

Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

**Einfluss von Metformin und Ranolazin
auf den Reperfusionsschaden des hämorrhagischen Schocks
am Tiermodell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Constantin Carlos Alejandro Conrad Enrique Weil von der Ahe
geboren am 06.01.1986 in Frankfurt am Main

Betreuer: Prof. M. Buerke

Gutachter: Prof. A. Simm
Prof. L. Mägdefessel, München

08.10.2019

22.09.2020

Meinen Eltern

Referat

Der hämorrhagische Schock ist fast für jeden vierten Tod weltweit in der Gruppe der 15- bis 45-Jährigen verantwortlich. Er besitzt heute noch eine hohe Mortalität. Ziel der durchgeführten Untersuchung ist es, die protektiven Eigenschaften von Ranolazin und Metformin in Bezug auf einen durch Blutung und Transfusion ausgelösten Reperfusionsschaden zu zeigen.

Hierfür wurden Wistar-Ratten mit verschiedenen Dosen und Applikationsformen der Medikamente vorbehandelt. Die Versuchstiere wurden durch Blutabnahme eine Stunde lang einer Hypovolämie und Hypotonie ausgesetzt. Danach wurde das heparinisierte Blut reperfundiert, sodass es zu einem möglichen Reperfusionsschaden kam, wobei die Tiere weitere drei Stunden überwacht wurden. Am Versuchsende wurden die Organe entnommen und laborchemisch, biochemisch und histologisch untersucht.

Die Gabe von Metformin zeigte in unterschiedlichen Applikationsformen und Dosen eine Verdopplung der Überlebenszeit und hatten damit einen signifikanten protektiven Effekt. Die Proteinexpression – nachgewiesen durch Western Plotting – zeigte z. B. eine verringerte I κ B α -Konzentration im Herzen, eine verringerte MPO-Aktivität in der Niere und im Herzen sowie eine geringere Schädigung in den Zellen und im Gewebe, was die These unterstützt.

Für Ranolazin konnte ebenfalls ein protektiver Effekt nachgewiesen werden. Es kam zu einer ebenfalls signifikanten Überlebenszeitverlängerung. Die laborchemischen und histologischen Untersuchungen zeigten, dass Ranolazin einen direkten protektiven Einfluss am Herzen hat und es so zu einem Überlebensvorteil kommt.

Die genauen Mechanismen beider Substanzen noch nicht endgültig und vollständig geklärt; es bedarf weiterer Untersuchungen. Die Ergebnisse dieser Studie müssen durch weitere Studien verifiziert werden, um eine Grundlage für klinische Studien und Anwendungen zu schaffen.

Inhaltsverzeichnis

Referat	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. Schock	2
1.1.1. Definition	2
1.1.2. Einteilung nach Ätiologie, Pathomechanismus und Hämodynamik	2
1.2. Hämorrhagischer Schock	3
1.2.1. Definition	3
1.2.2. Pathophysiologie	5
1.3. Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens	7
1.4. Aktuelle Therapie des hämorrhagischen Schocks	10
1.5. Experimenteller hämorrhagischer Schock	13
1.6. Ranolazin	14
1.6.1. Chemie und Wirkungsweise	14
1.6.2. Zulassung und bisheriger Einsatz	15
1.7. Metformin	16
1.7.1. Chemie und Wirkungsweise	16
1.7.2. Zulassung und bisheriger Einsatz	17
2. Ziel der Untersuchung	19
3. Materialien	20
3.1. Operationsgeräte und -besteck	20
3.2. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	20
3.2.1. Laborgeräte	20
3.2.2. Plastikwaren	21
3.2.3. Glasware	21
3.2.4. Chemikalien und Medikamente	21
4. Methoden	22
4.1. Hämorrhagischer Schock	22
4.1.1. Versuchsvorbereitung	22
4.1.1.1. Tierversuchsgenehmigung	22
4.1.1.2. Versuchstiere	22
4.1.2. Versuchsaubau	23
4.1.3. Versuchsdurchführung	23
4.2. Probenaufbereitung	25
4.2.1. Proteinextraktion	25
4.2.2. Gesamtproteingehalt-Bestimmung nach Popov	25
4.3. Western Blot	26
4.3.1. Prinzip des Western Blots	26
4.3.2. Gelelektrophorese	26

4.3.3. Proteinübertragung aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Polyvinylidendifluorid-Membran	28
4.3.4. Proteinfärbung mit Ponceau S	28
4.3.5. Nachweis von spezifischen Antigenen	29
4.4. Myloperoxidaseaktivität	30
4.5. Histologie	31
4.6. Angaben zur Statistik	32
5. Ergebnis	33
5.1. Effekte von Ranolazin beim hämorrhagischen Schock	33
5.1.1. Einfluss von Ranolazin auf die Überlebenszeit	33
5.1.2. Hämodynamische Veränderungen durch Ranolazin	34
5.1.3. Einfluss von Ranolazin auf den Hämatokrit-Wert	36
5.1.4. Einfluss von Ranolazin auf die Myloperoxidaseaktivität	37
5.1.5. Einfluss von Ranolazin auf die Proteinexpression in den Organe	38
5.2. Metformin	42
5.2.1. Einfluss von Metformin auf die Überlebenszeit	42
5.2.2. Hämodynamische Veränderungen durch Metformin	43
5.2.3. Einfluss von Metformin auf den Hämatokrit-Wert	44
5.2.4. Einfluss von Metformin auf die Myloperoxidaseaktivität	45
5.2.5. Einfluss von Metformin auf die Proteinexpression in den Organe	47
5.3. Histologie	50
5.3.1. Herz	50
5.3.2. Leber	51
5.3.3. Lunge	52
5.3.4. Niere	53
6. Diskussion	54
6.1. Auswahl des Tiermodells	54
6.2. Auswahl des Schockmodells und der Schocktiefe	54
6.3. Ranolazin	55
6.3.1. Effekte von Ranolazin auf das Überleben und die Hämodynamik	55
6.3.2. Effekte von Ranolazin auf die Proteinexpression	56
6.3.3. Effekte von Ranolazin auf die Myloperoxidaseaktivität und die histologischen Veränderungen	59
6.4. Metformin	61
6.4.1. Effekte von Metformin auf das Überleben und die Hämodynamik	61
6.4.2. Effekte von Metformin auf die Proteinexpression	61
6.4.3. Effekte von Metformin auf die Myloperoxidaseaktivität und die histologischen Veränderungen	62
6.5. Limitationen der Arbeit	66
7. Zusammenfassung	67
8. Literaturverzeichnis	68
9. Thesen	76
10. Anhang	77
Erklärung über früherer Promotionsversuche	VI

Selbständigkeitserklärung.....	VII
Lebenslauf	IX
Danksagung.....	X

Abkürzungsverzeichnis

ACS	American College of Surgeons
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AE	angiographische Embolisation
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP activated protein kinase
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
ATLS	Advanced Trauma Life Support
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	3´5´ zyklisches Adenosinmonophosphat
CYP3A4	Cytochrom P3A4
DBP	diastolischer Blutdruck
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
Hk	Hämatokrit
HTAB	3-Hydroxy-2,4,6-Triiodobenzosäure
HZV	Herzzeitvolumen
i.a.	intraarteriell
i.p.	intraperitoneal
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukine
kDA	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
MABP	mittlerer arterieller Blutdruck
mGPD	mitochondriale glycerophosphate Dehydrogenase
MODS	Multiorganversagen
MPO	Myeloperoxidase
MPTP	mitochondrial permeability transition pores
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
OCT	organic cation transport
PKA	Proteinkinase A
PRI	Pressure Rate Index
PTT	partielle Thromboplastinzeit
PTZ	Plasmathrombinzeit
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rcf	relative centrifugal force
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm (U/min)	Umdrehung per Minute
SBP	systolischer Blutdruck
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS-	Tris buffered saline
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung

Der starke Blutverlust mit oder ohne Trauma ist ein extremer pathologischer Zustand, unter dem der Körper alle ihm zur Verfügung stehenden Mechanismen ausschöpft, um einen suffizienten Blutdruck und Gewebepfusion und damit den Sauerstoffbedarf auf zellulärer Ebene zu gewährleisten. Der Körper erhöht die Herzfrequenz, das Schlagvolumen und zentralisiert das Blutvolumen. In der präklinischen Phase sind die Blutungskontrolle mit Hilfe von Tourniquet und Kompressionsverbänden sowie die Aufrechterhaltung des Blutdrucks durch Volumensubstitution oder medikamentöse Intervention vorrangig. In der Schockraumphase steht eine zügige Diagnostik im Vordergrund und die daran anschließende differenzierte systematische Behandlung, die eine Aufrechterhaltung einer adäquaten Homöostase, den Einsatz von Blutprodukten und Gerinnungsfaktoren sowie ggf. eine erste chirurgische oder angiologische Intervention zur Blutungskontrolle beinhaltet (David et al. 2013).

Durch den Einsatz von Erythrozytenkonzentraten und die Reperfusion kommt es nach dem Ischämieschaden zum Reperfusionsschaden. Dieser zeichnet sich durch das Bilden von freien Sauerstoffradikalen aus, die zu einem weiteren Zelluntergang führen. Des Weiteren kommt es zu einer Akkumulation insbesondere von neutrophilen Granulozyten, die eine weitere Bildung von freien Sauerstoffradikalen und eines Ödems begünstigen. Durch die Ödematisierung und Entzündung des Gewebes kommt es zu einer Minderperfusion und zu weiteren Zelluntergängen. Diese können infolge von sympathoadrenergen Kompensationsmechanismen zu einer Störung der Mikrozirkulation und zur Umstellung des Zellstoffwechsels führen. Das Übergreifen der Entzündungsreaktion auf den Gesamtorganismus kann zu einem Multiorganversagen führen (Lippuner 2004). Seit etwa 30 Jahren werden Versuche und Untersuchungen durchgeführt, um einen Therapieansatz zu finden, der den Reperfusionsschaden minimiert. In den USA wurden im Jahr 2000 ca. 2 Millionen Patienten wegen eines Traumas hospitalisiert, die ca. \$ 35 Milliarden direkte Versorgungskosten verursachten (Seifert 2007; DiMaggio et al. 2016). Es wird geschätzt, dass der gesamte volkswirtschaftliche Schaden bei ca. \$ 671 Milliarden liegt (Centers for Disease Control and Prevention 2015).

Der französische Chirurg Henry François Le Dran beschrieb 1731 erstmalig die hämodynamische Instabilität eines Patienten nach einer Schussverletzung, die erst später durch eine Übersetzung ins Englische als „Schock“ bezeichnet wurde. Anfangs wurde der Schock als eine reine neurologische Reaktion auf die Verwundung gedeutet. Erst seit dem amerikanischen Bürgerkrieg wird der Begriff Schock in der heutigen Art und Weise benutzt. Die Auffassung über die Pathophysiologie des Schocks hat sich im Laufe der Zeit geändert, die Symptome jedoch nicht (Millham 2010).

1.1. Schock

1.1.1. Definition

Der Schock ist die kritische Verminderung der Mikrozirkulation mit Hypoxie des Gewebes und metabolischen Störungen (Meinert et al. 2017). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) stellt im Jahr 2000 fest, dass jährlich über 5 Millionen Menschen aufgrund von Traumen sterben. Das ist fast ein Zehntel aller Todesfälle. In der Gruppe der 15- bis 45- Jährigen ist ein Trauma für jeden zweiten Todesfall verantwortlich. Die Blutung und der hämorrhagische Schock werden bei 30–40 % der Fälle als Ursache des Todes angegeben. Der hämorrhagische Schock ist die häufigste Schockart bei Traumapatienten. Der hämorrhagische Schock nach Trauma ist für den größten Teil der Mortalität in den ersten Stunden, in über 80 % der Sterbefälle während der Operation nach schwerem Trauma und in 50 % der Todesfälle in den ersten 24 Stunden nach Trauma verantwortlich (Kauvar et al. 2006).

1.1.2. Einteilung nach Ätiologie, Pathomechanismus und Hämodynamik

Der Schock kann aufgrund seiner Ätiologie, seines Pathomechanismus und der Hämodynamik in verschiedene Gruppen aufgeteilt werden. Auf Hinshaw und Cox gehen die klassischen Einteilungen des Schocks zurück (Hinshaw und Cox 1972). Es werden vier Hauptformen unterschieden:

- Der *hypovolämische Schock* ist durch einen verminderten venösen Rückfluss zum Herzen bei normaler Pumpfunktion aufgrund von z. B. Blutverlust, Exikose oder Verbrennung gekennzeichnet.
- Der *kardiogene Schock* wird durch das Pumpversagen des Herzens verursacht. Dieses entsteht durch eine Kontraktionsminderung z. B. bei Myokardinfarkt, Volumenbelastung/Druckbelastung, Klappeninsuffizienzen/-stenosen oder durch Herzrhythmusstörungen.
- Der *distributive Schock* ist durch einen niedrigen Gefäßtonus gekennzeichnet und eine dadurch resultierende Erhöhung der Gefäßkapazität. Dieser untergliedert sich in drei weitere Schockformen:
 - den *septischen Schock* mit einer Verteilungsstörung des zirkulierenden Blutes durch eine Sepsis,
 - den *anaphylaktischen Schock* durch eine Überempfindlichkeitsreaktion auf physikalische oder chemische, IgE-abhängig oder unabhängig vermittelte Mediatoren,

- den *neurogenen Schock* durch ein Ungleichgewicht zwischen Sympathikus und Parasympathikus bei der Regulation der glatten Gefäßmuskulatur.
- Der *extrakardiale obstruktive Schock* entsteht durch die Behinderung der Auswurfaktion durch ein Hindernis, das außerhalb des Herzens liegt wie z. B. eine Herzbeutelampnade, Aortenisthmusstenose oder fulminante Lungenembolie (Hinshaw und Cox 1972; Adams et al. 2001).

Der hypovolämische Schock unterteilt sich in folgende Formen:

Spezielle Formen des hypovolämischen Schocks	
Hämorrhagischer Schock	Akute Blutung ohne wesentliche Gewebeschädigung (Gewalt von aussen)
Hypovolämischer Schock im engeren Sinne	Kritische Abnahme des zirkulierenden Plasmavolumens ohne akute Blutung
Traumatisch-hämorrhagischer Schock	Akute Blutung mit ausgedehnter Gewebeschädigung
Traumatisch-hypovolämischer Schock	Kritische Abnahme des zirkulierenden Plasmavolumens ohne akute Blutung mit ausgedehnter Gewebeschädigung

Tab. 1: Einteilung des hypovolämischen Schocks (Janssens und Graf 2004)

1.2. Hämorrhagischer Schock

1.2.1. Definition

Nach Adams ist der hämorrhagische Schock ein Zustand unzureichender Durchblutung vitaler Organe aufgrund von intravasalem Volumenmangel mit kritisch verminderter kardialer Vorlast. Dadurch resultiert ein konsekutives Missverhältnis von Sauerstoffangebot und -verbrauch (Adams et al. 2001). Durch die oben beschriebenen Mechanismen können folgende Leitsymptome auftreten: Tachykardie, Tachypnoe, Hypotonie, Hautblässe, kalter Schweiß, schwach tastbarer Puls, Angst, Unruhe sowie Oligurie bis hin zu Anurie (Kreimeier und Prückner 1998). Der hämorrhagische Schock wird nach der Advanced Trauma Life Support (ATLS)-Klassifikation der Amerikanischen Gesellschaft für Chirurgie (ACS) nach der Schwere des Blutverlusts klassifiziert:

Schwere des Blutverlustes gemäß ACS/ATLS	Klasse I	Klasse II	Klasse III	Klasse IV
Blutverlust	< 750 ml	750-1500 ml	1500-2000 ml	> 2000 ml
Pulsrate (min)	< 100	> 100	> 120	> 140
Blutdruck	Normal	Normal	Erniedrigt	Erniedrigt
Atemfrequenz (min)	14 - 20	20 - 30	30 - 40	> 40
Urinproduktion (ml/h)	> 30	20 - 30	5 - 15	keine
Zentrales Nervensystem	Etwas ängstlich	ängstlich	ängstlich, verwirrt	anteilnahmslos

Tab. 2: Advanced Trauma Life Support (ATLS)-Klassifikation der Schwere des Blutverlusts (bezogen auf einen 70-kg-Patienten) (Kortbeek et al. 2008)

Weiter kann der hämorrhagische Schock in vier klinische Phasen eingeteilt werden:

Phase 1

auch Akutphase genannt, beginnt mit dem schockauslösenden Ereignis und der daraus entstehenden Hypoperfusion des Gewebes und der Organe.

Phase 2

ist gekennzeichnet durch die Reaktion des Körpers auf die präklinischen sowie die klinischen Maßnahmen innerhalb der ersten 24 h.

Phase 3

ist die hypermetabolische Phase und der Versuch der Wiederherstellung der Körperfunktionen nach dem Schock. Übersteht die Person diese Phase aufgrund der Schwere der Verletzung nicht, kommt es zu

Phase 4

mit Multiorganversagen (MODS), indem die eigentlich nützlichen Entzündungsreaktionen zur Selbstzerstörung führen. Es folgen ein weiterhin massiv gesteigerter Stoffwechsel, der Abbau von Proteinen und die Hochregulierung von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren wie z. B. verschiedenen Cytokinen (IL-1, IL-6, IL-8). Durch die oben beschriebenen Mechanismen kommt es zu einer Schwächung des Organismus. Der Organismus wird anfälliger für Infektionen jeglicher Art, die zu einer bakteriellen Sepsis oder einem septischen Schock führen können (Peitzman et al. 1995).

1.2.2. Pathophysiologie

Aufgrund des akuten Blutverlustes z. B. durch ein traumatisches Ereignis fällt der Blutdruck im arteriellen System ab. Es kommt zur körpereigenen Katecholaminausschüttung als Kompensationsmechanismus und einer daraus resultierenden Tachykardie sowie zur Gefäßtonuserhöhung in den arteriellen Gefäßen und den venösen Kapazitätsgefäßen. Durch die Zentralisation des Blutes werden eine Versorgung der wichtigen Organe (Herz/Gehirn) und die Stabilisation des Blutdrucks sichergestellt. Durch Ausschüttung von ADH wird das Renin-Angiotensin-Aldesteron-System aktiv und es wird vermehrt Wasser und Natrium resorbiert, um das intravasale Volumen hoch zu halten. Diese Mechanismen werden noch durch eine am Anfang bestehende Verschiebung von intestinaler Flüssigkeit in das Gefäßsystem unterstützt. Die Flüssigkeitsverschiebung dreht sich später in die umgekehrte Richtung um, da es durch die beginnende Gewebshypoxie zu einer Ansammlung von sauren Metaboliten kommt. Die Gefäßpermeabilität steigt und die Flüssigkeit kann nicht mehr intravasal gehalten werden. Aufgrund der Azidose kommt es zuerst zu einer Atonie der präkapillaren Gefäße und einer Stase des Blutes, die zu Mikrothromben bis hin zur Verbrauchskoagulopathie führen kann (Janssens und Graf 2004).

Durch die genannten Mechanismen kommt es zu einer Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff. Die Zelle stellt von aerober auf anaerobe Energiegewinnung um. Es kommt zum Laktatanstieg bei gleichzeitigem Abfall des pH-Wertes in der Zelle. Es beginnen sich Zerfallsprodukte wie ADP, AMP und Phosphat in der Zelle zu kumulieren (Johansson et al. 2017). Aus den angereicherten reduzierten Abbauprodukten wie z. B. Pyridinnukleotide entstehen Superoxid- und Hydrogenperoxid-Radikale, die bei einer Reperfusion zur Lipidperoxidation führen (Tatarkova et al. 2005). Wenn die aerobe wie anaerobe Glykolyse nicht mehr ausreicht, um den Zellstoffwechsel mit genügend Energie zu versorgen, kommt es zu irreversiblen Gewebeschäden.

Durch den Abfall von ATP ist die Zelle nicht mehr in der Lage, ausreichend Natriumionen über den Na⁺/K⁺ ATPase auszutauschen, und versucht dies mit dem passiven Austausch von interzellulärem Natrium durch extrazelluläres Kalzium auszugleichen. Es kommt zum Anstieg von Kalziumionen in den Mitochondrien und dadurch zur Öffnung von mitochondrial permeability transition pores (MPTP), die den Untergang der Mitochondrien zur Folge haben. Über eine Kaskade, die durch das mitochondriale Cytochrom C ausgelöst wird, kommt es zur Apoptose oder bei komplettem ATP-Mangel zur Zellnekrose (Abb. 1) (Thiel et al. 2006).

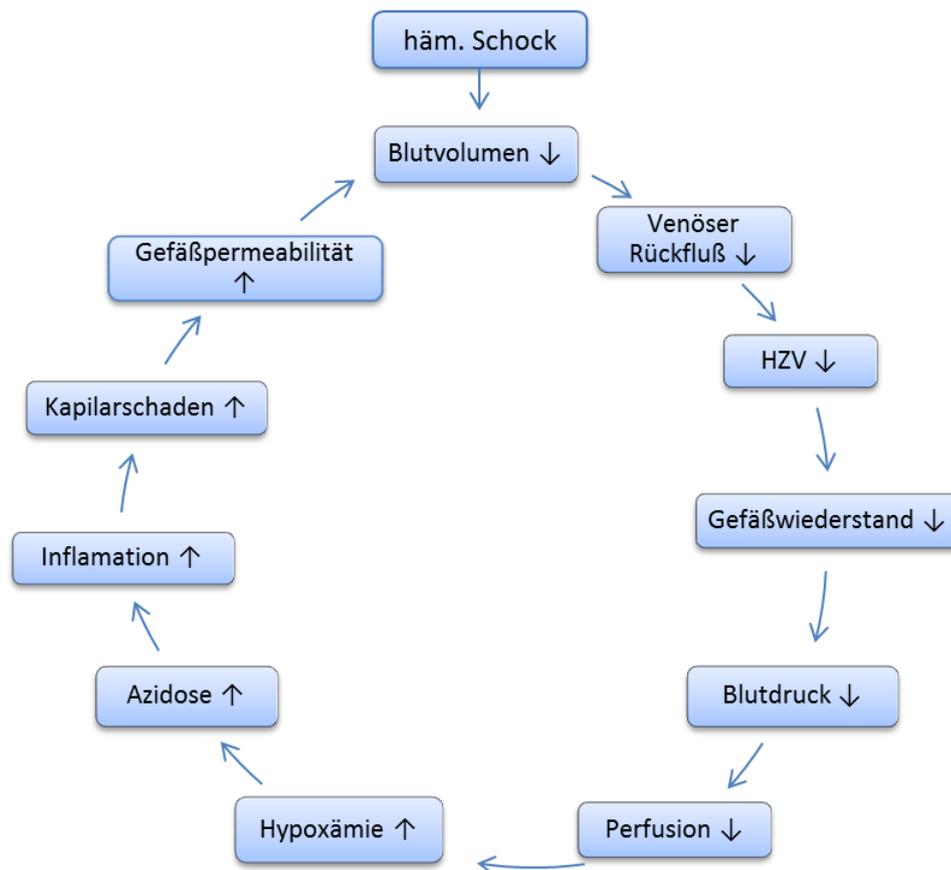


Abb. 1 Circulus vitiosus des hämorrhagischen Schocks

Die Mortalität beim hämorrhagischen Schock wird entscheidend von der „lethal triad“ bestimmt. Sie setzt sich aus Hypothermie, Azidose und Koagulopathie (Trauma-induzierte Koagulopathie) zusammen. Die Kontrolle dieser drei Faktoren spielt in der Behandlung des hämorrhagischen Schocks eine wesentliche Bedeutung.

Die *Hypothermie* entsteht durch ein Versagen der körpereigenen Thermoregulation und hat zur Folge, dass wichtige Enzyme, die z. B. zuständig sind für die Hämostase, inaktiviert werden. Die Hypothermie kommt meist durch die präklinischen Abläufe und mit dem Blutverlust einhergehenden Wärmeverlust zustande.

Die *Azidose* entsteht durch das Absinken des pH-Wertes unter 7,35. Es kommt zu einer verminderten Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIIa, Va/Xa und VII/FT-Komplex. Des Weiteren ist die Wirkung exogener und endogener Katecholamine bei zu niedrigem pH-Wert vermindert. Die *Koagulopathie* wird durch freigesetzte Gewebefaktoren aus dem geschädigten Gewebe hervorgerufen. Als Gegenreaktion kommt es zu einer systemischen Antikoagulation und einer Hyperfibrinolyse, ausgelöst durch das Protein C (David et al. 2013).

1.3. Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens

Der durch die Ischämie hervorgerufene Sauerstoffmangel führt zur Reduktion von ATP. Die ATP-abhängigen Pumpen der Zellmembran reduzieren dadurch ihre Aktivität. Nun strömt Kalzium und mit ihm Wasser in die Zelle. Gleichzeitig wird Adenosinmonophosphat (AMP) abgebaut und es kommt zu einer Akkumulation von Hypoxanthin. Bei der Reperfusion beginnt die Xanthinoxidase das angefallene Hypoxanthin in Xanthin umzuwandeln. Dabei entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Sauerstoffradikale sind gute Reduktoren und Oxidatoren. Die Sauerstoffradikale beginnen mit der Oxidation von Fettsäuren und Lipiden, die einen direkten Zellschaden sowie die Aktivierung von Leukozyten hervorrufen. Die Leukozyten beginnen nun aufgrund von verstärkter Adhäsion in das Endothel einzuwandern, was einen Teil des „Reflow Paradox“ verursacht. Ortsständige Makrophagen verstärken die Inflammation durch Ausschüttung von Zytokinen wie TNF- α , Interleukin- (IL-6, IL-1 β , MCP-1, IL-12), Sauerstoffradikalen und NO. Durch die Zytokine wird die Einwanderung von polymorphkernigen Leukozyten weiter gesteigert, die im Gewebe zusätzlich Superoxidanionen freisetzen (Abb. 2). Dies führt zu einer weiteren Zerstörung der Endothelschranke und zur stärkeren Verschiebung von Flüssigkeit in das Gewebe (Thiel et al. 2006).

Es kommt durch die Schädigung oder den Untergang der Membran zum Austritt von intrazellulären Molekülen, wie z. B. Myoglobine oder Kalium, die durch die Reperfusion in den Körper und seine Organe eingeschwemmt werden. Diese Produkte führen zu einer systemischen Inflammationsreaktion und zum Anstieg von z. B. der Aspartat-Aminotransferase, Alanin-Aminotransferase, Laktat-Dehydrogenase und Serum-Kreatinin (Percival und Rasmussen 2012). Mit der Schädigung des Endothels wird auch das Komplementsystem aktiviert (Collard und Gelman 2001). Diese Reaktionen können als schwerste Folge des hämorrhagischen Schocks das Multiorganversagen (MODS) auslösen. Das MODS wird als klinisches Syndrom bezeichnet und definiert sich durch eine zunehmende lebensbedrohende, aber mögliche reversible pathophysiologische Dysfunktion in zwei oder mehreren Organen oder Organsystemen. Es wird zwischen einem frühen (< 7 Tage) oder späten (> 7 Tage) MODS unterschieden (Ramirez 2013).

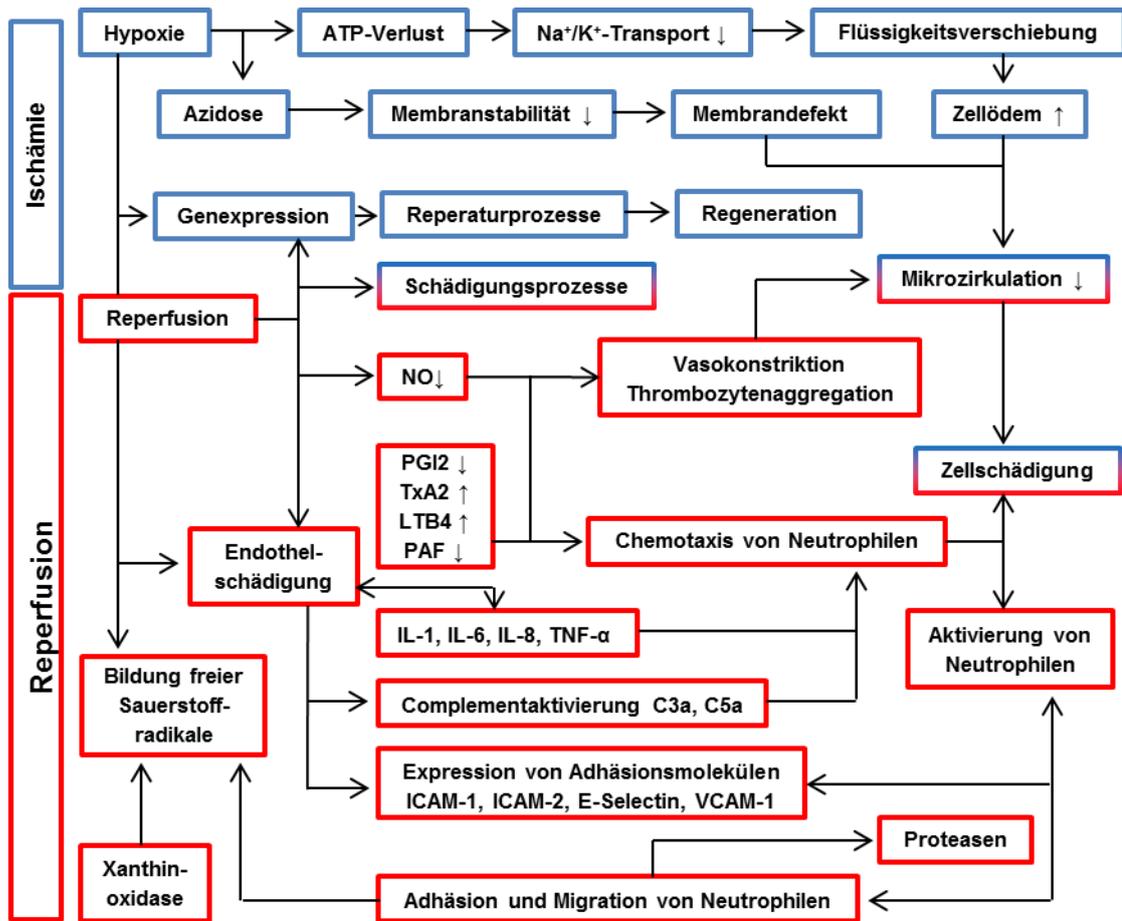


Abb. 2 Schematische Darstellung der Pathophysiologie der Ischämie-Reperfusion in Anlehnung an Braun (Braun et al. 2005). Die Zellschädigung und dadurch die Apoptose der Zelle werden während der Ischämie (blau) durch den Verlust von ATP und das Zustandekommen der Azidose durch die Hypoxie eingeleitet. Dadurch kommt es zu einer Flüssigkeitsverschiebung und zu Membrandefekten. Dies führt zu einem Zellödem und später zu Zellschädigung. In der Reperusionsphase (rot) werden diese Effekte noch ergänzt und verstärkt, sodass es zur Bildung von Sauerstoffradikalen kommt sowie zu erhöhter Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α), Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, ICAM-2, E-Selectin, VCAM-1) auf den Zellen und Aktivierung des Komplementsystems. Dadurch kommt es zur Aktivierung und zur Chemotaxis von Neutrophilen. Dies führt neben der durch Vasokonstriktion gestörten Mikrozirkulation zur Zellschädigung.

Risikofaktoren für MODS sind die Sepsis, schwere Traumen, Verbrennungen und eine Immunschwäche. Meistens ist die Lunge als Erstes betroffen, die sich nach der Ischämie-Reperfusion innerhalb von 24 bis 72 Stunden von einer akuten respiratorischen Insuffizienz bis hin zur Schocklunge (ARDS) entwickelt. Weiter können Leber-, Nieren-, Gastrointestinal- und Herzversagen auftreten. Abhängig von der Zahl der ausgefallenen Organe liegt die Mortalität zwischen 30 und 100 %. Die meisten Patienten versterben nicht direkt am Blutverlust, sondern z. B. durch das von diesem ausgelöste ARDS (Collard und Gelman 2001). Neben den allgemein ablaufenden Reaktionen können noch weitere Organ- oder körperregionale spezifische Schäden auftreten, wie z. B. an:

Extremitäten

Durch die gegebene Anatomie der Extremitäten mit ihren in Faszien eingeschlossenen Muskeln und Nerven sind diese leicht anfällig für ein Kompartmentsyndrom. Die in der Ischämie-Reaktion erfolgte Schädigung des Endothels führt durch erhöhte Permeabilität der Gefäße in der Reperfusion zu einer weiteren Verschiebung von intravasaler Flüssigkeit in das Gewebe. Durch Drucksteigerung in den Kompartimenten kommt es zu einer erneuten Kompression des Gewebes und zum weiteren Untergang von Gewebe (Percival und Rasmussen 2012).

Herzmuskel

Während der Reperfusion des Myokards sind vier verschiedene Arten der kardialen Dysfunktion zu unterscheiden (Yang 2018):

1. Stunned Myokard ist eine zeitlich beschränkte Dysfunktion (Kontraktionsreduktion) des Myokards nach erfolgreicher Reperfusion. In dem betroffenen Gebiet findet kein relevanter Zelluntergang statt und es kann sich komplett von der stattgefundenen Ischämie erholen (Buja und Vander Heide 2016).
2. *Non-reflow-Phänomen* ist definiert als unzureichende Perfusion des Myokards, trotz vollständiger Wiederherstellung eines koronaren Blutflusses (Lim 2016). Man geht von vier unterschiedlichen pathophysiologischen Mechanismen aus:
 - 2.1. a) Distale atherothrombotische Embolisation, b) Ischämieschaden, c) Reperfusionsschaden und d) Schäden in der koronaren Mikrozirkulation. Der Reperfusionsschaden ist auf die Einschwemmung von Neutrophilen und Blutplättchen und die damit einhergehende Aktivierung von Entzündungsmediatoren, Sauerstoffradikalen und proteolytischen Enzymen zurückzuführen (Niccoli et al. 2009).
3. *Reperfusionarrhythmien* können zum plötzlichen Herztod führen. Bei der Reperfusion kann es aufgrund von plötzlicher Änderung der Ionenkonzentration in der ischämischen Region zu Arrhythmien kommen. Meist sind diese Arrhythmien aber nicht von Relevanz (Neri et al. 2017).

4. *Tödlicher Reperfusionsschaden* aufgrund von unterschiedlichen Mechanismen wie z. B.:

Calcium Paradoxum

Bei der Reperfusion des Herzmuskelgewebes entsteht ein Kalzium-Overload (Mani et al. 2015), das die bereits in der Ischämie entstandenen Schäden am sarkoplasmatischen Retikulum durch die Inaktivierung der Ionenpumpen weiter begünstigt. Bei der erneuten Oxygenierung des Gewebes kann die Zelle wieder ATP bereitstellen. Das überschüssige Kalzium und die neue vorhandene Energie führen zu einer Hyperkontraktion der Zelle. Durch das angereicherte Kalzium kommt es zu einem Anschwellen und später zu einem Untergang der Mitochondrien. Die Hyperkontraktion und die Zerstörung der Mitochondrien führen zum Zelluntergang (Piper et al. 2004).

Myokardiale Nekrosen entstehen ab einer Ischämiezeit von länger als 30 Min. Histologisch ist der irreversible Verlust von Myokardzellen durch Koagulationsnekrosen sichtbar (Kumar et al. 2015). Durch den Zelluntergang kommt es zu einem Remodeling des Gewebes, was Narbenbildung, Hypertrophie sowie Aktivierung von Zytokinen, Entzündung und Reparatur umfasst (Sutton und Sharpe 2000).

1.4. Aktuelle Therapie des hämorrhagischen Schocks

In der präklinischen Phase haben die Rettungskräfte verschiedene Möglichkeiten, die Blutungen zu minimieren. Bei Extremitätenverletzungen stehen verschiedene Arten von Tourniquets zur Verfügung, wenn Kompressionsverbände nicht wirksam sind. Diese Tourniquets sollten nicht länger als zwei Stunden, maximal sechs Stunden am Ursprung der Extremität befestigt werden. Mit Hilfe von Beckengurten kann das Becken stabilisiert und komprimiert werden. Des Weiteren können extern sichtbare Blutungen mit Druckverbänden und gerinnungsfördernden Substanzen und Schwämmen zum Stillstand gebracht werden (David et al. 2013).

Bei der Volumentherapie wird eine leichte Hypotension angestrebt mit dem Ziel, einen systolischen Blutdruck von 80–90mmHg oder einen MABP von 50–60mmHg zu halten, solange der Patient dies tolerieren kann (Spahn et al. 2013; Liu et al. 2014). Die Flüssigkeitsrestriktion beeinflusst nicht nur den Blutdruck, sondern auch direkt die Verdünnung des Blutes. Die Volumengabe ist direkt proportional zur Blutverdünnung (Weiss et al. 2010).

Bei der Volumentherapie ist neben der Menge auch die Art der Infusionslösung für die Therapie entscheidend. Bis jetzt konnte noch keine optimale Infusionslösung gefunden werden. Die meistverwendete Infusionslösung ist die Ringerlaktatlösung, da sie wahrscheinlich im

Vergleich zur Isotonen-Kochsalzlösung zu einer besseren Pufferung der metabolischen Azidose führt. Es sind geringere Volumina nötig und es kommt zu geringeren physiologischen Veränderungen. Diesen Vorteilen stehen die vermehrten Endothelschäden der Ringerlaktatlösung gegenüber. Zurzeit wird die leitliniengerechte Therapie mit kristalloiden Lösungen, wie z. B. der Ringerlaktatlösung, durchgeführt, mit Ausnahme von Patienten mit schweren Kopfverletzungen (Spahn et al. 2013).

Der Einsatz von Katecholaminen soll den Blutdruck ohne den durch Volumengabe erzeugten Verdünnungseffekt erhöhen und dadurch die Gewebepfusion erhalten. Einige Studien legen aber nahe, dass es so zu einer schlechteren Mikrozirkulation kommt und die Mortalität steigt (Harrois et al. 2011). Es wird zu einem vorsichtigen Einsatz von Katecholaminen geraten (David et al. 2013).

Operatives klinisches Management

Das Hauptaugenmerk der operativen Versorgung liegt in den ersten 24 Stunden auf der Kontrolle der Blutungen und nicht auf der Wiederherstellung von anatomischen Strukturen. Es wird versucht, die Operationszeit unter zwei Stunden zu halten. Erst nach der Stabilisierung des Patienten wird eine schrittweise Wiederherstellung angestrebt. Das zweizeitige Vorgehen verbessert die Überlebensprognose der Patienten. Zur Blutungskontrolle kann die angiographische Embolisation (AE) beitragen, wenn diese innerhalb der ersten drei Stunden nach dem Ereignis durchgeführt wird. Besonders bei Einblutung in das Becken, die Leber und die Milz hat sich die AE bewährt (Requarth et al. 2011; David et al. 2013).

Um der oben beschriebenen „lethal triad“ entgegenzuwirken, werden therapeutisch folgende Schritte eingeleitet: Hypothermie wird versucht zu verhindern, indem der Patient präklinisch vor Auskühlung bewahrt wird. Dabei kann es nötig sein, ihn aktiv zu wärmen, z. B. durch warme Infusionen, Heizdecken oder Luftheizsysteme. Zur Therapie und Prognoseverbesserung des Patienten ist die frühe Erkennung der Azidose von entscheidender Bedeutung. Es ist wichtig, die Koagulopathie so früh wie möglich zu erkennen und zu therapieren (Requarth et al. 2011; David et al. 2013). Zur Diagnose stehen neben klinischen Zeichen verschiedene patientennahe Labordiagnostika zur Verfügung wie z. B. INR CoaguChek XS Pro® oder ROTEM®. Des Weiteren helfen laborchemische Parameter wie die PTT, PTZ oder Gerinnungsfaktoren die akute Situation des Patienten zu beurteilen. Bei Massenblutung ist es nötig, neben der Volumentherapie auch Thrombozyten- und Fibrinogenkonzentrate zu substituieren, diese mindestens nach jedem sechstem Erythrozytenkonzentrat. Das Verhältnis zwischen Fresh-Frozen-Plasma und Erythrozytenkonzentrat sollte 1:1 oder 1:2 betragen (Theusinger et al. 2012; Davenport et al. 2011). Durch die gezielte Therapie der Koagulopathie, die frühe Erkennung und spezifische

Substitution von Gerinnungsfaktoren, reduzieren sich der Verbrauch von Blutprodukten und das damit einhergehende Risiko. Infolge der verbesserten Blutstillung wird angenommen, dass sich auch die Gesamtprognose verbessert, dies muss aber in zukünftigen Studien noch verifiziert werden (David et al. 2013).

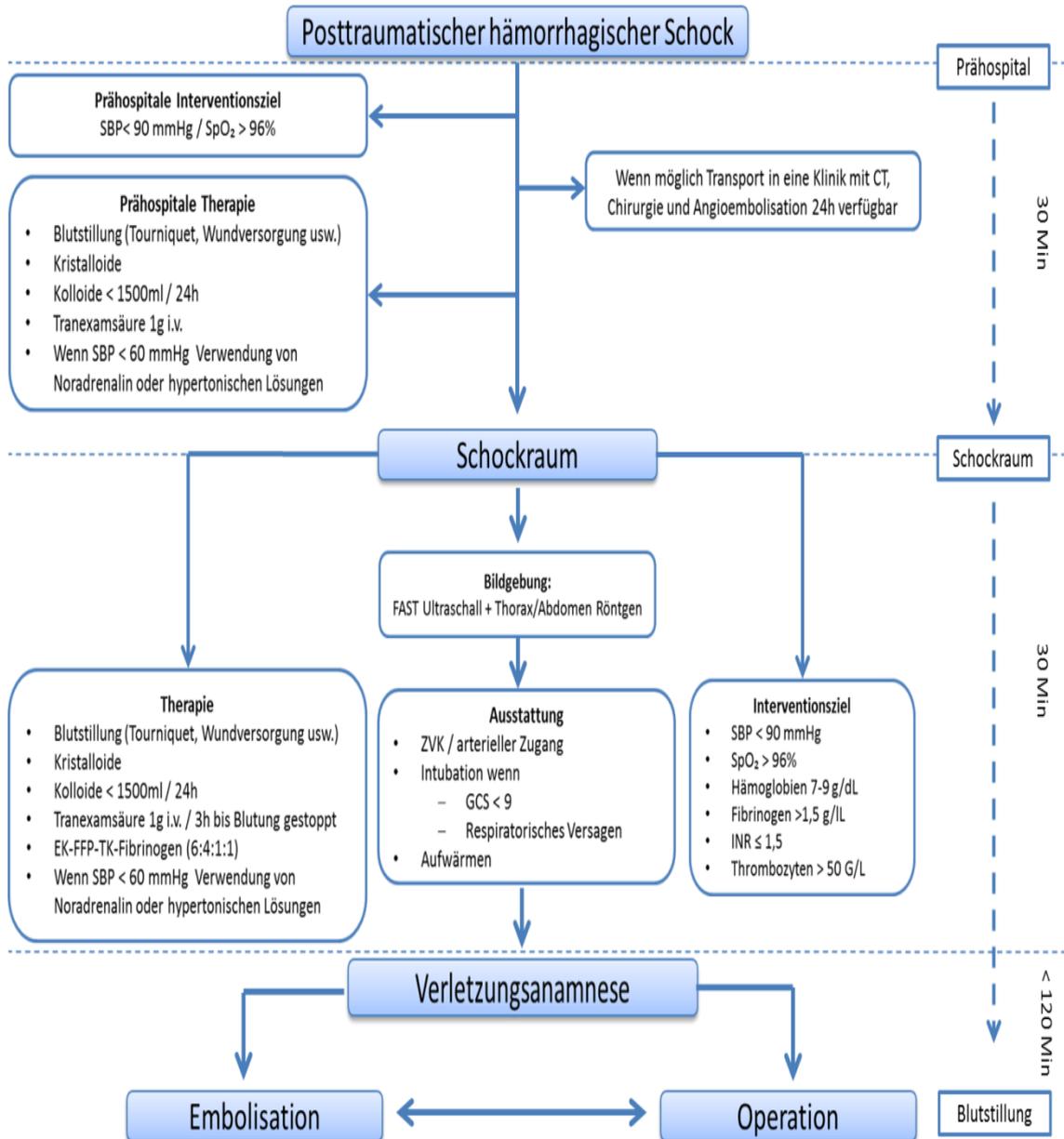


Abb. 3: Entscheidungspfad für das Versorgen von Bauch-/Hüftverletzungen ohne Gehirnbeteiligung in Anlehnung an David (David et al. 2013).

Die Abbildung beschreibt die drei Phasen der Versorgung mit jeweiligen Therapiemöglichkeiten sowie den angestrebten Interventionszielen. Die erste Phase ist die präklinische Phase, die auf das zügige Verbringen in eine geeignete klinische Einrichtung abzielt. Die zweite Phase ist die Schockraumphase, die auf eine schnelle und umfassende Diagnostik setzt und die Voraussetzung schafft für die klinische Phase (dritte Phase) mit umfangreicher chirurgischer/angiologischer Intervention und intensivmedizinischer Versorgung.

1.5. Experimenteller hämorrhagischer Schock

Es gibt verschiedene Modelle, unter experimentellen Bedingungen einen hämorrhagischen Schock zu erzeugen.

Das *Fixed Pressure Model* erzeugt einen hämorrhagischen Schock, indem es über einen vor Beginn festgesetzten Zeitraum einen bestimmten Blutdruck erzeugt. Mit Hilfe eines Katheters wird entweder Blut abgenommen oder hinzugefügt, sodass ein konstanter Blutdruck herrscht. In den unterschiedlichen Ausführungen dieses Modelles kann der mittlere arterielle Blutdruck zwischen 70 und 35 mmHg liegen und dies über eine Zeit von 30 Min. bis zu 5 Stunden (Lomas-Niera et al. 2005). Der druckkontrollierte hämorrhagische Schock induziert eine konstante Schocktiefe mit den entsprechenden systemischen wie organischen Entzündungsreaktionen. Dadurch überzeugt diese Modell durch eine hohe Standardisierung, Reproduktivität und Verlässlichkeit. Es lässt aber keine Kompensationsmechanismen des Körpers zu (Pfeifer et al. 2013).

Im *Fixed Volume Modell* wird der hämorrhagische Schock durch Entfernen eines vorher festgesetzten Volumens an Blut erzeugt. Dieses Blutvolumen kann bis zu 50 % des totalen Blutvolumens entsprechen. Der Vorteil dieses Modelles ist das Zulassen der physiologischen hämodynamischen Reaktion des Körpers auf den Blutverlust (Lomas-Niera et al. 2005). Dem gegenüber steht die schlechte Reproduzierbarkeit des hämorrhagischen Schocks aufgrund der großen Interindividualität der Versuchstiere (Pfeifer et al. 2013). Der unkontrollierte hämorrhagische Schock wird herbeigeführt durch z. B. eine Inzision der Milz oder Leber oder durch standardisiertes Trauma etwa durch eine Oberschenkelfraktur. Dieses Modell bildet die klinische Situation am besten ab und erlaubt den körpereigenen Kompensationsmechanismen zur Wirkung zu kommen. Bei dieser Versuchsart ist eine Standardisierung z. B. der Schocktiefe nur schwer zu erreichen (Lomas-Niera et al. 2005).

1.6. Ranolazin

1.6.1. Chemie und Wirkungsweise

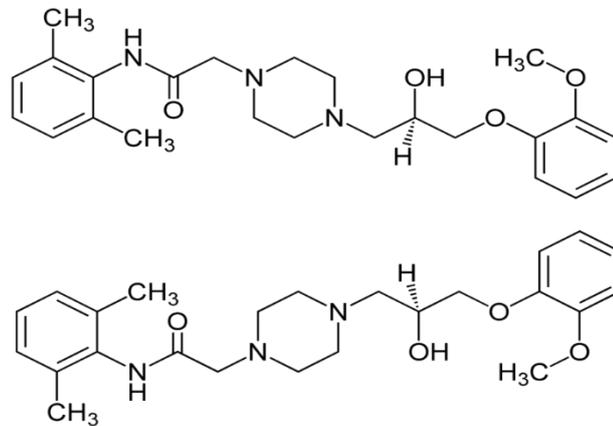


Abb. 4: Strukturformel von Ranolazin

Ranolazin ist ein Piperazinderivat und wird seit 2008 auf dem europäischen Markt als anti-anginöses Medikament verwendet (Maier 2009). Die Wirkungsweise von Ranolazin wird über die Schließung der Natriumkanäle erzielt. Die Aktivierung der Kardiomyozyten durch einen elektrischen Impuls führt unter normalen Umständen dazu, dass sich die Natriumkanäle früh und schnell öffnen und es so zu einer starken Depolarisierung kommt. Die starke Depolarisierung hat auch zur Folge, dass sich die Natriumkanäle rasch schließen (Abb. 5).

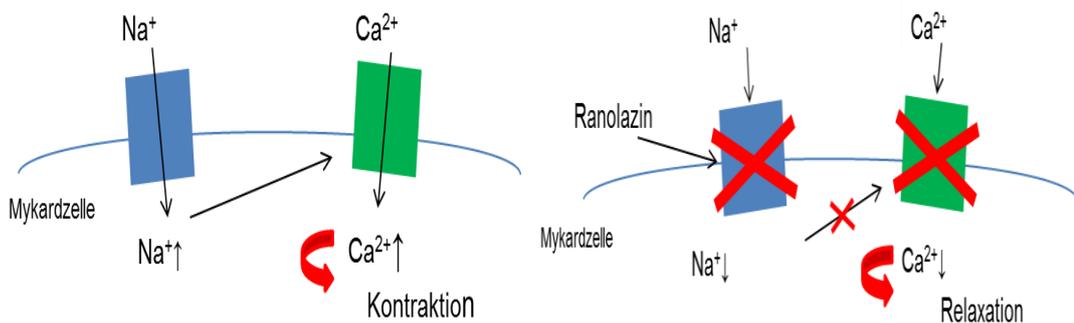


Abb. 5: rechts: Darstellung des Zusammenspiels der Natrium- und Kalziumkanäle in einer Myokardzelle; links: Wirkungsweise von Ranolazin in einer Myokardzelle

Bei einer Ischämie, oxidativem Stress oder zu großer Wandspannung des Herzmuskels kommt es zu einem späteren weiteren Einstrom von Natrium, da die Natriumkanäle nicht geschlossen werden. Durch die hohe Natriumkonzentration im Zytosol strömt weiter Kalzium in die Zelle

und es kommt nicht zu einer Relaxierung der Herzmuskelzelle (Reddy et al. 2010; Stone 2008). Durch Ranolazin wird das schnelle Schließen des Natriumkanals erreicht. Dadurch kommt es zu einer besseren Relaxierung des Herzmuskels und zu einer Reduktion der diastolischen linksventrikulären Steifigkeit (Abb. 5,6).

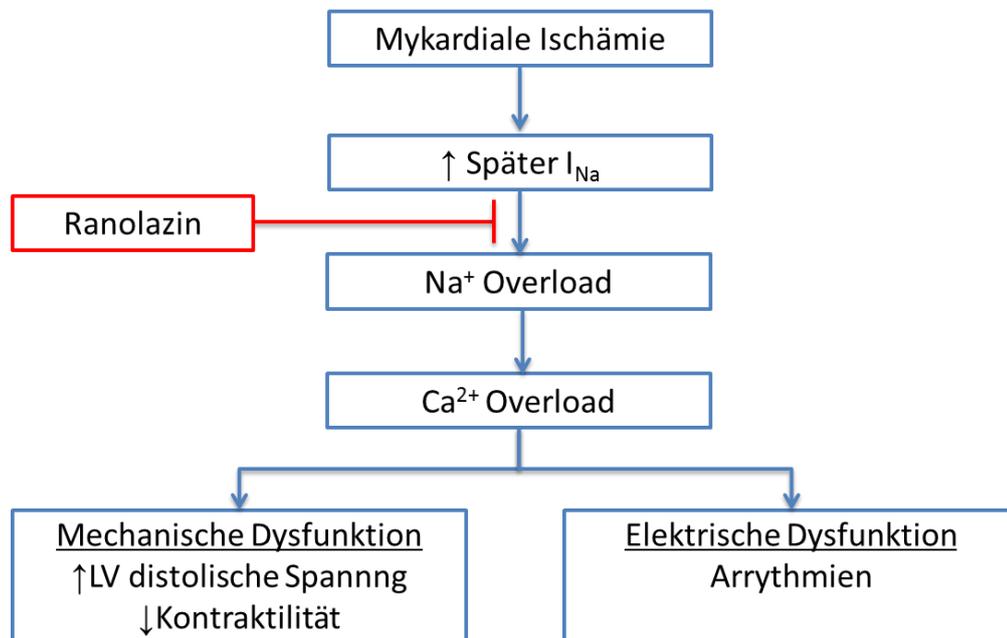


Abb. 6: Eingriff von Ranolazin in den Pathomechanismus der myokardialen Ischämie nach Belardinelli (Belardinelli et al. 2006)

Die durchschnittliche Bioverfügbarkeit von Ranolazin liegt zwischen 35 % und 50 %. Seine Spitzenkonzentration wird nach 2 bis 6 Stunden nach oraler Aufnahme erreicht. Die Einnahme von Ranolazin ist kontraindiziert bei schweren Nierenfunktionsstörungen (Kreatinin-Clearance < 30 ml) oder ab mäßiger Leberfunktionsstörung (EMEA 2014). Unter Ranolazin kommt es häufig zu Schwindel, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen (arznei-telegramm 2009).

1.6.2. Zulassung und bisheriger Einsatz

Ranolazin wurde in der Europäischen Union 2008 zur symptomatischen Behandlung der chronischen stabilen Angina pectoris zugelassen (EMEA 2014). Auf dem deutschen Markt wird Ranolazin unter dem Namen Ranexa® vertrieben. Ranolazin wird nur als Zusatztherapie empfohlen, wenn Mittel der ersten Wahl wie z. B. Kalziumantagonisten oder Betablocker nicht ausreichend ansprechen (arznei-telegramm 2009).

Die klinische Wirksamkeit wurde in drei Hauptstudien nachgewiesen. Die Pivot-Studie CARISA wies die Verbesserung der Belastbarkeit bei Männern und eine Reduktion von Nitroglycerin bei beiden Geschlechtern unter Ranolazin 750 mg und 100 mg als Ergänzungstherapie nach. Die Basismedikation mit z. B. Amlodipin 5 mg, Diltiazem 180 mg oder Atenolol 50 mg wurde beibehalten (EMA 2014).

In der ERICA-Studie wurde Ranolazin ergänzend zur Behandlung mit Amlodipin 10 mg eingesetzt. 565 Patienten wurden nach einer einwöchigen täglichen Anfangsdosis von Ranolazin 1000 mg über sechs Wochen Ranolazin 2000 mg pro Tag verabreicht. 45 % der Studienteilnehmer nahmen darüber hinaus noch langwirksame Nitrate. Ranolazin führte im Vergleich zum Placebo dazu, dass eine signifikante Abnahme des Verbrauchs von schnellwirksamen Nitraten stattfand. Ebenfalls reduzierte sich die Anzahl der Angina-pectoris-Attacken (EMA 2014).

In der CARISA- sowie in der MERLIN-TIMI-36-Studie wurde eine Reduktion von HbA1C um ca. 0,5 %-Punkte festgestellt (Reddy et al. 2010).

1.7. Metformin

1.7.1. Chemie und Wirkungsweise

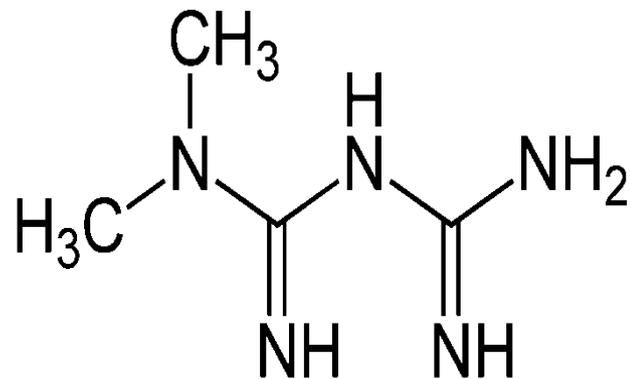


Abb. 7: Strukturformel von Metformin

Metformin, auch 1,1-Dimethylbiguanid genannt, ist ein Guanidinderivat, das aus der Geißraute (*Galega officinalis*) gewonnen werden kann (Rena et al. 2013). Aufgrund seiner hydrophilen Eigenschaften ist Metformin auf einen Transport der „organic cation transport“ (OCT)-Gruppe angewiesen. Im Zellinneren angelangt, blockiert es im Mitochondrium den Complex I der Atmungskette. Durch eine pH-Wert-Erhöhung wird Metformin dahingehend verändert, dass es eine hohe Kupferaffinität aufweist und so die Redoxreaktion im Mitochondrium stört. Durch die

reduzierte Produktion von ATP in der Atmungskette verschiebt sich das Verhältnis von ATP zu ADP und AMP zu Gunsten von Letzterem. Dies hat die Aktivierung der AMP activated protein kinase (AMPK) zur Folge (Pryor und Cabreiro 2015). Die Aktivierung von AMPK wird als eine der Ursachen für die Wirkung von Metformin angenommen. Diese nimmt Einfluss auf den gesamten Energiehaushalt des Körpers, indem sie den Körper von einer anabolen ATP-verbrauchenden Stoffwechsellage in eine katabole ATP-erzeugende Stoffwechsellage überführt.

Des Weiteren hemmt Metformin die mitochondriale glycerophosphate Dehydrogenase (mGPD). Durch diese Mechanismen werden die Glukoneogenese, die hepatische Glucoseproduktion sowie die Synthese von Lipiden und Triglyzeriden gehemmt. Die Aktivierung von AMPK wird als mögliche Ursache des Langzeiteffekts auf den Lipidstoffwechsel vermutet. Neben dem von AMPK abhängigen Signalweg wird noch ein unabhängiger Signalweg für die Wirkung von Metformin diskutiert wie z. B. die oben genannte cAMP-PKA-Kaskade (Rena et al. 2013). Da Metformin nicht die Verstoffwechslung von Glukose in der Peripherie blockiert, kommt es nicht zu einem Anstieg von Laktat (Bailey und Turner 1996).

Metformin wird primär durch renale Elimination ausgeschieden. Nach oraler Einnahme erreicht es nach 150 Min. seine maximale Plasmakonzentration. Durch die fast über 50-jährige klinische Erfahrung mit der Metformin-Therapie kann ein hohes Maß an Patientensicherheit gewährleistet werden (Rena et al. 2013). Bei einer Behandlung mit Metformin sind folgende Kontraindikationen zu beachten: diabetische Ketoazidose sowie akute oder chronische Erkrankungen, die zu einer Gewebshypoxie führen können, wie kardiale oder respiratorische Insuffizienz und ein frischer Myokardinfarkt. Die häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen einer Metformin-Therapie sind Übelkeit, Erbrechen, Durchfall, Bauchschmerzen und Appetitverlust (Berlin Chemie 2014). Die gefürchtetste Nebenwirkung der Metformin-Therapie ist die Laktatazidose. Sie tritt mit einer Häufigkeit von 0,01 bis 0,08 pro 1000 Patientenjahre auf. Meistens tritt diese aufgrund von nicht Beachten der Kontraindikationen auf. Das Risiko, an der durch Metformin induzierte Laktatazidose zu versterben, ist genauso so hoch wie durch eine Hypoglykämie bei einer Sulfonyl-Harnstoff-Therapie zu Tode zu kommen. Durch eine Hämodialyse ist es möglich, bei der Laktatazidose den erhöhten Metformin-Plasmaspiegel zu senken. Bei der Beachtung der Kontraindikationen der Metformin-Therapie ist die Laktatazidose eine sehr seltene Nebenwirkung (Bailey und Turner 1996).

1.7.2. Zulassung und bisheriger Einsatz

Schon im Mittelalter wurde die Wechselwirkung zwischen der Geißraute (*Galega officinalis*), woraus das Metforminderivat Guanidin gewonnen wird, und Diabetes mellitus hergestellt. In den späten fünfziger Jahren wurde Metformin in der Therapie gegen Diabetes mellitus

wiederentdeckt. 1975 wurde Metformin zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 in Europa zugelassen (Thomas und Gregg 2017). Metformin ist die erste Wahl bei der medikamentösen Behandlung von Diabetes mellitus Typ 2. Es kann in der Monotherapie sowie der Kombinationstherapie eingesetzt werden. Des Weiteren wird es im Off-Label-Einsatz auch zur Therapie des polyzystischen Ovarialsyndroms bei Kinderwunsch eingesetzt (Bundesärztekammer et al. 2013).

Es wurde beobachtet, dass bei Diabetes-Patienten, die mit Metformin behandelt worden sind, eine Verbesserung des Herz-Kreislauf-Systems eintrat. Einige präklinische Studien verweisen darauf, dass Metformin arteriosklerotische Prozesse verlangsamt, die Größe des Myokardinfarkts verkleinert und die Umbauprozesse nach einem Infarkt positiv beeinflusst (Rixen und Tack 2014). Es wird vermutet, dass Metformin protektive Eigenschaften bei der Entstehung von Arteriosklerose hat, indem es die Endothelintegrität wahrt und das Entstehen von Plaques verhindert. Dies wird durch eine Reduktion des oxidativen Stresses, der das Endothel schädigt, über die Aktivierung der AMPK erreicht, sowie die Blockierung des Proteinkinase-NAD(P)H-Oxidations-Signalwegs. Die dadurch erzielte Reduktion von zytosolischer reactive oxygen species (ROS) verhindert die endotheliale Apoptose (Pryor und Cabreiro 2015). Aufgrund von mehreren großen epidemiologischen Studien wird vermutet, dass Metformin das Risiko reduziert, an verschiedenen Arten von Krebs zu erkranken, wie z. B. Kolorectal-, Leber-, Pankreas-, Magen- oder Oesophaguskrebs (Pryor und Cabreiro 2015).

2. Ziel der Untersuchung

Der hämorrhagische Schock ist die häufigste Schockart bei Traumapatienten. Der hämorrhagische Schock setzt verschiedene inflammatorische Kaskaden, die Dysregulation des Säure-Base-Haushalts und des Gerinnungsystems sowie eine Immunschwäche in Gang. Neben der Volumentherapie und dem operativen Management werden bereits seit 30 Jahren nach neuen Ansätzen in der pharmakologischen Therapie gesucht. Die hierbei eingesetzten Substanzen sollen anti-inflammatorisch, einfach in der Anwendung, gut verträglich und steuerbar sein. Die vorliegende Arbeit möchte einen Beitrag zur Weiterentwicklung eines neuen Ansatzes in der pharmakologischen Therapie des hämorrhagischen Schocks leisten. Dazu wurden folgende Hypothesen für die untersuchten Substanzen Metformin und Ranolazin aufgestellt:

Metformin

- 1) Metformin verlängert bei einem hämorrhagischen Schock die Überlebenszeit und verbessert die hämodynamischen Veränderungen nach Ischämie/Reperfusion.
- 2) Metformin führt über den AMPK-Weg zur einer Downregulation von NF- κ B und damit zu einer verminderten Transkription von Zytokinen.
- 3) Der Reperfusionsschaden der Organe Herz, Lunge, Leber und Niere beim hämorrhagischen Schock wird durch die Metformin-Vorbehandlung reduziert.
- 4) Aufgrund der Reduktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) werden weniger pro-inflammatorische Proteine exprimiert und es folgt eine geringere Leukozytenakkumulation mit sinkender MPO-Aktivität im Gewebe.
- 5) Metformin kann über AMPK-abhängige und -unabhängige Wege die Expression von pro-inflammatorischen Proteinen hemmen und die Expression von anti-inflammatorischen Proteinen fördern.

Ranolazin

- 1) Ranolazin verlängert bei einem hämorrhagischen Schock die Überlebenszeit und mildert die hämodynamischen Veränderungen des Ischämie-/Reperfusionsschadens ab.
- 2) Ranolazin kann die Folgen aus Ischämie-/Reperfusionsschaden aufgrund seiner cytoprotektiven und anti-arrhythmischen Wirkung abschwächen.
- 3) Durch eine bessere Versorgung des Gewebes nach Ranolazin-Vorbehandlung fallen die durch die Ischämie-/Reperfusionsschaden hervorgerufenen Schädigungen der Organe Herz, Lunge, Leber und Niere geringer aus.
- 4) Aufgrund einer verbesserten Durchblutung der Schockorgane werden weniger pro-inflammatorische Proteine exprimiert und es folgt eine geringere Leukozytenakkumulation mit sinkender MPO-Aktivität nach Ranolazin-Vorbehandlung.

3. Materialien

3.1. Operationsgeräte und -besteck

Gefäßklammer	B. Braun	Melsungen
Messeinheit: xtrans Messkammer: RE7 ST-933	CODAN pvb Critical Care GmbH	Forstinning
Monitor: Sirecust 1281	Siemens	Erlangen
Pinzette, Skalpell	B. Braun	Melsungen
Pipette: Eppendorf Reference 0,5–10, 10–100,100–1000µl	Eppendorf	Hamburg
Rechnungseinheit: Sirens	Siemens	Erlangen

3.2. Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

3.2.1. Laborgeräte

Automatische Pipettierhilfe: Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Electrophoresis Powersupply EPS600	Amersham Pharmacia Bio- tech	Freiberg i. Br.
Filmmaterial: Amersham Hyper-film ECL	Amersham GE Healthcare Limited	Buckinghamshire, England
Heizblock: Thermomixer 5437	Eppendorf	Hamburg
Immobilon-P Transfer Membrane	Millipore	Bedford, Mass., USA
Inkubator Heraeus	Heraeus	Hanau
Kamera: Power Shot G6	Canon	Japan
Laborwaage: FI3100	Fischerbrand	Schwerte
Magnetrührer: Variomag	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Minizentrifuge	Qualitron Inc.	Seoul, Südkorea
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo	Gießen
Präzisionswaage: Precisa 40SM-200A	PAG Oerlikon AG	Zürich, Schweiz
Scanner AGFA Snapscan	AGFA	Köln
Spectralphotometer S.250	Secoman	Ales Cedex, Frank- reich
Zentrifuge: Centrifuge 5417R	Eppendorf	Hamburg
Zentrifuge Typ: 2010	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
Gelkammer	Hoefer Pharmacia Biotech Inc.	San Francisco, USA

3.2.2. Plastikwaren

Centrifuge Tubes 50 ml	Labcon	San Rafael, USA
Halbmikroküvetten 1201	Ratiolab	Dreieich
Mehrweghahn Discofix 3SC	Braun	Melsungen
Pipettenspitzen 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl	Eppendorf	Hamburg
Katheterspitze: Intranedic Luer Stub Adapter 23G, Nadeln: Microlance 3 27G Spritze 1 ml/10 ml	Becton-Dickenson	Franklin Lakes, USA
Safe-Lock Eppendorf Tubes 2 ml	Eppendorf	Hamburg

3.2.3. Glasware

Objektträger Superfrost Plus Mezel Gläser	Labotec	Wiesbaden
Zählkammer nach Neubauer: improved	Kühn & Bayer	Nidderau
Hämatokrit-Kapillaren (heparinisiert)	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
Hamiltonspritze	ITO Coporation	Fuji, Japan

3.2.4. Chemikalien und Medikamente

Benzonasen Nucleasen 10KU	Novagen Merck	Darmstadt
Rotiphorese NF-Harnstoff	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Thiouria 99,0 %	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
ChapsPuffer	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Complete Mini	Roche Diagnostics	Mannheim
PVDF Membran: Immobilon-P 0,45mm	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
TRIS Pufferan 99,9 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Glycine	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
SDS Ultrapure	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
NaCl	Appli Chem	Darmstadt
Methanol	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Tween 20	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad Laboratories	Hercules, USA
30 % Acrylamid/BisSolution 29:1	Serva Electrophoresis	Heidelberg
2-Propanol	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Roti-Load 1, Milchpulver, Ethansäure 99,9 %	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Siofor 500 (Metformin)	Berlin Chemie	Berlin
Heparin-Natrium 25000	Ratiopharm	Ulm
NaCl 0,9 %	B. Braun	Melsungen
Narcoren Pentobarbital-Natrium 16 g/100 ml	Merial	Duluth, USA
Ranolazin	Berlin Chemie	Berlin
BSA Albumin Standard, No. 23209	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Blue G	SERVA Electrophoresis	Heidelberg

4. Methoden

4.1. Hämorrhagischer Schock

4.1.1. Versuchsvorbereitung

4.1.1.1. Tierversuchsgenehmigung

Die Haltung sowie die Tierversuche wurden streng nach den Auflagen und Bestimmungen der §§ 7, 8 und 9 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Unter dem Aktenzeichen 203.h-42502-2-849 wurden die Tierversuche vom Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt genehmigt.

4.1.1.2. Versuchstiere

Die Experimente wurden an männlichen Tieren des Rattenstammes Wistar aus der internen Zucht der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät, durchgeführt. Die Tiere wiesen ein mittleres Gewicht von 250 g auf, waren zwischen neun und zwölf Wochen alt und zeigten keine klinischen Auffälligkeiten. Die Ratten wurden in Makrolonkäfigen (Typ III) in zwei Gruppen unter konventionellen (holoxenen) Bedingungen auf Weichholzgranulat gehalten. Als Enrichment gemäß dem Konzept von Russel und Burch (1959) stand eine Rattenröhre zur Verfügung (Russell und Burch 1959). Durch automatische Belüftungs- und Temperatursteuerung wurden die Haltungsräume konstant mit $22 \pm 2 \text{ C}^\circ$, $55 \pm 5 \%$ relative Luftfeuchte und einer zehnfachen Luftumwälzung pro Stunde betrieben. Der natürliche Tagesrhythmus wurde durch zeitgesteuerte Beleuchtungsanlagen mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12/12 aufrechterhalten. Um für die Experimente den Zustand der Homöostase zu gewährleisten, wurden die Untersuchungen erst nach einer Adaptationszeit von minimal 14 Tagen durchgeführt. Wasser sowie artgerechtes Trockenfutter (Haltungsdiet Ratten/Mäuse, Altromin 1324) wurden ad libitum bereitgestellt.

4.1.2. Versuchsaubau

Im Hauptteil der Arbeit wurde der Einfluss von Ranolazin und Metformin auf die Überlebenszeit von Wistar-Ratten bei einem hämorrhagischen Schock untersucht. Neben den Vitalparametern MABP, HF, PRI und HK wurden verschiedene laborchemische Bestimmungen wie die Myeloperoxidaseaktivität, T-bet, p38 MAPK und I κ B α -Expression gemessen. Darüber hinaus wurden die Organe der Versuchstiere makro- und mikroskopisch untersucht, um das Ausmaß der Entzündungskaskade zu quantifizieren. Es wurden unterschiedliche Dosen und Applikationsformen der jeweiligen Medikamente verwendet. Es gab eine Vehikel Gruppe, zwei Ranolazin Gruppen, eine Metformin Gruppe und für jedes Medikament eine Sham Gruppe. Die einzelnen Versuchsgruppen hatten eine Größe zwischen 5 und 10 Tieren.

4.1.3. Versuchsdurchführung

Zu Beginn der Versuchsdurchführung (Finalisierungsversuche) wurden die Ratten durch eine intraperitoneale Pentobarbitalinjektion (1/10) narkotisiert. Durch einen standardisierten Schmerztest, bei dem ein Schmerzreiz an Schwanz und Bauch der Ratte gesetzt wurde, konnte die Tiefe und Wirksamkeit der Narkose bestimmt werden. Wenn nötig wurde die Prozedur wiederholt, bis eine ausreichende Narkosetiefe sichergestellt war. Durch einen 1–2 cm langen Schnitt entlang der medialen Halsregion wurde der Zugang für die Tracheotomie sowie das Legen des arteriellen Katheters hergestellt. Das Operationsfeld wurde mit Hilfe des Lokalanästhetikums Xylocain zusätzlich betäubt. Die Trachea wurde freipräpariert und quer eröffnet. Nun konnte ein Plastiktubus in die Trachea eingeführt und mit zwei Fäden (3-0, Ethicon) fixiert werden. Dieser Tubus sorgte für sichere Atemwege während der Dauer des gesamten Versuchs. Im Anschluss wurde die linke Arteria carotis communis freigelegt. Mit einer Gefäßklammer proximal und einem Faden distal wurden die zukünftigen Schnittstellen unterbunden. Durch einen diagonalen Schnitt und mit einer Katheterführungshilfe wurde der Katheter in das Gefäß eingeführt und nach Lösung der Gefäßklammer bis kurz vor den linken Ventrikel geführt. Anschließend wurde der Katheter mit Fäden fixiert. Das Operationsfeld wurde mit in NaCl getränkten, sterilen Kompressen abgedeckt. Mit Hilfe des Katheters konnte eine permanente Kreislaufüberwachung durchgeführt werden, auch das Entnehmen und Geben von Blut war darüber möglich. Der Katheter wurde bei Bedarf mit einer NaCl-Heparin-Lösung (1/100) gespült und so stets offen gehalten. Die Körperkerntemperatur wurde mit Heizkissen während der gesamten Versuchsdauer bei 37°C gehalten. Es erfolgte eine ständige rektale Temperaturmessung. Nach einer 15-minütigen Ruhephase startete der Versuchsdurchlauf. Den Tieren (außer den Sham-Gruppen) wurde so lange Blut über den Katheter entnommen, bis sich der mittlere Blutdruck auf 40 \pm 5 mmHg eingestellt hatte. Das entnommene Blut wurde durch Heparin an der Gerinnung gehindert und gekühlt. Über eine Stunde wurde dieser niedrige

Blutdruck durch weitere Blutentnahme und bei Unterschreiten des Grenzwertes von 36 mmHg durch Eigenblutgabe gehalten. Nach einer Stunde wurde das den Tieren zu Beginn des Versuchs entnommene Blut wieder verabreicht, nachdem es zuvor auf Körperkerntemperatur erwärmt worden war. Alle 20 Minuten wurden nun Herzfrequenz, mittlerer arterieller Blutdruck (MABP), systolischer Blutdruck (SBP), diastolischer Blutdruck (DBP) und Pressure Rate Index (PRI) gemessen. Alle 60 Minuten wurde der Hämatokrit-Wert bestimmt. Durch den eingebrachten Katheter war es möglich, alle oben genannten Werte außer dem Hämatokrit-Wert in Echtzeit zu messen. Es wurden so lange die verschiedenen Werte bestimmt, bis entweder der Tod eintrat oder die Gesamtversuchszeit überschritten worden war. Der gesamte Versuch wurde auf 240 Minuten beschränkt. Der Tod wurde durch fehlenden Puls, einen Blutdruck unter 30 mmHg und fehlende Atmung festgestellt. Bei Tieren die die Gesamtversuchszeit überlebt hatten, wurde das Experiment durch deren Tötung mittels Pentobarbituratspritze beendet.

Zeit (Min.)	-15	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200	220	240
HF	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
PRI	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MABP	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HK		x			x			x			x			x
Versuchsphasen	Ruhephase	Ischämie				Reperfusion								

Tab. 3: Zeitliches Schema des Versuchsablaufs

HF: Zeitpunkt der Herzfrequenzbestimmung

PRI: Zeitpunkt der Pressure-Rate-Index-Bestimmung

MABP: Zeitpunkt der mittleren arteriellen Blutdruckbestimmung

HK: Zeitpunkt der Hämatokrit-Wert-Bestimmung

Zur Hämatokrit-Wert-Bestimmung wurde das entnommene Vollblut bei 4000 U/min 5 Min. zentrifugiert und anschließend mit Hilfe eines Messkreises der korpuskuläre Anteil abgelesen.

Am Ende des Versuchs wurden den Tieren die Lungen, das Herz, die Leber und die Nieren entnommen. Die Organe wurden mit gekühlter physiologischer NaCl-Lösung gespült und in Eppendorf Tubes aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Proben sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

4.2. Probenaufbereitung

4.2.1. Proteinextraktion

Zur Proteinextraktion wurden in einem vorgekühlten Mörser 100 µg der zu untersuchenden gefrorenen Gewebeprobe zerkleinert. 1000 µl Lysepuffer (Tab. 4) sowie 8 µl Benzonase, gekühlt auf -20° C, wurden dazugegeben. Unter Zuhilfenahme eines kleinen Pistills wurden die Bestandteile weiter zerkleinert und in ein Eppendorf Tube gefüllt. Die noch nicht gelösten Gewebeteile wurden in einem Ultraschallbad endgültig gelöst. Das nun entstandene Lysat wurde eine Stunde bei Raumtemperatur stengelassen und dann mit maximaler Umdrehung (20800 Rcf) bei 4° C 90 Min. zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und jeweils 100 µl in Eppendorf Tubes portioniert. Nun konnte die Probe direkt zur Proteinbestimmung verwendet oder bei -80° C aufbewahrt werden.

Substanzen	Endkonzentration	Menge
Harnstoff	7 M	17,0 g
Thioharnstoff	2 M	6,1 g
CHAPS	4 %	1,6 g
TRIS Buffer	40 mM	0,194 g
Complete Mini		4 Tabletten
Auffüllen mit Aqua dest. auf		40 ml

Tab. 4: Ansatz des Lysepuffers nach Amersham-Pharmacia-Biotech-Protokoll (Berkelman und Stenstedt 1998)

4.2.2. Gesamtproteingehalt-Bestimmung nach Popov

Zur Gesamtproteingehalt-Bestimmung nach Popov werden folgende drei Lösungen benötigt:

- Lösung I: 0,65 g Amidoschwarz 10 B in 50 ml der Lösung II
- Lösung II: 30 ml Eisessig (100 % Essigsäure) und 450 ml Methanol
- Lösung III: Lösung I mit Lösung II im Verhältnis 1:10 verdünnt

Das zuvor gewonnene Proteinlysate wird im Verhältnis 1:20 (30 µl + 570 µl Aqua dest.) verdünnt. Davon werden 200 µl für den Test verwendet, die in einem Eppendorf Tube vorgelegt und mit 600 µl der Lösung III versetzt werden. Dadurch bildet sich ein Komplex aus Proteinen und Amidoschwarz 10 B, der ausfällt. Die Proben werden 5 Min. bei 20800 Rcf zentrifugiert und der Überstand wird abgetragen. Das zurückbleibende Pellet wird dreimal mit 750 µl Lösung II gewaschen. Bei der letzten Waschung wird erneut 5 Min. bei 20800 Rcf zentrifugiert

und dann die Waschlösung entfernt. Die Probe wird nun mit 1000 µl 0,1 M Natronlauge mit Hilfe eines Vortexers gelöst. Die Lysate werden jetzt in eine Halbmikroküvette überführt und die Absorption bei 620 nm in einem Spektrometer gemessen. Nun wird die Konzentration der Probe durch Extrapolation aus einer Eichkurve bestimmt. Zur Herstellung der Eichkurve wird eine BSA (bovines Serumalbumin)-Stammlösung (2 mg/1000 µl) mit Aqua dest. auf 100, 250, 1000 und 1500 µg/ml im Test verdünnt und mit den verdünnten Lösungen wird jeweils die oben beschriebene Prozedur ebenfalls durchlaufen. So können bestimmte Proteinmengen einer bestimmten Absorption zugeordnet werden. Durch dieses Verfahren ist es möglich, in der darauf folgenden Gelelektrophorese 50 µg Proteinprobe in die Geltaschen zu füllen.

4.3. Western Blot

4.3.1. Prinzip des Western Blots

Der Western Blot ist eine mögliche Form der Proteinanalytik, die zur sensitiven Bestimmung von Antigenen benutzt wird. Mit Hilfe der Elektrophorese werden die Proteine nach Größe und Ladung getrennt und anschließend mit einem senkrecht stehenden elektrischen Feld aus dem Gel in eine Membran transferiert. Durch diese Methode bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten und kann mit anderen Methoden weiterbehandelt werden, im vorliegenden Fall mit spezifischen mono- und polyklonalen Antikörpern.

4.3.2. Gelelektrophorese

Zur Vorbereitung des Western Blots werden die Proteine zunächst nach ihrer Größe und Ladung getrennt. Das hier verwandte Elektrophoreseverfahren wurde erstmalig 1970 von Laemmli beschrieben. Abhängig von ihrer Größe und Ladung wandern die Proteine unterschiedlich schnell durch das elektrische Feld zu den entgegengesetzt geladenen Elektroden. Für den im vorliegenden Fall verwendeten SDS-Page müssen zwei Gele gegossen werden, die sich in ihrer Porengröße und dem pH-Wert unterscheiden. SDS bindet als anionisches Detergenz an Proteine, überdeckt deren Eigenladung und zerstört die Tertiärstruktur der Proteine. Durch den erzeugten Ausgleich der Ladungen wandern alle Proteine zur Anode und werden dabei nach Größe aufgetrennt. Die Gele bestehen aus Polyacrylamid, das durch Zusatz von Bisacrylamid quervernetzt ist. Zunächst wird das Trenngel (Tab. 5) hergestellt und in die schon vorbereitete Gelkammer gegossen. Danach wird durch Zusatz von 2-Propanol garantiert, dass sich im Gel keine Luft einschließen befinden. Nach etwa 30 bis 45 Min. ist das Gel auspolymerisiert und das 2-Propanol wird mit Aqua dest. ausgewaschen. Nur wird das Sammelgel (Tab. 5) in die Gelkammer gegossen und es werden Gelkämme eingesetzt. Die hierdurch entstehenden Taschen

dienen später zur Aufnahme der Proben. Schließlich muss das Gel weitere 30 bis 45 Min. auspolymerisieren.

Trenngel	Sammelgel
13,5 ml Acrylamid 30 %ig	2,5 ml Acrylamid 30%ig
5,62 ml Trenngelpuffer	5 ml Sammelgel
450 µl SDS 10%ig	200 µl SDS 10%ig
23,25 ml Aqua dest.	11,3 ml Aqua dest.
2,25 ml APS 1,5%ig (Ammoniumpersulfat)	1 ml APS 1,5%ig
22,5 µl TEMED (N,N,N'N'Tetramethylethylendiamid)	15 µl TEMED

Tab. 5: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel (für je zwei Gele)

Trenngelpuffer	Sammelgelpuffer
363 g Tris Base (3,0 M)	30 g Tris Base (3,0 M)
1000 ml Aqua destilata	500 ml Aqua destilata
mit konzentrierter HCl auf pH 8,8 einstellen	mit konzentrierter HCl auf pH 6,8 einstellen
Endkonzentration im Gel: 375 mM Tris-HCl	Endkonzentration im Gel: 125 mM Tris-HCl

Tab. 6: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgelpuffer

In dieser Zwischenzeit können die Proben langsam aufgetaut werden. Die auf Raumtemperatur aufgewärmten Proben werden in einem Verhältnis 1:3 mit Roti-Load 1 versetzt, dann in einem Thermomixer 5 Min. bei 95° C erhitzt, anschließend kurz zentrifugiert und wieder auf Eis gelegt. Durch diesen Vorgang werden die Proteine denaturiert, aber deren Abbau verhindert. Nun können nach dem Entfernen der Gelkämme die Proben in die dafür vorgesehenen Taschen mit Hilfe einer Hamiltonspritze eingebracht werden. Zuvor wurden die entstandenen Geltaschen und die Elektrophoresekammer mit SDS-Elektrophoresepuffer gespült und aufgefüllt. Im vorliegenden Fall wurden in die erste Tasche 10 µl (low range Bio Rad) eines Molekulargewicht-Standards eingebracht. Die verbliebenen Taschen wurden jeweils mit 50 µg der Proben gefüllt, die durch die Gesamtproteinbestimmung nach POPOV im Vorfeld bestimmt worden sind. Nun wurden die zwei Gele in die Elektrophoresekammer überführt und die obere und untere Kammer mit 5000 ml Elektrophoresepuffer (Tab. 6), der einen pH-Wert von 8.3 besitzt, gefüllt. Nach einer 20-minütigen Anlaufphase bei 40 mA und aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften des Sammelgels werden die Proteine am Übergang von Sammelgel zu Trenngel aufgereiht. Dieser ersten Phase schließt sich eine 4-stündige Trennungsphase bei 80 mA und 17° C an. Auf das Auftrennen der Proteine folgt der Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF), die für den Western Blot benötigt wird.

4.3.3. Proteinübertragung aus SDS-Polyacrylamidgelen auf Polyvinylidendifluorid-Membran

Für den Proteintransfer wurden zunächst die PVDF-Membran und das Filterpapier zurechtgeschnitten. Die Membranen wurden 3 Sek. in Methanol getaucht und anschließend 20 Min. in Transferpuffer (Tab. 7) gelegt. Schwämme sowie Filterpapier wurden 5 Min. in Transferpuffer eingeweicht. Nun wurde die Gelkammer geöffnet und die rechte obere Kante des Gels markiert. Das Sammelgel wurde abgetrennt und danach wurde das restliche Gel 10 Min. in Transferpuffer geschwenkt. Im Anschluss wurde das Gel in die Transferkammer gelegt und die Kammer mit dem restlichen Transferpuffer aufgefüllt. Der Aufbau der Kammer wird an folgender Tabelle ersichtlich:

10x Transferpuffer	
Tris (25 mM)	30,29 g
Glycin (192 mM)	144 g
Aqua dest.	1000 ml

Tab. 7: Bestandteile zur Herstellung von 1 l Transferpuffer 10-fach, pH 8,3

1x Transferpuffer	
Transferpuffer 10x	100 ml
Methanol	200 ml
Aqua dest.	1000 ml

Tab. 8: Bestandteile zur Herstellung von 1 l Transferpuffer 1-fach, pH 8,3

An die Blotting-Kammer wurden die Elektroden angeschlossen und die mindestens 12-stündige Transferphase konnte bei 0,5 A beginnen. Der ganze Prozess wurde durch Eis gekühlt. Eine Stunde vor der Membranentnahme wurde der Transfer von 0,5 A auf 1 A erhöht.

4.3.4. Proteinfärbung mit Ponceau S

Durch die Behandlung mit dem roten Farbstoff Ponceau S können Proteine sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde 2 Min. in dem Farbstoff geschwenkt und anschließend 5 Min. in 10%iger Essigsäure fixiert. Die Reste wurden durch mehrere Waschschriffe mit Aqua dest. entfernt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Das Ergebnis wurde mit Hilfe einer Fotokopie dokumentiert, so dass diese später in der Auswertung des Endergebnisses berücksichtigt werden konnten.

4.3.5. Nachweis von spezifischen Antigenen

Zunächst mussten die freien unspezifischen Bindungsstellen blockiert werden, da sonst das spezifische Anheften der Antikörper später nicht möglich gewesen wäre. Dazu wurde die PVDF-Membran 2 Stunden lang bei Raumtemperatur mit einer 5%igen Magermilchlösung versetzt (Tab. 11), um im Anschluss in zwei aufeinander folgenden Waschschritten mit TBS-T 0.1 % gespült zu werden (Tab. 10). Nun folgte das Auftragen des jeweiligen primären Antikörpers im vom Hersteller vorgegebenen Verhältnis mit 5%iger Magermilchlösung. Die Membran und die Lösung wurden anschließend in eine Folie eingeschweißt und 12 Stunden bei +4° C im Kühlschrank gelagert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Membranen dreimal jeweils 5 Min. mit 0,1%iger TBS-T-Lösung gespült. Nach diesem Vorgang konnte der sekundäre Antikörper mit 1%iger Magermilchlösung versetzt werden und auf die Membran aufgebracht werden. Diese wurde 1,5 Stunden lang bei Raumtemperatur geschwenkt. Durch diesen Vorgang konnte der primäre Antikörper und das an ihn gebundene Antigen später sichtbar gemacht werden. Nach der Inkubationszeit wurde der Überschuss mit 0,1%iger TBS-T-Lösung abgewaschen. Das Hinzufügen von ECL™-Lösung 1 und 2 (Amersham) zur Membran aktivierte diese und es fand eine nicht-radioaktive Chemilumineszenzreaktion statt. Um diese Reaktion zu detektieren, wurde die Blot-Membran mit der Proteinseite nach oben zwischen zwei Plastikfolien in eine Röntgenkassette gelegt. Die Entwicklung des Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham) wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Um die Proteinbanden einer entsprechenden Proteingröße in kDA zuzuordnen zu können, wurde der entwickelte Film auf die vorher entstandene Fotokopie der Membran gelegt und dann mit Hilfe der Standardbanden abgelesen.

TBS (Tris-Buffer Saline) 10-fach	
Tris	12,10 g
NaCl	90 g
Aqua dest.	1000 ml

Tab. 9: TBS-Lösung 10-fach

TBS-T 0,1 %	
TBS 10x	100 ml
Aqua dest.	900 ml
Tween	1 ml

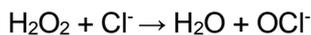
Tab. 10: TBS-Lösung 10-fach

Blockierungslösung 5 %	
TBS-T 0,1 %	100 ml
Magermilchpulver	5 g

Tab. 11: TBS-Lösung 10-fach

4.4. Myloperoxidaseaktivität

Das Enzym Myloperoxidase (MPO) spielt bei der Regulation und Termination von Entzündungsprozessen eine bedeutende Rolle. Es wird in Vesikeln innerhalb von neutrophilen Granulozyten gespeichert. Es katalysiert mit Hilfe von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Chloridionen:



Die hierdurch gebildeten Hydrochloridionen unterstützen das Abtöten von phagozytierenden Bakterien bei Infektionen.

Zunächst mussten zur MPO-Bestimmung ein HTAB-Puffer und eine ODI-Lösung hergestellt werden. Die zu bestimmende Gewebeprobe wurde aus der -70 °C-Kühlung genommen und um ihr 10-faches Gewicht/Volumen mit HTAB-Puffer (Tab. 12) versetzt. Nach der Homogenisierung der Probe für 1 Min. wurde diese 30 Min. bei 4° C und 12500 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgeschöpft und mit Eis gekühlt. 50 µl Probenüberstand wurde mit 950 µl ODI-Lösung (Tab. 13) versetzt. Unmittelbar im Anschluss wurde mit Hilfe eines Photometers bei 460 nm die Extinktion gemessen. Zu beobachten war ein Farbumschlag von hellgelb über türkisblau zu braun. Die Abschwächung des Lichtstrahles wurde nach 0, 30, 60, 90, und 120 Sek. gemessen. Die MPO-Aktivität konnte nun mit Hilfe folgender Formel bestimmt werden: MPO-Aktivität in U/l = (Ext. 120" – Ext. 60") x 17,7.

HTAB-Puffer	
Hexadecyltrimethylammoniumbromid	250 mg
Aqua dest.	45 ml
KH ₂ PO ₄ (50mM) (0,034g/5ml)	5 ml

Tab. 12: Herstellung des HTAB-Puffers

ODI-Lösung	
o-Dianisidine	8,35 mg
PBS	5 ml
H ₂ O ₂ -Lösung (10 µl 30%ige H ₂ O ₂ -Lösung + 6 ml Aqua dest)	0,5 ml

Tab. 13: Herstellung der ODI-Lösung

4.5. Histologie

Die gefrorenen Gewebeproben wurden mit Hilfe einer 4%igen Formalinlösung mindestens 24 Stunden fixiert und im Anschluss als Einbettkassette zurechtgeschnitten. Die Proben kamen zum Entwässern 20 Stunden in einen Einbettungsautomaten. Dort wurden zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe (80%ig, 85%ig, 96%ig, absoluter Alkohol), eine Xylol-Lösung und drei verschiedene Paraffinbäder bei 63° C nacheinander durchgeführt. Aus den Paraffinbädern kommend wurden die Proben direkt im Anschluss in eine Gießwanne mit flüssigem Paraffin gegossen und mit Hilfe einer Kühlplatte als Gewebeblock fixiert. Nun wurden mit einem Rotationsmikrotom die Gewebelöcke in 5 µm dünne Scheiben geschnitten und unter Zuhilfenahme von 50° C warmem Aqua dest. auf die Objektträger aufgezogen. Während des einstündigen Lagerns in einem 80° C warmen Umluftheizschrank konnte das Paraffin ablaufen und anschließend wurde mit dem Färben der Schnitte begonnen.

Zwei verschiedene Färbetechniken kamen zur Anwendung:

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Alle sauren Strukturen werden blau (z. B.: Zellkerne, Ribosomen) und alle basischen Strukturen rot (Zellplasmaproteine) gefärbt. Für diese Färbung wurden die Präparate zweimal in ein Xylolbad gelegt und danach mit einer absteigenden Alkoholreihe und einmalig mit Aqua dest. gewaschen. Im Anschluss erfolgte das Färben mit der Hämatoxylin-Lösung zweimal für 10 Min. und das Waschen der Proben mit Aqua dest. Im nächsten Schritt wurde die Probe einmalig 5 Min. in Eosin-Lösung gebadet und erneut mit Aqua dest. gewaschen. Mit aufsteigender Alkoholreihe sowie einem abschließenden Xylolbad wurden die Proben endgültig fixiert und mit einem Deckgläschen geschützt.

Giemsa-Färbung

Die Zellkerne werden rotviolett, Zellplasma blau, Erythrozyten blassrot und die Kerne von Protozoen und Parasiten leuchtend rot gefärbt. Dafür wurden die Präparate ebenfalls zweimal in ein Xylolbad gelegt und danach mit einer absteigenden Alkoholreihe und einmalig mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die Proben 45 Min. in einer frisch hergestellten Giemsa-Gebrauchslösung gebadet. Die Präparate wurden kurz in einem Essigbad, 10 Sek. in absolutem Alkohol, 10 Sek. in Isopropanol und abschließend zweimal 5 Min. erneut in ein Xylolbad gebracht. Danach erfolgte das Eindecken der Objektträger mit der Probe durch einen Eindeckautomat.

Die Proben wurden mit einem Lichtmikroskop mit Kamera beurteilt.

4.6. Angaben zur Statistik

Bei allen hier im Text sowie in den Tabellen vorgestellten Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte \pm der Standardabweichung des Mittelwertes. Es wurde mit einem zweiseitigen T-Test und einem allgemeinen linearen Modell mit Messwiederholung gearbeitet (Casals et al. 2014). Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant im Voraus festgelegt und in den Grafiken mit * gekennzeichnet. Alle Berechnungen wurden mit Hilfe des kommerziellen Statistikprogramms SPSS (IBM SPSS Statistic Version 21) durchgeführt (Bühl 2012).

5. Ergebnis

5.1. Effekte von Ranolazin beim hämorrhagischen Schock

5.1.1. Einfluss von Ranolazin auf die Überlebenszeit

Nachdem die Tiere narkotisiert waren und eine 15-minütige Erholungs- und Stabilisierungsphase durchlaufen hatten, starteten Versuch und Messung der Überlebenszeit. Die Messung wurde entweder durch den vorzeitigen Tod oder spätestens nach 240 Min. durch das Einschläfern des Tieres mit Hilfe einer Pentobarbituratspritze direkt ins Herz beendet. Bei den verschiedenen Sham-Tieren wurde nach der 15-minütigen Ruhephase ebenfalls mit der Messung begonnen.

Die durchschnittliche Überlebenszeit der Vehikel-Gruppe betrug 109 Min. Alle Tiere verstarben im Zeitraum zwischen 85 Min. und 130 Min. nach Versuchsbeginn (Tab. 1 Anhang). Im Vergleich dazu überlebten in der Ranolazin-Sham-Gruppe die Tiere im Mittelwert 236 Min. Es verstarb nur eine Ratte 40 Min. vor Versuchsende (Tab. 1 Anhang). Die Ranolazin-Gruppe, die 24 Stunden vor Beginn des Versuchs mit 2,7 mg (22,4 mg/kg KG) Ranolazin intraperitoneal vorbehandelt wurde, wies eine Überlebenszeit im Mittelwert von 181 Min. auf (Abb. 8). Die Verdopplung der Dosis auf 5,4 mg führte zum Tod bei fünf von sieben Tieren vor Reperfusion. Die zweite Ranolazin-Gruppe, die 50 Min. nach Versuchsbeginn 2,7 mg (22,4 mg/kg KG) Ranolazin intraarteriell infundiert bekommen hatte, wies eine durchschnittliche Überlebenszeit von 189 Min. auf (Abb. 8)

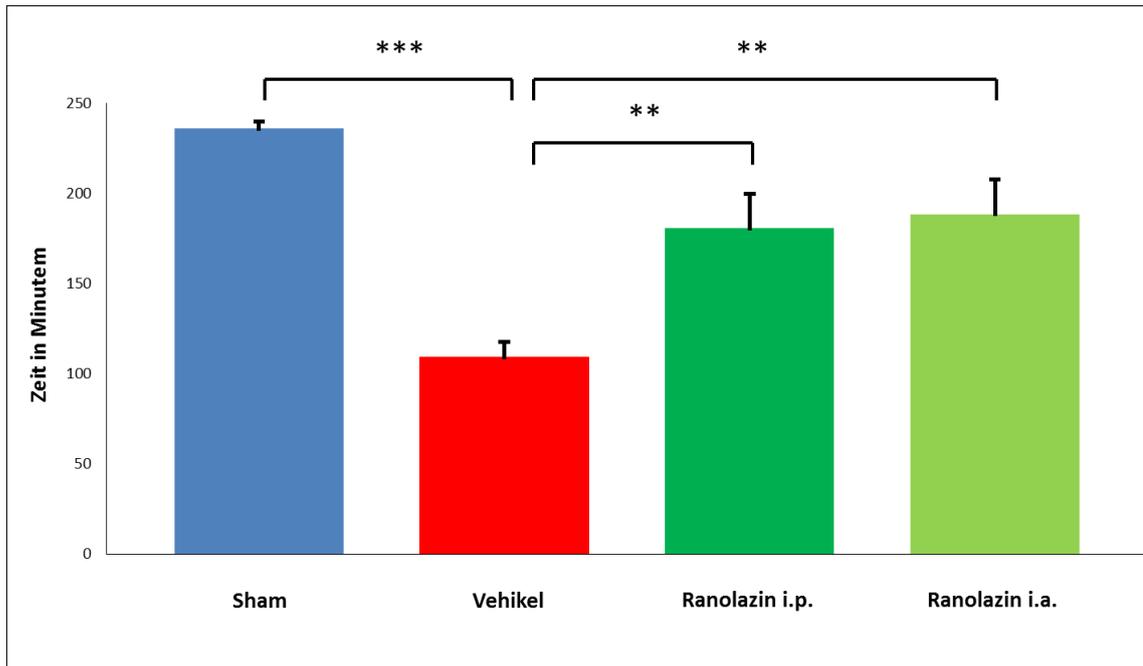


Abb. 8: Durchschnittliche Überlebenszeit der Ranolazin-Sham-Tiere, Vehikel-Tiere- und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tiere bei unterschiedlichen Applikationsarten *** $p \leq 0,001$ ** $p \leq 0,01$

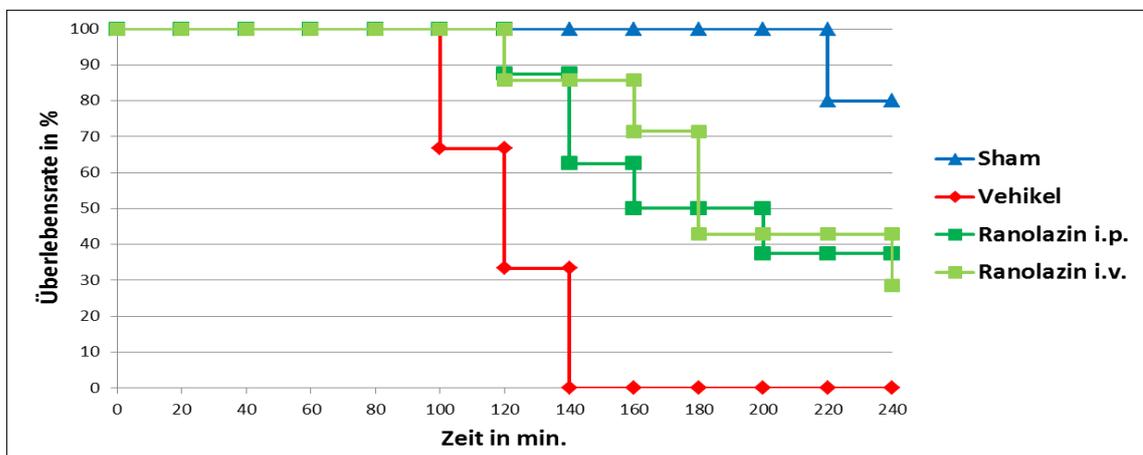


Abb. 9: Überlebensrate nach Zeit der Ranolazin-Sham-Tiere, Vehikel-Tiere und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tiere bei unterschiedlichen Applikationsarten (Kaplan-Meier-Kurven)

5.1.2. Hämodynamische Veränderungen durch Ranolazin

Hämodynamische Veränderungen konnten mit Hilfe des systolischen wie diastolischen Blutdrucks und dem daraus resultierenden mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) sowie der Herzfrequenz und dem Pressure Rate Index (MABPxHF/1000) erkannt werden. Diese Parameter

wurden alle zwanzig Minuten bis zum Versterben des Versuchstieres oder dem Versuchsende erhoben.

Aufgrund des für den Versuch ausgewählten Blutdruck-kontrollierten hämorrhagischen Schockmodells war die MABP-Kurve während der hämorrhagischen Schockphase, d. h. zwischen Minute 0 und 60 konstant bei $40 \text{ mmHg} \pm 5 \text{ mmHg}$. Daraus resultierte auch die PRI-Kurve mit einem Wert um 19. Nach der Reperfusion stieg der Blutdruck der Vehikel-Tiere nicht mehr auf das Ausgangsniveau von 135 mmHg , sondern nur noch im Mittelwert auf 101 mmHg . Innerhalb der nächsten 20 Min. halbierte sich der Blutdruck auf 56 mmHg und stabilisierte sich dort für 40 Min. (Abb. 10). Dem gegenüber wurde bei den Tiere der Sham-Gruppe während des gesamten Versuchs ein Blutdruck von $130 \text{ mmHg} \pm 20 \text{ mmHg}$ verzeichnet. Die Versuchsgruppe Ranolazin $2,7 \text{ mg i.p.}$ erreichte nach der Reperfusion einen MABP von 133 mmHg , der dem Blutdruck zu Beginn des Versuchs entsprach. Innerhalb von 40 Min. fiel der MABP kontinuierlich auf einen Mittelwert von 85 mmHg und stabilisiert sich dort bis zum Versuchsende (Abb. 10). In der Versuchsgruppe Ranolazin $2,7 \text{ mg i.a.}$ wurde das Ausgangsniveau des mittleren arteriellen Blutdrucks mit 140 mmHg erreicht. Der mittlere arterielle Blutdruck sank innerhalb der nächsten 40 Min. um 25 mmHg (Abb. 10).

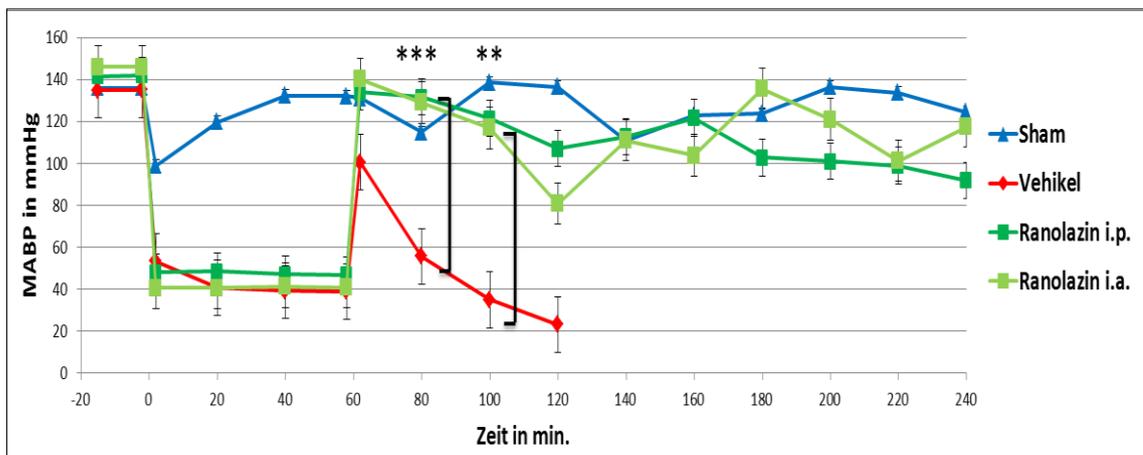


Abb. 10: Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP) während des Versuchszeitraums von 240 Minuten bei den Ranolazin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tieren bei unterschiedlichen Applikationsarten; *** $p \leq 0,001$ ** $p \leq 0,01$

Bei der Herzfrequenz kam es, anders als beim mittleren arteriellen Blutdruck, nicht zu einer signifikanten Veränderung bzw. zu Unterschieden zwischen den Sham-Tieren, den Vehikel-Tieren und den Ranolazin-Tieren. Es ist lediglich ein geringer Abfall der Herzfrequenz während der Hypovolämie sowie ein leichter Anstieg nach der Reperfusion zu beobachten (Abb. 11).

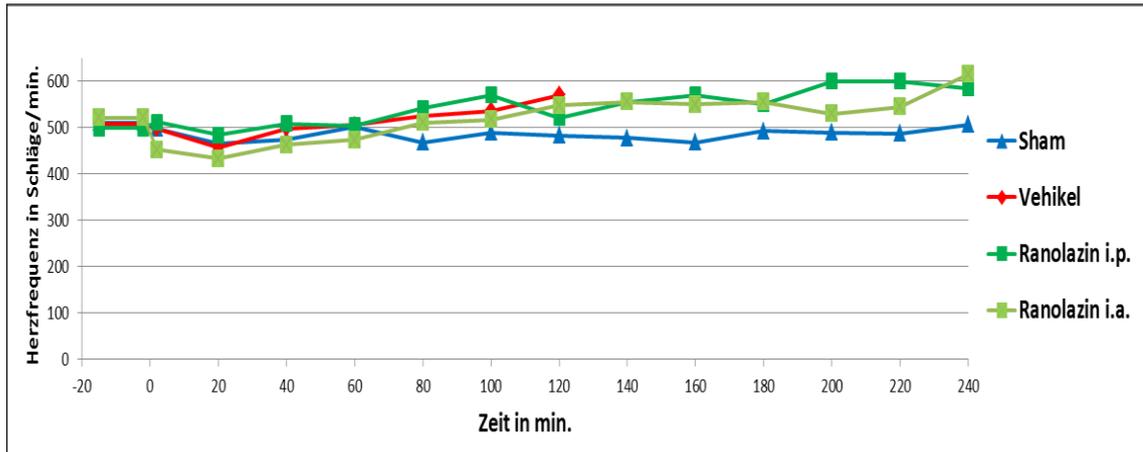


Abb. 11: Verlauf der Herzfrequenz während des Versuchszeitraums von 240 Minuten bei den Ranolazin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tieren in unterschiedlicher Applikationsarten

5.1.3. Einfluss von Ranolazin auf den Hämatokrit-Wert

Insgesamt wurden fünf Hämatokrit-Werte gewonnen, indem stündlich ein Kapillarröhrchen mit einem Topfen Blut aus dem Carotiskatheter befüllt wurde.

Der Verlauf des Hämatokrit-Wertes stellte sich unterschiedlich dar. Zu Versuchsbeginn lag er bei allen Gruppen zwischen 41 % und 48 %. Nach 60-minütiger Hypovolämie der Vehikel-Tiere und der Ranolazin-Tiere fiel dieser ab und erholte sich langsam bis zum Versuchsende (Abb. 12). Im Gegensatz dazu blieb der Hämatokrit-Wert der Sham-Gruppe auf einem konstanten Niveau.

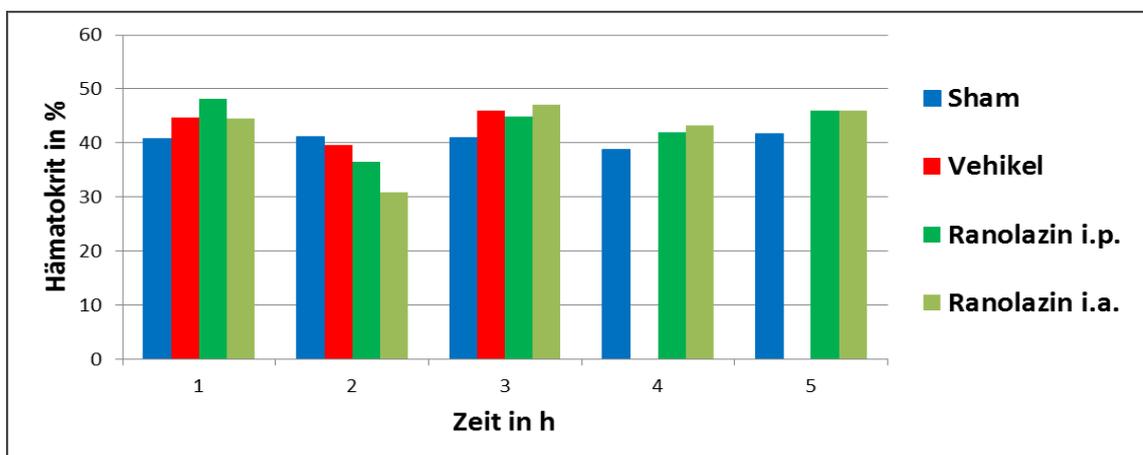


Abb. 12: Verlauf des durchschnittlichen Hämatokrit-Wertes während des Versuchszeitraums von 240 Minuten bei Ranolazin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tieren bei unterschiedlichen Applikationsarten

5.1.4. Einfluss von Ranolazin auf die Myeloperoxidaseaktivität

In der Leber der Vehikel-Tiere konnte im Vergleich zur Sham-Gruppe eine deutlich erhöhte Myeloperoxidaseaktivität festgestellt werden (0,00369 U/ μ g vs. 0,00180 U/ μ g). Die Ranolazin-Tiere (0,00218 U/ μ g) hatten dem gegenüber nur eine leichte MPO-Erhöhung zu verzeichnen (Abb. 13).

Auch in den Nieren der Vehikel-Tiere war eine signifikante Steigerung der Myeloperoxidaseaktivität festzustellen. In der Sham- wie auch der Ranolazin-Gruppe gab es auf gleichem Niveau eine niedrige Aktivität an Myeloperoxidase (Abb. 14).

Im Herzen war die Aktivität der MPO bei den Ranolazin-Tieren niedriger (0,00143 U/ μ g) als in der Vergleichsgruppe der Vehikel-Tiere (0,00315 U/ μ g).

In der Lunge kam es bei den Ranolazin-Tieren im Gegensatz zu den beiden Vergleichsgruppen zu einem deutlichen Anstieg der Enzymaktivität.

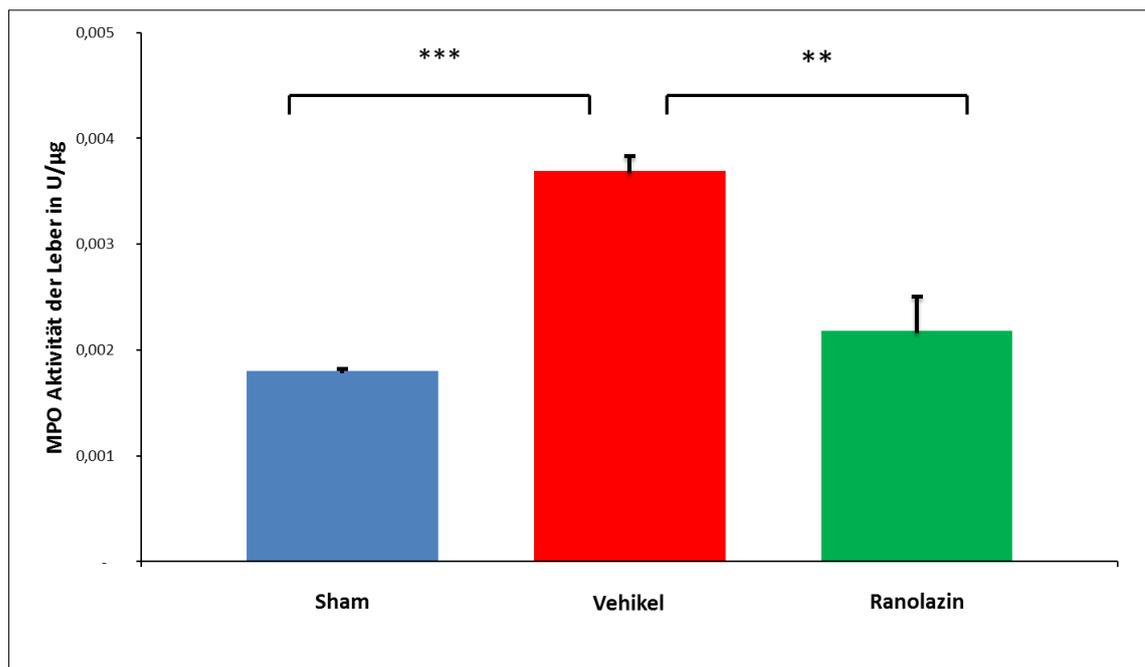


Abb. 13: Effekt von Ranolazin auf die Myeloperoxidaseaktivität in der Leber im Vergleich bei Ranolazin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tieren mit 2,7 mg Ranolazingabe 24 h vor Versuchsbeginn intraperitoneal ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,001$

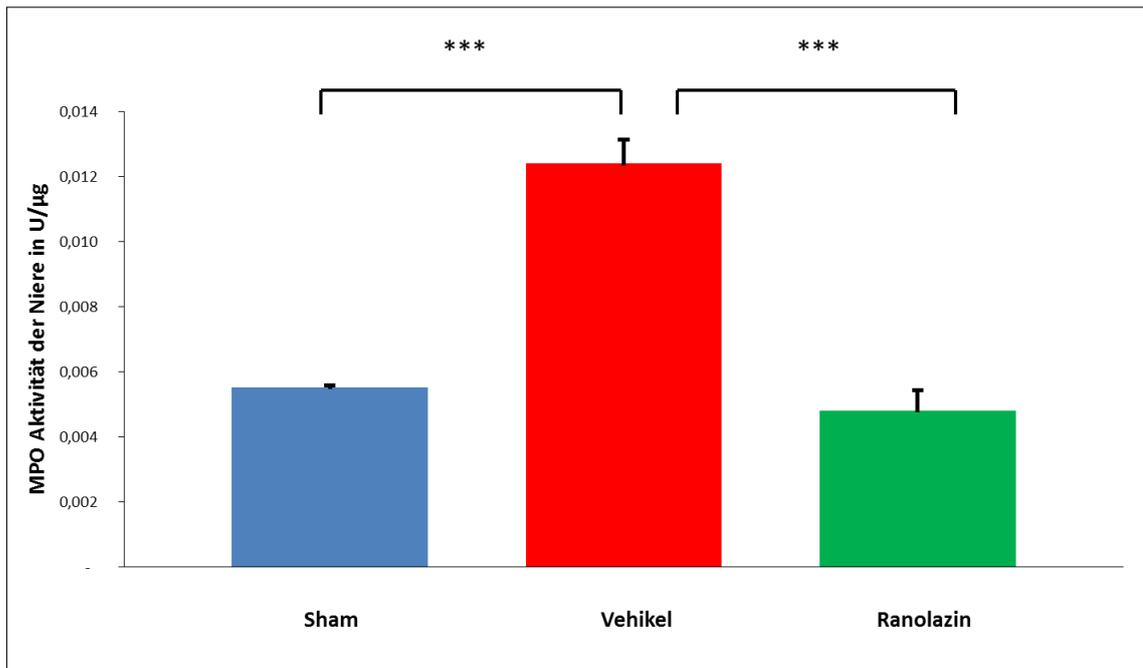


Abb. 14: Effekt von Ranolazin auf die Myeloperoxidaseaktivität in der Niere im Vergleich bei Ranolazin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tieren mit 2,7 mg Ranolazingabe 24 h intraperitoneal *** $p \leq 0,001$

5.1.5. Einfluss von Ranolazin auf die Proteinexpression in den Schockorgane

Mit Hilfe des Western Blots ist es möglich, die unterschiedliche Expression von verschiedenen Proteinen in ausgewählten Organe, darzustellen. Mit Hilfe von p38-Antikörpern war es möglich, die Expression von p38-mitogenaktivierter Proteinkinase (p38 MAPK) im Gewebe festzustellen. In der Niere wurde p38 vermehrt von den Ranolazin-Tieren und den Sham-Tieren gebildet mit einem relativen Wert von 10,48 und 13,74. Dem gegenüber steht die niedrige Expression von p38 von 8,75 von den Vehikel-Tieren (Abb. 15 und 16).

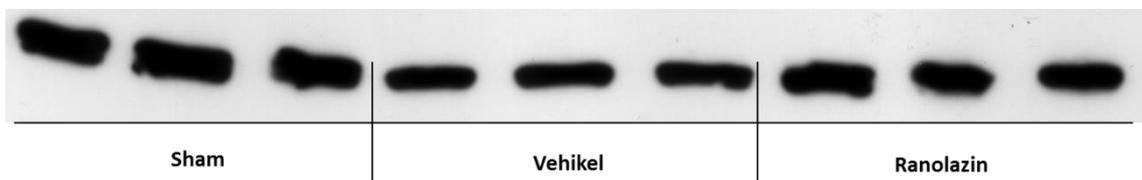


Abb. 15: Western Blot: p38-MAPK-Expression in der Niere nach Ranolazingabe im häm. Schock

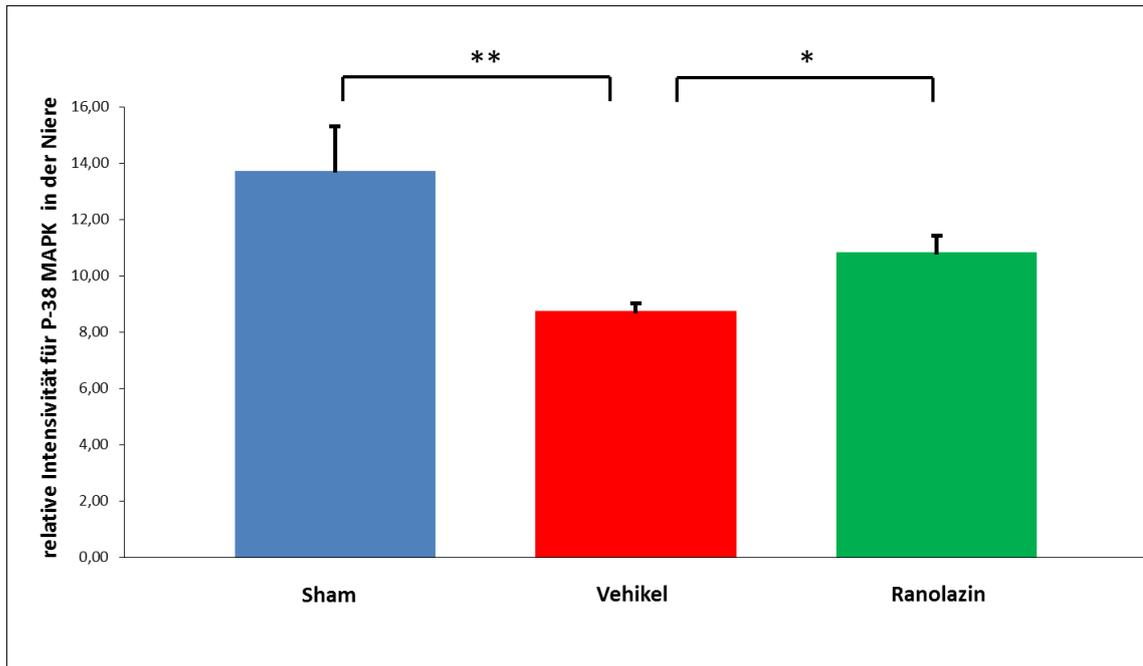


Abb. 16: Western Blot: p38-MAPK-Expression in der Niere im Vergleich bei Ranolazin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tieren mit 2,7 mg Ranolazingabe 24 h vor Versuchsbeginn intraperitoneal * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$

Ein ähnliches Bild weist der Western Blot für den Transkriptionsfaktor T-bet nach. Im Myokard kommt es bei der Sham-Gruppe zu einer Verdopplung der Expression des Transkriptionsfaktors T-bet auf 15,77. Die Vehikel-Tiere exprimieren T-bet nur in geringem Maße (6,97). Dazwischen liegt die Ranolazin-Gruppe mit einem relativen Wert von 10,59. Die Expression von T-bet in der Niere steigt ebenfalls an von einem niedrigen Wert in der Vehikel-Gruppe (8,12) über die Ranolazin-Gruppe (10,91) bis zu höchsten Expression in der Sham-Gruppe (14,33) (Abb. 17 und 18).

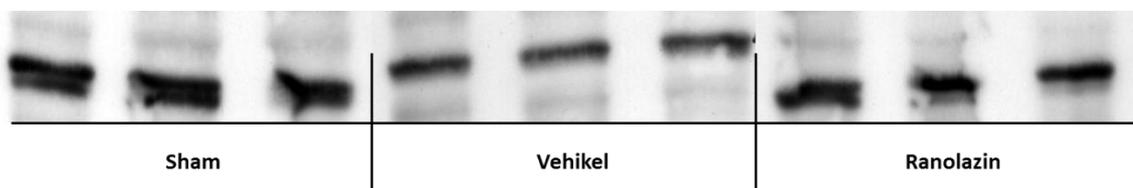


Abb. 17: Western Blot: T-bet-Expression in der Niere nach Ranolazingabe im häm. Schock

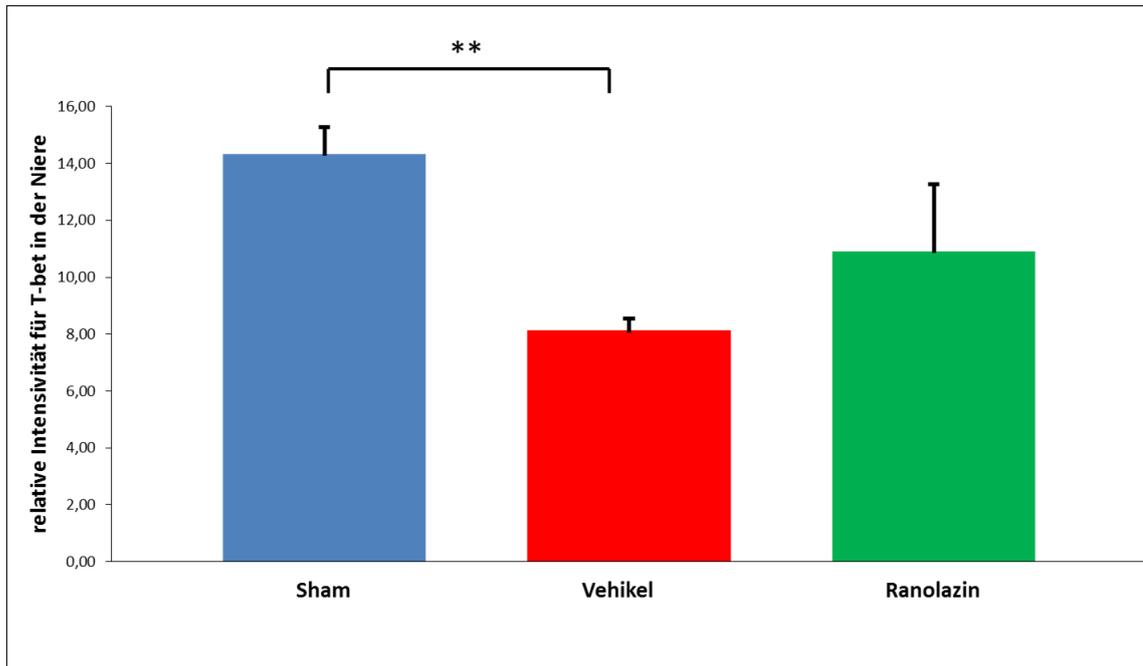


Abb. 18: Western Blot: T-bet-Expression in der Niere nach Ranolazingabe im Vergleich bei Ranolazin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tieren mit 2,7 mg Ranolazingabe 24 h vor Versuchsbeginn intraperitoneal $**p \leq 0,01$

Die Expression des I κ B α -Proteins im Herzen war bei den Vehikel-Tieren (17,20) um mehr als den Faktor 3 höher als bei den Sham-Tieren (4,74) und um den Faktor 2 höher bei den Ranolazin-Tieren (8,42) (Abb. 19 und 20).

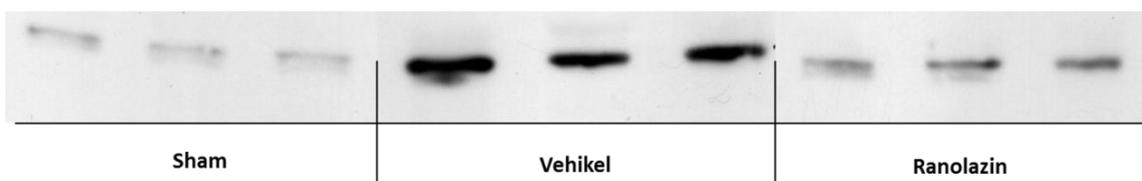


Abb. 19: Western Blot: I κ B α -Expression im Herzen nach Ranolazingabe im häm. Schock

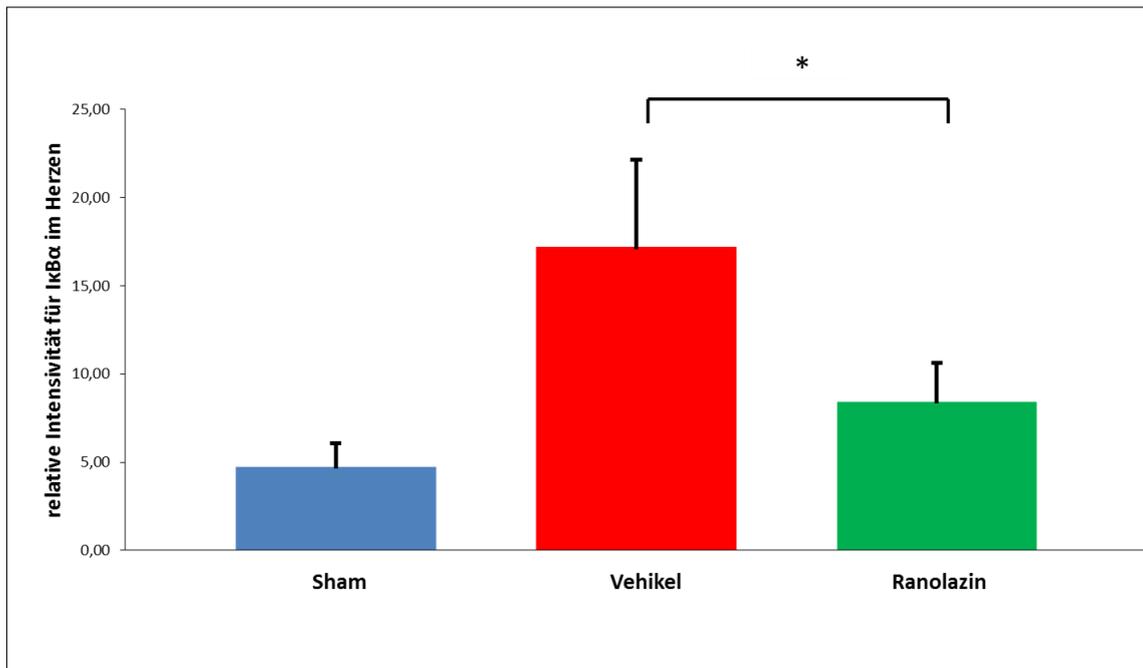


Abb. 20: Western Blot: IκBα-Expression im Herzen nach Ranolazingabe im Vergleich bei Ranolazin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tieren mit 2,7 mg Ranolazingabe 24 h vor Versuchsbeginn intraperitoneal *p ≤ 0,05

In der Niere wurde IκBα am stärksten in der Sham-Gruppe (14,85) exprimiert, gefolgt von der Ranolazin-Gruppe (10,33) und der Vehikel-Gruppe (8,16) (Abb. 21).

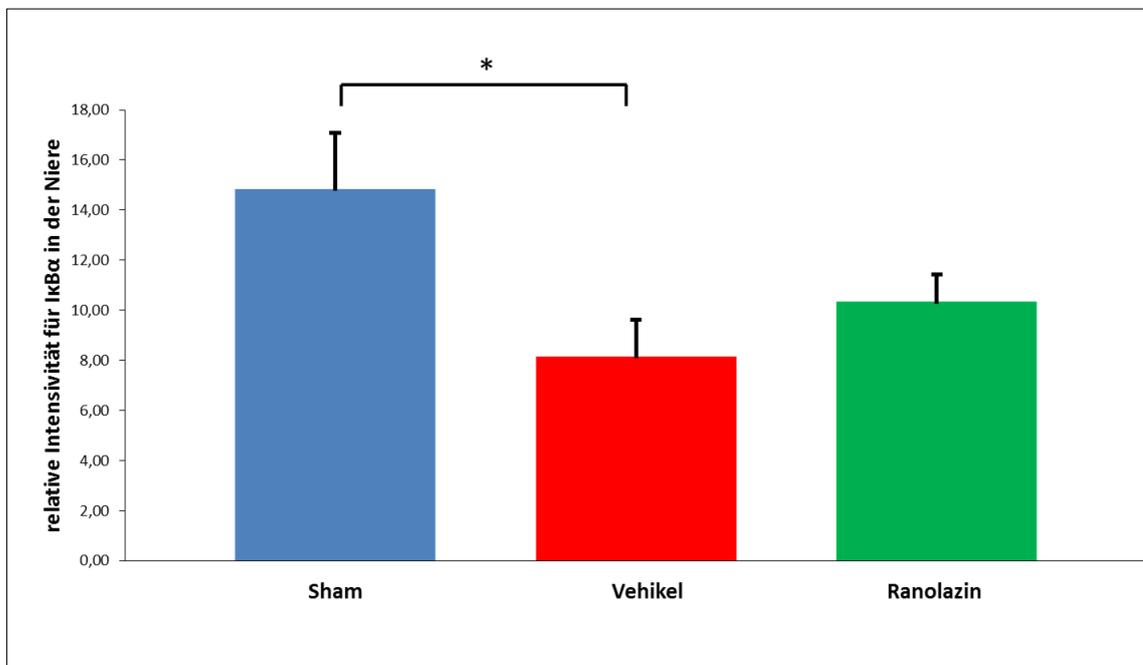


Abb. 21: Western Blot: IκBα-Expression in der Niere nach Ranolazingabe im Vergleich bei Ranolazin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Ranolazin-Tieren mit 2,7 mg Ranolazingabe 24 h vor Versuchsbeginn intraperitoneal *p ≤ 0,05

5.2. Metformin

5.2.1. Einfluss von Metformin auf die Überlebenszeit

Die durchschnittliche Überlebenszeit der Vehikel-Gruppe lag bei 109 Min. Alle Tiere starben im Zeitraum zwischen 85 Min. und 130 Min. (Tab. 14) nach Versuchsbeginn. Die Tiere der Metformin-Sham-Gruppe, bestehend aus fünf Tieren, hatten eine Überlebenszeit von 240 Min. Durch die Behandlung der Versuchstiere mit 5 mg (41,5 mg/kg KG) 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit Metformin intraperitoneal konnte fast eine Verdopplung der durchschnittlichen Überlebenszeit auf 204 Min. erreicht werden. Bei der Reduzierung der Dosis um auf ein Fünftel (8,3 mg/kg KG) konnte nur noch eine Überlebenszeit im Mittelwert von 160 Min. erreicht werden (Abb. 22 und 23).

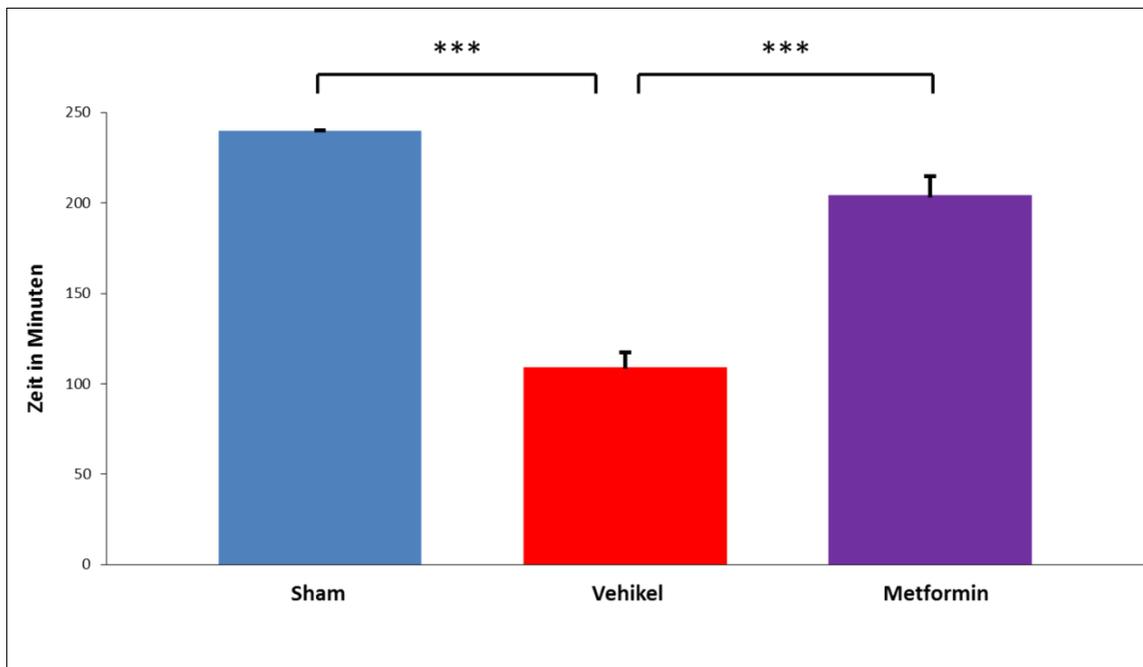


Abb. 22: Überlebenszeit der Metformin-Sham-Tiere, Vehikel-Tiere und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tiere mit 5 mg Metformingabe 24 h intraperitoneal ***p ≤ 0,001

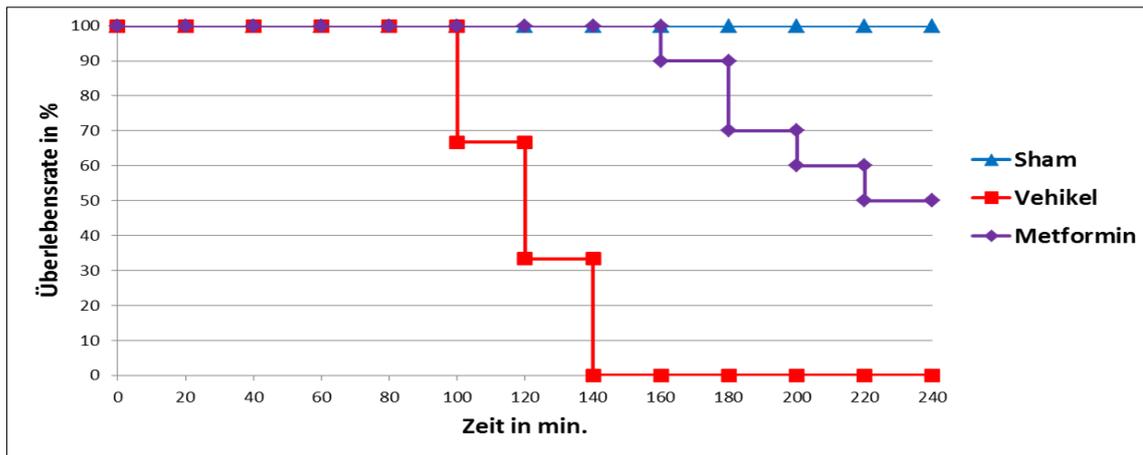


Abb. 23: Überlebensrate der Metformin-Sham-Tiere, Vehikel-Tiere und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tiere mit 5 mg Metformingabe 24 h intraperitoneal (Kaplan-Meier-Kurven)

5.2.2. Hämodynamische Veränderungen durch Metformin

Aufgrund des im Versuch ausgewählten Blutdruck-kontrollierten hämorrhagischen Schockmodells lag die MABP-Kurve während der hämorrhagischen Schockphase, d. h. zwischen Minute 0 und 60 konstant bei $40 \text{ mmHg} \pm 5 \text{ mmHg}$. Daraus resultierte auch die PRI-Kurve um die 19 ($\text{MABP} \times \text{HR} / 1000$). Nach der Reperfusion stieg der Blutdruck der Vehikel-Tiere nicht mehr auf das Ausgangsniveau von 135 mmHg , sondern nur noch im Mittelwert auf 101 mmHg . Innerhalb der nächsten 20 Min. halbierte sich der Blutdruck auf 56 mmHg und stabilisierte sich dort für 40 Min. Dem gegenüber wiesen die Tiere in der Sham-Gruppe während des gesamten Versuchs einen Blutdruck von $130 \text{ mmHg} \pm 20 \text{ mmHg}$ auf. Die Versuchstiere, die 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit Metformin behandelt worden waren, erreichten nach der Reperfusion ebenfalls ihren Ausgangswert. Bis zum Ende des Versuchs war der mittlere arterielle Blutdruck leicht abgesenkt (Abb. 24).

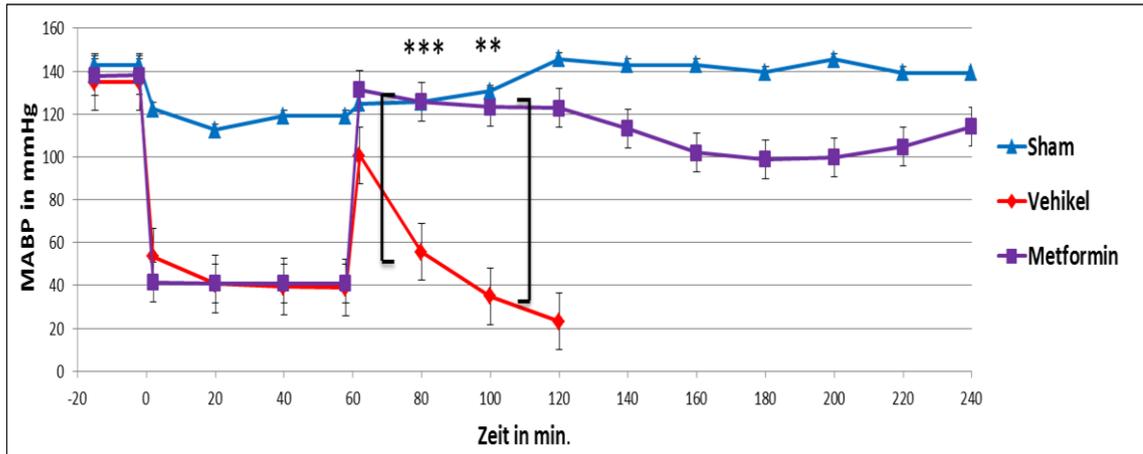


Abb. 24: Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP) während des Versuchszeitraums von 240 Minuten bei Metformin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tieren mit 5 mg Metformingabe 24 h intraperitoneal *** $p \leq 0,001$ ** $p \leq 0,01$

Im Vergleich zum mittleren arteriellen Blutdruck zeigte sich keine signifikante Änderung und keine signifikanten Unterschiede bei der Herzfrequenz der Sham-Tiere, der Vehikel-Tiere und der Metformin-Tiere. Es war lediglich ein geringer Abfall der Herzfrequenz während der Hypovolämie sowie einen leichten Anstieg nach der Reperfusion zu beobachten (Abb. 25).

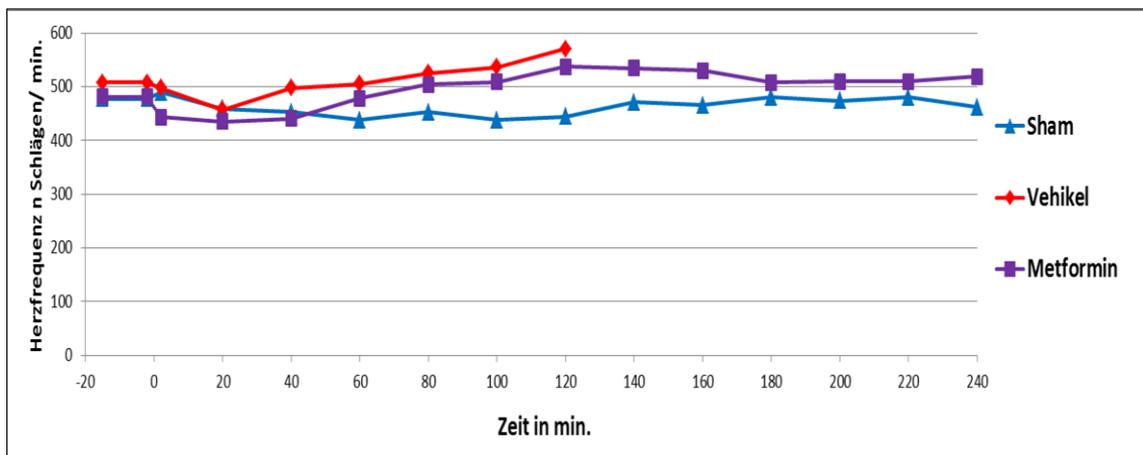


Abb. 25: Verlauf der Herzfrequenz während des Versuchszeitraums von 240 Minuten bei Metformin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tieren mit 5 mg Metformingabe 24 h intraperitoneal

5.2.3. Einfluss von Metformin auf den Hämatokrit-Wert

Der Verlauf des Hämatokrit-Wertes stellte sich unterschiedlich dar. Zu Versuchsbeginn lag er bei allen Gruppen zwischen 41 % und 48 %. Nach 60-minütiger Hypovolämie der Vehikel-Tiere und der Metformin-Tiere fiel dieser ab und erholte sich langsam bis zum Versuchsende. Im

Gegensatz dazu blieb der Hämatokrit-Wert bei den Sham-Tieren auf einem konstanten Niveau (Abb. 26).

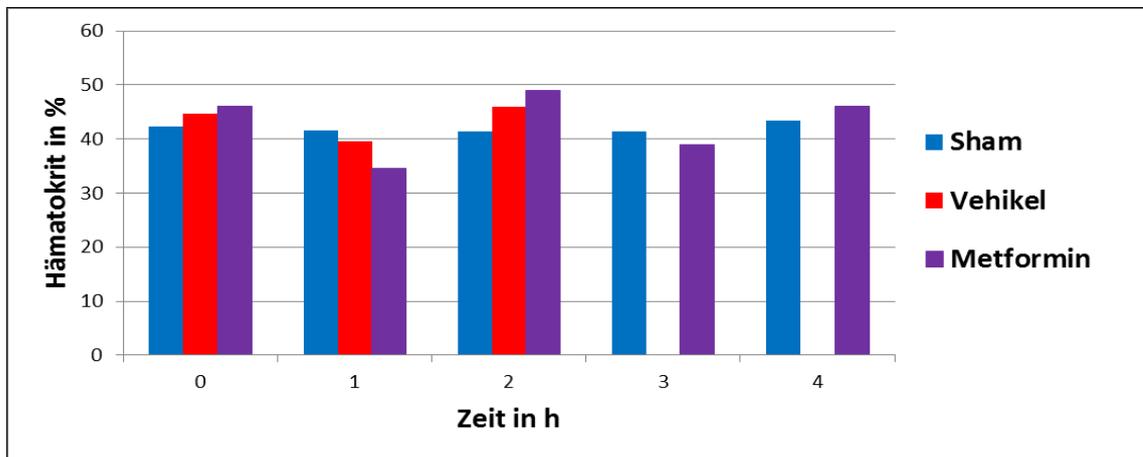


Abb. 26: Verlauf des Hämatokrit-Wertes während des Versuchszeitraums von 240 Minuten bei Metformin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tieren mit 5 mg Metformingabe 24 h intraperitoneal

5.2.4. Einfluss von Metformin auf die Myloperoxidaseaktivität

Die Myloperoxidaseaktivität in der Leber der Vehikel-Tiere stieg im Vergleich zu den Sham-Tieren und den Metformin-Tieren an (Abb. 27). In der Niere der Vehikel-Tiere verdoppelte sich die Aktivität der Myloperoxidase sogar auf 0.01240 U/ μ g, im Vergleich zu den Sham-Tieren (0,00582 U/ μ g) und den Metformin-Tieren (0,00565 U/ μ g) (Abb. 28). In den Organen Lunge und Herz konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Myloperoxidaseaktivität nachgewiesen werden.

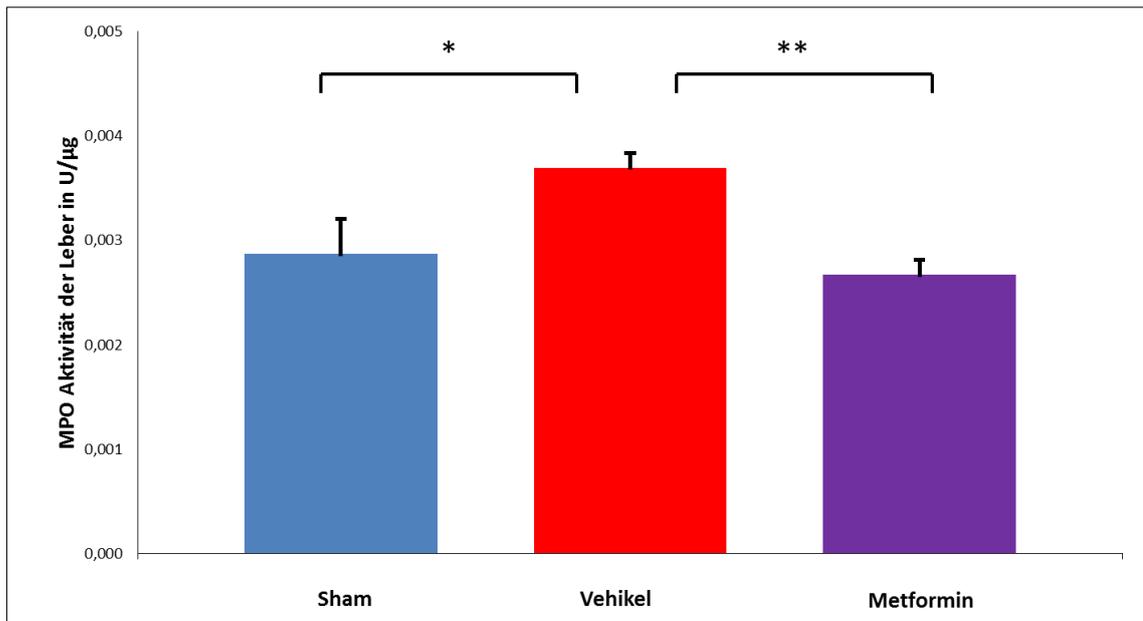


Abb. 27: Effekt von Metformin auf die Myeloperoxidaseaktivität in der Leber im häm. Schock im Vergleich bei Metformin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tieren mit 5 mg Metformingabe 24 h intraperitoneal * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$

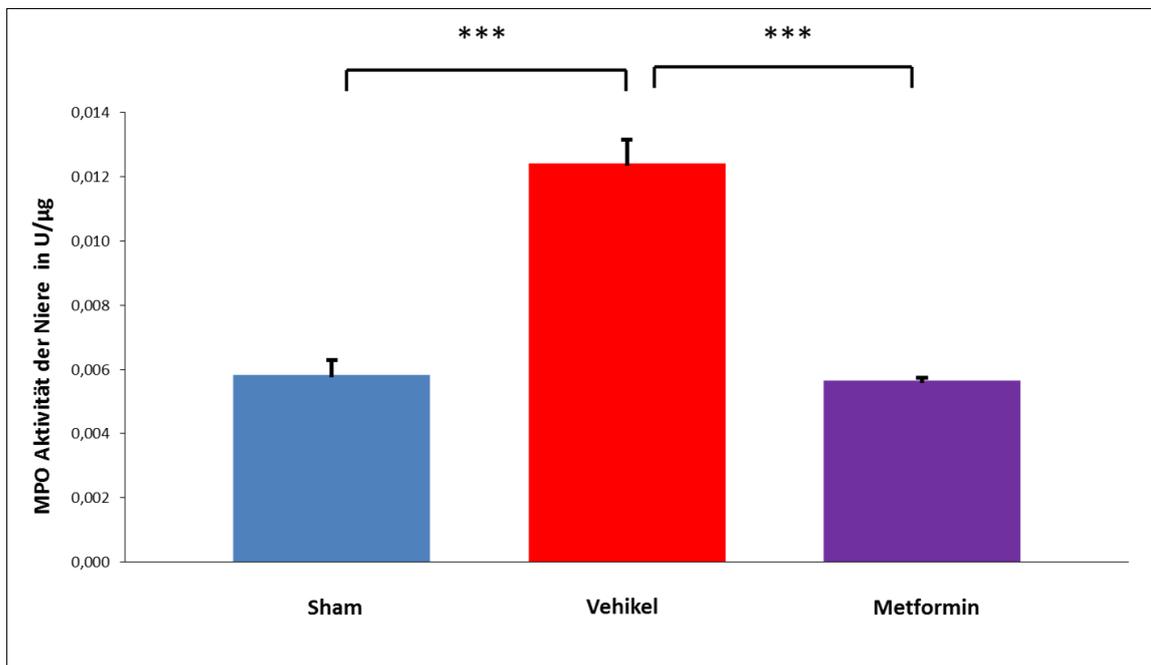


Abb. 28: Effekt von Metformin auf die Myeloperoxidaseaktivität in der Niere im häm. Schock im Vergleich bei Metformin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tieren mit 5 mg Metformingabe 24 h intraperitoneal *** $p \leq 0,001$

5.2.5. Einfluss von Metformin auf die Proteinexpression in den Schockorganen

Die Expression der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 MAPK) in der Leber war bei den Metformin-Tieren am stärksten ausgeprägt (12,29). Auf fast gleichem Niveau wurde auch bei den Sham-Tieren die Kinase exprimiert (11,85), diese war nur bei den Vehikel-Tieren vermindert (9,19) (Abb. 29 und 30). Das gleiche Bild zeigte sich auch bei der Expression von p38 MAPK in der Niere.

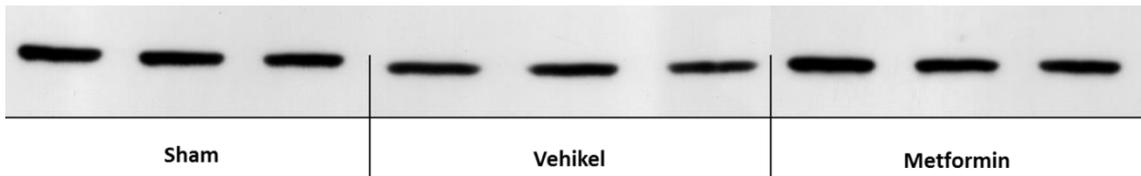


Abb. 29: Western Blot: p38-MAPK-Expression in der Leber nach Metformin-Gabe im häm. Schock

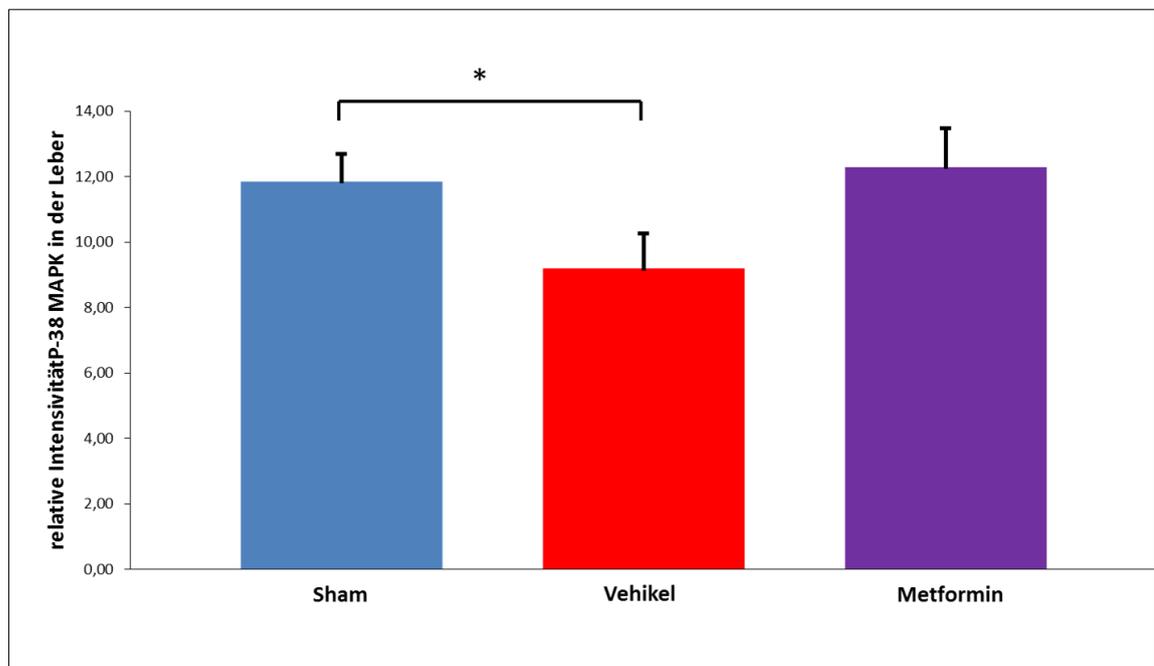


Abb. 30: Western Blot: p38-MAPK-Expression in der Leber nach Metformin-Gabe im Vergleich bei Metformin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tieren mit 5 mg Metformingabe 24 h intraperitoneal * $p \leq 0,05$

In der Leber zeigte sich ein reduzierter Wert der T-bet-Aktivität in der Vehikel-Gruppe. Im Vergleich dazu stieg diese in der Sham-Gruppe auf 11,34; die stärkste Expression gab es in der Leber der Metformin-Tiere mit 12,82 (Abb. 31/32).

In der Niere wurde der Transkriptionsfaktor T-bet ebenfalls verstärkt bei den Sham-Tieren und den Metformin-Tieren exprimiert; dagegen war T-bet bei den Vehikel-Tieren vermindert exprimiert (Abb. 33).

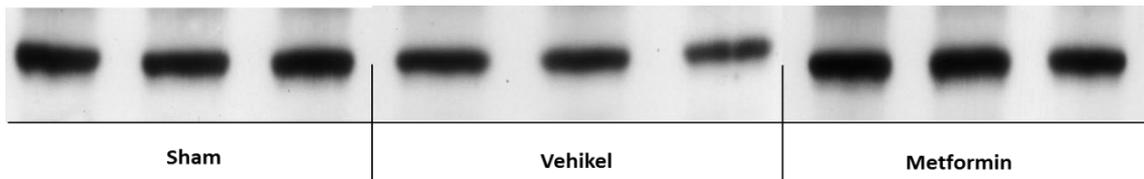


Abb. 31: Western Blot: T-bet-Expression in der Leber nach Metformin-Gabe im häm. Schock

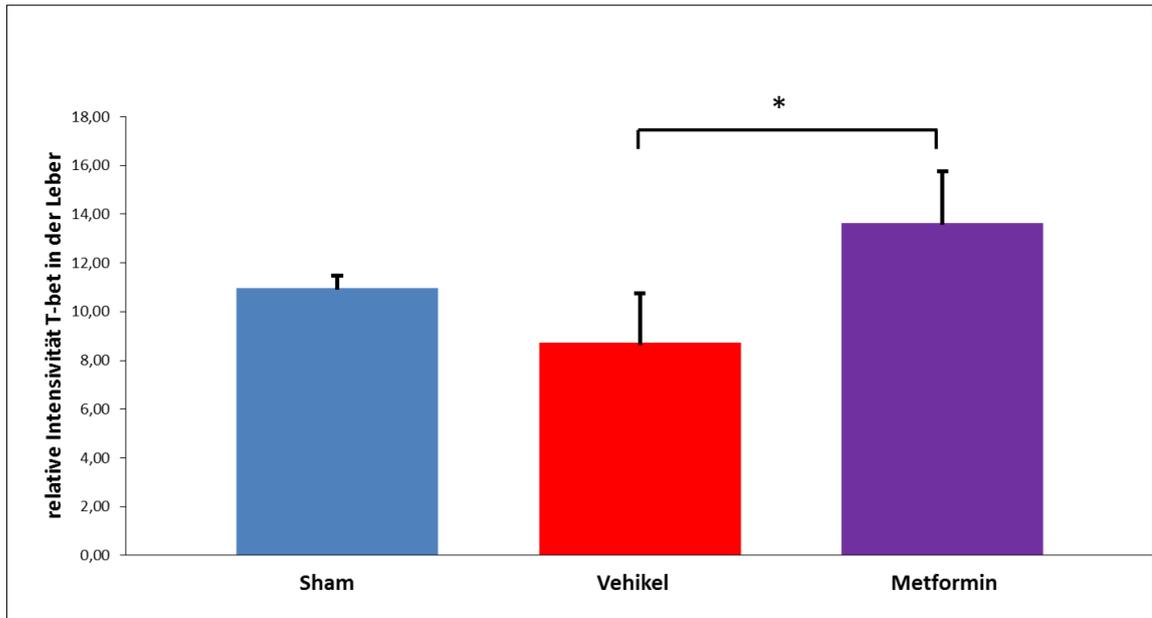


Abb. 32: Western Blot: T-bet-Expression in der Leber nach Metformin-Gabe im Vergleich bei Metformin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tieren mit 5 mg Metformin-gabe 24 h intraperitoneal * $p \leq 0,05$

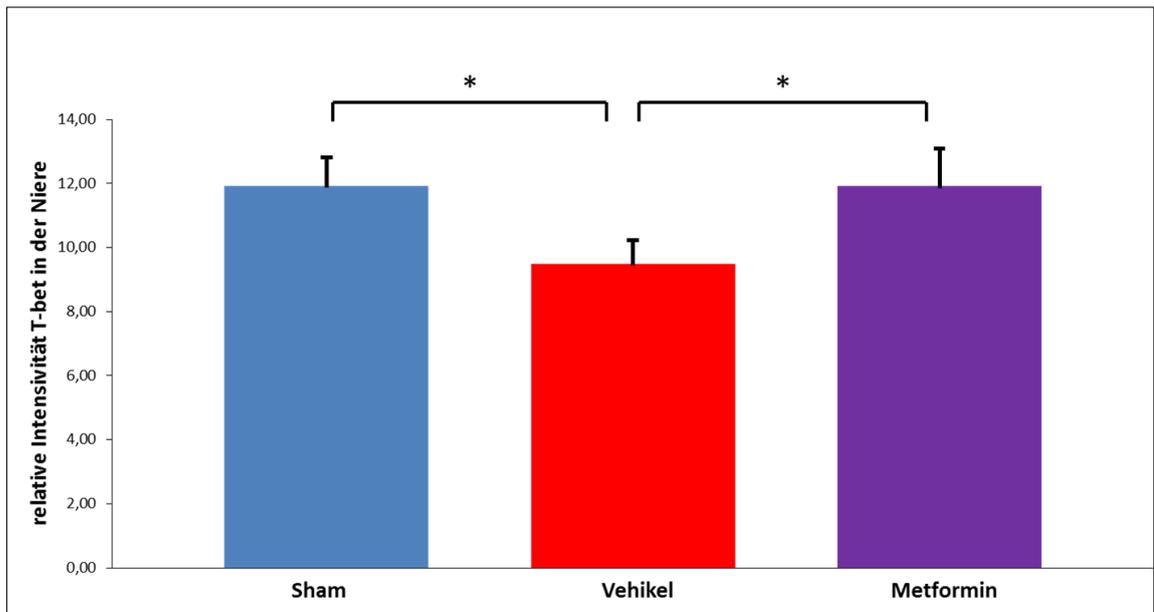


Abb. 33: Western Blot: T-bet-Expression in der Niere nach Metformin-Gabe im Vergleich bei Metformin-Sham-Tieren, Vehikel-Tieren und Häm.-Schock-plus-Metformin-Tieren mit 5 mg Metformin-gabe 24 h intraperitoneal * $p \leq 0,05$

Das Protein I κ B α wurde im Herzen in der Vehikel-Gruppe mit 14,33 stark erhöht gefunden, im Vergleich zu 6,09 in der Metformin-Gruppe.

5.3. Histologie

5.3.1. Herz

Bei der Entnahme des Herzens der Vehikel-Gruppe war makroskopisch eine Dilatation des Ventrikels sowie eine leichte Veränderung der Organkonsistenz festzustellen. Mikroskopisch fiel dazu passend eine Auflockerung des Muskelzellverbands auf. In der Giemsa-Färbung ist bei der Vehikel-Gruppe im Vergleich zu den Sham-Gruppen eine deutlich vermehrte Einwanderung von Leukozyten zu sehen (Abb. 34).

Sowohl in der Ranolazin-Gruppe wie in der Metformin-Gruppe ist eine diskrete Auflösung des Zellverbands sowie eine vermehrte Einwanderung von Leukozyten zu beobachten. Im Vergleich zur Vehikel-Gruppe war diese jedoch deutlich geringer und im Sinne eines zytoprotektiven Effekts ausgeprägt (Abb. 34).

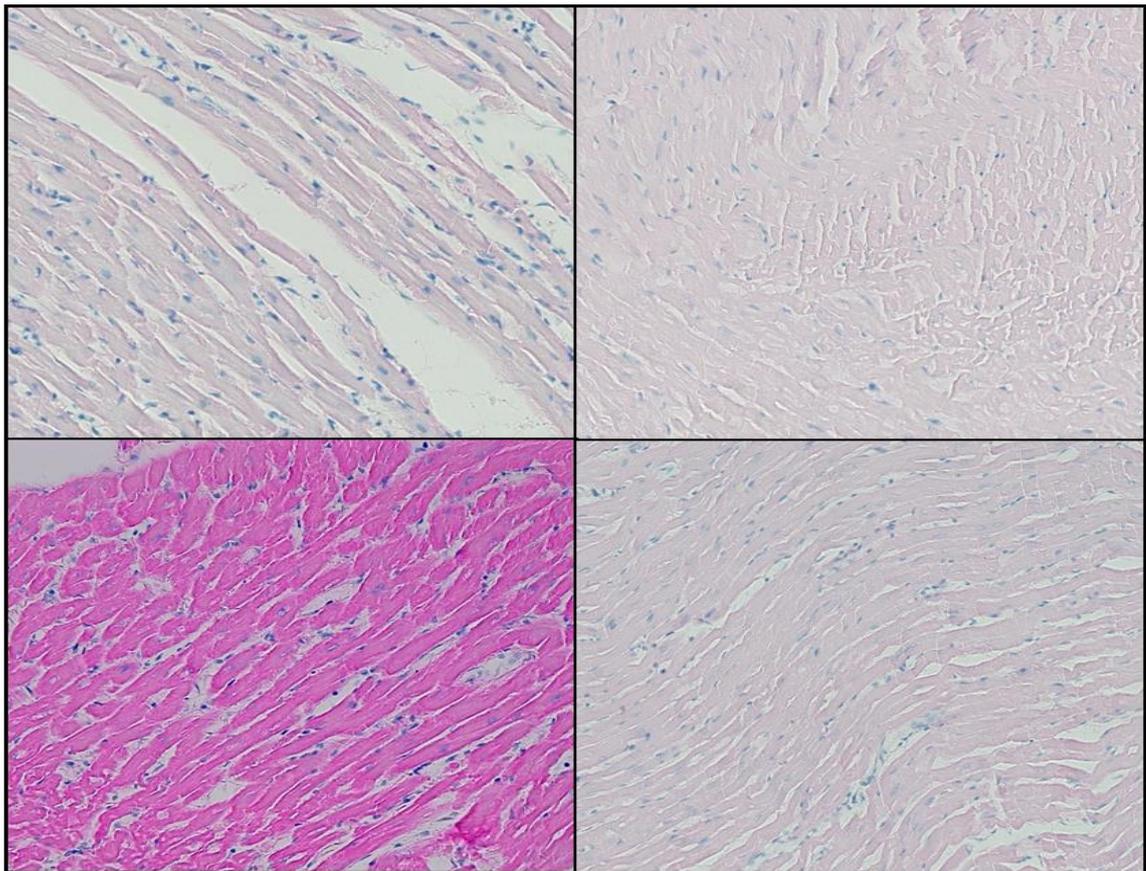


Abb. 34: Links oben: Myokardgewebe der Vehikel-Gruppe, Giemsa-Färbung
Rechts oben: Myokardgewebe der Sham-Gruppen, Giemsa-Färbung
Links unten: Myokardgewebe der Ranolazin-Gruppe, HE-Färbung
Rechts unten: Myokardgewebe der Metformin-Gruppe, Giemsa-Färbung
Alle Bilder in 400-facher Vergrößerung

5.3.2. Leber

Bei der Entnahme der Organe nach dem Beenden des Versuchs fiel in der Vehikel-Gruppe eine prall gefüllte Leber mit weißlich-gelblich Nekrosen an der Oberfläche auf. Die entnommenen Leber der beiden Sham-Gruppen zeigten keine Auffälligkeiten. Bei der mikroskopischen Betrachtung der Vehikel-Gruppe fielen das Verschwinden der Sinusoiden aufgrund einer massiven Stauung mit Erythrozyten und die Schwellung der Hepatozyten auf (Abb. 35).

In der Ranolazin-Gruppe und der Metformin-Gruppe kam es zu einer leichten Anschwellung der Hepatozyten. Diese war aber nicht so stark ausgeprägt wie in der Vehikel-Gruppe. Des Weiteren war keine vermehrte Einwanderung von Leukozyten an den Glissonschen Trias zu sehen wie in der Vehikel-Gruppe (Abb. 35).

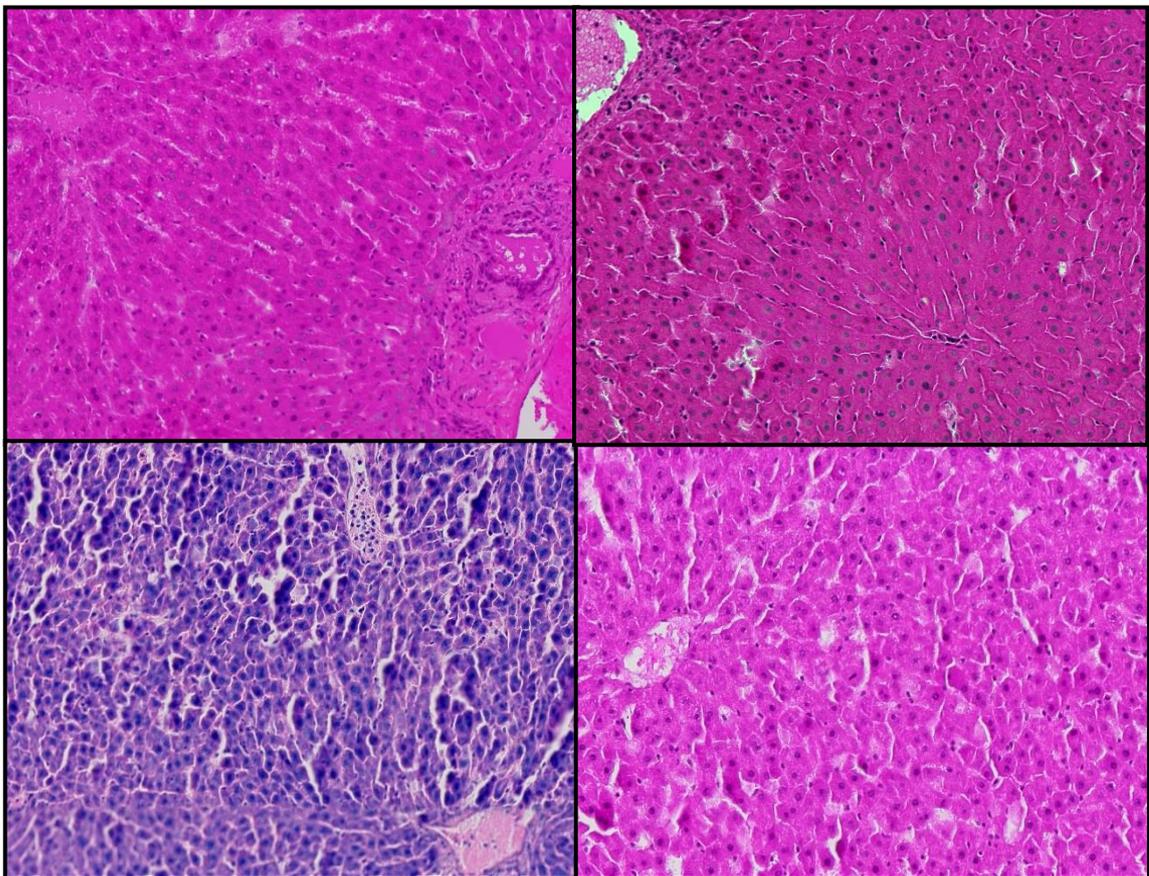


Abb. 35: Links oben: Lebergewebe der Vehikel-Gruppe, HE-Färbung
Rechts oben: Lebergewebe der Sham-Gruppen, HE-Färbung
Links unten: Lebergewebe Ranolazin-Gruppe, Giemsa-Färbung
Rechts unten: Lebergewebe Metformin-Gruppe, HE-Färbung
Alle Bilder in 200-facher Vergrößerung

5.3.3. Lunge

Makroskopisch fiel während der Entnahme der Lunge in der Vehikel-Gruppe vereinzelt Einblutung auf. Bei allen anderen Gruppen konnten kaum Veränderungen festgestellt werden. Bei der mikroskopischen Betrachtung der Vehikel-Gruppe war eine Verdickung der Interalveolarsepten sowie das Schrumpfen und Zusammenfallen der Alveolen zu erkennen. Es kam zur Einwanderung von Leukozyten und an einigen Stellen zur Einblutung. Die Sham-Gruppen wiesen leicht verdickte Interalveolarsepten auf, aber dennoch zeigten sich weite und offene Alveolen. Es war ebenfalls nur eine leichte Einwanderung von Leukozyten festzustellen (Abb. 36).

In der Ranolazin-Gruppe sowie in der Metformin-Gruppe kam es zu einem Anschwellen der Interalveolarsepten und zu einer leichten Verkleinerung der Alveolen. Die Änderungen waren nicht so gravierend wie in der Vehikel-Gruppe. In der Abbildung (Abb. 36) wird dies beispielhaft anhand der Giemsa- und der HE-Färbung für die verschiedenen Gruppen gezeigt (Abb. 36).

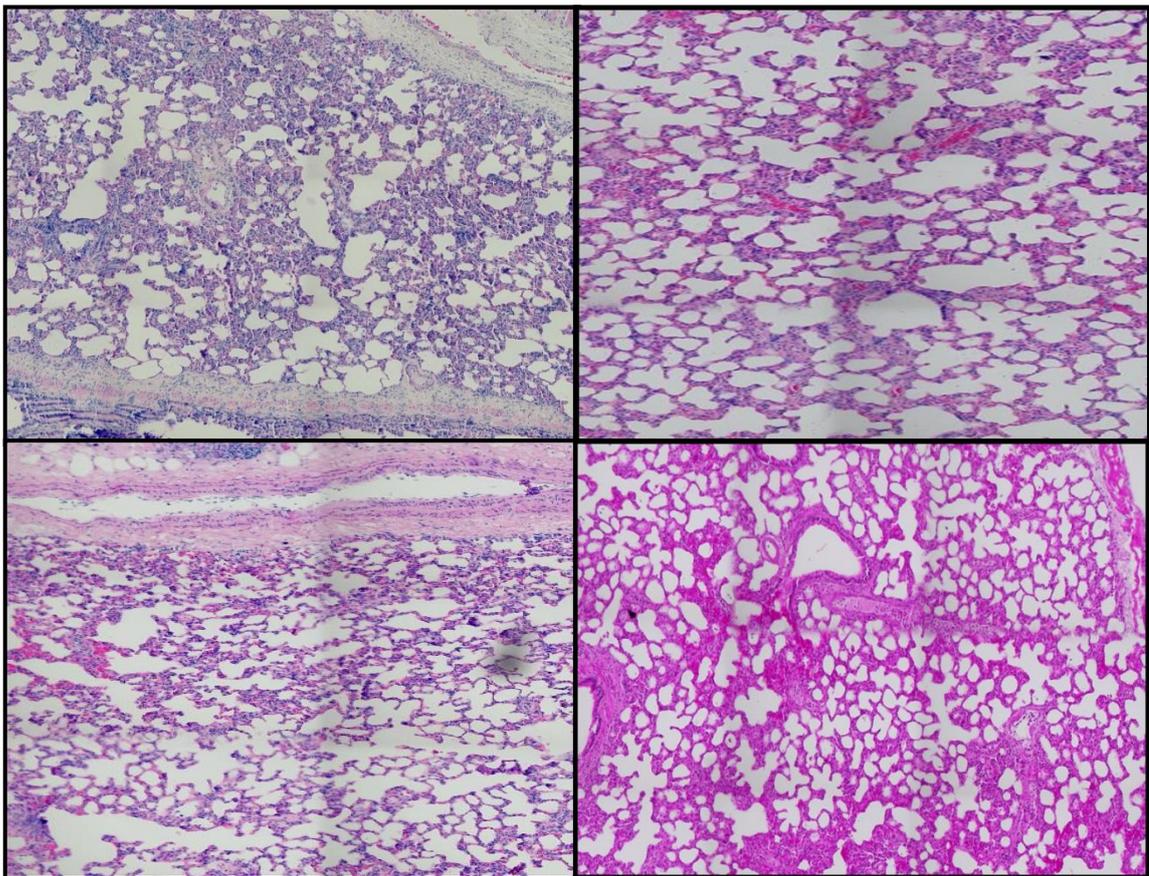


Abb. 36: Links oben: Lungengewebe der Vehikel-Gruppe, Giemsa-Färbung
Rechts oben: Lungengewebe der Sham-Gruppen, Giemsa-Färbung
Links unten: Lungengewebe Ranolazin-Gruppe, HE-Färbung
Rechts unten: Lungengewebe Metformin-Gruppe, HE-Färbung,
Alle Bilder in 200-facher Vergrößerung

5.3.4. Niere

In den histologischen Präparaten konnten zwischen den einzelnen Gruppen kein Unterschied festgestellt werden. Die verschiedenen Gruppen zeigten eine intakte Bowman-Kapsel in den Glomeruli. Es zeigte sich kein Unterschied bei der Leukozyteneinwanderung zwischen den Sham-Gruppen und der Vehikel-Gruppe.

6. Diskussion

Im Hauptteil der Arbeit wurde der Einfluss von Ranolazin und Metformin auf die Überlebenszeit von Wistar-Ratten bei einem hämorrhagischen Schock untersucht. Neben den Vitalparametern MABP, HF und PRI wurden verschiedene laborchemische Bestimmungen wie die Myloperoxidaseaktivität, T-bet, p38 MAPK, I κ B α -Expression gemessen. Darüber hinaus wurden die Organe der Versuchstiere makro- und mikroskopisch untersucht, um das Ausmaß der Entzündungskaskade zu quantifizieren. Es wurden unterschiedliche Dosen und Applikationsformen der jeweiligen Medikamente verwendet. Die einzelnen Versuchsgruppen hatten eine Größe zwischen 5 und 10 Tieren. Es konnte fast eine Verdopplung der Überlebenszeit im Vergleich der Vehikel-Gruppe und der Metformin-Gruppe festgestellt werden. Es konnte eine starke Steigerung der Überlebenszeit in der Ranolazin-Gruppe erreicht werden.

6.1. Auswahl des Tiermodells

Die in diesem Versuch verwendeten männlichen Ratten des Wistar-Stammes haben sich in umfangreichen Untersuchungen bewährt. Sie zeichnen sich durch eine geringe Variabilität, einfache Haltung und Handhabung aus. Im Vergleich zu größeren Versuchstieren wie Schweinen oder Schafen ist die kardiovaskuläre Antwort unterschiedlich und ihre genetische Distanz zum Menschen größer. Durch Einsatz von männlichen Versuchstieren konnten Geschlechtsunterschiede ausgeschaltet werden (Fulop et al. 2013). Der für die vorliegende Untersuchung wichtigste Versuchsparameter, die Überlebenszeit, konnte ohne Nachteile erfasst werden. Die labor- wie immunochemischen Marker sowie die hämodynamische Überwachung sind ebenfalls bei Ratten anwendbar (Hauser 2005).

6.2. Auswahl des Schockmodells und der Schocktiefe

Zur Erzeugung eines hämorrhagischen Schocks wurde ein druckkontrolliertes Modell mit einer Reduktion des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP) auf 40 mmHg \pm 5 mmHg für 60 Min. gewählt. Es zeigte sich, dass bei diesem Schockmodell und dieser arteriellen Blutdruckeinstellung die natürlichen Gegenregulationsmechanismen noch aktiv waren. Trotzdem konnte ein hämorrhagischer Schock mit ausreichender Tiefe erzeugt werden. Ein druckkontrolliertes Modell ist zur Untersuchung der Immunsystemantwort und von Organschäden bei hämorrhagischem Schock und dadurch auch bei Reperfusionsschaden valider, da es den natürlichen Kompensationsmechanismus unterdrückt (Fulop et al. 2013). Beim volumenkontrollierten Modell wäre die Intraspeziesvarianz zu groß gewesen und es hätte keine ausreichende

Schocktiefe sichergestellt werden können (Pfeifer et al. 2013). Das druckkontrollierte Model zeigte im Vergleich dazu mit niedrigeren MABP eine verkürzte Überlebenszeit im Verlauf und einen suffizienten hämorrhagischen Schock (Gonzalez et al. 2001). Höhere oder tiefere arterielle Blutdrücke hätten entweder zu keinem oder zu einem so schweren Schock geführt, dass die Versuchstiere innerhalb von 20 Min. verstorben wären (Rönn et al. 2011).

6.3. Ranolazin

6.3.1. Effekte von Ranolazin auf das Überleben und die Hämodynamik

Ranolazin hat, wie gezeigt werden konnte, einen positiven Einfluss auf das Überleben der Tiere. Sowohl die Versuchsgruppe, die 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit dem Medikament behandelt worden war, als auch die Versuchsgruppe, die dieses 50 Min. nach Start des hämorrhagischen Schocks verabreicht bekommen hatte, zeigten eine verlängerte Überlebenszeit. In den vorbehandelten Tieren ist diese unter anderem auf eine schwächere Entzündungsreaktion zurückzuführen, wie durch das gleichbleibende Niveau der MPO gezeigt werden konnte. Die meisten Studien über Ranolazin untersuchen den Einfluss auf das Herz. In früheren Studien wurde festgestellt, dass Ranolazin eine anti-arrhythmische Wirkung auf Vorhöfe wie auch Herzkammern hat (Kumar et al. 2009; Dhalla et al. 2009). Im Gegensatz zu anderen anti-arrhythmischen Medikamenten übt Ranolazin aufgrund seiner geringeren Wirkung auf den L-Typ-Kalziumkanal keinen Einfluss auf die Herzfrequenz, Myocardkontraktion, AV-Knoten-Überleitung und den Blutdruck aus (Antzelevitch et al. 2004). In Studien konnte gezeigt werden, dass gerade die Arrhythmien während der Ischämie verhindert werden konnten und so eine Verlängerung der Überlebenszeit erreicht wurde (Dhalla et al. 2009; Hale und Kloner 2014). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass unter Einfluss von Ranolazin die Infarktzone am Herzen reduziert werden konnte. Die kardiale Funktion konnte durch die Reduktion von mitochondrialen ROS und die geringere Überladung mit mitochondrialem und zytosolischem Kalzium verbessert werden (Calderon-Sanchez et al. 2016). Diese werden als einer der Hauptverursacher des Ischämie-Reperfusionsschadens genannt (Aldakkak et al. 2011) und lassen sich auf die Blockade des späten Natriumeinstromes zurückführen. Durch diesen wird auch die Aktivität des Natrium-Kalium-Austauschers reduziert. Durch die Vorbehandlung mit Ranolazin, so wird vermutet, gelangt ein geringerer Anteil Cytochrom c in das Zytosol und es entstehen weniger mitochondrial permeability transition pores (MPTP), sodass das Mitochondrium eine erhöhte Stabilität aufweist und seltener zur Apoptose kommt (Aldakkak et al. 2011).

Ranolazin verringert während der Ischämie-/Reperusionsphase im Myokard den Anfall von Stoffwechselzwischenprodukten wie Acetyl-CoA oder NADH, indem es die β -Oxidation hemmt

und die Glucoseoxidation fördert. So wird der Azidose im Gewebe vorgebeugt (Zacharowski et al. 2001). Aufgrund dieser Kenntnisse ist ein protektiver Einfluss auf das Herz und dadurch die Abmilderung oder Verzögerung eines MODS zu vermuten. Die oben genannten Einflüsse führen zu einer gesteigerten Herzfunktion und damit zu einer verbesserten Organperfusion. Daher sind die positiven Einflüsse von Ranolazin außerhalb des Herzens als indirekte Protektion der Organe zu werten (Dehina et al. 2014; Aldakkak et al. 2011).

Hämodynamisch konnte nur beim mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) innerhalb der ersten 40 Min. nach Reperfusion ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ranolazin-Gruppen und der Vehikel-Gruppe festgestellt werden. Im Gegensatz zur Vehikel-Gruppe erreichen die jeweiligen Ranolazin-Gruppen ihren Ausgangs-MABP vor Ischämie und Reperfusion. Es ist zu vermuten, dass dieser Unterschied Bestand hat. Dies könnte jedoch aufgrund der kleinen Versuchsgruppen und der steigenden Volatilität innerhalb der Gruppen nicht statistisch abgesichert werden. Die anderen hämodynamischen Werte unterscheiden sich nicht. Es ist davon auszugehen, dass Ranolazin einen signifikanten Effekt auf die Überlebenszeit und die Hämodynamik im hämorrhagischen Schock hat.

6.3.2. Effekte von Ranolazin auf die Proteinexpression

Die Expression von T-bet ist zentral für eine adäquate und ausgeglichene Antwort auf inflammatorische Prozesse (Ponzoni et al. 2007). Der Transkriptionsfaktor ist das Bindeglied zwischen dem angeborenem und erlernten Immunsystem (Lazarevic et al. 2013). In der folgenden Grafik wird der Einfluss von T-bet auf verschiedene Zellen und Mediatoren des Immunsystems aufgezeigt (Abb. 37). Es zeigte sich, dass Ranolazin einen Einfluss auf die T-bet-Expression hat. Im Myokard kommt es bei der Ranolazin-Sham-Gruppe zu einer Verdopplung der Expression des Transkriptionsfaktors T-bet im Vergleich zur Vehikel-Gruppe. Zwischen diesen beiden Gruppen liegt die Expression von T-bet bei der Ranolazin-Gruppe. Das gleiche Bild ist bei der Expression in der Niere zu sehen. Es ist zu vermuten, dass es aufgrund der inflammatorischen Reaktion des hämorrhagischen Schocks zu einer verminderten Expression von T-bet kommt.

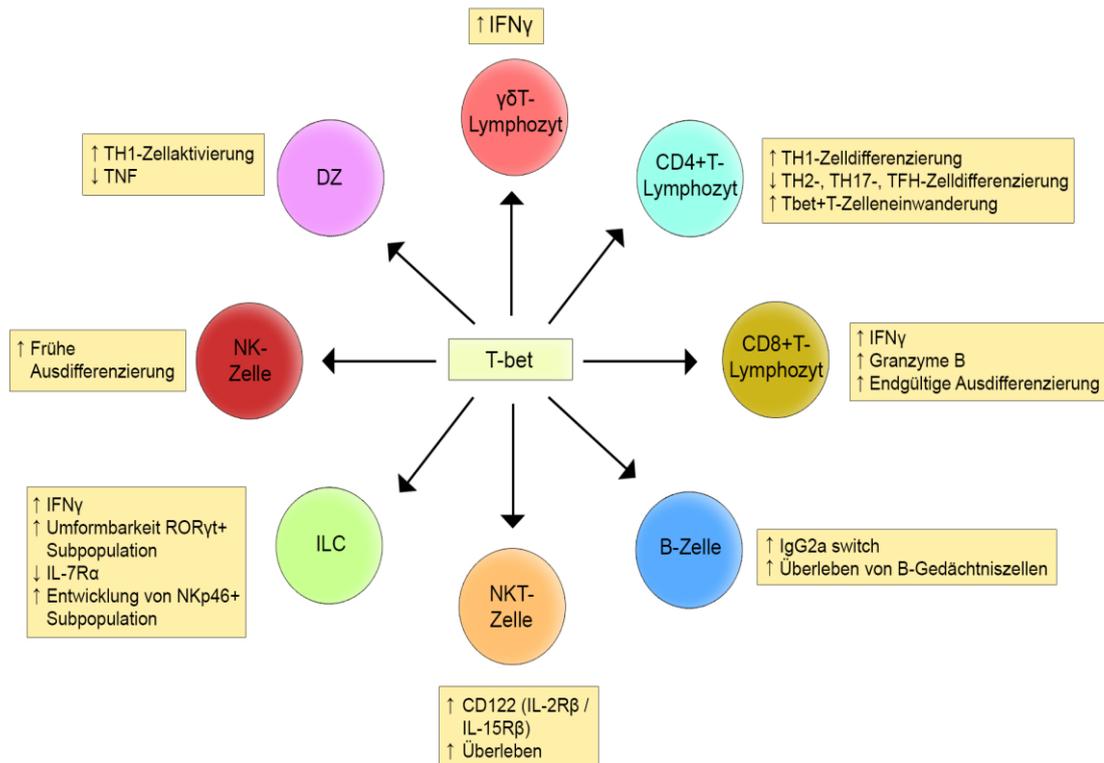


Abb. 37: Schematische Darstellung der von T-bet beeinflussten Zellen nach Lazarevic (Lazarevic et al. 2013; Lazarevic und Glimcher 2011): $\gamma\delta$ T-Lymphozyten ($\gamma\delta$ T Lymphozyt), CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten (CD4+/CD8+ T Lymphozyt), B-Lymphozyten (B Zelle), natürliche Killer-T-Zelle (NKT-Zelle), dendritische Zellen (DZ), Lymphozyten (ILC), natürliche Killerzellen (NKZ), Interferon gamma (IFN γ), Interleukin 7 Rezeptor α (IL-7R α), natürliche Killerzelle p64 Rezeptorprotein (NKp46), retinoic acid receptor-related orphan receptor-gamma t (ROR γ t), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), folliculäre T-Helferzelle (TFH), T-Helferzelle (TH)

Der NF- κ B (nuclear factor, kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) ist bei der Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose von Bedeutung. Er hat eine Schlüsselfunktion bei der Regulation von Entzündungen. Im normalen Zustand befindet er sich inaktiviert durch die Bindung von I κ B α im Zytosol. Mit der Phosphorylierung von I κ B α durch die I κ B-Kinase wird NF- κ B aktiviert, I κ B α freigesetzt und später abgebaut (Abb. 38) (Senftleben et al. 2001). Aus diesem Grund müsste unter Ranolazin-Einfluss eine geringere Freisetzung von I κ B α erfolgen. Dieses lässt sich im Herzen nachweisen. In der Vehikel-Gruppe ist die Freisetzung von I κ B α um mehr als den Faktor 3 erhöht im Vergleich zur Sham-Gruppe und zu den Ranolazin-Gruppen, in denen es nur eine Verdopplung gab.

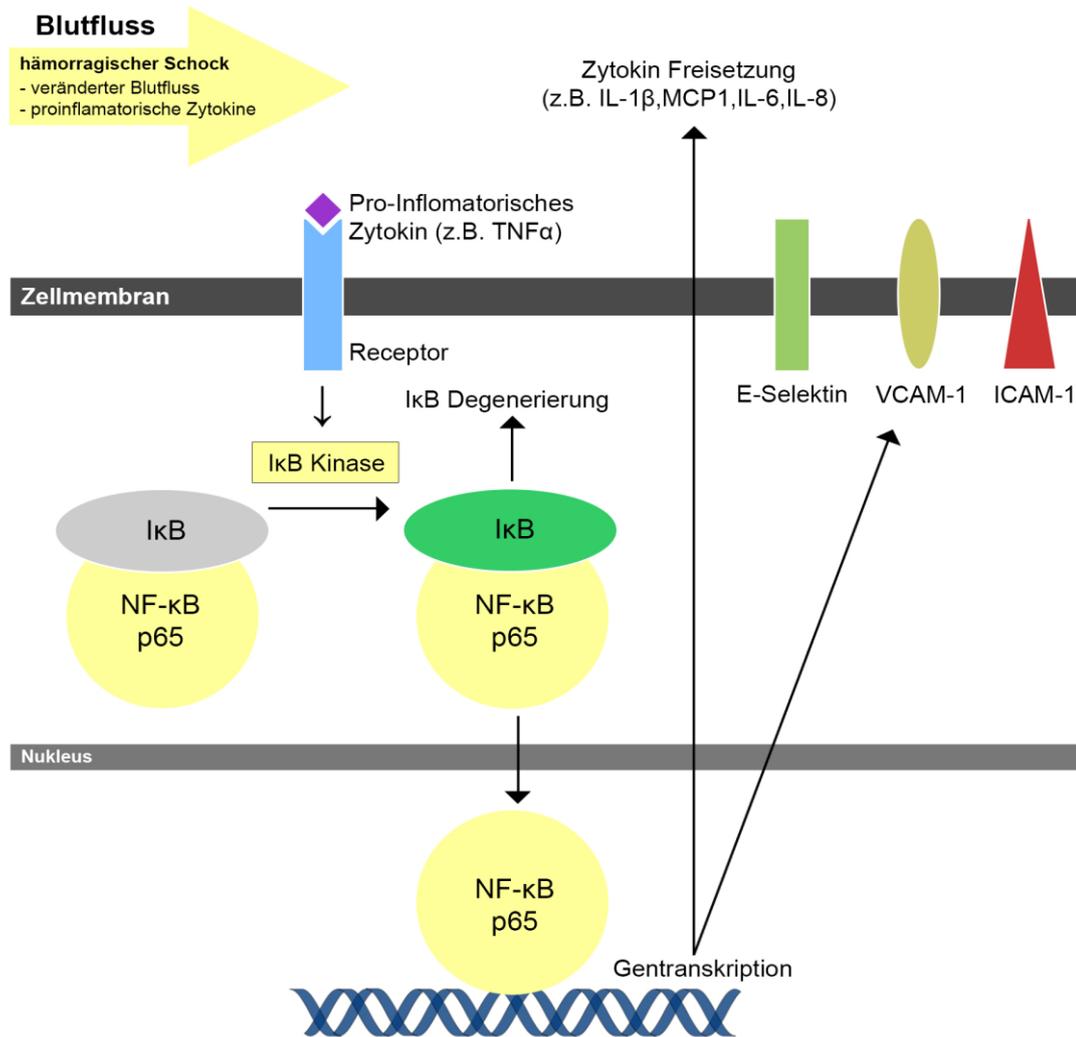


Abb. 38: Darstellung der Aktivierung des NF- κ B-Faktors beim hämorrhagischen Schock nach Li (Li et al. 2015). Durch den hämorrhagischen Schock kommt es zu einem veränderten Blutfluss und zu einer erhöhten Exposition von pro-inflammatorischen Zytokinen (z. B. TNF- α), zur Aktivierung des NF- κ B-Wegs, zur Gentranskription von Adhäsionsmolekülen (z. B. E-Selektin, VCAM-1, ICAM-1) sowie zu einer Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen (z. B. IL-1 β , MCP-1, IL-6, IL-8), was zu einer Intensivierung des hämorrhagischen Schocks führt.

In den durchgeführten Untersuchungen wurde ein Anstieg von p38-mitogenaktivierter Protein-kinase (p38 MAPK) in allen Organen und Gruppen nachgewiesen, die mit Ranolazin vorbe-handelt wurden. p38 ist ein wichtiger Bestandteil des MAPK-Pfades besonders beim hypoxi-schen Stress. Sie steigert unter anderem die Erythropoetinbildung in den Nieren (Tamura et al. 2000). In den Ranolazin-Gruppen konnte in der Niere eine gesteigerte p38-MAPK-Expres-sion festgestellt werden. Dies ist auf eine Anpassungsreaktion auf die Hypoxie im hämorrhagischen Schock zurückzuführen. Da diese Anpassung bei den Ranolazin-Tieren stärker aus-fällt, ist ein Zusammenhang von Ranolazin und gesteigerter p38-MAPK-Aktivität möglich. Ebenfalls ist die p38-MAPK-Aktivität im Myokard bei den Ranolazin-Tieren erhöht, dieses Er-gebnis steht im Gegensatz zu vorherigen Studien, in denen kein Einfluss von Ranolazin auf

die p38-MAPK-Expression im Myokard nachgewiesen werden konnte (Mourouzis et al. 2014). In den anderen Organen konnte ebenfalls eine gesteigerte Expression von p38 MAPK in den Ranolazin-Gruppen festgestellt werden. Nach ausführlichen Literaturrecherchen konnten keine anderen Studien gefunden werden, die sich mit dem direkten Einfluss von Ranolazin auf p38 MAPK befassen.

6.3.3. Effekte von Ranolazin auf die Myeloperoxidaseaktivität und die histologischen Veränderungen

Die Myeloperoxidaseaktivität ist ein indirekter Marker für das Entzündungsgeschehen und korreliert mit diesem (Brennan und Hazen 2003). In diesem Zusammenhang sollte festgestellt werden, ob Ranolazin die Myeloperoxidaseaktivität und die Gewebeschädigung günstig beeinflusst.

Herz

Am Herzen konnte schon bei der Entnahme eine makroskopische Schädigung festgestellt werden. Unter dem Mikroskop zeigte sich, dass es in der Vehikel-Gruppe zu einer Auflockerung des Muskelzellverbands sowie zu einer verstärkten Leukozyten-Einwanderung gekommen war. Bei den Ranolazin-Tieren war im Vergleich dazu eine Halbierung der MPO-Aktivität nachzuweisen. Diese Reduktion ist auf die kardioprotektiven Eigenschaften von Ranolazin zurückzuführen. Dieses verhindert die Arrhythmien während der Ischämie und es kommt zu einer verbesserten Perfusion (Dhalla et al. 2009; Wei et al. 2016). Des Weiteren kommt es zu einer Reduktion von mitochondrialen ROS und einer geringeren Überladung mit mitochondrialem und zytosolischem Kalzium in den Myozyten (Aldakkak et al. 2011; Nathan und Cunningham-Bussel 2013).

Niere

In den Nieren konnte die MPO-Aktivität in der Ranolazin-Gruppe auf dem Ausgangsniveau (Sham-Gruppe) gehalten werden, im Gegensatz zur Vehikel-Gruppe, in der diese massiv anstieg. Es gibt Hinweise, dass durch Ranolazin die Nierendurchblutung verbessert wird, indem es als ein signifikanter Antagonist des α 1-Rezeptors und schwacher Antagonist des Kalziumkanals auf die intrarenalen Arterien wirkt (Deng et al. 2012). Lodge et al. vermuten zudem, dass Ranolazin eine gewisse renale Protektion besitzt (Lodge et al. 1990). Des Weiteren wird von einer verbesserten Organperfusion durch Ranolazin ausgegangen, was die protektiven Eigenschaften von Ranolazin erklärt (Hale und Kloner 2006; Slavich et al. 2016).

Leber

In der Leber der Vehikel-Tiere konnte eine um das Zweifache erhöhte Myeloperoxidaseaktivität im Vergleich zur Sham-Gruppe festgestellt werden. Die Ranolazin-Tiere wiesen im Vergleich dazu nur eine leichte Erhöhung der MPO-Aktivität auf. Ebenso zeigte es sich, dass es in der Vehikel-Gruppe zu einer stärkeren mikroskopischen Veränderung kommt als bei den Ranolazin-Tieren. Diese ist vermutlich durch die verbesserte Organperfusion durch Ranolazin zu erklären, sodass auch hier von protektiven Eigenschaften von Ranolazin ausgegangen werden kann (Hale und Kloner 2006; Slavich et al. 2016).

Lunge

Die histologischen Untersuchungen der Lunge zeigen in der Vehikel-Gruppe makroskopische wie mikroskopische Schädigungen des Gewebes, die stärker ausgeprägt waren als bei den mit Ranolazin behandelten Tieren. Zudem kam es nur bei dieser Gruppe zu einem deutlichen Anstieg der Enzymaktivität der MPO. In der Literatur finden sich keine Untersuchungen, die die Auswirkung von Ranolazin auf die Lunge untersuchen. Aufgrund der kardioprotektiven Eigenschaften von Ranolazin ist trotzdem von einer verbesserten Organperfusion der Lunge und damit von indirekten protektiven Eigenschaften von Ranolazin auszugehen (Hale und Kloner 2006; Slavich et al. 2016).

	Ranolazin	Metformin
Herz	+	+
Niere	+/(+)	+
Leber	Ø/(+)	+
Lunge	Ø/(+)	+

Tab. 10: Zytoprotektive Eigenschaften von Ranolazin und Metformin auf die unterschiedlichen Organe im hämorrhagischen Schock nach der aufgeführten Literatur.

+: direkte protektive Eigenschaften,

(+): indirekte protektive Eigenschaften

Ø: keine direkten protektiven Eigenschaften

6.4. Metformin

6.4.1. Effekte von Metformin auf das Überleben und die Hämodynamik

Die Behandlung der Tiere mit Metformin hat einen deutlichen positiven Einfluss auf die Überlebenszeit der Tiere. Durch die Behandlung mit 5 mg Metformin konnte die durchschnittliche Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zur Vehikel-Gruppe verdoppelt werden. Eine Reduktion der Metformindosis auf ein Fünftel der ursprünglichen Dosis hatte immer noch einen positiven Einfluss auf das Überleben

Metformin hat keinen direkten Einfluss auf die Herzfrequenz, den Blutdruck oder andere hämodynamische Parameter (Berlin Chemie 2014). Durch die Aktivierung der AMP-Kinase und eNOS und die Inhibition von Complex I in der Atmungskette wird die Apoptose während der Ischämie-/Reperfusion gestoppt (Pryor und Cabreiro 2015). Die oben beschriebenen Effekte schützen die Zellen des Körpers vor der Apoptose während der Ischämie-/Reperusionsphase und sind die Hauptgründe für den protektiven Einfluss von Metformin auf den hämorrhagischen Schock. Hämodynamisch konnte ebenfalls nur beim MABP in den ersten 40 Min. nach Reperfusion ein signifikanter Unterschied zwischen der Metformin-Gruppe und der Vehikel-Gruppe festgestellt werden. Im Vergleich zur Vehikel-Gruppe erreichten die Metformin-Gruppen ihren Ausgangs-MABP vor Ischämie und Reperfusion. Aufgrund des frühen Versterbens der Tiere der Vehikel-Gruppe und die dadurch bedingte Vergrößerung des Konfidenzintervalls konnte 40 Min. nach Reperfusion keine Signifikanz nachgewiesen werden. Es ist jedoch zu vermuten, dass dieser Unterschied auch später noch besteht. Das Erreichen und Halten des Prä-Ischämie-/Reperusions-MABP ohne Steigerung der Herzfrequenz ist ein Ausdruck einer suffizienten Herzleistung und entscheidend für die ausreichende Perfusion des restlichen Gewebes. Es ist zu vermuten, dass es aufgrund der oben erwähnten Mechanismen zur Reduktion der Infarktgröße kommt (Elmadhun et al. 2014).

6.4.2. Effekte von Metformin auf die Proteinexpression

I κ B α findet sich unter normalen Umständen gebunden an NF- κ B im Zytosol. Durch die Aktivierung der I κ B-Kinase durch z. B. TNF- α kommt es zu einer Abspaltung und Aktivierung von NF- κ B. I κ B α findet sich nun vermehrt frei im Zytosol und wird später abgebaut. Die erhöhte Konzentration von I κ B α im Zytosol ist ein Hinweis auf eine vermehrte Zytokinproduktion des ebenfalls freigesetzten NF- κ B (Tak und Firestein 2001). In der vorliegenden Studie wurde im Herzen der Vehikel-Gruppe eine doppelt so große Menge des Proteins I κ B α gefunden als in der mit Metformin behandelten Vergleichsgruppe. Dies weist darauf hin, dass Metformin einen

inhibitorischen Einfluss auf die Freisetzung von NF- κ B hat und damit bei hämorrhagischem Schock protektiv wirkt (Isoda 2005; Hattori et al. 2006).

Die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) ist in einem komplexen Kaskadensystem eingebunden, in dem sie die Proteinexpression mitbestimmt. p38 MAPK führt zu Apoptose oder vermehrter Entzündungsreaktion. Die im Versuch gewonnenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den erwarteten und den in vorherigen Untersuchungen gewonnenen Ergebnissen. Es konnte in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden, dass Metformin die ROS-Entstehung mindert und so auch die p38-MAPK-Aktivierung reduziert (Yao et al. 2015). In dieser Untersuchung wurde eine erhöhte Expression der p38 MAPK in der Leber und der Niere der Metformin-Tiere und der Sham-Tiere festgestellt. Allein im Herzen war die p38-MAPK-Aktivität in der Metformin-Gruppe geringer als in der Vehikel-Gruppe.

Der Transkriptionsfaktor T-box expressed in T cells (T-bet) ist der Haupttranskriptionsfaktor der Th-1-Zellen. Er verstärkt sich durch eine positive Rückkopplung über IFN γ selbst. T-bet ist für den nötigen Schutz gegen Pathogene wichtig, kann aber bei einer Über-Expression zu einer überschießenden und schädigenden Entzündung führen (Lazarevic und Glimcher 2011). In der vorliegenden Studie zeigte sich eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors T-bet in der Vehikel-Gruppe in der Leber wie in der Niere. Wie in den Ranolazin-Gruppen kommt es durch Metformin im hämorrhagischen Schock zu keinem Abfall der T-bet-Expression. Es besteht weiterhin ein ausgewogenes Verhältnis der T-Zellen-Differenzierung. In der Literatur konnte keine Arbeit gefunden werden, die den Einfluss von T-bet und Metformin im Schock untersucht hat.

Da das Versuchsende nach 240 Minuten festgelegt worden ist, konnte die Wirkung von Metformin, das die Transkription und damit die Proteinexpression beeinflusst, nicht umfänglich und im gesamten Ausmaß untersucht werden (Kravchuk et al. 2011).

6.4.3. Effekte von Metformin auf die Myeloperoxidaseaktivität und die histologischen Veränderungen

Herz

In der mikroskopischen Auswertung des Myokards fiel in der Vehikel-Gruppe eine Auflockerung des Muskelzellverbands auf. In der Giemsa-Färbung ist im Vergleich zur Sham-Gruppe eine deutlich vermehrte Einwanderung von Leukozyten zu sehen. Dem steht nur eine diskrete Auflösung des Zellverbands in der Metformin-Gruppe gegenüber. Ebenfalls kam es zu einer vermehrten Einwanderung von Leukozyten, die aber nicht so ausgeprägt war wie in der

Vehikel-Gruppe. Die Expression der Myeloperoxidaseaktivität war in der Metformin-Gruppe nicht signifikant geringer als in der Vehikel-Gruppe. Dies könnte von der zu geringen Probenzahl herrühren. Aufgrund des mikroskopischen Ergebnisses, der geringeren Aktivierung von NF- κ B sowie der besseren Hämodynamik ist davon auszugehen, dass Metformin eine Akkumulation von Leukozyten vermindert und damit auch das entzündliche Geschehen im Myokard reduziert.

Es hat sich in früheren Studien gezeigt, dass Metformin im Myokard protektiv wirkt. Während der Reperfusion steigert Metformin die Phosphorylierung der Aktivierten Serin/Threonin-Kinase (Akt) sowie die Reperfusion injury salvage Kinase (RISK) und verhindert so ein Öffnen des MPTP-Kanals. Bei einer Öffnung des MPTP-Kanals während der frühen Phase der Reperfusion kommt es zu einem Einstrom von Kalziumionen, massiven Anstieg von oxidativem Stress sowie einem Abfall von ATP. Dies hat zur Folge, dass Flüssigkeit in die Zelle einströmt und es zu einer Ruptur des Mitochondriums kommt. Durch das Freiwerden von intramitochondrialen Strukturen wird die Apoptose der Zelle eingeleitet. Das Verhindern dieses Signalweges über die Phosphorylierung der Aktivierten Serin/Threonin-Kinase (Akt) sowie die Reperfusion injury salvage Kinase (RISK) führt zur Reduzierung der Myokardinfarktgröße (Driver et al. 2018; Riksen et Tack 2014). Metformin fördert die Aktivierung der AMP-Kinase. Die AMPK ist für eine Homöostase des Energiehaushalts auch unter oxidativem Stress, Ischämie oder Hypoxie verantwortlich (Abb. 39). Durch die Blockierung des Complex 1 der Atmungskette im Mitochondrium wird die AMPK aktiviert. Dies verbessert den ATP:AMP-Quotienten, indem die für die energieintensiven Cholesterin- und Fettsäurebiosynthese verantwortlichen Enzyme gehemmt werden. AMPK verhindert die Öffnung vom MPTP zu Beginn der Reperfusionsphase, bis es zu einer Normalisierung des aeroben Metabolismus kommt. Die Aktivierung des eNOS und des Adenosin-Rezeptors tragen zu den kardioprotektiven Eigenschaften von Metformin bei (Abb. 39) (Peng et al. 2016, Driver et al. 2018; Varjabedian et al. 2018).

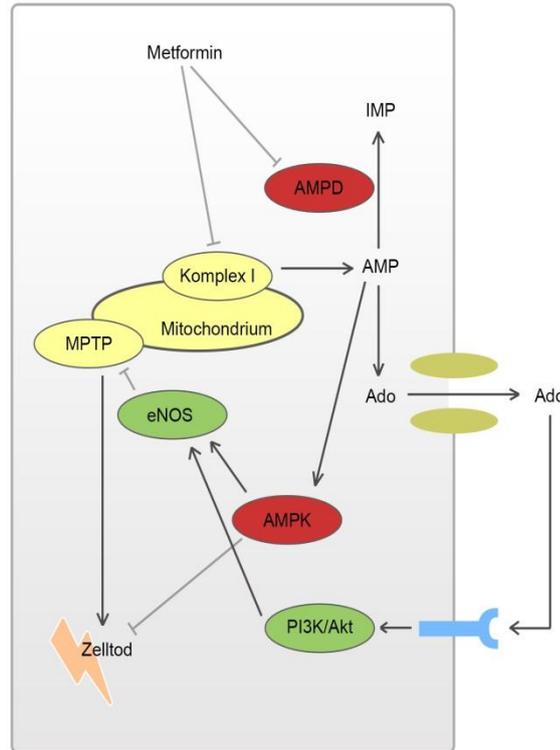


Abb. 39: Kardioprotektive Wirkungsmechanismus in der Zelle von Metformin (El Messaoudi et al. 2013). Mit der Hemmung von Komplex 1 steigt die AMP-Konzentration. Diese aktiviert AMPK, was zu einer Ansammlung von Adenosine (Ado) führt und die Öffnung der MPTP-Kanäle bei der Reperfusion verhindert.

Niere

In der vorliegenden Studie zeigte sich unter dem Einfluss von Metformin eine signifikante Erhöhung der Aktivität der Myeloperoxidase in der Vehikel-Gruppe. Im Vergleich dazu ist die Aktivität in der Metformin-Gruppe um die Hälfte geringer. Dieses Ergebnis spiegelt sich nicht im makro- und mikroskopischen Bild der entnommenen Nieren wider. Diese Diskrepanz zwischen laborchemischen und histologischen Ergebnissen könnte durch die frühzeitige Beendigung des Versuchs nach vier Stunden Reperfusion entstanden sein. Trotzdem ist davon auszugehen, dass durch die bessere Hämodynamik unter Metformin die Versorgung und die Filtrationsrate auf einem hohen Niveau bleiben. Wang et al. zeigten ebenfalls, dass Metformin mit der Aufrechterhaltung der Aktivität der Na-K-ATPase nach der Ischämie die Hämostase der Nierenzellen bewahrt und somit die Niere geschützt wird. Des Weiteren reduziert Metformin die Menge an inflammatorischen Mediatoren wie z. B. COX-2 oder Caspase-3 und so auch das Aktivierungsniveau von Makrophagen (Wang et al. 2015).

Leber

Während der Entnahme der Organe fiel auf, dass sich die Vehikel-Gruppe und die Metformin-Gruppe makroskopisch wie mikroskopisch unterscheiden. In der Vehikel-Gruppe ist eine leichte Erhöhung der MPO-Aktivität zu sehen. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Studien, die für Metformin eine Erhöhung der anti-inflammatorischen Enzymaktivität, eine geringere Aktivierung der Sauerstoffradikalen sowie eine Reduzierung der postischämischen Inflammationsmediatoren nachweisen (Cahova et al. 2015).

Lunge

Während der Entnahme der Lunge fiel auf, dass nur in der Vehikel-Gruppe vereinzelte Einblutungen makroskopisch zu sehen waren. Mikroskopisch konnten im Gegensatz dazu bei der Metformin-Gruppe die Einwanderung von Leukozyten beobachtet werden. Dies kann der Beginn einer Schocklunge (ARDS) sein, was später zu einem Multiorganversagen (MODS) führt (Collard und Gelman 2001). Chen et al. beschreiben bei neonatalen Ratten, die einer Hypoxie ausgesetzt waren, ebenfalls anti-inflammatorische und koagulierende Effekte als protektive Eigenschaften von Metformin. Diese entstehen durch die Beeinflussung von AMPK und die verminderte Aktivität z. B. von p53, Sauerstoffradikalen und anderen pro-inflammatorischen Proteinen unter der Gabe von Metformin (Chen et al. 2015).

	Ranolazin	Metformin
Herz	+	+
Niere	+/(+)	+
Leber	Ø/(+)	+
Lunge	Ø/(+)	+

Tab. 11: Zytoprotektive Eigenschaften von Ranolazin und Metformin auf die unterschiedlichen Organe im hämorrhagischen Schock nach der aufgeführten Literatur

+: direkte protektive Eigenschaften,
 (+): indirekte protektive Eigenschaften
 Ø: keine direkten protektiven Eigenschaften

6.5. Limitationen der Arbeit

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell wurde in früheren Studien erfolgreich erprobt. (Wang et al. 2015; Apaijai et al. 2014). Wie bereits oben angesprochen, ist eine direkte Übertragung der Ergebnisse vom Tier auf den Menschen nur eingeschränkt möglich. Des Weiteren muss bei der Überführung in den klinischen Alltag beachtet werden, dass in dieser Studie die Versuchstiere 24 Stunden vor Versuchsbeginn mit Ranolazin oder Metformin behandelt wurden. Nur eine Ranolazin-Gruppe wurde 50 Min. nach Beginn des hämorrhagischen Schocks mit Ranolazin behandelt, was eher dem Vorgehen im klinischen Alltag entspricht.

Um geschlechtsspezifische Unterschiede zu minimieren, wurden nur männliche Tiere verwendet, da der während des Zyklus schwankende Einfluss von weiblichen Sexualhormonen nicht abzuschätzen ist. Die einzelnen Versuchsgruppen hatten eine ausreichende Anzahl an Tieren was jedoch in weiteren Untersuchungen überprüft werden müsste.

In dieser Arbeit wurde aus der Gruppe der hypovolämischen Schockarten nur der hämorrhagische Schock untersucht. Im klinischen Alltag kommt es jedoch in der Regel durch ein Trauma zu einem traumatischen hämorrhagischen Schock; seltener ist der reine hämorrhagische Schock ohne Trauma. Durch das Trauma werden wiederum pathophysiologische Reaktionen beeinflusst, die in dieser Arbeit nicht berücksichtigt werden konnten.

Bei der Auswertung wurden jeweils drei Präparate von jedem Organ und jeder Versuchsgruppe untersucht und dazu exemplarische Bilder in der Arbeit gezeigt. Die Auswahl geschah nach einem subjektivem und nicht nach einem standardisierten Protokoll.

Es ist davon auszugehen, dass histologisch sichtbare Gewebeveränderungen erst in einer späteren Phase eines hämorrhagischen Schock entstehen. In den histologischen Präparaten wurden in allen drei Gruppen noch keine Gewebeveränderungen gefunden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Versuche spätestens vier Stunden nach Reperfusion beendet worden sind. Den klinischen Verdacht eines Leberschadens oder einer Verschlechterung der Lungenfunktion unter Ranolazin in sehr seltenen Fällen konnte durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden (Sancho-del-Val et al. 2013; Goswami et al. 2010).

Die bis dato erschienenen Studien über Ranolazin beleuchten primär den Einfluss auf das Herz. Es wurde bis jetzt keine Studie über die Wirkung im hämorrhagischen Schock verfasst.

7. Zusammenfassung

Der hämorrhagische Schock ist fast für jeden vierten Tod weltweit in der Gruppe der 15- bis 45-Jährigen verantwortlich (Kauvar et al. 2006). Die Mortalität bei hämorrhagischem Schock ist heute noch hoch. Ziel der durchgeführten Untersuchung war es, die protektiven Eigenschaften von zwei zugelassenen Medikamenten (Ranolazin und Metformin) vor dem durch ärztliches Handeln ausgelösten Reperfusionsschaden zu zeigen.

Hierfür wurden Wistar-Ratten je Medikament in eine Sham-Gruppe, eine Vehikel-plus-häm.-Schock-Gruppe und eine oder zwei Medikament-plus-häm.-Schock-Gruppe eingeteilt. Die Medikamentengabe erfolgte 24 Stunden vor Versuchsbeginn i.p. oder 50 Min. nach Versuchsbeginn i.v. Nach einer Allgemeinanästhesie wurde den Versuchstieren mit Ausnahme der zwei Sham-Gruppe durch Blutabnahme auf den MABP-Zielwert von 40 ± 5 mmHg ein hämorrhagischer Schock für eine Stunde zugefügt. Nach einer Stunde wurde das abgenommen Blut reperfundiert und die Versuchstiere weitere drei Stunden überwacht. Im Anschluss an den Versuch wurden die Organe entnommen und laborchemische sowie histologische Untersuchungen durchgeführt.

Unter der Gabe von Metformin zeigte sich im Vergleich zu unbehandeltem hämorrhagischem Schock eine Verdopplung der Überlebenszeit und ein signifikanter protektiver Einfluss auf den Gesamtorganismus. Die laborchemischen Ergebnisse wie z. B. die verringerte I κ B α -Konzentration im Herzen und die histologische Auswertung unterstützen diese These.

Für Ranolazin konnte ebenfalls eine protektive Eigenschaft nachgewiesen werden. Es kam zu einer ebenfalls signifikanten Überlebenszeitverlängerung. Die laborchemischen und histologischen Untersuchungen zeigten, dass Ranolazin einen direkten protektiven Einfluss am Herzen hat und es so zu einem Überlebensvorteil kommt.

Die vollständigen und genauen Wirkmechanismen beider Substanzen sind noch nicht endgültig geklärt und bedürfen weiterer experimenteller und In-vitro-Untersuchungen. Die Ergebnisse dieser Studie müssen nun durch größere Studien verifiziert werden, um eine Grundlage für weitere klinischen Studien und Anwendungen zu schaffen.

8. Literaturverzeichnis

- Adams, H. A.; Baumann, G.; Gansslen, A.; Janssens, U.; Knoefel, W.; Koch, T. et al. (2001): Definition of shock types. In: *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* : AINS 36 Suppl 2, S. S140-3. DOI: 10.1055/s-2001-18174.
- Aldakkak, M.; Camara, A.; Heisner, J.; Yang, M.; Stowe, D. (2011): Ranolazine reduces Ca²⁺ overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. In: *Pharmacological research* 64 (4), S. 381–392. DOI: 10.1016/j.phrs.2011.06.018.
- Antzelevitch, C.; Belardinelli, L.; Zygmunt, A.; Burashnikov, A.; Di Diego, J.; Fish, J. et al. (2004): Electrophysiological effects of ranolazine, a novel antianginal agent with antiarrhythmic properties. In: *Circulation* 110 (8), S. 904–910. DOI: 10.1161/01.CIR.0000139333.83620.5D.
- Apaijai, N.; Chinda, K.; Palee, S.; Chattipakorn, S.; Chattipakorn, N. (2014): Combined vildagliptin and metformin exert better cardioprotection than monotherapy against ischemia-reperfusion injury in obese-insulin resistant rats. In: *PloS one* 9 (7), S. e102374. DOI: 10.1371/journal.pone.0102374.
- Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft; Deutsche Diabetes Gesellschaft; Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin; Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin; Verband der Diabetesberatungs- und Schulungsberufe Deutschland; Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (2013): Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes - Langfassung, 1. Auflage: Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF).
- arznei-telegramm (2009): Ranolazin bei chronisch stabiler Angina Pectoris. Fakten und Vergleiche für die rationale Therapie. Hg. v. A.T.I. Arzneimittelinformation Berlin GmbH.
- Bailey, C.; Turner, R. (1996): Metformin. In: *The New England journal of medicine* 334 (9), S. 574–579. DOI: 10.1056/NEJM199602293340906.
- Belardinelli, L.; Shryock, J. C.; Fraser, H. (2006): Inhibition of the late sodium current as a potential cardioprotective principle: effects of the late sodium current inhibitor ranolazine. In: *Heart (British Cardiac Society)* 92 Suppl 4, S. iv6-iv14. DOI: 10.1136/hrt.2005.078790.
- Berkelman T, Stenstedt T. (1998): 2-D Electrophoresis using Immobilized pH Gradients: Principles and Methods. Hg. v. Amersham Pharmacia Biotech. Uppsala.
- Berlin Chemie (2014): Fachinformation Sifor 500mg.
- Braun F, Platz KP, Müller AR (2005): Ischämie- Reperfusionsschaden bei Dünndarmtransplantation. In: *TransplantLinc* 2005 (11), S. 29–43.
- Brennan, M.; Hazen, S. (2003): Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. In: *Current opinion in lipidology* 14 (4), S. 353–359. DOI: 10.1097/01.mol.0000083762.66245.51.
- Bühl, A. (2012): SPSS 20. Einführung in die moderne Datenanalyse. 13., aktualisierte Aufl. München [u.a.]: Pearson (Scientific tools).
- Buja, L.; Vander Heide, R. (2016): Pathobiology of Ischemic Heart Disease: Past, Present and Future. In: *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 25 (3), S. 214–220. DOI: 10.1016/j.carpath.2016.01.007.

- Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften: Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes- Langfassung. Online verfügbar unter www.dm-therapie.versorgungsleitlinien.de.
- Cahova, M.; Palenickova, E.; Dankova, H.; Sticova, E.; Burian, M.; Drahota, Z. et al. (2015): Metformin prevents ischemia reperfusion-induced oxidative stress in the fatty liver by attenuation of reactive oxygen species formation. In: *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 309 (2), S. G100-11. DOI: 10.1152/ajpgi.00329.2014.
- Calderon-Sanchez, E.; Dominguez-Rodriguez, A.; Lopez-Haldon, J.; Jimenez-Navarro, M.; Gomez, A.; Smani, T.; Ordonez, A. (2016): Cardioprotective Effect of Ranolazine in the Process of Ischemia-reperfusion in Adult Rat Cardiomyocytes. In: *Revista espanola de cardiologia (English ed.)* 69 (1), S. 45–53. DOI: 10.1016/j.rec.2015.02.027.
- Casals, M.; Girabent-Farres, M.; Carrasco, J. (2014): Methodological quality and reporting of generalized linear mixed models in clinical medicine (2000-2012): a systematic review. In: *PloS one* 9 (11), S. e112653. DOI: 10.1371/journal.pone.0112653.
- Centers for Disease Control and Prevention (2015): Web-based Injury Statistics Query and Reporting System. Hg. v. National Center for Injury Prevention and Control. Online verfügbar unter <http://www.cdc.gov/injury/wisqars>, zuletzt aktualisiert am 26.01.2015.
- Chen, X.; Walther, F.; Sengers, R.; Laghmani, El H.; Salam, A.; Folkerts, G. et al. (2015): Metformin attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats by reducing the inflammatory response. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 309 (3), S. L262-70. DOI: 10.1152/ajplung.00389.2014.
- Collard, C. D.; Gelman, S. (2001): Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. In: *Anesthesiology* 94 (6), S. 1133–1138.
- Davenport, R.; Curry, N.; Manson, J.; De'Ath, H.; Coates, A.; Rourke, C. et al. (2011): Hemostatic effects of fresh frozen plasma may be maximal at red cell ratios of 1:2. In: *The Journal of trauma* 70 (1), S. 90-5; discussion 95-6. DOI: 10.1097/TA.0b013e318202e486.
- David, J-S; Spann, C.; Marcotte, G.; Reynaud, B.; Fontaine, O.; Lefèvre, M.; Piriou, V. (2013): Haemorrhagic shock, therapeutic management. In: *Annales françaises d'anesthésie et de réanimation* 32 (7-8), S. 497–503. DOI: 10.1016/j.annfar.2013.07.008.
- Dehina, L.; Descotes, J.; Chevalier, P.; Bui-Xuan, B.; Romestaing, C.; Dizerens, N. et al. (2014): Protective effects of ranolazine and propranolol, alone or combined, on the structural and functional alterations of cardiomyocyte mitochondria in a pig model of ischemia/reperfusion. In: *Fundamental & clinical pharmacology* 28 (3), S. 257–267. DOI: 10.1111/fcp.12033.
- Deng, C.; Kuang, S.; Rao, F.; Yang, H.; Fang, X.; Shan, Z. et al. (2012): Effect of ranolazine on rat intrarenal arteries in vitro. In: *European journal of pharmacology* 683 (1-3), S. 211–216. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.03.010.
- Dhalla, A.; Wang, W.; Dow, J.; Shryock, J.; Belardinelli, L.; Bhandari, A.; Kloner, R. (2009): Ranolazine, an antianginal agent, markedly reduces ventricular arrhythmias induced by ischemia and ischemia-reperfusion. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 297 (5), S. H1923-9. DOI: 10.1152/ajpheart.00173.2009.
- DiMaggio, C.; Ayoung-Chee, P.; Shinseki, M.; Wilson, C.; Marshall, G.; Lee, D. et al. (2016): Traumatic injury in the United States: In-patient epidemiology 2000-2011. In: *Injury* 47 (7), S. 1393–1403. DOI: 10.1016/j.injury.2016.04.002.

- Diodato, M.; Knöferl, M.; Schwacha, M.; Bland, K.; Chaudry, I. (2001): Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. In: *Cytokine* 14 (3), S. 162–169. DOI: 10.1006/cyto.2001.0861.
- Driver, C.; Bamitale, K.; Kazi, A.; Olla, M.; Nyane, A.; Owira, P. (2018): Cardioprotective Effects of Metformin. In: *Journal of cardiovascular pharmacology*. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000599.
- El Messaoudi, S.; Rongen, G.; de Boer, R.; Riksen, N. (2011): The cardioprotective effects of metformin. In: *Current opinion in lipidology* 22 (6), S. 445–453. DOI: 10.1097/MOL.0b013e32834ae1a7.
- El Messaoudi, S.; Rongen, G.; Riksen, N. (2013): Metformin therapy in diabetes: the role of cardioprotection. In: *Current atherosclerosis reports* 15 (4), S. 314. DOI: 10.1007/s11883-013-0314-z.
- Elmadhun, N.; Sabe, A.; Lassaletta, A.; Chu, L.; Sellke, F. (2014): Metformin mitigates apoptosis in ischemic myocardium. In: *The Journal of surgical research* 192 (1), S. 50–58. DOI: 10.1016/j.jss.2014.05.005.
- EMA (Hg.) (2014): Europ. Beurteilungsbericht (EPAR) RANEXA,. Online verfügbar unter http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000805/WC500045937.pdf, zuletzt aktualisiert am 09.2014.
- Fulop, A.; Turoczi, Z.; Garbaisz, D.; Harsanyi, L.; Szijarto, A. (2013): Experimental models of hemorrhagic shock: a review. In: *European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes* 50 (2), S. 57–70. DOI: 10.1159/000348808.
- Gonzalez, R. J.; Moore, E. E.; Ciesla, D. J.; Biffl, W. L.; Johnson, J. L.; Silliman, C. C. (2001): Mesenteric lymph is responsible for post-hemorrhagic shock systemic neutrophil priming. In: *The Journal of trauma* 51 (6), S. 1069–1072.
- Goswami, R.; Van De Car, D.; Schmader, K.; Bashore, T.; Sketch, M. (2010): Ranolazine-related dyspnea on exertion. In: *The American journal of geriatric pharmacotherapy* 8 (1), S. 73–76. DOI: 10.1016/j.amjopharm.2010.01.002.
- Hale, S.; Kloner, R. (2006): Ranolazine, an inhibitor of the late sodium channel current, reduces postischemic myocardial dysfunction in the rabbit. In: *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 11 (4), S. 249–255. DOI: 10.1177/1074248406294607.
- Hale, S.; Kloner, R. (2014): Ranolazine treatment for myocardial infarction? Effects on the development of necrosis, left ventricular function and arrhythmias in experimental models. In: *Cardiovascular drugs and therapy* 28 (5), S. 469–475. DOI: 10.1007/s10557-014-6548-3.
- Harrois, A.; Dupic, L.; Duranteau, J. (2011): Targeting the microcirculation in resuscitation of acutely unwell patients. In: *Current opinion in critical care* 17 (3), S. 303–307. DOI: 10.1097/MCC.0b013e3283466ba0.
- Hattori, Y.; Suzuki, K.; Hattori, S.; Kasai, K. (2006): Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. In: *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 47 (6), S. 1183–1188. DOI: 10.1161/01.HYP.0000221429.94591.72.
- Hauser, C. (2005): Preclinical models of traumatic, hemorrhagic shock. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 24 Suppl 1, S. 24–32.

- Hinshaw B. Cox B. (1972): The fundamental mechanisms of shock. New York: Plenum Press.
- Isoda, K. (2005): Metformin Inhibits Proinflammatory Responses and Nuclear Factor- κ B in Human Vascular Wall Cells. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (3), S. 611–617. DOI: 10.1161/01.ATV.0000201938.78044.75.
- Janssens, U.; Graf, J. (2004): Shock: What are the basics? In: *Der Internist* 45 (3), S. 258–266. DOI: 10.1007/s00108-003-1135-x.
- Johansson, P.; Stensballe, J.; Ostrowski, S. (2017): Erratum to: Shock induced endotheliopathy (SHINE) in acute critical illness - a unifying pathophysiologic mechanism. In: *Critical care (London, England)* 21 (1), S. 187. DOI: 10.1186/s13054-017-1756-4.
- Kauvar, D.; Lefering, R., Charles E. (2006): Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. In: *The Journal of trauma* 60 (6 Suppl), S. S3-11. DOI: 10.1097/01.ta.0000199961.02677.19.
- Kortbeek, J.; Al Turki, S.; Ali, J.; Antoine, J.; Bouillon, B.; Brasel, K. et al. (2008): Advanced trauma life support, 8th edition, the evidence for change. In: *The Journal of trauma* 64 (6), S. 1638–1650. DOI: 10.1097/TA.0b013e3181744b03.
- Kravchuk, E.; Grineva, E.; Bairamov, A.; Galagudza, M.; Vlasov, T. (2011): The effect of metformin on the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion injury in the rat model of diabetes mellitus type II. In: *Experimental diabetes research* 2011, S. 907496. DOI: 10.1155/2011/907496.
- Kreimeier, U.; Prückner, S. (1998): Volumetherapie bei Hypovolämie und Schock. In: *Notfall Rettungsmed* (1), S. 119–129.
- Kumar, K.; Nearing, B.; Carvas, M.; Nascimento, B.; Acar, M.; Belardinelli, L.; Verrier, RL. (2009): Ranolazine exerts potent effects on atrial electrical properties and abbreviates atrial fibrillation duration in the intact porcine heart. In: *Journal of cardiovascular electrophysiology* 20 (7), S. 796–802. DOI: 10.1111/j.1540-8167.2009.01437.x.
- Kumar, V.; Abbas, A.; Aster, J. (2015): Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Ninth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders.
- Lazarevic, V.; Glimcher, L. (2011): T-bet in disease. In: *Nature immunology* 12 (7), S. 597–606. DOI: 10.1038/ni.2059.
- Lazarevic, V.; Glimcher, L.; Lord, G. (2013): T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (11), S. 777–789. DOI: 10.1038/nri3536.
- Lee, J.; Kim, K.; Choe, S.; Hong, Y. (2016): Reduced immunoreactivities of B-type natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension rats after ranolazine treatment. In: *Anatomy & cell biology* 49 (1), S. 7–14. DOI: 10.5115/acb.2016.49.1.7.
- Li, R.; Aslan, A.; Yan, R.; Jongman, R.; Moser, J.; Zwiers, P. et al. (2015): Histone Deacetylase Inhibition and I κ B Kinase/Nuclear Factor- κ B Blockade Ameliorate Microvascular Proinflammatory Responses Associated With Hemorrhagic Shock/Resuscitation in Mice. In: *Critical care medicine* 43 (12), S. e567-80. DOI: 10.1097/CCM.0000000000001203.
- Lim, S. (2016): No-Reflow Phenomenon by Intracoronary Thrombus in Acute Myocardial Infarction. In: *Chonnam medical journal* 52 (1), S. 38–44. DOI: 10.4068/cmj.2016.52.1.38.
- Lippuner T (2004): Hämorrhagischer Schock Choc hémorragique. In: *Schweiz Med Forum* 2004;4:158–164 2004 (4), S. 158–164.

- Liu, S.; Cao, Y.; Zeng, Z. (2014): The ideal target blood pressure for resuscitation during uncontrolled haemorrhagic shock. In: *Injury* 45 (12), S. 2110–2111. DOI: 10.1016/j.injury.2014.04.023.
- Lodge, J. P.; Lam, F. T.; Perry, S. L.; Giles, G. R. (1990): Ranolazine--a new drug with beneficial effects on renal preservation. In: *Transplantation* 50 (5), S. 755–759.
- Lomas-Niera, J. L.; Perl, Mario; Chung, Chun-Shiang; Ayala, Alfred (2005): Shock and hemorrhage: an overview of animal models. In: *Shock (Augusta, Ga.)* 24 Suppl 1, S. 33–39.
- Maier, L. (2009): A novel mechanism for the treatment of angina, arrhythmias, and diastolic dysfunction: inhibition of late I(Na) using ranolazine. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 54 (4), S. 279–286. DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181a1b9e7.
- Mani, H.; Tanaka, H.; Adachi, T.; Ikegawa, M.; Dai, P.; Fujita, N.; Takamatsu, T. (2015): How Does the Ca(2+)-paradox Injury Induce Contracture in the Heart?-A Combined Study of the Intracellular Ca(2+) Dynamics and Cell Structures in Perfused Rat Hearts. In: *Acta histochemica et cytochemica* 48 (1), S. 1–8. DOI: 10.1267/ahc.14059.
- Meinert, T.; Schäffler, A. (2017): Pschyrembel klinisches Wörterbuch. 267., akt. Aufl. Berlin: De Gruyter.
- Millham, F. (2010): A brief history of shock. In: *Surgery* 148 (5), S. 1026–1037. DOI: 10.1016/j.surg.2010.02.014.
- Mourouzis, I.; Mantzouratou, P.; Galanopoulos, G.; Kostakou, E.; Dhalla, A.; Belardinelli, L.; Pantos, C. (2014): The beneficial effects of ranolazine on cardiac function after myocardial infarction are greater in diabetic than in nondiabetic rats. In: *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 19 (5), S. 457–469. DOI: 10.1177/1074248414524481.
- Nathan, C.; Cunningham-Bussel, A. (2013): Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. In: *Nature reviews. Immunology* 13 (5), S. 349–361. DOI: 10.1038/nri3423.
- Neri, M.; Riezzo, I.; Pascale, N.; Pomara, C.; Turillazzi, E. (2017): Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. In: *Mediators of inflammation* 2017, S. 7018393. DOI: 10.1155/2017/7018393.
- Niccoli, G.; Burzotta, F.; Galiuto, L.; Crea, F. (2009): Myocardial no-reflow in humans. In: *Journal of the American College of Cardiology* 54 (4), S. 281–292. DOI: 10.1016/j.jacc.2009.03.054.
- Noble, D.; Noble, P. J. (2006): Late sodium current in the pathophysiology of cardiovascular disease: consequences of sodium-calcium overload. In: *Heart (British Cardiac Society)* 92 Suppl 4, S. iv1-iv5. DOI: 10.1136/hrt.2005.078782.
- Peitzman, A.; Harbrecht, B.; Udekwu, A.; Billiar, T.; Kelly, E.; Simmons, R. (1995): Hemorrhagic shock. In: *Current Problems in Surgery* 32 (11), S. 925–1002. DOI: 10.1016/S0011-3840(05)80008-5.
- Peng, Y.; Liu, J.; Le S.; Tang, Y.; Gao, D.; Long, J.; Liu, J. (2016): Mitochondrial dysfunction precedes depression of AMPK/AKT signaling in insulin resistance induced by high glucose in primary cortical neurons. In: *Journal of neurochemistry* 137 (5), S. 701–713. DOI: 10.1111/jnc.13563.
- Percival, T. J.; Rasmussen, T. E. (2012): Reperfusion strategies in the management of extremity vascular injury with ischaemia. In: *The British journal of surgery* 99 Suppl 1, S. 66–74. DOI: 10.1002/bjs.7790.

- Pfeifer, R.; Lichte, P.; Schreiber, H.; Sellei, R.; Dienstknecht, T.; Sadeghi, C. et al. (2013): Models of hemorrhagic shock: differences in the physiological and inflammatory response. In: *Cytokine* 61 (2), S. 585–590. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.10.022.
- Piper, H.; Abdallah, Y.; Schäfer, C. (2004): The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. In: *Cardiovascular research* 61 (3), S. 365–371. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.12.012.
- Ponzoni, M.; Arrigoni, G.; Doglioni, C. (2007): New transcription factors in diagnostic hematopathology. In: *Advances in anatomic pathology* 14 (1), S. 25–35. DOI: 10.1097/PAP.0b013e31802f0495.
- Pryor, R.; Cabreiro, F. (2015): Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. In: *The Biochemical journal* 471 (3), S. 307–322. DOI: 10.1042/BJ20150497.
- Ramirez, M. (2013): Multiple organ dysfunction syndrome. In: *Current problems in pediatric and adolescent health care* 43 (10), S. 273–277. DOI: 10.1016/j.cppeds.2013.10.003.
- Reddy, B.; Weintraub, H.; Schwartzbard, A. (2010): Ranolazine: a new approach to treating an old problem. In: *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St. Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital* 37 (6), S. 641–647.
- Rena, G.; Pearson, E.; Sakamoto, K. (2013): Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? In: *Diabetologia* 56 (9), S. 1898–1906. DOI: 10.1007/s00125-013-2991-0.
- Requarth, J.; D'Agostino, R.; Miller, P. (2011): Nonoperative management of adult blunt splenic injury with and without splenic artery embolotherapy: a meta-analysis. In: *The Journal of trauma* 71 (4), S. 898-903; discussion 903. DOI: 10.1097/TA.0b013e318227ea50.
- Riksen, N.; Tack, C. (2014): The cardiovascular effects of metformin: lost in translation? In: *Current opinion in lipidology* 25 (6), S. 446–451. DOI: 10.1097/MOL.000000000000128.
- Rönn, T.; Lendemans, S.; Groot, H.; Petrat, F. (2011): A new model of severe hemorrhagic shock in rats. In: *Comparative medicine* 61 (5), S. 419–426.
- Russell, W.; Burch, R. L. (1959): The principles of humane experimental technique. Special ed. South Mimms, Potters Bar, Herts, England: Universities Federation for Animal Welfare.
- Sancho-del-Val, L.; Barrio-Andres, J.; Herranz-Bachiller, M.; Alcaide-Suarez, N. (2013): Hepatotoxicity and insomnia secondary to ranolazine. In: *Revista española de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Española de Patología Digestiva* 105 (5), S. 304–305.
- Seifert, J. (2007): Incidence and economic burden of injuries in the United States. In: *Journal of Epidemiology & Community Health* 61 (10), S. 926. DOI: 10.1136/jech.2007.059717.
- Senfleben, U.; Cao, Y.; Xiao, G.; Greten, F. R.; Krahn, G.; Bonizzi, G. et al. (2001): Activation by IKK α of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. In: *Science (New York, N. Y.)* 293 (5534), S. 1495–1499. DOI: 10.1126/science.1062677.
- Slavich, M.; Maranta, F.; Fumero, A.; Godino, C.; Giannini, F.; Oppizzi, M. et al. (2016): Long-Term Preservation of Left Ventricular Systolic Function in Patients With Refractory Angina Pectoris and Inducible Myocardial Ischemia on Optimal Medical Therapy. In: *The American journal of cardiology* 117 (10), S. 1558–1561. DOI: 10.1016/j.amjcard.2016.02.028.
- Spahn, D.; Bouillon, B.; Cerny, V.; Coats, T.; Duranteau, Jacques; Fernández-Mondéjar, Enrique et al. (2013): Management of bleeding and coagulopathy following major trauma:

- an updated European guideline. In: *Critical care (London, England)* 17 (2), S. R76. DOI: 10.1186/cc12685.
- Stone, P. (2008): Ranolazine: new paradigm for management of myocardial ischemia, myocardial dysfunction, and arrhythmias. In: *Cardiology clinics* 26 (4), S. 603–614. DOI: 10.1016/j.ccl.2008.06.002.
- Sutton, M. G.; Sharpe, N. (2000): Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. In: *Circulation* 101 (25), S. 2981–2988.
- Tak, P.; Firestein, G. (2001): NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. In: *J Clin Invest* 107 (1), S. 7–11. DOI: 10.1172/JCI11830.
- Tamura, K.; Sudo, T.; Senftleben, U.; Dadak, A. M.; Johnson, R.; Karin, M. (2000): Requirement for p38alpha in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. In: *Cell* 102 (2), S. 221–231.
- Tatarkova, Z.; Aplan, P.; Matejovicova, M.; Lehotsky, J.; Dobrota, D.; Flameng, W. (2005): Effect of ischemia and reperfusion on protein oxidation in isolated rabbit hearts. In: *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 54 (2), S. 185–191.
- Theusinger, O.; Madjdpour, C.; Spahn, D. (2012): Resuscitation and transfusion management in trauma patients: emerging concepts. In: *Current opinion in critical care* 18 (6), S. 661–670. DOI: 10.1097/MCC.0b013e328357b209.
- Thiel, M.; Czerner, S.; Prückner, S.; Kreimeier, U. (2006): Pathophysiologie des Schocks. In: *Notfall Rettungsmed* 9 (6), S. 509–515. DOI: 10.1007/s10049-006-0850-y.
- Thomas, I.; Gregg, B. (2017): Metformin; a review of its history and future: from lilac to longevity. In: *Pediatric diabetes* 18 (1), S. 10–16. DOI: 10.1111/pedi.12473.
- Varjabedian, L.; Bourji, M.; Pourafkari, L.; Nader, N. (2018): Cardioprotection by Metformin: Beneficial Effects Beyond Glucose Reduction. In: *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 18 (3), S. 181–193. DOI: 10.1007/s40256-018-0266-3.
- Wang, Z.; Liu, X.; Wang, M.; Jiang, G.; Qiu, T.; Chen, Z.; Wang, L. (2015): Metformin attenuated the inflammation after renal ischemia/reperfusion and suppressed apoptosis of renal tubular epithelial cell in rats. In: *Acta cirurgica brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia* 30 (9), S. 617–623. DOI: 10.1590/S0102-865020150090000006.
- Wei, X.; Zhu, A.; Zhang, Y.; Yao, S.; Mao, W. (2016): Pre- and Delayed Treatments With Ranolazine Ameliorate Ventricular Arrhythmias and Nav1.5 Downregulation in Ischemic/Reperfused Rat Hearts. In: *Journal of cardiovascular pharmacology* 68 (4), S. 269–279. DOI: 10.1097
- Weiss, G.; Lison, S.; Spannagl, M.; Heindl, B. (2010): Expressiveness of global coagulation parameters in dilutional coagulopathy. In: *British journal of anaesthesia* 105 (4), S. 429–436. DOI: 10.1093/bja/aeq199.
- Yang, C. (2018): Clinical manifestations and basic mechanisms of myocardial ischemia/reperfusion injury. In: *Ci ji yi xue za zhi = Tzu-chi medical journal* 30 (4), S. 209–215. DOI: 10.4103/tcmj.tcmj_33_18.
- Yao, X.; Ye, S.; Xiao, C.; Gu, J.; Di Yang; Wang, S. (2015): Metformin alleviates high glucose-mediated oxidative stress in rat glomerular mesangial cells by modulation of p38 mitogen-activated protein kinase expression in vitro. In: *Molecular medicine reports* 12 (1), S. 520–526. DOI: 10.3892/mmr.2015.3446.

Zacharowski, K.; Blackburn, B.; Thiemermann, C. (2001): Ranolazine, a partial fatty acid oxidation inhibitor, reduces myocardial infarct size and cardiac troponin T release in the rat. In: *European journal of pharmacology* 418 (1-2), S. 105–110.

9. Thesen

- 1) Das hämorrhagische Schockmodell mit Schocktiefe und -länge ist für die Erforschung der Wirkung eines Medikaments im hämorrhagischen Schock geeignet.
- 2) Die Gabe von Ranolazin im hämorrhagischen Schock führt zu einer signifikanten Überlebenszeitverlängerung und zu einer Stabilisierung des MABP und der Hämodynamik.
- 3) Die gewebeschädigende Wirkung des hämorrhagischen Schocks und die Leukozytenakkumulation in Herz, Leber, Lunge und Niere können durch die zusätzliche Gabe von Ranolazin abgeschwächt werden.
- 4) Ranolazin bewirkt auf der Ebene der Proteinexpression durch die Verdopplung des Transkriptionsfaktors T-bet und die Verringerung des Anstieges des I κ B α -Proteins primär im Herzen eine positive Beeinflussung von pro-inflammatorischen Faktoren.
- 5) Die Gabe von Metformin 24 Stunden vor dem hämorrhagischen Schock verdoppelt die mittlere Überlebenszeit.
- 6) Mit Metformin vorbehandelte Tiere weisen aufgrund einer geringeren Transkription von NF- κ B eine geringere Entzündungsreaktion mit besserer Hämodynamik auf.
- 7) Es konnte unter Metformin eine geringere Leukozytenakkumulation in Herz, Leber, Lunge und Niere und eine niedrigere Myeloperoxidaseaktivität in der Niere nachgewiesen werden.
- 8) Lichtmikroskopisch ist in den Organen Herz, Lunge, Leber und Niere eine verminderte Gewebeschädigung nach Metformin-Vorbehandlung sichtbar.
- 9) Die in der Studie gewonnenen Erkenntnisse über Metformin im hämorrhagischen Schock müssten in weiteren tierexperimentellen und später in klinischen Studien weiter untersucht werden.

Erklärung frühere Promotionsversuche

Ich versichere, dass von mir, Constantin Weil von der Ahe, keine früheren Promotionsversuche mit dieser oder einer anderen Dissertation erfolgt sind. Es wurde nur dieser Antrag auf Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht.

Halle/Saale, den

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Constantin Weil von der Ahe, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen Hilfsmittel als angegeben verwendet habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als solche kenntlich gemacht habe.

Halle/Saale, den

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen ausdrücken, ohne deren Hilfe diese Promotionsschrift nicht zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Sedding und Herrn Prof. Dr. med. Werder, da sie diese Promotion ermöglicht haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Buerke, meinem Doktorvater, für die Überlassung des Themas zur eigenständigen Bearbeitung, seine hilfreiche Unterstützung bei den Experimenten und seine Geduld bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Marsch und seinem Team bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Claassen gilt mein Dank für die Benutzung der Räumlichkeiten und Mikroskope zur Auswertung der histologischen Präparate.

Ein großes Dankeschön geht an Frau Schulz für ihre unermüdliche Hilfe und die vielen Ratschläge während der Laborarbeit.

Ein weiterer Dank gebührt dem Team des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung für die Unterstützung bei den Versuchen und die Bereitstellung der Versuchstiere.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern danken für ihre dauerhafte Unterstützung und Ermutigung und die Chancen, die Sie mir ermöglicht haben. Ohne sie wäre ich nicht bis zu diesem Punkt gekommen.