

Aus dem Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln

Direktor: Professor Dr. med. J. H. Fischer

**Myokard- und Endothelfunktion nach hypothermer
Langzeitkonservierung und heterotoper
Herztransplantation**

**Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln**

vorgelegt von

Marc Reismann

aus Köln

promoviert am 03. September 2003

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. Lehmkuhl

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. J. H. Fischer

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. E. R. de Vivie

Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich keine Unterstützungsleistung erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 24. Juni 2003

Marc Reismann

Die Operationen an den Versuchstieren wurden von Herrn Dr. med. F. Kuhn-Régnier als Operateur und Herrn Oguzhan Dagtekin und mir als Assistenten durchgeführt.

Die zur Herzperfusion verwendete Herz-Lungen-Maschine wurde von den biologisch- bzw. medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Corinna July oder Frau Manuela Lerwe bedient.

Die Überwachung der Tiere in der ersten postoperativen Nacht wurde jeweils von Herrn Oguzhan Dagtekin oder mir selbst nach entsprechender Unterweisung und bei Beaufsichtigung durch Frau Dr. med. vet. S. Jeschkeit-Schubbert durchgeführt.

Die Bestimmung des linksventrikulären Druckes, der Kontraktilität, der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit, des Herzzeitvolumens, der Schlag- und Herzarbeit wurden ebenso wie die Herzentnahme gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. med. J. H. Fischer und Frau Dr. med. vet. S. Jeschkeit-Schubbert durchgeführt.

Die Koronarfunktionstestungen wurden von Herrn Oguzhan Dagtekin oder mir vorgenommen.

Das Ansetzen der benutzten Lösungen sowie die biochemischen Analysen wurden von Frau Corinna July und Frau Manuela Lerwe durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Fischer möchte ich sehr herzlich für die freundliche Überlassung der interessanten Aufgabenstellung, die persönliche Anleitung zur wissenschaftlichen Arbeit, die großzügige Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche sowie den großen Entscheidungsspielraum danken.

Herrn Dr. Kuhn-Régnier danke ich ebenfalls sehr herzlich für die ebenso lehrreiche und effektive wie angenehme Zusammenarbeit.

Frau Dr. Stephanie Jeschkeit-Schubbert danke ich sehr herzlich für die wohlwollende und umfassende Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Medizin, die durch ihre Mithilfe einen Beitrag zu der vorliegenden Arbeit geleistet haben.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Geschichte der Herztransplantation	1
1.2 Die Problematik der Herzkonservierung	3
1.3 Die Methode der Sauerstoffpersufflation	5
1.4 Ziel dieser Versuchsreihe	8
2. Methodik	9
2.1 Die Gruppeneinteilung	9
2.2 Die Herzentnahme	10
2.2.1 Die Messung des Herzzeitvolumens	11
2.2.2 Die Perfusion mit Konservierungslösung	12
2.3 Die Herzlagerung	13
2.4 Die Vorbereitung der Herzimplantation	14
2.4.1 Die Vorbereitung des Empfängertieres	14
2.4.2 Die Vorbereitung des Spenderherzens	15
2.5 Die Herzimplantation	15
2.6 Die Reperfusion	17
2.6.1 Die initiale Reperfusion	17
2.6.2 Die Blutreperfusion	18
2.7 Die postoperative Versorgung	19
2.8 Die Entnahme des Herzens am siebten postoperativen Tag	21
2.9 Die Funktionsmessung der Koronararterien	22
2.10 Die Probenaufbereitung	25
2.11 Die Stoffwechselsituation des transplantierten Herzens	26
2.12 Die Versuchsauswertung	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Die Herzentnahme	29
3.2 Die Konservierung	29
3.3 Die Reperfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung und Blutreperfusion	29
3.4 Die Funktionsprüfungen	30
3.4.1 Das Herzzeitvolumen	30
3.4.2 Die Amplitude des linksventrikulären Druckes, die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit	30
3.5 Der Wassergehalt der Gewebeproben und die biochemische Analyse	32
3.5.1 Der Wassergehalt der Gewebeproben	32

3.5.2	Die Adeninnukleotide	33
3.5.3	Der Adenosintriphosphatgehalt	34
3.5.4	Das Energy Charge Potential	34
3.5.5	Der Phosphorylierungsgrad im Kreatinsystem	35
3.5.6	Der Glykogengehalt	36
3.5.7	Der Glukosegehalt	37
3.5.8	Der Laktatgehalt	38
3.6	Die Herzenzyme	39
3.6.1	Das kardiale Troponin T	39
3.6.2	Die Kreatinkinase	41
3.7	Die Funktion der Koronararterien	43
4.	Diskussion	45
4.1	Zum Versuchstier Schwein	45
4.2	Zum operativen Vorgehen und zur Reperfusion	46
4.3	Zu den Lösungen	49
4.3.1	Zum Kalzium	50
4.3.2	Zum Adenosin	51
4.3.3	Zu den antiödematös wirksamen Substanzen	52
4.3.4	Zu den Puffersubstanzen	53
4.3.5	Zu den weiteren Inhaltsstoffen	54
4.3.6	Zur Filterung der UW-Lösung vor Gebrauch	55
4.3.7	Zum optimalen Einsatzbereich der Lösungen und zur maximalen Lagerungszeit	56
4.4	Zur Amplitude des linksventrikulären Druckes, der maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit	57
4.5	Zum Wassergehalt der Gewebeproben und zur biochemischen Analyse	58
4.5.1	Zum Wassergehalt	58
4.5.2	Zu den energiereichen Phosphaten und zum Energy Charge Potential	58
4.5.3	Zum Glykogengehalt der Herzen	61
4.5.4	Zum Glukosegehalt der Herzen	62
4.5.5	Zum Laktatgehalt der Herzen	63
4.6	Zu den Herzenzymen	63
4.6.1	Zum kardialen Troponin T	63
4.6.2	Zur Kreatinkinase	65
4.7	Zu der Funktion der Koronararterien	67
5.	Zusammenfassung	74
6.	Literaturverzeichnis	76

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	- Abbildung
Ach	- Acetylcholin
ABE	- aktueller Basenüberschuss
ABL	- Acid Base Laboratory
ADP	- Adenosindiphosphat
AMP	- Adenosinmonophosphat
ATP	- Adenosintriphosphat
COP	- coronare Sauerstoffpersufflation (coronary oxygen persufflation)
Cr	- Kreatin
cTnT	- kardiales Troponin T
CrP	- Kreatinphosphat
dp/dt	- Druckveränderung pro Zeiteinheit
+ dp/dt _{max}	- maximale Kontraktionsgeschwindigkeit
- dp/dt _{max}	- maximale Relaxationsgeschwindigkeit
ECP	- Energy Charge Potential
FG	- Feuchtgewicht
Glu.	- Glucose
Gly.	- Glycogen
HPLC	- Hochdruck-Flüssigkeits- Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
HTK	- Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung nach Bretschneider
HZV	- Herzzeitvolumen
I.E.	- internationale Einheiten
Indo.	- Indomethacin
iNOS	- induzierbare Stickoxidsynthase
KH	- Krebs-Henseleit-Lösung
Lak.	- Laktat
L-NIL	- L-N6-(-1-Iminoethyl)lysin
L-NNA	- N-Nitro-L-Arginin
LA	- linkes Atrium

LVB	- Basis des linken Ventrikels
LVDP	- linksventrikuläre Druckamplitude (left ventricular developed pressure)
LVP	- linksventrikulärer Druck (left ventricular pressure)
LVS	- Spitze des linken Ventrikels
mKH	- modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung
mmHg	- Millimeter Quecksilbersäule
NHBD	- Organspender mit Herzstillstand (non-heart-beating donor)
n.s.	- nicht signifikant
RV	- rechter Ventrikel
SAN	- Summe der Adeninnukleotide
Pa	- Papaverin
SP	- Substanz P
TG	- Trockengewicht
Tab.	- Tabelle
UW	- University of Wisconsin Lösung
ZVD	- zentralvenöser Druck

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Anastomosierung der großen Herzerterien mit den Nierengefäßen	16
Abb. 2:	Apparateanordnung zur Messung der Koronarfunktion	24
Abb. 3:	Beispielhafter Verlauf einer Koronarfunktionsstörung	25
Abb. 4:	Reaktionen der photometrischen Tests	28
Abb. 5:	Vergleich der linksventrikulären Druckamplitude (LVP-Ampl.)	31
Abb. 6:	Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit ($+dp/dt_{max}$)	31
Abb. 7:	Maximale Relaxationsgeschwindigkeit ($-dp/dt_{max}$)	32
Abb. 8:	Trockengewicht (TG) in Prozent des Feuchtgewichtes (FG)	33
Abb. 9:	Summe der Adeninnukleotide (SAN)	33
Abb. 10:	ATP-Gehalt	34
Abb. 11:	Energy Charge Potential (ECP)	35
Abb. 12:	Glykogengehalt	36
Abb. 13:	Glukosegehalt der Herzen	37
Abb. 14:	Laktatgehalt der Herzen	38
Abb. 15:	Differenzen von Laktatgehalt der Gewebsflüssigkeit und Blutlaktatgehalt	39
Abb. 16:	Halbstündige Veränderungen des Gehaltes an kardialem Troponin T im Serum	40
Abb. 17:	Veränderungen des Gehaltes an kardialem Troponin T über die Tage	41
Abb. 18:	Halbstündige Veränderungen der Kreatinkinaseaktivität im Serum	43
Abb. 19:	Veränderungen der Kreatinkinaseaktivität über die Tage	43
Abb. 20:	Koronarfunktion	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Einteilung der Gruppen	9
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Konservierungslösungen	10
Tabelle 3:	Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung (mKH-Lösung) zur initialen Reperfusion	18
Tabelle 4:	Postoperative Medikation	20
Tabelle 5:	Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung (KH-Lösung) als Inkubationslösung für die Koronararterien	22
Tabelle 6:	Substanzen zur Überprüfung der Funktion der Koronararterien	24

1. Einleitung

1.1 Die Geschichte der Herztransplantation

Von den ersten erfolgreichen Herzverpflanzungen wurde 1905 von Carrel und Guthrie berichtet. Dabei wurden Hundeherzen homolog und heterotop an die Hälse der Tiere transplantiert. Dies führte jedoch bereits nach ca. zwei Stunden zum Organversagen aufgrund von Thrombenbildung (Carrel and Guthrie 1905). Da die immunologischen Abstoßungsprozesse noch nicht bekannt waren, blieben ähnliche spätere Versuche von Mann et al. ebenfalls ohne klinische Relevanz (Mann et al. 1933). Diese Vorgänge wurden von Williamson zunächst am Beispiel der Niere untersucht. Er hatte im Gegensatz zur Beobachtung bei der autologen Transplantation bei der heterologen Verpflanzung ein histologisches Bild ähnlich dem einer glomerulären Nephritis gefunden. Diese Untersuchungen führten jedoch noch nicht zu einem weitergehenden Verständnis der biologischen Abstoßungsmechanismen (Williamson 1926). Dieses wurde erst in den 40er Jahren durch Medawars Versuche zur Hauttransplantation an Kaninchen erlangt, der die Begriffe der frühen, der späten und der hyperakuten Abstoßung prägte (Medawar 1944a). In einer weiteren Untersuchung entwickelte Medawar die grundsätzliche Unterscheidung in die zelluläre und die humorale Immunität und ordnete diese verschiedenen Mechanismen dem jeweiligen Abstoßungstyp zu (Medawar 1944b). Die erste erfolgreiche Nierentransplantation in Kenntnis dieser Arbeiten erfolgte 1955 dennoch zunächst an eineiigen Zwillingen (Merrill et al. 1956). 1960 folgte die Nierentransplantation durch Merrill et al. zwischen zweieiigen Zwillingen erstmals unter vorsichtiger Anwendung von Kortikoiden (Merrill et al. 1960), und 1962 wurde durch Murray, Merrill et al. erstmals von einer erfolgreichen „Nierentransplantation mit modifizierten Empfängern“ berichtet (Murray et al. 1962). Damit war der Grundstein für die moderne Immunsuppression gelegt. Calne wies die immunsuppressive Wirksamkeit von Azathioprin bei der Nierentransplantation nach (Calne 1961), und die Erforschung anderer immunsuppressiven Substanzen wie z.B. des Cyclosporin A folgte nach.

Die operative Entwicklung der Herztransplantation wurde parallel voran getrieben. Fortschritte waren durch die Entwicklung der Herz-Lungen-Maschine und aufgrund von Erkenntnissen auf dem Gebiet der Immunsuppression möglich. Über die erste erfolgreiche orthotope Herztransplantation im Kaninchenversuch wurde 1960 von Lower und Shumway berichtet (Lower und Shumway 1960). Die erste humane orthotope Transplantation wurde am 3. Dezember 1966 allgemein unerwartet von Barnard in Südafrika vorgenommen (Barnard

1967). Der 55jährige Empfänger Louis Washanski verstarb jedoch 18 Tage nach der Operation, und das Vorgehen Barnards kann demnach nur sehr bedingt als erfolgreich gewertet werden. Obwohl die humane orthotope Herztransplantation nachfolgend weltweit begonnen wurde, verschwand sie aufgrund des Fehlens positiver Langzeitergebnisse bis zu den frühen 70er Jahre weitgehend aus der klinischen Praxis. Erst intensive Untersuchungen auf dem Gebiet der Organkonservierung und effektiverer immunsuppressiver Maßnahmen führten zu Erfolgen bei der Organtransplantation und schließlich auch zur verbreiteten Wiederaufnahme der Herztransplantation in den 80er Jahren. In diesem Zeitraum der 70er und 80er Jahre sind die ersten wesentlichen Untersuchungen der Organkonservierung durch die Methode der Sauerstoffpersufflation durch den Kölner Kreis um Fischer und Isselhard anzusiedeln (Fischer et al. 1978, 1980 u. 1998), die u.a. in den vorliegenden Versuchen ihre Fortsetzung finden.

Bis zur Einführung der Immunsuppression durch das spezifisch wirkende Cyclosporin A Anfang der 80er Jahre wurden jährlich 20 bis 100 Herztransplantationen durchgeführt. Danach stieg die Zahl der Herztransplantationen an, die seit 1988 jährlich relativ konstant weltweit ca. 3000 bis 3500 beträgt (Hosenpud et al. 1995). Das Cyclosporin A verhindert die Aktivierung und Proliferation von T-Lymphozyten über die Hemmung der Expression von T-Zell-Aktivatorgenen für bestimmte Zytokine, ohne einen Einfluss auf Granulozyten und B-Lymphozyten auszuüben (Borel et al. 1977; Calne et al. 1978; Meiser et al. 1997). Noch potentere Immunsuppressiva befinden sich bereits in klinischem Einsatz. So agiert das Immunsuppressivum Tacrolimus in ähnlicher Weise wie das Cyclosporin A. Es bindet jedoch an ein anderes T-Zell-Protein (das FK-Bindungsprotein) und erlangt dadurch eine 10 bis 100 mal höhere Potenz. Als Alternative zum Purinantagonisten Azathioprin wurde das Mycophenolat Mofetil entwickelt, das wie ersteres über die Hemmung der Purinneusynthese die Proliferation von B- und T-Lymphozyten verhindert. Mit der Dreifachkombination von Cyclosporin A, Azathioprin und Steroiden kann derzeit eine 2-Jahres-Überlebensrate von ca. 84 % erreicht werden (Meiser et al. 1997). Andere Autoren berichten zusätzlich von 1- und 5-Jahresüberlebenszeiten von 81 bzw. 70 % (Harringer und Haverich 2002). Eine Limitation erfährt dieses Ergebnis durch die zunehmende Zahl an schwerkranken Patienten, die ein Transplantat erhalten (Meiser et al. 1997). Nach Angaben der Internationalen Gesellschaft für Herz- und Lungentransplantation belief sich die Zahl der bisher weltweit verpflanzten Herzen bis zum 31. Dezember 2000 auf 57818 (Hosenpud et al. 2001). Im Gebiet von Eurotransplant (Belgien, Deutschland, Österreich, Luxemburg, Niederlande und Slowenien) wurden im Jahr

2002 579 Herzen verpflanzt, wovon allein 333 in Deutschland transplantiert wurden (nach Angaben im Internet: www.transplant.org).

1.2 Die Problematik der Herzkonservierung

Die Konservierung von ischämischen Herzen ist mit den zur Zeit verwendeten Methoden auf 3 bis 6 h limitiert, während Niere und Pankreas 24 bis 48 h in kalter Ischämie bei weitgehendem Funktionserhalt überstehen können (Akihiko et al. 1994; Fischer 1999; Reichenspurner et al. 1993a; Stringham et al. 1992). Die Gründe dafür liegen vor allem in der Eigenschaft des Herzens als kontraktilem Organ, das seine Funktion sofort aufnehmen und zu nahezu 90 % über unmittelbare Perfusion der Koronararterien aufrecht erhalten muss (Stringham et al. 1992). Es enthält die kontraktile Proteine Myosin und Aktin in großer Menge mit entsprechendem Verbrauch an energiereichen Phosphaten (Coetzee et al. 1986), wobei hier in erster Linie das unmittelbar fungierende Adenosintriphosphat zu nennen ist, das auch ein Gegenstand der weiteren Untersuchungen in dieser Arbeit war. Sobald der ATP-Vorrat aufgebraucht ist, kommt es im Herzen zur irreversiblen Kontraktur, was auf die dann fehlende Lösung der Myosinquerbrücken vom Aktin zurückzuführen ist (Bretschneider et al. 1984; Stringham et al. 1992). Desweiteren existieren Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass die kontraktile Filamente die ersten Proteinstrukturen sind, die während Ischämie im Herzmuskelgewebe geschädigt werden (Hein et al. 1995).

Der Radius, in dem ein Herz ohne größeren Funktionsverlust transportiert werden kann, ist zum Teil durch die die Transportzeit limitierende Konservierungszeit definiert. Überschreitet diese bei den derzeit üblichen Verfahren 3,5 h, nimmt die Rate an Funktionsstörungen stark zu (Akihiko 1994; Fischer 1999; Reichenspurner et al. 1993a; Stringham et al. 1992). Eine Verlängerung der Ischämiezeit würde daneben mehr Zeit für organisatorische Maßnahmen und histologische Untersuchungen lassen (Reichenspurner 1993a). Wichtige Determinanten werden zur Zeit in der Methode der Reperfusion sowie in der Zusammensetzung der jeweiligen Perfusionslösung gesehen (Rosenkranz et al. 1986).

Bei grundsätzlich verschiedenen Methoden zur Herzkonservierung stellt die sog. Flush-Perfusion die im klinischen Alltag am häufigsten angewendete dar. Dabei werden die Koronararterien über wenige Minuten mit kalter Kardioplegielösung durchspült und das Herz anschließend ohne weitere Perfusion auf Eis gelagert (Brambridge et al. 1977; Reichenspurner et al. 1993b; Stringham et al. 1992). Meist wird die Reperfusion direkt als

Blutreperfusion über die Herz-Lungen-Maschine vorgenommen (Mohara et al. 2002). Entsprechend der Vielfalt an unterschiedlichen Drücken und an unterschiedlichsten Substanzen, die zugesetzt werden können, ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten der Reperfusion.

Ischämie des Herzen ist definiert als ein Ungleichgewicht zwischen dem vom Myokard benötigten und dem vom Gefäßsystem bereitgestellten Koronarblut. Dies geht einher mit einem Gewebsdefizit an Sauerstoff und Substrat und einem ungenügenden Abtransport potentiell toxischer Metabolite (Hearse 1977). Die Ischämie wird unterteilt in eine frühe, potentiell reversible Phase, die u.a. mit Glycogenverlust, Ödembildung, und Mitochondrienschwellung aufgrund von Kalzium- und Plasmaproteineinstrom bei pathologischer Membranpermeabilität einhergeht. Des weiteren gibt es eine späte, irreversible Phase, die u.a. aber v.a. durch Schäden an den kontraktilen Filamenten gekennzeichnet ist (Engelmann et al. 1979; Hein et al. 1995; Neely und Grotyohann 1984; Reimer et al. 1981). Die durch die Ischämie verursachten Schäden werden in erster Linie auf Schädigung im Bereich der Oxidativen Phosphorylierung mit resultierendem ATP-Verlust zurückgeführt (de Wit et al. 1988; Engelmann et al. 1979; Fischer et al. 1981; Stringham et al. 1992). Das „Substrat“ Sauerstoff wird bei Ischämie in Organen zuerst erschöpft und ist gleichzeitig die Schlüsselsubstanz der Oxidativen Phosphorylierung. Das Ziel eines jeden Konservierungsverfahrens ist es demnach, die reversible Phase der Ischämie wenn nicht zu verhindern doch wenigstens so lang wie möglich aufrecht zu erhalten.

Zahlreiche Untersuchungen haben sich mit dem Effekt oxygenierter Lösungen auf den Stoffwechsel und Funktionserhalt von Herzen bei Ischämie befasst. Eine Untersuchung befasste sich mit dem Effekt von einfach mit Sauerstoff angereicherter kardioplegischer Lösung (Coetzee et al. 1986). In dieser Studie wurde für die mit oxygenierte Lösung gegenüber einer nichtoxygenierten Vergleichslösung bei dreistündiger Lagerung von Rattenherzen bei 20 °C im Hinblick auf Herzfunktion, ATP-Gehalt und ultrastrukturelle Veränderungen signifikant besser Ergebnisse erzielt. Eine weitere Arbeit kam bei einstündiger Lagerung von Hundeherzen bei 4 °C im Hinblick auf Funktionsparameter zu dem selben Ergebnis (Tabayashi et al. 1988). In beiden Arbeiten wurde auf das antiproportionale Verhältnis von Sauerstofflöslichkeit und Temperatur hingewiesen, wobei in der erstgenannten Arbeit ein nachteiliger Effekt von Temperaturen unter 15 °C auf das Herzmuskelgewebe angenommen wurde. In beiden Arbeiten wurde lediglich der Sauerstoffgehalt der Lösungen erhöht, so dass der Sauerstoff entsprechend dem jeweiligen Partialdruck über die Zellgrenzen hinweg diffundieren konnte. Der Effekt auf die Ischämiezeit der Herzen war kein vorrangiger

Gegenstand der Untersuchungen. Grundsätzlich lässt sich jedoch feststellen, dass gelöster Sauerstoff in Perfusionslösungen in der Lage ist, einen protektiven Effekt auf das Organewebe auszuüben (Silber et al. 1991).

1.3 Die Methode der Sauerstoffpersufflation

Ein vielversprechender methodischer Ansatz zur Organkonservierung mit wesentlich verlängerter Ischämietoleranz ist die Sauerstoffpersufflation. Die Möglichkeit der Persufflation von Herzen mit gasförmigem Sauerstoff zum Funktionserhalt der Organe wurde zuerst 1902 von Magnus untersucht (Magnus et al. 1902). Seit diesen Versuchen wurde die Methode der Sauerstoffpersufflation in erster Linie an Lebern und Nieren experimentell untersucht (Fischer et al. 1978; Fischer et al. 1980), desweiteren wurden jedoch auch Untersuchungen an weiteren transplantationsfähigen Organen wie Darm und Pankreas unternommen (Isselhard und Minor 1999). Experimente mit Herzen waren bisher zwar nicht die Ausnahme, stellten aber im Vergleich zu denen mit den erstgenannten Organen die Minderheit dar. Schon dieser Umstand mag ein Hinweis für spezifische Probleme bei der Transplantation von Herzen sein. Der Unterschied zur reinen Erhöhung des Sauerstoffgehaltes der Perfusionslösungen für eine hypotherme Dauerperfusion bei Anwendung der herkömmlichen Techniken besteht darin, dass der gasförmige Sauerstoff einem blutleeren Organ unter vergleichsweise niedrigem Gasdruck über sein Gefäßsystem zugeführt wird. Der Druck muss ausreichen, um Kapillaren zu eröffnen und die Diffusionsstrecken gering zu halten. Mitbestimmender Faktor ist neben dem Persufflationsdruck der mit sinkender Temperatur abnehmende O₂-Bedarf des jeweiligen Organs. Entscheidend ist die Funktion des Transplantats (Isselhard und Minor 1999). Vergleichende Untersuchungen an Rattenlebern konnten für die Sauerstoffpersufflation gegenüber der Verwendung einer einfach mit Sauerstoff angereicherten Lösung im Hinblick auf den ATP-Gehalt eine wesentlich erhöhte Wirksamkeit nachweisen (Minor et al. 1997).

Viel versprechende Versuche mit dieser Methode wurden jedoch zunächst an der Niere durchgeführt, die zu der betreffenden Zeit das meist transplantierte Organ war. Fischer et al. konnten zeigen, dass sich die Clearance von Kaninchennieren, die 24 h bei 6 °C unter Anwendung der retrograden (venösen) Sauerstoffpersufflation (ROP) mit einem Persufflationsdruck von 50-60 mmHg gelagert wurden, im Vergleich zur Lagerung ohne ROP gleich nach der Transplantation signifikant besser wurde. Zudem war der ATP-Gehalt im

Gewebe signifikant erhöht (Fischer et al. 1978). Die Verbesserung der lebenserhaltenden Funktion wurde in späteren Versuchen von Ross und Escott nachgewiesen (Ross und Escott 1979). In einer weiteren Arbeit unter Anwendung eines Druckes von 11 mmHg und einer Temperatur von 0 °C wurden die bisherigen Ergebnisse grundsätzlich bestätigt. Uneinigkeit bestand insgesamt lediglich in der Frage des ATP-Gehaltes des Gewebes, der optimalen Temperatur, des optimalen Drucks sowie der bestgeeigneten Lösung (Rolles et al. 1984). In späteren Versuchen mit erneuter Anwendung der ROP an Nieren im 24 h-Versuch bei 0 °C und einem Persufflationsdruck von 11 mmHg wurde wieder bestätigt, dass sie in der Lage ist, die ATP-Synthese in ausreichendem Maße aufrechtzuerhalten. Außerdem waren im Gegensatz zu den nicht persufflierten Nieren im elektronenmikroskopischen Vergleich lediglich reversible ultrastrukturelle Veränderungen auszumachen (Pegg et al. 1989).

Weitere Untersuchungen befassten sich mit der Anwendung der Methode an Lebern. In ersten Versuchen über 48 h wurde für die Anwendung der ROP an Rattenlebern ebenfalls ein protektiver Effekt in Bezug auf den ATP-Gehalt nachgewiesen (Fischer et al. 1980), und weitere In-Vitro-Versuche an Rattenlebern über 48 h konnten ebenfalls eine im Vergleich signifikante Zunahme des ATP-Gehaltes zeigen (Minor und Isselhard 1996). In Folgeversuchen wurde die protektive Wirkung der ROP auf ischämisches Lebergewebe auf einen antiproteolytischen Effekt aufgrund verminderter Entstehung freier Sauerstoffradikale zurückgeführt (Minor et al. 1997). In neueren Experimenten mit Rattenlebern unter Anwendung der ROP wurde erneut die protektive Wirkung in Bezug auf die ATP-Speicher festgestellt. Zusätzlich wurde jedoch die Verminderung des Gehaltes an Hypoxanthin als Substrat in der Entstehung von Sauerstoffradikalen sowie des Laktatgehaltes als wesentliche Ursache der Gewebsazidifizierung nachgewiesen. Ein neuer Ansatz in diesen Versuchen war die Bestimmung des Gehaltes an zyklischem AMP (cAMP), das in der Lage ist, eine Zellschutzfunktion in Bezug auf Kalziumakkumulation und strukturelle Integrität auszuüben. Die Konzentration dieses Moleküls war bei Anwendung der ROP mit der präischemischen Konzentration vergleichbar (Kötting und Minor 2000). Insgesamt wurden zahlreiche funktionelle und strukturelle Parameter bei der Anwendung der ROP bei der Leber untersucht, die nahezu alle zugunsten dieses Konservierungsverfahrens ausfielen (Isselhard und Minor 1999). Die erwähnten Untersuchungen wurden jeweils bei unterschiedlichen Temperaturen, Persufflationsdrücken und unter Verwendung unterschiedlicher Perfusionslösungen durchgeführt. Dennoch stellte sich die Methode Sauerstoffpersufflation durchgehend im direkten Vergleich mit allen sonstigen Methoden bei gleichen Rahmenbedingungen als überlegen heraus.

Die erfolgreiche experimentelle Anwendung der Methode der Sauerstoffpersufflation am Herzen unter Hypothermie mit erheblich verlängerter Lagerungszeit erfolgte im Vergleich zu den Untersuchungen an Niere und Leber aufgrund der oben genannten Besonderheiten des Herzens spät und wurde erst durch neue methodische Ansätze möglich, die am Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln entwickelt wurden. Erste erfolgreiche Untersuchungen mit hypothermer Langzeitlagerung über 14 h wurden mit Kaninchenherzen im Langendorff-Modell durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei 0-1 °C unter Verwendung der mit Hyaluronidase versetzten modifizierten HTK-Lösung (mHTK). Im Vergleich mit nicht oxygenierten Herzen waren nach 90 minütiger Reperfusion mit mHTK-Lösung linksventrikulärer Druck, Herzfrequenz, Kontraktilität und isotonisches Schlagvolumen der Herzen mit Anwendung der COP signifikant besser (Jeschkeit et al. 1989). Nachfolgende Versuche mit orthotoper Transplantation von Schweineherzen mit einer Überlebenszeit von 3 h wurden erstmals mit Verwendung des Valve Guards, eines Aortenklappenabgusses aus Silikongummi (vergl. 2.3), durchgeführt, der die Überdehnung des linken Ventrikels und den Druckverlustes bei der Persufflation verhinderte (vergl. 2.3). Die Anwendung der COP unter Verwendung der mHTK-Lösung bei 0-1 °C über 14 h zeigte gegenüber der herkömmlichen hypothermen Lagerung nach Flush-Perfusion mit mHTK-, UW- und der intrazellulären Euroflush-Lösung (EFG) signifikant bessere Ergebnisse hinsichtlich der erbrachten Leistung, des linksventrikulären Druckes und der Kontraktionsgeschwindigkeit. Die jeweiligen Plasmagehalte an Kreatinkinase-MB und Troponin T waren im Vergleich nach Anwendung der COP wesentlich geringer. Die Signifikanz der Unterschiede im ATP-Gehalt des Myokards und des Energy Charge Potential variierten je nach Lösung (Kuhn-Régnier et al. 1997; Fischer et al. 1998). Folgende Versuche mit HTK, modifizierter (m)HTK und mHTK + COP bei hypothermer Lagerung über 14 h im Direktvergleich erbrachten in Bezug auf die Kontraktilität, das Schlagvolumen und den ATP- und SAN-Gehalt für die mHTK + COP-Gruppe jeweils die höchsten Werte, die jeweils gegenüber denen nach einfacher Lagerung mit HTK signifikant waren. Für die Plasma-CK-Werte nach Reperfusion waren die Werte nach ein bis drei Stunden für die mHTK + COP-Gruppe insgesamt signifikant niedriger (Kuhn-Régnier et al. 2000). Auch in den Versuchen mit Herzen hat sich demnach die Methode der Sauerstoffpersufflation als gegenüber der Flush-Perfusion mit anschließender einfachen hypothermer Lagerung überlegen herausgestellt.

1.4 Ziel dieser Versuchsreihe

Unsere Versuche wurden als Fortsetzung von Versuchen mit Anwendung der COP über vierzehn Stunden und orthotoper Transplantation vorgenommen. Bei diesen ersten Versuchen hatte die Überlebenszeit der Schweine drei Stunden entsprechend der Reperfusionzeit betragen (Fischer et al. 1998; Kuhn-Régnier et al. 2000). Unsere Versuche sollten der Überprüfung und Ergänzung der Ergebnisse dieser Versuche mit einer längeren Überlebenszeit der Versuchstiere auch im Hinblick auf die klinische Relevanz der COP dienen. Dazu wurde die Methode der COP bei hypothermer Lagerung über vierzehn Stunden mit Verwendung der UW-Lösung direkt mit der derzeit in Europa üblichen Methode der einfachen hypothermen Lagerung über drei Stunden mit Verwendung der HTK-Lösung verglichen, wobei in beiden Gruppen eine Überlebenszeit von sieben Tagen veranschlagt wurde. In weiteren Versuchen wurde die COP mit Verwendung der HTK-Lösung angewendet. Die Ergebnisse dieser Versuche waren Gegenstand einer weiteren Dissertationsschrift.

Neben den schon vorher verwendeten funktionellen, biochemischen und enzymatischen Parametern wurde in unseren Versuchen ein besonderes Augenmerk auf die Integrität des Koronarendothels durch die Untersuchung der endothelvermittelten Relaxation der Koronarien eine Woche nach der Transplantation gerichtet.

Ebenfalls im Hinblick auf eine möglichst verlässliche prognostische Aussagekraft unserer Untersuchungen in Bezug auf eine mögliche klinische Anwendung der vorgestellten Methode haben wir das Schwein als Versuchstier gewählt, das durch die weitgehende Vergleichbarkeit seines Herzens mit dem des Menschen in Bezug auf die anatomischen Verhältnisse, die Größe und die Ischämietoleranz für unsere Versuche prädestiniert war.

2. Methodik

2.1 Die Gruppeneinteilung

Für die Versuche wurden insgesamt 24 Schweine mit einem Gewicht von $41,1 \pm 8,9$ kg (Mittelwert \pm Standardabweichung) verwendet, wobei es sich um Kreuzungen der „Deutschen Landrasse“ mit „Deutscher Edelfrasse“ handelte. Bei 12 Tieren wurden in Narkose die Herzen entnommen und konserviert, 12 Tiere dienten als Empfänger der Transplantate. Die Durchführung der Versuche erfolgte mit der Genehmigung der Bezirksregierung Köln (AZ: 26.203.2 K 24, 3187).

Die Tiere wurden mit Wasser und Schweinefutter (RWZ Alleinfutter für Schweine; Gen. Raiffeisen, Rhein-Main eG, Werk Neuss, Deutschland) ad libitum versorgt, wobei darauf geachtet wurde, dass sie zum Zeitpunkt der OP mindestens 12 Stunden nüchtern waren.

Die Konservierung erfolgte unter Anwendung der Methode der Sauerstoffpersufflation der Koronarien = Coronary Oxygen Persufflation (COP). Bei 6 der entnommenen Herzen erfolgte die Konservierung mit University of Wisconsin-Lösung (UW) (Viaspan®, Dupont, hergestellt von NPBI, Niederlande) für im Mittel $13,8 \pm 0,3$ Stunden bei 0 bis 1 °C, wobei die Lösung vor Gebrauch frisch mit 3 mmol/l reduziertem Glutathion versetzt wurde (vergl Tab. 2). Die übrigen 6 Spenderherzen wurden für im Mittel $2,7 \pm 0,3$ Stunden bei gleicher Temperatur ohne Anwendung der COP mit Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung (HTK) nach Bretschneider (Custodiol®; Fa. Dr. F. Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein, Deutschland) ohne weitere Zusätze konserviert. Beide Lösungen wurden filtriert (Porengröße 0,45 μ m), um die typischerweise in der UW-Lösung vorhandenen Fettsäurepartikel zu entfernen bzw. auch im Falle der HTK-Lösung eine vergleichbare Partikelfreiheit zu gewährleisten (Lösungen vergl. Tab. 2).

Konservierungslösung	Anzahl der Versuche	Konservierungsdauer
UW (Viaspan®) + COP	6	$13,8 \pm 0,3$ h
HTK (Custodiol®)	6	$2,7 \pm 0,3$ h

Tabelle 1: Einteilung der Gruppen

(Die Konservierungsdauer ist der Zeitraum vom Ende des Freispülens von Blut mit kalter Konservierungslösung bis zum Beginn der Reperfusion nach der Transplantation)

Substanz [mmol/l]	UW-Lösung	HTK-Lösung
Na ⁺	30	15
K ⁺	125	10
Ca ²⁺	-	0,015
Mg ²⁺	5	4
Cl ⁻	-	50
HCO ₃ ⁻	-	-
SO ₄ ²⁻	5	-
PO ₄ ³⁻	25	-
Glutarat	-	1
Histidin	-	198
Laktobionat	100	-
Tryptophan	-	2
Mannitol	-	30
Saccharose	-	-
Raffinose	30	-
Adenosin	5	-
Allopurinol	1	-
Glutathion, oxidiert	1,5	-
Hepes	-	-
Pentastarch	50 g/l	-

Zusätze unmittelbar vor Gebrauch	UW-Lösung
Dexamethason	16 mg/l
Glutathion, reduziert	3 mmol/l
Insulin	40 IU/l
Penicillin	2 x 10 ⁵ IU/l

Tabelle 2: Zusammensetzung der Konservierungslösungen

2.2 Die Herzentnahme

Zur Einleitung der Narkose wurden den Tieren 4 mg/kg Azaperon (Stresnil®; Fa. Janssen, Neuss, Deutschland) sowie 0,02 mg/kgKG Atropin (Atropinsulfat®; Fa. B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) intramuskulär in die laterale Nackenmuskulatur verabreicht. Nach einer Wartezeit von 30 min und bei ausreichender Sedation wurde den Tieren jeweils eine Venenverweilkanüle (Venflor 2; Fa. Ohmeda Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) in die Vena auricularis gelegt und 1-2 mg/kgKG Propofol (Disoprivan® 2 %; Fa. Zeneca, Plankstadt, Deutschland) und anschließend 5-10 mg/kgKG Ketamin (Ketavet®; Fa. Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland) intravenös verabreicht. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurden die Tiere in Rückenlage auf dem Operationstisch fixiert. Die folgenden Maßnahmen wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Nach

medianer Tracheotomie und Einführung eines Tubus (Größe 8; Fa. Protex Limited, Hythe, Kent, England) erfolgte volumenkontrollierte Beatmung mit 8-12 l/min Raumluft über ein Beatmungsgerät (Engström RS 300 LKB Medical; Fa. Bromma, Schweden), wobei der jeweilige Volumenbedarf über den expiratorischen Kohlendioxydgehalt ermittelt wurde.

Mit ventralem rechtslateralem Zugang wurde anschließend die Vena jugularis externa freigelegt und mit einem doppelumigen Katheter (Durchmesser proximal 18 GA, distal 16 GA, Certon; Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) katheterisiert. Die Narkose wurde nun mit Hilfe eines Perfusors (Perfusor®VI; Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit Ketamin in einer Erhaltungsdosis von 0,36-0,6 ml/kgKG/h fortgesetzt. Eine zusätzliche Relaxation der Muskulatur erfolgte mit Hilfe von Pancuronium (Pancuronium Curamed®; Fa. CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in einer Dosierung von 0,02 mg/kgKG i.v.. Zur Flüssigkeitssubstitution wurde Sterofundin® (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit 500 ml/h über den zentralvenösen Katheter appliziert.

Nach medianer Sternotomie mit dem Lebsche-Meißel wurde der Thymus reseziert und das Perikard Y-förmig eröffnet. Der Herzbeutel wurde durch vier Perikardhochnähte offengehalten und an der Thoraxwand fixiert, wodurch das Herz in physiologischer Position stabilisiert wurde. Vollheparinisierung wurde mit 500 I.E./kgKG Heparin (Liquemin®; Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland) über den zentralvenösen Katheter erreicht. Über eine Perforation im Herzspitzenbereich konnte ein Katheter-tip Manometer (Mikro Tip; Millar Instruments, Houston, USA) in den linken Ventrikel vorgeschoben und über einen Transducer (Control Unit Model TC-510; Fa. Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) an einen Brückenverstärker mit Differenzierer (HSE Modell 336; Fa. Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) angeschlossen werden. So konnten der linksventrikuläre Druck, die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit ($+dp/dt_{max}$) und die maximale Relaxations-geschwindigkeit ($-dp/dt_{max}$) bestimmt werden und zusammen mit der Herzfrequenz über einen Thermoschreiber (Watanabe, Mark VII) kontinuierlich aufgezeichnet werden.

2.2.1 Die Messung des Herzzeitvolumens

Nach Anschlingen der Aorta erfolgte die Messung des Herzzeitvolumens mit Hilfe eines Transit-Time Flowmeters (Type 700; Fa. Hugo Sachs Elektronik – Havard Apparatus, March,

Deutschland) (Dopplerverfahren). Hierzu wurde ein ringförmiger Ultraschallkopf entsprechender Größe um die Aorta gelegt. Die Durchflusswerte wurden in l/min angezeigt. Zur Kontrolle wurde in einigen Versuchen der Kontrollgruppe zusätzlich eine HZV-Messung über die Thermodilution durchgeführt. Hierzu wurde ein Injektionskatheter in den linken Vorhof vorgeschoben (LA-Katheter; Fa. Vygon, Steriflex, Durchmesser außen 2,4 mm, multiple apikale Perforationen zur Flüssigkeitsvernebelung) und ein Thermistor-Katheter (Swan Ganz 7F) über die Herzspitze in der pars ascendens der Aorta positioniert. Es wurden nun 5 ml 0 bis 1 °C kalte Ringer-Lösung (Ringer-Lösung; Fa. Delta-Pharma, Pfullingen, Deutschland) über den LA-Katheter eingespritzt und die Temperaturabnahme über den Thermistor-Katheter registriert. Die Berechnung des HZV aus der Temperaturdifferenz erfolgte mit einem HZV-Computer (IVC3, F. Schwarzer GmbH, München, Deutschland), die Ergebnisse wurden in l/min angezeigt. Es wurden mehrere Injektionen durchgeführt bis drei aufeinanderfolgende Messungen weniger als 10 % Abweichung voneinander zeigten, aus denen der entsprechende Mittelwert gebildet wurde.

2.2.2 Die Perfusion mit Konservierungslösung

Zur Vorbereitung der Herzentnahme wurde nun eine Kardioplegiekanüle (R 505 15 Stöckert; Fa. Stöckert, München, Deutschland) in die Aorta ascendens eingestochen, neben der eine Kanüle (Microlance 3, 21 G 1¹/₂; Fa. Becton Dickinson, Fraga, Spanien) placiert wurde. Diese war zur kontinuierlichen Messung des Kardioplegiedruckes über eine Heidelberger Verlängerung an einen Statham-Druckaufnehmer angeschlossen. In Kopftieflage wurde nun arterielles Blut zügig über die Kardioplegiekanüle entnommen. Das Blut wurde als Transfusionsreserve für das Empfängertier in einem Reservoir aufgefangen. Sobald der Systemdruck auf 30 mmHg abfiel, wurden Vena azygos sinistra, die beim Schwein in den Sinus coronarius mündet (vergl. 4.1), Vena cava inferior und superior und die Aorta in der Reihenfolge abgeklemmt. Die Konservierungslösung wurde über die Kardioplegiekanüle im Aortenbulbus zugeführt. Gemäß den Anwendungsrichtlinien wurde mit der HTK-Lösung die erste Minute mit einem Druck von 75 mmHg und die restliche Zeit von bis zu neun Minuten mit 40 mmHg perfundiert, wobei insgesamt 3 l der Lösung verbraucht wurden. Von der UW-Lösung wurde 1 Liter eingesetzt, die Perfusion erfolgte über maximal 5 min mit einem konstanten Druck von 75 mmHg. Die Temperatur der Lösungen betrug 0 bis 1 °C, wobei die Abkühlung der Herzen von aussen durch Übergießen mit 0 bis 1°C kalter physiologischer

Kochsalzlösung (Fa. Delta-Pharma GmbH; Pfullingen, Deutschland) beschleunigt wurde. Die Venae cavae und das linke Herzohr wurden zu Beginn der Perfusion inzidiert, um einer Überdehnung des Ventrikels entgegenzuwirken. Nach Herzstillstand und Perfusionsende wurde das Herz inklusive Perikardbeutel exzidiert. Die Vena cava inferior, Pulmonalvenen, Vena azygos, die Pulmonalarterie, Vena cava superior und schließlich die Aorta samt supraaortaler Äste wurden durchtrennt und das Herz aus dem Thorax entnommen. Das Herz wurde nun in der jeweiligen Kardioplegielösung bei 0 bis 1° C gelagert und für das weitere Vorgehen präpariert.

2.3 Die Herzlagerung

Zunächst soll das Vorgehen in der UW-Versuchsgruppe beschrieben werden.

Nach Trennung vom Perikardbeutel und Denudierung der Aorta wurde diese im Bereich der pars ascendens ca. 2 Querfinger über der Aortenklappenbasis zu ungefähr 80 % zirkulär inzidiert. Es folgte die Implantation des „Valve Guards“. Bei diesem handelte es sich um einen Aortenklappenabguss aus Silikongummi, der von Prof. Fischer in verschiedenen Größen entsprechend der Größenverhältnisse der jeweiligen Aortenklappe selbst hergestellt worden war. Die Aufgabe des Klappenabgusses war, die möglichst alleinige Persufflation der Koronararterien ohne Gasverlust über Aortenklappe und den linken Ventrikel zu gewährleisten. Er wurde über eine Naht durch die Noduli Arantii auf der aortalen Klappenseite befestigt (8-0 Prolene, Ethicon; Fa. Johnson & Jonsohn Intl., Brüssel, Belgien). Als nächster Schritt wurde ein Teflonzylinder mit zentraler Bohrung in den proximalen Aortenstumpf eingebunden und mit einer Ligatur befestigt. Während der gesamten Lagerungszeit bis zum Zeitpunkt der Implantation wurde über den Zylinder Sauerstoff (Sauerstoff; Fa. Linde AG, TC Höllriegelskreuth, Deutschland) unter einem Druck von 45 mmHg in die Aorta und somit in die Koronararterien eingeleitet. Das Lagerungsgefäß enthielt 200 ml der UW-Kardioplegielösung und befand sich auf einem Eis-Wasser-Gemisch bei 0 bis 1 °C im Kühlschrank. Das Gas konnte über eine Inzision im rechten Vorhof ausströmen und wurde aus dem Lagerungsgefäß über einen Katheter gegen einen Widerstand von 5 cm Wassersäule abgeleitet, so dass eine Abschätzung der Gasmenge und somit der Dichtigkeit des Systems über die Intensität der Blasenbildung möglich war. Der Gasdruck wurde während der Persufflation über einen Kompensationsschreiber (Fa. Kipp & Zonen, Kronberg, Deutschland) aufgezeichnet.

Die Herzen der HTK-Gruppe wurden entsprechend der derzeitigen klinischen Praxis einfach ohne Anwendung der COP für drei Stunden bei 0-1 °C auf einem Eis-Wasser-Gemisch gelagert.

2.4 Die Vorbereitung der Herzimplantation

2.4.1 Die Vorbereitung des Empfängertieres

Als Empfängertier wurde ein Wurfgeschwistertier mit möglichst gleichem Geschlecht (zwei Ausnahmen in der HTK-Kontrollgruppe), ähnlichem Gewicht sowie ähnlicher Größe ausgewählt.

Um einen Abfall der Körpertemperatur in der Narkose zu vermeiden, wurden die Tiere auf einer Wärmematte gelagert. Prämedikation, Narkose, Beatmung und zentralvenöse Katheterisierung erfolgten wie oben beschrieben (vergl 2.2). Die Maßnahmen wurden auch hier unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Zusätzlich wurde eine zentralarterielle Katheterisierung der Arteria carotis communis dextra mit einem doppellumigen Katheter (Durchmesser proximal 18 GA, distal 16 GA, Certon; Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) vorgenommen, der wie schon bei dem zentralvenösen Katheter beschrieben (vergl. Abschnitt 2.2) über einen Statham-Druckaufnehmer mit einem Brückenamplifier verbunden war. Es wurden so der zentralvenöse Druck (ZVD), der zentralarterielle Druck (ZAD) und die Herzfrequenz (HF) kontinuierlich über den Thermo-Oszillographen Recorder aufgezeichnet.

Sofort und in 30-minütigen Abständen wurde sowohl aus dem arteriellen als auch aus dem venösen Katheter Blut entnommen, um Elektrolyte, Blutgase, kardiales Troponin T (Enzymun-Test; Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland) und Kreatinkinaseaktivität (Monotest CK NAC; Fa. Boehringer Mannheim, Deutschland) bestimmen zu können. Elektrolytwerte (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}), Laktat- und Glukosegehalt des Blutes wurden über ein entsprechendes Analysegerät (EML 105, Elektrolyte Metabolite Laboratory; Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) ermittelt, Abweichungen von physiologischen Parametern wurden gegebenenfalls durch Substitution der Substanzen korrigiert. Der pH-Wert, jeweiliger Basenüberschuss, Standardbasenüberschuss, Bicarbonat-Konzentration sowie der Standard-Bicarbonatgehalt des Blutes wurden mit einem weiteren Analysegerät (ABL 300, Acid Base Laboratory; Fa. Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) bestimmt. Bei metabolischer Azidose wurde mit 8,4 %iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (Fa. Delta-Pharma GmbH,

Pfullingen, Deutschland) gepuffert. Mit dem ABL 300 wurden außerdem Sauerstoffpartialdruck, Kohlendioxidpartialdruck, Sauerstoffsättigung, Gesamtkohlendioxid-Konzentration sowie Hämoglobingehalt des Blutes ermittelt.

Zur Muskelrelaxation wurden 0,2 mg/kgKG Pancuronium verabreicht, zur Verhinderung von Immunsuppression gegen Transplantat bzw. Fremdblut wurden perioperativ 500 mg Prednisolon i.v. (Urbason solubile®; Fa. Hoechst, Frankfurt, Deutschland) appliziert.

Nach medianer Laparotomie und schonender Abpräparation des Peritoneums nach links erfolgte die Darstellung von rechten Nierengefäßen, Nieren und Ureter.

2.4.2 Die Vorbereitung des Spenderherzens

Die Präparation des Spenderherzens erfolgte in der jeweiligen kalten Kardioplegielösung bei 0 bis 1° C. Linker Vorhof, Vena azygos sinistra und Vena cava inferior wurden in fortlaufender Naht zusammen verschlossen (4-0 Prolene, Ethicon; Fa. Johnson & Johnson Intl., Brüssel, Belgien). Anschließend wurden Vena cava superior, linkes Herzohr und Arteria pulmonalis mit Tabaksbeutelnähten sowie diese mit Drosseln versehen (4-0 BB Prolene, Ethicon). Mit der Entfernung von Ligatur, Teflonzylinder und „Valve Guard“ wurde die Persufflation beendet. Es folgte der Verschluss der Aortenklappe mittels einer Naht durch die Noduli Arantii (8-0 Prolene, Ethicon) sowie der Verschluss der queren Aortotomie in fortlaufender Naht (4-0 Prolene, Ethicon). Nachdem im Bereich beider großer supraaortalen Äste Tabaksbeutelnähte angebracht worden waren (4-0 BB Prolene, Ethicon), wurden die Thymusgefäße als mögliche Blutungsquelle umstochen.

2.5 Die Herzimplantation

Die abdominellen Organe wurden mittels feuchter Bauchtücher nach links verdrängt und der rechte Ureter ligiert und durchtrennt. Es erfolgte Heparin-gabe in oben erwähnter Dosierung. Nach Abklemmung von Arteria und Vena renalis wurden die Gefäße vor der Aufzweigung des Hauptstammes durchtrennt und die Niere verworfen. Nach Einlage eines kaltperfundierten „Cooling-Jackets“ (topical cooling device TCD™; Fa. Cobe Cardiovascular Laboratories, Inc., Arvada, Co, USA) erfolgte die Anpassung des Herzens ins Nierenlager, so dass die Aorta dorsal und die Arteria pulmonalis ventral zu liegen kam. Es folgte zentrale Perforation im

Bereich der Aorta ascendens des Transplantates (Durchmesser ca. 2 mm) sowie End-zu-Seit Anastomose mit der Arteria renalis in fortlaufender Naht (7-0 Prolene, Ethicon) (vergl. Abb. 1). Nach Inzision der Arteria pulmonalis in Pulmonalklappenhöhe (Durchmesser ca. 5 mm) wurde die dahinterliegende Semilunarklappe reseziert, um einen besseren Abfluss zu ermöglichen. Es folgte End-zu-Seit-Anastomose mit der Vena renalis (7-0 Prolene, Ethicon) (vergl. Abb. 1). Schließlich wurde das Cooling-Jacket entfernt. Das Herz wurde zur Sicherung der Position im Nierenlager mit dem zunächst resezierten Perikardbeutel abgedeckt, der mit einigen Nähten an der Bauchwand fixiert wurde.

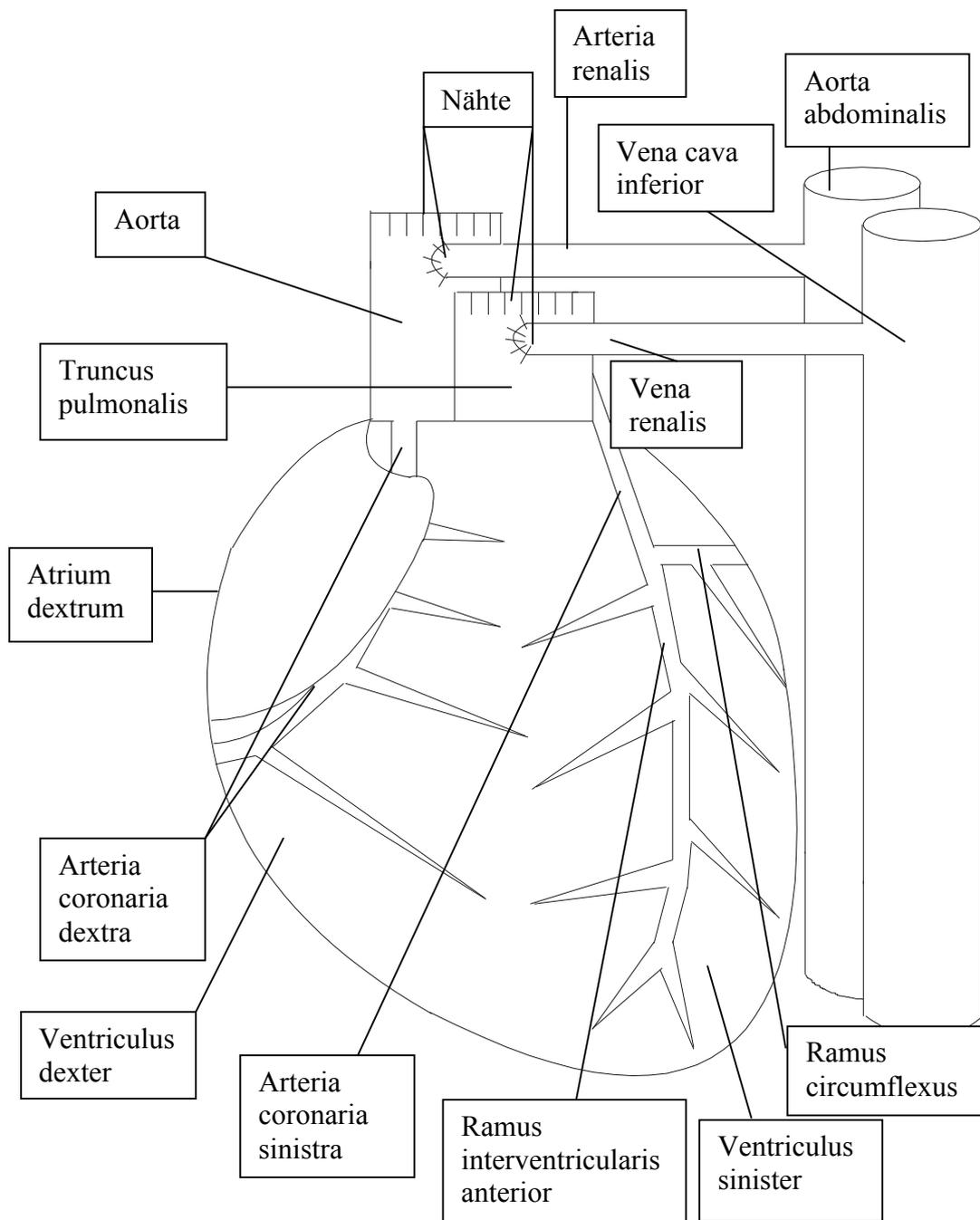


Abb. 1: Anastomosierung der großen Herzarterien mit den Nierengefäßen

2.6 Die Reperfusion

2.6.1 Die initiale Reperfusion

Zur initialen Reperfusion über zehn Minuten wurde modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung (mKH; vergl. Tab. 3) verwendet. Die Perfusion erfolgte über eine in die Arteria carotis communis eingebundene Kardioplegiekanüle (Durchmesser 6,5 mm; Fa. Stöckert, München, Deutschland). Druckkontrolle wurde über eine in den aufsteigenden Ast der Aorta eingestochene Kanüle (Microlance 3, 21 G 1¹/₂; Fa. Becton Dickinson, Fraga, Spanien) vorgenommen, die über eine Heidelberger Verlängerung mit einem Statham-Druckaufnehmer in Verbindung stand, so dass der Druck kontinuierlich über den Thermo-Rekorder aufgezeichnet werden konnte.

Die mKH-Lösung wurde auf 37 °C erwärmt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde oxygeniert (Carbogen; 95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid; Fa. Linde AG, TC, Höllriegelskreuth, Deutschland), so dass der Sauerstoffpartialdruck 600 mmHg erreichte. In der ersten Minute erfolgte die Reperfusion mit einem initialen Druck von 70 mmHg, der ab der zweiten Minute auf 40 mmHg gesenkt wurde. Für die letzten fünf Minuten wurden der mKH-Lösung initial 3 ml/l CaCl₂-Lösung entsprechend einer Konzentration von 0,33 mmol/l zugesetzt, in einminütigen Abständen wurde weiterhin Calciumchlorid bis zu dem Zielwert von 0,8 mmol/l zugegeben. Zusätzlich wurde mit der Infusion von Adenosin (Adenosine®, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in Mischung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung in einer Dosierung von 0,75 mmol/h über insgesamt eine Stunde mittels Perfusor in den Aortenstamm begonnen.

Auftretendes Kammerflimmern während der initialen Reperfusion wurde mit 100 bis 200 mg 2 %igem Lidocainhydrochlorid (Xylocain® 2 %; Fa. Astra GmbH, Wedel, Deutschland) entsprechend 5 bis 6 ml der Lösung i.v. therapiert. Diese Möglichkeit bestand während der Reperfusion nicht mehr, da das abgesaugte Blut als Transfusionsreserve aufgefangen wurde, so dass dann defibrilliert werden musste (Lifepak 5 Defibrillator; Fa. Physio Control Corporation, Washington, USA). Eventuell schon während der initialen Reperfusion vorhandener Eigenrhythmus des Transplantates wurde bis zur Stabilisierung mit einem externen Schrittmachersystem (ERAB SDH Schrittmacher; Fa. Biotronic, Berlin, Deutschland) unterstützt, dessen Elektroden auf den Ventrikeln positioniert wurden, um eine Frequenz von 80 Schlägen pro Minute zu erreichen.

Substanz [mmol/l]	mKH-Lösung
Na ⁺	143,100
K ⁺	5,900
Ca ²⁺	0,800
Mg ²⁺	1,300
Cl	127,800
HCO ₃ ⁻	10,100
H ₂ PO ₄ ⁻	1,200
SO ₄ ²⁻	1,300
Glucose	11,100
Adenosin	0,015
Harnsäure	1,000
Insulin	1,000 I.E./l

Tab. 3: Zusammensetzung der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung (mKH-Lösung) zur initialen Reperfusion; Kalzium-Gehalt bei Beginn der Reperfusion 0,05 mmol/l

2.6.2 Die Blutreperfusion

Nach dem Verschluss der angebrachten Tabaksbeutelnähte über die entsprechenden Tourniquets wurde zunächst die venöse und anschließend die arterielle Klemme an den Nierengefäßen entfernt und somit die Blutreperfusion begonnen. Nach initialer Blutstillung mit filzunterlegten Nähten wurde für die nächsten 1 bis 1½ Stunden unter Beobachtung von Herzfunktion, Aspekt des Transplantates und Blutverluß die Blutreperfusion bei offener Bauchdecke vorgenommen. Größerem Blutverluß aus den Anastomosen und evtl. zunächst insuffizienten Nähten am Herzen wurde mit Retransfusion von abgesaugtem Eigenblut begegnet. Der Heparinantagonist Protamin (Protamin 1000/-5000 „Roche“®; Fa. Hoffmann-La Roche AG, Grenzach Whylen, Deutschland) wurde im Verhältnis 1:1 zur entsprechenden vorherigen Heparin-gabe intravenös verabreicht. Dies geschah unter Kontrolle der Activated Clotting Time (ACT), um eine mögliche Hyperkoagulabilität zu vermeiden bzw. rechtzeitig für Gegenmaßnahmen zu erkennen. Flüssigkeitssubstitution erfolgte zusätzlich mit Sterofundin®-Lösung sowie 5 %iger Glukose-Lösung (Glucose-Lösung 5 Prozent; Fa. Delta Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland). Temperaturkontrolle wurde über eine Thermosonde (elektrisches Thermometer) rektal vorgenommen. Kontrolle von Elektrolyt- und Blutgaswerten sowie des Hämoglobingehaltes des Blutes (Hb-Wert) erfolgten weiterhin wie oben beschrieben (vergl. 2.4.1). Sobald ausreichende Herzfunktion und Blutstillung

sichergestellt waren, wurde mit dem Wundverschluss begonnen. Nach Einlegen eines mit zahlreichen Perforationen versehenen Drainageschlauches (Absaugkatheter Ch 14, 50 cm; Fa. Dahlhausen, Deutschland) in das Nierenlager und Faszien- (3-0 Sotopak Vicryl, Ethicon) sowie Hautnaht (2-0 Resolon, Fa. Resorba, Nürnberg) des Bauchschnittes erfolgte die Umkanülierung der Vena jugularis externa. Der Katheter wurde über einen subkutan geschaffenen Kanal in den Nackenbereich ausgeleitet und dort mittels Naht fixiert. Nach anschließender Hautnaht wurde steril verbunden.

2.7 Die postoperative Versorgung

Nach Beendigung der Narkose wurden die Tiere bis zum Erreichen ausreichender Spontanatmung und von Sauerstoffsättigungs-(SpO₂)-Werten des Blutes über 90 % in Seitenlage weiterbeatmet. Die ständigen Kontrollen von SpO₂ mit Messung am Ohr oder an einer Leistenfalte erfolgten über ein Pulsoxymeter (NPB-40; Fa. Nellcor Puritan Bennett Inc., Pleasanton, USA). Weitere kontrollierte Werte waren Pulsfrequenz, Temperatur, Blutgas-, Elektrolyt- und Hämatokritwert sowie der Hb-Werte. Während der gesamten Zeit wurden kristalloide Infusionslösungen wie Sterofundin®-Lösung und Ringer-Lösung und 5 %ige Glukose-Lösung mit ca. 500 ml/h i.v. verabreicht. Um das Exzitationsstadium beim Erwachen abzumildern, wurden bei der ersten Aufwachreaktion 500 ml Sterofundin®-Lösung in Mischung mit 2 ml Stresnil® langsam i.v. gegeben. Bei Erreichen zufriedenstellender Blutgas- und Elektrolytwerte, gut palpablem Transplantat sowie ausreichender Spontanatmung wurden die Tiere in eine isolierte mit Stroh ausgekleidete Box (Maße 1 m x 2 m) gebracht. In der Nacht nach der Transplantation wurden mindestens halbstündige Kontrollen der oben genannten Werte sowie der Transplantatfunktion, von Miktion und Defäkation vorgenommen. In sechs- bis achtstündigen Abständen wurden jeweils 0,5 ml Buprenorphin (Temgesic®; Fa. Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) entsprechend 0,15 mg zur Analgesie gegeben, zusätzlich kam in ähnlichen Abständen Metamizol (Novalgin® 2,5g-Injektionslösung; Fa. Hoechst Marion Roussel, Frankfurt am Main, Deutschland) mit 5 ml entsprechend 2,5 g langsam i.v. zur Anwendung. Bis zum Einsetzen der Miktion wurden in halb- bis einstündigen Abständen 20 bis 40 mg Furosemid (Lasix® 20-Injektionslösung; Fa. Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) i.v. verabreicht. Bei Hypokalzämie (Normwert beim Schwein 0,8 mmol/l)

wurde Kalzium (Calcium-Sandoz® 10 %; Fa. Novartis Consumer Health GmbH, München, Deutschland) bis zur Normalisierung der entsprechenden Plasmawerte langsam i.v. gegeben. Beim Absinken des Hb-Wertes unter 7 mg/dl wurde das in der Entnahmeoperation gewonnene Blut nach Filtrierung (Porengröße 40 µm, Pall Transfusion Filter Set; Fa. Pall, New Quay, Cornwall, UK) langsam über eine 50 ml-Spritze (Original-Perfusor®-Spritze OPS 50 ml Luer Lock; Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) transfundiert. Um ca. 20 Uhr des Operationstages wurden 250 mg Prednisolon (Urbason® solubile forte 1000; Fa. Hoechst Marion Roussel GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) zur Immunsuppression sowie 500 mg Ampicillin (Binotal® 1,0 g; Fa. Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) zur antibiotischen Prophylaxe gegeben.

Die nächtliche Überwachung erfolgte bis die selbstständig Tiere standen, fraßen, tranken, miktionierten, defäkierten und stabile Werte aufwiesen, was in der Regel zwischen 4 und 8 Uhr des ersten postoperativen Tages gegeben war. Ab dem ersten postoperativen Tag wurde jeweils um 8 Uhr eine Blutprobe von 5 ml zur Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität entnommen, das Serum abzentrifugiert und eingefroren. Vom ersten bis zum dritten postoperativen Tag wurden jeweils um 8 Uhr und 20 Uhr 250 mg Prednisolon und 500 mg Ampicillin verabreicht und es erfolgte jeweils Kontrolle der genannten Blutwerte. Ab dem vierten Tag wurde die Prednisolondosis auf 125 mg, ab dem sechsten Tag auf 70 mg gesenkt. Am siebten Tag post OP erfolgte keine weitere Antibiotikagabe (vergl. Tab. 4).

Tag	Medikament	8.00 Uhr	20.00 Uhr
OP-Tag	Prednisolon	500 mg (intraop.)	250 mg
	Ampicillin	1000 mg (intraop.)	500 mg
1. Post-OP-Tag	Prednisolon	250 mg	250 mg
	Ampicillin	500 mg	500 mg
2. Post-OP-Tag	Prednisolon	250 mg	250 mg
	Ampicillin	500 mg	500 mg
3. Post-OP-Tag	Prednisolon	250 mg	250 mg
	Ampicillin	500 mg	500 mg
4. Post-Op-Tag	Prednisolon	125 mg	125 mg
	Ampicillin	500 mg	500 mg
5. Post-OP-Tag	Prednisolon	125 mg	125 mg
	Ampicillin	500 mg	500 mg
6. Post-OP-Tag	Prednisolon	70 mg	70 mg
	Ampicillin	500 mg	500 mg
7. Post-OP-Tag	Prednisolon	70 mg	-
	Ampicillin	-	-

Tab. 4: Postoperative Medikation

2.8 Die Entnahme des Herzens am siebten postoperativen Tag

Narkose, Lagerung und Tracheotomie erfolgten wie bereits beschrieben, alle Maßnahmen wurden unter unsterilen Bedingungen vorgenommen (vergl. 2.2).

Nach medianer Laparotomie entlang der bestehenden Naht wurde zusätzlich ein rechtsseitiger Flankenschnitt unterhalb der zwölften Rippe bis zum Nierenlager vorgenommen. Nach Verdrängen der abdominalen Organe nach links erfolgte stumpfes Freipräparieren des Transplantates. Über die schon bestehende Perforation an der Herzspitze wurde ein selbst angefertigter Ballonkatheter, bestehend aus einem handelsüblichen Gummiluftballon und einem ca. 15 cm langen Kunststoffschlauch, in den linken Ventrikel eingeführt und an einen Brückenverstärker mit Differentiator (HSE Modell 336; Fa. Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) angeschlossen. Nach Vorfüllung des Ballons mit Aqua destillata bis zum Erreichen eines Vordruckes von 10 mmHg konnten der linksventrikuläre Druck (LVP), die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit ($+dp/dt_{max}$), die maximale Relaxationsgeschwindigkeit ($-dp/dt_{max}$) und die Herzfrequenz kontinuierlich über Thermoschreiber aufgezeichnet werden. Nach Auffüllung des Nierenlagers mit angewärmter 0,9 %iger NaCl-Lösung erfolgte die Messung des Blutflusses nach dem bereits beschriebenen Ultraschallverfahren soweit möglich an beiden Anastomosen.

Es folgte die Probenentnahme für die Stoffwechseluntersuchungen. Dafür wurden am noch schlagenden Herzen transmurale Proben (Größe 1 cm^2) von der Herzspitze im Bereich des linken Ventrikels, von der Herzbasis im gleichen Bereich, vom rechten Ventrikel und linken Vorhof in entsprechender Reihenfolge mit dem Skalpell herausgeschnitten. Sofort nach Entnahme wurden die Proben zwischen den Backen einer bei -196 °C in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Metallzange komprimiert und in flüssigen Stickstoff eingetaucht (Wollenberger Technik, Wollenberger et al. 1960). Anschließend wurde die rechte Koronararterie mit KH-Lösung (siehe Tab. 5) freigespült.

Für zusätzliche elektronenmikroskopische Untersuchungen der unterschiedlichen Herzgewebe wurden transmurale Proben aus rechtem Ventrikel und rechtem Vorhof, dem Bereich des Ramus interventricularis anterior, linkem Ventrikel und den Papillarmuskeln entnommen, in 1 mm^3 große Stücke geschnitten und anschließend in Formalin fixiert.

Anschließend wurde das eigene Herz des Empfängers nach Sternotomie mit dem Lebsche-Meißel als Kontrollherz für die Funktionsmessung der Koronararterien entnommen.

Substanz [mmol/l]	KH-Lösung
Na ⁺	143,10
K ⁺	5,90
Ca ²⁺	1,60
Mg ²⁺	1,20
Cl ⁻	126,00
HCO ₃ ⁻	25,00
H ₂ PO ₄ ⁻	1,20
SO ₄ ²⁻	1,20
Glukose	5,10

Tab. 5: Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung (KH-Lösung) als Inkubationslösung für die Koronararterien

2.9 Die Funktionsmessung der Koronararterien

Die jeweils rechte Koronararterie wurde auf einer Strecke von 6 bis 8 cm freipräpariert, von umgebenden Bindegewebe befreit und in 0,5 cm lange Ringe aufgeteilt, wobei das Endothel sorgfältig geschont wurde.

Mittels der unten beschriebenen Messeinrichtung erfolgte schließlich die Funktionsmessung der Koronararterien (vergl. Abb. 2). Als Funktionsparameter wurden die durch pharmakologische Substanzen hervorgerufene Kontraktion und Relaxation zueinander in Beziehung gesetzt. Mit einem balkenförmigen Wegaufnehmer (Lever Transducer B 40 Type 373; Fa. Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) wurden die durch isotonische Kontraktion oder Relaxation hervorgerufenen Veränderungen des Gefäßdurchmessers über einen Verstärker (Transducer-Amplifier Module Type 705/1; Fa. Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) durch einen Kompensationsschreiber (Multi-Pen-Recorder; Fa. Rikadenki Kogyo Co. Tokyo, Japan) kontinuierlich aufgezeichnet (vergl. Abb.2). Zunächst wurden die Gefäßringe jeweils zwischen zwei triangulären Gefäßringhaltern aus 0,3 mm dickem Stahldraht unter einer Belastung von 2 g eingehängt und in ein doppelwandiges mit 37 °C warmem Wasser durchströmtes Begasungsgefäß eingetaucht, das mit 10 ml 37 °C warmer Krebs-Henseleit-Lösung (KH-Lösung; vergl. Tab. 6) gefüllt war, die kontinuierlich mit Carbogen begast wurde.

Grundsätzlich wurden vier Versuchsdurchgänge mit unterschiedlichen Substanzen durchgeführt, zwischen denen mehrmals mit 37 °C warmer KH-Lösung ausgewaschen wurde, um einen stabilen Gleichgewichtszustand (steady state) als Basisgröße zu erreichen (vergl.

Abb.3). Jeweils zwei Transplantatringe wurden zwei Kontrollringen aus dem Empfängereigenherz gegenübergestellt. Die angegebenen Konzentrationen der Substanzen beziehen sich auf die Endkonzentration im Organbad, das jeweils mit 10 ml oxygenierter und 37 °C warmer KH-Lösung gefüllt war, deren pH-Wert sowie O₂- und CO₂-Partialdruck in physiologischen Grenzen gehalten wurden.

Zunächst wurde im ersten Versuchsdurchgang maximale Gefäßkontraktion durch Zugabe von Kaliumchloridlösung (60 mmol/l) erreicht. Im zweiten und in allen übrigen Durchgängen wurde der Cyklooxygenaseweg durch Zugabe von 10 µmol/l Indomethacin gehemmt. Maximale Gefäßkontraktion wurde durch Prostaglandin PGF_{2α} (10 µmol/l; Dinolytic®, Fa. Pharmacia & Upjohn GmbH, Steinheim, Deutschland) angestrebt. Endothelabhängige Dilatation über die physiologische Stickstoffmonoxidsynthese wurde nach Zugabe von Substanz P-Lösung (10 nmol/l, SP; Fa. Fluka Chemie GmbH, Neu-Ulm, Deutschland) angestrebt. Alle angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration im Organbad.

Bei jeweils zwei Versuchen der UW-Gruppe und der HTK-Kontrollgruppe wurde in einem dritten Durchgang die endothelunabhängige induzierte Stickstoffmonoxid-Synthese durch Zugabe von L-NIL (10 µmol/l, L-N6-[-1-Iminoethyl]lysin; Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) blockiert. Anschließend wurden PGF_{2α} und Substanz P in erwähnter Dosierung hinzugegeben.

Im vierten Durchgang wurde zur Blockade jeglicher Stickstoffmonoxid-Synthese L-NNA (300µmol/l, N-Nitro-L-Arginin; Fa. Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) hinzugegeben. Nach einer Wartezeit von mindestens 30 min wurden PGF_{2α} und Substanz P wie oben beschrieben hinzugefügt. Als letzter Schritt wurde das Zellgift Papaverin (200 nmol/l; Fa. Knoll, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland) zum Erreichen maximaler Relaxation entsprechend dem Ausgangswert hinzugegeben (vergl. Abb. 3).

In Vorversuchen zur Ermittlung der transplantationsunabhängigen Koronarfunktion waren Gefäßringe der rechten Koronararterie aus Schlachthofherzen in einer Vergleichsgruppe getestet worden. Die Arterien wurden mit oxygenierter mKH-Lösung freigespült, präpariert und in KH-Lösung in das Institut für Experimentelle Medizin der Universität zu Köln transportiert.

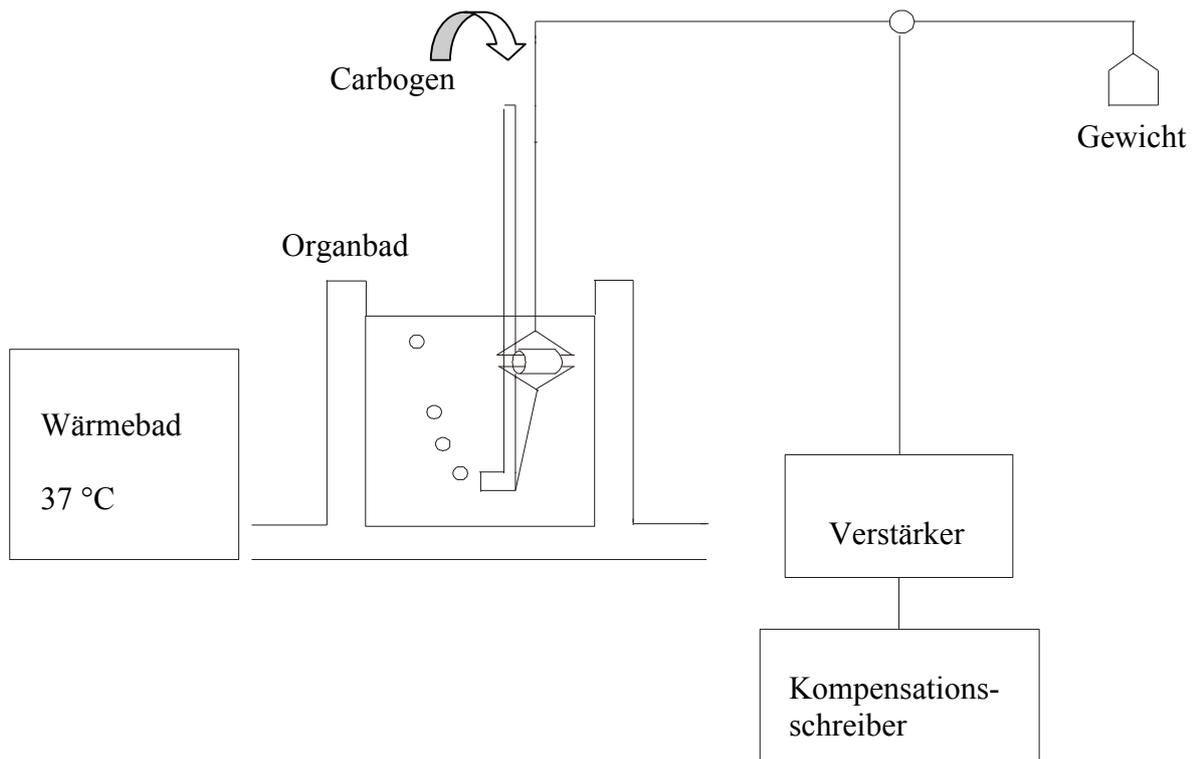


Abb. 2: Apparateanordnung zur Messung der Koronarfunktion

Substanz	Lösungen	Menge [μ l] für 10 ml KH
KCl	2,4 mol/l Kaliumchloridlösung	250
Indometh.	35,8 mg Indomethacin gelöst in 10 ml 96 % Ethanol	10
L-NNA	22 mg N-Nitro-L-Arginin mit 1 Tropfen HCL gelöst und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt	60
PGF _{2α}	Dinolytic® (1 ml enthält 5 mg PGF _{2α})	10
Papaverin	Papaverin® (1 ml enthält 40 mg Papaverinsulfat)	20
Subst. P	10 μ mol/l Substanz P	10

Tab. 6: Substanzen zur Überprüfung der Funktion der Koronararterien

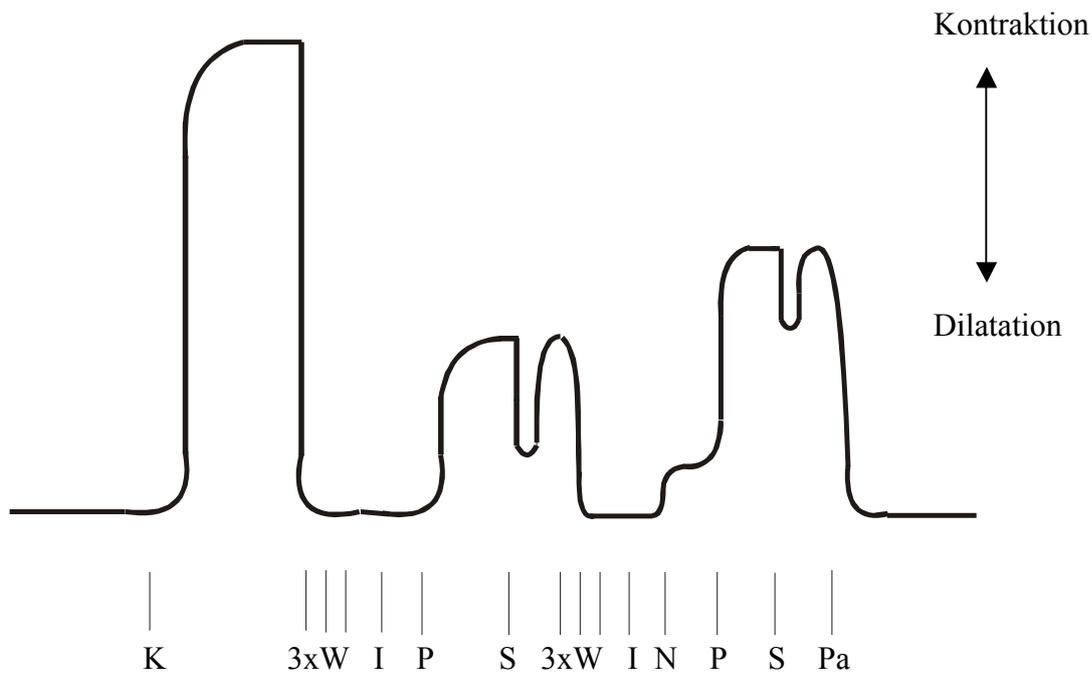


Abb. 3: Beispielhafter Verlauf einer Koronarfunktionstestung

Abkürzungen für Substanzen und Vorgänge: K: Kaliumchlorid; W: Waschen;

I: Indomethacin; P: PGF_{2α}; S: Substanz P; N: L-NNA; Pa: Papaverin

2.10 Die Probenaufbereitung

Die eingefrorenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff gekühlt, von Blut und sonstigen Anhaftungen gereinigt und schließlich im gefrorenen Zustand gewogen. Nach Gefriertrocknung über fünf bis sechs Tage bei -40 °C (Gefriertrocknungsanlage WKF L2; Fa. Brandau, Odenwald, Deutschland) wurde durch erneutes Wiegen das Feuchtgewicht bestimmt. Der Restwasseranteil nach Gefriertrocknung konnte durch Nachtrocknung separater Proben im Trockenschrank bei 110 °C bis zur Gewichtskonstanz ermittelt werden. Die Berechnung des Trockengehalts des Myokards nach Korrektur um den Restwasseranteil erfolgte durch die Formel $\text{Trockengewicht} / \text{Feuchtgewicht} \times 100$.

Bei einer Temperatur von 0 bis 4 °C wurden die gefriergetrockneten Proben in 10facher Menge des eingewogenen Materials nach Zusatz von $1/3$ molarer Perchlorsäure (HClO_4) mit einem Ultra-Turrax-Gewebe-Homogenisator (Fa. Janke u. Kunkel, Staufen/Breisgau, Deutschland) homogenisiert. Nach einer Extraktionszeit von 20 min wurden für die

Glycogenbestimmung (Isselhard und Merguet 1962) von jedem Homogenat 0,5 ml abpipettiert. Der Rest des Homogenats wurde bei einer Temperatur von ca. 2 °C bei 15000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit 2M Kaliumhydroxid-Lösung neutralisiert, um Kaliumperchlorat auszufällen. Dieses konnte nach erneutem Einfrieren und anschließendem Auftauen abzentrifugiert werden (10 min bei 15000 U/min). Bis zur biochemischen Analyse wurden die Proben bei -30 °C eingefroren.

Zur Glycogenbestimmung wurden die Proben mit jeweils 1,5 ml 28,5 %igem Natriumhydroxid versetzt und für 20 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert, um andere organische Substanzen zu zerstören. Es wurden nun jeweils 2,2 ml 96 %iges Ethanol zugegeben und die Proben anschließend bei ca. 60 °C für 20 min im Wasserbad inkubiert. Das Glycogen wurde anschließend bei Raumtemperatur in den nächsten 12 bis 24 Stunden ausgefällt. Im Folgenden wurden die Proben für 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest verworfen. Es wurde nun erneut mit jeweils 5 ml 96 %igem Ethanol gewaschen und für 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert, um den Überstand anschließend vollständig zu entfernen. Das getrocknete Sediment wurde jeweils mit 3 ml 1 M Salzsäure versetzt. Die Proben wurden anschließend für 2 Stunden im Wasserbad gekocht, um das Glycogen in Glucose aufzuspalten. Nach Abkühlung der Proben erfolgte Neutralisation der Proben mit jeweils 1,1 ml 2 molarer Natronlauge und Natriumbicarbonat. Anschließend wurden die Proben mit Aqua destillata in geeichten Röhrchen auf ein konstantes Endvolumen von jeweils 5 ml aufgefüllt.

2.11 Die Stoffwechselsituation des transplantierten Herzens

Der Glucose- und Laktatgehalt der Transplantate wurde enzymatisch mit Hilfe des gekoppelten optischen Testes nach Warburg ermittelt. Grundlage der enzymatischen Reaktionen war die Oxidation oder Reduktion von Nikotinsäureamiden. Die Absorptionswellenlängen der oxidierten und reduzierten Reaktionspartner wurden mittels Photometer (Eppendorf-Photometer 1101M; Fa. Eppendorf, Hamburg Deutschland) auf der Wellenlänge von 366 nm gemessen. Aus den Extinktionsveränderungen wurde dann die Konzentrationen von Glucose und Laktat errechnet.

Der Gehalt an ATP, ADP, AMP, Kreatinphosphat (CrP) und Kreatin (Cr) wurde mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) aus den Peakflächen ermittelt. Die Peakidentifikation erfolgte über die Retentionszeit und die individuellen Spektren der

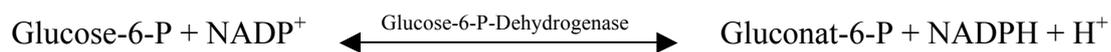
genannten Stoffe (Fischer 1995). Zur Kontrolle der ermittelten Werte wurde der Gehalt an ATP und CrP zusätzlich im gekoppelten optischen Test nach Warburg bestimmt.

Die HPLC-Anlage setzte sich aus sieben Einzelementen zusammen (Elemente 1-6: Fa. Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland; Element 7: Fa. Jour research, Onsala, Schweden):

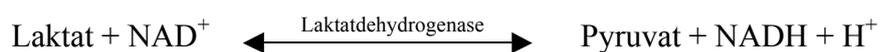
- 1) T-6300 Column Thermostat
- 2) D-6000 Interface
- 3) L-6200 Intelligent pump
- 4) L-4500 A Diode Array Detector
- 5) L-4250 UV-VIS Detector
- 6) AS-2000 Autosampler
- 7) Ecosaver

Reaktionsprinzipien der enzymatischen Tests:

Prinzip der Bestimmung des Glucosegehalts (Lamprecht und Trauschold 1958; Isselhard und Merguet 1962)



Prinzip der Bestimmung des Laktatgehalts:



Kombinierte Bestimmung des Kreatinphosphats und des ATP (Lamprecht und Trauschold 1958; Isselhard und Merguet 1962)

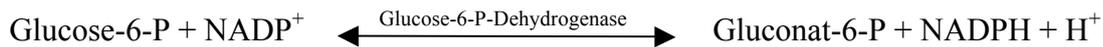
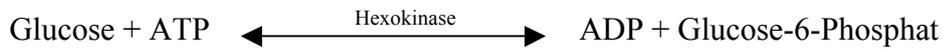
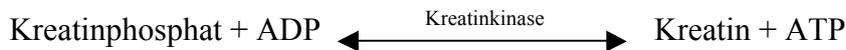


Abbildung 4: Reaktionen der photometrischen Tests

2.12 Die Versuchsauswertung

Als Summe der ATP-, ADP- und AMP-Werte ergab sich die Summe der Adeninnukleotide (SAN), über die sich als Nenner im Quotienten mit der Summe von ATP- und halbiertem ADP-Wert das „energy charge potential“ ($\text{ECP} = (\text{ATP} + \frac{1}{2} \text{ADP})/\text{SAN}$) als Maß für den Phosphorylierungsgrad der Adeninnukleotide (Atkinson 1968) errechnen ließ.

Die Gehaltsangabe von nur intrazellulär vorkommenden Substanzen, bei denen es sich um alle Adeninnukleotide, Kreatinphosphat, Creatin und Glykogen handelte, erfolgte in $\mu\text{mol pro g Trockengewicht (TG)}$. Hierdurch wurde die Gefahr von lediglich scheinbaren Veränderungen der Substanzgehalte in den Geweben durch Flüssigkeitsverschiebungen verhindert.

Glucose und Laktat kommen sowohl intra- als auch extrazellulär vor und sind somit teilweise Bestandteil von Gewebsflüssigkeiten, so dass hier deren Gehalt in $\mu\text{mol pro g Feuchtgewicht (FG)}$ angegeben wurde.

Die jeweiligen sich aus den Versuchen ergebenden Daten und die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung erfolgten mit dem Tabellenkalkulationsprogramm „Framework“. Der Vergleich und die Bestimmung der signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte über den t-Test, vorher wurden die Stichproben mit dem Test nach David auf Normalverteilung überprüft. Die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als Signifikanzschranke festgelegt.

Abbildungen und Tabellen wurden mit dem Programm „Excel“ erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Die Herzentnahme

Die Dauer der Herzexplantation wurde als der Zeitraum vom Narkosebeginn bis zum Perfusionsbeginn mit der jeweiligen Kardioplegielösung definiert. Sie betrug in der UW-Versuchsgruppe $1,3 \pm 0,14$ h (n=6) und in der HTK-Kontrollgruppe $1,4 \pm 0,1$ h (n=6).

Die Freispüldauer mit Konservierungslösung betrug in der Versuchsgruppe $4,7 \pm 0,7$ min bei einem Verbrauch von jeweils 1 l der UW-Lösung und bei einem Verbrauch von jeweils 3 l der HTK-Lösung in der Kontrollgruppe $8,5 \pm 1,5$ min.

3.2 Die Konservierung

Die Konservierungsdauer, definiert als Zeitraum vom Ende des Freispülens mit Konservierungslösung bis zum Beginn der Reperfusion mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung, betrug in der UW-Versuchsgruppe $13,8 \pm 0,3$ h und in der HTK-Kontrollgruppe $2,7 \pm 0,3$ h.

Die Transplantationsdauer wurde als Zeitraum von der Einlage des Herzens in das Nierenlager bis zum Beginn der Reperfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung definiert. Sie betrug in der Versuchsgruppe 28 ± 2 min und in der Kontrollgruppe 32 ± 3 min ohne signifikante Unterschiede.

3.3 Die Reperfusion mit Krebs-Henseleit-Lösung und Blutreperfusion

50 % der Herzen in der Versuchsgruppe wiesen bereits bei der KH-Reperfusion einen stabilen Eigenrhythmus auf, während dies bei den übrigen Herzen erst bei der Blutreperfusion der Fall war. Hier kam es in einem Fall zu Kammerflimmern, das mit Defibrillation therapiert wurde.

In der Kontrollgruppe wurde der Eigenrhythmus lediglich bei einem der Herzen während der KH-Reperfusion erreicht. Zwei der übrigen fünf Herzen, die erst bei der Blutreperfusion eigenrhythmisch kontrahierten, wiesen zunächst Kammerflimmern auf, das jeweils mit der Gabe von Xylocain oder mit Defibrillation behoben werden konnte.

3.4 Die Funktionsprüfungen

3.4.1 Das Herzzeitvolumen

Das Herzzeitvolumen in der UW-Versuchsgruppe betrug $3,6 \pm 0,4$ l/min. In der HTK-Kontrollgruppe betrug das HZV $3,5 \pm 1,1$ l/min ohne signifikante Unterschiede.

3.4.2 Die Amplitude des linksventrikulären Druckes, die maximale Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit

Zum Zeitpunkt der Messung von linksventrikulärer Druckamplitude (LVP-Amplitude), maximaler Kontraktionsgeschwindigkeit ($+dp/dt_{max}$) und maximaler Relaxationsgeschwindigkeit ($-dp/dt_{max}$) gleich nach Einführen des Ballonkatheters betrug die mittlere Herzfrequenz in der UW-Versuchsgruppe 105 ± 15 Schläge/min und in der HTK-Kontrollgruppe 134 ± 41 Schläge/min. Die Volumina der Druckmessballons betragen bei einem Vordruck von 10 mmHg im Mittel $25,2 \pm 10,4$ ml bzw. $23,0 \pm 11,5$ ml ohne signifikante Unterschiede.

In der Kontrollgruppe wurde im Mittel 80 % der LVP-Amplitude im Vergleich zur UW-Gruppe erreicht (vergl. Abb. 5). Der mittlere $+dp/dt_{max}$ -Wert in der UW-Gruppe betrug im Vergleich zur Kontrollgruppe 80 % (vergl. Abb. 6), der entsprechende $-dp/dt_{max}$ -Wert erreichte im Mittel 68 % (vergl. Abb. 7). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

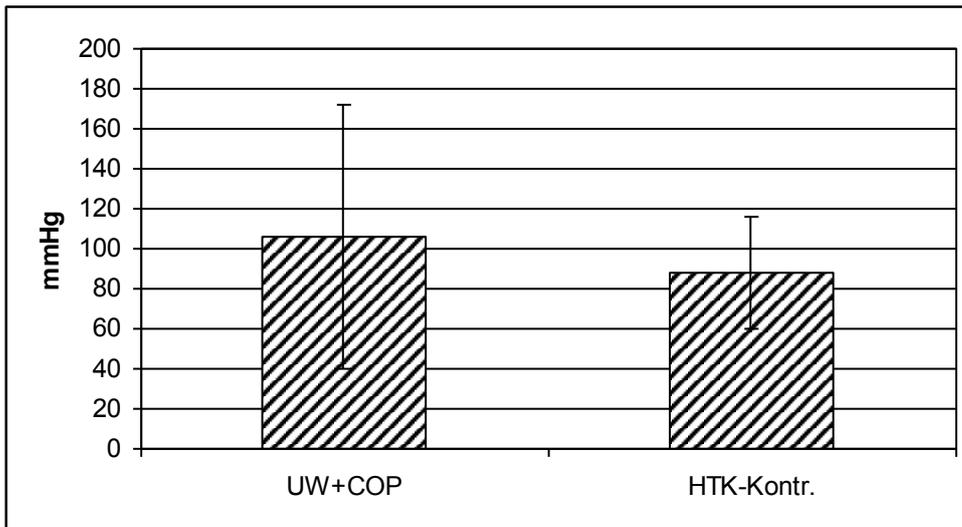


Abb. 5: Vergleich der linksventrikulären Druckamplitude (LVP-Ampl.) der Transplantate der einzelnen Konservierungsgruppen nach einer Woche; Mittelwert \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe; Ballonvolumina: UW+COP: $15,2 \pm 10,4$ ml; HTK: $23,0 \pm 11,5$ ml; p=n.s.

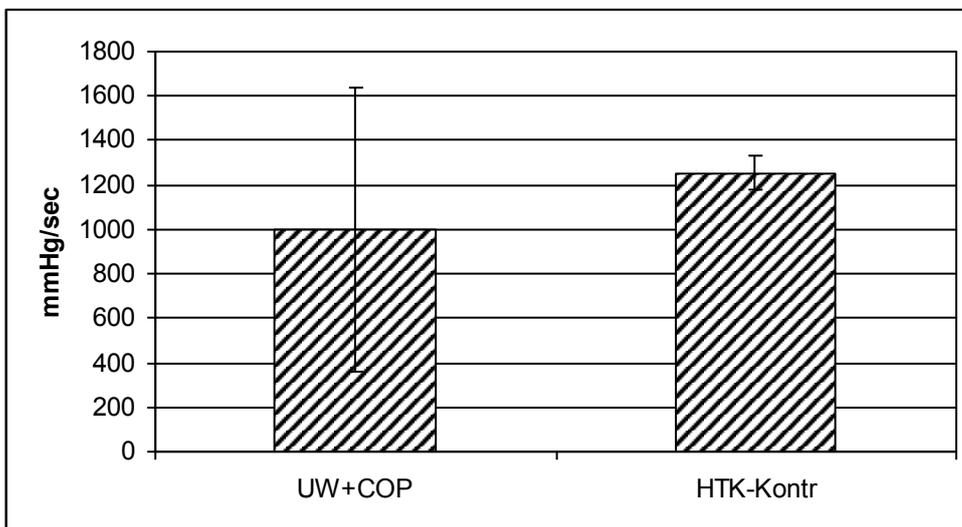


Abb. 6: Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (+dp/dt_{max}) der Transplantate nach einer Woche; Mittelwert \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe; p=n.s.

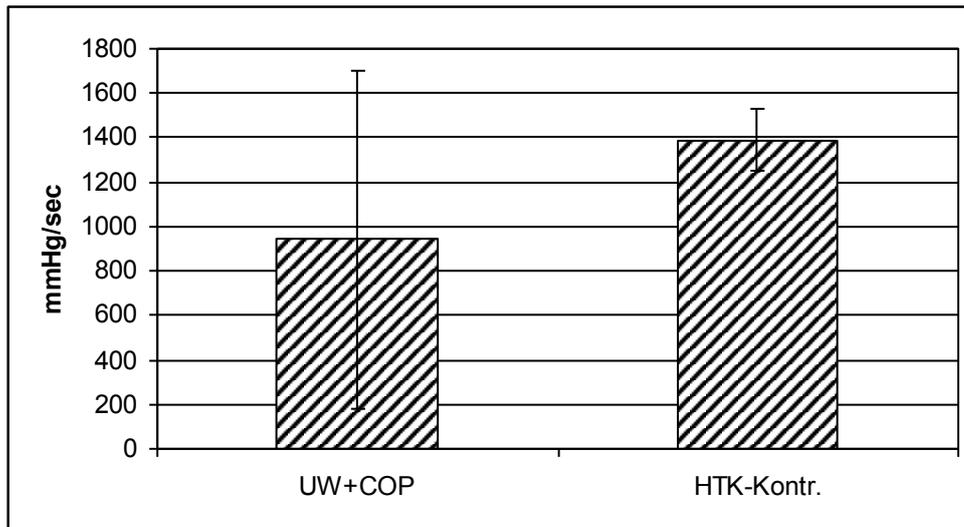


Abb. 7: Maximale Relaxationsgeschwindigkeit ($-dp/dt_{\max}$) der Transplantate nach einer Woche; Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=6$ pro Gruppe; $p=n.s.$

3.5 Der Wassergehalt der Gewebeproben und die biochemische Analyse

3.5.1 Der Wassergehalt der Gewebeproben

Der Wassergehalt der Proben wurde anhand des Quotienten von Trockengewicht (TG) und Feuchtgewicht (FG) festgestellt. Er wurde jeweils in Proben von linkem Vorhof (LA), von der Basis und der Spitze des linken Ventrikels (LVB und LVS) und vom rechten Ventrikel (RV) bestimmt (vergl. Abb. 8).

In allen Proben lag der mittlere TG-Anteil vom FG in der HTK-Kontrollgruppe über dem der UW-Versuchsgruppe, die somit in den Myokardproben einen höheren mittleren Wassergehalt aufwies. Die Mittelwerte in der UW-Versuchsgruppe betragen in der LVB $16,08 \pm 0,88$ %, in der LVS $16,59 \pm 0,75$ %, im RV $16 \pm 0,83$ % und im LA $15,13 \pm 0,29$ %. Die Werte in der Kontrollgruppe waren mit $16,8 \pm 1,06$ % in der LVB, $17,08 \pm 1,22$ % in der LVS, $16,46 \pm 1,85$ % im RV und $16,39 \pm 2,00$ % im LA jeweils geringfügig höher. Die Unterschiede waren nicht signifikant.

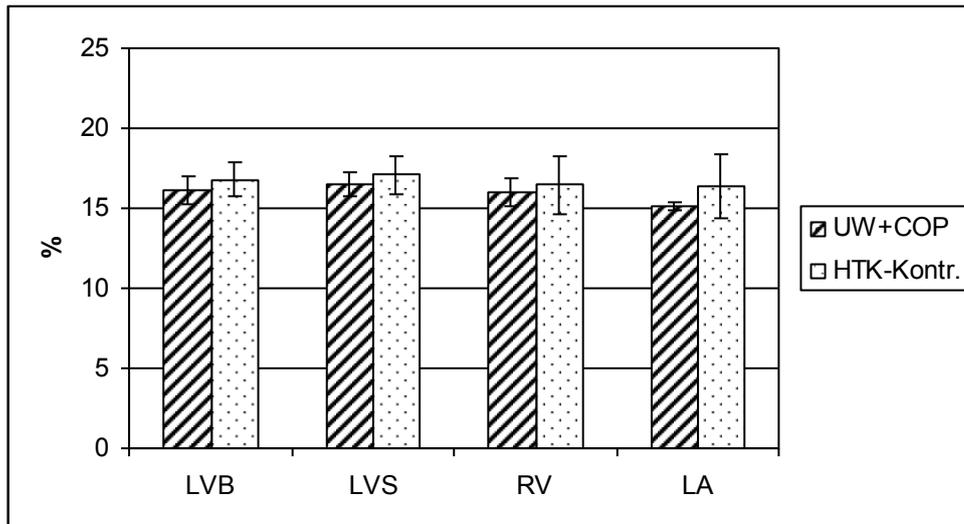


Abb. 8: Trockengewicht (TG) in Prozent des Feuchtgewichtes (FG); Mittelwert \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe; p=n.s.

3.5.2 Die Adeninnukleotide

In keiner Region des Herzens fanden sich signifikante Unterschiede im ATP- oder SAN-Gehalt. Die Mittelwerte differierten nur geringfügig mit bis zu 2,12 % geringeren Werten in der LVB der UW+COP-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe, bis zu 1,39 % geringeren Werten in der LVS und bis zu 0,77 % in dem RV. Die Werte im LA waren im Mittel mit nur 0,05 % Abweichung weitgehend identisch. (vergl. Abb. 9).

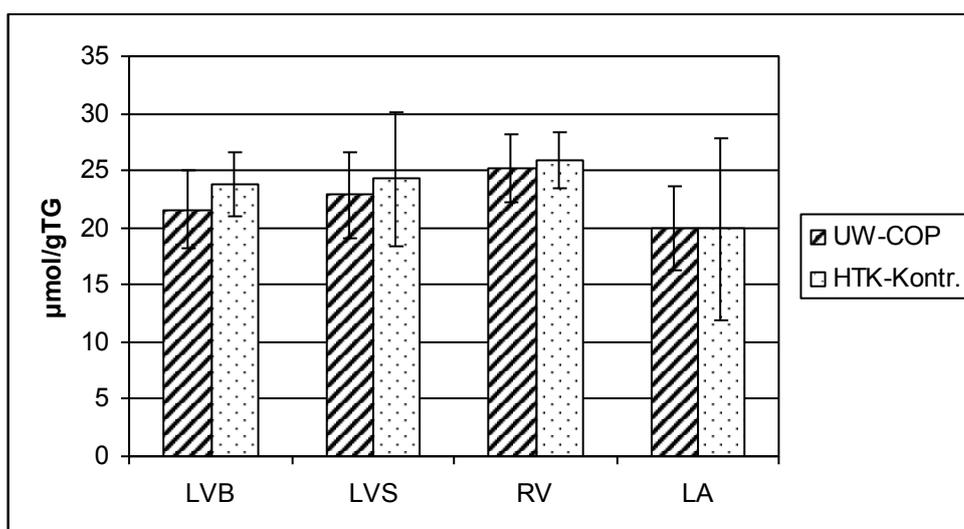


Abb. 9: Summe der Adeninnukleotide (SAN); Mittelwert \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe; p=n.s.

3.5.3 Der Adenosintriphosphatgehalt

Der Gehalt an Adenosintriphosphat (ATP) war im Mittel in allen Gewebeproben der UW-Gruppe mit Ausnahme des LA niedriger als in der Kontrollgruppe. Die Mittelwerte in der UW-Gruppe bewegten sich in einem Rahmen von $15,63 \pm 1,94 \mu\text{mol/gTG}$ in der LVB, $17,35 \pm 3,3 \mu\text{mol/gTG}$ in der LVS und $19,73 \pm 3,56 \mu\text{mol/gTG}$ im RV. In der Kontrollgruppe fanden sich Werte von $18,08 \pm 4,12 \mu\text{mol/gTG}$ in der LVB, $17,88 \pm 5,86 \mu\text{mol/gTG}$ in der LVS und $21,66 \pm 3,08 \mu\text{mol/gTG}$ im RV, wo sich somit jeweils die höchsten Werte fanden. Die jeweils niedrigsten Werte im LA waren mit $14,87 \pm 2,87 \mu\text{mol/gTG}$ bzw. $14,78 \pm 6,33 \mu\text{mol/gTG}$ weitgehend identisch. Es handelte sich insgesamt um nicht signifikante Unterschiede (vergl. Abb. 10).

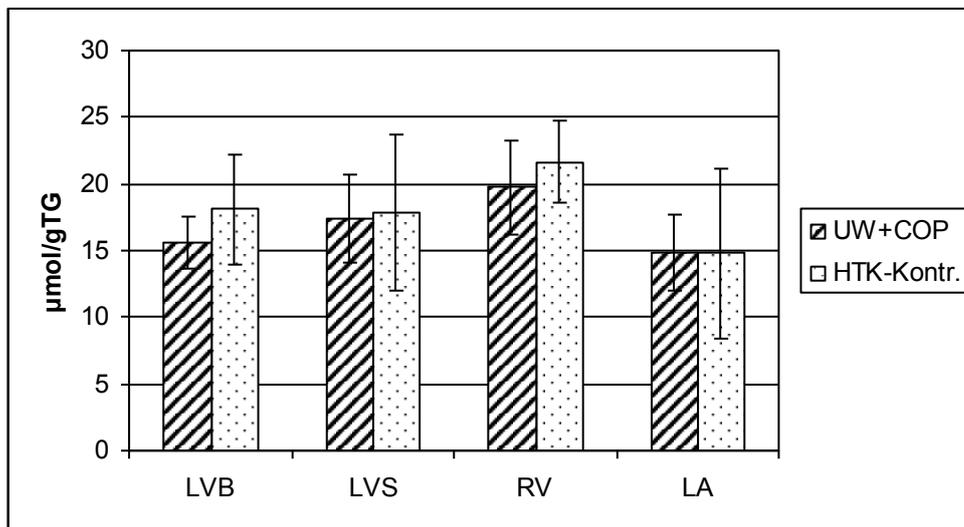


Abb. 10: ATP-Gehalt; Mittelwert \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe; p=n.s.

3.5.4 Das Energy Charge Potential

Das mittlere Energy Charge Potential (ECP) der LVB- und RV-Proben der UW-Gruppe betrug $0,84 \pm 0,06$ bzw. $0,87 \pm 0,04$ und wies gegenüber den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe geringere Werte auf. Die Werte in der Kontrollgruppe betragen $0,86 \pm 0,06$ bzw. $0,90 \pm 0,03$. Die LVS- und LA-Proben erreichten Werte von $0,86 \pm 0,04$ und $0,85 \pm 0,02$ und waren höher als die der Kontrollgruppe mit Werten von $0,84 \pm 0,05$ bzw. $0,84 \pm$

0,03. Die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der beiden Gruppen waren nicht signifikant (vergl. Abb. 11).

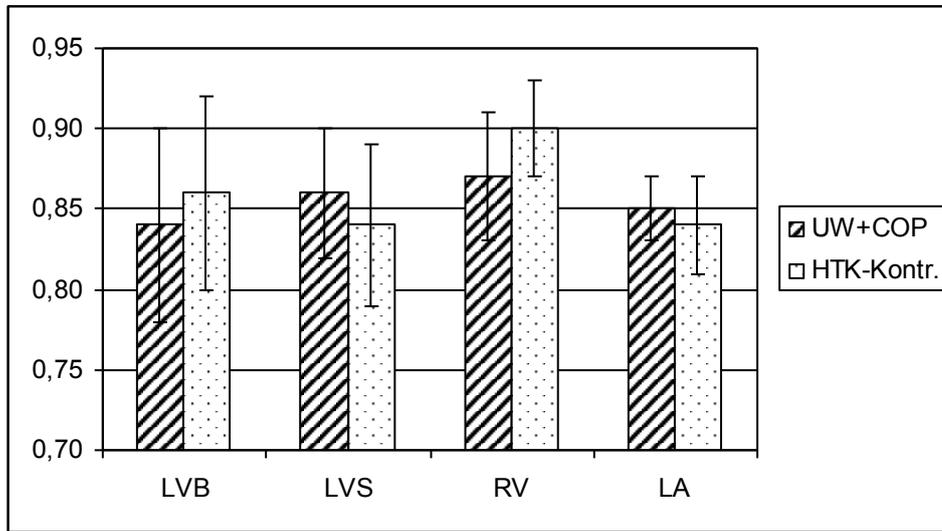


Abb. 11: Energy Charge Potential (ECP); Mittelwert \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe; p=n.s.

3.5.5 Der Phosphorylierungsgrad im Kreatinsystem

Mittels der in unseren Versuchen angewendeten Entnahmemethode ist es trotz Wollenberger-Technik nicht möglich, den Phosphorylierungsgrad im Kreatininsystem in vivo für die biochemische Analyse aufrecht zu erhalten.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren allesamt nicht signifikant. In der LVB und der LVS lagen die Mittelwerte in der UW+COP-Gruppe mit $0,26 \pm 0,06$ bzw. $0,25 \pm 0,08$ über denen der Kontrollgruppe ($0,21 \pm 0,12$ bzw. $0,24 \pm 0,11$). Im RV und LA war dieses Verhältnis umgekehrt, so waren die Mittelwerte für die HTK-Gruppe hier $0,21 \pm 0,09$ und $0,22 \pm 0,18$, während die Werte für die UW+COP-Gruppe $0,14 \pm 0,09$ und $0,15 \pm 0,05$ betragen.

3.5.6 Der Glykogengehalt

Der mittlere Glykogengehalt lag in allen Proben in der UW-Gruppe unterhalb der entsprechenden Werte der Kontrollgruppe. Die Mittelwerte in der UW+COP-Gruppe betragen in der LVB $100 \pm 29 \mu\text{mol/gTG}$, in der LVS $95 \pm 31 \mu\text{mol/gTG}$, im RV $130 \pm 39 \mu\text{mol/gTG}$ und im LA $94 \pm 8 \mu\text{mol/gTG}$. Die höchsten Werte fanden sich mit $130 \pm 39 \mu\text{mol/gTG}$ bzw. $169 \pm 31 \mu\text{mol/gTG}$ im RV, wobei die Werte ansonsten innerhalb der Gruppen auf vergleichbarem Niveau lagen. Die entsprechenden Werte in der HTK-Kontrollgruppe betragen für die LVB $130 \pm 32 \mu\text{mol/gFG}$, für die LVS $133 \pm 42 \mu\text{mol/gFG}$, für den RV $169 \pm 31 \mu\text{mol/gFG}$ und für den LA $142 \pm 78 \mu\text{mol/gFG}$. Auch hier fand sich der höchste Mittelwert im RV bei sonst vergleichbaren mittleren Gehalten an Glykogen. Bei den gegebenen Standardabweichungen fanden sich keine signifikanten Unterschiede (vergl. Abb.12).

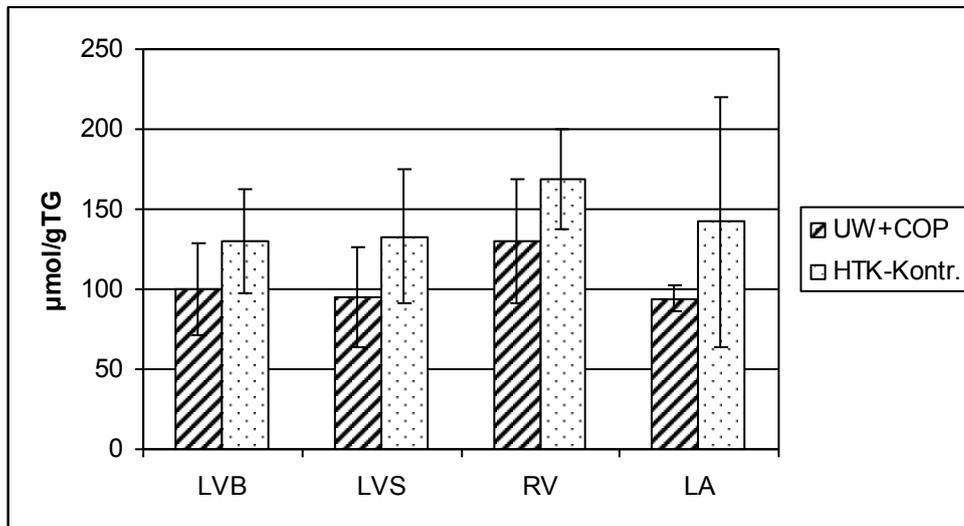


Abb. 12: Glykogengehalt; Mittelwert \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe; p=n.s.

3.5.7 Der Glukosegehalt

Der Glukosegehalt der Herzen war direkt vom Glukosegehalt des Blutes bei Entnahme des Transplantates nach einer Woche abhängig. Der mittlere Blutglukosegehalt in der UW-Gruppe war höher als der in der Kontrollgruppe. Die Werte betragen $6,38 \pm 2,3$ mmol/l in der UW-Gruppe und $5,7 \pm 0,53$ mmol/l in der Kontrollgruppe. Die Unterschiede erreichten nicht die Signifikanzschränke.

Der mittlere Glukosegehalt der Herzen lag außer bei den LVB-Proben in der UW-Gruppe immer unterhalb dem der Kontrollgruppe. Die Mittelwerte betragen für die UW+COP-Gruppe in der LVB $2,2 \pm 1,0$ $\mu\text{mol/gFG}$, in der LVS $1,7 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/gFG}$, im RV $2,0 \pm 0,7$ $\mu\text{mol/gFG}$ und im LA $2,8 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/gFG}$. In der HTK-Kontrollgruppe fanden sich Werte von $2,1 \pm 0,9$ $\mu\text{mol/gFG}$ in der LVB, $3,2 \pm 2,9$ $\mu\text{mol/gFG}$ in der LVS, $2,5 \pm 0,6$ $\mu\text{mol/gFG}$ im RV und $3,0 \pm 1,6$ $\mu\text{mol/gFG}$ im RA. Der höchste Wert in der UW-Gruppe fand sich somit im linken Vorhof, der in der Kontrollgruppe in der Spitze des linken Ventrikels. Die Unterschiede waren aufgrund der teilweise großen Standardabweichungen nicht signifikant (vergl. Abb.13).

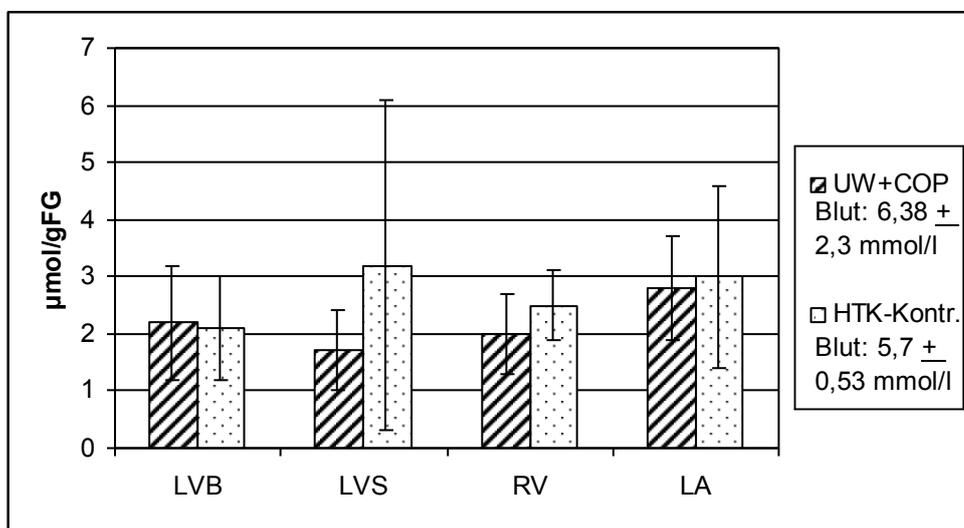


Abb. 13: Glukosegehalt der Herzen; Mittelwert \pm Standardabweichung, n=6 pro Gruppe; p=n.s.

3.5.8 Der Laktatgehalt

Der Laktatgehalt des Herzgewebes stand in einem direktem Abhängigkeitsverhältnis zum Laktatgehalt des Blutes bei Transplantatentnahme. Beim gemittelten Blutlaktatgehalt während der Entnahme fanden sich in UW-Gruppe und HTK-Kontrollgruppe identische Werte. Die Laktatgehalte der Gewebsflüssigkeit in den unterschiedlichen Herzregionen lagen abgesehen von der Ausnahme eines Organs über denen des Blutes (vergl. Abb. 15).

Der mittlere Laktatgehalt im Herzgewebe lag in der UW-Gruppe außer bei der LA-Probe immer über dem der Kontrollgruppe. Die höchsten Werte wurden bei beiden Gruppen jeweils in der Spitze des linken Ventrikels mit Mittelwerten von $4,9 \pm 2,6 \mu\text{mol/gFG}$ in der UW-Gruppe und $4,7 \pm 2,8 \mu\text{mol/gFG}$ in der HTK-Gruppe gemessen. Der niedrigste Wert der Versuchsgruppe fand sich im LA mit $4,2 \pm 1,3 \mu\text{mol/gFG}$ ($4,6 \pm 1,5 \mu\text{mol/gFG}$ in der HTK-Kontrollgruppe), der der Kontrollgruppe im RV mit $3,7 \pm 1,2 \mu\text{mol/gFG}$ ($4,4 \mu\text{mol/gFG}$ in der UW-Gruppe). Die Mittelwerte in der LVB betrug $4,6 \pm 2,5 \mu\text{mol/gFG}$ in der UW-Gruppe und $4,1 \pm 2,8 \mu\text{mol/gFG}$ in der HTK-Gruppe. Signifikante Unterschiede gab es nicht (vergl. Abb. 14).

Zwei LA-Werte in der UW+COP-Gruppe wurden nicht übernommen, da sie für diese Herzregion unplausibel hoch waren.

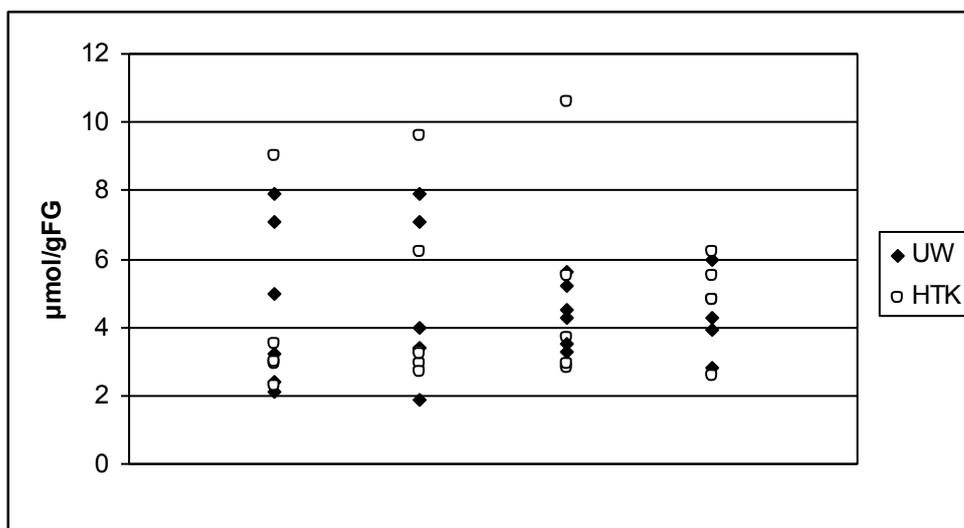


Abb. 14: Laktatgehalt der Herzen bei Transplantatentnahme; Einzelwerte

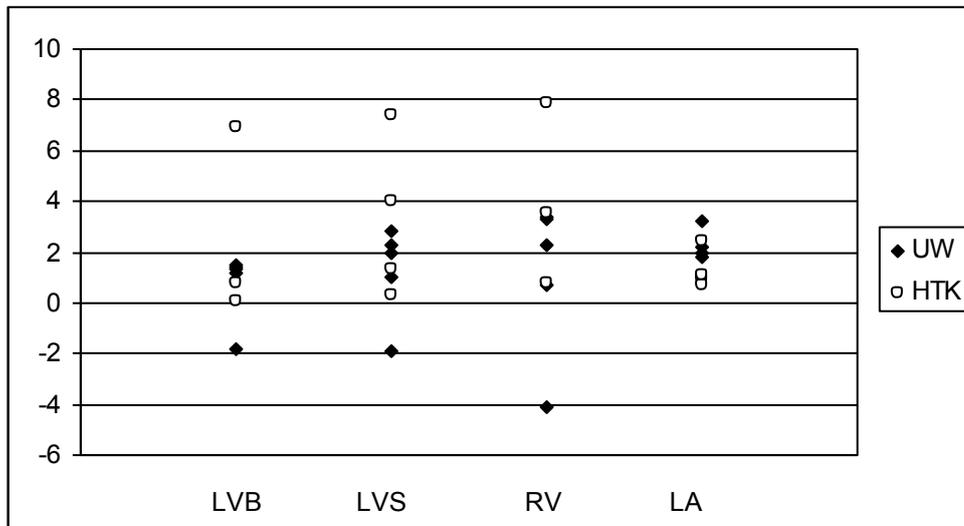


Abb. 15: Differenzen von Laktatgehalt der Gewebsflüssigkeit [$\mu\text{mol/g}$] und Blutlaktatgehalt [$\mu\text{mol/g}$] bei Entnahme der Transplantate nach einer Woche; Einzelwerte

3.6 Die Herzenzyme

3.6.1 Das kardiale Troponin T

Das kardiale Troponin T (cTnT) wurde zunächst am Tage der Herzimplantation in halbstündigen und anschließend in eintägigen Abständen mit jeweils morgendlicher Blutentnahme bestimmt.

Der cTnT-Wert war vor der Reperfusion in beiden Gruppen nicht messbar. Eine halbe Stunde nach der Reperfusion lag der entsprechende Wert in der Kontrollgruppe mit $2,50 \pm 3,60$ ng/ml ($n=3$) deutlich über dem Wert der UW-Gruppe mit $1,35 \pm 1,05$ ng/ml ($n=2$). Nach einer Stunde war das Verhältnis aufgrund steileren Anstieges in der UW-Versuchsgruppe mit einem Mittelwert von $6,25 \pm 1,44$ ng/ml ($n=2$) gegenüber einem Kontrollwert von $3,25 \pm 4,03$ ng/ml ($n=3$) ebenso wie noch nach zwei Stunden ($11,07 \pm 8,44$ ng/ml ($n=2$) bzw. $5,21 \pm 5,05$ ng/ml ($n=3$)) umgekehrt. Nach drei Stunden lag der cTnT-Wert von $17,05 \pm 8,40$ ng/ml ($n=3$) in der Kontrollgruppe nach Umkehrung der Steigungsverhältnisse wieder über dem von $14,04 \pm 10,93$ ng/ml ($n=5$) in der UW-Versuchsgruppe.

Im Verlauf über die nächsten Tage zeigte sich in der Kontrollgruppe ein zunächst steilerer Anstieg im Kurvenverlauf mit Erreichen des Maximums am zweiten Tag mit einem Mittelwert von $18,73 \pm 6,97$ ng/ml ($n=6$). Die Differenz zwischen den Mittelwerten betrug

9,3 ng/ml. Das Maximum mit dem insgesamt höchsten Mittelwert von $19,45 \pm 8,78$ ng/ml ($n=5$) wurde in der UW-Versuchsgruppe am dritten Tag erreicht. Der entsprechende Mittelwert in der Kontrollgruppe betrug $12,41 \pm 10,39$ ng/ml ($n=3$). Aufgrund des späteren Abfalls des cTnT-Gehalts lagen die Werte in der Versuchsgruppe am vierten Tag über denen der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von $10,22 \pm 4,12$ ng/ml ($n=5$) gegenüber dem von $6,11 \pm 4,99$ ng/ml ($n=3$) in der Kontrollgruppe. Nach steilem Abfall in beiden Gruppen lag der Mittelwert in der Kontrollgruppe ab dem fünften Tag mit $1,84 \pm 1,06$ ng/ml ($n=4$) auf niedrigem Niveau und bei nahezu parallelem Verlauf der entsprechenden Kurve über dem Wert von $0,90 \pm 0,48$ ng/ml ($n=3$) in der Versuchsgruppe. Die entsprechenden Mittelwerte des sechsten Tages waren in der UW-Gruppe $0,33 \pm 0,14$ ng/ml ($n=3$) und in der HTK-Kontrollgruppe $1,01 \pm 1,09$ ng/ml ($n=3$). Die abschließenden Mittelwerte am siebten Tag erreichten in der UW-Versuchsgruppe $0,30 \pm 0,26$ ng/ml ($n=5$) und in der HTK-Kontrollgruppe $2,15 \pm 3,29$ ng/ml ($n=4$).

Aufgrund teilweise fehlender Werte und großer Standardabweichungen waren insgesamt keine Signifikanzen auszumachen (vergl. Abb. 16 u. 17).

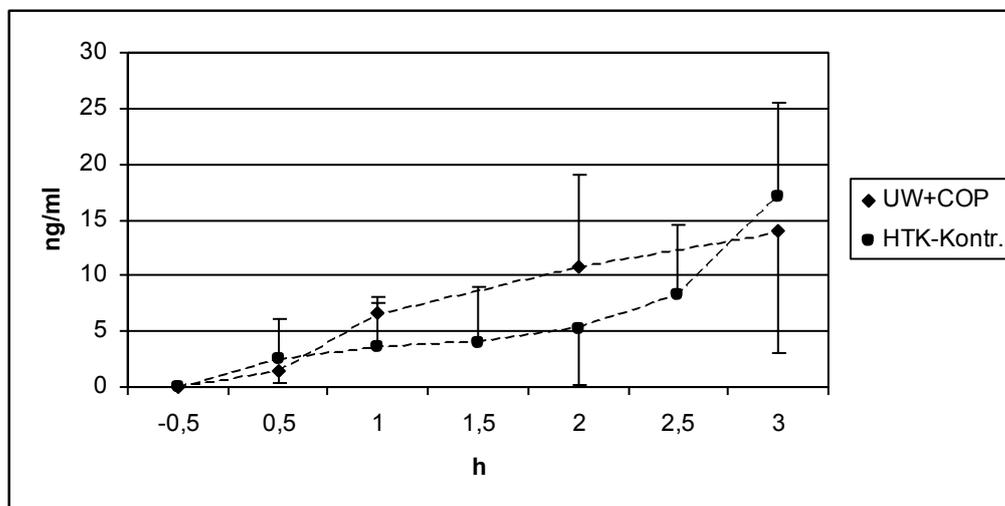


Abb. 16: Halbstündige Veränderungen des Gehaltes an kardialem Troponin T im Serum; Mittelwert \pm Standardabweichung, $n_{(UW)}=\{5;2;2;0;2;0;5\}$ $n_{(HTK)}=3$; $p=n.s.$

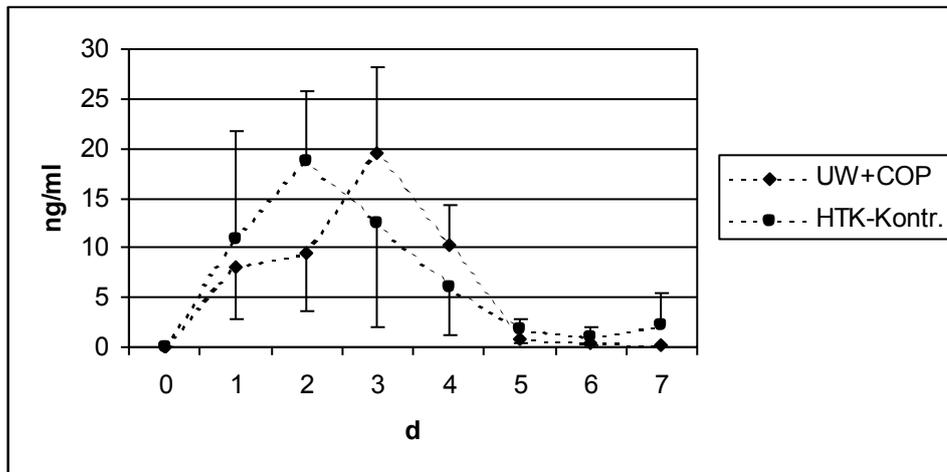


Abb. 17: Veränderungen des Gehaltes an kardialem Troponin T über die Tage; Mittelwert \pm Standardabweichung, $n_{(UW)} = \{5;3;2;5;5;3;3;5\}$, $n_{(HTK)} = \{6;6;6;3;3;4;3;4\}$; $p = n.s.$

3.6.2 Die Kreatinkinase

Die Aktivität der Kreatinkinase wurde jeweils im Serum der gleichen Blutproben bestimmt, in dem der Troponin T-Gehalt ermittelt wurde.

Insgesamt lässt sich in beiden Gruppen nach Reperfusion ein deutlicher Anstieg der Enzymaktivität feststellen. Nachdem die Werte in den Gruppen vor der Reperfusion mit 642 ± 817 U/l in der UW+COP-Gruppe ($n=6$) und 597 ± 637 U/l in der HTK-Kontrollgruppe ($n=5$) nahe beieinander lagen und eine halbe (653 ± 441 U/l in der UW+COP-Gruppe ($n=6$) gegenüber 545 ± 474 U/l in der HTK-Gruppe ($n=5$)) und eine Stunde (1181 ± 795 U/l ($n=6$) bzw. 1343 ± 922 U/l ($n=2$)) nach Reperfusion nahezu gleich waren, zeigte sich in der UW-Gruppe in der nächsten halben Stunde ein im Vergleich höherer Anstieg der Aktivität, so dass die Werte nach 1,5 mit 1995 ± 1059 U/l ($n=4$) und nach 2 Stunden mit 2152 ± 1400 U/l ($n=6$) zwar in der Gruppe auf gleichem Niveau aber über denen der HTK-Kontrollgruppe (1193 ± 799 U/l ($n=4$) bzw. 1708 ± 965 U/l ($n=4$)) lagen. In letzterer war ab 1,5 Stunden ein im Vergleich größerer Anstieg zu verzeichnen, der in der Kontrollgruppe erst 2 Stunden nach Reperfusion stattfand, so dass die Werte nach 2,5 (3165 ± 1715 U/l ($n=4$) bzw. 3066 ± 1205 U/l ($n=4$)) und 3 Stunden (3046 ± 1685 U/l ($n=5$) bzw. 3238 ± 2764 U/l ($n=3$)) in beiden Gruppen auf ähnlichem Niveau lagen. Nun war der Anstieg in der Kontrollgruppe im Vergleich deutlich größer, so dass der Wert für die Kreatinkinaseaktivität 3,5 Stunden nach

Reperfusion mit 4934 ± 4171 U/l ($n=3$) deutlich über dem der UW-Gruppe mit 3279 ± 2128 U/l ($n=3$) lag (vergl. Abb. 18). Aufgrund der teilweise großen Standardabweichungen ergaben sich für die Unterschiede zwischen den Gruppen keine Signifikanzen.

Aufgrund der großen Streubreite der zur Verfügung stehenden Werte zu den Veränderungen der Enzymaktivität über die Tage in der HTK-Kontrollgruppe kam es zu Standardabweichungen, die größer waren als die Mittelwerte. Die Werte der einzelnen Tiere der Kontrollgruppe, die über die ersten drei Tage zur Verfügung standen, sind ungemittelt in Abb. 19 logarithmisch dargestellt. Ab dem vierten Tag sind die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen dargestellt. Die Veränderungen der Enzymaktivität in der UW+COP-Gruppe sind ohne Ausnahme gemittelt über die Tage mit den Standardabweichungen dargestellt.

Entsprechend dem vorgezeichneten Trend der Aktivitätsveränderungen der Kreatinkinase über die Stunden lassen sich insgesamt höhere Werte in der Kontrollgruppe gegenüber denen der UW-Gruppe ausmachen. Die Werte der UW+COP-Gruppe lagen in den ersten drei Tagen bei 6415 ± 2569 U/l, 1198 ± 466 U/l und 382 ± 198 U/l ($n=\{6;5;4\}$), womit ein Abwärtstrend deutlich wurde. Dieser setzte sich mit dem Mittelwert von 178 ± 43 U/l ($n=4$) am vierten Tag bis zum fünften Tag mit 104 ± 23 U/l ($n=3$) fort. Danach kam es zur Stabilisierung der Werte mit 128 ± 62 U/l ($n=3$) am sechsten und 137 ± 58 U/l ($n=4$) am siebten Tag, so dass das präoperative Niveau unterschritten wurde. Die dargestellten Einzelwerte der Kontrollgruppe lagen mit einer Ausnahme über denen der Versuchsgruppe. Das war auch bei den gemittelten Werten der Kontrollgruppe ab dem vierten Tag der Fall. Hier kam es zunächst ausgehend von 340 ± 366 U/l ($n=2$) zu einem Aktivitätsanstieg von 1174 ± 719 U/l ($n=3$) am fünften Tag. Im weiteren Verlauf kam es zu einem allmählichen Abfall der Mittelwerte auf 786 ± 509 U/l ($n=3$) am sechsten und schließlich 394 ± 220 U/l ($n=3$) am siebten Tag. Auch in der Kontrollgruppe wurde der präoperative Ausgangswert unterschritten. Signifikanzen ließen sich nicht ausmachen.

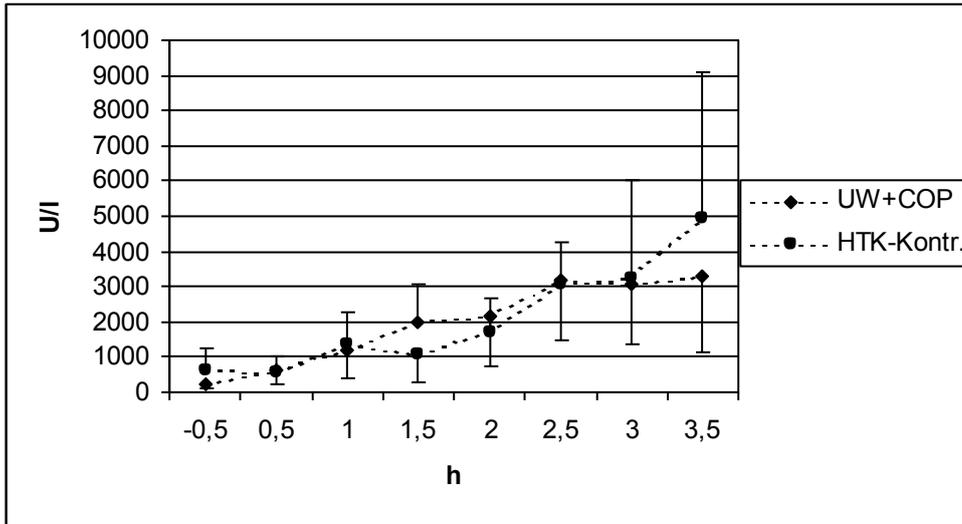


Abb. 18: Halbstündige Veränderungen der Kreatinkinaseaktivität im Serum;
Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n_{(UW)} = \{6;6;6;4;6;4;5;3\}$, $n_{(HTK)} = \{5;5;2;4;4;4;3;3\}$; $p = n.s.$

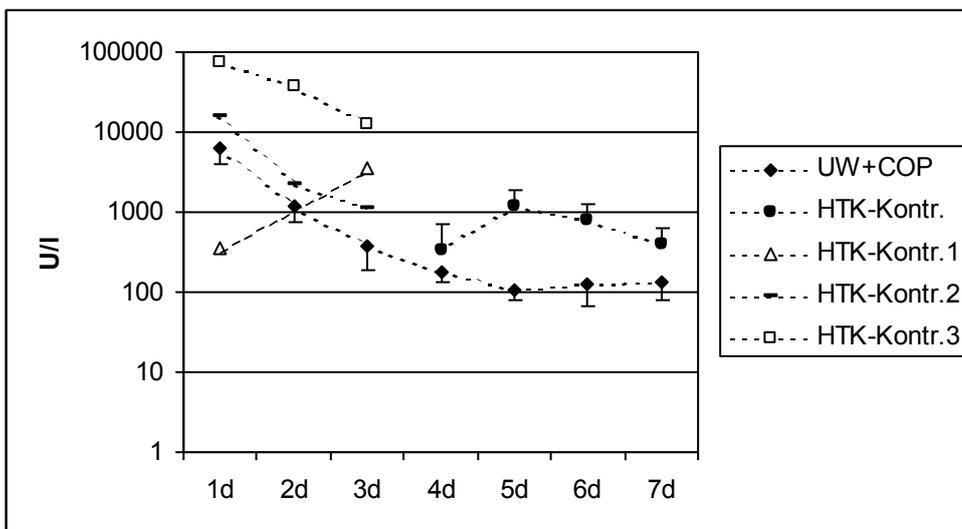


Abb. 19: Veränderungen der Kreatinkinaseaktivität über die Tage; Mittelwerte;
 $n_{(UW)} = \{6;5;4;4;3;3;4\}$, $n_{(HTK)} = \{3;2;3;2;3;3;3\}$; $p = n.s.$

3.6 Die Funktion der Koronararterien

Die Testung der Koronararterien erfolgte jeweils sofort nach der Entnahme des Transplantates und des eigenen Herzens des Empfängertieres.

Den Ergebnissen der Koronarringe der UW-Versuchsgruppe und der HTK-Kontrollgruppe standen die der Ringe der Kontrollherzen aus den Thoraces der Empfängertiere und die der Ringe aus dem Kölner Schlachthof gegenüber. Letztere wurden lediglich im ersten Versuchsdurchgang getestet. Funktionsparameter war die prozentuale Beziehung von Relaxation zu Kontraktion.

Im ersten Versuchsdurchgang lag der Wert für die Relaxation nach SP-Gabe im Verhältnis zur durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ oder, falls nicht ausreichend, durch U46619 ausgelösten Kontraktion für die UW-Gruppe bei $68 \pm 22\%$. Für die Kontrollgruppe betrug der Wert $74 \pm 27\%$, für die Kontrollringe aus dem Empfängereigenherz $83 \pm 12\%$ und für die Herzen aus dem Schlachthof als Vergleichsgruppe $75 \pm 9\%$. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Im zweiten Versuchsdurchgang mit vorheriger Gabe von L-NNA lag der Wert für die Dilatation in der UW-Gruppe mit $23 \pm 22\%$ insgesamt am niedrigsten und war somit gegenüber dem Wert für die Gruppe der Kontrollherzen mit $66 \pm 10\%$ signifikant niedriger. Der Wert für die Kontrollgruppe war mit $34 \pm 24\%$ ebenfalls innerhalb der eigenen Gruppe am niedrigsten, die Unterschiede gegenüber den übrigen Gruppen waren nicht signifikant (vergl. Abb. 20).

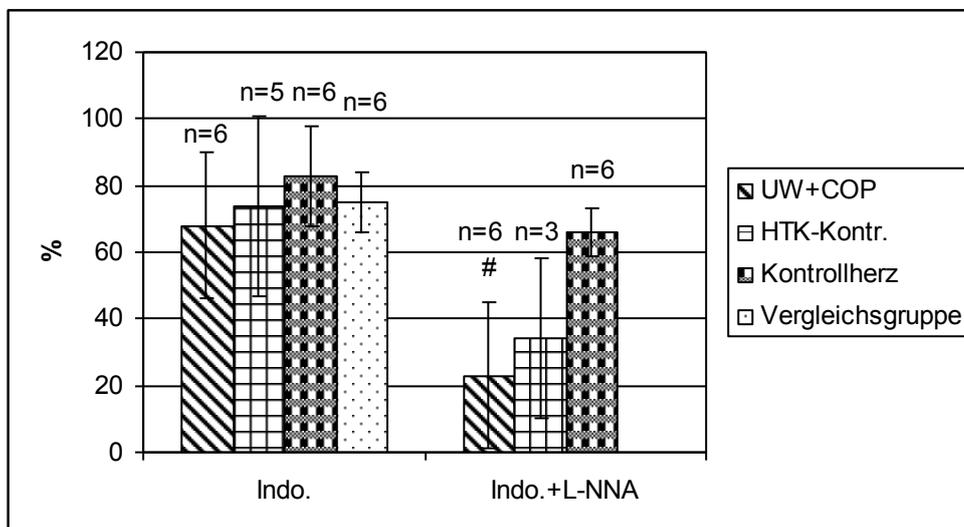


Abb. 20: Koronarfunktion; Mittelwert \pm Standardabweichung

Dilatation durch SP im prozentualen Verhältnis zur Kontraktion durch $\text{PGF}_{2\alpha}$ oder U46619 bei vorheriger Applikation von Indomethacin bzw. Indomethacin und L-NNA; Kontrollherz: Koronararterien aus Empfängereigenherz; Vergleichsgruppe: Koronararterien aus Schlachthof Köln; Mittelwert \pm Standardabweichung; #: $p < 0,05$ gegenüber Gruppe der Kontrollherzen

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die vierzehnstündige hypotherme Konservierung von Herzen mit UW-Lösung unter Anwendung der Sauerstoffpersufflation der Koronararterien mit der Methode der drei- bis vierstündigen hypothermen Konservierung mit HTK-Lösung ohne COP verglichen. Wesentliche Unterschiede dieser Methoden im Hinblick auf den Funktionserhalt wurden nicht gefunden.

4.1 Zum Versuchstier Schwein

Mit dem Schwein wurde ein Versuchstier gewählt, das dem Menschen im Hinblick auf das Herz sehr ähnlich ist. So stimmt die Größe des Organs weitgehend mit der des Menschenherzen überein. Menschen- und Schweineherzen weisen zudem gleiche grundsätzliche Versorgungstypen auf, die durch Koronararterien gegeben sind, bei denen es sich um funktionelle Endarterien mit wenig Kollateralen handelt. Letztere weisen ähnliche Größenverhältnisse wie die Herzgefäße des Menschen auf.

Ein Unterschied zwischen den Herzen beider Spezies besteht in der Mündung der Vena azygos sinistra des Schweins in den Sinus coronarius (Nickel et al 1984). Dieser Unterschied spielte in unseren Versuchen jedoch lediglich dahingehend eine Rolle, dass dieses Gefäß verschlossen werden musste. Ein weiterer anatomischer Unterschied zwischen den Herztypen ist die Lage der Hohlvenen des Schweins im 90 °-Winkel zueinander (Crick et al. 1998). Dieser Unterschied spielte in unseren Versuchen keine Rolle.

Im Vergleich zu anderen Versuchstieren wie Ratten und Hunde weist das Schweineherz eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoffmangel auf, so dass ischämiebedingte Schäden eher auftreten (Weisel 1993). Für ischämiebedingte Schäden, die im menschlichen Herzen auftreten mögen, besteht somit eine im Vergleich höhere Sensitivität.

Das Versuchstier wurde gewählt, um über die Vergleichbarkeit seines Herzens mit dem des Menschen eine möglichst substantielle Aussagekraft mit Rücksicht auf eine mögliche klinische Anwendung der Methode der COP zu erreichen.

4.2 Zum operativen Vorgehen und zur Reperfusion

Die vorliegenden Versuche stellen die Fortsetzung von Experimenten mit vierzehnstündiger Herzlagerung unter Anwendung der COP mit einer Überlebenszeit der Schweine entsprechend einer Blutperfusionzeit von 2-3 h dar (Fischer et al. 1998, Kuhn-Régnier et al. 2000). Es wurde die Methode der Flush-Perfusion angewendet, auf die bereits an anderer Stelle eingegangen wurde (vergl. 1.2). Die letztgenannten Versuche wurden allerdings als orthotope Herztransplantation nach der Technik von Lower und Shumway durchgeführt (Lower und Shumway 1960), die sich bei uns in anfänglichen Versuchen für das Versuchsziel der Überlebenszeit von sieben Tagen als zu komplikationsreich herausgestellt hatte. Außer der Modifikation im Sinne der bikavalen Anastomose zur Verbesserung der Vorhofkontraktilität besteht diese Methode seit ihrer Entwicklung kaum verändert (Meiser et al. 1997). Als Vorbild für das operative Vorgehen wurde bei den chronischen Versuchen die Technik der heterotopen Herztransplantation nach Mitchell et al. gewählt, die erstmals als Versuchsmodell am Kaninchen vorgestellt wurde (Mitchell et al. 1990) und die neben ihren Eigenschaften als komplikationsärmere, praktikablere und kostengünstigere Methode allen Anforderungen in Bezug auf das Versuchsziel gerecht wurde. Dieses Vorgehen stellt eine Modifikation der Methode nach Ono und Lindsey dar (Ono und Lindsey 1969), bei der die Anastomosierung direkt an Aorta und V. cava inf. erfolgte (Kadner et al. 2000; Yokoyama et al. 1995).

Die heterotope Herztransplantation ist definiert als Positionierung des Herzens in einer ektopen Lage ohne Entfernung des nativen Herzens (Kadner et al. 2000). Diese Form der Organverpflanzung wird grundsätzlich in working- und nonworking models eingeteilt mit dem Unterschied, dass bei den non-working models das Herz zwar perfundiert wird aber nicht den Blutkreislauf des Empfängers unterstützt. Dieses Modell eignet sich lediglich für den experimentellen Bereich, ist dort jedoch wegen seiner relativen Unkompliziertheit, besserem Zugang zum Transplantat und wegen des Überlebens des Empfängertieres selbst nach Transplantatabstoßung der orthotopen Transplantation in vielen Bereichen überlegen. Zudem kann das Organ wegen seiner oberflächlichen Lage gut palpirt werden (Yasumitsu et al. 1990; Kadner et al. 2000). Desweiteren existiert noch die Möglichkeit der Transplantation mit abdomineller Positionierung als working model ebenfalls entsprechend einer Modifikation der Technik von Ono und Lindsey (Yokoyama et al. 1995; Asfour 1999). Dieses Vorgehen hätte jedoch bei unseren Versuchen keine weiteren Vorteile gebracht und lediglich die Wahrscheinlichkeit von Komplikationen wie die der Anastomoseninsuffizienzen

wegen der geringeren Verschieblichkeit im Nierenlager aufgrund der direkten Anastomisierung an die großen Gefäße noch weiter erhöht. Weiterhin ist dieses Verfahren technisch schwieriger zu bewerkstelligen und hätte vermutlich auch intraoperativ vermehrt Komplikationen verursacht.

Bei unseren Versuchen kam es zu verschiedenen Komplikationen, die in der Regel zum Versagen der Transplantate vor der Organentnahme am siebten postoperativen Tag führten und so keinen Einfluss auf die in dieser Arbeit diskutierten Versuchsergebnisse hatten. Im einzelnen waren dies in der UW+COP-Gruppe ein septischer Verlauf, eine Gefäßverlegung, in zwei Fällen therapieresistentes Kammerflimmern nach Transplantation und in einem weiteren Fall ein technischer Defekt während der Persufflation. In der HTK-Kontrollgruppe kam es in drei Fällen zur arteriellen Thrombosierung der Anastomosen und in einem Fall zu therapieresistentem Kammerflimmern. Diesen Komplikationen standen in beiden Gruppen sechs komplikationslose Verläufe gegenüber, deren Ergebnisse hier diskutiert werden.

Die Reperfusion nach Ischämie beinhaltet verschiedene Gefahren wie das Kalziumparadox, auf das an anderer Stelle eingegangen wird (vergl. 4.3.1). Desweiteren kann eine abrupte Reoxygenierung ischämischen Herzgewebes zu weiteren paradoxen Reaktionen führen. Eine Untersuchung wies nach achtstündiger isolierter Perfusion von Rattenherzen und anschließender Reperfusion mit oxygenierter KH-Lösung einen deutlichen Anstieg verschiedener Herzenzyme als Indikatoren der Gewebsschädigung nach (Hearse et al. 1973). Eine weitere Arbeit führt das jeweilige Ausmaß der Schädigung auf den Reperusionszeitpunkt zurück (Hearse 1977). So führt demnach eine Reoxygenierung während der frühen, reversiblen Phase der Ischämie (vergl. 1.2) zu lediglich reversiblen ultrastrukturellen Schäden. Eine Reperfusion während der späten irreversiblen Ischämiephase (vergl. 1.2) führt zu irreversiblen Schäden. Die Funktion wird bei früher Reoxygenierung zunächst durch vorübergehende asymmetrische Kontraktion beeinflusst, kann sich aber schließlich regenerieren. Die Schäden an Mitochondrien als Ort der oxidativen Phosphorylierung und somit ATP-Synthese sind zwar in der frühen Ischämiephase in der Regel geringfügig und reversibel. Es können jedoch nach kurzen ischämischen Phasen und anschließender plötzlicher Reperfusion ausgeprägte Schäden entstehen. Nach längerer Ischämie sind die Schäden an Mitochondrien in der Regel ausgeprägt und irreversibel. Die plötzliche Verfügbarkeit von Sauerstoff in ischämischem Gewebe ist jedoch in der Lage, eine ausgeprägte Freisetzung von Kreatinkinase hervorzurufen. Eine Hypothese für diese Beobachtung in diesem Zusammenhang ist ein plötzlicher resultierender Kalziumeinstrom (vergl.4.3.1) (Hearse 1977).

Neben den bereits genannten Schwierigkeiten besteht bei der Reperfusion die Gefahr von Elektrolytstörungen, die vermehrt nach der hypothermen Lagerung und in Abhängigkeit von der jeweiligen Konservierungslösung auftreten und in Arrhythmien und Kammerflimmern resultieren. Direkt verantwortlich ist der Einstrom von Na^+ in die ischämische Zelle während der Reperfusion mit folgender Erregungsbildungs- und leitungsstörung. Aber auch die genannten ultrastrukturellen Schäden, die eventuell nur passager auftretenden Kontraktionsstörungen oder Gefäßendothelschäden mögen dazu beitragen (Paulus 1994).

Der wesentliche Grund für die initiale Perfusion mit KH-Lösung war zunächst die Freispülung der Koronararterien von Metaboliten und Konservierungslösung, damit diese nicht in den Kreislauf des Empfängertieres gelangten. Eine sofortige Reperfusion mit Blut hätte verschiedene Probleme mit sich gebracht. So hat Blut zunächst eine höhere Oberflächenspannung als die KH-Lösung, was in Verbindung mit dem in den Herzgefäßen verbliebenen Persufflationsgas bei zunehmender Temperatur zu einer wesentlich höheren Gefahr schwerer Reperfusionsstörungen geführt hätte (Tabayashi et al. 1988; Blankenstein et al. 1997). Desweiteren hätte eine sofortige Blut-Reperfusion eine abrupte Rekalzifizierung mit einem stark erhöhten Risiko für eine Kontrakturbildung mit sich gebracht (vergl. 4.3.1).

Da die KH-Lösung keine korpuskulären Elemente wie die Erythrozyten des Blutes enthält, die in der Lage sind, Sauerstoff in chemischer Bindung zu transportieren, musste die Oxygenierung des Herzgewebes während der Reperfusion per diffusionem über einen unphysiologisch hohen Sauerstoffpartialdruck erfolgen (Poizat et al. 1994). Dieser betrug in der KH-Lösung 600 mmHg. Die Lösung wurde dem Herzen über die erste Minute mit einem Druck von 70 mmHg zugeführt, der über die restlichen neun Minuten auf 40 mmHg gesenkt wurde, um zunächst die Koronargefäße bis in die Peripherie zu öffnen ohne eine nennenswerte Ödembildung zu verursachen (Fischer et al. 1998). Die Kalziumkonzentration wurde zum allmählichen Angleich an die Blutkalziumkonzentration über die letzten fünf Minuten auf 0,8 mmol gesteigert (vergl. 4.3.1). Die Reperfusionszeit war ein Kompromiss zwischen der Notwendigkeit, Metabolite zu entfernen und das Herz auf das Blutmilieu vorzubereiten sowie der Notwendigkeit, die Gefahr der Ödementwicklung zu minimieren. Letztere war vor allem wegen des Mangels an kolloidalen Substanzen in der KH-Lösung gegeben.

An zusätzlichen Substanzen wurden Adenosin (vergl. 4.3.2) und Harnsäure zugeführt, das insbesondere in der initialen Reperfusionsphase antioxidativ wirken soll (Becker et al. 1996). Glukose und Insulin sollten einer schnellen zellulären Glukoseaufnahme dienen (vergl. 4.3.7).

Die sonstigen relevanten methodischen Aspekte werden im entsprechenden Zusammenhang diskutiert (vergl. 4.3-4.7).

4.3 Zu den Lösungen

Bei beiden Lösungen wird von Anwendung während kalter Ischämie ausgegangen. Diese soll die ATP-verbrauchenden Stoffwechselfvorgänge auf ein Mindestmaß reduzieren (Engelmann et al. 1979; Meisel et al. 1997). Die UW-Lösung wurde ursprünglich für die Dauerperfusions-Konservierung entwickelt.

Bevorzugt in klinischer Anwendung befinden sich die Lösungen UW und HTK. Eine fundamentale Klassifizierung teilt diese in intrazelluläre und extrazelluläre Lösungen ein, wobei sich diese Einteilung an den Ionenkonzentrationsverhältnissen orientiert, die in den entsprechenden Zellen herrschen (Bretschneider et al. 1984; Termignon et al. 1995). Demnach handelt es sich bei der UW-Lösung um eine intrazelluläre Stoffkombination, die durch eine hohe Kaliumionenkonzentration gegenüber einer niedrigen Natriumionenkonzentration gekennzeichnet ist, die jeweils der in den Herzzellen angeglichen ist. Dieses Ionenkonzentrationsverhältnis ist durch einen niedrigen Konzentrationsgradienten mit konsekutiver Depolarisation gekennzeichnet, die einen reduzierten aktiven Transport und somit niedrigen ATP-Verbrauch bei kalter Ischämie nach sich zieht (Engelmann et al. 1979; Termignon et al. 1995). Die vor allem in Europa bevorzugte HTK-Lösung lässt sich nicht eindeutig einteilen. Während sie einerseits durch eine mäßig hohe K^+ -Konzentration gekennzeichnet ist, besitzt sie eine der intrazellulären Konzentration entsprechende Na^+ -Konzentration. So wird die extrazelluläre Na^+ -Konzentration herabgesetzt, um die Ödembildung zu verhindern. Erhöhtes Kalium und der Mangel an Kalzium führen zur Herabsetzung der energieverbrauchenden Prozesse (Reichenspurner et al. 1993b; Hachida et al. 1996).

Die Überlegenheit der einen gegenüber der anderen Elektrolytkomposition ist seit jeher einer kontroversen Diskussion unterworfen. Während die einen Untersuchungen den Vorteil einer intrazellulären Lösung neben der Verringerung des ATP-Verbrauchs in dem verminderten Natriumeinstrom in die Zelle sehen (Termignon 1995), gehen andere Untersuchungen von Herzmuskelschäden durch hohe Kaliumkonzentrationen aus (Brambridge et al. 1977). Wieder andere Untersuchungen schlagen als Kompromiss niedrigere Kaliumkonzentrationen zur Prevention von Gewebsschäden vor (Okouchi 1990), und schließlich existieren Arbeiten,

die eine Überlegenheit der HTK-Lösung und somit der natriuminduzierten Kardioplegie feststellen (Reichenspurner et al. 1993b; Hachida et al. 1996). Da die Lösungen noch zahlreiche andere Substanzen enthalten, sollen sie an anderer Stelle einer Bewertung unterzogen werden (vergl. 4.3.7). Im Folgenden sollen die weiteren Inhaltsstoffe der beiden Lösungen diskutiert werden.

4.3.1 Zum Kalzium

Als wichtige Substanz in der elektromechanischen Kopplung spielt das Ca^{2+} eine entscheidende Rolle. Um über die mechanische Inaktivierung der Herzmuskelzellen den ATP-Verbrauch weiter zu senken, wurde in der UW-Lösung ganz auf einen Ca^{2+} -Zusatz verzichtet, während die Ca^{2+} -Konzentration in der HTK-Lösung mit 0,15 mmol/l nur einen geringen Ca^{2+} -Gehalt aufwies (Reichenspurner et al. 1993b). Untersuchungen (Fischer 1999; Termignon et al. 1995) haben ergeben, dass sich ein Ca^{2+} -Zusatz zu intrazellulären Lösungen und hier im Besonderen zur UW-Lösung negativ auf den Ruhedruck während der Herzlagerung und den ATP-Gehalt der Herzen auswirkt. Entgegen der Behauptung der rein negativen Einflüsse von der Ca^{2+} -Zugabe zur UW-Lösung weisen andere Untersuchungen auf einen protektiven Effekt vom Zusatz von 0,05 mmol/l Ca^{2+} zur Lösung im Hinblick auf das Kalziumparadox (s.u.) hin. Ein Problem bei den kalziumfreien Lösungen ergibt sich während Reperfusion mit kalziumhaltigen Lösungen. Es wird „Kalziumparadox“ genannt und wurde das erste mal von Zimmerman und Hülsmann beschrieben (Zimmermann und Hülsmann 1966). Der Begriff umschreibt den Umstand, dass isolierte Rattenherzen nach Perfusion mit Ca^{2+} -freier Lösung bei Reperfusion mit einer kalziumhaltigen Lösung einer massiven Ca^{2+} -Aufnahme unterliegen, die mit elektrischem und mechanischem Aktivitätsverlust und zusätzlich einem Verlust an intrazellulären Strukturen und Substanzen einhergeht (Boink et al. 1976; Hearse 1977; Termignon et al. 1995). Desweiteren wurde ein Verlust an energiereichen Phosphaten bei Reperfusion mit Ca^{2+} beschrieben, wobei im Falle der betreffenden Untersuchung einschränkend darauf hingewiesen werden muss, dass die Kalziumkonzentration nicht angegeben wurde (Boink et al. 1976). Dieses Phänomen, das nicht auf Rattenherzen beschränkt ist und für das eine Temperaturabhängigkeit mit vermindertem Risiko bei Temperaturen zwischen 0 und 4° C postuliert wurde (Hearse et al. 1978; Holland und Olsen 1975; Ruigrok et al. 1983), wurde zunächst für extrazelluläre Lösungen beschrieben. Bei Konservierung mit UW-Lösung über 12 h wurde das

Kalziumparadox jedoch auch für eine intrazelluläre Lösung beschrieben (Termignon et al. 1995). In einer weiteren Untersuchung (Neely und Grotyohann 1984) wurde ein Zusammenhang zwischen Laktatgehalt des Herzmuskelgewebes und dem extrazellulären Ca^{2+} -Gehalt vermutet. Diese Beobachtung ließe sich dadurch erklären, dass die normalen ATP-abhängigen Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung des physiologischen Ionentransports zwischen Sarkoplasmatischem Retikulum, Zytoplasma und Extrazellulärraum während der Ischämie nicht mehr funktionieren. So kommt es zu vermindertem Ca^{2+} -Transport in die Kalziumspeicher und vermehrter Kalziumdiffusion in die Zelle mit resultierender Ca^{2+} -Überladung. Nach Reperfusion mit oxygenierter kalziumhaltiger Lösung kommt es nach ATP-Neusynthese zu einem Na^+ -Einstrom durch einen H^+/Na^+ -Austauscher und anschließendem $2\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch mit entsprechendem zusätzlichem Kalziumeinstrom. Je länger die Ischämiedauer mit dem entsprechenden Laktatgehalt anhielt, desto geringere Ca^{2+} -Konzentrationen führten zum Kalziumparadox. In der Untersuchung wurde für eine über mehrere Minuten andauernde Perfusion bei einem Druck von 60 mmHg und einer Ca^{2+} -Konzentration von 2,5 mmol/l mit Ausschwemmung der vor der Lagerungszeit vorhandenen Glycolyseprodukte eine Minimierung des Kalziumparadoxrisikos beschrieben. Bei unseren Experimenten wurde bei der Reperfusion vorsichtig in allmählich aufsteigender Konzentration Ca^{2+} bis zu dem Zielwert von 0,8 mmol/l zugeführt, bei dem es sich um den physiologischen Serum- Ca^{2+} -Gehalt bei Schweinen handelt.

4.3.2 Zum Adenosin

Die UW-Lösung enthält als weitere Substanz u.a. Adenosin, das zusätzlich in beiden Gruppen während der Reperfusion kontinuierlich über einer Stunde intravenös zugeführt wurde. Dieses verhältnismäßig einfache Molekül hat vielfältige Wirkungen. So ist es u.a. in der Lage, die Thrombozytenadhäsion zu vermindern (Zimmer et al. 1973) und hat eine relaxierende Funktion in der Regulation des Koronarflusses. Die relaxierende Funktion wird bei den Koronararterien des Schweines endothelunabhängig über den $\text{A}_{2\text{A}}$ -Adenosinrezeptorsubtyp vermittelt, so dass die endothelabhängige Kontraktion und Relaxation nicht beeinflusst werden (Lew und Kao 1999; Zimmer et al. 1973). Des weiteren existieren Arbeiten, die der Substanz einen gewebsschutzenden Effekt hinsichtlich der Entstehung von Sauerstoffradikalen und einen mindernden Einfluss auf die Granulozytenadhäsion zuweisen (Becker et al. 1996; Hori et al. 1991).

In diesem Zusammenhang wird dem Adenosin eine protektive Rolle beim sog. „myocardial stunning“ zugewiesen. Darunter ist eine reversible Kontraktur der Herzmuskulatur zu verstehen, die neben einem Affinitätsverlust der kontraktilen Elemente zu Kalzium (Hampton et al. 1998) wahrscheinlich durch Enzymaktivierung und Lipidperoxidation mit konsekutiver Radikalentstehung verursacht wird. Adenosin scheint in der Lage zu sein, die Radikalentstehung über eine verminderte Xanthinoxidase- und Leukozytenaktivität zu verhindern (Jeroudi et al. 1994).

Der wesentliche Grund für das Adenosin als Komponente in der UW-Lösung ist jedoch ein anderer. In der UW-Lösung soll das Adenosin im Energiestoffwechsel von transplantierten Organen eine wichtige Rolle spielen (Kawai et al. 1994; Kötting und Minor 2000). Während die ATP-Neusynthese aus Ribose-5-Phosphat nach Depletion des energiereichen Phosphats zumindest in Rattenherzen vergleichsweise langsam erfolgt, existieren Untersuchungen zufolge daneben 10 bis 20 mal schnellere alternative Synthesewege auf Basis der Adenosinphosphorylierung. Extrazellulär verabreichtes Adenosin wird demnach schnell aufgenommen und phosphoryliert (Reimer et al. 1981; Rolles et al. 1984; Zimmer et al. 1973).

4.3.3 Zu den antiödematös wirksamen Substanzen

Ein zentrales Problem im Hinblick auf den koronaren Rückfluss ist neben der Kontraktur die Bildung eines Gewebsödems im Herzen (Tabayashi et al. 1988).

Grundsätzlich wird zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Ödem unterschieden. Beide Lösungen enthalten Substanzen, die aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften der Entwicklung von Ödemen vorbeugen sollen. So enthält die UW-Lösung die impermeablen Substanzen Raffinose, Sulfat und Laktobionat in nennenswerter Konzentration, während Chlorid als diffusible Komponente im Gegensatz zur HTK-Lösung nicht vorhanden ist. Dem osmotischen Effekt intrazellulärer Proteine wirkt so eine entsprechende Kraft entgegen. In einer Untersuchung war Laktobionat allein nicht in der Lage, die intrazelluläre Ödembildung im Herzen nach heterotoper Transplantation zu verhindern (Termignon et al. 1995). Eine weitere Substanz die bei Anwendung der UW-Lösung die Ödembildung verhindern soll, ist das Kolloid Pentastarch. Dieses ist jedoch nur initial während der Flushperfusion in der Lage, die Wasserakkumulation zu verhindern, scheint aber nicht der interstitiellen Ödembildung während der Reperfusion über die Erhöhung des kolloidosmotischen Drucks im Interstitium

durch Diffusion aus den Gefäßen vorzubeugen (Fischer 1999; Fischer et al. 1994). In Nieren, Pankreas und Lebern war die UW-Lösung deshalb natürlich in der Lage, die Gewebsödembildung während der Lagerung bei geringer Temperatur zu verhindern (Okouchi et al. 1990), die mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Reperfusion einsetzende Ödembildung wurde aber nicht untersucht. Als antiödematöse Substanz enthält die HTK-Lösung Mannit in ebenfalls nennenswerter Konzentration. Die Ödementwicklung bei der Herzlagerung ist für gewöhnlich bei Einhaltung der Anwendungsrichtlinien im Falle beider Lösungen gering, bei der Reperfusion mit UW-Lösung ist jedoch eine vermehrte Ödembildung festzustellen (Fischer 1999; Okouchi et al. 1990).

Untersuchungen haben ergeben, dass geringe Mengen an Hyaluronidase in der Lage sind, die Ödembildung sowohl bei Anwendung der UW-Lösung als auch im Besonderen der HTK-Lösung weiter zu reduzieren. Diese Wirkung beruht darauf, dass der Gehalt an Hyaluronsäure mit seiner hohen Wasserbindungskapazität im Herzgewebe vermindert wird (Fischer 1999; Fischer und Jeschkeit 1996; Fischer et al. 1994). Da aber dennoch die kommerziell erhältlichen Lösungen diesen Zusatz noch nicht enthalten, und so ein Vergleich mit der derzeit gängigen Praxis im Bezug auf das Verfahren nicht möglich wäre, wurde auf diesen Zusatz verzichtet.

4.3.4 Zu den Puffersubstanzen

In den Lösungen werden unterschiedliche Puffer verwendet, so dass der pH-Wert der jeweiligen Lösung über verschiedene Temperaturbereiche in physiologischen Grenzen gehalten wird (nicht unter pH ca. 6,0) (Bretschneider et al. 1984), um die vor allem durch das Laktat bedingten Schwankungen auszugleichen. Der entscheidende Puffer in der UW-Lösung ist der auch physiologisch im Blut vorhandene Phosphatpuffer, der in der vergleichsweise geringen Konzentration mit seiner im Vergleich geringen Kapazität vorzugsweise zur Pufferung während des initialen Freispülens geeignet ist. Der vorherrschende Puffer in der HTK-Lösung ist der in hoher Konzentration vorhandene Histidin/Histidinchlorid-Puffer, der über eine hohe Pufferkapazität (pK temperaturabhängig bei 35 °C 5,9, bei 25 °C 6,1 und bei 15 °C 6,3) über einen weiteren pH-Bereich verfügt und so den PH-Wert über einen längeren Zeitraum und bei unterschiedlichen Temperaturen konstant halten kann (Bretschneider et al. 1984; Fischer 1999; Hachida et al. 1996; Reichensperner et al. 1993b; Saitoh et al. 2000).

Diese unterschiedlichen Puffer prädestinieren die beiden Lösungen aufgrund ihrer Kapazität für jeweils unterschiedliche Anwendungsbereiche (vergl. 4.3.7).

4.3.5 Zu den weiteren Inhaltsstoffen

UW und HTK enthalten Magnesiumionen in ähnlichen geringen Konzentrationen. Mg^{2+} fungiert als Kalziumantagonist an Ca^{2+} -Kanälen der Ventrikelmuskulatur mit resultierend vermindertem Kalziumeinstrom in die Zellen (Almers und Mc Cleaskey 1984; Hess und Tsien 1984). Mg^{2+} ist in der Lage, Ca^{2+} an Membranen und kontraktilen Filamenten zu ersetzen, und es vermindert so die elektromechanische Kopplung (Bretschneider et al. 1984; Cooper et al. 1983). Zusätzlich hemmt Magnesium den Stoffwechsel, wirkt membranstabilisierend (Webb et al. 1966; Downes et al. 1973; Pegg und Galant 1977) und wirkt einem intrazellulären Kaliumverlust während der Organkonservierung entgegen (Green und Pegg 1979).

Die HTK-Lösung enthält Ketoglutarat und die Aminosäure Tryptophan. Diese Substanzen sollen über alternative Synthesewege den ATP-Gehalt erhöhen und so den Laktatgehalt im Herzgewebe vermindern. Tatsächlich ergaben sich für die HTK-Lösung gegenüber Lösungen, die jeweils einen dieser Stoffe nicht enthielten, im Hinblick auf den maximalen linksventrikulären Druck und den Koronarfluss signifikant bessere postoperative Werte nach Herztransplantation (Hachida et al. 1996).

Als weitere Komponente enthält die UW-Lösung Allopurinol, einen Hemmstoff der Xanthinoxidase. Es gibt Untersuchungen dahingehend (Burton et al. 1984; Chambers et al. 1985), dass dieses Enzym schon nach kurzer Zeit in ischämischem Gewebe vermehrt aus Xanthindehydrogenase gebildet wird und in der Lage ist, bei der Oxidation freier Purinbasen das Superoxid anion und Radikal O_2^- als wichtige Quelle der Gewebsschädigung in großer Menge zu produzieren. Die Blockade der Xanthinoxidase wird vor allem als sinnvolle protektive Maßnahme in der Phase der frühen Ischämie beurteilt.

Eine weitere Möglichkeit, die Menge an Radikalen zu vermindern besteht im Einsatz von sog. Radikalfängern. Eine solche antioxidativ wirksame Substanz ist das reduzierte Glutathion, dessen Produktion über die physiologisch vorhandene Glutathionperoxidase während Ischämie stark reduziert ist und das als Komponente in der UW-Lösung vorhanden ist, um diesen Glutathionmangel abzumildern (Burton et al. 1984). Ein wesentliches Problem bei

dieser Komponente ist die Umwandlung der reduzierten Form in die weniger wirksame oxidierte Form, die zudem nur eine Halbwertszeit von ca. 4 Tagen besitzt. Es existieren Untersuchungen (Fischer 1999; Fischer und Jeschkeit 1995), denen zufolge die Notwendigkeit eines Zusatzes an reduziertem Glutathion zur Lösung kurz vor Gebrauch besteht. Dieser Zusatz bewirkt tatsächlich eine signifikante Verbesserung von LVP und ECP bei Anwendung der UW-Lösung und wurde bereits in die Anwendungsrichtlinien für die UW-Lösung aufgenommen.

An weiteren Zusätzen kurz vor Gebrauch enthält die UW-Lösung Dexamethason, Penicillin und Insulin. Dexamethason soll membranstabilisierend wirken und Insulin die zelluläre Glukoseaufnahme verbessern (Southard et al. 1990). Der Zusatz von Glukose und Insulin war in einer Untersuchung in der Lage, den ATP-Gehalt in Rattenherzen nach 5 h Ischämie auf 139 % gegenüber der Kontrolle zu erhöhen, konnte die Funktion der Herzen aber nicht verbessern (de Wit 1988). Bakteriellles Wachstum in Lösung und Transplantat soll durch Penizillin verhindert werden. Die Notwendigkeit der antibiotischen Prophylaxe bei hypothermer Lagerung ist nicht belegt.

4.3.6 Zur Filterung der UW-Lösung unmittelbar vor Gebrauch

Bei der UW-Lösung existiert eine Besonderheit in Bezug auf darin enthaltene Partikel von 5-100 µm Durchmesser, die aufgrund ihrer Aggregationsfähigkeit in der Lage sind, selbst größere Gefäße zu verstopfen. Diese Partikel bestehen aus Stearin- und Palmitinsäure und setzten in einer Untersuchung (Fischer 1999; Fischer und Jeschkeit 1996) die Konservierungszeit gegenüber der kurz vor Gebrauch gefilterten Kontrolle herab. Die Herkunft der Partikel wird in den zur Aufbewahrung verwendeten PVC-Beuteln vermutet. Die Anwendungsrichtlinien für die UW-Lösung beinhalten seit 1996 die Anweisung zur Filterung der Lösung mit einem Filter mit einer Porengröße von 40 µm. Noch effektivere Maßnahmen werden im Rudolf-Virchow-Klinikum Berlin durchgeführt, wo die Lösung in nicht PVC-haltigen Beuteln gelagert und mit Filtern mit einer Porengröße von 8 µm gefiltert wird, oder im St. Luc Hospital in Brüssel, wo Filter mit 5 µm Porengröße verwendet werden (Fischer 1999)

4.3.7 Zum optimalen Einsatzbereich der Lösungen und zur maximalen Lagerungszeit

Auf die kontroverse Diskussion bezüglich der in unseren Versuchen verwendeten Lösungen im Hinblick auf die Herztransplantation wurde bereits hingewiesen. Im Folgenden soll das Problem näher erläutert werden.

Eine grundlegende Arbeit befasst sich u.a. mit dem optimalen Einsatzbereich für die Lösungen in Bezug auf ihre Inhaltsstoffe. So wird die HTK-Lösung entsprechend ihrer großen Pufferkapazität über einen weiten pH-Bereich als besonders geeignet für die Kurzzeitlagerung auch über einen größeren Temperaturbereich beurteilt. Die UW-Lösung wird aufgrund ihres Gehaltes an hochmolekularen Substanzen als ideal für die Langzeitlagerung und für die kontinuierliche Perfusion bewertet, da hier die Verminderung der Ödementwicklung ein vorrangiges Ziel ist (Fischer 1999). Entsprechend wird die HTK-Lösung zumindest in Europa hauptsächlich für Herztransplantationen verwendet, die UW-Lösung findet in erster Linie in der Leber- und Nierentransplantation Anwendung (Reichenspurner et al. 1993a u. b).

Die Langzeitlagerung mit möglichst effektivem Funktionserhalt ist seit jeher das Ziel mit der höchsten Priorität bei der Anwendung von Perfusionslösungen. Die Diskussion um die Lösungen betrifft dementsprechend zum großen Teil diese grundlegende Zielsetzung. In einer Untersuchung (Termignon 1995) wurden nach heterotoper Kaninchenherz-transplantation für die UW-Lösung gegenüber einer extrazellulären Lösung signifikant höhere Werte für den LVP und $+dp/dt$ nach sechsständiger Lagerungszeit gefunden, wobei diese guten Funktionswerte allein auf die spezielle Elektrolytkomposition zurückgeführt wurden, da mit einer Vergleichslösung mit Laktobionat als einzigem Zusatz ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. In einer weiteren Arbeit (Stringham et al. 1992) mit heterotoper Transplantation von Hundeherzen wurde die sichere Ischämiezeit bei Verwendung der UW-Lösung nach Bewertung des Plasma-CK-Gehaltes, der linksventrikulären Kontraktilität und nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei mindestens 8 Stunden gesehen. Obwohl vereinzelt erfolgreich Ischämiezeiten von bis zu 15 h erreicht worden sein sollen, zeigten sechzehn Stunden konservierte Herzen ausgeprägte Funktionseinbußen und elektronenmikroskopisch sichtbare strukturelle Veränderungen (Mori et al. 1994). In einer retrospektiven Studie wurde die sichere Ischämiezeit bei Herztransplantation unter Verwendung der UW-Lösung in Bezug auf frühes Organversagen ebenfalls bei ungefähr sechs Stunden gesehen (Reichenspurner et al. 1993a). In einer Arbeit wird die Überlegenheit der HTK-Lösung gegenüber der UW-Lösung im Langendorff-Versuch mit Rattenherzen nach achtständiger Lagerung in Bezug auf Aortenfluss, Koronarfluss, Auswurfvolumen,

linksventrikuläre Funktion und Funktionserhalt der Koronararterien festgestellt (Saitoh et al. 2000). In anderen In-Vitro-Versuchen mit Rattenherzen fanden sich nach sechsständiger Lagerung für ähnliche Parameter nahezu präoperative Werte (Hachida et al. 1996). Eine retrospektive Studie weist hingegen darauf hin, dass die Überschreitung von 4 Stunden Ischämiezeit zu einer signifikanten Zunahme der Frühsterblichkeit nach Herztransplantation bei Verwendung der HTK-Lösung führt, bescheinigt ihr ansonsten jedoch gute Ergebnisse (Reichspurner et al. 1993b). In der erstgenannten retrospektiven Studie (Reichenspurner et al. 1993a) werden der HTK-Lösung jedoch im Vergleich mit der UW-Lösung signifikant schlechtere Funktionsergebnisse bei kürzerer Lagerung attestiert, wobei es sich nahezu um die gleichen Autoren handelt.

Zur Zeit muss demnach besonders im Hinblick auf die retrospektiven Studien davon ausgegangen werden, dass die Zeitlimitation für die Herzlagerung bei Verwendung der UW-Lösung bei maximal 6 Stunden und für die der HTK-Lösung bei maximal 4 Stunden liegt, sofern die derzeit üblichen Konservierungsverfahren wie die Flush-Perfusion angewendet werden. Diese Feststellung wäre mit der ursprünglichen Klassifikation der UW-Lösung als reiner Perfusionslösung kompatibel.

4.4 Zur Amplitude des linksventrikulären Druckes, der maximalen Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit

Um die Vergleichbarkeit der Funktionsparameter innerhalb und zwischen den Gruppen zu gewährleisten, wurden LVP, $-dp/dt$ und $+dp/dt$ bei einem einheitlichen enddiastolischen Ventrikeldruck von 10 mmHg gemessen. Die Herzfrequenzen der Transplantate wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf, so dass ein möglicher positiv inotroper Effekt der Frequenz auf den LVP kaum eine Rolle bei den Unterschieden gespielt haben mag. In unseren Untersuchungen fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der LVP war in der UW+COP-Gruppe im Mittel höher als in der Kontrollgruppe, während die mittleren Kontraktions- und Relaxationszeiten im Vergleich in der UW+COP-Gruppe geringer waren. Die funktionellen Parameter weisen darauf hin, dass die Methode der COP in der Lage war, die mechanische Funktion der Herzen weitgehend aufrecht zu erhalten. Ischämie ist grundsätzlich in der Lage, die mechanische Herzfunktion wesentlich herabzusetzen. So wurden in einer Untersuchung (Engelmann et al. 1978) Schweineherzen zunächst über Herz-Lungen-Maschine perfundiert, anschließend hypothermer (4-8 °C)

Ischämie bis zu 180 min ausgesetzt und schließlich bei schlagendem Herzen 30 bzw. 60 min erneut perfundiert. Die Kontraktilität war nach dieser Prozedur signifikant vermindert. Sauerstoff während der Konservierung scheint jedoch in der Lage zu sein, die mechanische Funktion von Herzen nach Transplantation weitgehend aufrecht zu erhalten (vergl. 4.5.2). Die unseren Versuchen voraus gehenden Untersuchungen mit vierzehnstündiger COP-Konservierung und einer Überlebenszeit der Schweine von drei Stunden stimmen dahingehend mit unseren Untersuchungen überein (Fischer et al. 1998; Kuhn-Régnier et al. 2000).

4.5 Zum Wassergehalt der Gewebeproben und zur biochemischen Analyse

4.5.1 Zum Wassergehalt

Die Probenentnahme erfolgte entsprechend der Technik nach Wollenberger (Wollenberger et al. 1960). Durch diese Methode wird das Einfrieren der Gewebeproben bei weitgehend unverändertem Gehalt der in unseren Versuchen bestimmten Substanzen außer der CK (s.u.) ermöglicht und das sog. Leidenfrostphänomen, die Entstehung einer isolierenden Gasschicht, verhindert.

Die Unterschiede des Wassergehaltes in den Gewebeproben nach einer Woche waren in den beiden Gruppen nur geringfügig. Dies mag zum einen in der Effektivität der antiödematös wirksamen Substanzen in den beiden Lösungen liegen, die schon in anderen Untersuchungen nachgewiesen wurde (vergl. 4.3.3). Zum anderen ist jedoch bemerkenswert, dass der Wassergehalt der Gewebeproben in der UW+COP-Gruppe bei wesentlich längerer Lagerungszeit dem der Proben in der HTK-Gruppe vergleichbar ist. Die Methode der Sauerstoffpersufflation führt nach den vorliegenden Ergebnissen auf jeden Fall im Vergleich mit der Kontrolle nicht zu einer Zunahme der Ödementwicklung.

4.5.2 Zu den energiereichen Phosphaten und zum Energy Charge Potential

Als Summe der ATP-, ADP- und AMP-Werte ergab sich die Summe der Adeninnukleotide (SAN), über die sich als Nenner im Quotienten mit der Summe von ATP- und halbiertem ADP-Wert das „energy charge potential“ ($ECP = (ATP + \frac{1}{2} ADP) / SAN$) als Maß für den

Phosphorylierungsgrad der Adeninnukleotide errechnen ließ. Der ATP-Gehalt wurde zudem isoliert betrachtet.

Die Mittelwerte für den ATP- und SAN-Gehalt waren in den unterschiedlichen Herzregionen ähnlich und nicht signifikant. Die einzige energetisch beanspruchte Region, der rechte Ventrikel, hatte den höchsten mittleren Gehalt an Adeninnukleotiden. Dies lässt sich möglicherweise mit einer besseren Anpassung an die besondere Stoffwechsel- und Durchblutungssituation entsprechend der Belastung und kürzeren Diffusionsstrecken im dünneren rechten Ventrikel erklären. Der Anteil des ATP an der SAN in den jeweiligen Herzregionen war hoch (vergl. 3.5.2 und 3.5.3). Da die Differenzen des ATP-Gehaltes in den beiden Gruppen unerheblich waren, lässt sich daraus wiederum auf einen vergleichbaren ATP-Erhalt bzw. eine vergleichbare ATP-Neusynthese in den Gruppen schließen. Ein Unterschied ist demnach nicht festzustellen. Welchen Anteil daran das in der UW-Lösung enthaltene bzw. insbesondere das in beiden Gruppen während der Reperfusion zugeführte Adenosin ausmacht, muss der Spekulation überlassen sein, da alle Herzen mit diesem Substrat der ATP-Synthese versorgt wurden (vergl. 4.3.2). Beim ECP waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auszumachen. Auch hier fanden sich im Bereich des rechten Ventrikels die höchsten Werte.

Unter ischämischen Bedingungen ist die ATP-Gewinnung über die anaerobe Glykolyse im Vergleich zu der unter aeroben Bedingungen stark defizitär. So werden bei der anaeroben Glykolyse für ein Mol Glukose lediglich zwei Mol ATP produziert, während das Verhältnis bei der oxidativen Phosphorylierung eins zu sechsunddreißig beträgt. Zusätzlich ist unter ischämischen Bedingungen der Adeninnukleotid-Pool im Vergleich niedrig, da nach ATP-Dephosphorylierung ADP und ADP rasch zu weiteren diffusiblen Substanzen wie Adenosin, Inosin, Hypoxanthin und Xanthin abgebaut werden, die leicht aus dem Gewebe ausgewaschen werden (Zimmer et al. 1973). Diese Umstände sind umso schwerwiegender als der ATP-Verbrauch, wenn auch reduziert, während der Ischämie weiter besteht und während der Reperfusion durch einen höheren Energiebedarf für die Reparatur der durch die Ischämie verursachten Schäden ansteigt (Bretschneider et al. 1984; Neely und Grotyohann 1984; Reimer et al. 1981; Rosenkranz et al. 1986; Zimmer et al. 1973). Auf die Möglichkeiten der postischämischen ATP-Synthese als Neusynthese ausgehend vom Ribose-5-Phosphat und Adenin oder Inosin oder über die bis zu zwanzig mal schnelleren alternativen Synthesewege mit Adenosin als Substrat wurde bereits hingewiesen (vergl.4.3.2). Der Wert der jeweiligen Konservierungsmethode liegt in ihrem Vermögen, den Verbrauch der ATP-Speicher bei möglichst gutem Funktionserhalt der Organe zu limitieren (Bretschneider et al. 1984; Coetzee

et al. 1986; Reibel et al. 1978; Rosenkranz et al. 1986). Über seine Funktionen im Zellstoffwechsel ist das ATP in der Lage, ischämischen Schäden über die Aufrechterhaltung der transmembranären Transportmechanismen vorzubeugen (Bretschneider 1979 u. 1984; Parrat und Marshall 1974). Desweiteren ist ein Verlust an ATP direkt für eine erhöhte Kontrakturteilung der Herzen verantwortlich, da sich die Myosinquerbrücken ohne ATP nicht vom Aktin lösen können (vergl. 1.2). Das ECP ist ebenfalls ein sinnvoller Parameter für den ATP-Gehalt im Gewebe, der eine gute Aussage über den augenblicklichen zellulären Energiestatus ermöglicht (Atkinson 1968; Fischer et al. 1998).

Der Gehalt der Herzen an energiereichen Phosphaten nach einer Woche kann nicht isoliert betrachtet werden, sondern muss im Zusammenhang mit dem mechanischen Funktionserhalt nach der Transplantation gesehen werden, der das zu erreichende Ziel der Organkonservierung darstellt. In wie fern der postischämische Gehalt an ATP, ADP und AMP einen prädiktiven Parameter für den mechanischen Funktionserhalt des Herzens darstellt ist umstritten. So wurden in einer Untersuchung Schweineherzen zunächst über Herz-Lungen-Maschine perfundiert, anschließend hypothermer Ischämie bis zu 180 min ausgesetzt und schließlich bei schlagendem Herzen 30 bzw. 60 min erneut perfundiert. Hier stellte sich der ATP-Gehalt als kein guter Voraussagewert für den Funktionserhalt der Herzen heraus (Engelmann et al. 1979). Eine ähnliche Untersuchung mit Hundeherzen und einer Ischämiezeit von bis zu 45 min kam zu dem selben Ergebnis (Rosenkranz et al. 1986). Als Erklärung für diese grundsätzliche Beobachtung wurde eine mögliche Kompartimentierung des ATPs angeboten (Rosenkranz et al. 1986; de Wit 1988). Dies würde bedeuten, dass ein Teil der ATP-Vorräte in der Zelle nicht für die Kontraktion der Filamente zur Verfügung stünde. Im Gegensatz zu den erwähnten Untersuchungen wurde im Langendorff-Versuch mit Ratten nach 30 minütiger Perfusion mit KH-Lösung unter ischämischen Bedingungen bei 37 °C eine positive Korrelation zwischen ATP-Gehalt und mechanischem Funktionserhalt gefunden (Reibel et al. 1978). In weiteren Untersuchungen mit Rattenherzen im Langendorff-Versuch als Working-Heart-Modell (vergl. 4.2) und bis zu 180 minütiger Perfusion mit oxygenierter KH-Lösung unter hypothermen Bedingungen wurde eine positive lineare Beziehung zwischen ATP-Gehalt und mechanischen Parametern gefunden (Coetzee et al. 1986). Gerade diese letztgenannte Untersuchung kann ein Hinweis darauf sein, dass der Gehalt an ATP zumindest dann ein nützlicher prädiktiver Parameter für den mechanischen Funktionserhalt von Herzen nach Transplantation ist, wenn nicht gänzlich anoxische Bedingungen herrschen, sondern das Organ oxygeniert wird. In den vorausgegangenen

Persufflationsversuchen mit Schweineherzen korrelierte der ATP-Gehalt sehr gut mit dem erreichten mechanischen Funktionserhalt (Fischer et al. 1998; Kuhn-Régnier et al. 2000).

Über die Dephosphorylierung des Kreatinphosphats (CrP) und die anschließende Rephosphorylierung von AMP im enzymatischen Prozess über die Kreatinkinase kann der ATP-Gehalt des Herzgewebes kurzfristig bis zum CrP-Verbrauch gerade unter sauerstoffdefizitären Bedingungen bis zu einem gewissen Maß aufrecht erhalten werden. So ist der Anteil des energiereichen phosphorylierten Kreatins am gesamten Kreatin (CrP+Cr) theoretisch ein guter Parameter zur Einschätzung des energetischen Zustandes des Herzens. Gerade der kurzfristige Verbrauch des CrP unter hypoxischen Bedingungen führt jedoch zum sofortigen Abfall nach Gewebentnahme, so dass es nach Anwendung der von uns favorisierten Entnahmetechnik nicht möglich war, die jeweiligen tatsächlichen CrP-Gehalte festzustellen.

4.5.3 Zum Glykogengehalt der Herzen

Eine zu erwartende Beobachtung in unseren Versuchen war der in allen Herzregionen tendenziell niedrigere Glykogengehalt in der UW+COP-Gruppe, der notwendigerweise mit der wesentlich längeren Lagerungszeit ohne Substratzufuhr einhergeht. Obwohl die Unterschiede der Glykogengehalte in den jeweiligen Herzregionen zwischen den Gruppen augenscheinlich sind, müssen sie mangels Signifikanz als tendenziell bezeichnet werden. Die metabolischen Bedingungen der sauerstoffpersufflierten Herzen scheinen es ermöglicht zu haben, die Glykogenvorräte weitgehend aufrecht zu erhalten bzw. die Wiederherstellung derselben weitgehend zu ermöglichen. Im Zusammenhang mit den Beobachtungen im Hinblick auf die Herzfunktion scheinen die Unterschiede im Glykogengehalt keinen wesentlichen Einfluss gehabt zu haben. Über den möglichen Einfluss auf die Laktatentstehung kann eine Woche nach der Transplantation nur sehr bedingt eine Aussage gemacht werden (vergl. 4.6.5). Interessant ist die Beobachtung, dass wiederum energetisch weniger beanspruchte Herzregionen einen höheren Substratgehalt aufwiesen als die mehr beanspruchten.

Bei fehlender Perfusion wird die vorhandene Glukose innerhalb kurzer Zeit in die Zellen transportiert und dort metabolisiert. Über die Glykogenolyse wird bei Glukosemangel eine Bereitstellung dieses Substrats für die Energiegewinnung gewährleistet. Im Hinblick auf die Herzkonservierung bringt dieser ansonsten sinnvolle Prozess jedoch einige negative Effekte

mit sich. So ist im nicht perfundierten Organ die Glykogenolyse über die Glukosefreisetzung und anschließende anaerobe Glykolyse einer der Hauptfaktoren für die Laktat bedingte Gewebsazidifizierung (Stringham et al. 1992). Schon in der frühen reversiblen Phase der Ischämie ist der Verlust der intrazellulären Glykogenpartikel eine der ersten elektronenmikroskopisch zu beobachtenden Veränderungen (Hearse 1977). In Versuchen hat die Reoxygenation von zunächst über zehn Minuten anoxisch perfundierten Rattenherzenerzen zwar zur Wiederherstellung der präischämischen ATP- und Kreatinphosphatbestände beigetragen, der Glykogengehalt war jedoch unverändert niedrig. Demgegenüber hat sich in den selben Versuchen ein niedriger präischämischer Glykogengehalt als ein wesentlicher Faktor für die Wiederherstellung der mechanischen Funktion herausgestellt (Neely und Groyohann 1984). Korrespondierend mit dieser Beobachtung wurde in Ischämieversuchen mit Hundeherzen die Feststellung gemacht, dass ein Glykogenverlust mit einer postischämischen Funktionsminderung der Herzen einhergeht (Reimer et al. 1981). Ein Grund für diese Beobachtung mag eine aus dem Glykogenabbau resultierende Gewebsazidifizierung sein.

4.5.4 Zum Glukosegehalt der Herzen

Der Glukosegehalt der Herzen ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So ist er zunächst ein Resultat der Glykogenolyse (vergl. 4.5.3). Er ist jedoch auch direkt vom Blutglukosegehalt über die Koronardurchblutung abhängig. Der mittlere Blutglukosegehalt war zum Entnahmezeitpunkt in beiden Gruppen sehr ähnlich. Demgegenüber waren die mittleren Gewebegehalte im Vergleich unter den Gruppen aber jedoch auch innerhalb der jeweiligen Gruppen in den unterschiedlichen Herzregionen sehr ungleich verteilt. Die teilweise großen Standardabweichungen weisen zudem auch unter den einzelnen Tieren auf eine große Streubreite der entsprechenden Werte hin. Die Unterschiede der Glukosegehalte in den einzelnen Herzregionen waren zwischen den Gruppen allesamt nicht signifikant. Da die mittleren Blutglukosewerte über den Gewebsglukosegehalten lagen, haben sie wahrscheinlich einen wesentlichen Einfluss auf letztere gehabt. Lokale Faktoren wie eine ungleiche Blutversorgung und unterschiedliche metabolische Faktoren haben wahrscheinlich ebenfalls einen wichtigen Beitrag geleistet, wobei sich diese Faktoren mit den von uns angewendeten Methoden nicht differenzieren lassen.

4.5.5 Zum Laktatgehalt der Herzen

Der Laktatgehalt des Herzgewebes ist in erster Linie direkt vom Blutlaktatgehalt abhängig. Der mittlere Blutlaktatgehalt war in beiden Gruppen identisch. Bei Betrachtung der Einzelwerte lag der Gewebslaktatgehalt abgesehen von drei Ausnahmen immer über dem Blutlaktatgehalt, was sich durch eine grundsätzlich nach einer Woche im Herzgewebe herrschende anaerobe Stoffwechsellaage erklären lässt. Hinsichtlich der entsprechenden Gewebsgehalte fanden sich keine signifikanten Unterschiede, eine deutliche Tendenz einer Gruppe zu vergleichsweise höheren Laktatgehalten ließ sich nicht ausmachen. Nicht beanspruchte Herzregionen wiesen vergleichsweise höhere mittlere Gehalte an Laktat auf, dies mag mit der Stoffwechselsituation in den linken Herzregionen und einer längeren Diffusionstrecke für den Abtransport des Laktats zusammenhängen (vergl. 4.5.2). Die unterschiedlichen Konservierungsmethoden haben demnach nicht zu wesentlichen Unterschieden im mittleren Gewebslaktatgehalt in den Gruppen eine Woche nach Transplantation geführt. Auch die Verteilung der Laktatgehalte in den verschiedenen Herzregionen innerhalb einer Gruppe war ähnlich. Die Anwendung der Sauerstoffpersufflation über 14 h war demnach in der Lage, den Laktatgehalt in Kombination mit der entsprechenden Reperfusionmethode auf ein Maß zu reduzieren, das dem mit der einfachen hypothermen Lagerung über 3 h erreichten vergleichbar war.

4.6 Zu den Herzenzymen

4.6.1 Zum kardialen Troponin T

Das kardiale Troponin T (cTnT) ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 37 kDa. Es fungiert als Untereinheit im myofibrillären Troponinkomplex. 95 % des cTnT ist myofibrillär gebunden, der Rest liegt in zytosolisch gelöster Form vor. Das cTnT weist spezifische Antigenstrukturen auf, die eine eindeutige Differenzierung von dem im Skelettmuskel vorhandenen Troponin T und kardialen Isoformen wie dem Troponin I ermöglichen (Faulk et al. 1998; Halwachs et al. 1996; Hokl et al. 1999). Die Freisetzung von cTnT aus unterschiedlichen Zellkomponenten ist das Ergebnis myokardialer Ischämie, und der Nachweis dieser Moleküle im Serum kann als spezifischer Indikator für das Ausmaß der myokardialen Schädigung unabhängig von der Lokalisation und der Verteilung des zellulären

Schadens dienen (Carrier et al. 1994). Bei Menschen und Tieren, die keine myokardiale Schädigung aufweisen, ist kein cTnT im Serum nachweisbar (Faulk et al. 1998).

In unseren Versuchen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf den Verlauf der Serum-cTnT-Konzentration über die ersten drei Stunden und die anschließenden sieben Tage, wobei hier einschränkend auf die differierenden Fallzahlen hingewiesen werden muss. Der grundsätzliche Verlauf war jedoch ähnlich. So fanden sich zwar in der UW+COP-Gruppe zunächst über die ersten 2 h höhere Werte, was mit Rücksicht auf die unten gemachten Ausführungen über die Korrelation mit der Ischämiezeit ein Hinweis auf die längere Konservierungszeit sein mag, 3 h nach Transplantation fanden sich jedoch in beiden Gruppen sehr ähnliche Werte. Der Verlauf über die Tage war dementsprechend. So erschienen die jeweiligen mittleren Maximalwerte in den Gruppen zwar in eintägigem Abstand, es handelte sich jedoch um sehr ähnliche Werte um 20 ng/ml. Die Normalisierung wurde in beiden Gruppen wieder am fünften Tag erreicht. Der grundsätzliche Verlauf der Serum-cTnT-Konzentration über sieben Tage nach Transplantation und die gemittelten Maximalwerte sprechen dafür, dass die unterschiedlichen Methoden bei Verwendung der unterschiedlichen Lösungen lediglich zu vergleichbaren myokardialen Schäden geführt haben. Bemerkenswert ist in beiden Gruppen die frühe Normalisierung der Werte bereits am fünften Tag.

Das kardiale Troponin T hat sich in verschiedenen Untersuchungen als sinnvoller Verlaufsparemeter im Rahmen der koronaren Herzkrankheit erwiesen, die eine bedeutsame Ursache für das Herzversagen ein Jahr nach Transplantation darstellt (He und Yang 1998, Neely und Grotyohann 1984). Dementsprechend spielt das cTnT auch eine bedeutende Rolle als Risikofaktor hinsichtlich der instabilen Angina pectoris und in der Infarkt Diagnostik, wo es zuerst Bedeutung gewann (Faulk et al. 1998; Halwachs et al. 1996; Walpoth et al. 1995). Zudem ist das cTnT ein routinemäßiger Parameter für den Verlauf der Thrombolyse Therapie, bei Koronarverschluss und bei der Quantifizierung perioperativer Insulte.

In Ischämieversuchen mit Rattenherzen wurde die maximale Serum-cTnT-Konzentration während myokardialer Ischämie nach 6 bis 12 h erreicht. Der Verlauf war aufgrund der ungleichen Verteilung in der Zelle teilweise biphasisch (Walpoth et al. 1995). In anderen Untersuchungen wurde ein Maximalwert nach ca. 24 h gefunden (Carrier et al. 1994), in einer weiteren Arbeit war der Verlauf bei Patienten nach orthotoper Transplantation biphasisch mit Maximalwerten nach ca. 5 und 10 Tagen bzw. ca. 8 und 15 Tagen jeweils abhängig vom Pulmonalarteriendruck (Halwachs et al. 1996). In der Frage der Korrelation von cTnT-Serumkonzentration und Ischämiezeit lässt sich nach der Meinung einiger Autoren wenn

überhaupt lediglich in der initialen Anstiegsphase eine Aussage machen (Carrier et al. 1994; Halwachs et al. 1996). Über die Normalisierung der cTnT-Werte nach Transplantation kann ebenfalls keine eindeutige Aussage gemacht werden, da der Verlauf insgesamt stark von Art und Ausmaß der Schädigung abhängt. Diese sind wiederum vom Alter und der Konstitution des Spenders, der Ischämiezeit und von der angewendeten Konservierungs- und Reperfusionmethode abhängig (Carrier et al. 1994). Eine Artspezifität mag zudem ein wesentlicher Faktor sein. Nach den erwähnten humanen orthotopen Transplantationen (s.o.) wurden jedoch erst nach ca. 20 Tagen Normalwerte gefunden (Halwachs et al. 1996).

Der cTnT-Nachweis scheint an sich schon ein wertvoller Indikator der Gewebsschädigung sein, und er erscheint für den Methodenvergleich in unseren Versuchen prädestiniert, da hier die wesentlichen Unterschiede in der Konservierungsmethode und der Konservierungszeit liegen.

Ein relativ neuer Gesichtspunkt ist die Verwendung der Serum-cTnT-Konzentration als Verlaufparameter im Rahmen der Transplantatabstoßung. So sind frühe Organschäden ein wesentlicher Faktor hinsichtlich von Spätkomplikationen nach Herztransplantation (Faulk et al. 1998). Um frühe Abstoßungserscheinungen einigermaßen sicher diagnostizieren zu können, sind bisher bis zu 20 Biopsieentnahmen im ersten Jahr nach Transplantation notwendig, was neben den Unannehmlichkeiten für den Patienten und den hohen Kosten alle Risiken einer invasiven Prozedur wie die Blutungs- und Infektionsgefahr mit sich bringt (Halwachs et al. 1996). Demgegenüber besteht die neuere Möglichkeit der cTnT-Bestimmung im Serum über einen spezifischen Antikörpertest, der auch im Rahmen unserer Versuche zur Anwendung kam (Halwachs et al. 1996; Walpoth et al. 1995). Über die Sensitivität und Spezifität dieses Tests im Hinblick auf die Anwendbarkeit im Rahmen der Abstoßungsdiagnostik gehen die Meinungen jedoch weit auseinander, so dass weitere Untersuchungen notwendig scheinen (Halwachs et al. 1996; Walpoth et al. 1995).

4.6.2 Zur Kreatinkinase

Die Kreatinkinase (CK) ist ein Enzym, das über die Phosphorylierung des Kreatins in der Lage ist, den zellulären ATP-Gehalt gerade unter sauerstoffdefizitären Bedingungen um ein Vielfaches schneller aufrechtzuerhalten als dies über die oxidative Phosphorylierung möglich ist (Nascimben 1996).

Die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der Kreatinkinaseaktivität über die ersten 3,5 h bzw. über die Tage muss mit Einschränkungen erfolgen. So soll an dieser Stelle auf die teilweise geringen Fallzahlen hingewiesen werden, die vor allem über den Verlauf über die Tage für die Kontrollgruppe vorlagen.

Im Verlauf über die ersten 3,5 h fanden sich mit einer vergleichsweise guten Datenlage für beide Gruppen ein sehr ähnlicher Verlauf eines deutlichen Enzymanstiegs ohne signifikante Unterschiede. Im Verlauf über die Tage war vor allem in der UW+COP-Gruppe ein erwartungsgemäßer Verlauf ausgehend von einem hohen Aktivitätsniveau mit allmählicher Normalisierung um den fünften Tag herum auszumachen. Dies geschah auf der Basis einer unabhängig vorhandenen Enzymaktivität, die durch die operationsbedingte CK-Freisetzung hervorgerufen wurde, so dass die Aktivitätswerte nicht zum präoperativen Niveau zurückkehrten. Auch über die beobachteten Tage kam es wahrscheinlich durch permanenten Gewebsuntergang aufgrund von ausgeprägten Entzündungserscheinungen im Operationsgebiet durchgehend zur CK-Freisetzung, so dass die grundsätzliche Aktivität erhalten blieb. Hier war die Datenlage vergleichsweise gut. Problematisch war der Verlauf im Falle der Kontrollgruppe. Hier lagen die wenigen vorhandenen Werte so weit auseinander, dass die Standardabweichungen in den ersten drei Tagen größer als die Mittelwerte waren. Insgesamt können die Daten lediglich als Tendenz gewertet werden. So scheinen die Werte, die über die ersten drei Tage vorlagen, einzeln betrachtet und der anschließende Verlauf auf grundsätzlich höhere Werte in der Kontrollgruppe lediglich hinzuweisen. Allerdings ist diese Feststellung aufgrund von möglichen wesentlichen Unterschieden in der operations- und entzündungsbedingten Enzymaktivität fragwürdig, die sich im Falle der Kontrollgruppe nicht ausreichend abgrenzen lässt (s.u.). So kann zumindest den Werten, die den Verlauf über die Tage betreffen, kaum eine Aussagekraft im Hinblick auf den Gruppenvergleich beigemessen werden. Für den initialen CK-Anstieg wurde jedoch eine Korrelation mit ischämiebedingten Schäden nahegelegt (s.u.), so dass die halbstündigen Veränderungen in den ersten 3,5 h auf einen ähnlichen ischämiebedingten Schädigungsmechanismus in beiden Gruppen zumindest hinweisen mögen.

Die CK hat drei Isoenzyme. So kommt die CK-MM hauptsächlich im Skelettmuskel vor, die CK-BB im Hirn und die CK-MB unter anderem im Herzen. Die CK-MB ist jedoch auch im Skelettmuskel, der Leber, der Lunge und im Intestinaltrakt nachweisbar, so wurde für den Quotienten aus CK-MB und Gesamt-CK eine höhere Aussagekraft behauptet (Benoist et al. 1997). In anderen Untersuchungen (Fischer et al. 2001) wurden für das Schwein in Darm, Leber und Lunge signifikant höhere CK-MB/Gesamt-CK-Quotienten nachgewiesen als in

gesunden Herzen gefunden wurden. Diese offensichtliche Unspezifität macht den CK-MB/Gesamt-CK-Quotienten zu einem bedingt aussagekräftigen Parameter hinsichtlich der myokardialen Schädigung nach Transplantation. Auch andere Arbeiten weisen auf diesen Umstand hin (Anderson et al. 1995). Für unsere Experimente mag dies erst recht gelten, da durch den großen abdominellen Eingriff eine geringe Traumatisierung von Skelettmuskel und Darm entstanden sein mag. Diese Umstände machten den genannten Quotienten für unsere Versuche zu einem entsprechend unselektiven Parameter, so dass die Gesamt-CK-Aktivität als mindestens ebenso aussagekräftiger Wert bestimmt wurde.

Zunächst noch unbeeinflusst von den erwähnten Untersuchungen hinsichtlich der Aussagekraft der CK-MB stellt diese im klinischen Alltag einen Standardparameter zur Herzinfarkt Diagnostik dar. Die weiteren routinemäßigen Indikationen sind denen für die cTnT- Diagnostik ähnlich (vergl. 4.6.1). Die CK wird grundsätzlich bei zellulärem Schaden freigesetzt und kann auch im Rahmen der Transplantationsdiagnostik als Hinweis auf durch Ischämie und Reperfusion bedingte Schäden bestimmt werden (Hearse et al. 1973; Carrier et al. 1994). Auf mögliche metabolische Konsequenzen ausgehend vom ausgeprägten Verlust dieses für die ATP-Synthese unter ischämischen Bedingungen wichtigen Enzyms sei an dieser Stelle lediglich hingewiesen. Insgesamt scheint jedoch der Serum-CK-Gehalt ähnlich dem cTnT-Gehalt (vergl. 4.6.1) lediglich beim initialen Anstieg der entsprechenden Konzentration eine Korrelation zur Ischämiedauer aufzuweisen (Carrier et al. 1994). In humanen Gewebeproben nach orthotoper Transplantation wurde für die Normalisierung der CK-Werte eine mittlere Dauer von ca. 6 Tagen festgestellt (Halwachs et al. 1996).

4.7 Zu der Funktion der Koronararterien

Das Endothel der Koronararterien wird als erste anatomische Struktur des Herzens unmittelbar mit allen chemischen, biologischen und physikalischen Einflüssen konfrontiert, die die Konservierung, die Reperfusion, die verschiedenen Lösungen, die verwendeten Medikamente und schließlich die Gegebenheiten des Empfängerorganismus mit sich bringen. Diese unterschiedlichen, sich kurzfristig verändernden und teilweise aggressiven Bedingungen stellen für die hochempfindliche, einschichtige Zelllage eine außerordentlich große Belastung dar. Das Koronarendothel hat eine Schlüsselrolle im Hinblick auf die Kontrolle des Gefäßtonus, es besitzt ausgeprägte antithrombotische Eigenschaften und es hat einen antiproliferativen Effekt auf die Gefäßmuskulatur (Perrault et al. 1999). Dementsprechend

können bereits frühe Endothelschäden einen erheblichen Beitrag zur Entwicklung der transplantationsbedingten Gefäßwandhyperplasie beitragen, die einen wichtigen Grund für das Organversagen nach Transplantation darstellt (vergl 4.6.1) (Folke et al. 1993; Neely and Grotyohann 1984; Malinowski et al. 1997; Meiser et al. 1997). Neben den genannten Faktoren scheinen Hypercholesterinämie, Hypertonie und Zytomegalievirusinfektionen eine wichtige Rolle zu spielen. Morphologisch hauptsächlich beobachtet werden die konzentrische, homogene Intimaverdickung, fokale exzentrische atherosklerotische Plaques und die dilatierende Angiopathie.

Die Koronarfunktion nach Herzentnahme eine Woche nach Transplantation wurde in unseren Versuchen über die Testung der den Koronartonus regulierenden Funktion des Endothels vorgenommen. Als Funktionsparameter wurden die durch pharmakologische Substanzen hervorgerufene Kontraktion und Relaxation zueinander in prozentuale Beziehung gesetzt. Maximale Kontraktion zum Funktionsnachweis der Tunica media wurde zunächst durch kaliuminduzierte Depolarisation erreicht. Die anschließende Kontraktion als Parameter gegenüber der Relaxation erfolgte über einen rezeptorvermittelten Prozess mit dem Prostaglandin $PGF_{2\alpha}$ (Kojda et al. 1992; Pearson et al. 1990) bzw. durch das Thromboxanmimetikum U46619 (Shimizu und Paul 1997). In allen Versuchsdurchgängen wurde die Cyclooxygenase-(COX-)Aktivität durch Indomethacin gehemmt. Im zweiten Durchgang wurden zudem die NO-Synthase-Aktivität durch N-Nitro-L-Arginin (L-NNA) unterdrückt. Die NO-abhängige Relaxation wurde durch Substanz P (SP) (s.u.) hervorgerufen. Die endothelvermittelte Relaxation war in beiden Gruppen zwar im Vergleich zu nicht konservierten Koronararterien teilweise vermindert, im Falle der UW-Gruppe war dieser Unterschied sogar signifikant. Zwischen UW+COP-Gruppe und Kontrolle gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede. Im ersten Versuchsdurchgang fanden sich keine signifikanten Unterschiede. So lagen die mittleren Werte der Koronararterien, der UW+COP- und der HTK-Kontrolle mit 68 bzw. 74 % nah beieinander. Die nicht konservierten Koronararterien aus den Kontrollherzen (Empfängereigenherzen) wiesen nahezu identische Werte auf. Der Mittelwert in der Vergleichsgruppe (Schlachthofherzen) lag mit 75% im Bereich der Gruppen mit Herzkonservierung. Bei Blockierung der Prostaglandin- und der NO-Synthese durch Indomethacin bzw. L-NNA im zweiten Versuchsdurchgang zeigte sich eine deutliche Veränderung. So nahm die SP-induzierte Relaxation im Vergleich zum ersten Durchgang in den untersuchten Gruppen deutlich ab. Die Relaxation in der Gruppe der Kontrollherzen war verhältnismäßig am wenigsten betroffen. In den Gruppen mit konservierten Herzen fanden sich im Vergleich zum ersten Durchgang um über 50 %

reduzierte Werte, die im Falle der UW+COP-Gruppe gegenüber der Kontrollherzgruppe das Signifikanzniveau erreichten. Da die NOS- und Prostaglandinsynthese keinen Beitrag zur Dilatation geleistet haben können, muss es sich bei der residualen Dilatation um die SP-induzierte EDHF-abhängige Relaxation gehandelt haben (s.u.) (Ge et al. 2000). Im Vergleich der UW+COP-Gruppe und der HTK-Kontrolle gab es jedoch keine signifikanten Unterschiede. In sog. Non-heart-beating Donor- (NHBD-) Versuchen (Fischer et al. 2001) haben sich für nach 16 minütiger normothermer Ischämie für 3,3 h mit COP behandelte und anschließend orthotop transplantierte Herzen im Hinblick auf die Endothelfunktion keine Funktionseinbußen gegenüber Kontrollherzen ergeben. Nach totaler Blockade der NO-Produktion durch L-NNA war jedoch in diesen Versuchen noch eine EDHF-vermittelte Relaxation von mindestens 50 % zu verzeichnen. In unseren Versuchen lagen die entsprechenden Werte mit im Mittel 23 % (UW-Gruppe) bzw. 34 % (HTK-Gruppe) deutlich niedriger. In in-vitro-Versuchen (Bosse M et al. 2002) mit 3 bzw. 18 stündiger Anwendung der COP fanden sich für die EDHF-abhängige Relaxation ähnliche Werte um 50 %. Nach zusätzlicher Reperfusion fielen die entsprechenden Werte auf 40 % ab.

Die Schädigung des Koronarendothels im Rahmen der Herztransplantation hat vier wesentliche Ursachen. So können die Operation an sich, vor allem aber die Belastung durch Druck- und Scherkräfte während Perfusion und Reperfusion zu mechanischen Gefäßwandschäden führen. Des weiteren tragen ischämische Perioden nicht unerheblich zu diesen Schäden bei (Pearson et al. 1990). Weitere Ursachen sind die hyperakute und die chronische Abstoßung durch den Empfängerorganismus (Nataf et al. 1995; Perrault 1997; Perrault 1999; Schmoeckel et al. 1996), und eine wichtige mögliche Ursache für die Koronarendothelschäden ist durch die chemische Zusammensetzung der jeweiligen Konservierungslösung gegeben (Eberl et al. 1999; He 1998; He und Yang 1998). Rahmenbedingungen wie die jeweilige Konservierungstemperatur mögen ebenfalls einen Einfluss haben. In unseren Versuchen haben wahrscheinlich die heterotope Transplantation mit den von den physiologischen hämodynamischen Bedingungen abweichenden Umständen und die im Vergleich längere Zeit bis zur Entnahme von 7 Tagen zu den Unterschieden in den NHBD-Versuchen geführt. Die genannten Mechanismen waren so über einen wesentlich längeren Zeitraum präsent. Eine wesentliche Fragestellung in unseren Versuchen war der Einfluss der COP und der Lagerungszeit auf die Integrität des Koronarendothels.

Die endothelabhängige Relaxation kann grundsätzlich durch verschiedene Mechanismen erreicht werden, die allesamt das Ziel haben, die zytosolische Kalziumkonzentration zu senken, um so eine Relaxation herbeizuführen. Zunächst führt jedoch ein Anstieg der

Kalziumkonzentration in der Zelle zum Anstieg dreier wesentlicher Endothelium Derived Relaxing Factors (EDRFs). So existiert ein prostazyklinabhängiger Weg, der über die Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) in der Lage ist, die zytosolische Kalziumkonzentration so weit zu senken, so dass die glatte Muskulatur relaxiert. Das Prostazyklin (PGI_2) entsteht im Rahmen der Cyklooxygenaseaktivität und fungiert über einen spezifischen Rezeptor (Malinowski 1997; Pearson et al. 1990; Shimizu et al. 1997). Ein zweiter EDRF ist der sog. Endothelium Derived Hyperpolarisation Factor (EDHF). Dabei handelt es sich weniger um einen einzigen Faktor wie das NO, sondern um einen komplizierten Vorgang der ausgehend von der Erhöhung des zytosolischen Kalziums nach Stimulation durch Acetylcholin, Bradykinin oder SP über die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Enzyme und der Freisetzung von second messengers schließlich in der Aktivierung Kalzium abhängiger Kaliumkanäle (K_{ca} -Kanäle) mit anschließendem Kaliumausstrom resultiert. Dies führt entweder über die Aktivierung einwärts gerichteter Kaliumkanäle oder der Na^+/K^+ -ATPase zur Hyperpolarisation mit anschließender Relaxation der glatten Muskelzellen. Dieser Vorgang kann sich entweder über die Endothelzellschicht oder über gap junctions der glatten Muskelzellen ausbreiten (Busse R et al. 2002). Ein Umstand im Hinblick auf den EDHF ist seine Organ- und Speziespezifität. Der dritte wichtige EDRF ist das Stickstoffmonoxid (Furchgott und Zawadski 1980). Die Freisetzung des NO erfolgt über das Gefäßendothel, Makrophagen, das zentrale Nervensystem u.a.. Es handelt sich um einen NADPH-abhängigen, enzymatischen Prozess, bei dem betreffenden Enzym um die endothelständige kalziumabhängige NO-Synthase (NOS). Als einziges Substrat dient das L-Arginin. Über die Abspaltung des terminalen Guanidino-Stickstoffatoms und die Reaktion mit Sauerstoff entsteht NO mit dem Co-Produkt L-Citrullin (Förstermann et al. 1994; Moncada et al. 1989). Das NO ist in der Lage, über die Zellgrenzen hinweg zu diffundieren. In den Zellen ist die Hauptaufgabe des Stickstoffmonoxid die Aktivierung der Guanylatzyklase. Die Folge sind vielfältige Funktionen auf der Basis der Bildung des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Das cGMP fungiert als weiterer Botenstoff und kann z.B. Ionenkanäle schließen und Funktionsproteine phosphorylieren (Förstermann et al. 1994; Moncada et al. 1989). Eine wichtige Funktion des NO ist die Vasodilatation, die zur Entdeckung der Substanz geführt hat. Weitere wichtige NO-Funktionen sind ein hemmender Effekt auf die Proliferation der glatten Muskulatur, auf die Thrombozytenaggregation- und adhäsion und auf die Granulozytenadhäsion (Dusting 1995; Perrault 1997).

Grundsätzlich sind zur Zeit drei Isoformen der NOS bekannt. Die für die Vasodilatation wesentliche Isoform III (c- bzw. eNOS) liegt zum größten Teil membranständig in Epithelzellen vor. Die beiden anderen Isoformen I (bcNOS) und II (iNOS) liegen in hauptsächlich gelöster Form in unterschiedlichen Zellen vor und weisen somit keine spezifische Funktion in Hinblick auf die Vasodilatation auf. Zudem ist die iNOS nicht kalziumabhängig und unterliegt so anderen Regulationsmechanismen. Sie wird in entzündlichen Prozessen vermehrt von Makrophagen freigesetzt (Dusting 1995; Förstermann et al. 1994; Faraci et al. 1996). Somit war für die vorliegenden Versuche die eNOS-abhängige Funktion ausschlaggebend. Da der spezifische iNOS-Inhibitor L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysin (L-NIL) (Moore et al. 1994) nur in zwei Versuchen vorlag, war eine aussagekräftige selektive Untersuchung der eNOS-Aktivität nicht möglich. In Vergleichen der Nukleotidsequenzen für die verschiedenen Isoformen in verschiedenen Spezies haben sich gute Übereinstimmungen zwischen 94 % und 99.9 % gezeigt. Es handelt sich somit um artenübergreifende Mechanismen (Förstermann et al. 1994). Verschiedene Substanzen haben einen wesentlichen Einfluss auf die NO-Produktion. So sind z.B. ADP, Bradykinin und Serotonin in der Lage, die NOS über rezeptorabhängige Mechanismen zu aktivieren, die von intrazellulären G-Proteinen abhängig sind. Ein potenter aber unspezifischer NOS-Aktivator ist Substanz P (SP), die in unseren Versuchen zur Induktion der NO-abhängigen Relaxation genutzt wurde. SP ist jedoch kein ausschließlicher NOS-Aktivator, sondern ist auch in der Lage, den EDHF zu aktivieren (Busse 2002; Shimizu 1997). Des Weiteren wurde im jeweils letzten Versuchsdurchgang das unselektiv L-NNA verwendet, ein Falschsubstrat für L-Arginin, um die NO-unabhängige Relaxation selektiv zu betrachten. Wichtig ist beim L-NNA eine Konzentration von mindestens 300 µmol/l, um eine Wirkung zu erzeugen.

Um die physiologisch vorhandene konstriktorisch bzw. dilatatorisch wirksame Prostaglandin- bzw. Prostazyklinsynthese zu hemmen und um den Einfluss die Wirkung des PGF_{2α} zu verifizieren, wurde der COX-Weg vor jedem Versuchsdurchgang mit dem unspezifischen COX-Inhibitor Indomethacin gehemmt.

Unsere Beobachtungen werden durch verschiedene andere Untersuchungen bestätigt. So wurden Koronararterien von Hunden sechzigminütiger Ischämie in vivo ausgesetzt, und die Arterien wurden nach zwölf Wochen hinsichtlich ihrer endothelabhängigen Relaxation als Reaktion auf bestimmte Substanzen getestet (Pearson 1990). In diesen Versuchen war die von den Thrombozytenprodukten ADP, Serotonin und Thrombin abhängige NO-vermittelte Relaxation nach zwölf Wochen noch beeinträchtigt. Eine grundsätzliche Beeinträchtigung der NO-Synthese wurde ausgeschlossen, da die Acetylcholin- (Ach-)vermittelte Relaxation

erhalten blieb. In einer späteren Untersuchung wurde jedoch ein EDHF-vermittelter Relaxationseffekt nach Ach-Gabe beschrieben (Malmsjö et al. 1999), was eine grundsätzliche Beeinträchtigung der NOS-Aktivität durch Ischämie zumindest möglich erscheinen ließ. In Versuchen mit Ratten wurde ein artifizieller Herzinfarkt durch Ligatur der Arteria coronaria sinistra verursacht (Malmsjö et al. 1999). Nach vier bis acht Wochen wurde eine verminderte NO-abhängige Relaxation gegenüber einer signifikant erhöhten EDHF-vermittelten endothelabhängigen Relaxation gegenüber Kontrolle beobachtet. Die Beobachtung, dass EDHF in der Lage ist, eine Beeinträchtigung der NO-vermittelten Gefäßrelaxation von Koronararterien bis zu einem gewissen Maß auszugleichen, wurde in verschiedenen Untersuchungen bestätigt (Borg-Capra et al. 1997; Ge et al. 2000; He 1998; He und Yang 1998; Malmsjö et al. 1999). In weiteren Arbeiten wurde ein wesentlicher Einfluss der Kaliumkonzentration der verwendeten Konservierungslösungen beobachtet. So wurde für unphysiologisch hohe Kaliumkonzentrationen ein schädigender Effekt im Hinblick auf die NO-Freisetzung beobachtet (Nilsson et al. 1991). Die Beobachtung in einer weiteren Arbeit, die auf eine Beeinträchtigung der NO-Freisetzung nach Lagerung von isolierten Schweinekoronararterien mit UW-Lösung hinweist, wurde auf diesen schädigenden Effekt zurückgeführt (He und Yang 1998). In einer weiteren Untersuchung wurde jedoch eine ebenfalls vorhandener schädigender Effekt von hohen Kaliumkonzentrationen auf die EDHF-Freisetzung in isolierten Schweinekoronarien beobachtet, der mit sog. Kaliumkanalöffnern (KCOs) bis zu einem gewissen Maß zu antagonisieren war (He 1998). Insgesamt gibt es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Relaxation bei Anwendung unterschiedlicher Methoden und Konservierungszeiten.

In unseren Versuchen hat eine wesentliche Beeinträchtigung der EDHF-abhängigen Relaxation der Koronarien in der UW+COP- und der Kontrollgruppe zu der ausgeprägten Abnahme der Relaxierung im zweiten Versuchsdurchgang geführt. Des weiteren scheint ein wesentlicher Anteil der durch SP hervorgerufenen Relaxation an der gesamten Relaxation NO-abhängig zu sein. Im Vergleich zu den bereits erwähnten NHBD-Versuchen (Fischer et al. 2001) konnte das Potential der EDHF-abhängigen Relaxation nicht aufrecht erhalten werden.

Mechanismen der Organabstoßung könnten in unseren Versuchen eine Rolle gespielt haben. So wurde hier die Abstoßungsprophylaxe lediglich auf Kortikoidbasis (allerdings hochdosiert) mit Prednisolon vorgenommen, was zunächst für den vergleichsweise kurzen Zeitraum von einer Woche als ausreichend angesehen wurde. Das Mittel der Wahl zur Abstoßungsprophylaxe ist zur Zeit neben Steroiden und Azathioprin jedoch zusätzlich

Cyclosporin A (vergl. 1.1), das wegen seiner nephrotoxischen Nebenwirkung im Hinblick auf unsere Versuche Bedenken hervorgerufen hatte, da die Tiere einseitig nephrektomiert waren. Azathioprin und Cyclosporin haben des weiteren ihren Hauptanwendungsbereich im Rahmen der chronischen Abstoßungsprophylaxe. Die Maximaldosis des Cyclosporins wird über die übliche einschleichende Dosierung erst nach ca. 1 Woche erreicht, d.h. mit einer ausreichenden Wirkung im Hinblick auf die frühe Organabstoßung wäre für unsere Versuche mit der einwöchigen Überlebenszeit der Tiere nicht zu rechnen gewesen. Ähnlich verhält es sich mit dem Azathioprin, dessen antiproliferativer Effekt erst nach einer Woche einsetzt. Die Wirkung des Prednisolons setzt in der verwendeten Dosis bereits nach wenigen Stunden ein und ist so für die Prophylaxe akuter und früher Abstoßungsreaktionen geeignet. Abstoßungsvorgänge können jedoch dennoch möglicherweise in unseren Versuchen eine Rolle bei der Verminderung der EDHF-vermittelten Relaxation im Vergleich zu der bei den Kontrollherzen oder bei den NHBD-Versuchen geführt haben.

5. Zusammenfassung

Überschreitet die Konservierungszeit von Herzen bei den derzeit üblichen Verfahren 3,5 Stunden, so nimmt die Rate an Funktionsstörungen stark zu.

Das Ziel unserer Experimente war die Untersuchung der Methode der Sauerstoffpersufflation der Koronararterien (COP) am Versuchstier Schwein unter Verwendung der University of Wisconsin-(UW-)Lösung mit vierzehnstündiger Konservierungszeit und einer Überlebenszeit der Tiere von sieben Tagen. Die UW-Lösung war bereits erfolgreich in vorhergehenden Versuchen mit Anwendung der COP und lediglich dreistündiger Überlebenszeit der Schweine verwendet worden. Die vorliegenden Versuche wurden im Direktvergleich mit der derzeit in Europa üblichen Methode der einfachen hypothermen Lagerung unter Verwendung der Histidin-Tryptophan-Ketoglutarat-Lösung nach Bretschneider (HTK) über drei Stunden vorgenommen.

Die Herzen wurden mit den jeweiligen Lösungen freigespült und anschließend entsprechend gelagert. In der UW+COP-Gruppe wurden die Herzen bei 0 bis 1 °C mit Anwendung der COP antegrad über das Koronarsystem über 14 Stunden konserviert und anschließend nach einseitiger Nephrektomie heterotop an die Nierengefäße eines zweiten Tieres transplantiert.

In der Kontrollgruppe wurden die Herzen nach Freispülung mit HTK-Lösung über 3 Stunden hypotherm gelagert und anschließend wie in der UW+COP-Gruppe transplantiert. In der folgenden Woche wurden tägliche Blutentnahmen zur Bestimmung des kardialen Troponin T und der Kreatinkinase vorgenommen. Die Entnahme der Herzen inklusive des Empfängereigenherzens erfolgte nach einer Woche mit vorheriger funktioneller Untersuchung des Transplantates im Hinblick auf den maximalen linksventrikulären Druck, die maximale Kontraktions- und die maximale Relaxationsgeschwindigkeit. Anschließend erfolgte die Gewebeprobenentnahme aus verschiedenen Herzregionen mit der Frierstopmethode in flüssigem Stickstoff zur Bestimmung des Stoffwechselstatus der Herzen. Die Koronararterien von Transplantat und Empfängereigenherz wurden gesondert im Organbad hinsichtlich des Erhaltes ihrer Fähigkeit zur endothelvermittelten Relaxation untersucht.

Sowohl in Bezug auf die mechanischen als auch auf die enzymatischen und biochemischen Untersuchungen waren zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Wie bei den vorher gegangenen Untersuchungen mit 3 Stunden Reperfusion blieb die endothelvermittelte Relaxation der Koronararterien auch nach 1 Woche erhalten. Allerdings sank der nicht auf Stickstoffmonoxid- (NO-)Freisetzung beruhende Anteil massiv ab, wurde

aber durch den Anstieg der NO-vermittelten Relaxation voll kompensiert. Das Maß der Beeinträchtigung der Endothelium Derived Hyperpolarisation Factor- (EDHF)-vermittelten Relaxation war für die 14stündige COP-Konservierung mit UW-Lösung und die 3stündige Kaltlagerung mit HTK-Lösung vergleichbar. Damit ist die Effektivität der COP bei Verwendung der UW-Lösung evident.

6. Literaturverzeichnis

1. Almers W, McCleaskey EW (1984):

Non-selective conductance in calcium channels of frog muscle: Calcium selectivity in a single-file pore. J Physiol 353: 585-608

2. Anderson JR, Hossein-Nia M, Brown PA, Corbishley C, Murday AJ, Holt DW (1984):

Creatine kinase MB: A potential predictor of acute cardiac allograft rejection. J Heart Lung Transplant 14,4: 666-670 (1995)

3. Asfour B, Hare JM, Kohl T, Baba HA, Kass DA, Chen K, Tjan TD, Hammel D, Weyand M, Hruban RH, Scheld HH, Byrne BJ (1999):

A simple new method of physiologically working heterotopic rat heart transplantation provides hemodynamic performance equivalent to that of an orthotopic heart. J Heart Lung Transplant 18,10: 927-36

4. Atkinson DE (1968):

The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. Biochemistry 7: 4030-1390

5. Barnard CN (1967):

The operation. A human cardiac transplantation : An interim report of a successful operation at Groote Schuur Hospital, Cape Town, S Afr Med J 41: 2171-2174

6. Becker BF (1996):

Interaktion von Adenosin mit Thrombozyten und Leukozyten. Kardiologie, Suppl. 2, 85: 186

7. Benoist JF, Cosson C, Mimoz O, Edouard A (1997):

Serum cardiac Troponin I Creatine Kinase (CK) and CK-MB in early posttraumatic rhabdomyolysis. Clin Chem 43,2: 416-417

8. Blankenstein JH v, Slager CJ, Soei LK, Boersma H, Stijnen T, Schuurbiens JCH, Krams R, Lachmann B, Verdouw PD (1997):

Cardiac depression after experimental air embolism in pigs: Role of a surface active agent. Cardiovasc Res 34: 473-482

9. Boink ABTJ, Ruigrok TJC, Maas AHJ, Zimmermann ANE (1976):

Changes in high-energy phosphate compounds of isolated rat hearts during Ca^{2+} -free perfusion and reperfusion with Ca^{2+} . J Mol Cell Cardiol 8: 973-979

10. Borg-Capra C, Fournet-Bourguignon MP, Janiak P, Villeneuve N, Bidouard JP, Vilaine JP, Vanhoutte PM (1997):

Morphological heterogeneity with normal expression but altered function of G proteins in porcine cultured regenerated coronary endothelial cells. Br J Pharm 122: 999-1008

11. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stähelin H (1977):

Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. Immunology 32: 1017-1025

12. Bretschneider HJ, Gebhard MM, Preusse CJ (1979):

Amelioration of protection by improvement of capacity and effectiveness of anaerobic glycolysis. Aus: Isselhard W (Hrsg.): Myocardial protection for cardiovascular surgery, International Symposium Köln Oct 2-4, Pharmazeutische Verlagsgesellschaft, München

13. Bretschneider HJ, Gebhard MM, Preusse CJ (1984):

Cardioplegia, Principles and problems. Aus: Sperelakis N (Hrsg.): Physiology and pathophysiology of the heart, Nijhoff, Boston

14. Braimbridge MV, Chayen J, Bitensky L, Hearse DJ, Jynge P, Canković-Daracott S (1977):

Cold cardioplegia or continuous coronary perfusion? J Thorac Cardiovasc Surg 74,6: 900-906

15. Burton KP, McCord JM, Ghai G (1984):

Myocardial alterations due to free-radical generation. Am J Physiol 84: H776-782

16. Bosse M, Dahnken S, Fischer JH (2002):

Preserved endothelial function of large and small coronary vessels after prolonged storage including coronary oxygen persufflation. Proc 37th Congress Eur Soc Surg Res May 2002: 209-217

17. Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH (2002):

EDHF: bringing the concepts together. TRENDS Pharm Sc 23: 374-379

18. Calne RY (1961):

Inhibition of the rejection of renal homografts in dogs by purine analogues. Transplant Bull 28: 65

19. Carrel A, Guthrie CC (1905):

Transplantation of veins and organs. Am J Med 1: 1101

20. Carrier M, Solymoss C, Cartier R, Leclerc Y, Pelletier LC (1994):

Cardiac Troponin T and creatine kinase MB isoenzyme as biochemical markers of ischemia after heart preservation and transplantation. J Heart Lung Transplant 13,4: 696-700

21. Chambers DE, Dale AP, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM (1985):

Xanthine Oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. J Mol Cell Cardiol 17: 145-152

22. Coetzee A, Kotzé J, Louw J, Lochner A (1986):

Effect of oxygenated crystalloid cardioplegia on the functional and metabolic recovery of the isolated perfused heart. J Thorac Cardiovasc Surg 91: 259-269

23. Cooper DKB, Wicomb WN, Barnard CN (1983):

Storage of the donor heart by a portable hypothermic perfusion system: Experimental development and clinical experience. J Heart Transplant 2: 104-110

24. Crick SJ, Sheppard MN, Ho SY, Gebstein L, Anderson RH (1998):

Anatomy of the pig heart; comparison with normal human cardiac structure. *J Anat* 139,1: 105-119

25. De Wit L, Coetzee A, Kotzé J, Lochner A (1988):

Oxygen requirements of the isolated rat heart during hypothermic cardioplegia. *J Cardiovasc Surg* 95: 310-320

26. Downes G, Hoffmann R, Huang J, Belzer FO (1973):

Mechanism of action of washout solutions for kidney preservation. *Transplantation* 16: 46-53

27. Dusting GJ (1973):

Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J Vasc Res* 32: 143-161 (1995)

28. Eberl T, Salvenmoser W, Rieger G, Gorny I, Heiß V, Kumpitsch B, Gnaiger E, Margreiter R (1999):

Ultrastructural analysis of human endothelial cells after hypothermic storage in organ preservation solutions: *J Surg Res* 82: 253-260

29. Engelmann RM, Auvil J, O'Donoghue MJ, Levitsky S (1978):

The significance of multidose cardioplegia and hypothermia in myocardial preservation during ischemic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 75: 555

30. Engelmann RM, Rousou JH, Longo F, Auvil J, Vertrees RA (1979):

The time course of myocardial high-energy phosphate degradation during potassium cardioplegic arrest. *Surgery* 86,1: 138-147

31. Faraci WS, Nagel AA, Verdries KA, Vincent LA, Xu H, Nichols LE, Labasi JM, Salter ED, Pettipher ER (1996):

2-amino-4-methylpyridine as a potent inhibitor of inducible NO-synthase activity in vitro and in vivo. *Circulation* 45: 1101-1108

32. Faulk WP, Labarrere A, Torry RJ, Nelson DR (1998):

Serum cardiac troponin T concentrations predict development of coronary artery disease in heart transplant patients. *Transplantation* 66,10: 1335-1839

33. Fischer JH (1999):

New Developments in the use of HTK and UW solution. Aus: Hesse UJ (ed.): Current status of the clinical use and experimental studies of HTK and UW solution for organ preservation, Pabst, Lengerich.

34. Fischer JH, Czerniak A, Hauer U, Isselhard W (1978):

A new simple method for optimal storage of ischemically damaged kidneys. *Transplantation* 25: 43-49

35. Fischer JH, Fuchs M, Miyata M, Isselhard W (1980):

Hypothermic liver preservation using different flush solutions and retrograde oxygen persufflation technique. *Europ Surg Res* 12, Suppl. 1 : 19-20

36. Fischer JH, Funcke C, Jechkeit-Schubbert S, Yotsumoto G, Kuhn-Régnier F (2001):

Coronary endothelial function in heart grafts of non-heart-beating donors (NHBD) after 3 h hypothermic COP-Preservation and orthotopic transplantation in pigs. *Eur Surg Res* 33: 99-191

37. Fischer JH und Isselhard W (1982):

Retrograde oxygen persufflation - a technique for preservation of ischeamically damaged organs. Organ preservation, basic and applied aspects. A symposium of the transplantation society. Pegg DE, Jacobson IA, Halasz NA (Hrsgb.)

38. Fischer JH, Kuhn-Régnier F, Jeschkeit S, Switkowski R, Bardakcioglu Ö, Sobottke R, deVivie ER (1998):

Excellent recovery after prolonged heart storage with coronary oxygen persufflation. *Transplantation* 66,11: 1450-1459

39. Fischer JH, Kulus D, Hansen-Schmidt I, Isselhard W (1981):

Adenine nucleotide levels of canine kidneys during hypothermic aerobic or anaerobic storage in Collins' solution. Eur Surg Res 13: 178-188

40. Fischer JH, Jeschkeit S (1995):

Effectivity of freshly prepared or refreshed solutions for heart preservation versus commercial Eurocollins, Bretschneider's HTK or University of Wisconsin solution. Transplantation 59,9: 1259-1262

41. Fischer JH, Jeschkeit S (1996):

Minimal amounts of hyaluronidase in HTK or UW solution substantially improve the recovery of preserved hearts. Transpl Int 9, Suppl 1: 442-446

42. Fischer JH, Jeschkeit S, Klein P (1994):

Adding a new principle to hypothermic storage preservation of edema formation by hyaluronidase. Transplantation 58,6: 748-753

43. Fischer JH, Jeschkeit-Schubbert S, Kuhn-Régnier F, Switkowski R (2002):

CK-MB/CK serum values after heart transplantation do not correlate with cardiac damage – unexpected low ratios in graft myocardial tissue. Proc 37th Congress Europ Soc Surg Res May 2002: 227-234

44. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwartz P, Gath I, Kleinert H (1994):

Nitric oxide Isoenzymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. Hypertension 23,6: 1121-1131

45. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980):

The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288: 373-379

46. Ge ZD, Zhang XH, Fung PCW, He GW (2000):

Endothelium-dependent hyperpolarisation and relaxation resistance to N^G-nitro-L-arginine and indomethacin in coronary circulation. Cardiovasc Res 46: 547-556

47. Green CJ, Pegg DE (1979):

Mechanism of action of “intracellular” renal preservation solutions. *World J Surg* 3: 115-120

48. Hori M, Goichi K, Kitakaze M, Iwai K, Iwakura K, Sato H, Kortsune Y, Inoue M, Kitabatake A, Kamada T (1991): Role of oxygen-derived free radicals in myocardial edema and ischemia in coronary microvascular embolization. *Circulation* 84: 828-840

49. Hachida M, Ookado A, Nonoyama N, Koyanagi H (1996):

Effect of HTK solution for myocardial preservation. *J Cardiovasc Surg* 37: 269-274

50. Halwachs G, Iberer F, Pieber T, Müller H, Tscheliessnigg K, Tiran A, Sabin K, Wilders-Truschnig M (1996):

Troponin T as a marker for posttransplantation adaptional problems of the donor heart. *J Heart Lung Transplant* 15,5: 451-455

51. Hampton TG, Amende I, Travers KE, Morgan JP (1998):

Intracellular calcium dynamics in mouse model of myocardial stunning. *Am J Physiol* 274,5: H1821-1827

52. Harringer W, Haverich A (2002):

Heart and heart-lung transplantation: standards and improvements. *World J Surg.* 26,2: 218-225

53. He GW (1998):

Potassium-channel opener in cardioplegia may restore coronary endothelial function. *Ann Thorac Surg* 66: 1318-1322

54. He GW, Yang CQ (1998):

Impaired endothelium-derived hyperpolarisation factor-mediated relaxation in coronary arteries by cold storage with University of Wisconsin solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116,1: 122-130

55. Hearse DJ (1977):

Reperfusion of the ischemic myocardium. *J Mol Cell Biol* 9,8: 605-616

56. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB (1973):

Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 5: 395-407

57. Hein S, Scheffold T, Schaper J (1995):

Ischemia induces early changes to cytoskeletal and contractile proteins in diseased human myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 110,1: 89-98

58. Hess P, Tsien (1984):

Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* 309: 453-456

59. Hokl J, Černý J, Němec P, Studeník P, Šimková M (1999):

Troponin T serum levels in donors related to troponin T levels in recipients immediately after heart transplantation. *Transplant Proc* 31: 137-138

60. Holland CE, Olsen RE (1975):

Prevention by hypothermia of paradoxical calcium necrosis in cardiac muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 126: 901-904

61. Hori MK, Goichi, Kitakaze M, Iwai K, Iwakura K, Sato H, Kortsune Y, Inoue M., Kitabatake A, Kamada T (1991):

Role of oxygen-derived free radicals in myocardial edema and ischemia in coronary microvascular embolization. *Circulation* 84: 828-840

62. Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ (2001) :

ISHLT Registry Report 2001. *J Heart Lung Transplant.* 20,8: 805-815

63. Isselhard W, Merguet H (1962):

Metabolite des Glykolyse-Cyclus und des Adenylsäure-Phosphokreatin-Systems im schlagenden und durchbluteten Warmblüterherzen unter verschiedenen Versuchsbedingungen. *Pflügers Arch* 276: 211-235

64. Isselhard W, Minor T (1999):

Gasförmiger Sauerstoff zur Protektion und Konditionierung von Organen in Ischämie .
Zentralbl Chir 124: 252-259

65. Jeroudi MO, Hartley CJ, Bolli R (1994):

Myocardial reperfusion injury: role of oxygen radicals and potential therapy with antioxidants.

Am. J Cardiol 73, 2B-7B

66. Jeschkeit S, Fischer JH, Diefenbach H (1996):

Significantly improved functional recovery after preservation with coronary oxygen persufflation (PCOP) during hypothermic heart storage. Eur Surg Res 29, Suppl. 1 : 89

67. Jeschkeit S, Fischer JH, Kuhn-Régnier F, Switkowski R (bisher unveröffentlicht):

Are CK-MB serum values after heart transplantation an Indicator of cardiac damage ?

68. Kadner A, Raymond HC, Adams DH (2000):

Heterotopic heart transplantation: experimental development and clinical experience. Eur J Card-Thor Surg 17: 474-481

69. Kawai A, Morita S, Kormos RL, Mandarino WA, Gasior TA, Pham SM, Armitage JA, Hardesty RL, Griffith BP (1994):

A clinical trial comparing University of Wisconsin solution and cold cardioplegic solution with load-independent mechanical parameters. J Heart Lung Transplant 13,1: 150-156

70. Kojda G, Klaus W, Werner G, Fricke U (1992):

Intervascular and stimulus selectivity of nitrendipine and related derivatives in KCL and prostaglandin F_{2α} precontracted porcine arteries. Br J Pharmacol 106: 85-90

71. Kötting M, Minor T (2000):

Biochemical effects and cyclic-AMP second messenger signal upon venous oxygen persufflation of ischemically preserved livers. Transplant Proc 32: 11-13

72. Kuhn-Régnier F, Fischer JH, Jeschkeit S, Hilgenhöner G, Switkowski R, Bardakcioglu Ö, Sobottke R, July C, deVivie ER (1997):

Improved long-term heart preservation using continuous coronary persufflation with gaseous oxygen in pigs. 23rd World Congress of the ISCVS, Cardiovasc Surg 72

73. Kuhn-Régnier F, Fischer JH, Jeschkeit S, Switkowski R, Bardakcioglu Ö, Sobottke R, deVivie ER (2000):

Coronary oxygen persufflation combined with HTK cardioplegia prolongs the preservation time in heart transplantation. Eur J Cardio-Thorac Surg 17: 71-76

74. Lamprecht W, Trauschold I (1958):

Nachweis eines direkten Insulineffektes auf den Kohlenhydratstoffwechsel der Leber. Hoppe-Seylers Physiol Chem 311: 245-255

75. Lew MJ, Kao SW (1999):

Examination of adenosine-receptor-mediated relaxation of the pig coronary artery. Clin Exp Pharm Phys 26: 438-443

76. Lower RR, Shumway NE (1960):

Studies on orthotopic transplantation of the canine heart. Surg Forum 11: 18

77. Magnus R (1902):

Die Tätigkeit des überlebenden Säugetierherzens bei Durchströmung mit Gasen. Arch Pathol Pharamakol 47: 200

78. Malinowski TR, Wellford AL, Khan N, Rubal BJ (1997):

Serum creatine kinase after endomyocardial biopsy in cardiac transplant patients. Milit Med 162: 51-54

79. Malmsjö M, Bergdahl A, Zhao XH, Sun XY, Hedner T, Edvinsson L, Erlinge D (1999):

Enhanced acetylcholine and P2Y-receptor stimulated vascular EDHF-dilatation in congestive heart failure. Cardiovasc Res 43: 200-209

80. Mann FC, Priestly JR, Markowitz J, Yates WM (1933):

Transplantation of the intact mammalian heart. Arch Surg 26: 219

81. Medawar PB (1944a):

The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. J Anat 78: 176

82. Medawar PB (1944b):

A second study of the behavior and fate of skin homografts in rabbits. J Anat 79: 157

83. Meiser BM, von Scheidt W, Weis M, Böhm D, Kur F, Joglin J, Reichenspurner H, Überfuhr P, Reichart (1997):

Herztransplantation – state of the art today. Herz 22: 237-252

84. Merrill JP, Murray JE, Dammin GJ, Dealy JB, Harrison JH (1962):

Kidney transplantation in modified recipients. Ann Surg 1956: 336

85. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH (1956):

Successful homotransplantation of the kidney between identical twins. JAMA 160: 227

86. Merrill JP, Murray JE, Harrison JH (1960):

Successful homotransplantation of the kidney between nonidentical twins. N Engl J Med 262: 1251

87. Minor T, Isselhard W (1996):

Synthesis of high energy phosphates during cold ischemic rat liver preservation with gaseous oxygen insufflation. Transplantation 61: 20-22

88. Minor T, Klauke H, Nagelschmidt M, Isselhard W (1997):

Reduction of proteolysis by venous-systemic oxygen persufflation during rat liver preservation and improved functional outcome after transplantation. Transplantation 63: 365-368

89. Minor T, Kötting M (2000):

Gaseous oxygen for hypothermic preservation of predamaged liver grafts: Fuel to cellular homeostasis or radical tissue alteration? *Cryobiology* 40: 182-186

90. Mitchell SV, Mottram PL, Purcell LJ, Dumble LJ, Millar RJ, Clunie GJA (1990):

A rabbit model for heterotopic cardiac transplantation. *Transplantation* 49,4: 835-837

91. Mohara J, Tsutsumi H, Takeyoshi I, Tokumine M, Aizaki M, Ishikawa S, Matsumoto K, Morishita Y (2002):

The optimal pressure for initial flush with UW solution in heart procurement. *J Heart Lung Transplant* 21,3: 383-390

92. Moore WM, Webber RK, Jerome GM, Tjoeng FS, Misko TP, Currie MG (1994):

L-N⁶-(1-Iminoethyl)lysine: A selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37: 3886-3888

93. Mori Y, Hirose H, Murakawa S, Yamada T, Ishikawa M (1994):

Evaluation of hypothermic heart preservation with University of Wisconsin solution in heterotopically and orthotopically transplanted canine hearts. *J Heart Lung Transplant* 13,4: 688-695

94. Murray JE, Merrill JP, Dammin GJ, Dealy JB, Alexandre GW, Harrison JH (1962):

Kidney transplantation in modified recipients: *Ann Surg* 156: 337

95. Nascimben L, Ingwall JS, Pauletto P, Friedrich J, Gwathmey JK, Saks V, Pessina AC, Allen PD (1996):

Creatine kinase system in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation* 94,8: 1894-1901

96. Nataf P, Plantier F, Nezafati M, Khunle M, Lima L, Nguyen L, Pavie A, Cabrol C, Gandjibakhch I (1995):

Ex vivo pig to human heart transplantation: a histological Study. *Transplant Proc* 27,5: 2635

97. Neely JR, Grotyohann LW (1984):

Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium: Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts. *Circ Res* 55,6: 816-824

98. Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1984):

Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere, Band III. 2. Aufl Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg.

99. Nilsson FN, Miller VM, Vanhoutte PM, McGregor CGA (1991):

Methods of cardiac preservation alter the function of the endothelium in porcine coronary arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg* 102: 923-930

100. Ohbayashi A, HiraganT, Okubo M, Murase T, Mtsushita H, Hara M (1994):

Charasteristics of porcine coronary artery endothelium cells in culture: Comparison with aortic endothelium. *Biochem Biophys Res Com* 202,1: 504-511

101. Okouchi Y, Shimizu K, Yamaguchi, Kamada N (1990):

Effectiveness of modified University of Wisconsin solution for heart preservation ass assessed in heterotopic rat heart transplant model. *J Thorac Cardiovasc* 99: 1104-1108

102. Ono K, Lindsey ES (1969):

Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 57:225-229

103. Parrat JR, Marshall (1974):

The response of isolated cardiac muscle to acute anoxia: protective effect of adenosine triphosphate and creatine phosphate. *J Pharm Pharmacol* 26: 427-433

104. Paulus WJ (1994):

Endothelial control of vasculatur and myocardial function in heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 8: 437-446

105. Pearson PJ, Schaff HV, Vanhoutte PM (1990):

Long-term impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets after reperfusion injury in canine coronary arteries. *Circulation* 81,6: 1921-1927

106. Pegg DE, Foreman J, Hunt CJ, Diaper MP (1989):

The mechanism of action of retrograde oxygen persufflation in renal preservation. *Transplantation* 48,2: 210-217

107. Pegg DE, Galant M (1977):

Water and electrolyte contents and extracellular space of rabbit kidneys after perfusion and storage for 24 hr at 4 °C. *Cryobiology* 14: 568-574

108. Perrault LP, Fournet-Bourguignon MP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Vilaine JP, Vanhoutte PM (1996):

Expression of endothelial G_i-proteins and nitric oxide synthase in accelerated atherosclerosis after heart transplantation. *Circulation, Suppl. 1*, 94,8: 106

109. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM (1999):

Impairment of G-protein-mediated signal transduction in the porcine coronary endothelium during rejection after heart transplantation. *Cardiovasc Res* 43: 457-470

110. Perrault LP, Bidouard JP, Janiak P, Villeneuve N, Bruneval P, Vilaine JP, Vanhoutte PM (1997):

Time course of coronary endothelial dysfunction in acute untreated rejection after heterotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 16,6: 643-657

111. Poizat C, Keriél C, Cuchet P (1994):

Is oxygen supply sufficient to induce normoxic conditions in isolated rat heart? *Basic Res Cardiol* 89: 535-544

112. Quignard JF, Félétou M, Thollon C, Vilaine JP, Duhault J, Vanhoutte PM (1999):

Potassium ions and endothelium-derived hyperpolarisation factor in guinea-pig and porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 127: 27-34

113. Reibel DK, Rovetto MJ (1978):

Myocardial ATP synthesis and mechanical function following oxygen deficiency. *Am J Physiol* 78: H620-624

114. Reichenspurner H, Russ C, Meiser BM, Überfuhr P, Nollert G, Weinhold Ch, Reichart B (1993a):

University of Wisconsin solution for myocardial protection in heart transplantation – a comparison with HTK. *Transplant Proc* 25,6: 3042-3043

115. Reichenspurner H, Russ C, Überfuhr P, Nollert G, Schlüter A, Reichart B, Klövekorn WP, Schüler S, Hetzer R, Brett W, Posival M, Körner MM, Körfer R (1993b):

Myocardial preservation using HTK solution for heart transplantation. A multicenter study *Eur J Cardio-Thor Surg* 7: 414-419

116. Reimer KA, Hill ML, Jennings RB (1981):

Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotide pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *J Mol Cell Cardiol* 13: 229-239

117. Rolles K, Foreman J, Pegg DE (1984):

Preservation of ischemically injured canine kidneys by retrograde oxygen persufflation. *Transplantation* 38,2: 102-106

118. Rosenkranz ER, Okamoto F, Buckberg GD, Vinten-Johansen J, Allen BS, Leaf J, Bugyi H, Young H, Barnard J (1986):

Studies of controlled reperfusion after ischemia: II. Biochemical studies: failure of adenosine triphosphat levels predict recovery of contractile function after controlled reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92: 488-501

119. Ross H, Escott ML (1979):

Gaseous oxygen perfusion of the renal vessels as an adjunct in kidney preservation. *Transplantation* 28: 362

120. Ruigrok TJC, de Moes D, Borst C (1983):

Bretschneider's histidine-buffered cardioplegic solution and the calcium paradox. *J Thorac Cardiovasc Surg* 86: 412-417

121. Saad S, Minor T, Kötting M, Fu ZX, Hagn U, Paul A, Nagelschmidt M (2001):

Extension of ischemic tolerance of porcine livers by cold preservation including postconditioning with gaseous oxygen. *Transplantation* 71,4: 498-502

122. Saitoh Y, Hashimoto M, Ku K, Kin S, Nosaka S, Masumura S, Nakayama K (2000):

Heart preservation in HTK solution: role of coronary vasculature in recovery of cardiac function. *Ann Thorac Surg* 69: 107-112

123. Schmoeckel M, Nollert G, Shahmohammadi M, Young VK, Chavez G, Kasper-König W, White DJG, Müller-Höcker J, Arendt RM, Wilbert-Lampen U, Hammer C, Reichart B (1996):

Prevention of hyperacute rejection by human decay accelerating factor in xenogenic perfused working hearts. *Transplantation* 62,6: 729-734

124. Shunichi S, Paul RJ (1997):

The endothelium-dependent Substance P relaxation of porcine coronary arteries resistant to nitric oxide synthesis inhibition is partially mediated by 4-aminopyridine-sensitive voltage-dependent K⁺-channels. *Endothelium* 5: 287-295

125. Silber R, Sauer B, Eigel P, Henrich HA, Elert O (1991):

Electron microscopic changes and edema after nine hours' perfusion of isolated canine hearts. *Heart Vessels* 6: 203-210

126. Smolens IA, Follette DM, Berkoff HA, Castellanos LM, Segel LD (1995):

Incomplete recovery of working heart function after twenty-four-hour preservation with a modified University of Wisconsin solution. *J Heart Lung Transplant* 14,5: 906-915

127. Southhard JH, van Gulik TM, Ametani MS, Vreugdenhil PK, Lindell SL, Pienaar BL, Belzer FO (1990): Important components of the UW solution. *Transplantation* 49: 251-257

128. Stringham JC, Southard JH, Hegge J, Triemstra L, Fields BL, Belzer FO (1992): Limitations of heart preservation by cold storage. *Transplantation* 53,2: 287-294

129. Suckfüll MM, Pieske O, Müdsam M, Babic R, Hammer C (1994): The contribution of endothelial to hyperacute rejection in xenogenic perfused working hearts. *Transplantation* 57,2: 262-267

130. Tabayashi K, McKeown PP, Miyamoto M, Luedtke AE, Thomas R, Allen MD, Misbach GA, Ivey TD (1988): Ischemic myocardial protection: comparison of nonoxygenated crystalloid, oxygenated crystalloid and oxygenated fluorocarbon cardioplegic solutions. *J Thorac Cardiovasc Surg* 95: 239-246

131. Termignon JL, Pradier F, Petit A, Journois D, Weiss M, Mazmanian M (1995): Effect of calcium concentration, lactobionate content and sodium/potassium ratio of preservation solutions on resting left ventricular pressure and postreperfusion function of rabbit heterotopic heart transplants. *J Heart Lung Transplant* 14,6: 1126-1135

132. Walpoth BH, Tschopp A, Peheim E, Schaffner T, Althaus U (1995): Assessment of Troponin T für detection of cardiac rejection in a rat model. *Transplant Proc* 27,3: 2084-2087

133. Webb WR, Dodds RP, Unal MO, Karow AM, Cook A, Daniel CR (1966): Suspended animation of the heart with metabolic inhibitors. Effect of magnesium sulfate or fluoride and adenochochrome in rats. *Ann Surg* 164,3: 343-351

134. Weisel RD (1993): Models of myocardial stunning. *J Card Surg* 8, Suppl.: 287-290

135. Williamson CS (1926):

Further studies of the transplantation of the kidney. J Urol 16: 231

136. Wollenberger A, Ristau O, Schoffa (1960):

Eine einfache Technik der extrem schnellen Abkühlung größerer Gewebstücke. Pflügers Arch 270: 399-412

137. Yan ZQ, Yokota T, Zhang W, Hansson GK (1996):

Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in injured artery. Circ Res 79,1: 38-44

138. Yokoyama H, Ohmi M, Murata S, Nakame T, Tabayashi K, Mohri H (1995):

Proposal of a working left heart model with a heterotopic transplantation technique in rats. J Heart Lung Transplant 14,4: 706-712

139. Zimmer HG, Trendelenburg C, Kammermeier H, Gerlach E(1995):

De novo synthesis of myocardial adenine nucleotides in the rat: acceleration during recovery from oxygen deficiency. Circulation Res 22: 635-642

140. Zimmermann ANE, Hülsmann WC (1966):

Paradoxical influence of calcium ions on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. Nature 211: 646-647

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.