung und durch Fremdpartikel aus dem Herstellungsprozess (Bock, 2002).

I.1.2.6 Priming, Füllungsvolumen, Sollfluss

Die Grundfüllung der Herz-Lungen-Maschine, auch Priming genannt, setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen: eine kristalloide, blutisotone Lösung wird mit Natriumbikarbonat zur Pufferung, mit kolloidalen Lösungen zur Prävention der Ödembildung, mit Mannit zur Förderung der Diurese und gegebenenfalls mit Heparin, v.a. bei zusätzlicher Verwendung von Blutkonserven, versetzt (Schelkle und Göriz, 2002).

(Standard-Priming des Deutschen Herzzentrums München: 1500 ml Ringer-Lactat versetzt mit 20%iger Mannitol-Lösung, Inzolen® (kaliumhaltig), Natriumhydrogencarbonat-Lösung 8,4% und 5000 IE Heparin).

Blutkonserven sollten dem Priming zugefügt werden, wenn der Hämatokrit während der Operation auf Werte unter 20-25 % bzw. der Hämoglobinwert auf unter 7 g/dl abfällt.

In der Erwachsenen-Herzchirurgie wird ein Füllungsvolumen von 1000-2000 ml verwendet (Christiansen, 2006).

Die Grundfüllung der HLM wird vor Einsatz am Patienten einige Minuten in der Maschine zirkuliert. Hierbei enthält das Schlauchsystem einen zusätzlichen Filter zur Entfernung von Fabrikationsrückständen, der vor Anschluss der HLM an das Herz-Kreislaufsystem des Patienten entfernt wird.

Der angestrebte Sollfluss der extrakorporalen Zirkulation liegt bei 2,4 l/min/m² und wird patientenspezifisch nach Körperoberfläche berechnet. Unter Narkose sollte der arterielle Mitteldruck 40-60 mmHg betragen (Schelkle und Göritz, 2002; Schmid, 2006).

I.1.2.7 Hypothermie

Die Hypothermie, unterteilt in:

- mild = 32-35°C,
- moderat = 26-31°C,
- tief = 20-25°C und
- profund = < 20°C,

wird in der Herzchirurgie eingesetzt um eine Verlängerung der Ischämietoleranz der Organe zu erreichen. Die Geschwindigkeit von Stoffwechselprozessen nimmt bei Abkühlung graduell ab, ATP wird langsamer verbraucht und damit der Sauerstoff- und Substratbedarf reduziert. Eine Temperaturminderung um 10°C erniedrigt den Sauerstoffbedarf um 50 % (Reichart, 1996; Lange, 2001; Benk et al., 2006).

Das Flussvolumen kann in Hypothermie reduziert werden und ermöglicht eine bessere Übersichtlichkeit des Operationsgebietes (Lange, 2001; Schelkle und Göritz, 2002).

Standardeingriffe werden wegen des in Hypothermie erhöhten Blutungsrisikos heute in milder Hypothermie durchgeführt, welche durch passive Kühlung über den Wärmetauscher der EKZ und durch die Kardioplegiegabe und Oberflächenkühlung des Herzens erreicht wird (Schelkle und Göritz, 2002). Ist eine Ischämiezeit von länger als einer Stunde geplant, ist eine moderate Hypothermie, bei Aortenbogeneingriffen meist eine tiefe Hypothermie erforderlich (Schmid, 2006).

I.1.2.8 Heparin und Protamin

Vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation wird zur Vermeidung von Thrombenbildung eine Vollheparinisierung des Patienten vorgenommen. Um eine „activated clotting time“ (ACT) von 350-450 sec zu erreichen werden ca. 200-400 IE Heparin pro Kilogramm Körpergewicht

verabreicht. Ein Teil des Heparins kann auch dem Priming der Herz-Lungen-Maschine zugefügt werden (Schelkle und Göritz, 2002).

Die Antagonisierung des Heparins mit Protamin nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation sollte im Verhältnis 1 : 1 erfolgen (Schmid, 2006).

I.1.3 Pathophysiologie der extrakorporalen Zirkulation

Schon seit Langem ist bekannt, dass bei herzchirurgischen Operationen mit Verwendung der Herz-Lungen-Maschine verschiedene Entzündungsprozesse ausgelöst werden, welche postoperativ zu einer eingeschränkten Funktion des Herzens führen. Dazu tragen sowohl das operative Trauma, als auch künstliche Oberflächen der HLM, durch die mechanische Pumpe erzeugte Scherkräfte, Temperaturveränderungen und pharmakologische Maßnahmen wie auch die Hämodilution bei (Edmunds, 1998; Asimakopoulos, 2001; Ensminger et al., 2006). Die zusätzlich auftretenden Veränderungen durch Ischämie und Reperfusion, erzeugt durch den kardioplegischen Herzstillstand, werden weiter unten im Text besprochen.

Neben der Herzfunktion sind nach Eingriffen am KPB vorübergehend auch die Funktion von Lungen, Gehirn, Nieren, Leber und Pankreas beeinträchtigt (Edmunds, 1998; Asimakopoulos et al., 2001; Parparella et al., 2002; Levy und Tanaka, 2003). Als Maximal-Form der systemischen Entzündungsreaktion kann es zu einer generalisierten Entzündung kommen, welche auch als SIRS (= systemic inflammatory response syndrom) bezeichnet wird (Levy und Tanaka, 2003; Ensminger et al., 2006).

Bislang wurden folgende Entzündungsprozesse, ausgelöst durch Operationen mit HLM, ausführlicher untersucht:

- Die Aktivierung des Komplementsystems durch Heparin-Protamin-Komplexe und über den Kontakt mit den künstlichen Oberflächen, vermittelt durch das Kinin-Kallikrein-System (Edmunds, 1998; Parparella et al., 2002).
- Die Sekretion von proinflammatorischen (IL-8, TNF- α) und antiinflammatorischen Zytokinen (IL-10) vermittelt durch den Transkriptionsfaktor NF κ B (Parparella et al., 2002).
- Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen, welche Mediatoren und zytotoxische Stoffe freisetzen (Edmunds, 1998; Levy und Tanaka, 2003).
- Die Aktivierung von intrinsischer und extrinsischer Gerinnung und Fibrinolyse durch Oberflächenkontakt (Edmunds, 1998; Ensminger et al., 2006).
- Die Produktion von vasoaktiven und zytotoxischen Substanzen und das Entstehen von Mikroemboli, welche ebenfalls mit der Morbidität nach KPB assoziiert sind (Edmunds, 1998).

I.2 Kardioplegie

Für viele herzchirurgische Eingriffe, wie z.B. Bypass-Operationen, Klappenrekonstruktionen oder Korrekturen angeborener Fehlbildungen, ist eine Operation am ruhiggestellten Herzen Standard und notwendig für ein präzises und erfolgreiches Operieren. Zusätzlich ist für eine gute Übersichtlichkeit des Operationsgebietes eine Blutleere des Herzens erforderlich. Diese beiden Aufgaben können durch die Kardioplegie erfüllt werden, welche außerdem das Herz in der Phase des Stillstandes vor destruktiven Einflüssen schützen soll (Nicolini et al., 2003).

I.2.1 Prinzipien der Kardioplegie

Die Kardioplegie wird definiert als „künstlich induzierter reversibler Herzstillstand bei Operationen am offenen Herzen“ (Pschyrembel, 2002). Sie kann ischämisch, hypotherm oder mit einer kardioplegischen Lösung durchgeführt werden.

Der Herzstillstand, der mittels einer alleinigen Myokardischämie durch Querklemmung der Aorta herbeigeführt wird, intermittierend durch das Öffnen der Aortenklamme unterbrochen, führt zu einem ischämischen Kammerflimmern des Herzens. Dabei ist das Herz allerdings nicht vor schädlichen Stoffwechselfvorgängen geschützt und ein Myokardversagen tritt häufig als Folge auf (Cordell, 1995; Martin et al., 2006).

Die Hypothermie als Möglichkeit zur Verlängerung der Ischämietoleranz des Herzens wurde bereits 1950 beschrieben (Bigelow et al., 1950). Sie führt zu einem verringertem Sauerstoffbedarf des Myokards (Nicolini et al., 2003). Zunächst wurde die Hypothermie durch Spülung des Perikardbeutels mit kalter Kochsalzlösung erzeugt (Shiroishi, 1999). Der hypotherme Herzstillstand kann aber auch durch die Perfusion der Koronararterien mit kalten kristalloiden Lösungen erreicht werden, welche zusätzlich die myokardiale Enzymaktivität hemmen und eine gute Übersicht des Operationsgebietes ermöglichen (Cohen et al., 1999).

Die Entwicklung unterschiedlicher kardioplegischer Lösungen begann mit der Beschreibung des durch Kaliumcitrat herbeigeführten Herzstillstandes durch Melrose im Jahr 1955 (Shiroishi, 1999; Martin et al., 2006). Die kaliumhaltige kardioplegische Lösung ist auch heute ein Standard zur Myokardprotektion (Robinson et al., 1995; Chambers, 2003). Dabei führt die Erhöhung des extrazellulären Kaliums zu einer Depolarisierung der Myokardzelle und einer Inaktivierung der schnellen Natriumkanäle, sodass keine Aktionspotentiale mehr zustande kommen und das Herz innerhalb kürzester Zeit stillsteht (Chambers, 2003).

Verwendung finden kristalloide Lösungen, wie z.B. die aus mehreren Komponenten bestehende Brettschneider-Lösung oder die St.-Thomas-Lösung Nr. 2, und die Blutkardioplegie, in welcher Blut in einem Verhältnis von 1:4 mit einer kristalloiden Lösung gemischt wird (Martin et al., 2006). Durch die Blutkardioplegie, eingeführt von Buckberg und Kollegen, wird die anaerobe Laktat-Produktion reduziert, eine bessere Sauerstoff-Transport-

Kapazität gewährleistet und mehr ATP bereitgestellt als bei Verwendung von kristalloiden Lösungen (Cohen et al., 1999).

In der heutigen Praxis wird eine Kombination der Techniken verwendet. Zum Operieren am blutleeren Herzen wird die Aorta mit einer Klemme verschlossen und damit eine absolute Ischämie erzeugt. Der Herzstillstand wird mit der Perfusion der Koronararterien mit einer kalten (4-10°C) kardioplegischen Lösung eingeleitet (Lange, 2001). Die Blutkardioplegie wird gegenüber der kristalloiden Lösungen bevorzugt verwendet (Robinson et al., 1995; Martin et al., 2006). Eine moderate systemische Hypothermie und das Kühlen des Herzmuskels mit Eiswasser sorgen für einen zusätzlichen Schutz des Myokards. Insgesamt kann durch die Reduktion der Stoffwechselfvorgänge und damit durch die Verminderung einer Gewebsazidose die Ischämiezeit des Myokards von 15-20 Minuten bei alleinigem, intermittierendem Querklemmen der Aorta auf zwei Stunden verlängert werden (Lange, 2001).

I.2.2 Ischämie und Reperfusion

Trotz der Verwendung verschiedener kardioplegischer Lösungen zum Erzielen eines Herzstillstandes unter Myokardprotektion sind diese nur bedingt kardioprotektiv. Sowohl die induzierte Ischämie als auch die darauf folgende Reperfusion des Herzens führen zu einer Vielzahl pathologischer Vorgänge im Myokard und damit einer eingeschränkten Herzfunktion nach kardiopulmonalen Bypass. In der Literatur wurde für diese vorübergehende systolische und diastolische kontraktile Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion der Begriff des „myokardialen Stunnings“ geprägt (Vinten-Johansen und Nakashini, 1993; Gross et al., 1999; Buckberg, 2003; Liakopoulos, 2005). Die Pathogenese des myokardialen Stunnings ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Als zugrunde liegende Reaktionen werden schwerpunktmäßig ein vorübergehender Kalziumüberschuss während der Reperfusion und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen diskutiert (Bolli und Marbán, 1999), wodurch weitere Prozesse initiiert werden, unter anderem die Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen (Siwik et al., 2001).

I.3 Kleintiermodell der HLM

I.3.1 Vorteil des Kleintiermodells

Durch Modelle an verschiedenen Tieren, wie z.B. Schweinen, Schafen oder Kaninchen, wurde die experimentelle Grundlagenforschung zu den Folgen von extrakorporaler Zirkulation und Ischämie und Reperfusion in vivo ermöglicht (Hiramatsu et al., 1997; Kim et

al., 1999). Allerdings sind Modelle an großen Tieren mit einem hohen Kostenaufwand, großem personellen Bedarf und entsprechend aufwendiger Laborausrüstung und Räumlichkeiten verbunden (Ballaux et al., 1999; Fabre et al., 2001; Mackensen et al. 2001; You et al., 2005; Dong et al., 2005).

Eine gute Alternative bietet daher das Kleintier-Modell der Herz-Lungen-Maschine an der Ratte, welches bereits 1968 erstmalig verwendet wurde (Popovic et al., 1968). Auch im Deutschen Herzzentrum München wurde bereits Ende der 60er Jahre eine Herz-Lungen-Maschine für Ratten entwickelt, welche unserem aktuellen Modell als Grundlage diente (Mendler et al., 1969).

I.3.2 Aktuelle Modelle und Probleme

Die HLM-Modelle an der Ratte wurden stetig weiterentwickelt und verbessert, sodass mit diesem in-vivo-Modell Fragestellungen praxisorientierter beantwortet werden können als durch Versuche am isolierten Präparat. Allerdings zeigen viele Kleintiermodelle immer noch verschiedene Schwachpunkte, die eine Übertragbarkeit der Ergebnisse in die klinische Routine erschweren. So erfordern die meisten Versuchsanordnungen große Mengen an Priming-Volumen und sind auf das Fremdblut einer „Spenderratte“ angewiesen (Fabre et al., 2001; Grocott et al., 2001; Mackensen et al., 2001; Dong et al., 2005). Andere Modelle ermöglichen nur einen partiellen Bypass, da der angestrebte Sollfluss der extrakorporalen Zirkulation nicht erreicht wird (Sasaki et al., 1996; Fabre et al., 2001). In den weiterentwickelten und klinisch relevanteren Modellen wurde bislang noch kein kardioplegischer Herzstillstand durchgeführt (Hamamoto et al., 2004; You et al., 2005; Jungwirth et al., 2006). Die Etablierung dieser Technik ist jedoch eine wichtige Voraussetzung zur Untersuchung des Ischämie- und Reperfusionsschadens nach kardiopulmonalem Bypass.

I.4 Matrix-Metalloproteinasen

I.4.1 Grundlagen

Neben der anatomisch-makroskopischen Untergliederung des Herzmuskels in Peri-, Epi- und Endokard wird auch eine histologisch-mikroskopische Einteilung vorgenommen, in welcher zelluläre und extrazelluläre Bestandteile unterschieden werden. Im Herzmuskel auffindbare Zellen sind vor allem Kardiomyozyten, sowie Endothelzellen, Fibroblasten und glatte Gefäßmuskelzellen, aber auch Mastzellen und Makrophagen sind vorhanden.

Der Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix ist das Kollagen, welches zusammen mit anderen Strukturproteinen wie dem Elastin und Adhäsionsproteinen, wie z.B. Fibronectin und

Laminin, ein Netzwerk bildet. Neben diesen Faserproteinen finden sich Proteoglykane, bestehend aus an Proteine gekoppelten Polysacchariden (Mann und Spinale, 1998; McDonnell et al., 1999; Hamacher et al., 2004). Die extrazelluläre Matrix erhält die Anordnung der Kardiomyozyten aufrecht, verbindet Zellen und Gefäße untereinander und trägt zur Kontraktion und Relaxierung des Herzmuskels bei (Heeneman et al., 2003). Sie ist einem ständigem Auf- und Abbau unterworfen, welche physiologischerweise miteinander im Gleichgewicht stehen.

Am Umbau der extrazellulären Matrix sind neben anderen Proteasen auch die Matrix-Metalloproteinasen beteiligt, welche als zinkabhängige Endopeptidasen klassifiziert werden (McDonnell et al., 1999; Hamacher et al., 2004; Chen et al., 2005). Nach Art des verwerteten Substrates werden die Matrix-Metalloproteinasen in die Untergruppen der Kollagenasen (MMP-1, -8, -13 und -18), Gelatinasen (MMP-2 und -9), Stromelysine (MMP-3 und -10), Matrilysine (MMP-7 und -26) und andere MMP's eingeteilt (Woessner, 1994; Visse und Nagase, 2003). Bei diesen erstmalig 1962 beschriebenen Enzymen werden über 20 Arten unterschieden (Woessner, 1994; Visse und Nagase, 2003; Lindsey, 2004), welche in verschiedensten Gewebearten und damit unterschiedlichen Krankheitsprozessen eine Rolle spielen. Sie sind physiologischerweise z.B. an der Embryogenese, Angiogenese und an Entzündungsprozessen beteiligt (Woessner, 1994; McDonnell et al., 1999, Lindsey, 2004). Bei Aktivitätsverlust oder -zunahme können pathologische Prozesse wie Arthritis, Tumore, Arteriosklerose, Aneurysmen oder Fibrose entstehen (McDonnell et al., 1999; Visse und Nagase, 2003; Nagase et al., 2006).

Synthetisiert und sezerniert werden die Matrix-Metalloproteinasen von verschiedenen Zellen als inaktive Vorstufen (pro-MMP), welche durch proteolytische Spaltung, durch Sauerstoffradikale oder auch durch Plasmin aktiviert werden (Mann und Spinale, 1998; Visse und Nagase, 2003).

I.4.2 Funktion der Matrix-Metalloproteinasen im Myokard

Am Herzen führt bereits eine geringe Zunahme an Kollagen zu einer erhöhten systolischen und diastolischen Steifheit des Myokards, wohingegen eine Abnahme von Kollagen, durch vermehrten Abbau oder eingeschränkte Synthese, zu einer Dilatation oder auch Ruptur des Herzmuskels führen kann (Cleutjens, 1996). Zu den Kollagen-verwertenden Proteasen im Herzmuskel zählen vor allem die Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9, welche auch als Gelatinase A und B bezeichnet werden (Woessner, 1994; McDonnell et al., 1999). Diese werden in den endokardialen und subendokardialen Schichten und im Interstitium des Myokards gefunden (Cheung et al., 2000) und wurden dort erstmalig 1975 von Montfort und Pérez-Tamayo nachgewiesen.

Der Umbau der Extrazellulärmatrix durch Matrix-Metalloproteinasen ist im Rahmen von kardialen Erkrankungen, wie z.B. der Herzinsuffizienz (Li et al., 1998), des Myokardinfarkts (Rohde et al., 1999) oder der dilatativen Kardiomyopathie (Thomas et al., 1998) von großer Bedeutung und Gegenstand vieler Forschungsprojekte. Allerdings müssen die durch die Matrix-Metalloproteinasen verursachten myokardialen Umbauprozesse immer im Zusammenspiel mit deren endogenen Inhibitoren betrachtet werden (Deschamps und Spinale, 2006).

I.4.3 Matrix-Metalloproteinasen und extrakorporale Zirkulation

In verschiedenen Studien konnte eine erhöhte MMP-2- und MMP-9-Aktivität in Myokard und Plasma nach extrakorporaler Zirkulation nachgewiesen werden (Mayers et al., 2001; Lin et al., 2005). Die linksventrikuläre Funktion wurde in diesen Studien jedoch nicht bestimmt und es bleibt somit unklar ob eine Korrelation zwischen erhöhter MMP-Aktivität und gestörter linksventrikulärer Funktion nach extrakorporaler Zirkulation besteht.

I.5 Problemstellung

Die Herz-Lungen-Maschine spielt in der Herzchirurgie nach wie vor eine bedeutende Rolle und wird trotz der zunehmenden Verwendung interventioneller Verfahren auch in den nächsten Jahrzehnten ein wichtiger Bestandteil dieser Fachdisziplin bleiben. Trotz intensiver Forschung auf dem Gebiet der pathophysiologischen Reaktion nach extrakorporaler Zirkulation und kardioplegischem Herzstillstand gibt es weiterhin viele ungeklärte Fragestellungen, welche durch ein Kleintiermodell adäquat beantwortet werden können. Dieses Modell sollte zur Erhebung klinisch relevanter und übertragbarer Daten in allen Anforderungen der im herzchirurgischen Alltag verwendeten Herz-Lungen-Maschine nachempfunden sein. Allerdings wurde bislang noch kein kostengünstiges Kleintiermodell mit kardioplegischem Herzstillstand und intraventrikulärer Druck-Volumen-Messung zur zusätzlichen molekularbiologischen Datenerhebung beschrieben.

Ziel dieses Projektes war daher zum einem die Entwicklung einer Kleintier-Herz-Lungen-Maschine mit Durchführung eines Herzstillstandes mittels kardioplegischer Lösung. Zudem sollte eine exakte Messung der linksventrikulären Funktionsparameter durch die Konduktanz-Katheter-Technik an der Ratte ermöglicht werden. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Minimierung des Primingvolumens gelegt, um der klinischen Situation möglichst genau zu entsprechen.

Durch diese Schwerpunktsetzung nimmt der Methodik-Teil einen größeren Raum in der Arbeit ein als üblich.

Zum anderen wurde nach der Etablierung des Modells eine Versuchsreihe angeschlossen um am Beispiel der Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 den Einfluss des kardioplegischen Herzstillstandes auf die myokardiale kontraktile Funktion weitergehend zu untersuchen. Zur Beurteilung der generalisierten Entzündungsreaktion wurde die Konzentration inflammatorischer Faktoren nach extrakorporaler Zirkulation in unterschiedlichen Versuchsgruppen ausgewertet.

II Material und Methoden

II.1 Chirurgische Arbeitsschritte

II.1.1 Allgemeine Vorbereitungen

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten in einem Alter von 12-14 Wochen mit einem Gewicht von 400-500 g (Charles River, Kisslegg) verwendet.

Die Narkose wurde mit der inhalativen Gabe von Diethylether eingeleitet und durch die intraperitoneale Applikation von Thiopental-Natrium (100 mg/kg KG) aufrechterhalten. Der Brustkorb sowie beide Leisten wurden rasiert und die Tiere in Rückenlage an den Extremitäten auf einer Wärmeplatte fixiert, mit deren Hilfe die Körperkerntemperatur bei 37°C stabilisiert wurde. Unter Verwendung einer rektalen Sonde wurde die Körpertemperatur kontinuierlich gemessen. Das EKG wurde über Extremitäten-Ableitungen während des gesamten Versuchs analog registriert und aufgezeichnet. Dazu wurden vier Stichelektroden in die Vorder- und Hinterbeine des Tieres eingebracht und an ein Mehrkanal-Empfangsgerät (RMP1, Siemens, Erlangen) angeschlossen.



Abb. 2.1 Narkoseeinleitung mit Ether

II.1.2 Beatmung

Zum Einführen eines 14G-Polyethylen-Tubus in die Trachea wurde 1 cm kranial des Sternums ein Hautschnitt gesetzt und nach der Durchtrennung der Halsmuskulatur die Trachea dargestellt und inzidiert. Über den Trachealtubus konnten die Ratten mit einem Kleintierrespirator (Modell 683, Harvard Apparatus Inc., South Natick, MA, USA) mechanisch

beatmet werden. Das Atemzugvolumen betrug 7 ml/kg bei einer Atemfrequenz von 50-60 Atemzügen pro Minute. Die Beatmung wurde mit einem Luft-Sauerstoff-Gemisch ($FiO_2 = 0,5$) unter Aufrechterhaltung eines Kohlendioxidpartialdrucks (pCO_2) von 35-45 mmHg durchgeführt.

II.1.3 Kanülierung für arterielle Blutdruckmessung, venösen Zugang und Konduktanz-Katheter

Lidocain 1% wurde im jeweiligen OP-Gebiet als Lokalanästhetikum zur Verringerung von Blutungen während der Präparation eingesetzt.

Zur Überwachung des systemischen arteriellen Blutdrucks mittels eines Druckaufnehmers (P231D, Gould Inc., Oxnard, CA, USA) und zur Entnahme von Blut für die Bestimmung der arteriellen Blutgaswerte wurde die linke Arteria femoralis mit einem heparinisierten 20G-Katheter (Cavafix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) kanüliert. In die Vena femoralis der gleichen Seite wurde zur Flüssigkeitssubstitution und zur Applikation von Medikamenten ebenfalls ein heparinisierte 20G-Katheter (Cavafix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) eingeführt. Anschließend wurde über den venösen Katheter Pancuronium-Bromid (2 mg/kg KG) verabreicht, um eine komplette Muskelrelaxierung zu erreichen.

Zur Beurteilung der Ventrikelfunktion wurde ein 2F-Einzelsegment-Druck-Volumen-Katheter (SPR 838, Millar Instruments, Houston, TX, USA) mit Hilfe einer Leitsonde in die rechte Arteria carotis eingeführt und unter kontinuierlicher Überwachung der Druck- und Volumensignale im linken Ventrikel platziert. Um eine Kalibrierung des Konduktanz-Katheters durch die Injektion von hypertoner Kochsalzlösung durchführen zu können, wurde die linke Vena jugularis mit einem heparinisierten 20G-Katheter (Cavafix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) kanüliert.

II.1.4 Anschluss der Herz-Lungen-Maschine

Als arterielle Infusions-Leitung für die Herz-Lungen-Maschine wurde in die rechte Arteria femoralis eine 2 cm lange 22G-Polyethylen-Kanüle eingeführt, welche mit einem Silikonschlauch verbunden war.

Zur venösen Drainage wurde eine an der Spitze mit vier länglichen Öffnungen versehene Stahlkanüle (Außendurchmesser 1,8 mm, Innendurchmesser ca. 1 mm) verwendet, welche über die rechte Vena jugularis in den rechten Vorhof vorgeschoben wurde. In dieser Position zeigte sich ein guter venöser Rückfluss, der Flussraten von ca. 120 ml/kg/min am kardiopulmonalen Bypass ermöglichte.

Anschließend wurde der Thorax über eine mediane Sternotomie mit einem Elektrokauter eröffnet. Der Thymus wurde reseziert und Aortenbogen und Truncus brachiocephalicus

freipräpariert. Zur Verabreichung der Kardioplegie wurde ein heparinisierte 20G-Katheter (Cavafix®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen) über die linke Arteria carotis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Dieser Katheter ermöglichte zusätzlich eine Entlastung des linken Ventrikels bei abgeklemmter Aorta.

Um Aortenbogen und Truncus brachiocephalicus wurden Tourniquets zum Abklemmen der Aorta angebracht, welche aus einer mit einer Klemme und einem verschiebbaren 2 cm langen Plastikschlauch versehenen Ligatur bestanden.

Als letzter Arbeitsschritt wurden arterielle und venöse Kanülen mit dem Schlauchset der Herz-Lungen-Maschine verbunden.

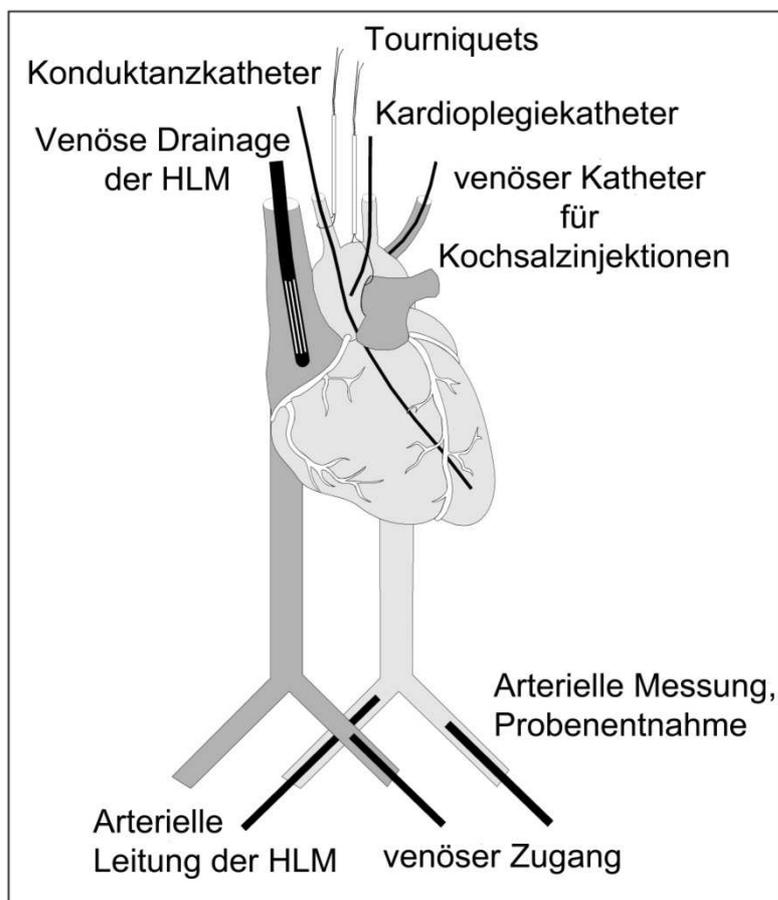


Abb. 2.2 Graphische Übersicht der Kanülierungen

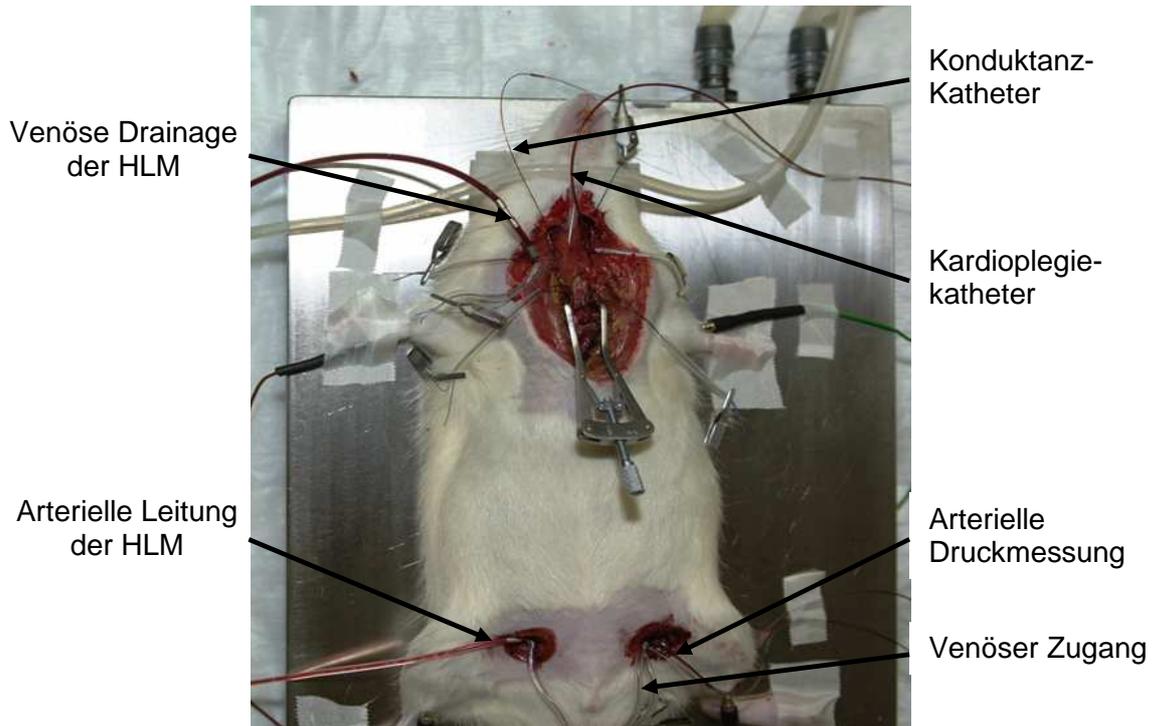


Abb. 2.3 Kanülierungen an der Ratte

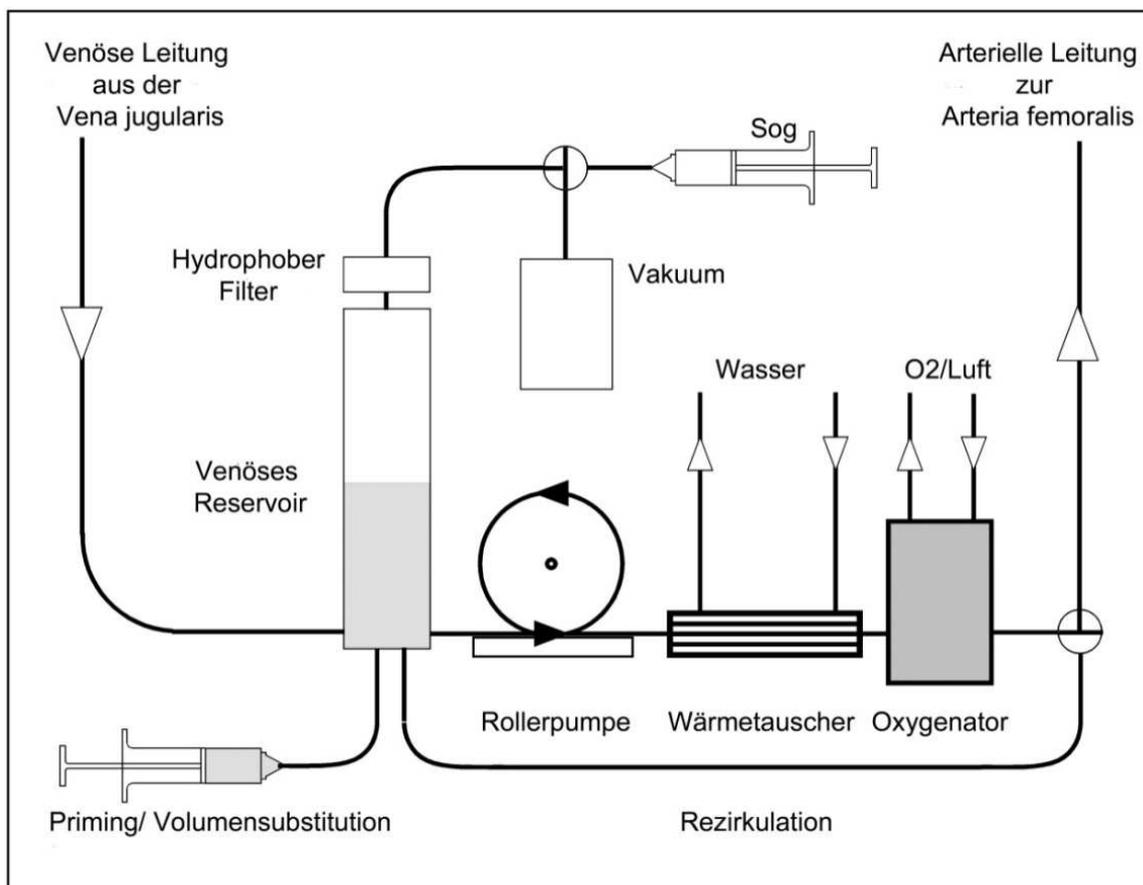


Abb. 2.4 Aufbau der extrakorporalen Zirkulation

II.2 Kleintier-Herz-Lungen-Maschine

Die Herz-Lungen-Maschine (HLM) für Kleintiere bestand, analog zu der im klinischen Alltag verwendeten HLM, aus einem venösen Reservoir, einer Rollerpumpe, einem Wärmetauscher, einem Membranoxygenator und aus Silikonschläuchen für die venöse, arterielle und die Rezirkulations-Leitung. Am venösen Reservoir konnte zusätzlich ein Sog erzeugt werden, der den venösen Rückfluss verbesserte.

Das über die venöse Kanüle aus dem Tier in die Maschine fließende Blut wurde mittels Schwerkraft und aktivem Sog über das venöse Reservoir zur Rollerpumpe befördert und von dieser durch den Wärmetauscher zum Membranoxygenator transportiert. Das dort oxygenierte Blut floss über die arterielle Kanüle in der rechten Arteria femoralis zurück in das Tier.

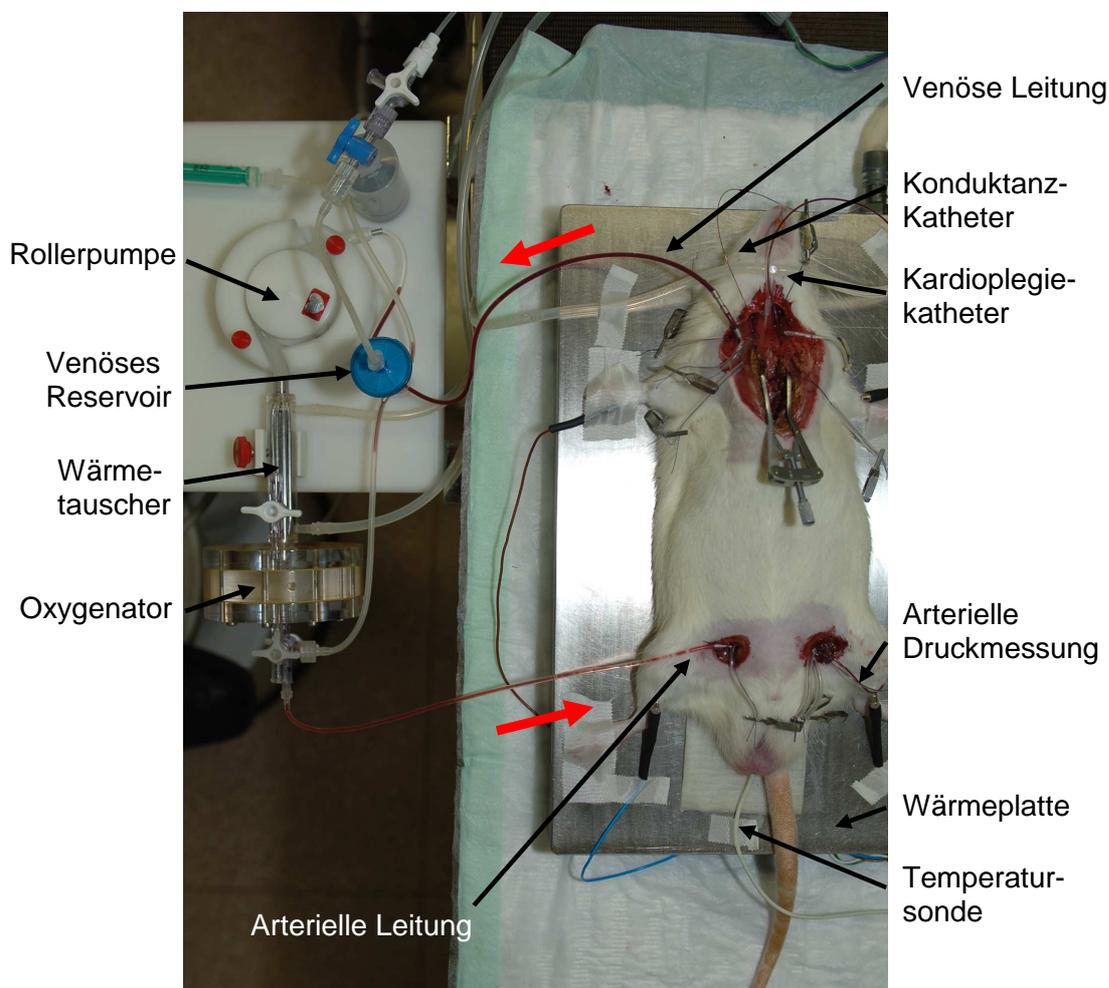


Abb. 2.5 Kompletter Versuchsaufbau

II.2.1 Venöses Reservoir

Das venöse Reservoir bestand aus einer versiegelten, 5 ml Flüssigkeit fassenden Plastikspritze, in der über eine kleine Vakuumkammer und eine Verbindung zu einem Druckluftsystem ein Sog zwischen -15 und -20 mmHg erzeugt werden konnte. Dieser aktive Sog gewährleistete eine hervorragende venöse Drainage und ermöglichte Flussraten von 120 ml/kg/min am kardiopulmonalen Bypass.

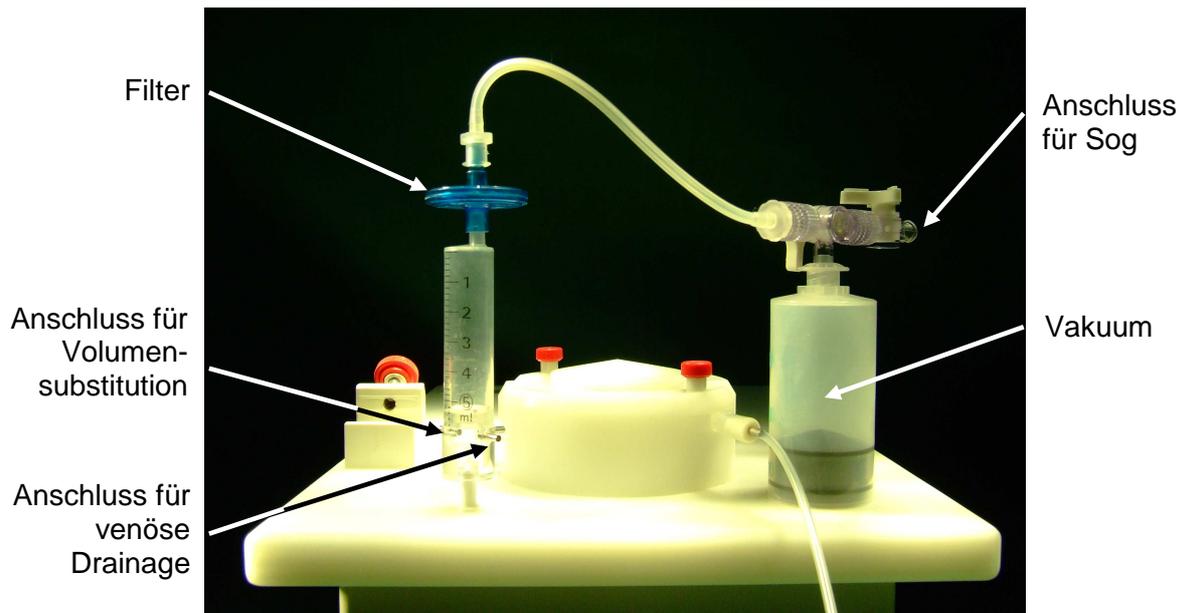


Abb. 2.6 Venöses Reservoir

II.2.2 Rollerpumpe

In den venösen Leitungsteil eingepasst befand sich die Rollerpumpe, welche aus einem Plexiglas®-Gehäuse (Dipl. Ing. M. Humbs, Valley) bestand. In diesem waren vier Bolzen senkrecht montiert, die ein in der Einfassung liegendes, 12 cm langes Stück Silikonschlauch (Innendurchmesser 4 mm, Füllungsvolumen 1,5 ml) komprimierten. Dadurch wurde das venöse Blut vom Reservoir durch den Wärmetauscher und den Membranoxygenator gepumpt und, mit Sauerstoff angereichert, zur arteriellen Kanüle in der rechten Arteria femoralis befördert.

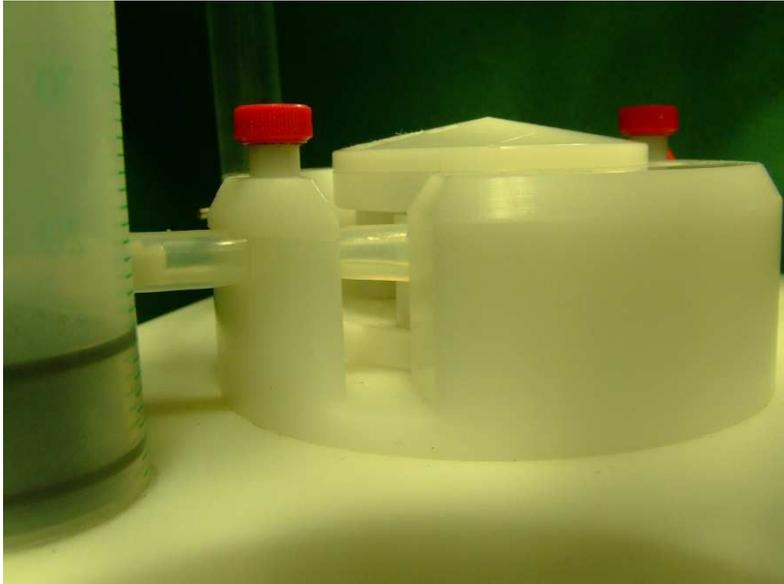


Abb. 2.7 Rollerpumpe

II.2.3 Wärmetauscher

Der Wärmeaustauscher bestand aus vier Edelstahlröhren (Füllungsvolumen 0,6 ml), die sich in einem Plexiglas®-Zylinder befanden. Das venöse Blut gelangte durch die Edelstahlröhren zum Oxygenator. Über zwei Öffnungen im Plexiglas®-Zylinder konnte temperiertes Wasser zugeführt und das Blut im Gegenstromprinzip gekühlt oder erwärmt werden.



Abb. 2.8 Wärmetauscher

II.2.4 Oxygenator

Der Membranoxygenator mit einem Füllungsvolumen von 4 ml wurde von Prof. Dr. N. Mandler (Deutsches Herzzentrum München) speziell für diese Studie entworfen. Eingefasst in einen Plexiglas®-Körper (Dipl. Ing. M. Humbs, Valley), welcher versehen war mit Öffnungen für die Zu- und Ableitung von Gas und Blut, lag ein quadratisches Hohlfasermembransystem (40 x 40 x 15 mm), welches von einem Gasgemisch durchströmt wurde. Die dafür verwendeten Textilfasern bildeten 40 Schichten mit Kapillaren (Durchmesser 0,4 mm), welche überkreuzend angeordnet waren. Das Blut floss senkrecht zu den Faserschichten in einer zylindrisch eingefassten Fläche (Durchmesser 30 mm) durch den Oxygenator. Die Oberfläche für den Gasaustausch betrug 0,063 m². Bei einem Sauerstoffanteil von 100% war ein Gasfluss von 70-80 ml/min ausreichend um eine gute Oxygenierung (PaO₂ 400-500 mmHg, gemischt-venöse Sättigung 70-80%) zu erzielen. Mit einer Gas-Blut-Flussrate von 1:2 konnte der pCO₂-Wert bei 35-45 mmHg konstant gehalten werden.

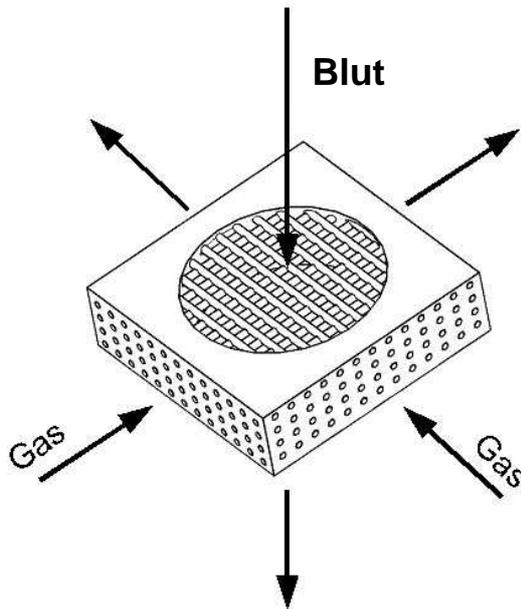


Abb. 2.9 Schematische Darstellung des Membranoxygenators

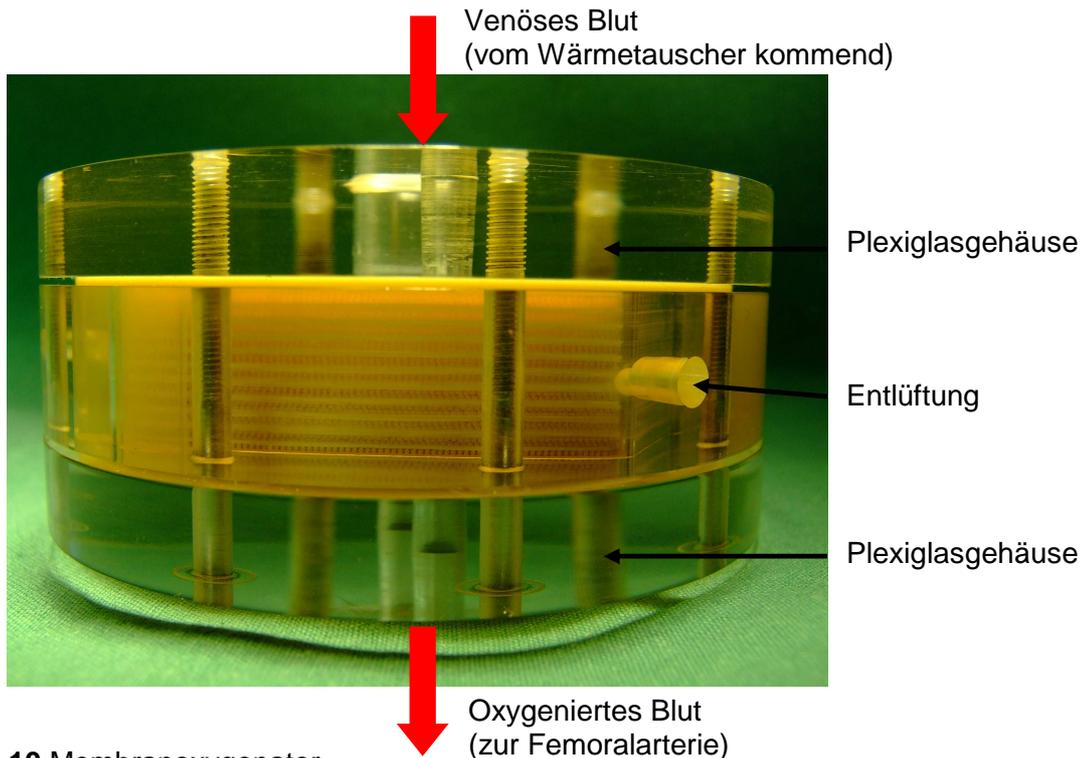


Abb. 2.10 Membranoxygenator

II.2.5 Arteriell und venöses Schlauchmaterial

Mit Ausnahme des Schlauchmaterials der Rollerpumpe wurde ein insgesamt 55 cm langer Silikonschlauch verwendet. Der Außendurchmesser für die arterielle Leitung betrug 2,16 mm und für die venöse Leitung 2,41 mm, die Innendurchmesser entsprechend 1,02 mm für die arteriellen und 1,57 mm für die venösen Schläuche. Das Füllungsvolumen des gesamten Schlauchmaterials betrug 2 ml.



Abb. 2.11 Arterielle Leitung mit Plastikkanüle

II.2.6 Vorbereitung des Kreislaufs, Priming

Zum Entlüften von Schlauchset, Reservoir, Wärmetauscher und Membranoxygenator wurde die HLM mit einer speziell entworfenen Stammlösung (Priming) befüllt, welche Hydroxyethylstärke 6% und Natriumhydrogencarbonat 8,4% im Verhältnis 25 : 1 enthielt. Diese Lösung wurde während des Versuchs ebenso zur Volumensubstitution verwendet. Es ist bei der Füllung der Schlauchsysteme und des Oxygenators darauf zu achten, dass keine Luftblasen in den Hohlräumen zurückbleiben. Das gesamte Füllungsvolumen des Kreislaufs betrug 8 ml, wovon 1 ml im venösen Reservoir verblieb.

Nach Beginn der extrakorporalen Zirkulation und durch die damit verbundene Durchmischung von Rattenblut mit dem Priming der HLM kam es zu einem Abfall des Hämatokrits von einem Ausgangswert von 40-45% auf 20-25%, was der klinischen Routine entspricht. Perioperativ konnte somit auf eine Fremdblutgabe verzichtet werden.

II.3 Konduktanz-Katheter-Technik

II.3.1 Grundlagen

Der Konduktanz-Katheter ermöglicht durch die kontinuierliche und online überwachbare Messung von ventrikulärem Druck und Volumen eine genaue Beurteilung der systolischen und diastolischen Ventrikelfunktion (Baan et al., 1984). Grundlage dafür ist die Messung der elektrischen Leitfähigkeit (Konduktanz) des Blutes. Dazu wird an den verschiedenen Elektroden des Katheters eine Spannung angelegt und ein elektrisches Feld in der Herzhöhle aufgebaut (Steendijk et al., 2004). Leitfähigkeit und Leitfähigkeitsänderungen werden mittels der erzeugten Spannung kontinuierlich registriert und in Volumeneinheiten umgerechnet.

Bei der Bewertung der Signale ist zu beachten, dass die Strukturen, welche die linke Herzkammer umgeben, wie z.B. Ventrikelmuskulatur, Lunge oder Blut im rechten Ventrikel, ebenfalls leitfähig sind und die aufgezeichneten Volumensignale beeinflussen. Um das exakte intraventrikuläre Volumen bestimmen zu können muss folglich die Leitfähigkeit des umgebenden Gewebes (Parallel-Konduktanz) ermittelt und von der Gesamtleitfähigkeit (Gesamt-Konduktanz) abgezogen werden. Diese Kalibrierung erfolgt üblicherweise durch die Injektion einer kleinen Menge hypertoner Kochsalzlösung in den Kreislauf. Dadurch ändert sich die Leitfähigkeit des Blutes vorübergehend ohne die Parallel-Konduktanz zu beeinflussen. Die Parallel-Konduktanz kann nun über die während der Passage der Kochsalzlösung durch den linken Ventrikel aufgenommenen Konduktanzsignale abgeschätzt und von der Gesamt-Konduktanz abgezogen werden (Steendijk et al., 2001).

Die Kombination der Daten aus den mit dem Konduktanz-Katheter durchgeführten Druck- und Volumenmessungen ermöglicht die Darstellung aller Phasen der Herzaktion in einer Druck-Volumen-Schleife (siehe Abb. 2.12). Dabei folgt der isovolumetrischen Anspannungsphase (1) die Auswurfphase (2), welche in die isovolumetrische Erschlaffungsphase (3) übergeht. Zuletzt kommt es in der Füllungsphase (4) zur Vorbereitung des nächsten Herzzyklus. Die einzelnen Phasen werden durch das Öffnen und Schließen von Mitral- und Aortenklappe voneinander abgegrenzt (Steendijk et al., 2004).



Abb. 2.12 Exemplarisch aufgezeigte Druck-Volumen-Schleife des linken Ventrikels

II.3.2 Durchführung

Für die intraventrikulären Messungen wurde ein speziell für Ratten entwickelter, von Ito et al. 1996 erstmalig beschriebener, 2F-Druck-Volumen-Katheter (SPR-838, Millar Instruments, Houston, TX, USA) verwendet, welcher mit vier paarweise angeordneten Elektroden (Elektrodenabstand 9 mm) zur Volumenmessung und einem dazwischen liegenden Drucksensor ausgestattet war. Der Katheter hatte eine Länge von 12,5 cm und wurde mit Hilfe der am Monitor beobachteten Druck-Volumen-Kurven in einer stabilen Position im linken Ventrikel platziert. Danach wurden die Signale kontinuierlich mit einer Abtastrate von 1000/sec unter Verwendung einer ARIA™ Druck-Leitfähigkeits-Messeinheit aufgezeichnet (MPCU-200, Millar Instruments, Houston, TX, USA), welche mit einem PowerLab/4SP Datenerfassungssystem (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australien) und einem PC verbunden war.

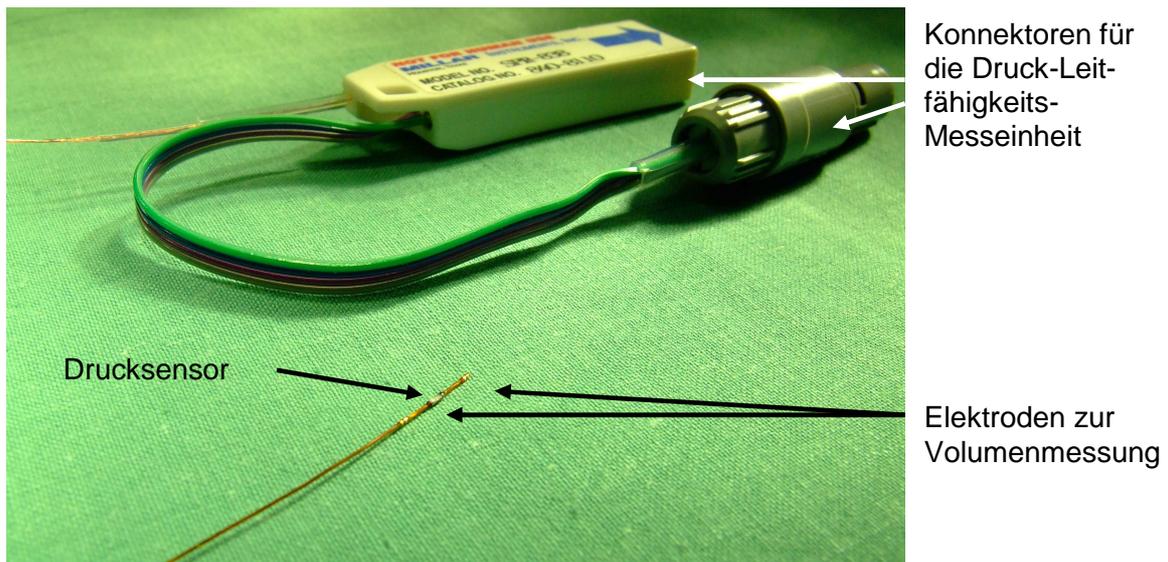


Abb. 2.13 Konduktanz-Katheter

Die Druck- und Volumensignale wurden während der Versuche kontinuierlich überwacht (Chart5 Windows, AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australien). Eine Aufzeichnung erfolgte zu den im Versuchsprotokoll festgelegten Messzeitpunkten. Dabei wurden Druck- und Volumen-Schleifen in Ruhe, während einer Volumenentlastung und während der Injektion von hypertoner Kochsalzlösung aufgezeichnet.

Mittels zwei aufeinander folgender Kochsalzinjektionen (10% NaCl, 50 μ l) in den linken Ventrikel über die Kanüle in der linken Vena jugularis wurde die Parallel-Konduktanz ermittelt.

Alle Messungen wurden zweimal unter stabilen Kreislaufbedingungen ohne inotrope oder durch die extrakorporale Zirkulation vermittelte Unterstützung durchgeführt. Die Beatmung wurde während der Datenaufzeichnung ausgesetzt um respiratorisch erzeugte hämodynamische Fluktuationen zu vermeiden.

II.3.3 Kalibrierung des Systems

Die Leitfähigkeit des Blutes ist vom Anteil der Erythrozyten am Blutvolumen abhängig. Daraus ergibt sich eine Abhängigkeit der Volumen-Messungen mit dem Konduktanz-Katheter vom Hämatokritwert. Bei einer Erniedrigung des Hämatokritwertes steigt das definitive Blutvolumen, ermittelt durch die Konduktanz-Katheter-Messungen, an (Heimisch et al., 2007).

Bei Kleintieren führen bereits kleine Volumen-Gaben zu merklichen Änderungen des Hämatokritwertes. In unseren Versuchen änderte sich der Hämatokrit infolge der Hämodilution durch das Priming-Volumen der HLM von einem Ausgangswert von 40-45%

auf ca. 20-25%, wodurch wiederholte in-vitro-Volumen-Kalibrierungen des Konduktanz-Katheters erforderlich wurden. Hierfür wurden bei 11 aufeinander folgenden Versuchen jeweils 0,5 ml Blut in mit Heparin vorbehandelten Spritzen unmittelbar nach der Präparation und zu verschiedenen Zeitpunkten der schrittweisen Vermischung von Blut und Füllungsvolumen der HLM durch die Rollerpumpe entnommen. Für die Konduktanz-Katheter-Kalibrierung wurden Kalibrierungs-Küvetten mit exakt bekannten Volumina von 28,3 μl , 63,3 μl und 113,1 μl (Standard-Kalibrierungs-Küvette, Artikel-Nr. 910-1048, Millar Instruments, Houston, TX, USA) verwendet, in denen das jeweilige Volumen über das Konduktanz-Katheter-System gemessen wurde. Der Rest des entnommenen Blutes wurde in Glaskapillaren aufgezogen um mittels Zentrifugierung (Zentrifuge 2010, Hettich, Tuttlingen) den zugehörigen Hämatokritwert zu bestimmen.

II.3.4 Messwerte

Die Analyse der Druck-Volumen-Signale wurde offline unter Verwendung der PVAN 2.9 Software (Millar Instruments, Houston, TX, USA) durchgeführt.

Folgende Parameter können zur Ermittlung der systolischen und diastolischen Herzfunktion errechnet werden:

1) Ventrikel-Funktionsparameter, die direkt aus den statischen Druck-Volumen-Schleifen ermittelt werden können und daher abhängig vom Füllungszustand des Ventrikels sind, geben Aufschluss über die (Steendijk et al., 2004)

- systolische Funktion: Schlagarbeit (SW), Schlagvolumen (SV), Auswurffraktion (EF), endsystolisches Volumen (ESV), endsystolischer Druck (ESP), maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max}), Spitzenrate der Ejektion (dV/dt_{\max})
- diastolische Funktion: enddiastolisches Volumen (EDV), enddiastolischer Druck (EDP), Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{\min}), Spitzenrate der Füllung (dV/dt_{\min}), diastolische Relaxationszeitkonstante tau (τ).

Die oben beschriebenen (siehe Abb. 2.12) einzelnen Phasen der Herzaktion können durch folgende Parameter beurteilt werden: über dP/dt_{\max} kann die Ventrikelfunktion in der isovolumetrischen Anspannungsphase, über dV/dt_{\max} kann die systolische Funktion in der Auswurfphase ermittelt werden. Die diastolische Ventrikelfunktion in der isovolumetrischen Erschlaffungsphase und in der Füllungsphase wird über dP/dt_{\min} und dV/dt_{\min} beurteilt.

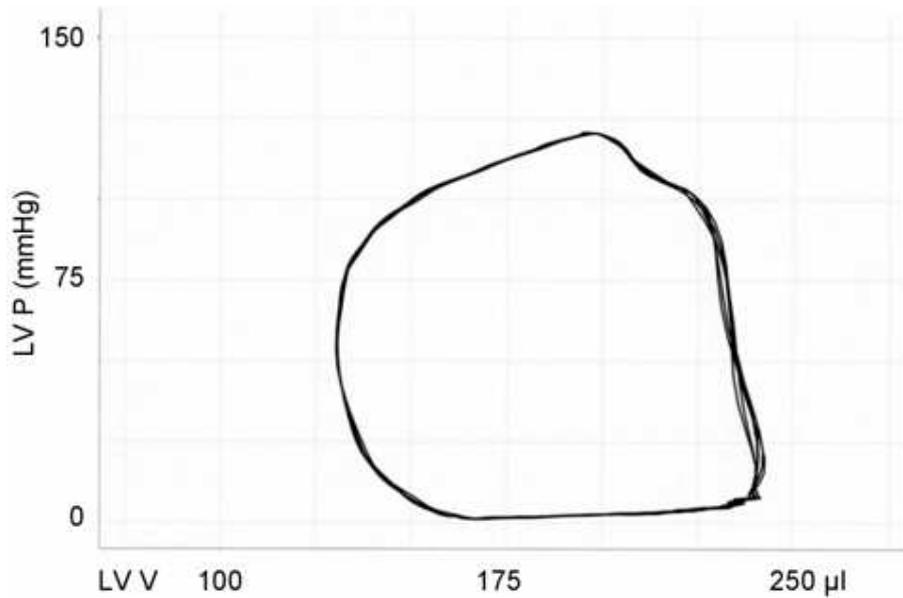


Abb. 2.14 Statische Druck-Volumen-Schleife

2) Um Parameter der systolischen und diastolischen Ventrikelfunktion, die unabhängig vom Füllungszustand des Herzens sind, zu berechnen, müssen Druck-Volumen-Schleifen zu unterschiedlichen Zeitpunkten einer Ventrikelentleerung erfasst werden (Steendijk et al., 2004). Durch eine schnelle venöse Volumenentlastung und damit einer Reduktion der Vorlast können somit die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR), die endsystolische Elastanz (E_{es}), die enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung (EDPVR), die enddiastolische Elastanz (E_{ed}) und die Vorlast-abhängige Schlagarbeit („preload recruitable stroke work“, PRSW) bestimmt werden.

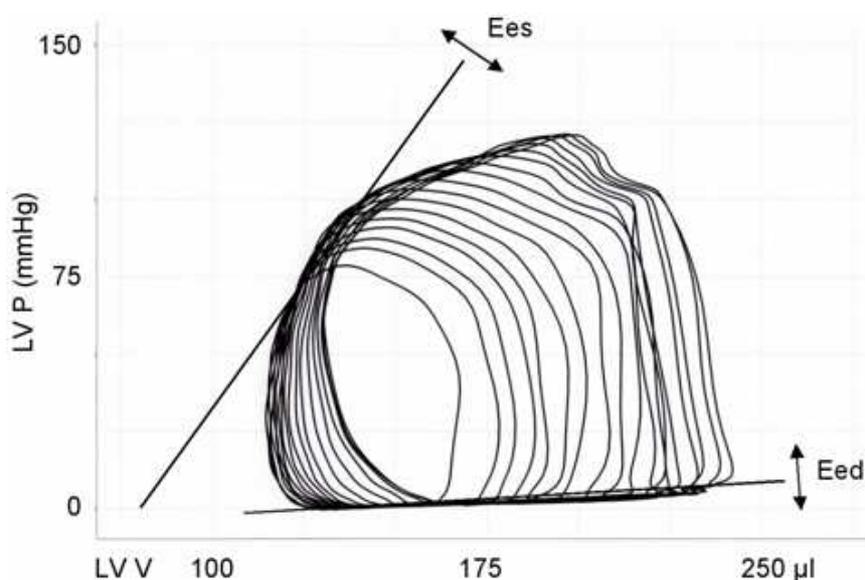


Abb. 2.15 Druck-Volumen-Schleifen während der Volumenentlastung des LV

II.4 Kardioplegie

Nach dem Verschluss der Aorta und der rechten Arteria carotis mittels Tourniquets, wurde die Kardioplegielösung (Inzolen®, Köhler Chemie, Alsbach) über den in der linken Arteria carotis liegenden Katheter in die Aortenwurzel injiziert. Die von uns verwendete kristalloide Kardioplegielösung enthielt hohe Konzentrationen an Kalium (280 mmol/l). Durch die Gabe von ca. 0,5 ml Inzolen® konnte innerhalb von 10-15 Sekunden ein Herzstillstand erreicht werden. Zusätzliche Dosen wurden verabreicht, wenn das EKG elektrische Aktivität anzeigte oder sich ein erhöhter intraventrikulärer Druck nachweisen ließ. Für einen 30-minütigen Herzstillstand bei einer rektal gemessenen Körpertemperatur von 32°C mussten insgesamt 1,0+/-0,5 ml Inzolen® verabreicht werden.

II.5 Experimentelles Protokoll

Nach der chirurgischen Präparation und der Gabe von Heparin (500 IE/kg KG) wurden arterielle Blutproben als Ausgangswerte gewonnen. Um eine Durchmischung des Rattenblutes mit dem zur Füllung der Herz-Lungen-Maschine verwendeten Blutersatz zu erreichen, wurde die Herz-Lungen-Maschine für drei Minuten in Betrieb genommen. Nach dieser Hämodilution wurden die hämodynamischen Parameter mittels des Konduktanz-Katheters bestimmt und eine weitere arterielle Blutgasanalyse durchgeführt.

Nach der Beendigung der Messungen wurde die extrakorporale Zirkulation mit einer Flussrate von 120 ml/kg/min gestartet und die Rektaltemperatur innerhalb von 15 Minuten auf 32°C abgesenkt. Nach diesen ersten 15 Minuten extrakorporaler Zirkulation wurde bei einem Teil der Versuchstiere ein kardioplegischer Herzstillstand mit abgeklemmter Aorta herbeigeführt. Die myokardiale Ischämie wurde nach 30 Minuten durch Lösen der Aortenklemme aufgehoben. Die letzten 15 Minuten der extrakorporalen Zirkulation dienten der Reperfusion des Herzens und dem Erwärmen der Tiere auf 37°C Rektaltemperatur. Bei der Vergleichsgruppe (Gruppe 2, siehe II.5.3) wurde die EKZ mit einer 30-minütigen Hypothermiephase bei 32°C ohne Herzstillstand durchgeführt.

Nach 60 Minuten extrakorporaler Zirkulation wurden die Tiere von der Herz-Lungen-Maschine entwöhnt. Die systemische Heparinisierung wurde nicht antagonisiert. Weitere arterielle Blutgasanalysen wurden während der extrakorporalen Zirkulation und 30 und 60 Minuten nach Entwöhnung von der HLM durchgeführt. Die Nachbeobachtungsphase betrug bei stabilen Herz-Kreislauf-Verhältnissen insgesamt 60 Minuten und endete mit einer letzten Bestimmung der linksventrikulären Funktion mittels Konduktanz-Katheter.

II.5.1 Datenerfassung

Arterielle Blutproben (0,1 ml) zur Blutgasanalyse wurden vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation, nach der Hämodilution, während der EKZ (nach 30 und 60 Minuten) und in der einstündigen Nachbeobachtungsphase (nach 30 und 60 Minuten) aus der rechten Arteria femoralis entnommen. Hämatokrit, pO₂, pCO₂, Kalium, Basenüberschuss und pH wurden damit analysiert.

Bei den Ausgangswerten der Blutgasanalysen und der hämodynamischen Parameter ist zu beachten, dass diese nicht die perioperative Situation repräsentierten, da die Blutviskosität und der periphere Gefäßwiderstand erheblich durch die Hämodilution während der extrakorporalen Zirkulation verändert wurden. Somit wurde die Erhebung eines zweiten Datensatzes nach der Durchmischung des Rattenblutes mit dem Priming der HLM notwendig.

Mittlerer arterieller Druck und Herzfrequenz wurden zur unmittelbaren Überwachung der Herzfunktion während der Versuche aus den Analogsignalen des arteriellen Drucks abgelesen, welche mittels eines Mehrkanal-Empfangsgeräts (Siemens, Erlangen) zusätzlich aufgezeichnet wurden.

Die Messungen mit dem Konduktanz-Katheter wurden nach der Hämodilution vor Beginn der EKZ und 60 Minuten nach Entwöhnen von der Herz-Lungen-Maschine durchgeführt.

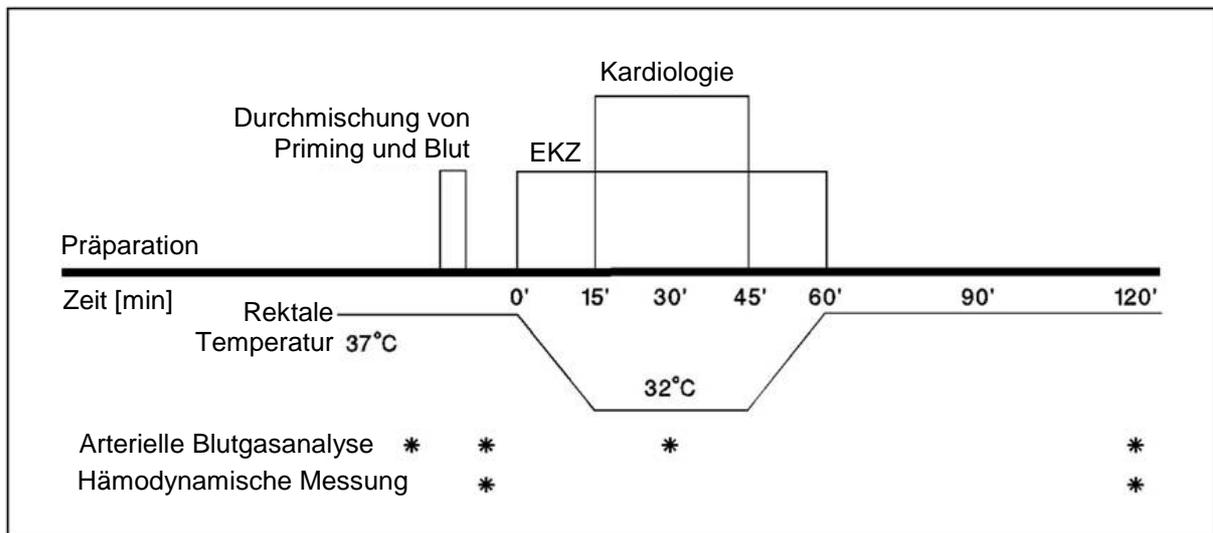


Abb. 2.16 Experimentelles Protokoll

II.5.2 Probengewinnung

Nach Abschluss der hämodynamischen Messungen wurde eine Blutprobe (5 ml) aus der Arteria femoralis entnommen und der Tod der Tiere durch eine Überdosis Kaliumchlorid herbeigeführt. Das Herz wurde in situ mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) antegrad

perfundiert und anschließend zur Probengewinnung durch Absetzen der großen Gefäße aus dem Thorax exzidiert. Zerteilt in verschiedene Bestandteile (Endo- und Epikard des linken Ventrikels) wurden die Proben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blutprobe wurde für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) und das so gewonnene Plasma von den darunter liegenden zellulären Blutbestandteilen mit einer Pipette abgenommen. Alle Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

II.5.3 Versuchsgruppen

Insgesamt wurden drei verschiedene Gruppen verglichen:

- Gruppe 1 (INZ): 60 Minuten extrakorporale Zirkulation inklusive 30-minütigem, kardioplegischem Herzstillstand (Inzolen®)
- Gruppe 2 (EKZ): 60 Minuten extrakorporale Zirkulation ohne Kardioplegie
- Gruppe 3 (Kontrolle): Kontrolltiere ohne extrakorporale Zirkulation und chirurgische Präparation (= Nativ-Tiere)

II.6 Zymographie

II.6.1 Grundlagen

Die Zymographie ist eine Methode zur Darstellung der proteolytischen Aktivität von auf Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennten Enzymen. Die Gele enthalten zusätzlich SDS, welches die Proteine denaturiert, und ein Substrat (meist Gelatine) der zu untersuchenden Proteine (Kleiner und Stetler-Stevenson, 1993).

Die zugrunde liegende Technik, die SDS-PAGE (= Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), wurde erstmalig 1970 von Laemmli beschrieben. Hierbei werden die hoch auflösenden Möglichkeiten der Elektrophorese mit der Eigenschaft von SDS, Proteine in ihre Polypeptidketten zu zerlegen, kombiniert und die Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Die verwendeten Gele bestehen aus einem 1 cm langen, oben gelegenen Sammelgel und einem unteren, 9 cm langen Trenngel (Laemmli, 1970).

Im Sammelgel werden die Proben vor der Auftrennung im Polyacrylamid-haltigerem Trenngel (Verhältnis der Polyacrylamidmenge von Sammelgel zu Trenngel = ca. 1 : 3) konzentriert. Dadurch können auch größere Proben-Volumina eingesetzt werden, deren enthaltene Proteine dennoch als klar abgrenzbare Banden im Gel dargestellt werden. Mittels einer angelegten elektrischen Spannung wandern die Proteine durch die Poren des in einer Pufferlösung stehenden Polyacrylamid-Gels und trennen sich im Bereich des Trenngels anhand der Molekülmasse auf. Durch die Verwendung von SDS zur Proteindenaturierung

wird die Eigenladung des Proteins aufgehoben und die Wandereigenschaften im Elektrophoresegel entsprechen damit in etwa dem Molekulargewicht. Kleine Proteine wandern schneller durch das Gel als große. Anhand eines zusätzlich eingesetzten Längenstandards kann die Molekülmasse bestimmt werden.

Zur Renaturierung der Proteine werden die Gele in 2, 5%igem Triton X-100 gewaschen und anschließend zur Entfaltung der hydrolytischen Aktivität der Gelatinasen über Nacht bei 37°C im Entwicklungspuffer inkubiert (Tyagi et al., 1993; Li et al., 1998).

Die Beimengung von Gelatine dient der Bestimmung der proteolytischen Aktivität der Proteine nach Färbung und Entfärbung mit Coomassie blue.

Bereiche des Gels mit proteolytischem Abbau von Gelatine werden als nicht gefärbte Zone sichtbar. Der Grad des proteolytischen Abbaus durch die Gelatinasen ist direkt proportional zur Menge des aufgetragenen Proteins (Kleiner und Stetler-Stevenson, 1993).

Somit kann die Zymographie sowohl zur quantitativen Bestimmung der Gelatinase-Aktivität, als auch zur qualitativen Darstellung der Gelatinase-Arten verwendet werden. Da die aktive und die latente Form von Enzymen unterschiedliche Molekulargewichte besitzen, können beide Formen im Zymogramm dargestellt werden.

Zum Nachweis der Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen -2 und -9 im Rattenmyokard und Plasma wurden für unsere Versuchsauswertung myokardiale und plasmatische Lysate auf Gelatine-haltigen (1 mg/ml) 7,5%igen-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (SDS-PAGE) und die proteolytischen Enzymaktivitäten nach Färbung des Gels in Coomassie brilliant blue R-250 und anschließender Entfärbung als weiße lytische Zonen auf blauem Hintergrund dargestellt und densitometrisch ausgewertet. Für die Bestimmung der einzelnen MMP-Formen wurde ein Längenstandardstandard für Gelatinasen (CHEMICON International, Inc., USA) verwendet.

Diese Methode wurde in leicht abgewandelter Form zuvor beschrieben von Grammer et al., 2006 und übernommen von Li et al., 1998.

Alle verwendeten Reagenzien stammen, soweit nicht anderweitig benannt, von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen.

II.6.2 Proteinisolierung

Die bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden im noch gefrorenen Zustand zerteilt und zu Proben von je 30-50 mg abgewogen (Mikrowaage, Sartorius, Göttingen). Zu einer Gewebemenge von bis zu 50 mg wurden 0,5 ml Puffer nach Li et al. pipettiert. Das Gewebe wurde mittels eines Homogenisators (Ultra-Turrax, T25 basic, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen) zerkleinert und danach bei 3000 rpm und 4°C 10 Minuten lang zentrifugiert

(Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Der Überstand wurde zur weiteren Verwendung abpipettiert.

Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung im Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf). Der zur Isolierung verwendete Puffer wurde hierbei als Referenzgröße eingesetzt.

	Reagenzien	Menge
Puffer nach Li et al., 1998 (Proteinisolierung)	Cacodyl-Säure, pH 5,0	10 mM (138 mg/100 ml H ₂ O)
	NaCl	150 mM (876,6 mg/100 ml H ₂ O)
	ZnCl ₂	1 µM (13,828 mg/100 ml H ₂ O)
	NaN ₃ (Natriumazid)	1,5 mM (9,75 mg/100 ml H ₂ O)
	Triton X-100	0,01% (10 µl/100 ml H ₂ O)
	CaCl ₂	20 mM (294 mg/100 ml H ₂ O)

Tab. 2.1 Puffer zur Proteinisolierung

II.6.3 Herstellung der Zymogrammgele

Alle zur Gelherstellung und Elektrophorese verwendeten Materialien stammen von Bio-Rad, München. Die Gele enthielten Gelatine in einer Konzentration von 1 mg/ml und 7,5% SDS-Polyacrylamid.

Als erster Arbeitsschritt musste die Gekassette für das zu gießende Gel (Größe ca. 7 × 9 cm, Dicke 0,75 mm), bestehend aus einer Spacerplatte (8,3 × 10,1 cm; Vertiefung 0,75 mm) und einer dünnere Deckplatte (7,3 × 10,1 cm), zusammengesetzt und in den Gießstand eingepasst werden. Als nächstes wurden die Komponenten des Trenngels gemischt. APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (Tetramethylethylendiamin) dürfen erst unmittelbar vor dem Befüllen der Gekassette zugegeben werden, da diese Bestandteile die Polymerisierung auslösen (Laemmli, 1970). Die Trenngel-Lösung (4 ml) wurde mit einer Pipette in die vorbereitete Gekassette bis ca. 3 cm unter den oberen Rand eingefüllt. Um eine glatte und gerade Oberfläche zu erhalten wurde das Trenngel-Gemisch sofort mit t-Amylalkohol (2-Methyl-2-Butanol) überschichtet. Nach 45-60 Minuten ist das Trenngel-Gemisch polymerisiert. Der Alkohol wurde abgegossen und die Geloberfläche mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet.

Anschließend wurden die Komponenten für das Sammelgel gemischt. APS und TEMED wurden ebenfalls als letzte Bestandteile zugegeben. Die Sammelgel-Lösung wurde mit einer Pipette bis zum oberen Rand der Gekassette eingefüllt und ein Kamm (10 Well; Dicke 0,75

mm) zwischen die Glasplatten in die Sammelgel-Lösung eingesetzt. Nach ca. 5-10 Minuten ist das Sammelgel polymerisiert. Nach der Entfernung des Kammes und dem Ausspülen der Wells mit Laufpuffer ist das Gel verwendungsfertig.

	Reagenzien	Menge
Trenngel (10%)	Wasser (deionisiert)	0,525 ml
	30%Acrylamid/Bis-Lösung	1,65 ml
	Trenngelpuffer	1,25 ml
	Sucroselösung	1,075 ml
	Gelatine	0,5 ml
	10%APS	17,5 µl
	TEMED	1,875 µl
Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)	Tris Base	27,23 g
	Wasser (deionisiert)	~ 130 ml
	6N (32%) HCl	zum Einstellen des pH`s
Sammelgel (4%)	Wasser (deionisiert)	1,84 ml
	30%Acrylamid/Bis-Lösung	0,66 ml
	Sammelgelpuffer	1,25 ml
	Sucroselösung	1,25 ml
	10%APS	60 µl
	TEMED	13 µl
Sammelgelpuffer (0,5 M Tris HCl, pH 6,8)	Tris Base	6 g
	Wasser (deionisiert)	~ 90 ml
	6N (32%) HCl	zum Einstellen des pH`s

Tab. 2.2 Komponenten von Trenngel und Sammelgel

II.6.4 Elektrophorese

Zunächst wurde die Elektrophoresekammer mit zwei Gelkassetten bestückt und mit dem zuvor 1 : 10 verdünnten Zymogramm-Laufpuffer (siehe Tab. 2.3) befüllt. Die benötigte Proteinmenge wurde für die gewünschte Proteinkonzentration (20 bzw. 40 µg) berechnet und abpipettiert. Die Proteinproben wurden jeweils mit der doppelten Menge Zymogramm-Sample-Puffer, welcher zusätzlich Bromophenol blau zur Darstellung der Proben während der Elektrophorese enthält, verdünnt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde mit 100 V bei Raumtemperatur und einer Laufzeit von 100 Minuten durchgeführt. Zur Renaturierung der Proteine wurden die Elektrophorese-Gele bei Raumtemperatur für 30 Minuten in je 100 ml Zymogramm-Renaturierungspuffer (2,5% Triton X-100) geschwenkt. Der Zymogramm-Renaturierungspuffer sollte nach 15 Minuten durch frischen Puffer ersetzt werden.

Anschließend wurden die Gele zur Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen über Nacht bei 37°C in je 100 ml Zymogramm-Entwicklungspuffer inku biert.

	Reagenzien	Menge
Zymogramm-Laufpuffer	Tris Base	15,00 g
	Glycin	72,00 g
	SDS (Invitrogen, Karlsruhe)	5,00 g
	Wasser (deionisiert)	500 ml
Zymogramm-Sample-Puffer	Wasser (deionisiert)	2,15 ml
	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
	Glycerol	2,50 ml
	10% SDS	4,00 ml
	1% Bromphenolblau	0,10 ml
Zymogramm-Renaturierungspuffer	Triton X-100	25 g
	Wasser (deionisiert)	900 ml
Zymogramm-Entwicklungspuffer	Tris Base	6,06 g
	NaCl	11,70 g
	CaCl ₂	0,56 g
	30% Brij-35	670 µl
	Wasser (deionisiert)	900 ml

Die Reagenzien des Zymogramm-Renaturierungs- und Entwicklungspuffers wurden zunächst in 900 ml deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit deionisiertem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 1 l aufgefüllt.

Tab. 2.3 Puffer für Gelelektrophorese und Entwicklung

II.6.5 Färben und Entfärben

Die über Nacht inkubierten Gele wurden in je 100 ml Zymogramm-Färbelösung (Coomassie brilliant blue R-250, Bio-Rad, München) für drei Stunden bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Entfärbung wurde mit je 100 ml Zymogramm-Entfärbelösung für ca. 30-60 Minuten ebenfalls unter Schwenken durchgeführt. Dabei sollte die Lösung jeweils nach 15 Minuten bis zur gewünschten Darstellung der nachzuweisenden weißen Banden auf blauem Hintergrund gewechselt werden.

	Reagenzien	Menge
Zymogramm-Färbelösung	Methanol	400 ml
	Essigsäure	100 ml
	Coomassie brilliant blue R-250	5 g
	Wasser (deionisiert)	500 ml
Zymogramm-Entfärbelösung	Methanol	400 ml
	Essigsäure	100 ml
	Wasser (deionisiert)	500 ml

Tab. 2.4 Komponenten für Färben und Entfärben

Die entfärbten Gele wurden auf einer Leuchtplatte liegend mit einer digitalen Kamera aufgenommen und densitometrisch am PC ausgewertet (ImageMaster® VDS System und ImageMaster 1D Elite v3.00 Software, Amersham Biosciences, Freiburg).

II.7 PCR

II.7.1 RNA-Isolierung und Aufbereitung

Die RNA-Isolierung wurde mit der Einschritt-Flüssigphasen-Separation von peqGOLD RNAPure™ (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt, wobei die gesamte RNA durch die modifizierte Guanidin-Isothiozyanat-Methode extrahiert wird.

Dazu wurden zunächst 100 mg Myokardprobe im tiefgefrorenen Zustand abgewogen und mit 2 ml peqGOLD RNAPure™ homogenisiert (Ultra-Turrax, T25 basic, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen). Ein zusätzlicher Reinigungsschritt mittels Zentrifugierung für 10 Minuten bei 4°C und 14000 rpm ergab einen gereinigten Überstand, der zur Weiterverwendung abpipettiert wurde. Zur gewünschten Phasentrennung in eine untere Phenol-Chloroform-Phase, eine mittlere Interphase und eine aufliegende wässrige Phase wurden je eingesetztem Milliliter peqGOLD RNAPure™ 0,2 ml Chloroform zugegeben, mittels Vortexer (Vortex 3, IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen) gemischt und anschließend für 5 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. In der unteren und mittleren Phase befanden sich nun DNA und Protein und ausschließlich in der oberen wässrigen Phase RNA. Diese wurde in ein frisches Röhrchen überführt, zur RNA-Präzipitation mit 0,5 ml Isopropanol pro eingesetztem Milliliter peqGOLD RNAPure™ vermischt und für 10 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Danach wurde der Isopropanol-Überstand mit der Pipette abgenommen und das entstandene Pellet zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen.

Das so gewonnene RNA-Pellet wurde nach dem Trocknen bei Raumluft in RNase-freiem Wasser zur Weiterverwendung gelöst. Mittels des DNA-free™-Kit (Ambion Inc., Woodward Austin, TX, USA) wurden sämtliche Reste an genomischer DNA aus der RNA-Präzipitation entfernt. Die Konzentration der Proben wurde im Photometer (BioPhotometer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) mit Wasser als Referenzgröße bestimmt. Der RNA-Gehalt war in allen Versuchsgruppen gleich. Zur Überprüfung der isolierten RNA auf Reinheit kann zuvor denaturierte RNA auf ein Checkgel (Formaldehyd 5,55% – Agarose 1,5% – Gel) aufgetragen, eine Elektrophorese bei 100 V für 30 Minuten durchgeführt und anschließend die aufgetrennten Banden mittels Markierung durch Ethidiumbromid unter dem UV-Licht beurteilt werden.

Die RNA-Konzentration und Reinheit wurden bei allen Proben durch die Spektrophotometrie überprüft.

II.7.2 Durchführung der RT-PCR

Der Nachweis und die semiquantitative Bestimmung von MMP-2- und MMP-9-mRNA wurde mittels Duplex-RT-PCR und einem "Housekeeping" Gen (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase, HPRT) als interner Kontrolle durchgeführt. Durch die Verwendung von Primer-Paaren, die sich sowohl an die mRNA als auch an die entstehende cDNA anlagern, und einem Enzym-Mix mit reverser Transkriptase und DNA-Polymerase ist es möglich die reverse Transkription der mRNA in cDNA und die Polymerase-Ketten-Reaktion in einem Schritt durchzuführen. Mit dieser Methode können auch sehr kleine Mengen an RNA äußerst sensitiv nachgewiesen werden (Freeman et al., 1999).

Folgende spezifischen MMP-Primer-Paare wurden eingesetzt:

Ratten-MMP-2:	sense:	ACTCCTGGCACATGCCTTTGCC
	antisense:	TAATCCTCGGTGGTGCCACACC
Ratten-MMP-9:	sense:	AGTTTGGTGTGCGGAGCAC
	antisense:	TACATGAGCGCTTCCGGCAC

Das DNA-Fragment der Ratten-HPRT enthielt 110 Basenpaare (Bp), das Fragment der MMP-2 474 Bp und der MMP-9 376 Bp.

In Tabelle 2.5 sind die zur Durchführung der RT-PCR benötigten Komponenten aufgelistet, welche als „Master Mix“ vorbereitet wurden.

Menge	Komponente
100 ng	zu untersuchende RNA
2 µl	Primer (1 µl reverse Primer + 1 µl forward Primer), Konzentration: 0,2 µM
1 µl	dNTP-Mix (Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade; Roche, Penzberg), Konzentration: 200 µM
1 µl	Enzym-Mix
0,34 µl	RNase Inhibitor (RNAguard™, Amersham Biosciences, Freiburg)
2,5 µl	DTT-Lösung
10 µl	RT-PCR-Puffer

Dem Master Mix wurde deionisiertes Wasser zugefügt, um ein Gesamtvolumen von 50 µl zu erhalten.

Enzym-Mix, DTT-Lösung und RT-PCR-Puffer sind im Titan One Tube RT-PCR System von Roche, Penzberg enthalten. Der Enzym-Mix besteht aus einer AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Reverse Transkriptase, einer Taq-DNA-Polymerase und einer Tgo-DNA-Polymerase mit Korrekturleseaktivität.

Tab. 2.5 Komponenten des Master Mix

Der Master Mix wurde in PCR-Gefäße (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) pipettiert und diese in einen Thermocycler (Mastercycler® personal, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) gegeben.

Die RT-PCR wurde mit folgenden Schritten durchgeführt:

- Reverse Transkription (50°C, 30 min)
- Denaturierung (94°C, 2 min) zum Trennen der doppel strängigen cDNA
- 10x Denaturierung (94°C, 10 sec), Hybridisierung der Primer (45-65°C, 30 sec) und Elongation (= DNA-Synthese; 68°C, 45 sec)
- 25x Denaturierung (94°C, 10 sec), Hybridisierung der Primer (45-65°C, 30 sec) und Elongation (68°C; 45 sec, zu welchen mit jedem Zyklus 5 sec addiert werden)
- verlängerte Elongation (68°C, bis zu 7 min)

II.7.3 Elektrophorese

Die amplifizierten DNA-Abschnitte wurden mittels Elektrophorese auf einem 2% Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend densitometrisch ausgewertet.

Zur Herstellung des Gels wurden 1 g NuSieve® 3 : 1 Agarose (Cambrex Bio Science, USA) und 50 ml Tris-Borat-EDTA-Gellaufpuffer (TBE-Puffer, siehe Tab. 2.6) in einer Mikrowelle erhitzt. Nach der Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid wurde das flüssige Gel zum Aushärten in eine Gekassette gegossen. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit TBE-Puffer befüllt und das hergestellte Gel hineingegeben. Je 15 µl Probe wurden mit 1,5 µl DNA-Sample-Puffer vermischt und davon 15 µl in die Gel-Slots pipettiert. Ein DNA-Längenstandard wurde ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für 45 Minuten durchgeführt.

	Reagenzien (von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)	Menge
TBE-Puffer	Borsäure	27,82g
	Trizma Base	54,5g
	EDTA, Dinatriumsalz-Dihydrat	4,65g
	DEPC-H ₂ O	370ml

Die Reagenzien wurden mit einem Magnetrührer vermenget. Nach vollständiger Lösung wurde der pH-Wert gemessen und mittels 1 N HCL auf 8,3 eingestellt. Danach wurde die Lösung mit DEPC-H₂O auf 500 ml aufgefüllt. Zur Herstellung des Gels und für die Elektrophorese muss eine 1 : 10-Verdünnung des Puffers mit destilliertem Wasser erfolgen.

Tab. 2.6 Puffer für die Elektrophorese der PCR-Produkte

Die Auswertung erfolgte densitometrisch am PC mit dem ImageMaster® VDS System und der ImageMaster 1D Elite v3.00 Software (Amersham Biosciences, Freiburg).

II.8 Nachweis von Zytokinen in Myokard und Plasma

II.8.1 Real-time RT-PCR der Myokardproben

Um die akute Entzündungsreaktion, welche durch die extrakorporale Zirkulation in Kombination mit der Inzolen®-Kardioplegie hervorgerufen wird, zu analysieren, wurde die myokardiale mRNA-Expression von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) und Interleukin 6 (IL-6) untersucht. Als Standard wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verglichen. Zur Erfassung der mRNA-Spiegel wurde die real-time RT-PCR eingesetzt, mit welcher zusätzlich zur Vervielfältigung der mRNA die entstehenden Gen-Produkte in Echtzeit durch eine Fluoreszenz-Messung quantifiziert werden. Diese Technik bietet neben einer hohen Sensitivität auch eine gute Reproduzierbarkeit und ermöglicht die Detektion selbst kleinster mRNA-Konzentrationen und Änderungen dieser (Pfaffl et al., 2002).

Spezifische Primer-Paare wurden von Dr. J. B. Grammer (Deutsches Herzzentrum München) für jedes Gen unter Verwendung der Primer3 Software (<http://www.frodo.wi.mit.edu/>) designend und deren Spezifität mittels des Standard Nukleotid basic local alignment search tool (BLASTn) nachgeprüft, welches durch das National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt wird. Die verwendeten Primer-Paare (sense/antisense) waren folgende:

- TNF- α (Genbank-Zugangsnummer NM_012675):
5'-GGGGCCTCCAGA ATCCA-3'/5'-TGGGCTACGGGCTTGTC-3';
- IL-6 (Zugangsnummer NM_012589):
5'-CCGTTTCTACCTGGAGTTTG-3'/5'-GAAGTTGGGGTAGGAAGGAC-3'/
5'-GAAGTTGGGGTAGGAAGGAC-3;
- GAPDH (Zugangsnummer NM_017009):
5'-TGGCCTTCCGTGT TCCTACCC-3'/5'-CCGCCTGCTTCACCACCTTCT-3'.

Die Primer wurden auf ihre Fähigkeit einzelne Produkte von korrekter Größe zu erzeugen durch eine Schmelzkurvenanalyse und einer Auftrennung auf einem Agarose-Gel getestet. Das Thermo-Cycling wurde in einem LightCycler 1.5 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) unter Verwendung des QuantiTect® SYBR® Green one-step RT-PCR-Kits (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Dabei wurde folgendes experimentelles Protokoll verwendet:

- 1) Reverse Transkription (20 min bei 50°C)
- 2) Denaturierung (15 min bei 95°C)
- 3) Amplifikation und Quantifizierung, 45x wiederholt (15 sec bei 95°C, 30 sec bei 56°C für alle drei Gene, 20 sec bei 72°C, 5 sec bei 73°C mit einer Einzel-Fluoreszenz-Messung)
- 4) Schmelzkurve (65-92°C mit einer Erwärmung um 0,1 °C pro Sekunde und einer kontinuierlichen Fluoreszenz-Messung)

5) Kühlung auf 40°C.

Durch die Fluoreszenz-Messung bei 73°C am Ende jedes Amplifikations-Schrittes wurde eine akkuratere Quantifizierung der IL-6-, TNF- α - und GAPDH-Produkte gewährleistet, da unspezifische PCR-Produkte, wie z.B. Primer-Dimere, unterhalb der gewählten Temperatur geschmolzen wurden. Die Auswertung wurde von Dr. J. B. Grammer (Deutsches Herzzentrum München) unter Verwendung der LightCycler Software 3.5 (Roche Moleculars Biochemicals, Mannheim) durchgeführt. Details des Procedere sind in Pfaffl et al. (2002) skizziert.

II.8.2 Bestimmung der Zytokin-Plasmakonzentrationen

IL-6 und TNF- α wurden zum Nachweis der Zytokine im Plasma aus den am Ende der Versuche gewonnenen Plasmaproben standardmäßig mittels ELISA, durchgeführt gemäß der Herstellerangaben (Biosource Deutschland GmbH, Solingen), bestimmt. Jede Probe wurde zweifach gemessen und die enthaltenen TNF- α - und IL-6-Konzentrationen anhand von Standardkurven berechnet. Die aufgrund der Hämodilution in den Versuchsgruppen zu niedrig bestimmten Zytokin-Werte wurden anhand der Gesamt-Proteinkonzentration im Plasma korrigiert.

II.9 Statistische Methoden

Die statistische Analyse der Daten wurde durch Prof. Dr. H. Schad und Dr. J. B. Grammer (Deutsches Herzzentrum München) unter Verwendung von SPSS 13.0 für Windows durchgeführt. Die Daten werden angegeben als Mittelwert \pm SD (n). Lineare Regressionen wurden für die Korrelationen von Hämatokrit und Volumen durch die Konduktanz berechnet. Die Daten der Blutgasanalysen wurden dem einseitigen ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur und dem Mann-Whitney-U-Test unterzogen. Für die hämodynamischen Parameter wurden der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben und der einseitige ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Die Daten der Zymographie und der PCR wurden ebenfalls mit dem einseitigen ANOVA-Test mit Bonferroni-Korrektur verglichen.

Eine Signifikanz der Unterschiede wurde für $p < 0,05$ akzeptiert.

III Ergebnisse

III.1 Verbesserungen des Versuchsaufbaus im Laufe der Experimente

III.1.1 Etablierung der Präparationstechnik

Die Präparationstechnik, welche für die arterielle Blutdruckmessung, die venöse Volumensubstitution und den Anschluss der Herz-Lungen-Maschine an die Ratte notwendig war, wurde an 30 Tieren etabliert.

Zunächst wurde für den arteriellen Zufluss der HLM die Schwanzarterie der Ratte kanüliert. Aufgrund des geringen Gefäßlumens kam es bei der Katheterplatzierung immer wieder zu Schwierigkeiten, sodass in den folgenden Versuchen die Arteria femoralis (rechts) verwendet wurde. Der Katheter für die invasive Blutdruckmessung wurde in die linke Arteria femoralis eingeführt. Da zusätzlich Bedarf an einem venösen Zugang für Volumen- und Medikamentensubstitutionen bestand, wurde auch die linke Vena femoralis kanüliert. Hierüber konnte z.B. Pancuronium zur kompletten Muskelrelaxierung verabreicht werden. Um eine Gefäßruptur zu vermeiden und die Kanülierung zu erleichtern, erwies sich eine Vordilatierung der Gefäße als sinnvoll. Für einen sicheren Halt der Katheter im Gefäßlumen ist die Verwendung von Tourniquets ratsam.

Für die venöse Leitung der HLM wurde zunächst die Vena anonyma, später die Vena jugularis rechts kanüliert. Die venöse Kanüle wurde durch eine Verlängerung der Stahlkanüle um 5 mm für eine leichtere und sichere Positionierung im rechten Vorhof und durch einen um 2 mm erweiterten Durchmesser (insgesamt 2,2 mm) für einen suffizienteren Rückfluss optimiert. Unter der zusätzlichen Verwendung von Sog (15-20 mmHg) am venösen Reservoir konnten die Flussraten der HLM weiter gesteigert werden. Häufig auftretende Probleme bei der venösen Kanülierung waren Perforationen der Vena jugularis, des rechten Ventrikels und des Vorhofseptums. Daher ist hierbei auf eine besonders sorgfältige und exakte Vorgehensweise zu achten. Eine Dilatierung des Gefäßes vor der Kanülierung ist ebenfalls hilfreich.

Für die Thorakotomie hat sich der Elektrokauter als geeignetes Werkzeug im Vergleich zu Schere oder Skalpell herausgestellt, da damit eine geringere Verletzungs- und Blutungsgefahr besteht. Nach der Platzierung der venösen Kanüle im rechten Vorhof sollte der Elektrokauter nicht mehr verwendet werden, da dies zu blutigen Imbibitionen des Vorhofes führt.

III.1.2 Etablierung der Konduktanz-Katheter-Technik und Kardioplegie

Die Etablierung der Konduktanz-Katheter-Technik wurde an 20 Tieren durchgeführt.

Zunächst wurde sowohl für die Messungen mit dem Konduktanz-Katheter als auch für die Gabe der kardioplegischen Lösung das gleiche Gefäß (Arteria carotis rechts) verwendet. Da der Katheterwechsel zu erheblichen Komplikationen wie Blutungen oder Blutdruckabfall führte, wurde der Kardioplegie-Katheter in die linke Arteria carotis eingeführt und der Konduktanz-Katheter in der rechten Arteria carotis belassen. Zur Installation der Kardioplegie mussten zusätzlich Truncus brachiocephalicus und Aortenbogen freipräpariert und mit Tourniquets, welche dem Abklemmen der Gefäße dienen, angeschlossen werden.

Bei der Platzierung des Konduktanz-Katheters im linken Ventrikel traten folgende Probleme auf: Perforationen von Ventrikelspitze, Ventrikelwand, Aortenklappensegel und Aortenwurzel, Rhythmusstörungen des linken Ventrikels, arterielle Blutungen und Hämatome in Ventrikelseptum und Herzspitze. Dies erforderte eine äußerst präzise und sorgfältige Vorgehensweise beim Einführen und Platzieren des Katheters. Durch einen zuvor in der rechten Arteria carotis platzierten Silikonkatheter konnte der Konduktanz-Katheter schonender vorgeschoben werden. Zudem wurden stabilere Messungen ermöglicht und Rhythmusstörungen vermieden. Das Zurückziehen des Katheters auf Klappenniveau während des kardiopulmonalen Bypasses führte ebenfalls zu einer geringeren Schädigung des Herzens.

Zur Messung der Parallel-Konduktanz wurde zusätzlich die linke Vena jugularis kanüliert und somit die Möglichkeit geschaffen kleine Mengen einer Kochsalzlösung zu injizieren.

III.2 Daten der Blutgasanalysen

Die arteriellen Blutgasanalysen dienten der Überwachung von Hämatokritwert, Oxygenierung, Säure-Basen-Haushalt und Kaliumwerten während des gesamten Versuchs. Die gewonnenen Daten sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Die Werte der Kontrolltiere entsprechen den Ausgangswerten (vor der Hämodilution) beider untersuchter Gruppen und wurden daher nicht gesondert aufgelistet.

Die Hämatokritwerte wurden durch die Hämodilution in beiden Versuchsgruppen signifikant verringert ($p < 0,05$), blieben aber während der extrakorporalen Zirkulation und 60 Minuten nach der Entwöhnung vom Bypass stabil. Die Oxygenierung stieg während der extrakorporalen Zirkulation signifikant an ($p < 0,05$), was eine hervorragende Leistung des Membranoxygenators aufzeigt. Der höhere Anstieg des Sauerstoffpartialdrucks und die verringerten Kohlendioxidpartialdrücke während und nach der extrakorporalen Zirkulation in der Gruppe ohne Kardioplegie sind auf die zusätzliche Lungenventilation zurückzuführen, welche lediglich während des kardioplegischen Herzstillstandes ausgesetzt wurde.

Ergebnisse

Basenüberschuss und pH-Wert blieben in beiden Versuchsgruppen während des gesamten Experiments stabil. Allerdings ist anzumerken, dass bei Bedarf Natriumbikarbonat in kleinen Mengen substituiert wurde, um eine metabolische Azidose auszugleichen.

Eine signifikante Erhöhung des Kaliums wurde 60 Minuten nach der extrakorporalen Zirkulation in beiden Gruppen beobachtet. Während der extrakorporalen Zirkulation verringerten sich die Kaliumwerte signifikant ($2p < 0,05$) in der Gruppe ohne Kardioplegie gegenüber der Gruppe mit Kardioplegie, was auf die kaliumhaltige kardioplegische Lösung zurückzuführen ist.

		vor HLM (vor der Hämodilution)	(nach der Hämodilution)	während HLM 30min	nach HLM 60min
Hkt [%]	EKZ	42,0 ± 5,1 *	22,3 ± 3,1	22,3 ± 3,9	21,0 ± 6,1
	INZ	43,8 ± 3,1 *	24,0 ± 3,6	22,1 ± 2,0	25,6 ± 4,2
pO₂ [mmHg]	EKZ	119 ± 25	109 ± 15	568 ± 25 * #	211 ± 91 *
	INZ	118 ± 37	124 ± 40	527 ± 40 *	158 ± 83
pCO₂ [mmHg]	EKZ	44,9 ± 3,4	47,3 ± 4,5	36,9 ± 5,2 *	37,1 ± 8,6 *
	INZ	42,5 ± 4,6	41,8 ± 7,4	38,0 ± 7,8	39,4 ± 7,4
pH	EKZ	7,35 ± 0,05	7,38 ± 0,04	7,49 ± 0,07 *	7,42 ± 0,05
	INZ	7,35 ± 0,04	7,40 ± 0,06	7,46 ± 0,08	7,41 ± 0,07
BE [mmol/l]	EKZ	-2,1 ± 2,2 *	+1,1 ± 1,8	+2,9 ± 1,7	-1,8 ± 4,5
	INZ	-2,9 ± 2,4	+0,2 ± 2,7	+1,1 ± 2,8	-0,6 ± 3,1
K⁺ [mmol/l]	EKZ	4,5 ± 0,5	4,0 ± 0,4	3,5 ± 0,2 #	5,5 ± 0,9 *
	INZ	4,2 ± 0,3	3,7 ± 0,3	4,5 ± 0,8	6,5 ± 1,3 *

Hämatokrit und Blutgasanalysen bei Ratten vor, während und nach kardiopulmonalem Bypass ohne Kardioplegie (EKZ, n = 10) und mit Inzolen®-Kardioplegie (INZ, n = 9). MW ± SD, * p < 0,05 vs. „nach der Hämodilution“, # 2p < 0,05 EKZ vs. INZ

Tab. 3.1 Daten der Blutgasanalysen

III.3 Daten der Konduktanz-Katheter-Messungen

III.3.1 Kalibrierung des Systems

Da die Konduktanz des Blutes vom Hämatokritwert abhängig ist und niedrige Hämatokritwerte zu einer Überschätzung der relativen Volumina, welche vom Konduktanz-Katheter-System erfasst werden, führen, ist eine Korrektur der Daten notwendig.

Diese führten wir wegen der unterschiedlichen Hämatokritwerte vor der extrakorporalen Zirkulation und nach der Entwöhnung vom Bypass mittels einer Kalibrierung des Konduktanz-Katheters für jede Volumen-Messung durch.

Insgesamt wurden 107 Kalibrierungs-Messungen mit speziellen Kalibrierungs-Küvetten (Fassungsvermögen 28,3 µl, 63,6 µl und 113,1 µl Blut) für Hämatokritwerte zwischen 7% und 50% vorgenommen. Durch einfache und multipel lineare Regressionsanalysen wurde der Zusammenhang zwischen den Proben-Volumina und den Hämatokritwerten bewertet. Die aus den Daten resultierenden Regressionsgleichungen wurden als Nomogramm für eine Zwei-Punkt-Kalibrierung der Druck-Volumen-Analyse-Software in den nachfolgenden Experimenten genutzt.

Wie in Abbildung 3.1 aufgezeigt wird, hängen die durch den Konduktanz-Katheter aufgezeichneten unterschiedlichen relativen Volumen-Einheiten (RVU) von bestimmten Hämatokritwerten ab. Es stellte sich hierbei ein streng linearer Zusammenhang ($r \geq 0,96$, $p < 0,0001$) dar. Auch eine mehrfach lineare Regressionsanalyse ergab einen Korrelationskoeffizienten $r = 0,94$ und $p < 0,0001$ für das **wahre Volumen (µl) = (1,47 × Hämatokrit) + (2,58 × RVU) - 42,7**, was somit als Regressionsgleichung verwendet werden kann.

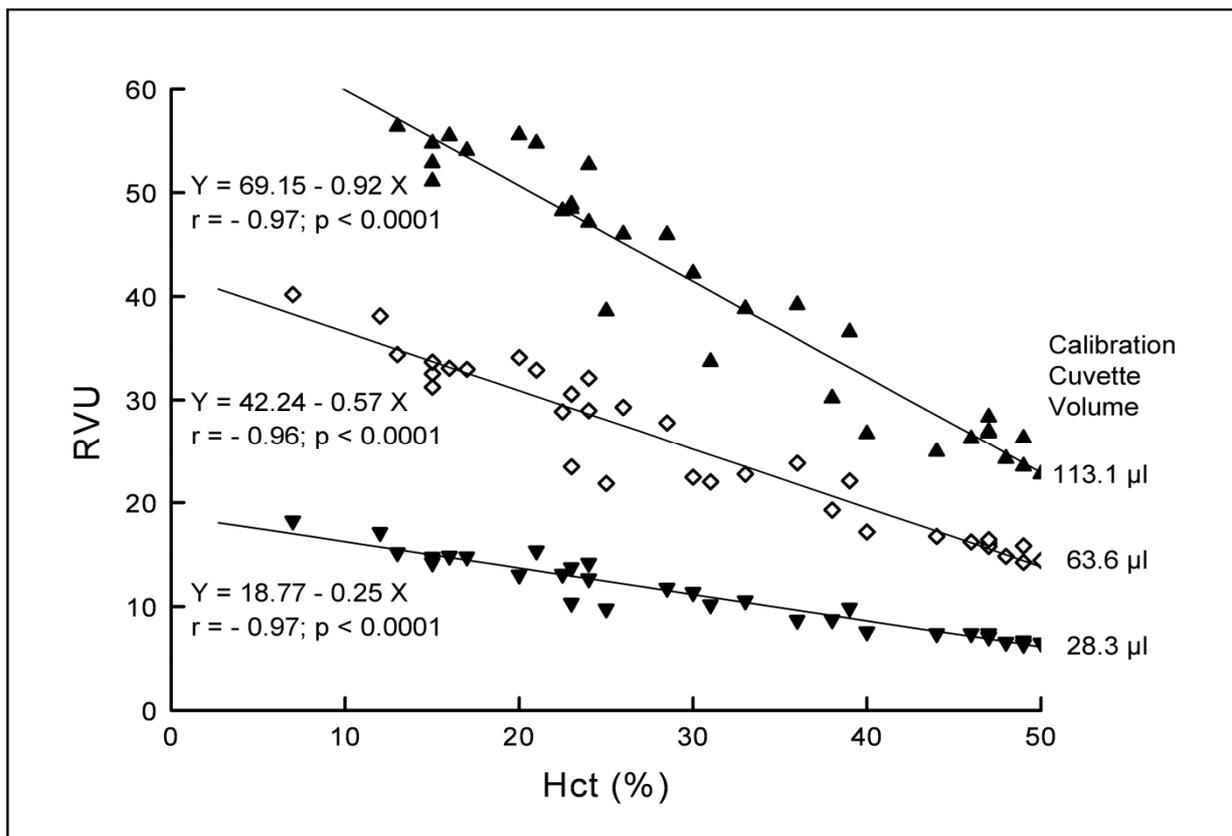


Abb. 3.1 Abhängigkeit der RVU vom Hämatokritwert

III.3.2 Hämodynamische Daten

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Daten sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Die Daten der Kontrolltiere entsprachen wiederum den Ausgangswerten und wurden daher nicht gesondert in die Tabelle aufgenommen.

Der maximale linksventrikuläre Druck (LVP_{max}) fiel im Vergleich zu den Werten vor dem KPB 60 Minuten nach der Entwöhnung vom Bypass in beiden Versuchsgruppen signifikant ab ($p < 0,05$; s. Abb. 3.2), wohingegen die Herzfrequenz in der Gruppe ohne Kardioplegie während des gesamten Experiments stabil blieb. Sie verringerte sich aber signifikant ($p < 0,05$) um ca. 70 Schläge/min in der Kardioplegie-Gruppe nach dem KPB im Vergleich zu den Werten davor.

Eine Reduktion der systolischen Funktion 60 Minuten nach dem kardiopulmonalen Bypass zeigte sich in der Versuchsgruppe mit Kardioplegie anhand der signifikant ($p < 0,05$) erniedrigten Parameter wie Schlagarbeit, Schlagvolumen, Herzminutenvolumen, Ejektionsfraktion, dP/dt_{max} und dV/dt_{max} . Die diastolische Herzfunktion war in der Gruppe mit Kardioplegie nach dem KPB ebenfalls beeinträchtigt (dP/dt_{min} , dV/dt_{min} signifikant verringert), was auch der füllungsunabhängige Parameter der enddiastolischen Elastanz durch eine signifikante Erhöhung anzeigte.

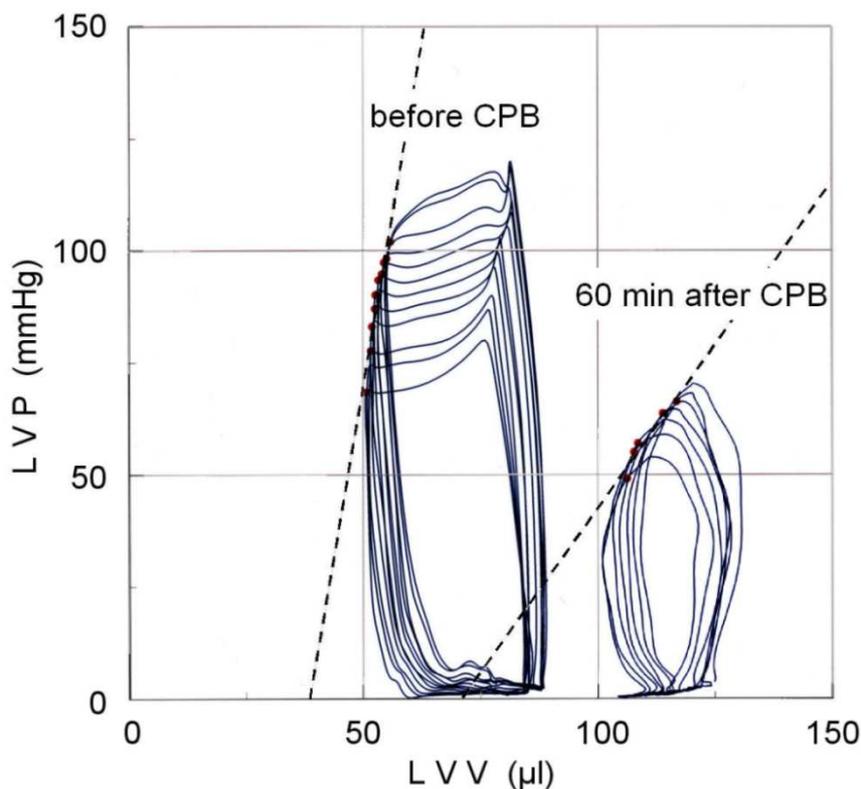


Abb. 3.2 Exemplarische Druck-Volumen-Schleifen während der venösen Volumenentlastung nach Hämodilution vor und 60 min nach der extrakorporalen Zirkulation

Ergebnisse

		vor HLM	60 min nach HLM
HF [/min]	EKZ	429 ± 24	413 ± 39
	INZ	409 ± 42	339 ± 55 * #
LVP_{max} [mmHg]	EKZ	132 ± 16	114 ± 20 *
	INZ	137 ± 21	102 ± 25 *
LVEDP [mmHg]	EKZ	4,2 ± 2,0	3,4 ± 1,0
	INZ	2,9 ± 1,7	3,7 ± 1,5
LVEDV [μl/kg]	EKZ	222 ± 32	216 ± 41
	INZ	209 ± 64	232 ± 27
SV [μl/kg]	EKZ	78 ± 29	84 ± 25
	INZ	72 ± 23	49 ± 23 * #
tau τ [msec]	EKZ	6,3 ± 1,0	6,4 ± 0,8
	INZ	6,4 ± 0,9	7,5 ± 1,4
HMV [ml/min·kg]	EKZ	34 ± 14	35 ± 12
	INZ	30 ± 12	17 ± 10 * #
EF [%]	EKZ	35 ± 10	39 ± 8
	INZ	36 ± 11	22 ± 10 * #
SW [mmHg·ml/kg]	EKZ	8,40 ± 4,53	7,39 ± 3,09
	INZ	7,39 ± 2,43	3,09 ± 1,62 * #
Ees [mmHg·kg/μl]	EKZ	1,63 ± 1,50	1,86 ± 1,69
	INZ	2,06 ± 1,37	2,52 ± 2,54
Eed [mmHg·kg/μl]	EKZ	43,3 ± 25,1	35,2 ± 20,2
	INZ	43,5 ± 25,7	80,3 ± 35,9 * #
dP/dt_{max} [mmHg/sec]	EKZ	13039 ± 3480	10498 ± 3541
	INZ	13384 ± 4297	6805 ± 3859 *
dV/dt_{min} [ml/sec·kg]	EKZ	3,80 ± 1,68	4,05 ± 1,68
	INZ	3,98 ± 1,96	2,26 ± 1,40 *
dP/dt_{min} [mmHg/sec]	EKZ	9588 ± 2058	6310 ± 2182 *
	INZ	9744 ± 2861	5702 ± 2723 *
dV/dt_{max} [ml/sec·kg]	EKZ	4,01 ± 2,92	3,99 ± 2,19
	INZ	2,80 ± 0,87	1,74 ± 0,73 *

Ergebnisse der Messungen mit dem Konduktanz-Katheter bei Ratten vor und nach HLM ohne Kardioplegie (EKZ, n = 10) und mit Inzolen®-Kardioplegie (INZ, n = 9). Angaben als MW ± SD, * p < 0,05 nach vs. vor HLM, # p < 0,05 vs. EKZ

Tab. 3.2 Hämodynamische Daten

III.3.3 Kardioplegischer Herzstillstand

Die exemplarisch, auf einer Zeitachse linear dargestellten Druck- und Volumenkurven (siehe Abb. 3.3) zu Beginn des kardioplegischen Herzstillstandes zeigen, dass es mit dem Abklemmen der Aorta und Infusion der kardioplegischen Lösung zu einem Druckanstieg im linken Ventrikel kam, welcher aber rasch wieder abfiel. Die Zeit bis zum Einsetzen des kompletten Herzstillstandes war mit 10 Sekunden sehr kurz und ist auf eine effektive Kardioplegie zurückzuführen.

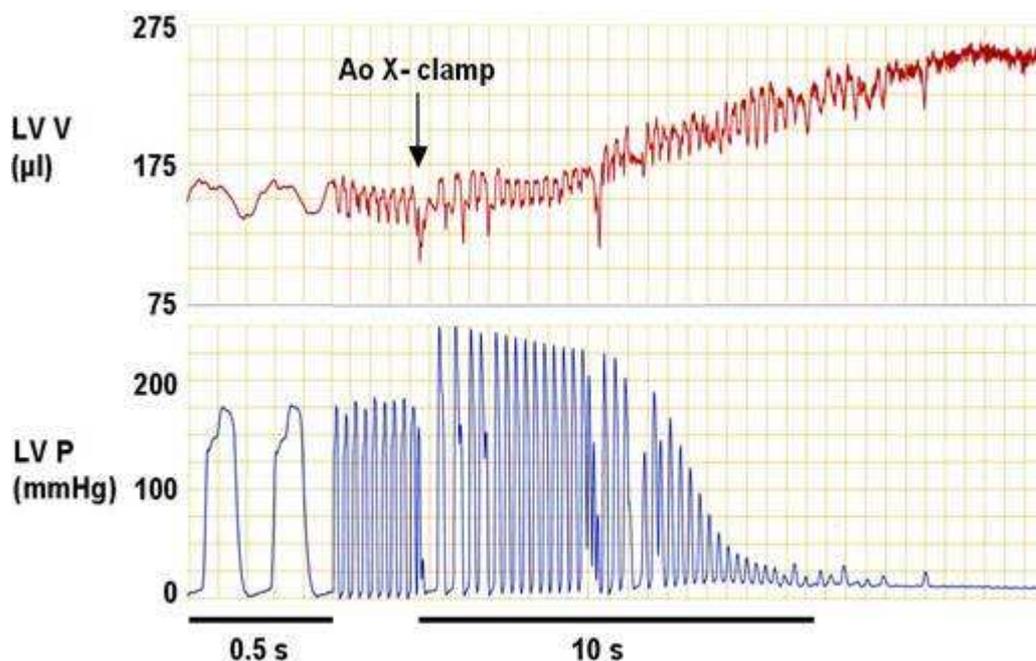


Abb. 3.3 Linear dargestellte Druck- und Volumenkurven während der Induktion des Herzstillstandes

Etwa 45 Sekunden nach dem Lösen der Aortenklemme und der Wiederherstellung der Koronarperfusion setzte die Pumpfunktion des linken Ventrikels ein und es konnten sofort stabile Druck- und Volumen-Signale aufgezeichnet werden (siehe Abb. 3.4). Dadurch wird ersichtlich, dass das Herz während Präparation und KPB keinen gravierenden strukturellen Schaden genommen hat.

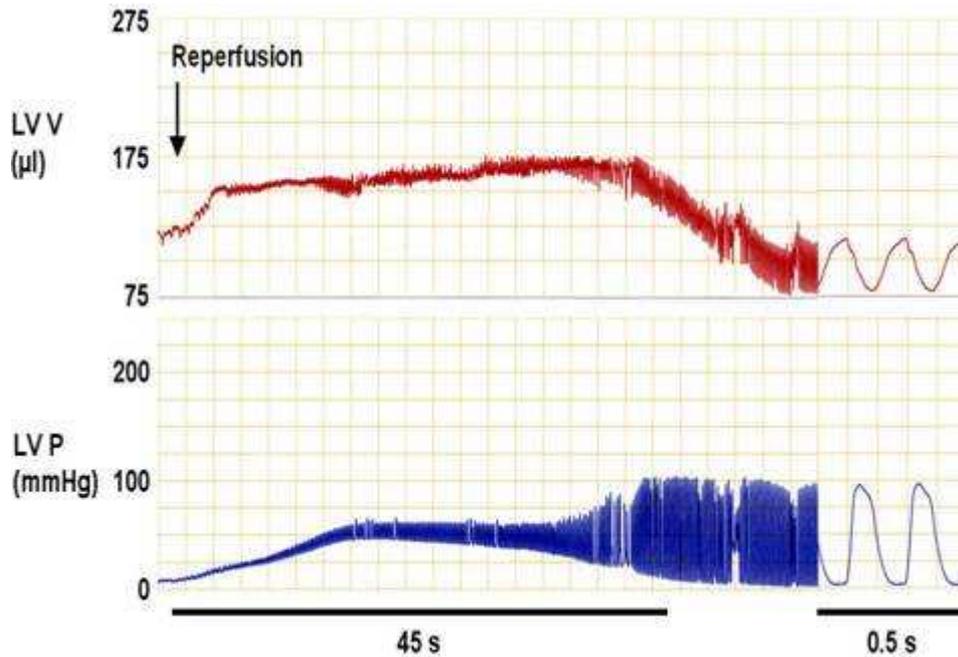


Abb. 3.4 Linear dargestellte Druck- und Volumenkurven zu Beginn der Reperfusionsphase

III.4 Molekularbiologische Daten

III.4.1 Matrix-Metalloproteinasen in der Zymographie

Die in den blau gefärbten Zymogrammgele vorhandenen weißen Banden, entstanden durch den Abbau von Gelatine durch die Matrix-Metalloproteinasen (MMP), wurden sowohl hinsichtlich ihrer Laufhöhe im Gel im Vergleich zum eingesetzten Längenstandard als auch hinsichtlich der Intensität der Bande ausgewertet.

Die Banden für MMP-2 und MMP-9 sind bei 72 kDa und 92 kDa zu erwarten (Corcoran et al., 1996, Nishikawa et al., 2003). Es wurde aber ersichtlich, dass verschiedene Formen von MMP-2 und -9 vorlagen. Die latenten, proteolytisch inaktiven pro-Formen (pro-MMP-2, pro-MMP-9) sind ca. 10 kDa größer als die aktiven MMP's und werden durch die Renaturierung nach der Gel-Elektrophorese aktiviert und dadurch ebenfalls im Gel detektierbar (Leber et al., 1997). Das pro-Enzym für MMP-2 findet sich bei 72 kDa, die aktive Form bei 62 kDa (Kleiner et al., 1993), wohingegen sich pro-MMP-9 bei 92 kDa und das aktive Enzym bei 84 kDa darstellt (Cheung et al., 2000).

Zudem wurde glykolysiertes pro-MMP-2 nachgewiesen, welches eine Bande bei 75 kDa bildet und spezifisch für Kleintiere ist (Lalu et al., 2002; Gao et al., 2003).

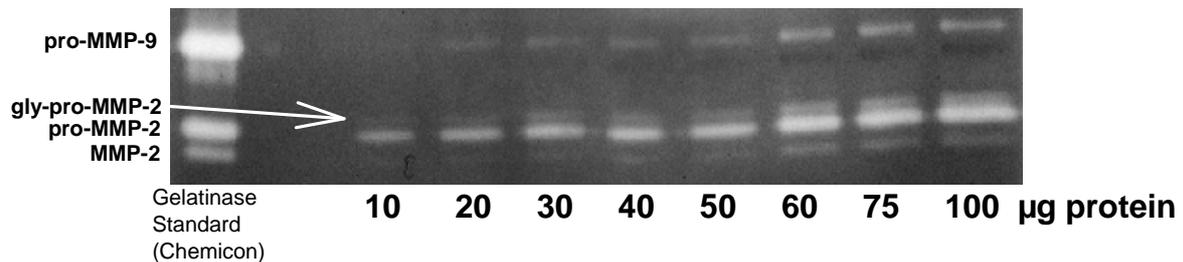
Um die notwendige Menge an Ventrikel-Myokard zu bestimmen, welche auf das Gel aufgetragen werden muss, um eine genaue Beurteilung der verschiedenen Aktivitätslevel der MMP's durchführen zu können, wurden verschiedene Mengen Protein in aufsteigender

Ergebnisse

Konzentration auf einem Gel nebeneinander aufgetragen. Dabei wurde eine Konzentration gesucht, die unterhalb der stationären Phase in der Mitte des linear ansteigenden Teils der gewonnenen Kurve liegt, da in diesem Bereich die unterschiedlichen Aktivitäten am besten differenziert werden können.

Es zeigte sich, dass zur Auswertung der Proben des Ventrikel-Myokards eine Proteinmenge von 40 µg, wie auch häufig in der Literatur beschrieben (Lalu et al., 2002; Nishikawa et al., 2003), am besten geeignet ist.

a)



b)

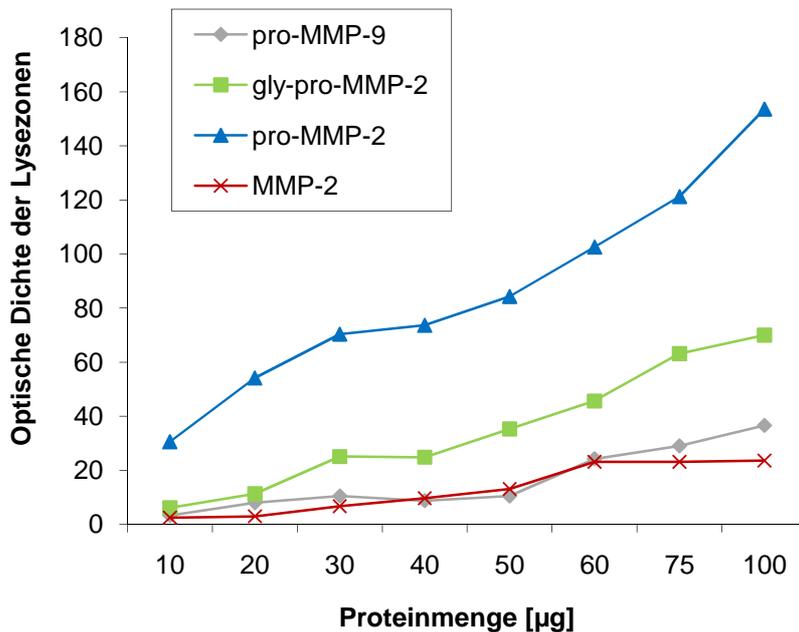


Abb. 3.5 a) Zymographie mit aufsteigender Proteinmenge **b)** Graphische Darstellung der nachweisbaren MMP-Aktivität in Abhängigkeit der Proteinmenge

Die densitometrische Auswertung der Myokard-Proben erbrachte folgende Ergebnisse:

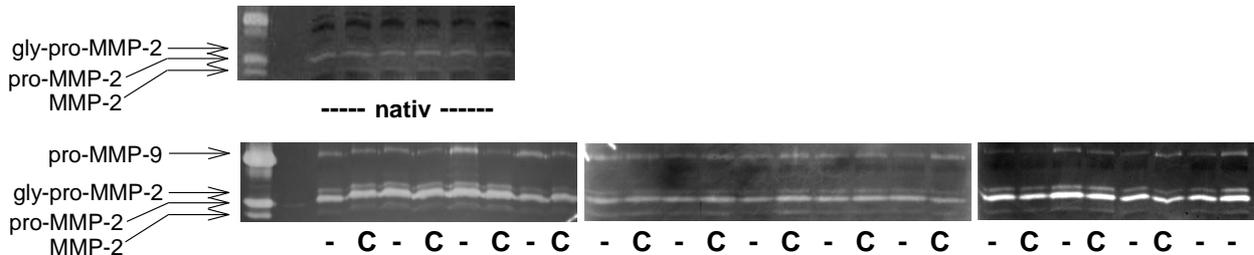
Aktives MMP-9 war in keiner der Gruppen nachweisbar, pro-MMP-9 wurde bei den Kontrolltieren nicht gefunden. In der Kontrollgruppe herrschte generell eine signifikant geringere MMP-Aktivität als in den Versuchsgruppen mit extrakorporaler Zirkulation ohne

Ergebnisse

und mit Kardioplegie ($p < 0,001$ für pro-MMP-9, gly-pro-MMP-2, pro-MMP-2 und MMP gesamt; $p < 0,01$ für MMP-2).

Zwischen den beiden Versuchsgruppen war bezüglich der MMP-Aktivität in den Myokardproben kein signifikanter Unterschied nachzuweisen.

a)



b)

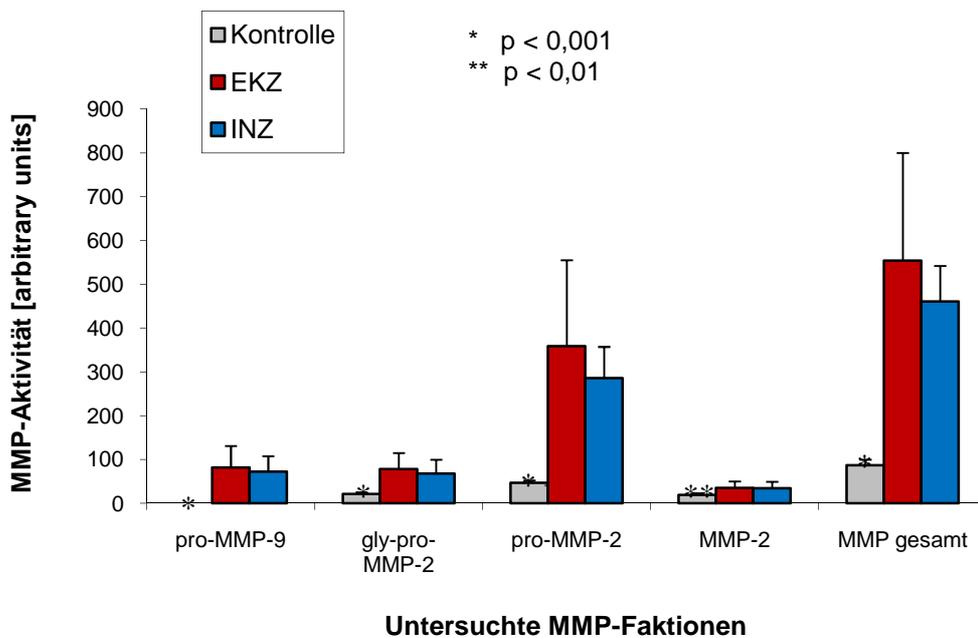


Abb. 3.6 a) Zymogramme der Myokardproben (nativ = Kontrollgruppe, - = EKZ-Gruppe, C = INZ-Gruppe) **b)** Graphische Darstellung der MMP-Aktivität im linken Ventrikel

Zusätzlich zu den gewebeständigen MMP's wurde auch die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen im Plasma untersucht, um die Freisetzung dieser Enzyme aus dem Herzmuskel und damit den Untergang von Ventrikelmyokard zu beurteilen.

Aktives MMP-2 konnte in keiner der drei Gruppen nachgewiesen werden. Zusätzlich zum latenten pro-MMP-2 lag wiederum das für Kleintiere spezifische glykolysierte pro-MMP-2 vor.

0,5 mM, 1 mM und 5 mM) inkubiert. In der densitometrischen Auswertung der Zymogramm-Gele zeigte sich hierbei generell eine Abnahme der Aktivität bei Zinkkonzentrationen ab 0,025 mM. Bei einer Konzentration von 0,09 mM war die Gesamt-Aktivität der detektierbaren MMP-2- und -9-Formen auf die Hälfte reduziert.

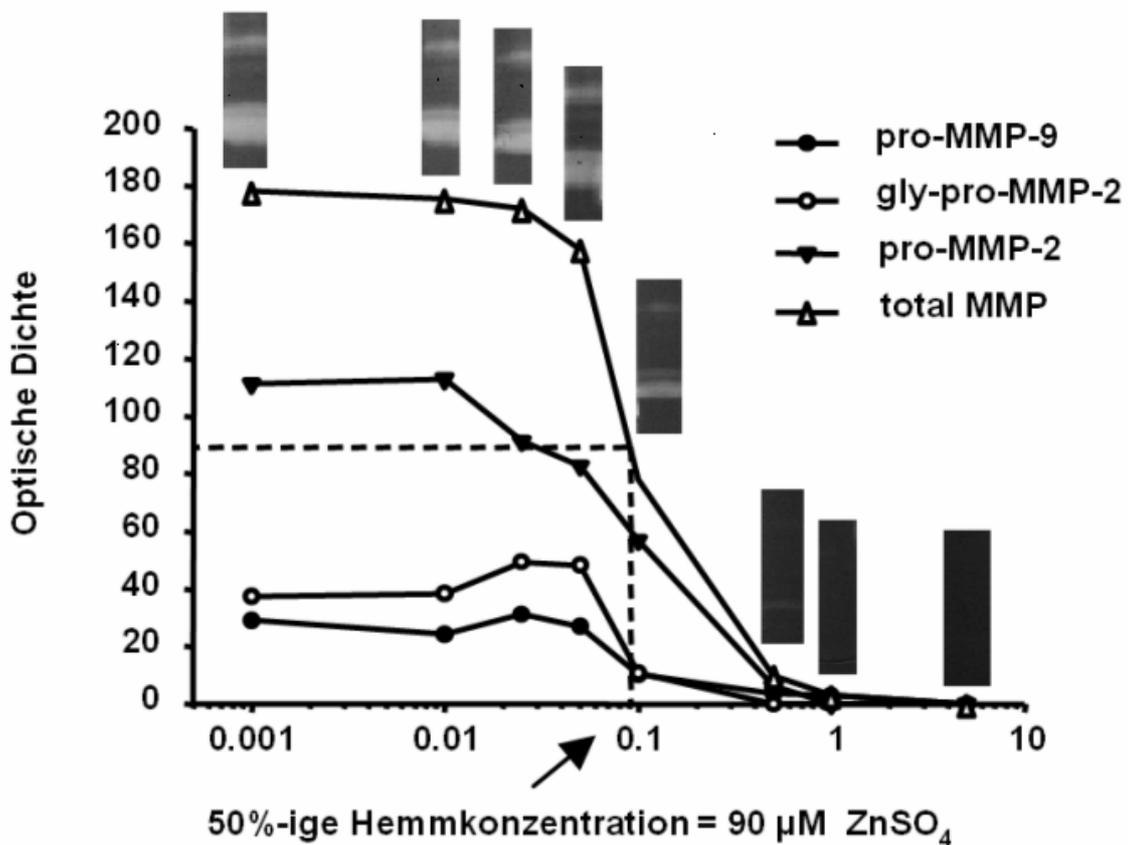


Abb. 3.8 Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf Matrix-Metalloproteinasen

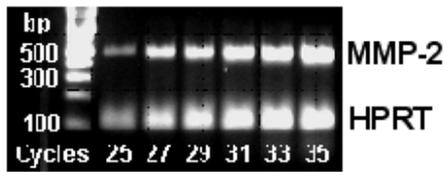
III.4.2 Matrix-Metalloproteinasen in der RT-PCR

Die RT-PCR wurde zusätzlich zur Zymographie durchgeführt um neben der Änderung der MMP-Aktivität auch eine Änderung der Transkription des Genproduktes erfassen zu können. Verglichen wurden dabei Proben des Myokards unterschieden in Innenschicht (Endokard) und Außenschicht (Epikard) sowohl für MMP-2 als auch für MMP-9 in beiden Versuchsgruppen und bei den Kontrolltieren. Als internes Kontroll-Gen für die PCR diente HPRT, welches häufig verwendet wird (Grammer et al., 2005).

Die notwendige Zyklenzahl für eine optimale Darstellung und Auswertung der Banden wurde mit Hilfe zweier Eichkurven sowohl für die Epikard- als auch für die Endokardproben ermittelt. Gesucht wurde dabei eine Zyklenzahl im ansteigenden, exponentiellen Bereich der Kurve unterhalb der Plateau-Phase, in welcher die PCR durch allmählich zur Neige gehende

Komponenten weniger vorhersehbar wird (Freeman et al., 1999). Für beide Proben waren 27 Zyklen die optimale Anzahl.

a)



b)

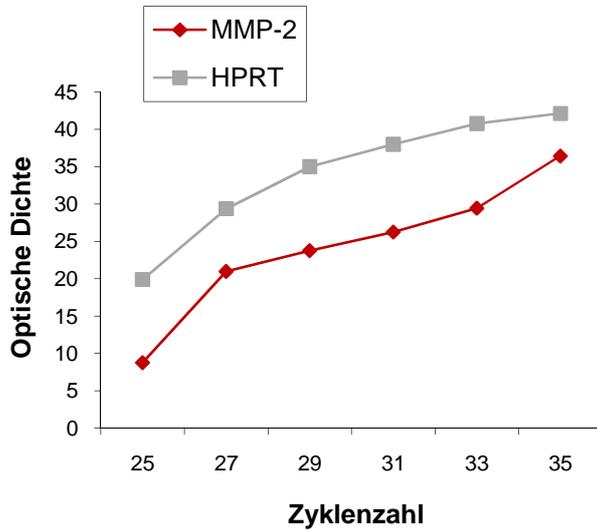
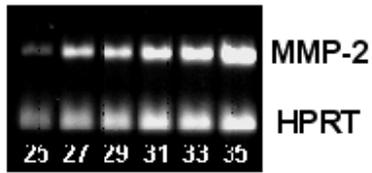


Abb. 3.9 a) RT-PCR der Endokardproben mit unterschiedlicher Zykluszahl **b)** Graphische Darstellung der nachweisbaren mRNA-Konzentration der Endokardproben in Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Zyklen

a)



b)

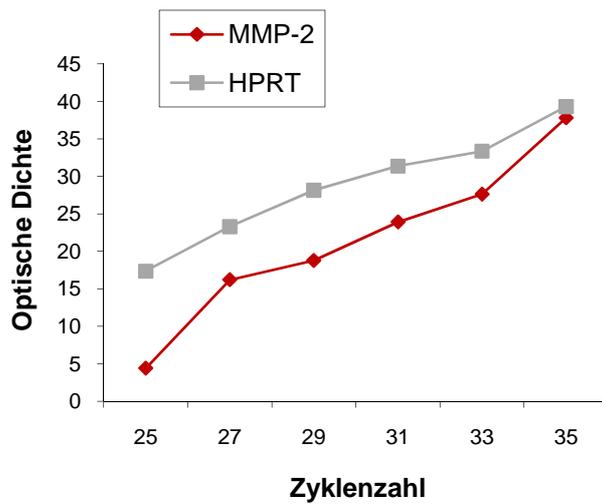


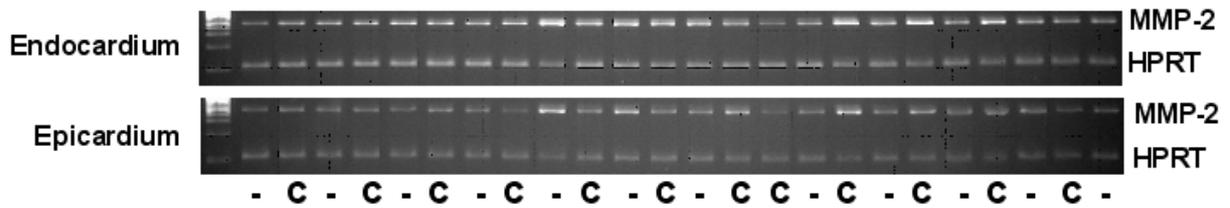
Abb. 3.10 a) RT-PCR der Epikardproben mit unterschiedlicher Zykluszahl **b)** Graphische Darstellung der nachweisbaren mRNA-Konzentration der Epikardproben in Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Zyklen

Ein Vergleich der Versuchsgruppen mit und ohne Kardioplegie erbrachte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Genexpression von MMP-2 und -9 in Endo- und Epikard.

In der Kontrollgruppe war mit der RT-PCR weder MMP-2 noch MMP-9 nachzuweisen, sodass sich hier ein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich mit den Versuchsgruppen zeigte.

Ergebnisse

a)



b)

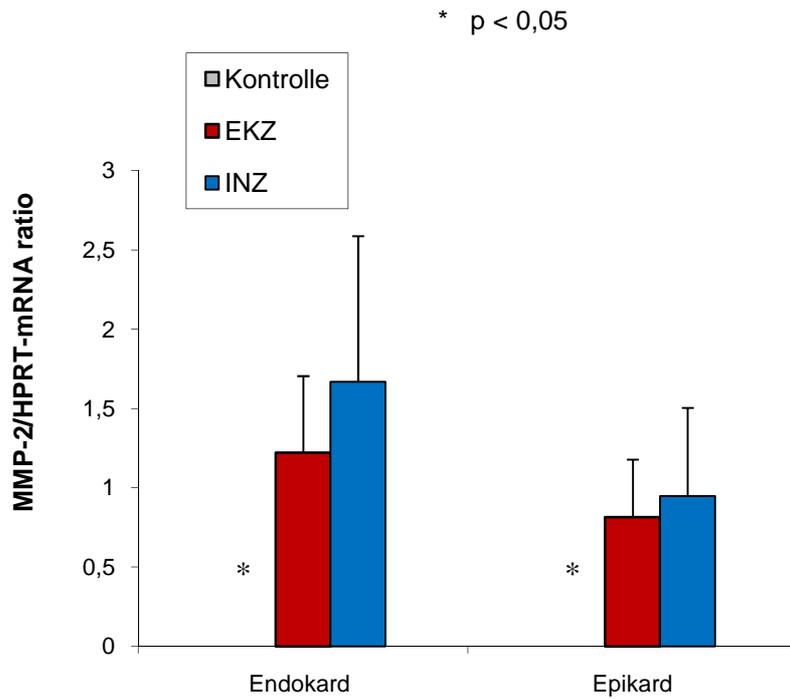
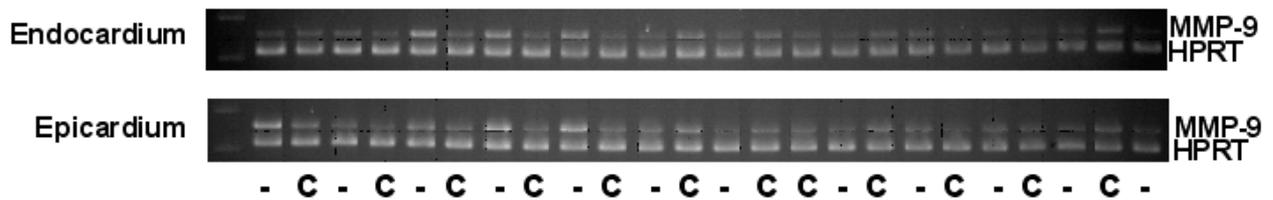


Abb. 3.11 a) RT-PCR für MMP-2 in Endokard und Epikard (- = EKZ-Gruppe, **C** = INZ-Gruppe) **b)** Graphische Darstellung der mRNA-Konzentration von MMP-2 in Endo- und Epikard

a)



b)

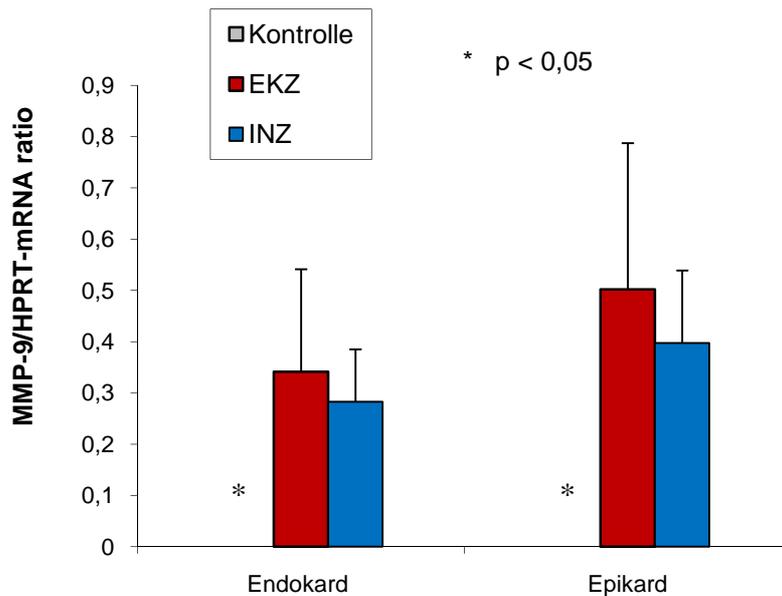


Abb. 3.12 a) RT-PCR für MMP-9 in Endokard und Epikard (- = EKZ-Gruppe, **C** = INZ-Gruppe) **b)** Graphische Darstellung der mRNA-Konzentration von MMP-9 in Endo- und Epikard

III.4.3 Entzündungsparameter

III.4.3.1 Real-time RT-PCR der myokardialen TNF- α - und IL-6-mRNA

Die Schmelzkurvenanalyse nach dem LightCycler-Lauf und die nachfolgende Agarose-Gel-Elektrophorese der real-time RT-PCR-Produkte bestätigte das Vorhandensein von einzelnen Amplifikations-Produkten für alle drei zu untersuchenden Gene (siehe Abb. 3.13 und 3.14). Die erwarteten cDNA-Fragment-Längen waren 105 bp für GAPDH, 150 bp für IL-6 und 218 bp für TNF- α .

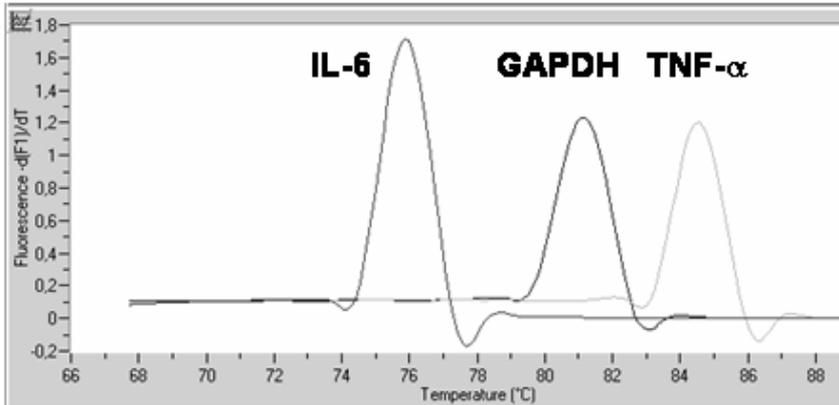


Abb. 3.13 Schmelzkurvenanalyse der real-time RT-PCR-Produkte

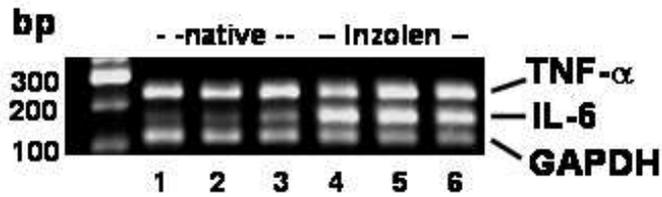


Abb. 3.14 Gel-Elektrophorese der real-time RT-PCR-Produkte

Während die TNF- α -mRNA-Spiegel nur leicht erhöht waren (1,28fach; $p = 0,71$), war eine herausragende Hochregulation von IL-6-mRNA in der Gruppe mit Kardioplegie zu beobachten (90,3fach; $p = 0,001$; siehe Abb. 3.15).

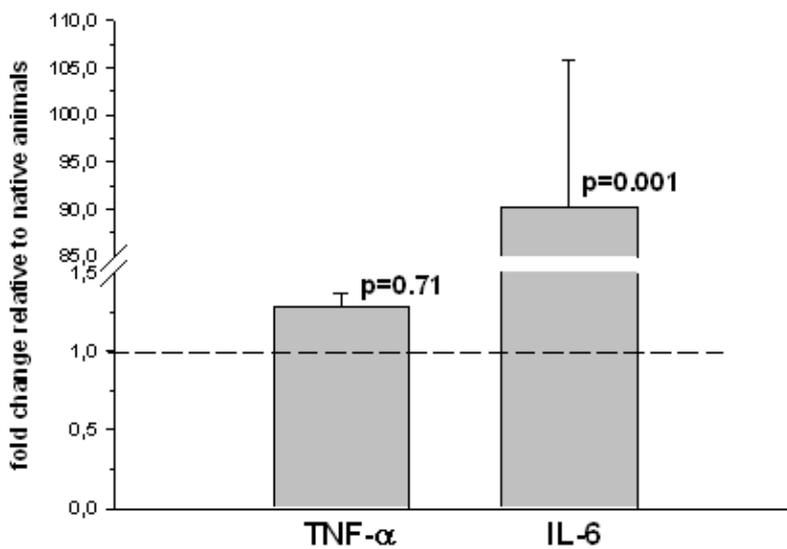


Abb. 3.15 TNF- α - und IL-6-mRNA-Spiegel im Myokard

III.4.3.2 TNF- α - und IL-6-Plasma-Konzentrationen

Im Gegensatz zur mRNA-Expression waren die Plasmaspiegel in der Gruppe mit kardioplegischem Herzstillstand sowohl für TNF- α als auch IL-6 signifikant erhöht. TNF- α erreichte 4,6fach höhere Werte ($p < 0,05$). Die IL-6-Spiegel waren 426,8fach erhöht ($p < 0,001$; siehe Abb. 3.16).

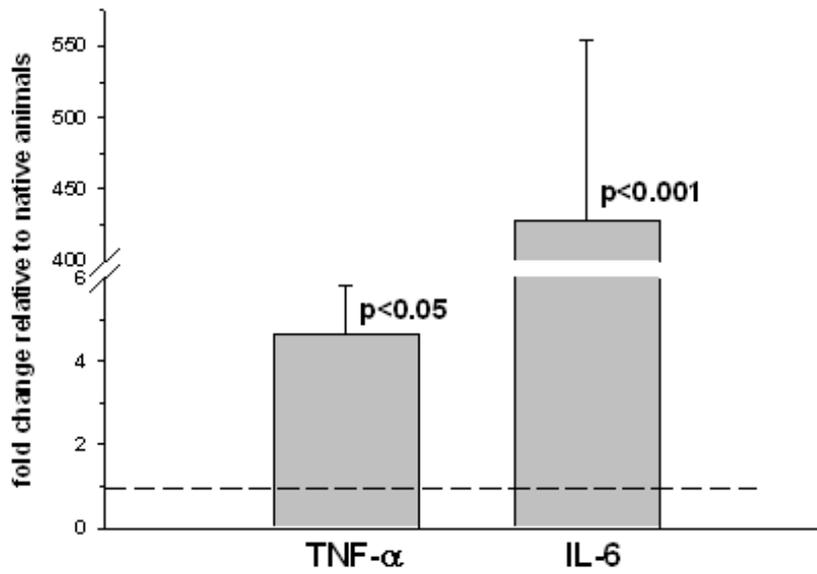


Abb. 3.16 TNF- α - und IL-6-Konzentrationen im Plasma

IV Diskussion

Im vorliegenden Projekt wurden zwei Schwerpunkte gesetzt:

- 1) Entwicklung einer Kleintier-Herz-Lungen-Maschine an der Ratte mit kardioplegischem Herzstillstand und gleichzeitiger Messung der Hämodynamik mittels Konduktanz-Katheter
- 2) Untersuchung der Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation und des kardioplegischen Herzstillstandes auf die linksventrikuläre Funktion, Inflammation und die Expression der Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9

IV.1 Entwicklung der Ratten-Herz-Lungen-Maschine

IV.1.1 Das Kleintiermodell

Zur Untersuchung der Pathophysiologie der extrakorporalen Zirkulation wurden in der Vergangenheit verschiedene Versuchsmodelle entwickelt. Die meisten Studien wurden an großen Tieren durchgeführt, was jedoch mit hohen Kosten für Labor, Ausrüstung und Personal verbunden ist (Mackensen et al. 2001; Gourlay et al., 2002; You et al., 2005; Modine et al., 2006).

Das Kleintiermodell bietet im Gegensatz dazu eine kostengünstige und weithin verfügbare Methode für Forschungsprojekte am Modell *in vivo*. Die Durchführung von Studien mit großer Fallzahl ist mit wesentlich geringerem Aufwand realisierbar (Fabre et al., 2001) und es können dadurch aussagekräftigere Daten gewonnen werden.

Zudem besteht ein weiterer Vorteil darin, dass sich Anatomie und Physiologie der Ratte nicht wesentlich vom menschlichen Herz-Kreislauf-System unterscheiden (Dong et al., 2005). Der größte physiologische Unterschied zwischen Mensch und Ratte besteht in der höheren Herzfrequenz der Ratten (Ballaux et al., 1999).

Auch wurde an der Ratte schon auf den unterschiedlichsten medizinischen Gebieten geforscht und es kann auf eine Vielzahl an Daten zu physiologischen und pathophysiologischen Prozessen zurückgegriffen werden (Ballaux et al., 1999, Grocott et al., 2001).

Bislang wurde am Kleintier allerdings kein *in-vivo*-Modell einer Herz-Lungen-Maschine mit kardioplegischem Herzstillstandes entwickelt. Ischämie-Reperfusion-Versuche wurden entweder am isolierten Präparat durchgeführt (Cheung et al., 2000; Khadour et al., 2002; Wang et al., 2002; Sawicki et al., 2005) oder durch die Verwendung unterschiedlicher

Sauerstoffkonzentrationen am partiellen Bypass simuliert, was allerdings zu einer Hypoxie aller Organe führt (Sasaki et al., 1996).

Der klinischen Praxis entsprechend wurde unser Modell mit der Möglichkeit für hämodynamischen Messungen mittels linksventrikulärem Druck-Volumen-Katheter, Blutgasanalysen, Herbeiführung eines Herzstillstandes durch Querklemmen der Aorta und Kardioplegiegabe und nachfolgender Entwöhnung vom Bypass angelegt (Günzinger et al., 2007). Somit konnten wir erstmalig einen *reversiblen kardioplegischen* Herzstillstand am Kleintier durchführen und in vivo reproduzierbare Daten zur myokardialen Leistung und systemischen Entzündungsreaktion nach kardiopulmonalen Bypass erheben (Günzinger et al., 2007).

Unser Forschungsmodell bietet gerade im Hinblick auf die immer noch signifikant vorhandene Morbidität nach kardiopulmonalem Bypass viele Möglichkeiten für klinisch relevante Grundlagenforschungen auf dem Gebiet der myokardialen Dysfunktion und systemischen Entzündungsreaktion nach Ischämie und Reperfusion bei extrakorporaler Zirkulation.

IV.1.1.1 Anforderungen an ein Kleintiermodell

Ein Kleintiermodell der Herz-Lungen-Maschine muss für die Untersuchung klinisch relevanter Fragestellungen verschiedene Grundbedingungen erfüllen, damit verwertbare und aussagekräftige Daten erhoben werden können. Ballaux et al. (1999) erweiterten die von Proctor (1978) aufgestellten Anforderungen an eine „Mini-Herz-Lungen-Maschine“:

- 1) Dem Priming (= Füllvolumen der Herz-Lungen-Maschine) soll kein Fremdblut zugesetzt werden, um Hämolyse und systemische Entzündungsreaktion uneingeschränkt untersuchen zu können. Ein Priming-Volumen von weniger als 15 ml wird gefordert.
- 2) Die Oxygenierung soll durch einen Membranoxygenator vorgenommen werden, welcher bei durchschnittlicher Herzauswurfleistung eine mehr als ausreichende Sauerstoffversorgung sicherstellen kann.
- 3) Der Fluss der extrakorporalen Zirkulation sollte dem physiologischen Herz-Minuten-Volumen der Ratte entsprechen. Dies kann durch die zentrale Kanülierung des rechten Vorhofes und durch einen arteriellen Zufluss direkt in die Aorta erreicht werden.
- 4) Ein Filter und/oder eine Blasenfalle können hilfreich sein.
- 5) Durch unmittelbare Blutgasanalysen kann die Effektivität des Bypasses optimal überwacht und gegebenenfalls korrigiert werden.

- 6) Der Wärmeaustauscher sollte eine suffiziente Kühlung und Erwärmung der Körperkerntemperatur der Ratte ermöglichen.
- 7) Eine große Oberfläche des Schlauchsystems verursacht eine wesentlich ausgeprägtere systemische Entzündungsreaktion durch Oberflächenaktivierung, sodass auch im Tiermodell das Verhältnis von Oberfläche zu Rattengewicht der klinischen Verwendung entsprechen sollte (You et al., 2005).

In unserem Modell wurden alle oben genannten Anforderungen erfüllt:

zu 1) Das Priming-Volumen unseres Modells der Herz-Lungen-Maschine inklusive Schlauchsystem von 8 ml lag weit unter der geforderten Grenze. Dies konnte vor allem durch einen speziell entworfenen Membranoxygenator mit geringem Füllungsvolumen (4 ml) trotz großer Oberfläche (0,063 m²) erreicht werden (Günzinger et al., 2007). Bei einem Gesamt-Blutvolumen der Ratte von ca. 25 ml war die nach Mischung von Füllvolumen und Blut auftretende Hämodilution in etwa proportional der klinischen Praxis und der dadurch bedingte Hämatokritabfall auf Werte von 20-25 % bewegte sich in klinisch akzeptierten Grenzen.

An der Ratte wurden bereits viele Versuchsanordnungen der extrakorporalen Zirkulation etabliert, allerdings sind die meisten davon durch einen großen Bedarf an Priming und damit Fremdblut limitiert (Sasaki et al. 1996; Fabre et al., 2001; Grocott et al., 2001; Mackensen et al., 2001; Homi et al., 2004; Dong et al., 2005). Auf Fremdblut konnte in unserem Modell komplett verzichtet werden, sodass die anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen zu Inflammation und Enzym-Aktivierung und -Expression nicht durch externe Komponenten verfälscht wurden.

Nur in wenigen Studien wurde bisher ein Modell des kompletten kardiopulmonalen Bypasses an der Ratte mit geringem Füllungsvolumen und ohne Fremdblutbedarf beschrieben (Gourlay et al., 2002; You et al., 2005; Jungwirth et al., 2006; Modine et al., 2006). Allerdings wurde in keiner der bisherigen Versuchsreihen ein hypothermer, kardioplegischer Herzstillstand durchgeführt, welcher zur Untersuchung des Ischämie-Reperfusionsschadens nach kardiopulmonalem Bypass ein essentieller Bestandteil für herzchirurgisch relevante Forschungsmodelle ist.

zu 2) Durch unseren speziell entwickelten Membranoxygenator konnte unter der Verabreichung von reinem Sauerstoff bei einer Flussrate des KPB von 120 ml/kg/min ein Sauerstoffpartialdruck von mehr als 400 mmHg erreicht werden (Günzinger et al., 2007). (S.a. Kapitel IV.1.3)

zu 3) Durch die Kanülierung der V. jugularis und Verschieben der venösen Drainage in den rechten Vorhof ließ sich ein suffizienter Rückfluss erzielen und Flussraten von

120 ml/kg/min am kompletten Bypass erreichen, was der klinischen Praxis entspricht (Schelkle und Göritz, 2002). Durch das Einbringen der arteriellen Kanüle in die A. femoralis, welche sich problemlos mit einer 22G-Kanüle punktieren ließ, blieb die Möglichkeit bestehen, die supraaortalen Äste für das Platzieren des Konduktanz-Katheters und des Kardioplegiekatheters zu verwenden.

- zu 4) Ein Filter mit Luftfalle wurde am venösen Reservoir angebracht.
- zu 5) Blutgasanalysen wurden im Versuchsprotokoll zu definierten Zeitpunkten durchgeführt und ausgewertet. Somit war eine ständige Optimierung der Oxygenierung oder Korrektur der Elektrolytwerte möglich.
- zu 6) Durch die Kombination von Wärmeplatte und Wärmetauscher konnte eine problemlose Kühlung der Versuchstiere auf bis zu 28°C und ein rasches Wiedererwärmen erreicht werden.
- zu 7) Die Durchmesser und die Länge des Schlausystems unseres Modells waren in der Größenproportion der Ratte angepasst, was sich durch das geringe Füllungsvolumen von 2 ml bestätigen lässt.

IV.1.1.2 Wichtige Aspekte in der Umsetzung des Kleintiermodells

- Eine partielle, kontinuierliche Ventilation sollte während der extrakorporalen Zirkulation am schlagenden Herzen in der Phase des Absenkens der Körpertemperatur und des Wiedererwärmens des Tieres aufrechterhalten werden. Hierdurch wird verhindert, dass nicht oxygeniertes Blut in die Koronararterien gelangt. Eine erfolgreiche Entwöhnung des Tieres von der extrakorporalen Zirkulation ist somit gewährleistet.
- Eine ausreichende Heparinisierung (500 IE/kg KG), welche Grundvoraussetzung für die Durchführung der extrakorporalen Zirkulation ist (Schelkle und Göritz, 2002), sollte so spät als möglich vorgenommen werden. Wir heparinisierten die Tiere nach Abschluss der chirurgischen Präparation unmittelbar vor Beginn der EKZ. Dadurch konnte der Blutverlust insgesamt reduziert und stabile Hämatokritwerte erzielt werden.
- Im venösen Reservoir der Herz-Lungen-Maschine sollten ständig mindestens 1-2 ml Blut verbleiben, um Luftembolien durch in die venöse Kanüle gesaugte Luft zu vermeiden.
- Für eine suffiziente venöse Drainage wird eine groß- und mehrlumige Kanüle am besten im rechten Vorhof platziert. Ein zusätzlich an der venösen Drainage angelegter aktiver Sog erlaubt höhere Flussraten am Bypass.

IV.1.2 Konduktanz-Katheter-Technik

Auch bei der Anwendung der Konduktanz-Katheter-Technik müssen einige entscheidende Aspekte beachtet werden:

- Im Falle von Volumenmessungen mittels Konduktanz ist eine Korrektur der Volumen-Kalibrierung anhand des aktuellen Hämatokritwertes notwendig, da die Konduktanz des Blutes stark von der Anzahl der Erythrozyten abhängt (Fricke, 1925; Jaspard et al., 2003).
- Messwerte des intraventrikulären Volumens, welche durch das Konduktanz-Katheter-System erfasst werden, werden außerdem durch die Menge und Eigenschaften des umliegenden Gewebes beeinflusst („parallele Konduktanz“). Dadurch wird das Volumensignal während akuter Veränderungen der Ventrikel-Umgebung, wie z.B. bei Gabe der kardioplegischen Lösung in die Wand des linken Ventrikels, unzuverlässig und muss im Anschluss erneut kalibriert werden.

IV.1.3 Der Membranoxygenator

Neben der Rollerpumpe, welche die Pumpfunktion des Herzens ersetzt, ist der Oxygenator als Lungenersatz der wichtigste Bestandteil einer Herz-Lungen-Maschine. In den meisten Kleintiermodellen wurde daher besonderer Wert auf die Konzeption des Oxygenators gelegt (Sasaki et al., 1996; Ballaux et al., 1999; Fabre et al., 2001; Dong et al., 2003). Hierbei sind folgende Aspekte zu beachten:

- 1) Für einen ausreichenden Gasaustausch muss eine entsprechend große Oberfläche vorhanden sein. In unserem Modell betrug diese 0,063 m² (Günzinger et al., 2007).
- 2) Trotzdem sollte das Füllungsvolumen für die Vergleichbarkeit des Modells möglichst gering gehalten werden.
- 3) Analog der aktuellen herzchirurgischen Praxis sollte für eine optimale Sauerstoffanreicherung des Blutes ein Membranoxygenator verwendet werden (Schmid, 2006).

Der speziell für dieses Kleintiermodell von Prof. Dr. N. Mandler (Deutsches Herzzentrum München) entwickelte Membranoxygenator bot verschiedene Vorteile. Zum einen war er so konzipiert, dass das Gesamt-Füllungsvolumen trotz großer Oberfläche mit 4 ml sehr gering war. In keinem anderen Modell der Ratten-Herz-Lungen-Maschine mit niedrigem Priming und komplettem kardiopulmonalen Bypass wurde dieses geringe Volumen bei entsprechend großer Oberfläche erreicht (Gourlay et al., 2002; You et al., 2005; Jungwirth et al., 2006).

Zum anderen gewährleistete der Oxygenator einen Sauerstoffpartialdruck von mehr als

400 mmHg bei einer Flussrate des KPB von 120 ml/kg/min unter der Gabe von reinem Sauerstoff (Günzinger et al., 2007). Der in der Blutgasanalyse nachweisbare signifikante Anstieg des PaO₂ bei Verwendung des Oxygenators bestätigte die hervorragende Funktion und ermöglicht die Untersuchung der Effekte und Pathophysiologie der hyperoxämischen Reperfusion des Herzens nach KPB.

Auch der ventilatorische Ausgleich des Säure-Basen-Haushalts war während der extrakorporalen Zirkulation problemlos möglich. Bei einer Gas/Blut-Flussrate von 2 : 1 konnte der Kohlendioxidpartialdruck bei 35-45 mmHg konstant gehalten. Der PaO₂ wurde während des KPB durch die Beimischung von Raumluft an physiologische Level angeglichen.

IV.1.4 Kardioplegischer Herzstillstand

Durch das Querklemmen der Aorta und die direkte Infusion der kardioplegischen Lösung in die Aortenwurzel konnte ein effektiver Herzstillstand erreicht werden, welcher bereits nach 10 Sekunden eintrat. Mittels EKG und intraventrikulärem Druck-Aufnehmer wurde die elektrische Aktivität des Herzens überwacht und bei Abweichungen von der isoelektrischen Null-Linie Kardioplegielösung nachgegeben. Nach dem Lösen der Aortenklammung setzte innerhalb von 45 Sekunden die Pumpfunktion wieder ein, was ebenfalls dem Zeitrahmen in der klinischen Praxis entsprach.

Ein wichtiger Aspekt bei der Verwendung kardioplegischer Lösungen ist zudem die Aufrechterhaltung stabiler Kaliumspiegel. In der vorliegenden Versuchsreihe wurde ein signifikanter Anstieg der Kaliumwerte 60 Minuten nach Beendigung des kardiopulmonalem Bypasses beobachtet. Dies war entweder durch die kardioplegische Lösung selbst bedingt, welche hohe Kaliumkonzentrationen enthielt, oder durch eine leichte Hämolyse, nachweisbar im Urin und in den Plasmaproben, was mit der klinischen Routine vergleichbar ist.

IV.1.5 Blutgasanalysen

Mit Hilfe der arteriellen Blutgasanalysen wurden Hämatokrit, Oxygenierung, Säure-Basen-Haushalt und Kaliumwerte zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchsablaufes überwacht. Die Hämodilution bewirkte einen signifikanten Abfall der Hämatokritwerte von ca. 40-45% auf ca. 20-25%. Über die Dauer des Versuches blieb dieser Wert stabil. Dies zeigt, dass trotz Heparinisierung keine größeren Blutverluste zu verzeichnen waren.

Im Falle einer metabolischen Azidose wurde Natriumhydrogencarbonat 8,4% appliziert, um während des gesamten Versuchs einen ausgeglichenen Säure-Basen-Haushalt zu gewährleisten.

Die erhobenen Daten zeigen, dass die gemessenen Blutparameter denjenigen in der klinischen Situation entsprechen und somit diesbezüglich ein praxisorientiertes und vergleichbares Versuchsmodell entworfen wurde (Nötzold, 2006).

IV.2 Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation und des kardioplegischen Herzstillstandes

IV.2.1 Linksventrikuläre Funktion

Die mittels der Konduktanz-Katheter-Technik durch intraventrikuläre Messungen erhobenen hämodynamischen Daten zeigten in beiden Versuchsgruppen einen signifikanten linksventrikulären Druckabfall (LVP_{max}) 60 Minuten nach Beendigung der extrakorporalen Zirkulation.

In der Gruppe mit Ischämie und Reperfusion durch kardioplegischen Herzstillstand waren im Vergleich zur Versuchsgruppe ohne Kardioplegie darüber hinaus die Herzfrequenz und die systolische linksventrikuläre Funktion vermindert. Dies zeigte sich in einer Abnahme von Schlagvolumen (SV), Schlagarbeit (SW), Ejektionsfraktion (EF), Herzminutenvolumen (HMV) und der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}). Die diastolische linksventrikuläre Funktion war in der Gruppe mit Inzolen®-Kardioplegie ebenfalls reduziert, was sich in einer Zunahme der enddiastolischen Elastanz (E_{ed}), einer Abnahme der Druckabfallsgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) und der Spitzenrate der Füllung (dV/dt_{min}) äußerte. Die Veränderung dieser Parameter spricht für eine erhöhte Ventrikelsteifigkeit, welche zur beobachteten Funktionseinschränkung führt.

Die signifikante Reduktion der kontraktiven Parameter nach Ischämie und Reperfusion wurde bereits in vorangehenden Studien nachgewiesen (Prasan et al., 2002; Liakopoulos et al., 2004; Guerra et al., 2006). Außerdem konnte eine eingeschränkte linksventrikuläre Funktion nach vorübergehendem Herzstillstand, herbeigeführt durch kristalloide Kardioplegie-Lösungen, aufgezeigt werden (Kopf et al., 1987; Vinten-Johansen und Nakanishi, 1993; Steensrud et al., 2004), was mit unseren hämodynamischen Daten übereinstimmt.

Mögliche Ursachen für diese Ergebnisse sind Reaktionen durch bei Ischämie vermehrt freigesetzte Sauerstoffradikale und die Aktivierung von Leukozyten, welche zum myokardialen Stunning nach kardiopulmonalem Bypass beitragen (Bolli und Marbán, 1999; Jordan et al., 1999; Paparella et al., 2002).

Eine weitere Erklärung für den Abfall der myokardialen Leistung kann ebenso der Mangel an Pufferlösungen in der verwendeten Inzolen®-Kardioplegie sein. In klinischen Studien zeigte sich ein eindeutiger Vorteil von bluthaltigen Kardioplegielösungen im Vergleich mit kristalloiden Lösungen bezüglich der Myokardprotektion (Ibrahim et al., 1999; Nicolini et al., 2003; Jacob et al., 2008).

In den Kleintiermodellen der Herz-Lungen-Maschine wurde bislang lediglich der mittlere arterielle Druck als hämodynamischer Messwert bestimmt (Fabre et al., 2001; Grocott et al. 2001; Mackensen et al., 2001; Homi et al., 2004). Eine ausführliche Untersuchung von Parameter der kontraktile Funktion mittels Konduktanz-Katheter-Technik wurde am Kleintier noch nicht durchgeführt. Somit bietet unser Modell einen weiteren wichtigen Vorteil für klinisch relevante Untersuchungen von Ischämie und Reperfusion nach kardioplegischem Herzstillstand.

IV.2.2 Systemische Entzündungsreaktion

Der Kontakt von Blutbestandteilen mit den künstlichen Oberflächen der Herz-Lungen-Maschine, Ischämie und Reperfusion beim kardioplegischem Herzstillstand und das durch die chirurgischen Arbeitsschritte bedingte operative Trauma führen zu einer systemischen Entzündungsreaktion im Rahmen herzchirurgischer Operationen mit extrakorporaler Zirkulation. Vermittelt wird diese Entzündungsreaktion zum einen durch die Aktivierung des Komplementsystems an Fremdmaterial und durch Gewebeverletzungen (Kirklin et al., 1983; Bruins et al., 1997; Gu et al., 1999). Zum anderen zeigt sich ein Anstieg proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF- α , IL-6) vor allem bedingt durch die Ischämie-Reperfusions-Reaktion (Schulz et al., 2004; Liakopoulos et al., 2005, Podgoreanu et al., 2005).

Diese Ergebnisse konnten durch unsere Untersuchungen bestätigt werden, da sowohl die mRNA-Expression im Myokard als auch die Plasma-Konzentrationen von TNF- α und IL-6 in der Versuchsgruppe mit kardioplegischem Herzstillstand erhöht waren. Es ist bemerkenswert, dass der Anstieg von IL-6 sowohl im Plasma als auch im Myokard wesentlich ausgeprägter ist als die Reaktion von TNF- α . Diese Resultate stimmen mit vorausgegangenen Untersuchungen überein, welche die frühe Hochregulation der mRNA im Rattenmyokard nach Ischämie betrachten (Guerra et al., 2006).

Von besonderer Bedeutung sind oben genannte Beobachtungen, da TNF- α und Interleukine, wie z.B. IL-1 und IL-6, ihrerseits zu einer Hochregulation der Proteinlevel und vermehrten Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 führen (Yao et al., 1997; Mann und Spinale, 1998; Mayers et al., 2001; Deschamps und Spinale, 2006).

Insgesamt trägt die systemische Entzündungsreaktion zu vielfältigen postoperativen Komplikationen wie z.B. kardialer Dysfunktion, respiratorischer Insuffizienz und Nierenversagen bei (Breisblatt et al., 1990; Paparella et al., 2002; Levy und Tanaka, 2003; Podgoreanu et al., 2005).

IV.2.3 Matrix-Metalloproteinasen

Bei unterschiedlichen kardialen Erkrankungen spielen die Matrix-Metalloproteinasen durch ihre Beteiligung an vaskulären Umbauprozessen, arteriosklerotischer Plaqueinstabilität und Umbauvorgängen im linken Ventrikel eine Rolle (Visse und Nagase, 2003; Lindsey 2004).

So konnte z.B. nachgewiesen werden, dass die MMP-Level nach Myokardinfarkt im Plasma ansteigen (Lindsey, 2004) und MMP-2 und -9 eine Schlüsselrolle bei der kardialen Ruptur nach Herzinfarkt spielen (Nagase et al., 2006). Zudem trägt die MMP-Aktivierung zu Veränderungen der Ventrikelgeometrie bei, welche unter anderem beim Fortschreiten der dilatativen Kardiomyopathie auftreten (Mann und Spinale, 1998).

Auch in der Herzchirurgie sind diese Enzyme durch ihr ubiquitäres Vorkommen im Myokard von Bedeutung. In vielen experimentellen und klinischen Studien zur systemischen Entzündungsreaktion nach kardiopulmonalem Bypass wurden die Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 untersucht, welche einen Einfluss auf die beobachtete myokardialen Dysfunktion nach EKZ haben (Chen et al., 2005; Lalu et al., 2005).

Um diesen Einfluss genauer zu beurteilen entwickelten wir das Kleintiermodell der Herz-Lungen-Maschine mit kardioplegischem Herzstillstand und intraventrikulärer Druck-Volumen-Messung.

IV.2.3.1 Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen durch den kardiopulmonalen Bypass

Nach Ischämie und Reperfusion sind die Aktivitäten von MMP-2 (Wang et al., 2002) und MMP-9 (Lu et al., 2000) im Herzen gesteigert. Zudem ist die Freisetzung der Matrix-Metalloproteinasen (pro-MMP-2, MMP-2, MMP-9) in den Koronarsinus erhöht und steigt mit der Dauer der Ischämie an (Cheung et al., 2000; Lalu et al., 2005).

Verschiedene Faktoren wurden als Ursachen der MMP-Aktivierung nachgewiesen, so z.B. proinflammatorische Zytokine (z.B. TNF- α , IL-1), freigesetzt während des KPB, welche MMP-2 und -9 induzieren (Li et al., 2000). Zudem zeigte sich in einigen Studien, dass reaktiver Sauerstoff und Stickstoffarten (z.B. Superoxide, Hydroxylradikale, Peroxynitrit, Wasserstoffperoxid), welche einen oxidativen Schaden nach Ischämie und Reperfusion induzieren, Matrix-Metalloproteinasen direkt aktivieren oder deren Transkription verändern (Egi et al., 2004; Deschamps und Spinale, 2006). Die Aktivierung von Leukozyten, welche Matrix-Metalloproteinasen intrazellulär speichern, ist vermutlich ein zusätzlicher Weg der MMP-Freisetzung und -Aktivierung (Lalu et al., 2005).

Matrix-Metalloproteinasen selbst sind wiederum an der Freisetzung von Entzündungsmediatoren, wie z.B. TNF α , beteiligt (Gearing et al., 1994).

IV.2.3.2 Ergebnisse im Vergleich

Mit den oben beschriebenen Methoden untersuchten wir die im Herzmuskel nachgewiesenen aktiven Formen der Matrix-Metalloproteinasen (MMP-2 und -9) und deren inaktive Vorstufen (pro-MMP`s) in Plasma und Myokard in Versuchsgruppen mit und ohne kardioplegischen Herzstillstand und in einer Kontrollgruppe. Wie bereits in anderen experimentellen Studien zur extrakorporalen Zirkulation und deren Einfluss auf Inflammation und damit Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen beschrieben (Matata et al., 2000; Asimakopoulos, 2001; Schneider et al., 2003), zeigte sich auch in unserer Versuchsreihe eine vermehrte MMP-Aktivität in Myokard und Plasma bei Verwendung der Herz-Lungen-Maschine im Vergleich zur Kontrollgruppe. In klinischen Studien konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Aktivität von MMP-2 und -9 in Myokard und Plasma nach Ischämie und Reperfusion nachgewiesen werden (Joffs et al., 2001; Lalu et al., 2004; Lin et al., 2005). Zudem zeigte sich, dass die Aktivierung von MMP-9 im Plasma früher beginnt als die Aktivierung von MMP-2 (Joffs et al., 2001; Chen et al., 2005) und eine positive Korrelation zwischen MMP-2-Aktivität und Ischämiedauer besteht (Lalu et al., 2004). Somit können die geringen bzw. fehlenden MMP-2 und -9-Anteile in unseren Versuchsgruppen bei signifikanter Erhöhung der Aktivität latenter MMP-Formen durch eine unzureichend lange Dauer der Ischämie erklärt werden.

Bemerkenswert ist, dass in unserer Versuchsreihe die MMP-Aktivitäten in der Gruppe mit Ischämie und Reperfusion durch kardioplegischen Herzstillstand im Plasma signifikant niedriger waren als in der Gruppe mit alleiniger extrakorporaler Zirkulation. Dies führten wir auf die in der kardioplegischen Lösung enthaltenen Schwermetalle, wie Kupfer, Zink oder Mangan, zurück. Durch die Zugabe von Zink zu den mit den Matrix-Metalloproteinasen zu inkubierenden Gelen zeigte sich mit ansteigender Zinkkonzentration eine signifikante Abnahme der MMP-Aktivität. Auch in zwei weiteren Arbeiten konnte dieser Effekt aufgezeigt werden (de Souza et al., 2000; Santos et al., 2004). Allerdings ist der zugrunde liegende Mechanismus im Detail bislang nicht geklärt.

Bekanntermaßen besitzen Matrix-Metalloproteinasen ein katalytisches Zentrum mit einem Zink-Atom, welches bei den pro-MMP`s durch eine Zink-Cystein-Bindung blockiert wird. Durch die Lösung dieser Bindung kann sich ein für die Katalyse wichtiges Wassermolekül an das Zink-Ion anlagern und die Matrix-Metalloproteinasen werden aktiviert (Visse und Nagase, 2003; Nagase et al., 2006). Gehemmt werden können Matrix-Metalloproteinasen daher durch Zink-Chelatoren, welche an das katalytische Zentrum binden (Corcoran et al., 1996; Woessner, 1999).

Hinsichtlich der Genexpression der Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 zeigte sich, dass in der Kontrollgruppe keine mRNA-Expression stattfand, welche in beiden Versuchsgruppen

jedoch nachweisbar war. Allerdings lag beim Vergleich der Versuchsgruppen (EKZ und INZ) untereinander in den untersuchten Proben aus Endo- und Epikard kein signifikanter Unterschied vor. Dies ist ebenfalls auf die kurze Ischämiezeit zurückzuführen, was mit der Studie von Prasan et al., 2002 übereinstimmt, in welcher nach einer kurzen Ischämiedauer von 15 Minuten keine Erhöhung der Transkription von pro-MMP-2 nachzuweisen war. Ein signifikanter MMP-2-Anstieg wurde erst in der Reperfusionsphase nach 60 Minuten Ischämie beobachtet. Cheung et al., 2000 konnten zeigen, dass der Anstieg von pro-MMP-2 im Myokard mit der Dauer der Ischämie zusammenhängt.

IV.2.3.3 Einfluss der Matrix-Metalloproteinasen auf die kontraktile Funktion

Unsere hämodynamischen Messungen mittels intraventrikulärem Konduktanz-Katheters ergaben eine signifikante Reduktion der systolischen und diastolischen linksventrikulären Funktion nach kardioplegischem Herzstillstand mit kristalloider Kardioplegie im Vergleich zur alleinigen extrakorporalen Zirkulation. Die Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen in dieser Versuchsgruppe war allerdings nicht signifikant erhöht, sodass in unserem Modell mit kurzer Ischämiezeit und zinkhaltiger kardioplegischer Lösung die Matrix-Metalloproteinasen keinen Einfluss auf die kontraktile Funktion nahmen. Die Einschränkungen der myokardialen Leistung nach kardiopulmonalem Bypass sind somit durch andere Faktoren bedingt, wie z.B. durch eine signifikante Erhöhung proinflammatorischer Zytokine (s. a. IV.2.2). Zudem sind unter anderem die Aktivierung von Leukozyten, des Komplementsystems und der Gerinnungskaskade nach kardiopulmonalem Bypass an der auftretenden systemischen Entzündungsreaktion mit nachfolgender Einschränkung der Herzfunktion und anderer Organsysteme beteiligt (Edmunds, 1998; Parparella et al., 2002; Levy und Tanaka, 2003).

Vermehrte Aktivierung und Expression von Matrix-Metalloproteinasen spielen vor allem bei längerer Ischämiedauer eine Rolle (Cheung et al., 2000; Prasan et al., 2002; Lalu et al., 2004). Der schädigende Einfluss dieser Enzyme auf die kardiale Funktion und myokardiale Struktur in chronischen Umbauprozessen nach Myokardinfarkt konnte durch Studien mit Inhibition von MMP-2 und -9 und MMP-2- und -9-knock-out-Modellen eindeutig bewiesen werden (Cheung et al., 2000; Ducharme et al., 2000; Hayashidani et al., 2003; Egi et al., 2004; Matsumura et al., 2005).

IV.3 Ausblick

IV.3.1 Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen

Um der Komplexität der Umbauvorgänge durch Matrix-Metalloproteinasen gerecht zu werden, müssen zusätzlich deren endogene Inhibitoren betrachtet werden. Matrix-

Metalloproteinasen üben ihre Funktion im gesunden Gewebe im Gleichgewicht mit spezifischen Inhibitoren (TIMP = tissue inhibitor of metalloproteinases) aus (Mann und Spinale, 1998; Visse und Nagase, 2003; Lindsey, 2004). Wird dieses Gleichgewicht durch Überexpression einer der Partner gestört, kommt es zu unterschiedlichen Krankheitsbildern basierend auf fibrotischen Umbauprozessen oder Gewebedestruktion (Woessner, 1994; Nagase et al., 2006). Durch Ischämie und Reperfusion wird die Expression von TIMP's im Myokard reduziert, die MMP-Aktivität hingegen nimmt zu, was zum myokardialen Stunning nach kardiopulmonalem Bypass beiträgt (Mayers et al., 2001; Schulze et al., 2003; Lin et al., 2005).

Somit sollte bei weiterführenden Untersuchungen mit dem Modell der Ratten-Herz-Lungen-Maschine zum Einfluss kardioplegischer Lösungen auf Matrix-Metalloproteinasen auch ein Augenmerk auf deren Inhibitoren gerichtet werden.

IV.3.2 Möglichkeiten des Kleintiermodells

Das von uns entwickelte und in ersten Versuchsreihen validierte Modell der Herz-Lungen-Maschine für die Ratte mit kardioplegischem Herzstillstand und intraventrikulärer Konduktanz-Messung bietet erstmalig die Möglichkeit mit der klinischen Praxis vergleichbare Studien am Kleintier durchzuführen. Vor allem der Vergleich kardioplegischer Lösungen (kristalloide Kardioplegie, Blutkardioplegie) hinsichtlich der Myokardprotektion lässt sich durch unser Modell optimal verwirklichen.

Desweiteren können ohne großen Mehraufwand Studien zur MMP-Inhibition etabliert werden, um die Entwicklung eines im klinischen Alltag einsetzbaren MMP-Inhibitors zur myokardialen Funktionsverbesserung nach Ischämie voranzutreiben.

Zu bedenken ist, dass normale Versuchstiere kein arteriosklerotisches Risikoprofil entsprechend dem herzchirurgischen Patienten aufweisen (Mackensen et al., 2001). Somit wäre eine Versuchsreihe an knock-out-Tieren mit Arteriosklerose äußerst aufschlussreich.

Zudem wurde in neueren Studien gezeigt, dass Matrix-Metalloproteinasen unabhängig vom Umbau der extrazellulären Matrix zusätzlich am Abbau von Troponin I, an Veränderungen der Plättchenaggregation und des Gefäßtonus beteiligt sind (Wang et al., 2002; Chen et al., 2005). Der Abbau intrazellulärer Substrate, wie z.B. Troponin I oder Myosin-Leichtketten, durch Matrix-Metalloproteinasen scheint zur kontraktile Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion beizutragen (Wang et al., 2002; Sawicki et al., 2005; Chow et al., 2007; Schulz, 2007).

Weitere Grundlagenforschung am Tiermodell ist notwendig um diese komplexen Vorgänge zu erfassen und die erworbenen Informationen für die klinische Medizin nutzbar zu machen.

V Zusammenfassung

Die Verwendung der Herz-Lungen-Maschine mit kardioplegischem Herzstillstand führt im herzchirurgischen Alltag trotz unzähliger Verbesserungen in den letzten Jahrzehnten immer noch zu erheblicher Morbidität und Mortalität nach operativen Eingriffen am Herzen. Bedingt wird die Einschränkung der myokardialen kontraktile Funktion nach extrakorporaler Zirkulation vor allem durch pathologische Reaktionen im Rahmen von Ischämie und Reperfusion nach künstlich erzeugtem Herzstillstand. Hieran beteiligt ist unter anderem eine generalisierte Entzündungsreaktion mit einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine, welcher wiederum zur Aktivierung unterschiedlicher Enzyme führt. Ein besonderes Augenmerk wurde in den letzten Jahren auf die Matrix-Metalloproteinasen gelegt, welche als zinkabhängige Endopeptidasen an physiologischen und auch pathologischen Umbauvorgängen im Herzmuskel beteiligt sind und unter anderem durch die Myokardischämie aktiviert werden.

Um molekularbiologische Untersuchungen zu den komplexen pathologischen Veränderungen nach Ischämie und Reperfusion durchführen zu können und daraus klinisch nutzbare Daten für Verbesserungsmöglichkeiten der kontraktile Funktion nach extrakorporaler Zirkulation gewinnen zu können, ist ein vielseitiges, allseits verwendbares und kostengünstiges Tiermodell nötig. Am Kleintiermodell war allerdings bislang ein kardioplegischer Herzstillstand durch Aortenquerklemmung und Installation einer kardioplegischen Lösung mit exakten hämodynamischen Messungen nicht möglich. Somit war es Ziel dieser Arbeit ein entsprechendes in-vivo-Modell der Herz-Lungen-Maschine mit hypothermen Herzstillstand unter Verwendung einer Kardioplegie an der Ratte zu etablieren und zu validieren. Anschließende molekularbiologische Auswertungen sollten die Anwendungsmöglichkeiten des Modells testen und erste klinisch relevante Daten erbringen.

Unsere Herz-Lungen-Maschine bestand analog des im klinischen Alltag verwendeten Modells aus einem venösen Reservoir, einem eigens entwickeltem Membranoxygenator, einem Wärmeaustauscher und einer Rollerpumpe. Wichtig hierbei ist, dass es uns möglich war das Füllungsvolumen auf ein Minimum zu reduzieren, sodass kein Fremdblut gegeben werden musste. Die linksventrikuläre Funktion des Herzens wurde mit Hilfe eines Konduktanz-Katheters ausgewertet. Durch kontinuierliche Druck-Volumen-Aufzeichnungen konnten die Funktionsreserven des Herzens ohne pharmakologische Intervention und ohne Beeinflussung der myokardialen Kontraktilität bestimmt werden. Parallel dazu wurden Herzmuskelgewebe und Plasmaproben molekularbiologisch aufgearbeitet, um einen direkten Zusammenhang zwischen systemischer Entzündungsreaktion, welche exemplarisch anhand der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 untersucht wurde, vermehrter Expression

der Matrix-Metalloproteinasen-2 und -9 und eingeschränkter linksventrikulärer Funktion nachweisen zu können.

Unsere Daten zeigten eine signifikante Erhöhung der Zytokine und Matrix-Metalloproteinasen-Aktivität nach extrakorporaler Zirkulation mit oder ohne kardioplegischem Herzstillstand. Die linksventrikuläre Funktion war nach der Gabe von kristalloider Kardioplegie deutlich eingeschränkt. Bemerkenswert ist hierbei, dass die in dieser Versuchsreihe verwendete kardioplegische Lösung aufgrund des Zinkgehaltes die Aktivität der untersuchten Enzyme im Vergleich zur Versuchsgruppe ohne Herzstillstand verminderte.

Somit haben wir erfolgreich ein in-vivo-Modell der Ratten-Herz-Lungen-Maschine mit kardioplegischem Herzstillstand und milder Hypothermie entwickelt. Dieses Kleintiermodell ist geeignet um klinisch relevante Fragestellungen hinsichtlich extrakorporaler Zirkulation und myokardialer Protektion zu beantworten.

VI Literaturverzeichnis

- Asimakopoulos G. Systemic inflammation and cardiac surgery: an update. *Perfusion*. 16 (2001) 353-360
- Baan J., van der Velde E.T., de Bruin H.G., Smeenk G.J., Koops J., van Dijk A.D., Temmerman D., Senden J., Buis B. Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation*. 70 (1984) 812-823
- Ballaux P.K.E.W., Gourlay T., Ratnatunga C.P., Taylor K.M. A literature review of cardiopulmonary bypass models for rats. *Perfusion*. 14 (1999) 411-417
- Benk C., Schlensak C., Doenst T. Aspekte zur praktischen Anwendung von Hypothermie in der Herzchirurgie. In: „Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine“. Feindt P., Harig F., Weyand M., Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2006, 147-156
- Bigelow W.G., Lindsay W.K., Greenwood W.F. Hypothermia - Its Possible Role in Cardiac Surgery: an Investigation of Factors Governing Survival in Dogs at Low Body Temperatures *Ann Surg*. 132 (1950) 849-866
- Bock H. Komponenten der EKZ – Blutfiltration. In: „Handbuch der Kardiotechnik“. Lauterbach G., Erber M., Lorenz D., Philipp A., Schelkle H., Urban & Fischer, München – Jena, 2002, 4. Auflage, 206-213
- Bolli R., Marbán E. Molecular and Cellular Mechanisms of Myocardial Stunning. *Physiological Reviews*. 79 (1999) 609-634
- Breisblatt W.M., Stein K.L., Wolfe C.J., Follansbee W.P., Capozzi J., Armitage J.M., Hardesty R.L. Acute myocardial dysfunction and recovery: a common occurrence after coronary bypass surgery. *J Am Coll Cardiol*. 15 (1990) 1261-1269
- Bruins P., te Velthuis H., Yazdanbakhsh A.P., Jansen P.G.M., van Hardevelt F.W.J., de Beaumont E.M.F.H., Wildevuur C.R.H., Eijsmann L., Trouwborst A., Hack C.E. Activation of the Complement System During and After Cardiopulmonary Bypass Surgery – Postsurgery Activation Involves C-Reactive Protein and Is Associated With Postoperative Arrhythmia. *Circulation*. 96 (1997) 3542-3548
- Buckberg G.D. Endothelial and myocardial stunning. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 125 (2003) S92-S93
- Chambers D.J. Mechanisms and Alternative Methods of Achieving Cardiac Arrest. *Ann Thorac Surg*. 75 (2003) 661-666
- Chen J., Tung C-H., Allport J.R., Chen S., Weissleder R., Huang P.L. Near-Infrared Fluorescent Imaging of Matrix Metalloproteinase Activity After Myocardial Infarction. *Circulation*. 111 (2005) 1800-1805
- Cheung P.-Y., Sawicki G., Wozniak M., Wang W., Radomski M.W., Schulz R. Matrix Metalloproteinase-2 Contributes to Ischemia-Reperfusion Injury in the Heart. *Circulation*. 101 (2000) 1833-1839
- Chow A.K., Cena J., Schulz R. Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol*. 152 (2007) 189-205

- Christiansen S. Empfehlungen zum Thema extrakorporale Zirkulation und Hämodilution, Priming, Hämofiltration und Hämodialyse. In: „Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine“. Feindt P., Harig F., Weyand M., Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2006, 139-145
- Cleutjens J.P.M. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res.* 32 (1996) 816-821
- Cohen G., Borger M.A., Weisel R.D., Rao V. Intraoperative Myocardial Protection: Current Trends and Future Perspectives. *Ann Thorac Surg.* 68 (1999) 1995-2001
- Cohn L.H. Fifty Years of Open-Heart Surgery. *Circulation.* 107 (2003) 2168-2170
- Cooley, D.A., Frazier, O.H. The Past 50 Years of Cardiovascular Surgery. *Circulation.* 102 (2000) IV 87-93
- Corcoran M.L., Hewitt R.E., Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. MMP-2: Expression, Activation and Inhibition. *Enzyme Protein.* 49 (1996) 7-19
- Cordell A.R. Milestones in the Development of Cardioplegia. *Ann Thorac Surg.* 60 (1995) 793-796
- Deschamps A.M., Spinale F.G. Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: Bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res.* 69 (2006) 666-676
- Dong G.-H., Xu B., Wang C.-T., Qian J.-J., Liu H., Huang G., Jing H. A Rat Model of Cardiopulmonary Bypass with Excellent Survival. *J Surg Res.* 123 (2005) 171-175
- Ducharme A., Frantz S., Aikawa M., Rabkin E., Lindsey M., Rohde L.E., Schoen F.J., Kelly R.A., Werb Z., Libby P., Lee R.T. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest.* 106 (2000) 55-62
- Edmunds L.H. Advances in the Heart-Lung Machine After John and Mary Gibbon. *Ann Thorac Surg.* 76 (2003) 2220-2223
- Edmunds L.H., Jr. Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass. *Ann Thorac Surg.* 66 (1998) 12-16
- Egi K., Conrad N.E., Kwan J., Schulze C., Schulz R., Wildhirt S. M. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and superoxide production reduces matrix metalloproteinase-9 activity and restores coronary vasomotor function in rat cardiac allografts. *Eur J Cardiothorac Surg.* 26 (2004) 262-269
- Ensminger C., Buchert R., Ensminger S.M. Spezielle Pathophysiologie der Extrakorporalen Zirkulation. In: „Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine“. Feindt P., Harig F., Weyand M., Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2006, 44-76
- Fabre O., Zegdi R., Vincentelli A., Cambillaud M., Prat A., Carpentier A., Fabiani J.N. A recovery model of partial cardiopulmonary bypass in the rat. *Perfusion.* 16 (2001) 215-220
- Freeman W.M., Walker S.J., Vrana K.E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potentials. *BioTechniques.* 26 (1999) 112-125

- Fricke H. The electric capacity of suspensions with special reference to blood. *J Gen Physiol.* 9 (1925) 137-152
- Gao C.Q., Sawicki G., Suarez-Pinzon W.L., Csont T., Wozniak M., Ferdinandy P., Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. *Cardiovasc Res.* 57 (2003) 426-433
- Gearing A.J.H., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson A.H., Drummond A.H., Galloway W.A., Gilbert R., Gordon J.L., Leber T.M., Mangan M., Miller K., Nayee P., Owen K., Patel S., Thomas W., Wells G., Wood L.M., Woolley K. Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature.* 370 (1994) 555-557
- Gourlay T., Ballaux P.K., Draper E.R.C., Taylor K.M. Early experience with a new technique and technology designed for the study of pulsatile cardiopulmonary bypass in the rat. *Perfusion.* 17 (2002) 191-198
- Grammer J.B., Bleiziffer S., Monticelli F., Lange R., Bauernschmitt R. Calcineurin and matrix protein expression in cardiac hypertrophy - Evidence for calcineurin B to control excessive hypertrophic signaling. *Basic Res Cardiol.* 101 (2006) 292-300
- Grammer J.B., Böhm J., Dufour A., Benz M., Lange R., Bauernschmitt R. Atrial fibrosis in heart surgery patients - Decreased collagen III/I ratio in postoperative atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol.* 100 (2005) 288-294
- Grocott H.P., Mackensen G.B., Newman M.F., Warner D.S. Neurological injury during cardiopulmonary bypass in rat. *Perfusion.* 16 (2001) 75-81
- Gross G.J., Kersten J.R., Warltier D.C. Mechanisms of Postischemic Contractile Dysfunction. *Ann Thorac Surg.* 68 (1999) 1898-1904
- Gu Y.J., Mariani M.A., Boonstra P.W., Grandjean J.G., van Oeveren W. Complement Activation in Coronary Bypass Grafting Patients Without Cardiopulmonary Bypass. *Chest.* 116 (1999) 892-898
- Günzinger R., Wildhirt S.M., Schad H., Heimisch W., Gurdan M., Mendler N., Grammer J., Lange R., Bauernschmitt R. A rat model of cardiopulmonary bypass with cardioplegic arrest and hemodynamic assessment by conductance catheter technique. *Basic Res Cardiol.* 102 (2007) 508-517
- Guerra M.S., Roncon-Albuquerque R., Jr, Lourenço A.P., Falcão-Pires I., Cibrão-Coutinho P., Leite-Moreira A.F. Remote myocardium gene expression after 30 and 120 min of ischaemia in the rat. *Exp Physiol.* 91 (2006) 473-480
- Hamamoto M., Suga M., Nakatani T., Takahashi Y., Sato Y., Inamori S., Yagihara T., Kitamura S. Phosphodiesterase type 4 inhibitor prevents acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass in a rat model. *Eur J Cardiothorac Surg.* 25 (2004) 833-838
- Hammacher S., Matern S., Roeb E. Extracellular matrix – from basic research to clinical implication. An overview with focus on matrix metalloproteinases. *Dtsch Med Wochenschr.* 129 (2004) 1976-1980
- Hayashidani S., Tsutsui H., Ikeuchi M., Shiomi T., Matsusaka H., Kubota T., Imanaka-Yoshida K., Itoh T., Takeshita A. Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285 (2003) H1229-H1235

- Heeneman S., Cleutjens J.P., Faber B.C., Creemers E.E., van Suylen R.-J., Lutgens E., Cleutjans K.B., Daemen M.J. The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis. *J Pathol.* 200 (2003) 516-525
- Heimisch W., Schad H., Günzinger R. Left Ventricular Volume Measurement by the Conductance Catheter and Variations in the Hematocrit in Small Animals. *Cardiovasc Eng.* 7 (2007) 43-46
- Hiramatsu Y., Gikakis N., Gormann J.H., Khan M.M.H., Hack C.E., Velthuis H.T.E., Sun L., Marcinkiewicz C., Rao A.K., Niewiarowski S., Colman R.W., Edmundus L.H., Anderson H.L. A baboon model for hematologic studies of cardiopulmonary bypass. *J Lab Clin Med.* 130 (1997) 412-420
- Homi H.M., Yang H., Pearlstein R.D., Grocott H.P. Hemodilution During Cardiopulmonary Bypass Increases Cerebral Infarct Volume After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Anesth Analg.* 99 (2004) 974-981
- Ibrahim M.F., Venn G.E., Young C.P., Chambers D.J. A clinical comparative study between crystalloid and blood-based St Thomas' hospital cardioplegic solution. *Eur J Cardiothorac Surg.* 15 (1999) 75-83
- Ito H., Takaki M., Yamaguchi H., Tachibana H., Suga H. Left ventricular volumetric conductance catheter for rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 270 (1996) H1509-H1514
- Jacob S., Kallikourdis A., Sellke F., Dunning J. Is blood cardioplegia superior to crystalloid cardioplegia? *Interact CardioVasc Thorac Surg.* 7 (2008) 491-498
- Jaspard F., Nadi M., Rouane A. Dielectric properties of blood: an investigation of haematocrit dependence. *Physiol. Meas.* 24 (2003) 137-147
- Joffs C., Gunasinghe H.R., Multani M.M., Dorman B.H., Kratz J.M., Crumbley A.J., Crawford F.A., Spinale F.G. Cardiopulmonary Bypass Induces the Synthesis and Release of Matrix Metalloproteinases. *Ann Thorac Surg.* 71 (2001) 1518-1523
- Jordan J.E., Zhao Z.-Q., Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 43 (1999) 860-878
- Jungwirth B., Mackensen G.B., Blobner M., Neff F., Reichart B., Kochs E.F., Nollert G. Neurologic outcome after cardiopulmonary bypass with deep hypothermic circulatory arrest in rats: Description of a new model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 131 (2006) 805-812
- Khadour F.H., Panas D., Ferdinandy P., Schulze C., Csont T., Lalu M.M., Wildhirt S.M., Schulz R. Enhanced NO and superoxide generation in dysfunctional hearts from endotoxemic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283 (2002) H1108-H1115
- Kim W.G., Moon H.J., Won T.H., Chee H.K. Rabbit model of cardiopulmonary bypass. *Perfusion.* 14 (1999) 101-105
- Kirklin J.K., Westaby S., Blackstone E.H., Kirklin J.W., Chenoweth D.E., Pacifico A.D. Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 86 (1983) 845-875
- Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W.G. Quantitative Zymography: Detection of Picogram Quantities of Gelatinases. *Anal Biochem.* 218 (1994) 325-329

- Kopf G.S., Chaudry I., Condos S., Baue A.E. Reperfusion with ATP-MgCl₂ following prolonged ischemia improves myocardial performance. *J Surg Res.* 43 (1987) 114-117
- Laemmli U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685
- Lalu M.M., Csonka C., Giricz Z., Csont T., Schulz R., Ferdinandy P. Preconditioning decreases ischemia/reperfusion-induced release and activation of matrix metalloproteinase-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 296 (2002) 937-941
- Lalu M.M., Pasini E., Schulze C.J., Ferrari-Vivaldi M., Ferrari-Vivaldi G., Bachetti T., Schulz R. Ischemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J.* 26 (2005) 27-35
- Lange R. Herzchirurgie. In: „Chirurgie“. Siewert J.R., Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 2001, 7. Auflage, 359-424
- Lauterbach G. Komponenten der EKZ – Herz-Lungen-Maschine. In: „Handbuch der Kardiotechnik“. Lauterbach G., Erber M., Lorenz D., Philipp A., Schelkle H., Urban & Fischer, München – Jena, 2002, 4. Auflage, 181-184
- Lauterbach G. Komponenten der EKZ – Oxygenatoren. In: „Handbuch der Kardiotechnik“. Lauterbach G., Erber M., Lorenz D., Philipp A., Schelkle H., Urban & Fischer, München – Jena, 2002, 4. Auflage, 185-200
- Lauterbach G., Meyer S. Komponenten der EKZ – Schlauchsysteme. In: „Handbuch der Kardiotechnik“. Lauterbach G., Erber M., Lorenz D., Philipp A., Schelkle H., Urban & Fischer, München – Jena, 2002, 4. Auflage, 201-205
- Leber T.M., Balkwill F.R. Zymography: A Single-Step Staining Method for Quantitation of Proteolytic Activity on Substrate Gels. *Anal Biochem.* 249 (1997) 24-28
- Levy J.H., Tanaka K.A. Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass. *Ann Thorac Surg.* 75 (2003) 715-720
- Li Y.Y., Feldman A.M., Sun Y., McTiernan C.F. Differential Expression of Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in the Failing Human Heart. *Circulation.* 98 (1998) 1728-1734
- Li Y.Y., McTiernan C.F., Feldman A.M. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res.* 46 (2000) 214-224
- Liakopoulos O.J., Mühlfeld C., Koschinsky M., Coulibaly M.O., Schöndube F.A., Dörge H. Progressive loss of myocardial contractile function despite unimpaired coronary blood flow after cardiac surgery. *Basic Res Cardiol.* 100 (2005) 75-83
- Lin T.C., Li C.Y., Tsai C.S., Ku C.H., Wu C.T., Wong C.S., Ho S.T. Neutrophil-Mediated Secretion and Activation of Matrix Metalloproteinase-9 During Cardiac Surgery with Cardiopulmonary Bypass. *Anaesth Analg.* 100 (2005) 1554-1560
- Lindsey M.L. MMP Induction and Inhibition in Myocardial Infarction. *Heart Fail Rev.* 9 (2004) 7-19

- Lorenz D., Erhardt G. Komponenten der EKZ – Kanülen und Kanülierungsarten. In: „Handbuch der Kardiotechnik“. Lauterbach G., Erber M., Lorenz D., Philipp A., Schelkle H., Urban & Fischer, München – Jena, 2002, 4. Auflage, 214-220
- Lu L., Gunja-Smith Z., Woessner J.F., Ursell P.C., Nissen T., Galardy R.E., Xu Y., Zhu P., Schwartz G.G. Matrix metalloproteinases and collagen ultrastructure in moderate myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 279 (2000) 601-609
- Mackensen G.B., Sato Y., Nellgård B., Pineda J., Newman M.F., Warner D.S., Grocott H.P. Cardiopulmonary Bypass Induces Neurologic and Neurocognitive Dysfunction in the Rat. *Anesthesiology.* 95 (2001) 1485-1491
- Mann D.L., Spinale F.G. Activation of Matrix Metalloproteinases in the Failing Human Heart : Breaking the Tie That Binds. *Circulation.* 98 (1998) 1699-1702
- Martin J., Schlensak C., Beyersdorf F. Myokardprotektion. In: „Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine“. Feindt P., Harig F., Weyand M., Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2006, 377-398
- Matata B.M., Sosnowski A.W., Galinanes M. Off-Pump Bypass Graft Operation Significantly Reduces Oxidative Stress and Inflammation. *Ann Thorac Surg.* 69 (2000) 785-791
- Matsumura S., Iwanaga S., Mochizuki S., Okamoto H., Ogawa S., Okada Y. Targeted deletion of pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest.* 115 (2005) 599-609
- Mayers I., Hurst T., Puttagunta L., Radomski A., Mycyk T., Sawicki G., Johnson D., Radomski M.W. Cardiac surgery increases the activity of matrix metalloproteinases and nitric oxide synthase in human hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 122 (2001) 746-752
- McDonnell S., Morgan M., Lynch C. Role of matrix metalloproteinases in normal and disease processes. *Biochem Soc Trans.* 27 (1999) 734-740
- Mendler N., Weishaar E., Brendel W. Eine Herz-Lungen-Maschine für Ratten als experimentelles Modell der extrakorporalen Zirkulation. *Thoraxchirurgie.* 17 (1969) 533-538
- Modine T., Azzaoui R., Fayad G., Lacroix D., Bordet R., Warembourg H., Gourlay T. A recovery model of minimally invasive cardiopulmonary bypass in the rat. *Perfusion.* 21 (2006) 87-92
- Montfort I., Pérez-Tamayo R. The distribution of collagenase in normal rat tissue. *J Histochem Cytochem.* 23 (1975) 910-920
- Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 69 (2006) 562-573
- Nicolini F., Beghi C., Muscari C., Agostinelli A., Budillon A.M., Spaggiari I., Gherli T. Myocardial protection in adult cardiac surgery: current options and future challenges. *Eur J Cardiothorac Surg.* 24 (2003) 986-993
- Nötzold A. pH- und Blutgas-Management während der EKZ. In: „Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine“. Feindt P., Harig F., Weyand M., Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2006, 157-164
- Nolan S.P., Zacour R., Dammann J.F. Reflections on the Evolution of Cardiopulmonary Bypass. *Ann Thorac Surg.* 64 (1997) 1540-1543

- Nishikawa N., Yamamoto K., Sakata Y., Mano T., Yoshida J., Miwa T., Takeda H., Hori M., Masuyama T. Differential activation of matrix metalloproteinases in heart failure with and without ventricular dilatation. *Cardiovasc Res.* 57 (2003) 766-774
- Paparella D., Yau T.M., Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg.* 21 (2002) 232-244
- Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) e36
- Podgoreanu M.V., Michelotti G.A., Sato Y., Smith M.P., Lin S., Morris R.W., Grocott H.P., Mathew J.P., Schwinn D.A. Differential cardiac gene expression during cardiopulmonary bypass: Ischemia-independent upregulation of proinflammatory genes. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 130 (2005) 330-339
- Popovic P., Horecky J., Popovic V.P. Hypothermic Cardiopulmonary Bypass in White Rats. *Ann Surg.* 168 (1968) 298-301
- Prasan A.M., McCarron H.C.K., White M.Y., McLennan S.V., Tchen A.S., Hambly B.D., Jeremy R.W. Duration of ischaemia determines matrix metalloproteinase-2 activation in the reperfused rabbit heart. *Proteomics.* 2 (2002) 1204-1210
- Proctor E. Partial and total circulatory support in the rat using a small heart-lung machine. *J Physiol Lond.* 281 (1978) 8P-10P
- Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch. de Gruyter W., Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin – New York, 2002, 259. Auflage, 833
- Reichart B. Herz und herznahe Gefäße – Grundlagen der Chirurgie des Herzens und der herznahen Gefäße. In: „Saegesser – Spezielle chirurgische Therapie“. Denecke H., Reichart B., Muhr G., Verlag Hans Huber, Bern – Göttingen – Toronto – Seattle, 1996, 11. Auflage, 351-364
- Robinson L.A., Schwarz G.D., Goddard D.B., Fleming W.H., Galbraith T.A. Myocardial Protection for Acquired Heart Disease Surgery: Results of a National Survey. *Ann Thorac Surg.* 59 (1995) 361-372
- Rohde L.E., Ducharme A., Arroyo L.H., Aikawa M., Sukhova G.H., Lopez-Anaya A., McClure K.F., Mitchell P.G., Libby P., Lee R.T. Matrix Metalloproteinase Inhibition Attenuates Early Left Ventricular Enlargement After Experimental Myocardial Infarction in Mice. *Circulation.* 99 (1999) 3063-3070
- Santos M.C., de Souza A.P., Gerlach R.F., Trevilatto P.C., Scarel-Caminaga R.M., Line S.R. Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. *J Oral Rehabil.* 31 (2004) 660-664
- Sasaki S., Takigami K., Shiiya N., Yasuda K. Partial Cardiopulmonary Bypass in Rats for Evaluating Ischemia-Reperfusion Injury. *ASAIO Journal* (1996) 1027-1030
- Sawicki G., Leon H., Sawicka J., Sariahmetoglu M., Schulze C.J., Scott P.G., Szczesna-Cordary D., Schulz R. Degradation of Myosin Light Chain in Isolated Rat Hearts Subjected to Ischemia-Reperfusion Injury – A New Intracellular Target for Matrix Metalloproteinase-2. *Circulation.* 112 (2005) 544-552

- Schelkle H., Göritz S. Durchführung der EKZ – Die EKZ beim Erwachsenen - Blutsparende Maßnahmen. In: „Handbuch der Kardiotechnik“. Lauterbach G., Erber M., Lorenz D., Philipp A., Schelkle H., Urban & Fischer, München – Jena, 2002, 4. Auflage, 223-238
- Schmid C. Techniken der extrakorporalen Zirkulation. In: „Empfehlungen zum Einsatz und zur Verwendung der Herz-Lungen-Maschine“. Feindt P., Harig F., Weyand M., Steinkopff Verlag, Darmstadt, 2006, 309-315
- Schneider S., Gunasinghe H., Sistino J., Blackwell M., Spinale F. Effects of leukocyte depletion filters on matrix metalloproteinase activation in an extracorporeal circulation circuit. *J Extra Corpor Technol.* 35 (2003) 139-142
- Schulz R. Intracellular targets of matrix-metalloproteinase-2 in cardiac disease: rational and therapeutic approaches. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47 (2007) 211-242
- Schulz R., Aker S., Belosjorow S., Heusch G. TNF α in ischemia/reperfusion injury and heart failure. *Basic Res Cardiol.* 99 (2004) 8-11
- Schulze C.J., Wang W., Suarez-Pinzon W.L., Sawicka J., Sawicki G., Schulz R. Imbalance Between Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 and Matrix Metalloproteinases During Acute Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation.* 107 (2003) 2487-2492
- Shiroishi M.S. Myocardial Protection – The Rebirth of Potassium-Based Cardioplegia. *Tex Heart Inst J.* 26 (1999) 71-86
- Siwik D.A., Pagano P.J., Colucci W.S. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280 (2001) C53-C60
- de Souza A.P., Gerlach R.F., Line S.R. Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater.* 16 (2000) 103-108
- Spinale F.G. Myocardial Matrix Remodeling and the Matrix Metalloproteinases: Influence on Cardiac Form and Function. *Physiol Rev.* 87 (2007) 1285-1342
- Steendijk P., Staal E., Jukema J.W., Baan J. Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281 (2001) H755–H763
- Steendijk P., Tulner S.A.F., Wiemer M., Bleasdale R.A., Bax J.J., van der Wall E.E., Vogt J., Schalij M.J. Pressure–volume measurements by conductance catheter during cardiac resynchronization therapy. *European Heart Journal.* 6 (2004) D35-D42
- Steensrud T., Nordhaug D., Husnes K.V., Aghajani E., Sørli D.G. Replacing potassium with nicorandil in cold St. Thomas' Hospital cardioplegia improves preservation of energetics and function in pig hearts. *Ann Thorac Surg.* 77 (2004) 1391-1397
- Thomas C.V., Coker M.L., Zellner J.L., Handy J.R., Crumbley A.J., Spinale F.G. Increased Matrix Metalloproteinase Activity and Selective Upregulation in LV Myocardium From Patients With End-Stage Dilated Cardiomyopathy. *Circulation.* 97 (1998) 1708-1715
- Tyagi S.C., Matsubara L., Weber K.T. Direct Extraction and Estimation of Collagenase(s) Activity by Zymography in Microquantities of Rat Myocardium and Uterus. *Clin Biochem.* 26 (1993) 191-198

Vinten-Johansen J., Nakanishi K. Postcardioplegia Acute Cardiac Dysfunction and Reperfusion Injury. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 7 (1993) 6-18

Visse R., Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function and Biochemistry. *Circ. Res.* 92 (2003) 827-839

Wan S., LeClerc J.L., Vincent J.L. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies. *Chest.* 112 (1997) 676-692

Wang W., Schulze C.J., Suarez-Pinzon W.L., Dyck J.R.B., Sawicki G., Schulz R. Intracellular Action of Matrix Metalloproteinase-2 Accounts for Acute Myocardial Ischemia and Reperfusion Injury. *Circulation.* 106 (2002) 1543-1549

Woessner J.F. Matrix Metalloproteinase Inhibition: From The Jurassic To The Third Millennium. *Ann N Y Acad Sci.* 878 (1999) 388-403

Woessner J.F. The Family of Matrix Metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci.* 732 (1994) 11-21

You X.-M., Nasrallah F., Darling E., Robins M., Nieman G., Searles B. Rat Cardiopulmonary Bypass Model: Application of a Miniature Extracorporeal Circuit Composed of Asanguinous Prime. *J Extra Corpor Technol.* 37 (2005) 60-65

Zahler S., Massoudy P., Hartl H., Hähnel C., Meisner H., Becker B.F. Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res.* 41 (1999) 722-730

VII Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
ABGA	arterielle Blutgasanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BE	base excess
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CO ₂	Kohlendioxid
DEPC	Diethyldicarbonat
DTT	Dithiothreitol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dP/dt _{max}	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
dP/dt _{min}	Spitzenrate des Abfalls des linksventrikulären Drucks
dV/dt _{max}	Spitzenrate der Ejektion
dV/dt _{min}	Spitzenrate der Füllung
EDP	enddiastolischer Druck
EDPVR	enddiastolische Druck-Volumen-Beziehung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	enddiastolisches Volumen
E _{ed}	enddiastolische Elastanz
E _{es}	endsystolische Elastanz
EF	Ejektionsfraktion
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ESP	endsystolischer Druck
ESPVR	endsystolische Druck-Volumen-Beziehung
ESV	endsystolisches Volumen
F	French
FiO ₂	Sauerstoff-Fraktion
G	Gauge (Maßeinheit für den Außendurchmesser)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HAES	Hydroxyethylstärke
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
IE	Internationale Einheiten

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
INZ	Inzolen®-Kardioplegie
K ⁺	Kalium
KG	Körpergewicht
KPB	kardiopulmonaler Bypass
LV	linksventrikulär/linker Ventrikel
LVP	linksventrikulärer Druck
LVV	linksventrikuläres Volumen
MAD	arterieller Mitteldruck
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
O ₂	Sauerstoff
P _a CO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
P _a O ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphat-gepufferter Salzlösung
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pondus hydrogenii
PRSW	Vorlast-abhängige Schlagarbeit
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RVU	relative Volumen-Einheit
SD	Standardabweichung
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SV	Schlagvolumen
SW	Schlagarbeit
τ (tau)	diastolische Relaxationszeitkonstante
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
V	Vena
ZnSO ₄	Zink

VIII Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Narkoseeinleitung mit Ether	18
Abb. 2.2 Graphische Übersicht der Kanülierungen	20
Abb. 2.3 Kanülierungen an der Ratte	21
Abb. 2.4 Aufbau der extrakorporalen Zirkulation	21
Abb. 2.5 Kompletter Versuchsaufbau.....	22
Abb. 2.6 Venöses Reservoir	23
Abb. 2.7 Rollerpumpe	24
Abb. 2.8 Wärmetauscher	24
Abb. 2.9 Schematische Darstellung des Membranoxygenators	25
Abb. 2.10 Membranoxygenator.....	26
Abb. 2.11 Arterielle Leitung mit Plastikkanüle	26
Abb. 2.12 Exemplarisch aufgezeigte Druck-Volumen-Schleife des linken Ventrikels	28
Abb. 2.13 Konduktanz-Katheter	29
Abb. 2.14 Statische Druck-Volumen-Schleife.....	31
Abb. 2.15 Druck-Volumen-Schleifen während der Volumenentlastung des LV	31
Abb. 2.16 Experimentelles Protokoll	33
Abb. 3.1 Abhängigkeit der RVU vom Hämatokritwert.....	47
Abb. 3.2 Exemplarische Druck-Volumen-Schleifen während der venösen Volumenentlastung nach Hämodilution vor und 60 min nach der extrakorporalen Zirkulation.....	48
Abb. 3.3 Linear dargestellte Druck- und Volumenkurven während der Induktion des Herzstillstandes.....	50

Abb. 3.4 Linear dargestellte Druck- und Volumenkurven zu Beginn der Reperfusionsphase	51
Abb. 3.5 a) Zymographie mit aufsteigender Proteinmenge b) Graphische Darstellung der nachweisbaren MMP-Aktivität in Abhängigkeit der Proteinmenge	52
Abb. 3.6 a) Zymogramme der Myokardproben b) Graphische Darstellung der MMP-Aktivität im linken Ventrikel	53
Abb. 3.7 a) Zymogramme der Plasmaproben b) Graphische Darstellung der MMP-Aktivität im Plasma	54
Abb. 3.8 Einfluss unterschiedlicher Zinkkonzentrationen auf Matrix-Metalloproteinasen	55
Abb. 3.9 a) RT-PCR der Endokardproben mit unterschiedlicher Zyklenzahl b) Graphische Darstellung der nachweisbaren mRNA-Konzentration der Endokardproben in Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Zyklen	56
Abb. 3.10 a) RT-PCR der Epikardproben mit unterschiedlicher Zyklenzahl b) Graphische Darstellung der nachweisbaren mRNA-Konzentration der Epikardproben in Abhängigkeit von der Anzahl der PCR-Zyklen.....	57
Abb. 3.11 a) RT-PCR für MMP-2 in Endokard und Epikard b) Graphische Darstellung der mRNA-Konzentration von MMP-2 in Endo- und Epikard.....	58
Abb. 3.12 a) RT-PCR für MMP-9 in Endokard und Epikard b) Graphische Darstellung der mRNA-Konzentration von MMP-9 in Endo- und Epikard.....	59
Abb. 3.13 Schmelzkurvenanalyse der real-time RT-PCR-Produkte.....	60
Abb. 3.14 Gel-Elektrophorese der real-time RT-PCR-Produkte	60
Abb. 3.15 TNF- α - und IL-6-mRNA-Spiegel im Myokard	60
Abb. 3.16 TNF- α - und IL-6-Konzentrationen im Plasma.....	61

IX Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Puffer zur Proteinisolierung	36
Tab. 2.2 Komponenten von Trenngel und Sammelgel.....	37
Tab. 2.3 Puffer für Gelelektrophorese und Entwicklung.....	38
Tab. 2.4 Komponenten für Färben und Entfärben	38
Tab. 2.5 Komponenten des Master Mix.....	40
Tab. 2.6 Puffer für die Elektrophorese der PCR-Produkte	41
Tab. 3.1 Daten der Blutgasanalysen	46
Tab. 3.2 Häodynamische Daten	49

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Manuela Angelika Gurdan
Geburtsdatum und -ort: 25.11.1981; Amberg
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schul- und Berufsausbildung

1988 – 1992 Volksschule Weiherhammer
1992 – 2001 Elly-Heuss-Gymnasium Weiden
2001 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
10/01 – 09/03 Studium der Humanmedizin, LMU München (Physikum 2003)
10/03 – 07/06 Studium der Humanmedizin, TU München
08/06 – 12/06 1. PJ-Tertial Innere Medizin: Universitätsspital Zürich
12/06 – 04/07 2. PJ-Tertial Chirurgie: Deutsches Herzzentrum München &
Chirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, München
04/07 – 07/07 3. PJ-Tertial Gynäkologie: Frauenklinik, Klinikum rechts der Isar, München
11/07 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
12/07 Approbation als Ärztin
Seit 03/08 Assistenzärztin in der Klinik für Gefäßchirurgie des Klinikums rechts der
Isar der Technischen Universität München

Auslandspraktika

2002 Einführungskurs in die Traditionelle Chinesische Medizin, China-Japan
Friendship-Hospital, Beijing, China
2006 Famulatur im Fach Tropenmedizin, Medical Center, Bukoba, Tansania

Wissenschaftliche Publikationen

Günzinger R, Wildhirt SM, Schad H, Heimisch W, Gurdan M, Mendler N, Grammer J, Lange R, Bauernschmitt R: A rat model of cardiopulmonary bypass with cardioplegic arrest and hemodynamic assessment by conductance catheter technique. Basic Res Cardiol. 102 (2007) 508–517

Guenzinger R, Gurdan M, Heimisch W, Schad H, Mendler N, Grammer J, Bauernschmitt R, Lange R, Wildhirt SM: A novel rat model of cardiopulmonary bypass with cardiac arrest and precise hemodynamic assessment by conductance catheter technique. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, Hamburg, 02.2006, Postervortrag

Hohenester S, Gurdan M: Lernkarten Biochemie, Urban & Fischer (Elsevier), 2005

Danksagung

Bedanken möchte ich mich zuerst bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Wildhirt, der das Projekt initiierte und allzeit Motivation für die Weiterarbeit bot.

Mein besonderer Dank als wichtigstem Ansprechpartner und Begleiter der Arbeit gilt Herrn Dr. Ralf Günzinger, der mit viel Elan und Beharrlichkeit die Umsetzung des Projektes vorantrieb und mich in allen Arbeitsphasen ausgezeichnet betreute und förderte. Ohne seine Mithilfe, Ermunterungen und Ratschläge hätte das wissenschaftliche Arbeiten nur halb so viel Spaß gemacht!

Den kreativen Köpfen bei der Etablierung des Modells, allen voran Herrn Prof. Mandler sowie Herrn Prof. Schad und Herrn Dr. Heimisch, gilt ebenso mein Dank.

Bei der molekularbiologischen Umsetzung danke ich Herrn Dr. Grammer und Frau Bernhard-Abt, welche mich mit viel Geduld in die Arbeitstechniken eingewiesen und bei der Durchführung unterstützt haben.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, Cornelia und Johann Gurdan, welche mich während des gesamten Medizinstudiums bedingungslos unterstützten und förderten.

Of science and the human heart

There is no limit

There is no failure here sweetheart

Just when you quit...

I am you and you are mine

Love makes nonsense of space

And time... will disappear

Love and logic keep us clear

Reason is on our side, love...

The songs are in your eyes

I see them when you smile

I've had enough of romantic love

I'd give it up, yeah, I'd give it up

For a miracle, a miracle drug, a miracle drug

für Christian Wilhelm