

Aus dem Institut für Pathophysiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. J. Holtz



Thema:

Untersuchung der kardioprotektiven Wirkung von Reduktionsmitteln
(Glutathion, Ascorbinsäure) an experimentell geschädigten Herzpräparaten

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frank Kalder

geb. am 10. September 1967 in Magdeburg

Gutachter:

1. Prof. Holtz
2. Prof. Werdan
3. Prof. Hasenfuß (Göttingen)

Eröffnungsdatum: 01.02.2000

Datum der Verteidigung: 29.10.2001

urn:nbn:de:gbv:3-000003280

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003280>]

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit basiert auf dem grundsätzlich vorhandenen Interesse an Möglichkeiten der Myokardprotektion nach vorhergehender Schädigung. Darauf beziehend werden hier zwei vermeintliche Protektoren, die Reduktionsmittel Glutathion und Ascorbinsäure, auf ihre Potenz zur Kardioprotektion überprüft. Die sogenannte "Scavenger"-Funktion beider Reduktionsmittel ist dabei als Wirkmechanismus von hauptsächlichem Interesse. Es werden einfache Modelle (Langendorff-Herz, Vorhof-Aurikel-Präparat) verwandt, in denen Glutathion und Ascorbinsäure mit unterschiedlichen Noxen in kombinierten Testreihen zur Reaktion gebracht werden. Neben den Untersuchungsergebnissen steht der vorgegebene methodische Ansatz dieser Arbeit als nicht optimal zur Diskussion.

Kalder, Frank: Untersuchung der kardioprotektiven Wirkung von Reduktionsmitteln (Glutathion, Ascorbinsäure) an experimentell geschädigten Herzpräparaten.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 68 Seiten, 1999

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	5
1.1. Allgemeines	5
1.2. Betrachtungen zur Radikaltheorie	6
2. Potentielle Wirkmechanismen der Reduktionsmittel.	9
2.1. Glutathion	9
2.2. Ascorbinsäure.	12
3. Potentielle Wirkmechanismen der Noxen	15
3.1. Ischämie	15
3.2. Verapamil	18
3.3. Pentobarbital	20
3.4. Tetrachlorkohlenstoff	21
3.5. Kaliumionen-Überschuß	22
3.6. Untersuchungsansatz	24
4. Erläuterung und Beschreibung der Methodik	27
4.1. Versuchsaufbau und -durchführung für das Aurikel-Vorhof-Präparat	27
4.2. Versuche am isoliert perfundierten Rattenherzen nach Langendorff	29
4.3. Statistische Auswertung	33

5.	Ergebnisse und graphische Auswertung	34
5.1.	Dosiswirkungskurven der Schutzsubstanzen	35
5.2.	Dosiswirkungskurven der Noxen in Kombination mit Protektion	40
5.2.1.	Schädigung durch Ischämie	40
5.2.2.	Schädigung durch Verapamil	42
5.2.3.	Schädigung durch Pentobarbital	47
5.2.4.	Schädigung durch Tetrachlorkohlenstoff	51
5.2.5.	Schädigung durch Kaliumionen-Überschuß	56
6.	Diskussion	59
7.	Zusammenfassung	62
8.	Literaturverzeichnis	64
9.	Thesen	69
10.	Tabellarischer Lebenslauf	72
11.	Selbständigkeitserklärung	73
12.	Erklärung über frühere Promtionsversuche	74
13.	Danksagung	75

1.Einführung

1.1. Allgemeines

Der Myokardinfarkt ist eine der Haupttodesursachen in den hochentwickelten Industrieländern unserer Zeit und beruht auf einem Verschuß der Koronararterien, woraus letztendlich der Untergang des Herzmuskels wegen des Defizits an notwendigen Sauerstoff resultiert. Die Restoration des myokardialen Blutflusses zum frühest möglichen Zeitpunkt nach Anfang einer Ischämie ist deshalb eine kausale dringliche Therapie und höchst bedeutungsvoll, um das Fortschreiten des myokardialen Zelltodes zu hemmen und um eine funktionelle Erholung des reversibel geschädigten Myokards zu gewährleisten (1). Dafür stehen chirurgische Verfahren (Bypass-Operation), Verfahren der interventionellen Kardiologie (Katheterdilatation u.a.) und thrombolytische Medikamente (z.B. Streptokinase) zur Verfügung (2). Trotz dieser Bemühungen eine Mangel durchblutung so schnell wie möglich zu therapieren, kommt es nach einer Ischämie fast ausnahmslos zu Funktionseinschränkungen des Myokards und zu myokardialen Gewebsschäden (3).

Selbst eine schnelle, vollständige Reperfusion nach einem koronaren Verschuß kann schwere Arrhythmien und andere Formen der Schädigung, sogenanntes "Stunning" oft nicht verhindern, was dann durch eine längere Periode der kontraktilen Dysfunktion deutlich wird.

Das Interesse an den Möglichkeiten zur Verbesserung der Erholung nach myokardialer Ischämie mit Hilfe von Antioxidantien ist in den letzten Jahren enorm gestiegen. Zur Durchführung solcher Untersuchungen und zum Studium der für die myokardialen Reperfusionsschäden verantwortlichen Mechanismen wurden als Testsysteme oft das isoliert perfundierte Rattenherz nach Langendorff und das Vorhof-Aurikel-Präparat genutzt.

Die Möglichkeit zur einfachen Kontrolle der myokardialen Funktion spricht für die isoliert perfundierten Herzmodelle als geeigneten Ansatz zur Bewertung direkter myokardialer Effekte von Medikamenten.

Außerdem können durch die Nutzung dieser mit Puffer-Lösungen perfundierten Präparate diverse Interaktionen zellulärer Blutelemente, Serumfaktoren und interferierender neurohumoraler Signale ausgeschlossen werden, die bei In-Vivo-Studien als zusätzliche Faktoren die Analyse direkter Effekte erschweren (4).

Kritisch sind bei diesen mit salinen Puffer-Lösungen perfundierten Modellen die Beobachtungen nach längerer Versuchsdauer wegen der begrenzten Stabilität der Präparate zu bewerten. Besonders dürfen dabei die Wirkungen des koronaren Innendruckes nicht unbewertet bleiben, da sie mit zunehmender Versuchsdauer zur Ödembildung und zu gestörter Organfunktion führen (4).

1.2. Betrachtungen zur Radikaltheorie

Bekannterweise werden im Ablauf des oxidativen Stoffwechsel von den Zellen potentiell toxische Radikalspezies produziert, für deren Entgiftung in der Regel spezifische und nichtspezifische Scavenger-Systeme in den Zellen vorhanden sind (4). Es ist wiederholt nachgewiesen worden, daß die nach einer Ischämie oder Hypoxie folgende Reperfusion die Produktion von derartigen sauerstoffspezifischen Radikalspezies weiter ansteigen läßt, wodurch das Ausmaß der ohnehin vorhandenen ischämischen Gewebsschäden zunimmt (1,4). Die freien Radikale schädigen dabei lebensfähige Gewebe durch die Peroxidation von Lipiden und durch die Oxidation von Protein-Sulphydrylgruppen, was zu Störungen der Membranpermeabilität und der Enzymfunktion führt (1).

Trotz vieler Studien über Ursprung und Schädigungsvermögen der verschiedenen Radikalspezies sind die exakten Reaktionsmechanismen und die konkrete Rolle der einzelnen aktiven Sauerstoffmetabolite in vielen Krankheiten noch immer nicht gänzlich klar (5). Bestimmte Sauerstoffmetaboliten, Hydroxylradikale sowie Komplexe von Sauerstoffradikalen und Eisenionen attackieren Proteine, DNS und Lipidmembranen, was dann zu einem Abfall der zellulären Aktivität und zu einer Verschlechterung der Funktion oder zum Zelluntergang führt (5). Solche Radikalspezies entstehen während des Anstiegs der Sauerstoffspannung innerhalb der Zellen über physiologische Normalwerte sowie bei Reoxigenierung nach Hypoxie. Sie führen dann unter anderem zur Lipidperoxidation von biologischen Membranen (5). Ungesättigte Fettsäuren sind Bestandteil der Zellmembranen und sehr empfänglich für die Lipidperoxidation. Die grundlegende Bedeutung der Lipidperoxidation wird durch die Tatsache illustriert, daß in vielen Fällen Krankheitsentstehung mit einer Anhäufung von Lipidperoxiden korreliert (5). Eine Anzahl antioxidativer Mechanismen verhindert die durch reaktive Sauerstoffprodukte verursachten Schäden, die während des oxidativen Stresses induziert werden. Die primären intrazellulären Abwehrmechanismen gegen diesen Typ der Schäden basieren auf Superoxid-Dismutase (SOD), Glutathion-Peroxidase, Katalase und Vitamin E, die in der Lipidmembran

lokalisiert sind (1). Dabei ergänzen sich die antioxidativen Aktivitäten dieser "Scavenger" oft untereinander. Aus reaktiven Superoxidanionen kann durch Katalysatorfunktion von SOD Wasserstoffperoxid und schließlich oxidiertes Glutathion gebildet werden (Abb.1).

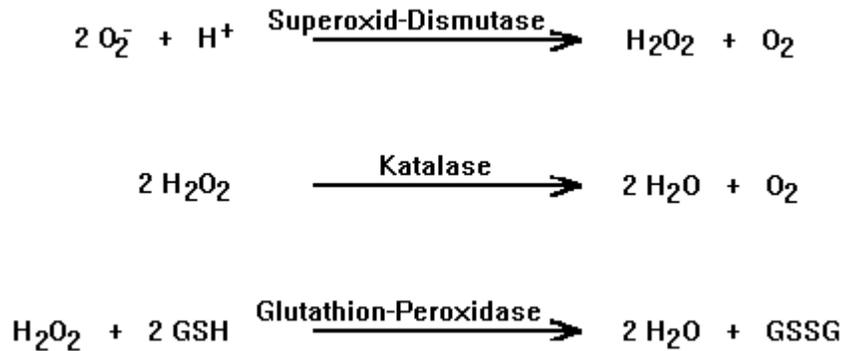


Abb.1: Endogene Enzyme als Katalysatoren bei antioxidativen Reaktionen

Die Spaltung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff wird katalysiert vom Enzym Katalase (Abb.1). Eine andere Reduktion von Wasserstoffperoxid oder Lipidperoxiden durch Glutathion-Peroxidase ist kombiniert mit der Oxidation von Glutathion, was dann schließlich zur Formation von Glutathion-Disulfid führt (Abb.1) (1). Die myokardialen Konzentrationen an freien Radikal-Scavengern wie Glutathion, Glutathion-Peroxidase und SOD können durch eine Hypoxie reduziert werden, wodurch die Anfälligkeit hypoxischer Zellen für Schäden durch freie Radikale während der Reoxygenation der Gewebe wächst (1).

Die Aktivitäten von SOD, Katalase und Glutathion-Peroxidase im Plasma dagegen sind sehr niedrig oder fehlen gänzlich (1).

Es ist weiterhin bekannt, daß die extrazelluläre Abwehr gegen freie Radikale durch Proteine, wie Ceruplasmin, Albumin und Haptoglobin, sowie durch zirkulierende Erythrozyten ergänzt wird (1). Erythrozyten sind effektive Hemmer von Schäden, die durch Wasserstoffperoxid verursacht werden, jedoch nicht für durch Superoxidanion initiierte Schäden (1). Die Reperfusion ischämischer, isolierter Rattenherzen mit Erythrozyten führt zu einem Ansteigen der ventrikulären Funktion und einem Abfall des myokardialen Wasserstoffperoxids (1). Verschiedene Ergebnisse zeigen, daß die Erythrozyten-Katalase endogen erzeugtes Wasserstoffperoxid und die damit verbundenen Gewebsschäden vermindern kann (1).

Ausgehend von diesen bekannten endogenen antioxidativen Mechanismen bestand die Aufgabenstellung meiner Arbeit, eine potentielle kardioprotektive Wirkung der exogen verabreichten Reduktionsmittel Glutathion und Ascorbinsäure an experimentell geschädigten Herzpräparaten in den verschiedenen Modellansätzen zu untersuchen.

2. Potentielle Wirkmechanismen der Reduktionsmittel

2.1. Glutathion

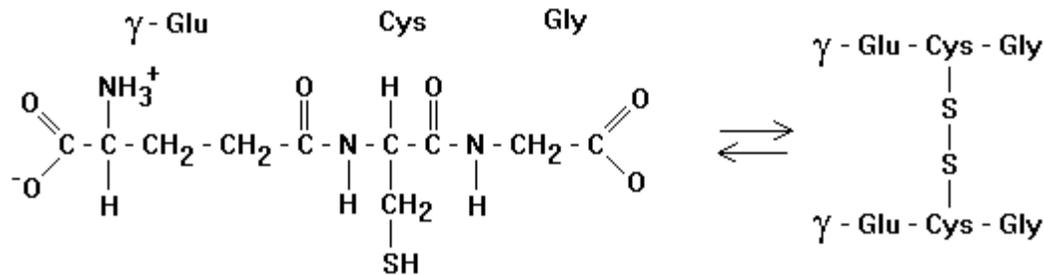


Abb. 2: Glutathion in reduzierter (GSH) und oxidierter Form (GSSG)

Glutathion ist ein Aminosäurederivat, das im Stoffwechsel der Zellen eine unterschiedlich wichtige Rolle spielt und in hoher Konzentration vorhanden ist (4,6,7). Glutathion ist in einem Redoxkreislauf eingebunden, in dem es in oxidierter Form (GSSG) und in reduzierter Form (GSH) auftritt (4,6). Oxidiertes Glutathion besteht aus zwei durch eine Disulfidverbindung miteinander verketteten Tripeptiden, währenddessen die reduzierte Thiolform ein einzelnes Tripeptid mit einer freien Sulfhydryl-Gruppe darstellt (6,7). In diesem Redoxsystem wird die Reduktion von GSSG zu GSH durch die Glutathion-Reduktase katalysiert. Hierbei ist das Gleichgewicht stark zugunsten des reduzierten Glutathion verschoben und NADPH als Cofaktor notwendig (4,6,8).

In den tierischen Zellen hat Glutathion zahlreiche Schlüsselpositionen bei biochemischen Prozessen inne, wobei die Wirkung als Antioxidans wahrscheinlich sehr wichtig ist (7). Weiterhin spielt es eine enorme Rolle im Metabolismus der Cystein-enthaltenden Proteine und ist beteiligt an der Deaktivierung toxischer, elektrophiler Agentien bei durch Schwefelverbindungen katalysierten Enzymtransporten (7).

Im Stoffwechsel übernimmt GSH die Aufgabe eines Sulfhydryl-Puffers, der unter anderem den Cysteinrest von Hämoglobin und andere Erythrozyten-Proteine in ihrer reduzierten Form erhalten soll (4,6). Untersuchungen ergaben, daß für die natürliche Struktur der Erythrozyten reduziertes

Glutathion unentbehrlich ist, da schon ein geringfügig kleinerer Spiegel an GSH eine höhere Affinität der Blutkörperchen zur Hämolyse als im Normalfall erkennen läßt (4,8).

Ebenfalls bedeutend ist der Glutathion-Redoxzyklus für den Erhalt der normalen mitochondrialen Funktion, wobei der GSH-Spiegel hier mit der Aktivität der Carnitin-Acylcarnitin-Translokase korreliert, die dadurch zu einem Indikator für die Glutathion-Präsenz in den Zellen wird (9).

Bei der im aeroben Leben unweigerlich auftretenden Produktion von Nebenprodukten, wie Hydrogen-Peroxiden und natürlichen Peroxiden besitzt Glutathion eine wichtige Entgiftungsfunktion (4,10,11). Hierbei ist Glutathion in ein spezifisches Scavenger-System der Zellen eingebunden, das den zahlreiche Veränderungen provozierenden Sauerstoffradikalen entgegenwirken soll (12). So werden beispielsweise Wasserstoffperoxid und Lipidperoxide im Glutathionzyklus in einer durch Glutathion-Peroxidase katalysierten Reaktion mit reduziertem Glutathion unter Bildung von Wasser und Sauerstoff metabolisiert, was in einer großen Anzahl von Zellen passiert (4,8). Das somit gebildete oxidierte Dimer von Glutathion (GSSG) wird dann nachfolgend im Redoxkreislauf wieder zu GSH reduziert (12). Die unterstützende Wirkung von reduziertem Glutathion und Glutathion-Peroxidase beim intrazellulären Schutz gegen Schädigung durch diese reaktiven Spezies konnte in zahlreichen Studien bestätigt werden (13).

Zu schweren pathophysiologischen Konsequenzen kann es kommen, wenn eine zu große Anzahl von Oxidantien die Kapazität des Glutathion-Metabolismus übertrifft, woraus dann oxidativer Streß resultiert (12). Die dabei nicht entgifteten Oxidantien können dann Strukturproteine, Enzyme, Membranlipide und Nukleinsäuren angreifen und somit entscheidend die Zellfunktion beeinträchtigen (12). Zu einer Behinderung der ATP-Synthese durch nicht entgiftete Peroxide kann es auf mitochondrialem oder glykolytischem Wege kommen (14). Eine intrazelluläre Anhäufung von GSSG, welches im Übermaß auch selbst Schaden (Reaktionen mit freien Sulfhydrylgruppen von Proteinen) anrichten kann, wird durch die Funktion ATP-abhängiger, Carrier-vermittelter Mechanismen stark vermindert (12).

Die hier im Vordergrund stehende Bedeutung des Glutathions als Protektor geht auf einen ausgebildeten Schutzmechanismus der Zelle zurück, der unter Zuwendung von Glutathion und anderen Reduktionsäquivalenten das Entstehen von Peroxidbildungen (an Fettsäureketten) verhindert (1,5). Ähnlich wie die Zellen anderer Organe sind natürlich auch die Myozyten mit einem solchen antioxidativen Enzymsystem ausgerüstet, welches außer dem Glutathion-

Redoxsystem noch Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase enthält, um sich vor Schädigungen durch reaktive Verbindungen zu schützen (15). Allein die Fähigkeit von Glutathion als Elektronendonator Wasserstoffatome von seiner Thiol-Gruppe zu spenden, um damit meistens kohlenstoff-, sauerstoff- oder nitratbeladene Radikale zu binden und damit zu deaktivieren, macht die Wirksamkeit als Antioxidans aus (16).

Da sich Glutathion auch im Herzen als wichtige antioxidative Substanz und damit als Protektor erwiesen hat, gibt es zu dem Problem der möglichen therapeutischen Nutzbarkeit von exogener Glutathion-Zufuhr bei Herzinfarkt umfangreiche wissenschaftliche Untersuchungen.

Es ist bekannt, daß es durch Ischämie und Reperfusion zu einer Erschöpfung des natürlichen Glutathion-Gehaltes der Zellen kommt (17,18). Ein Mitarbeiterteam um FERRARI konnte zeigen, daß sich die Erschöpfung des myokardialen Glutathions bzw. anderer Antioxidantien in der Ischämieperiode nachteilig auf den Selbstschutz des Myokards gegen reaktive Sauerstoffmetaboliten in der nachfolgenden Reperfusion auswirkt und einen großen Anteil am Ausmaß der myokardialen Reperfusionsschäden hat (8,17). Der Glutathion-Verlust in den Zellen kommt wahrscheinlich während der Ischämie durch ein starkes Anwachsen der Glutathion-verbrauchenden Reaktionen, aber auch durch eine zu geringe Regenerationsrate im Glutathion-Zyklus zustande (18).

Bedingt durch diese intrazelluläre Glutathion-Erschöpfung ist insbesondere im Endothel eine Steigerung der Zell-Lyse zu verzeichnen, welche nach HARLAN *et al.* auf Hydroperoxide und aktivierte Leukozyten zurückzuführen ist (19). Die Schädigung der Endothelzellen durch Superoxid-Radikale bzw. durch Peroxid-erzeugende Systeme äußert sich durch eine Bildung von Blasen und durch eine Vakuolisierung in den Zellen. Die endothelialen Schäden werden im Glutathion-erschöpften Herzen nach Ischämie und Reperfusion besonders durch Anstieg des koronaren Widerstandes deutlich, was letztendlich zu einer Versteifung der Kammermuskulatur ("Stunning") und damit zur Leistungseinbuße führt (4).

SINGH *et al.* (1989) untersuchten die Zweckmäßigkeit einer externen Glutathion-Zufuhr. Hier wurde zuerst an vorbehandelten Versuchstieren ("Yorkshire pigs") das myokardiale Glutathion durch einen potenten Glutathion-Synthesehemmer erschöpft, um dann im Vergleich mit unbehandelten Tieren das Ausmaß der Schädigungen nach oxidativen Streß feststellen zu können (8). Durch eine intravenöse Glutathion-Administration konnte hier ein positiver Effekt erzielt werden, da mit dieser externen Glutathion-Zufuhr der myokardiale Glutathion-Gehalt während

der Ischämie anstieg und die reperfusionsbedingten Schäden bzw. das myokardiale Infarktausmaß reduziert werden konnten (8).

Verschiedene andere Arbeiten an isoliert-perfundierten Herzmodellen haben ebenfalls gezeigt, daß eine Anreicherung des Perfusats mit GSH eine deutlich bessere Erholung der Ventrikelfunktion nach Ischämie und Reperfusion mit sich bringt (4,13,20). Eine verbesserte Funktion beruht jedoch weniger auf einem Ansteigen des intrazellulären GSH-Spiegel (GSH kann nicht effektiv in die Zellen transportiert werden) als vielmehr auf noch unergründeten Effekten des extrazellulären Glutathions (13,21). WEINBERG *et al.* (1987) schlußfolgerten nach Versuchen an einem Modell hypoxisch geschädigter renaler Tubuli, daß der cytoprotektive Effekt des exogenen Glutathion wahrscheinlich auf Glycin zurückzuführen ist, welches durch Abbau aus GSH entsteht (22).

Auch SHUG *et al.* verweisen auf Glycin, welches sich im Glutathion-erschöpften Herzen vermutlich nach Abbau reduzierter Myozyten bildet (4). Glycin ist nicht unbedeutend an der Detoxifikation von Acyl-CoA beteiligt, einem amphipathischen Molekül mit grenzflächenaktiven Eigenschaften, das sich besonders während myokardialer Ischämie anhäuft (4).

2.2. Ascorbinsäure

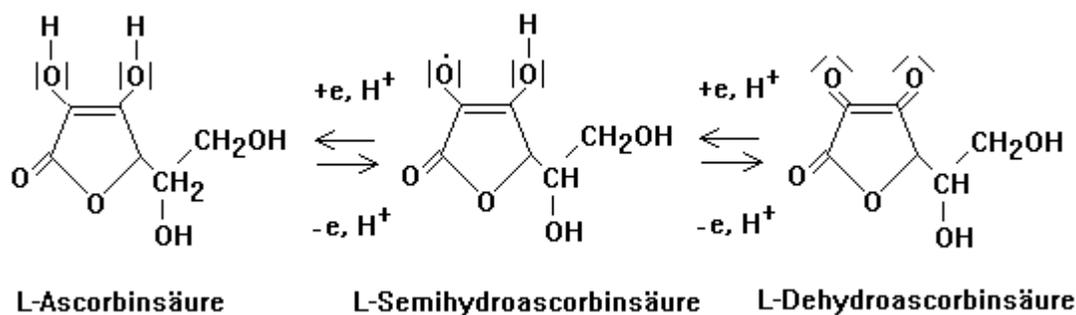


Abb. 3: Ascorbinsäure als Protonen-Donator und -Akzeptor

Strukturell ist Ascorbinsäure ein mit Glucose und anderen Hexosen verwandtes sechsgliedriges Kohlenstoff-Ketolacton und wasserlösliches Vitamin. Im Körper wird es reversibel zu Dehydroascorbinsäure oxidiert, wirkt also im Rahmen eines Redoxgleichgewichts als

Elektronendonator und Elektronenakzeptor, worauf auch die biologische Hauptwirkung beruht. Die bedeutungsvollen Redoxvorgänge laufen zwischen L-Ascorbinsäure (wirkt als 1-Elektronendonator) und der radikalischen L-Semihydroascorbinsäure ab (23,24,25,26). Neben zahlreichen anderen Aufgaben, die Ascorbinsäure im Stoffwechsel zu bewältigen hat, steht für uns hier die Bedeutung als endogener "Scavenger" im Vordergrund (5). Diese Funktion als Radikalfänger geht von spezifischen Scavengersystemen aus, mit denen die Zellen ausgestattet sind, um sich vor Sauerstoffradikalen und anderen toxischen Sauerstoffmetaboliten zu schützen, die ganz eindeutig zu reversiblen und irreversiblen Gewebsschäden, unter anderem auch am Myokard führen können (12). Die freien Radikale kennen hierbei verschiedene Schädigungsmuster, wobei die Peroxidation von Membranphospholipiden und die Oxidation von Sulfhydrylverbindungen sicherlich am bedeutungsvollsten sind (5). Während es im Rahmen der Phospholipidperoxidation zur Entstehung von verschiedenen Radikalspezies, wie Lipidradikale, Lipidalkoxyradikale, Lipidperoxide und Lipidhydroperoxide kommt, werden bei der Oxidation von Sulfhydrylverbindungen essentielle Membrantransportproteine und Enzyme inaktiviert, was wiederum zur Anhäufung bestimmter Elektrolyte und damit zur Zellschädigung führt (5). Mit Hilfe der Antioxidantien, die in den endogenen Schutzsystemen eingebunden sind (neben Ascorbinsäure auch Vitamin E und alpha-Tocopherol), versuchen die Zellen die durch eine explosions-artige Radikalproduktion ausgelösten und fortlaufenden Kettenreaktionen einzudämmen bzw. zu beenden (5).

Obwohl Ascorbinsäure zu den am stärksten reduzierenden Agentien im biologischen Milieu gehört, kann sie speziell bei Anwesenheit von Metallionen selbst aktive Sauerstoffspezies erzeugen und ist somit auch als Prooxidans aktiv (23,27). Im Zusammenhang mit vorhandenen Metallionen wird ebenfalls die Autooxidation von Ascorbinsäure stimuliert. Die Zytotoxizität des Vitamins ist sauerstoffabhängig und korreliert gleichsinnig mit seiner Autooxidation (23).

Bisherige Versuche Ascorbinsäurederivate mit einer verbesserten autooxidativen Resistenz zu synthetisieren, konnten nur mit unbefriedigenden Ergebnissen beendet werden (23).

In den letzten Jahren gab es viele Untersuchungen über die genauen Wirkmechanismen sowie über die therapeutische Nutzbarkeit von Ascorbinsäure als "Scavenger" und damit als Schutzfaktor der Zellen vor oxidativen Streß.

Unter anderem versuchten japanische Wissenschaftler bekannte Antioxidantien (darunter auch Ascorbinsäure) strukturell zu verändern, um vorhandene Scavengerwirkungen weiter zu

verbessern (24). Auf der Basis vorhergegangener Versuche von KATO *et al.* (26) erkannte man vor einiger Zeit, daß infolge struktureller Modifikation der Ascorbinsäure durch Substitution der 3-Hydroxylgruppe mit lipophilen Teilen neue Verbindungen geschaffen werden können, die sich durch eine starke Radikalketten-unterbrechende Aktivität sowie Affinität für Biomembranen auszeichnen (24). Somit können also auch lipophile Ascorbinsäurederivate protektiv gegen Reperfusionsschäden eingesetzt werden (24). Besonders beteiligt an der Entwicklung der eben benannten Verbindungen haben sich NIHRO *et al.* (23,24,26). Die von ihnen synthetisierten verschiedenen 3-O-Alkylascorbinsäuren wurden eingehend auf Beziehungen zwischen Struktur und antioxidativer Aktivität, auf die Elektronen-donierende Potenz sowie auf Effekte gegenüber der Lipidperoxidation und auf autooxidative Stabilität untersucht (23).

Es gab auch Untersuchungen, ob und wie bei experimentell definierten Versuchsbedingungen initiierte Gewebsschäden optimal gehemmt bzw. vermindert werden können. DOPPELFELD und PARNHAM untersuchten zu dieser Thematik in einer Studie von 1992 Ascorbinsäureeffekte an isoliert perfundierten Herzmodellen (3). Bei diesen Versuchen zeigte es sich unter anderem, daß die hemmenden Effekte von lipophoben Antioxidantien auf reperfusionsbedingte Gewebsschäden nach längeren Ischämieperioden (Perfusion und Reperfusion unter konstanten Druckbedingungen) sehr viel ausgeprägter sind, als bei kurzdauernden ischämischen Zuständen (3). Unter konstanten Flußbedingungen jedoch, hier wurde die Ischämie durch elektrische Tachystimulation erzeugt, scheint der Einsatz von Ascorbinsäure zur verbesserten Erholung der Kontraktilität während der Reperfusion noch effektiver.

Im Gegensatz zu den positiven Effekten kann Ascorbinsäure unter konstanten Druckbedingungen auch pathologische hämodynamischen Veränderungen hervorrufen, wie Kontraktilitätsverlust oder eine ausbleibende Verbesserung von Frequenz und koronarem Fluß nach der Reperfusion. Die Negativeffekte von Ascorbinsäure sind noch ungeklärt, wobei nicht übersehen werden darf, daß dieses Vitamin wie schon erwähnt als Redoxagens in der Lage ist, sowohl vor Radikalen zu schützen als auch selbst welche zu erzeugen (3).

3. Potentielle Wirkmechanismen der Noxen

3.1. Ischämie

Allgemein versteht man unter einer Ischämie eine lokal existierende Blutleere bei relativer oder totaler Unterbrechung der arteriellen Durchblutung (28,29,30). Die ischämische Herzkrankheit bzw. die myokardiale Ischämie, die in dieser Arbeit im Vordergrund steht, ist in den industriell hochentwickelten Ländern die am häufigsten verbreitete Erkrankung der Gegenwart. Die klassische Ischämietheorie nimmt bei der Entstehung derselben hauptsächlich ein durch hämodynamische Ursachen hervorgerufenen Mißverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffverbrauch an (28,29,30). Die Koronargefäße werden dabei als maximal weitgestellt angesehen, wobei man Veränderungen der Myokarddurchblutung einer extravaskulären Kompression zuschreibt (30). Neuere Auffassungen betrachten die aktive Koronarvasomotion für die Auslösung einer Myokardischämie (im Unterschied zur traditionellen Vorstellung) als wesentlich mitverantwortlich (30). Die gesunde Koronarzirkulation zeichnet sich durch eine ausgezeichnete Anpassungsfähigkeit an die ständig wechselnde Leistung des Herzens aus. Bei Durchblutungsstörungen kann selbst bei einer geringen Restdurchblutung in einem bestimmten Zeitintervall die Myokardfunktion aufrechterhalten werden, ohne das dabei irreversible Schäden entstehen (30,31,32). Kommt es dann doch bei länger bestehender Mangeldurchblutung zu Störungen oder Schäden der Funktion, können sehr vielfältige funktionelle und organische Faktoren dabei eine Rolle spielen.

So zum Beispiel sind Lage der Stenose, Vollständigkeit der Occlusion, Reversibilität der eingetretenen Dysfunktionen, sowie Art, Stärke und Zeitdauer der Schädigungen wichtige Kriterien zur Beurteilung der Ischämie und deren Folgezustände.

Im Gegensatz zu einer schweren Ischämie (länger als 20 min), bei der es zu einem Myokardinfarkt und zum irreversiblen Verlust der kontraktilen Funktion kommt, kann das Myokard bei leichteren Ischämieformen vital bleiben, zunächst mit einer chronisch reduzierten kontraktilen Funktion, die sich nach Reperfusion aber wieder normalisiert (30, 33). Dieser Zustand wird als "hibernating" Myokard bezeichnet (30,34). Hierbei wird das Myokard, das bei leichteren Ischämieformen seinen Energiebedarf über eine gewisse Zeit dem verminderten Angebot anpaßt, analog mit einem im Winterschlaf befindlichen Tier verglichen, das ohne

Nahrungszufuhr und mit reduzierten Energiebedarf den Winter überlebt (Hibernation = Winterschlaf) (30).

Durch Reperfusion kann es zur vollständigen Erholung der kontraktilen Funktion eines reversiblen geschädigten Myokards kommen, wozu jedoch eine gewisse Zeit erforderlich ist (30,35). Diese, eine entsprechende Zeitspanne dauernde, postischämische Dysfunktion wird als myokardiales "Stunning" (=Betäubung) definiert (30,36,37). Ein weiterer Aspekt, der aus den neueren Ischämietheorien hervorgeht, ist "Ischemic Preconditioning". Hierbei kommt es durch vorangehende, kurzdauernde ischämische Sensationen nicht zu einer Summierung und damit zur Entstehung eines ausgeprägten irreversiblen Schadens, sondern vielmehr wird das Myokard indirekt durch eine gewisse Anpassung und Gewöhnung vor den Folgen einer längerdauernden Ischämie geschützt (38). Der protektive Effekt von "Ischemic Preconditioning" beschränkt sich dabei nicht nur auf eine Verringerung der Infarktgröße, sondern vermindert auch Entstehung und Ausmaß ischämisch bedingter Arrhythmien, sowie die Schädigung der autonomen Herznervation (39). Die verantwortlichen Mechanismen, die die rasche Reduktion der kontraktilen Funktion in der Phase der akuten Myokardischämie verursachen, sind noch weitgehend unbekannt (30). Es gibt verschiedene Theorien über die Möglichkeiten der Schädigung, wobei sich diese Mechanismen, die dem myokardialen "Stunning" zugrunde liegen, keineswegs gegenseitig ausschließen müssen, sondern vielmehr in einem komplexen Schädigungsmodus eingebunden sind, der folgendermaßen gegliedert sein könnte (30):

1. Schädigung von Membranen und Enzymen durch freie Radikale (30,40)
2. Dysfunktionen des sarkoplasmatischen Retikulums (30)
3. Abnahme der Kalzium-Sensivität der Myofibrillen (30).

Für die Pathogenese des "Stunning" kommt zweifellos den freien Radikalen die größte Bedeutung zu, wobei die kausale Beteiligung der Radikale bei der Ausbildung desselben im Vordergrund steht (30,41). Zu Beginn der Reperfusion ist immer ein rapider und drastischer Anstieg der Radikalbildung zu verzeichnen, der dann nach längerer Zeit aber wieder abklingt. Währenddessen kommt es im Verlauf der Ischämie nur zu einer geringen Radikalausüttung (30,42). Verschiedene Untersuchungen belegen, daß eine schnellere Erholung der kontraktilen Funktion und eine Abschwächung des "Stunning" durch eine gehemmte Radikalbildung (30) und

einem beschleunigten Radikalabbau, z.B. mit Hilfe niedermolekularer Antioxidantien (30,42) oder durch enzymatischen Abbau (30,43) zu beobachten ist.

Zahlreiche Details bezüglich der Radikaltheorie sind noch ungeklärt, so zum Beispiel Art und Weise sowie Ort der freien Radikalbildung. Die Auswahl der Zellen, Organellen und Enzyme, die wahrscheinlich an der Radikalerzeugung beteiligt sind, ist unklar. Eine wesentliche Rolle dabei spielen Leukozyten (insbesondere neutrophile Granulozyten), Xanthinoxidase, Cyclooxygenase und Lipooxygenase, sowie die Autooxidation von Katecholaminen, Mitochondrien und sarkoplasmatisches Retikulum (1). Ebenfalls diskutiert werden die Fragen, welche Radikale spezifisch pathogenetisch wirksam sind, wie z. B.

Superoxidradikal, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal und welche zellulären Strukturen für das kontraktile Versagen nach Radikalschädigung verantwortlich sind (Denaturierung von Enzymen und Myofibrillen, Lipidperoxidation von Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums oder der Mitochondrien) (30,40,41).

Die einzige Ursache für die komplexen Zellschädigungen sind die freien Radikale wahrscheinlich nicht, denn auch eine frühzeitige antioxidative Therapie kann das myokardiale "Stunning" nicht vollständig verhindern. Es bleibt also auch die Frage, zu welchem Prozentsatz die Radikale an der Ausbildung des "stunned"- wie auch des "hibernating" Myokard beteiligt sind (30).

Entgegengesetzt hierzu kann man eine Schlüsselfunktion der Radikale für die Entstehung des "Ischemic Preconditioning" ausschließen, denn weder eine freie Radikalbildung noch ein hoher Schutz vor Radikalen durch die Anregung antioxidativer Mechanismen können "Ischemic Preconditioning" beeinflussen (44).

Zur Zeit sind die dem "hibernating und stunned" Myokard zugrunde liegenden Mechanismen bzw. deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei der Ausbildung der kontraktilen Dysfunktion noch unerklärt (45).

3.2. Verapamil

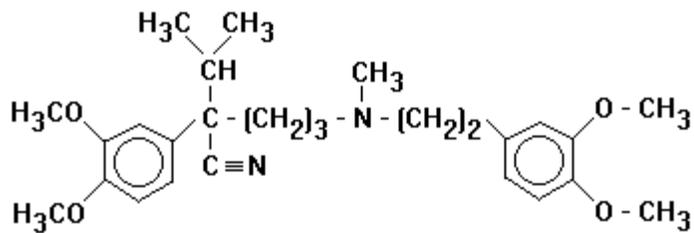


Abb.4: Verapamil - kationisch amphiphile Substanz

Verapamil ist eine antiarrhythmische Substanz kationisch, amphiphiler Natur, die zur Gruppe der Phenylalkylanine gehört und spezifisch kalziumantagonistisch wirksam ist (46). Allgemein wird durch Kalziumantagonismus der Einstrom extrazellulärer Kalziumionen durch die Zellmembran blockiert und damit eine daraus resultierende Aktivierung von glatter Muskulatur und Myokard verhindert (46,47,48,49). Diese pharmakologische Grundwirkung hat auch Verapamil inne, wobei durch Blockade des Kalziumeinstroms jene Parameter verändert werden, die ihre Funktion im Erregungsleitungssystem auf der Basis fortgeleiteter Potentiale ausüben (46,48). Der Mechanismus der erschwerten Erregung beruht auf der membranstabilisierenden Wirkung dieser Substanz, die mit einer Verringerung der Ionenpermeabilität einhergeht (48). In seiner Wirkung ist Verapamil von der elektrischen Tätigkeit der Zellen abhängig. Entweder penetriert es im ungeladenen Zustand Biomembranen oder es lagert sich in geladener Form in erhöhtem Maße an der Wasser-Lipid-Interphase von Zellmembranen an. Hierauf beruht auch die membranstabilisierende Wirkung, wobei diese Aussage und der daraus resultierende pharmkologische Effekt noch diskutiert wird (46,48). Die spezifische Wirkung von Verapamil basiert vor allem auf der Verminderung der Depolarisationsgeschwindigkeit, der Verlängerung der Erregungszeit und der Unterdrückung von spätauftretenden, pathologisch bedingten Nachpotentialen, welche durch Digitalis oder Katecholamine auslösbar sind (50). Daraus wiederum ergeben sich die antiarrhythmischen Mechanismen von Verapamil. Einmal kommt es zu einem gewissen Schutz des Kammer-Erregungsleitungssystems gegen starke atriale Reizfrequenzen durch eine Verlängerung der Erregungszeit der Zellen des AV-Knotens. Zum anderen werden durch Blockade des Einstroms von Kalzium langsamer fortgeleitete Potentiale

unterdrückt und kreisende Erregungen "reentry-Arrhythmien" auf Grund einer augenblicklichen Reizelemination verhindert (47,51,52). Neben den antiarrhythmischen Effekten hat Verapamil auch eine hypotensive Wirkung, primär hervorgerufen durch eine Erschlaffung der glatten Gefäßmuskulatur des arteriellen Stromgebietes, insbesondere der Koronararterien (48). Dabei sinkt der periphere Gefäßwiderstand ab, wodurch jedoch das venöse System nicht oder nur minimal tangiert wird (53).

In verschiedenen Studien letzterer Zeit wird häufig über protektive Effekte von Kalziumantagonisten im ischämischen Myokard berichtet, wobei es auch hier zahlreiche kontroverse Untersuchungsdaten gibt. Die Australierin NAYLER, die mehrere Arbeiten zu dieser Thematik veröffentlicht hat (verwendete Tierspezies überwiegend Sprague-Dawley-Ratten), gibt sehr wohl eine Schutzfunktion der Kalziumantagonisten vor Ischämie-Reperfusion-induzierten Schäden an, solange durch die prophylaktische Therapie mit Kalziumantagonisten ausreichende Plasmaspiegel erreicht werden. Außerdem soll die Entstehung atherogener Plaques behindert werden durch einen allgemeinen Schutz der vaskulären Endothelzellen insbesondere auch vor der Lipidperoxidation, wobei die Entstehung freier Radikale durch Verapamil effektiv gestört wird (54,55).

DIKSHIT und VAN OOSTEN (1992) stellen dagegen bei Untersuchungen an Kaninchen fest, daß ihre experimentellen Ergebnisse bezüglich der Protektivität von Kalziumantagonisten nicht unbedingt mit den in der Literatur verfügbaren Berichten übereinstimmen. Sie konnten bei Anwendung von Verapamil in mikromolaren Konzentrationen in vitro keine Effekte auf die verschiedenen repräsentativen Marker während einer Ischämie bzw. Reperfusion, wie zum Beispiel LDH, MPO, SOD und Katalaseaktivität feststellen. Lediglich bei sehr hohen Konzentrationen wurde eine Hemmung von MPO- und Katalaseaktivität beobachtet (54).

Der protektive Effekt von Kalziumantagonisten bei Ischämie-Reperfusion-induzierten Schäden ist komplexer Natur und beruht wahrscheinlich auf einem Energie-Spar-Effekt mit langsamen Verlust der Adenosin-Vorläufer, einem langsamen Anstieg der zytosolischen Kalziumionen-Konzentration und einem zeitweise langsamen Verlust von endogenen Noradrenalin (55). Mit dieser Schutzwirkung verbunden ist eine Minderung der kardialen Kontraktionskraft, die bei Überdosierung zu Herzversagen führen kann. Diese negativ inotrope Wirkung des Verapamil wurde in meinen Untersuchungen als "Kardionoxe" eingesetzt.

3.3. Pentobarbital

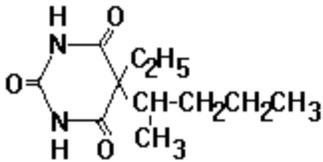


Abb.5: Pentobarbital

Pentobarbital ist lipophil und als freie Säure in Wasser sehr schwer löslich. Als ein Abkömmling der Barbitursäure hat es verschiedene, vor allem sedierende, hypnotische und antiepileptische Wirkeigenschaften (56,57,58,59). Die Hauptwirkung ist eine unspezifische Hemmung (zentrale Dämpfung) des ZNS, wobei die verschiedenen Derivate der Barbitursäure unter therapeutischen Aspekten gesehen, alle gleichartig wirken und sich nur in der Quantität unterscheiden (56).

Bei In-Vivo-Betrachtungen der kardiovaskulären Mechanismen von Pentobarbital ist nach oraler Applikation lediglich ein hypotonischer Effekt zu verzeichnen. Nach intravenöser Injektion kann jedoch eine Abnahme des Schlagvolumens und des Herzzeitvolumens beobachtet werden (59,60). Interessant ist die Erkenntnis, daß Pentobarbitalbehandlung nach globaler und fokaler Ischämie die Infarktausdehnung geringer halten kann (61). Möglicherweise beruht dieser Effekt auf eine durch Pentobarbital verhinderte Anhäufung freier Fettsäuren (62).

Die dem Wirkprinzip von Pentobarbital zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht völlig aufgedeckt. So gibt es einige Theorien bzw. einzelne Befunde über Permeabilitätsveränderungen der Plasma- und Zytomembranen von Hirnzellen (56). Man geht davon aus, daß die Verstärkung der inhibitorischen Effekte von GABA-_A im ZNS, die beeinflussbar von Chloridionen über eine Bindung der Barbiturate an sogenannte Barbiturat-Rezeptoren (GABA-_A-Neurone) erfolgt, eine große Rolle spielt (56,58).

Obwohl zur toxikologischen Komponente von Pentobarbital nur spärliche Erkenntnisse vorliegen, kann man davon ausgehen, daß bei Überschreiten der Plasmakonzentrationen von 10 µg/ml Symptome einer Intoxikation auftreten können (57). Spezielle Untersuchungen in letzterer Zeit haben hinreichend darauf hingewiesen, daß die Anwendung von Pentobarbital einzuschränken ist, da die Risiken möglicher Intoxikationen und schwererer Nebenwirkungen den

eventuellen Nutzen bei länger dauernder Anwendung deutlich übersteigen, was sich aus der Analyse der pharmakokinetischen Daten ergibt (BAYLIFF *et al.*, 1985) (57,63).

Noch bis zuletzt wurde Pentobarbital auch für Untersuchungen am Langendorff-System zur vorbereitenden Anästhesie der Versuchstiere genutzt, wobei Pentobarbital bescheinigt wurde, daß unerwünschte Effekte am isoliert perfundierten Herzen durch den schnellen Ausspüleffekt nach erfolgter Präparation verschwindend gering sind (64). In den Untersuchungen von OGUCHI *et al.* (1992) wird dazu jedoch festgestellt, daß eine Pentobarbitalanästhesie sowohl die präischämischen Bedingungen als auch die Erholungsphasen in der Reperfusion an isoliert perfundierten Herzpräparaten ungünstig beeinflußt, worauf auch schon von SEGAL *et al.* (1990) hingewiesen wurde (64,65). Die negativ inotrope Wirkung des Pentobarbital wurde in meinen Untersuchungen als "Kardionoxe" eingesetzt.

3.4. Tetrachlorkohlenstoff

Tetrachlorkohlenstoff gehört zu den halogenierten aliphatischen Kohlenwasserstoffen und stellt sich als farblose, nicht brennbare, süßlich riechende Flüssigkeit dar, die schlecht wasserlöslich und im Grunde nur gering reaktionsfähig ist. Durch den teilweise unterschiedlichen Abbau im Organismus werden die aliphatischen Kohlenwasserstoffe in verschiedene Gruppen unterteilt, wobei die Substanz CCl₄ zu den hoch toxischen Stoffen zählt (66). Auftretende Komplikationen nach einer Intoxikation beruhen fast immer auf Schädigung der Leber und Nieren, aber auch am Herzen kann es zu degenerativen Veränderungen kommen (67,68). Über die Giftigkeit der Verbindung entscheidet die oxidative Dehalogenierung von Chlor- und Bromverbindungen im Organismus, was immer mit der Entstehung reaktiver Metabolite verbunden ist (66). Die metabolische Umwandlung von CCl₄ ist bestimmt durch die Bildung freier Radikale, wie Trichloromethyl und Trichloromethylperoxid (69). Die Intoxikation kommt durch die Reaktion der freien Radikale mit Lipiden, Proteinen und Phospholipiden zustande, die sich miteinander konvalent binden (68). Normalerweise wird das Auftreten von Peroxidbildungen an Fettsäureketten durch einen zellulären Schutzmechanismus verhindert, an dem verschiedene Reduktionsäquivalente, wie zum Beispiel Glutathion, beteiligt sind (1,5). Dieser gut ausgebildete Schutzmechanismus wird jedoch durch das Auftreten freier Radikale aus chlorierten Kohlenwasserstoffen außer Kraft gesetzt.

Inwiefern nun die einzelnen Gewebsbestandteile bei den unterschiedlichen Interaktionen bis hin zur Schädigung eine Rolle spielen, ist noch umstritten (68,70). RECKNAGEL und GLENDE (1973) gehen davon aus, daß die freien Radikale im endoplasmatischen Retikulum eine Fettperoxidation provozieren, die dann als fortlaufende Kettenreaktion zerstörend auf die Struktur und Funktion der Membranen wirkt, wobei augenscheinlich das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien besonders betroffen sind (68,70). Bedingt durch diese Membranschädigungen werden Enzyme aus Zellen und Organellen freigesetzt und gelangen ins Blut. Zusätzlich kann es zu Störungen des Elektrolytgefälles an den Grenzbereichen sowie zur Anhäufung von Triglyceriden auf Grund gestörter Transportmechanismen kommen (68,71). Die Radikalbildung durch Tetrachlorkohlenstoff wurde hier als "Kardionoxe" eingesetzt.

3.5. Kaliumionen-Überschuß

Kaliumionen haben vorrangige Bedeutung bei der Entstehung von Potentialen an erregbaren Zellen, da sie im Ruhezustand biologische Membranen in beiden Richtungen passieren können (72). Das Kaliumpotential, welches also durch die Verteilung der Kaliumionen um die Membranen und deren Kaliumleitfähigkeit eingestellt wird, kann als Ruhemembranpotential oder auch als Ruhepotential aller erregbaren Zellen gesehen werden (72,73). Die durchschnittliche Kaliumkonzentration im Plasma und Serum liegt zwischen 3,5-4,5 mmol/l, wobei Werte größer als 5,5 mmol/l als hyperkaliämisch bezeichnet werden. Im weiteren sollen hauptsächlich die Ursachen und Auswirkungen einer erhöhten Kaliumzufuhr auf den Organismus, insbesondere auf die Herzfunktion betrachtet werden.

Es ist bekannt, daß Veränderungen im myokardialen Blutfluß, wie sie beispielsweise während myokardialer Ischämie und Reperfusion vorkommen, stets mit Veränderungen der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration korrelieren (74,75). Im Verlauf einer akuten myokardialen Ischämie kommt es durch den reduzierten Blutfluß zu einer Akkumulation von Kaliumionen im Extrazellulärraum, die in der Reperfusionsphase durch Restoration des Blutflusses ausgewaschen bzw. neu verteilt werden. Abgesehen von den bestehenden Korrelationen zwischen Kaliumionen-Konzentration und myokardialer Ischämie bzw. Reperfusion sind Veränderungen der Kaliumionen-Konzentration auch repräsentativ für die Anhäufung und Neuverteilung anderer

ischämischer Produkte, sowie für die Entwicklung von Arrhythmien während der Ischämie- und Reperfusionsphasen (74,75,76,77).

Kardiotoxische Effekte einer auftretenden Hyperkaliämie sind in zahlreichen Studien untersucht wurden (74,76,72). Ein Ansteigen der Kaliumionen-Konzentration im Plasma bewirkt zahlreiche Veränderungen an den Membranen und Aktionspotentialen des Herzmuskels, was wiederum signifikante Änderungen im Elektrokardiogramm hervorruft.

In elektrokardiographischen Untersuchungen konnten bei Erhöhung der Kaliumionen-Konzentration von 4 mM auf 8 mM verschiedene Abweichungen von bekannten Standardwerten registriert werden. Unter anderem führt eine Erhöhung der Kaliumionen-Konzentration zu einer Reduktion der P-Welle und zu einem Ansteigen der T-Welle, sowie zu einer Verbreiterung des QRS-Komplexes und einer Verkürzung des QT-Intervalles (77).

Als Folge des Kaliumanstiegs im Extrazellulärraum nimmt die Kaliumleitfähigkeit zu und bewirkt eine Verminderung des Aktionspotentials (speziell das Plateau des AP wird verkürzt) und eine verzögerte Repolarisation (78,79). Da die Herzfrequenz mit der Dauer des AP korreliert (Kaliumleitfähigkeit ändert sich am schnellsten im Sinusknoten) kommt es bei einer Hyperkaliämie zunächst zur sinus-wellenartigen Aktivität im EKG mit einhergehender Bradykardie, die eine schwerwiegende Minderversorgung lebenswichtiger Organe verursacht und im Extremfall zum Herzversagen führt (77,73).

Antagonistische hyperkaliämische Effekte werden unter einer Kalzium-Infusion erzielt (8).

3.6. Untersuchungsansatz

Um die vermeintlich protektiven Mechanismen der angewandten Reduktionsmittel untersuchen zu können, müssen die Herzpräparate einer definierten Schädigung unterzogen werden. Zur experimentellen Schädigung der Langendorff-Herzen bzw. der Vorhof-Aurikel-Präparate wurden die schon oben beschriebenen Noxen ausgewählt, wobei die Herzen in beiden Versuchsmodellen mit den Substanzen Verapamil, Pentobarbital und Tetrachlorkohlenstoff in steigender Dosierung geschädigt wurden.

Eine 20-minütige Ischämie wurde ausschließlich am Langendorff-Herzen induziert, während ein Kaliumionen-Überschuß am Vorhof-Aurikel-Präparat durch eine stufenweise Konzentrationssteigerung, des in der salinen Lösung ohnehin vorhandenen Kaliumspiegels, erreicht wurde. Die Verwendung dieser Schädigungsmodelle war für meine Untersuchungen vorgegeben.

Der konzeptionelle Ansatz einer Untersuchung zu Schutzmechanismen könnte sich unter entsprechenden Rahmenbedingungen prinzipiell in zweierlei Form gestalten:

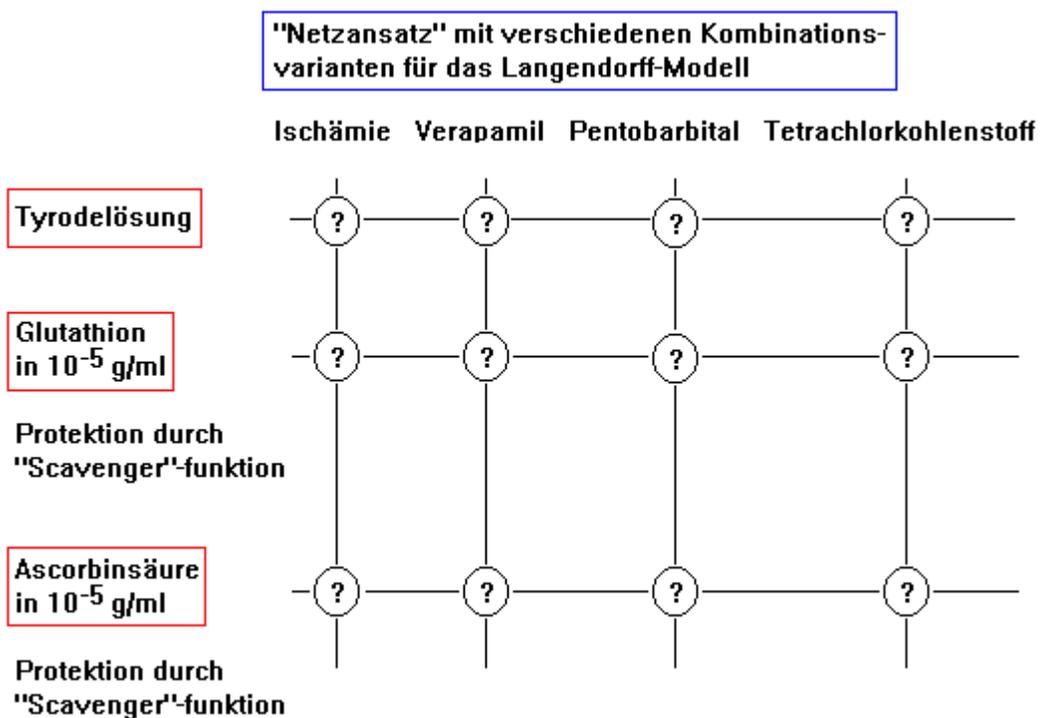
Mit dem Material geeigneter Literaturvorgaben wird eine konkrete Arbeitshypothese erstellt, die den vermuteten zellulären Mechanismus der zu untersuchenden Substanz beschreibt. Um diese Hypothese zu beweisen bzw. zu widerlegen, wird eine exakte Auswahl der als Reaktionspartner dienenden Substanzen getroffen, die spezifisch auf den zellulären Wirkmechanismus des Untersuchungsobjektes zugeschnitten sind.

Eine andere Alternative besteht darin, zunächst ohne konkrete Arbeitshypothese möglichst viele unterschiedliche Kardionoxen mit vermeintlich protektiven Substanzen miteinander reagieren zu lassen. Nach systematischer Abarbeitung eines derartigen "Netzwerkes" der unterschiedlichsten Kombinationen könnte eventuell eine Konstellation mit optimaler Schutzwirkung herausgefunden werden. Die Erarbeitung einer Hypothese kann dann aus dem positiven Untersuchungsergebnis heraus erfolgen.

Ein nicht unbedeutender Nachteil des sogenannten "Netzansatzes" ist die Beschränkung der Untersuchungen auf relativ einfache "screening"-Methoden, die besonders für breit angelegte Untersuchungsreihen geeignet sind, auf der anderen Seite aber auch einen immensen Aufwand

verursachen, da immer eine sehr große Anzahl von Kombinationsvarianten untersucht werden muß.

Der experimentelle Teil meiner Arbeit über die kardioprotektiven Wirkungen von Reduktionsmitteln wurde als "Netzansatz" an den verwendenden Arbeitsmodellen (Langendorff-Herz, Vorhof-Aurikel-Präparat) durchgeführt. Die Entscheidung für ein "Screening" in einem "Netzansatz" war mir vorgegeben.

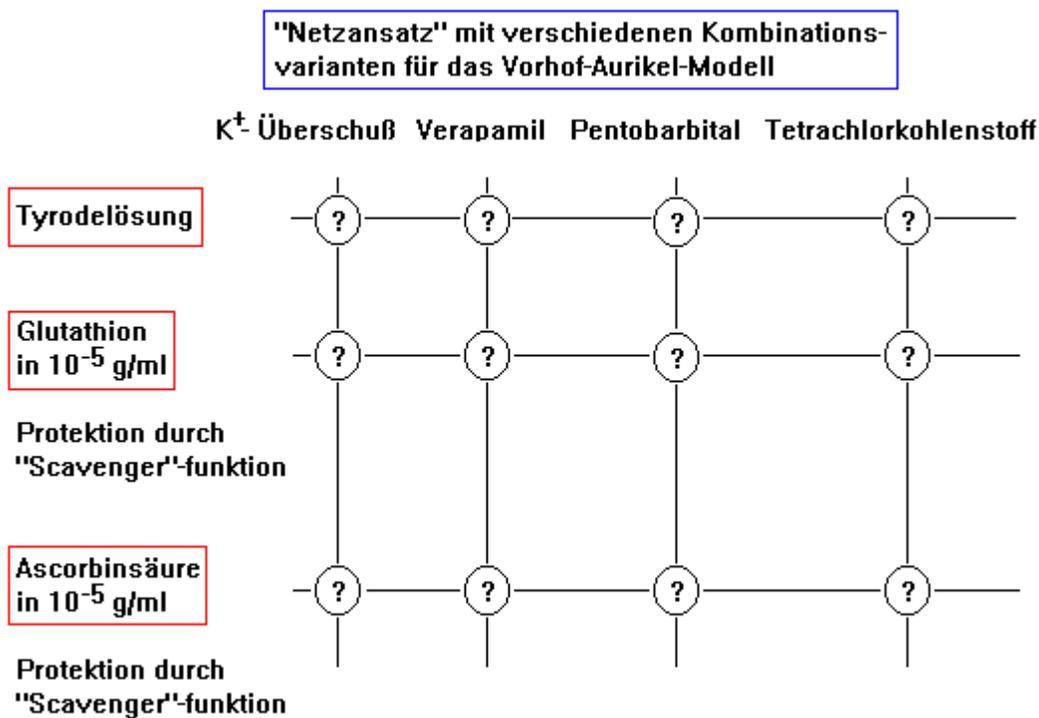


Bevor in den nachfolgenden Abschnitten umfassende Ausführungen zur Erläuterung und Beschreibung der Methodik erfolgen, soll hier vorerst das Prinzip unseres "Netzansatzes" geklärt werden.

In der Regel könnte man anhand der Dosiswirkungskurve der Reduktionsmittel die entsprechende Konzentration finden, die ein Optimum an Protektion vermuten läßt. Da ein solches Wirkoptimum aber nicht signifikant festgestellt werden konnte, wurden in den weiteren Kombinationsversuchen für die protektiv eingestuft Substanzen willkürlich eine Konzentration

von 10^{-5} g/ml festgelegt, was einer Konzentration von $32 \mu\text{mol/l}$ für Glutathion und einer Konzentration von $56 \mu\text{mol/l}$ für Ascorbinsäure entspricht.

Diese, in der Tyrode, stets präsenten Konzentrationen stellen die Konstanten dar, währenddessen die aufsteigenden Konzentrationen der eingesetzten Kardionoxen die variablen Komponenten sind. Aus der Kombination der Noxen mit den protektiv wirkenden Substanzen resultieren die abgebildeten Raster des "Netzansatzes", welche im Verlaufe des experimentellen Parts kontinuierlich abgearbeitet wurden.



Anhand dieses Ansatzes kann auch eine Konkretisierung der Aufgabenstellung erfolgen, welche folgende Punkte beinhaltet:

1. Hat eine Kardioprotektion bei Abarbeitung der vorgegebenen Raster beobachtet werden können (signifikanter Unterschied zur Tyrode-Lösung)?
2. Gibt es eindeutige Unterschiede in der Kardioprotektion zwischen den Reduktionsmitteln (eventuelle Rückschlüsse auf unterschiedliche Potenz der "Scavenger")?

4. Erläuterungen und Beschreibungen der Methodik

4.1. Versuchsaufbau und -durchführung für das Aurikel-Vorhof-Präparat

Für die Experimente zur Untersuchung kardioprotektiver und kardiotoxischer Substanzen wurden am Vorhof-Aurikel-Präparat einmal Glutathion und Ascorbinsäure als Reduktionsmittel sowie Tetrachlorkohlenstoff, Pentobarbital und Verapamil als schädigende Substanzen eingesetzt.

Zusätzlich war eine vierte Schädigungsvariante in Form einer Hyperkaliämie vorgegeben. Als Tierspezies wurden für jeweils drei Versuchsserien Meerschweinchen und für eine weitere Serie Wistar-Ratten verwendet. Zur effektiveren Ausnutzung der Versuchsanlage führte man ständig drei Einzelversuche gleichzeitig durch. Dafür stand dem Experimentator eine Apparatur zur Verfügung, die aus drei miteinander gekoppelten Doppelwandgefäßen für die Aufnahme der Präparate bestand, drei Universalstativen mit mechano-elektrischen Wandlern, einem Thermostat, einem Träger-Frequenz-Meßverstärker und einem technischen Schnellschreiber.

Zur Entnahme der zu präparierenden Herzen wurden die Meerschweinchen durch eine kräftige Schleuderbewegung mit einhergehender Fraktur der oberen Halswirbel schnell und schmerzlos getötet. Die Tötung der zu einer Versuchsserie benutzten Wistar-Ratten dagegen erfolgte, nach vorheriger Betäubung in einem mit Äther versetzten geschlossenen Glasgefäß, durch einen Schlag mit einer Metallstange auf die Halswirbelsäule. Nachdem dann die getöteten Tiere in Rückenlage auf dem Seziertisch fixiert waren, wurde mit wenigen Scherenschnitten der Thorax oberhalb des Zwerchfells eröffnet und das vom Mediastinum und Blutgefäßen abgetrennte Herz entnommen. Bei der eigentlichen Feinpräparation in einem mit vorgewärmter Tyrode gefüllten und mit Carbogen begasten flachen Gefäß (Petri-Schale) mußte sehr präzise vorgegangen werden. Die Aurikel und der dazwischen liegende Sinusknoten sollten nach Möglichkeit sauber von der übrigen Muskelmasse getrennt werden, ohne dabei jedoch den Sinusknoten zu tangieren beziehungsweise zu verletzen, da dieses zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Funktion oder zur völligen Unbrauchbarkeit führen konnte.

Nach vollendeter Präparation schlang man an beiden Vorhöfen je einen Faden, mit denen die Vorhof-Aurikel-Präparate dann in die doppelwandigen Glasgefäße eingehängt wurden. Das präparierte Herz war jetzt einmal am Boden des Gefäßes befestigt und über den zweiten Faden mit dem mechano-elektrischen Wandler verbunden, über den dann mit Hilfe von Träger-Frequenz-Meßverstärker und Schnellschreiber die Parameter Kontraktionskraft und Herzfrequenz

abgeleitet und registriert werden konnten. Die Doppelwandgefäße mit Funktion einer Wärmekammer enthielten jeweils 10 ml Tyrode-Lösung, die wiederum durch eine am Boden des Gefäßes befindliche Glasfritte mit Carbogen durchperlt wurde. Das Badvolumen blieb mittels Thermostat und Pumpsystem stets gleich auf 37° C temperiert. Bis zu Beginn des Versuches vergingen ca. 30 Minuten, wobei während dieser Zeit das Tyrodebad in der Regel dreimal gewechselt wurde, um vorhandene Eiweißreste (erkennbar an der Schaumbildung) auszuspülen. Hatten sich nach Ablauf dieser sogenannten Einhängszeit alle Werte stabilisiert, konnte mit den Versuchen begonnen werden.

Vor Beginn der eigentlichen Kombinationsversuche wurden für die Reduktionsmittel, wie auch für die Noxen die reinen Dosiswirkungskurven bestimmt. Diese Dosiswirkungskurven konnten ermittelt werden, in dem immer eine Serie von 6 Herzpräparaten in festgelegten Zeitabständen mit vier bis fünf steigenden Konzentrationen einer Testsubstanz konfrontiert wurden. Hierbei sollten sich stets dosis- und wirkungsabhängige Veränderungen der zu ermittelnden Parameter ergeben, die dann später in graphischer Darstellung auszuwerten wären.

Nach Ablauf der angegebenen Einhängszeit und einer erfolgten Kontrollregistrierung von Amplitude und Frequenz wurde die jeweilige Testsubstanz, mit der kleinsten Konzentration beginnend, in das Tyrodebad mit Herzpräparat gegeben. Die Einwirkzeit betrug immer 5 Minuten. Genau wie die Kontrollregistrierung vor Zugabe der Substanz mußten auch nach Verstreichen der 5 Minuten Einwirkzeit die experimentellen Meßwerte (Kontraktionskraft, Herzfrequenz) mit dem Schnellschreiber registriert werden.

Bevor nun die nächsthöhere Konzentration der zu untersuchenden Substanz verabreicht wurde, mußte das Doppelwandgefäß mit dem Präparat dreimal mit vorgewärmter Tyrode gespült und anschließend durch 10 ml frische Lösung gefüllt werden. Innerhalb der nächsten 10 Minuten stabilisierten sich Amplitude und Frequenz substanzabhängig so weit, daß nach einer Kontrollregistrierung erneut die entsprechende Substanz in erhöhter Dosis in die Badlösung gegeben werden konnte.

Für die Versuche Reduktionsmittel in Kombination mit Noxe wurde für das entsprechende Reduktionsmittel eine von den vorher untersuchten Konzentrationen festgelegt, bei der die

gewünschte Wirkung am ehesten zu erwarten wäre und die ein möglicher Garant für ein positives Versuchsergebnis sein sollte.

Abgesehen von der obligaten Kontrollregistrierung mit Normaltyrode zu Beginn des Versuches war der vermeintliche Protektor bzw. das Reduktionsmittel dann stets in der Tyrode-Lösung in der festgelegten, immer gleichbleibenden Konzentration vorhanden.

Nach einer zweiten Kontrollregistrierung mit protektorversetzter Tyrode lief dann das Experiment wie vorher beschrieben im Wechsel mit Applikation der Noxen in steigender Konzentration und Erneuerung der Badlösung in den angegebenen Zeitabständen ab.

4.2. Versuche am isoliert perfundierten Rattenherz nach Langendorff

Neben den Experimenten am Aurikelpräparat wurde ein Teil der Versuche am nach Langendorff perfundierten Herzen durchgeführt, wobei als mutmaßliche Protektoren hier ebenso Ascorbinsäure und Glutathion und als entsprechende Noxen Tetrachlorkohlenstoff, Pentobarbital und Verapamil verwendet wurden. Anstelle des am Aurikelpräparat arrangierten Kaliumionen-Überschusses wurde am isoliert perfundierten Wistar-Rattenherzen eine Ischämie induziert. Bevor auf die Art und Weise der Ermittlung der klinisch relevanten Parameter wie Amplitude, Frequenz und koronarer Fluß eingegangen wird, soll kurz der Versuchsaufbau bzw. die Versuchsdurchführung nach Langendorff erläutert werden.

Während der gesamten Dauer des Experimentes befindet sich das präparierte Herz in einer Wärmekammer, die ständig eine Temperatur von 37° C hält. Diese nahezu konstante Temperierung ist durch ein vorgeschaltetes Pumpsystem mit eingegliedertem Thermostat möglich, welches auch das Vorwärmen der benötigten Tyrode-Lösung in einem doppelwandigen Vorratsgefäß bewerkstelligt. Der Transport der physiologischen Lösung zum Vorratsbehälter geschieht über eine in der Geschwindigkeit regulierbaren Rollenpumpe. Für die Sättigung der Tyrode mit Carbogen wurde der Vorratsbehälter mit dem Gaszufuhrsystem durch ein Glasrohr verbunden, eine weitere als Überdruckventil dienende Rohrleitung existiert zwischen Vorratsgefäß und einem ein Meter hohen und fünf Zentimeter im Durchmesser starken wassergefüllten Glaszylinder, durch die das überflüssige Carbogen das System verlassen kann. Auf das Vorratsbehältnis wurde, um gleichbleibende

Versuchsbedingungen zu schaffen, um den koronaren Durchfluß exakt messen zu können und um das Präparat durch etwaige Druckveränderungen nicht zusätzlich zu belasten, ein konstanter Druck von 40 mm Hg ausgeübt. Die Menge des aus dem rechten Herzen austretenden Perfusats konnte mit Hilfe eines elektrischen Tropfenzählers ermittelt werden. Das jeweils präparierte Herz war über eine Glaskanüle mit dem Tyrodebehälter gekoppelt und wurde auch auf diesem Weg mit der Carbogen-gesättigten Lösung versorgt. An der Herzspitze ist zur Ermittlung der Kontraktionshöhe und Frequenz eine Metallserafine angebracht worden, die mechanisch durch einen Faden über eine Umlenkrolle mit einem mechano-elektrischen Wandler verbunden war. Unter Zuhilfenahme eines Zwölf-Kanal-Lichtschreibers und eines Verstärkers konnten jetzt Herzfrequenz, Kontraktionskraft und die durch den Tropfenzähler ermittelte Perfusatmenge insgesamt registriert werden.

Für die an der Langendorffanlage durchgeführten Versuchsserien wurden ausschließlich Wistar-Ratten verwendet, die zunächst in einem mit Äther versetzten geschlossenen Glasgefäß betäubt und dann schmerzlos durch einen Schlag mit einer Metallstange auf die Halswirbelsäule getötet worden sind. Nach der Tötung und Thorax-Öffnung (wie vorher festgestellt) wurde mit einer kleinen spitzen Schere die aufsteigende vorher mit einem Faden umschlungene Aorta geschlitzt und eine in Herzrichtung in die Aorta eingeführte Glaskanüle fixiert. Ein Teil des rechten Herzohres wurde nun durch einen Scherenschnitt entfernt, womit der rechte Vorhof eröffnet war. Das noch vom Mediastinum abzutrennende Herz muß danach sofort mit der eingeschliffenen Glaskanüle in den Versuchsaufbau eingehängt werden. Um anfängliche Komplikationen und Probleme bei der Anpassung des präparierten Herzen an die neue Situation zu vermindern, wurde die Glaskanüle im Tyrodebad vorgewärmt und schon mit Tyrode gefüllt in die Aorta eingebracht, zum anderen wurde nach Anbringen der Metallserafine an die Herzspitze das eingehängte nun physiologisch funktionierende Herz umgehend in die auf 37° C temperierte Wärmekammer gebracht. Noch bevor die Tyrode-Lösung vom Carbogen durchperlt das Herz fortlaufend retrograd über Aortenwurzel-- Koronarostien--Koronararterien--Koronarvenen--Sinus coronarius--angeschnittenes rechtes Herzohr durchströmte, wurde sie in einem dem Vorratsgefäß vorgeschalteten Reinigungsmechanismus in Form einer Glasfritte gesäubert. Nach Einhängen des Präparates vergingen 30 Minuten, bis das Herz an die Versuchsbedingungen angepaßt war und

die experimentellen Parameter stabile Werte zeigten. Erst dann konnte mit dem eigentlichen Versuch begonnen werden.

Am Anfang der Untersuchungen stand wie beim Aurikelpräparat die Ermittlung der Dosiswirkungskurven (DWK) aller Substanzvorgaben. Die Effekte der eingesetzten Substanzen bzw. die Effekte der verursachten Ischämie wurden an jeweils 6 Herzpräparaten aufgezeichnet. Nach der bekannten Einhängszeit der Präparate erfolgte die Bestimmung der DWK auch hier mit vier bis fünf Konzentrationssteigerungen der jeweils zu untersuchenden Testsubstanz in festgelegten Zeitabständen, wobei die Reduktionsmittel wie auch die Noxen im Abstand von 10 Minuten in steigender Dosierung der Apparatur zugeführt wurden. Die Zugabe der jeweiligen Substanz erfolgte generell über die Rollenpumpe. Vor jeder Konzentrationserhöhung der Testsubstanz wurde eine Kontrolle geschrieben, um erwartete dosis- und wirkungsabhängige Veränderungen der Parameter Kontraktionskraft, Herzfrequenz und koronarer Fluß entsprechend zu registrieren.

Die zu untersuchende Ischämie wurde durch eine 20-minütige Unterbrechung des Tyrodeflusses erzeugt. Hier wurden die benannten Parameter nach Beendigung der Ischämie im Abstand von 1,2,3,5,10 und 15 Minuten registriert.

In den nachfolgenden Kombinationsversuchen mußte wieder für die mutmaßlichen Protektoren Glutathion und Ascorbinsäure eine Konzentration aus den vorher ermittelten Dosiswirkungskurven festgelegt werden, mit der diese Substanzen dann in der Tyrode-Lösung ständig präsent sein sollten. Der entsprechende Protektor wurde dabei nach der Einhängphase des Herzpräparates und der ersten Registrierung direkt der Tyrode zugegeben. Bis zur nächsten Registrierung wirkte das eingesetzte Reduktionsmittel 20 Minuten ein. Die Schädiger wurden dann im Abstand von 10 Minuten als Einzelgaben in steigender Dosierung entsprechend den Vorversuchen hinzugesetzt.

Selbstverständlich wurde auch jetzt vor jeder Dosissteigerung der Noxen eine Registrierung der experimentellen Parameter durchgeführt.

Die benutzte Tyrode für die am Aurikel-Präparat und an der Langendorffanlage durchgeführten Versuche setzt sich wie folgt zusammen:

Stammlösung A: 6,84 mol NaCl
0,13 mol KCl
0,05 mol MgCl₂
ad 2000 ml Aqua dest.

Stammlösung B: 0,59 mol NaHCO₃
ad 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung C: 0,02 mol NaH₂PO₄
ad 1000 ml Aqua dest.

Stammlösung D: 0,18 mol CaCO₃ + 4,94 mol HCl (2n)
ad 1000 ml Aqua dest.

Mischung der Stammlösungen:

40 ml der Stammlösung A
20 ml der Stammlösung B
20 ml der Stammlösung C
10 ml der Stammlösung D
5,55 x 10⁻³ mol Glukose
ad 1000 ml Aqua dest.

4.3. Statistische Auswertung

Als Grundlage der Berechnung für die weiterführenden Untersuchungen wurden für jedes Präparat die zuerst bestimmten Kontrollwerte für Amplitude, Frequenz, Koronarfluß und Leistung gleich 100 % gesetzt. Der Parameter Leistung am Vorhof-Aurikel-Präparat ergab sich dabei aus Produkt von Amplitude und Frequenz. Der Grad der Beeinflussung der Herzpräparate durch die schädigenden Substanzen bzw. durch die Protektoren wurde immer prozentual zu den Ausgangskontrollwerten bestimmt.

Zu jeder Versuchsreihe wurden jeweils 6 Herzpräparate experimentell untersucht und die errechneten Prozentwerte gemittelt, wobei diese Mittelwerte dann für die graphische Darstellung der Meßergebnisse genutzt wurden. Außerdem wurden die Standardabweichungen und die maximalen Fehler zwecks Signifikantsanalyse ermittelt.

Die Signifikanzgrenze für die statistischen Auswertungen liegt bei $p < 0,05$, die Untersuchungen wurden nach dem "**Student's T-Test**" durchgeführt.

5. Ergebnisse und graphische Auswertung

Wie unter der Methodikbeschreibung schon angedeutet, war für jede einzelne Versuchsserie die Untersuchung von jeweils 6 Herzpräparaten vorgesehen. Für die Experimente am Vorhof-Aurikel-Präparat wurden dabei in drei Versuchsserien Herzpräparate von Meerschweinchen und in einer weiteren Serie Herzpräparate von Wistar-Ratten untersucht, währenddessen für Versuche an der Langendorffanlage ausschließlich Wistar-Rattenherzen Verwendung fanden. Die in den Versuchen ermittelten Meßwerte für Amplitude, Frequenz, Tropfenzahl und Leistung wurden ausgewertet und graphisch dargestellt, wobei die hier verwendeten Parameter synonym für Kontraktionskraft, Herzfrequenz, koronaren Fluß und Produkt aus Kontraktionskraft und Herzfrequenz stehen.

Soweit in den Legenden der graphischen Darstellungen die Bezeichnungen für Tierspezies und Versuchsapparaturen nicht ausgeschrieben werden konnten, verwendete ich folgende Abkürzungen:

LA/WR - Langendorffanlage/Wistarratten

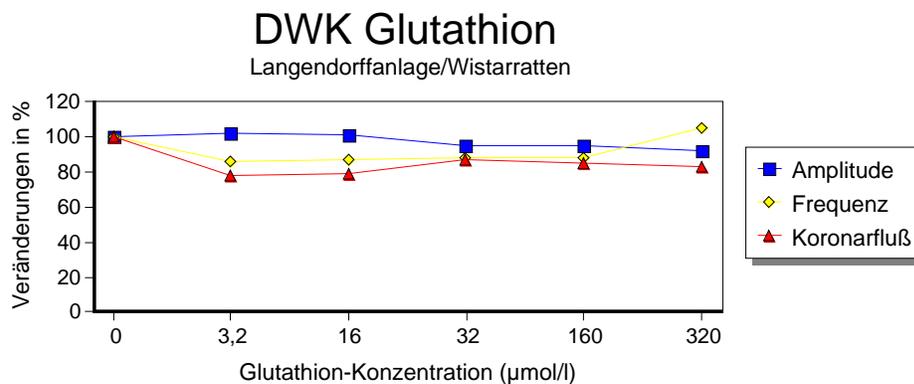
AU/MS - Aurikelpräparat/Meerschweinchen

AU/WR - Aurikelpräparat/Wistarratten.

5.1. Dosiswirkungskurven der Schutzsubstanzen

Zur Bestimmung der Dosiswirkungskurven von Glutathion wurden jeweils in fünf Abstufungen Konzentrationen von 3,2 $\mu\text{mol/l}$ bis 320 $\mu\text{mol/l}$ und von Ascorbinsäure Konzentrationen von 5,6 $\mu\text{mol/l}$ bis 560 $\mu\text{mol/l}$ an der Langendorffanlage und am Aurikelpräparat untersucht. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Veränderungen in % zum Ausgangskontrollwert (Konzentration der Schutzsubstanzen zum Zeitpunkt der Ausgangskontrolle = 0) von n = 6 Versuchen.

"SEM" ist jeweils für zwei ausgewählte Konzentrationen angegeben.



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

Amplitude bei 16 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 3,01

Frequenz bei 16 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 1,06

Tropfenzahl bei 16 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 7,56

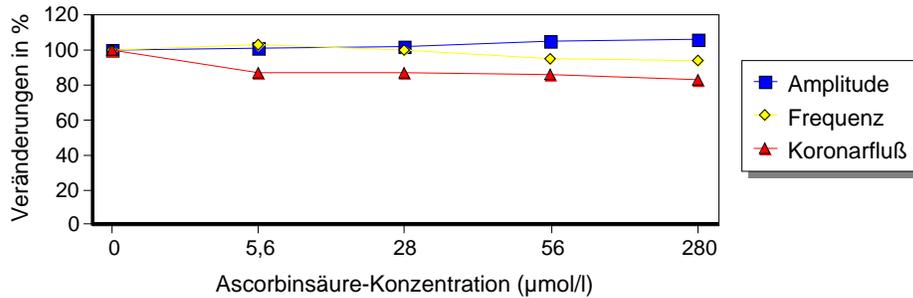
Amplitude bei 320 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 4,10

Frequenz bei 320 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 15,25

Tropfenzahl bei 320 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 8,67

DWK Ascorbinsäure

Langendorffanlage/Wistarraten



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

Amplitude bei 28 µmol/l SEM: 1,80

Frequenz bei 28 µmol/l SEM: 4,67

Tropfenzahl bei 28 µmol/l SEM: 7,96

Amplitude bei 280 µmol/l SEM: 8,69

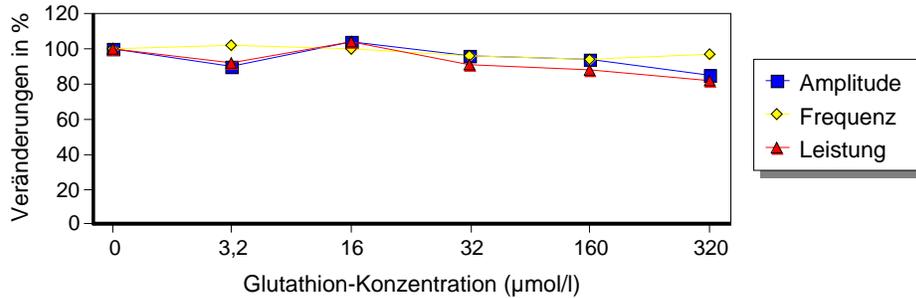
Frequenz bei 280 µmol/l SEM: 5,20

Tropfenzahl bei 280 µmol/l SEM: 7,20

Die Überprüfung der Dosiswirkungskurven beider Protektoren im Langendorff-Herz von Wistarraten ergibt keinen Hinweis bezüglich der Toxizität einer der beiden Substanzen bei einer bestimmten Konzentration. Die zu messenden Parameter verändern sich innerhalb der Konzentrationssteigerung im Vergleich zur Kontrollregistrierung nur unwesentlich.

DWK Glutathion

Aurikelpräparat/Meerschweinchen



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

Amplitude bei 16 µmol/l SEM: 5,50

Frequenz bei 16 µmol/l SEM: 1,62

Leistung bei 16 µmol/l SEM: 5,55

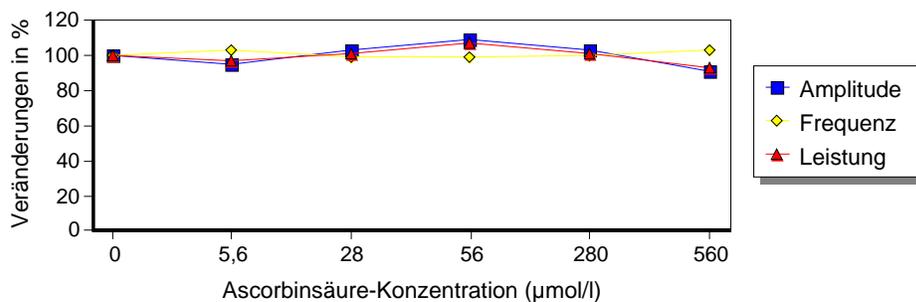
Amplitude bei 320 µmol/l SEM: 2,16

Frequenz bei 320 µmol/l SEM: 1,11

Leistung bei 320 µmol/l SEM: 1,59

DWK Ascorbinsäure

Aurikelpräparat/Meerschweinchen



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

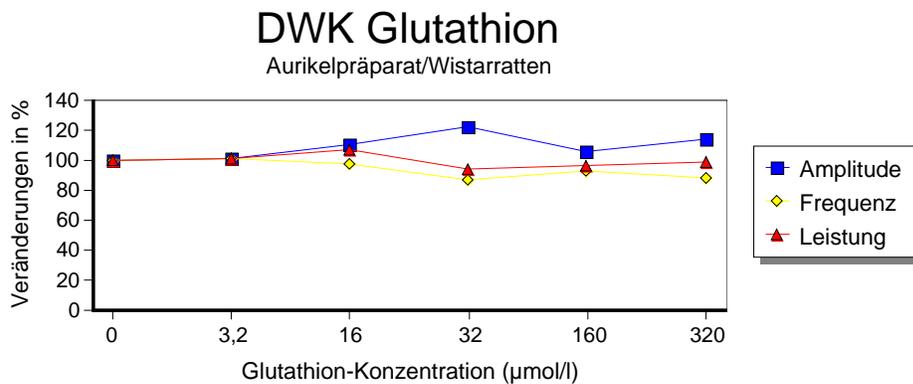
Amplitude bei 28 µmol/l SEM: 3,65

Frequenz bei 28 µmol/l SEM: 0,84

Leistung bei 28 µmol/l SEM: 2,80

Amplitude	bei 560 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 3,41
Frequenz	bei 560 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 1,98
Leistung	bei 560 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 2,11

Auch in der Präparation von Aurikeln des Meerschweinchens treten mit stetiger Konzentrationszunahme von Glutathion bzw. Ascorbinsäure an den untersuchten Herzpräparaten keine signifikanten Änderungen auf.



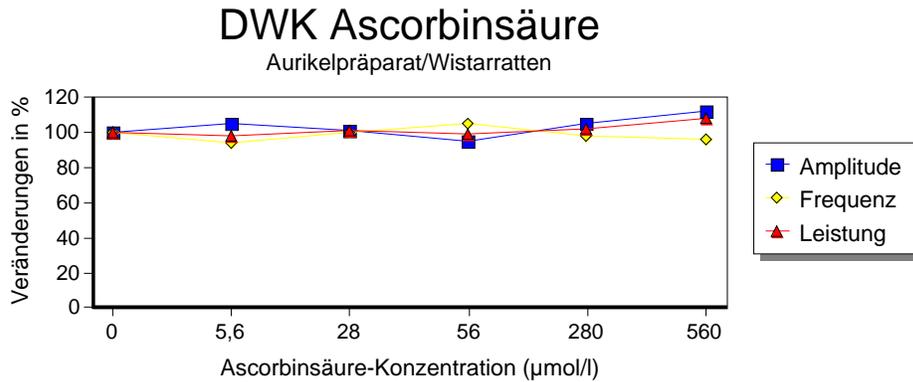
Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

Amplitude	bei 16 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 9,57
Frequenz	bei 16 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 3,33
Leistung	bei 16 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 6,95

Amplitude	bei 320 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 16,55
Frequenz	bei 320 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 3,93
Leistung	bei 320 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 11,91

Da auch in der Präparation von Aurikeln von Wistarratten ähnliche Ergebnisse wie in den vorhergegangenen Versuchen registriert wurden, kann man die Effekte der zu untersuchenden Schutzsubstanzen in den verschiedenen Präparationen als identisch einschätzen.

Eine signifikante Schädigung der Herzpräparate ist in den vorangegangenen Experimenten auch bei höchster Konzentration von 320 $\mu\text{mol/l}$ Glutathion bzw. 560 $\mu\text{mol/l}$ Ascorbinsäure nicht nachzuweisen.



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

Amplitude bei 28 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 2,02

Frequenz bei 28 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 1,24

Leistung bei 28 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 2,20

Amplitude bei 560 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 5,75

Frequenz bei 560 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 2,00

Leistung bei 560 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 6,19

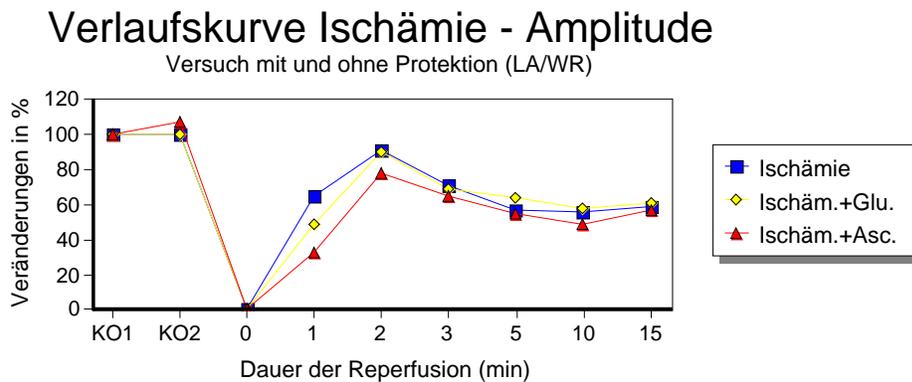
Auf Grund der geringfügigen Schwankungen der gemessenen Parameter und eines nicht eindeutig zu ermittelten Wirkoptimums wurde für die nachfolgenden Kombinationsversuche eine Konzentration von **32 $\mu\text{mol/l}$ Glutathion** bzw. **56 $\mu\text{mol/l}$ Ascorbinsäure** festgelegt, mit der die Protektoren für die Untersuchung von potentiellen Interaktionen mit Noxen in der Tyrodelösung präsent sein sollen.

5.2. Dosiswirkungskurven der Noxen in Kombination mit Protektion

Vor dem Beginn der eigentlichen Schädigung wurden jeweils zwei Kontrolluntersuchungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der ersten Kontrolle (KO1) ist die Einhängzeit der Präparate beendet, Amplitude, Frequenz und Koronarfluß zeigen stabile Werte und werden als Vergleich mit den Versuchsergebnissen gleich 100% gesetzt. Bei Registrierung der zweiten Kontrolle (KO2) ist die Tyrodelösung bereits mit einer der beiden mutmaßlich protektiv wirkenden Substanzen versetzt. Die zweite Kontrolle gibt uns also erste Abweichungen zu den Ausgangswerten des unbehandelten Herzpräparates an. Auch in den Kombinationsversuchen werden "SEM"-Werte jeweils für zwei ausgewählte Konzentrationen angegeben.

5.2.1. Schädigung durch Ischämie

In dieser Versuchsserie, die nur am Langendorff-Herz durchgeführt wurde, erfolgt die Schädigung der Herzpräparate nicht durch eine Noxe, sondern wird durch Erzeugung einer Ischämie hervorgerufen. Die Ischämie wurde mit einer zeitlich begrenzten Unterbrechung des Tyrodeflusses herbeigeführt, wobei die Dauer der Perfusionsunterbrechung 20 Minuten beträgt. Die zu untersuchenden Parameter werden nach 1, 2, 3, 5, 10 und 15 Minuten vom Beginn der Reperfusion (Zeitpunkt 0 min) an registriert.



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

nach 2 min Reperfusion SEM: 8,34

nach 2 min Reperfusion + Glutathion SEM: 10,83

nach 2 min Reperfusion + Ascorbinsäure SEM: 8,64

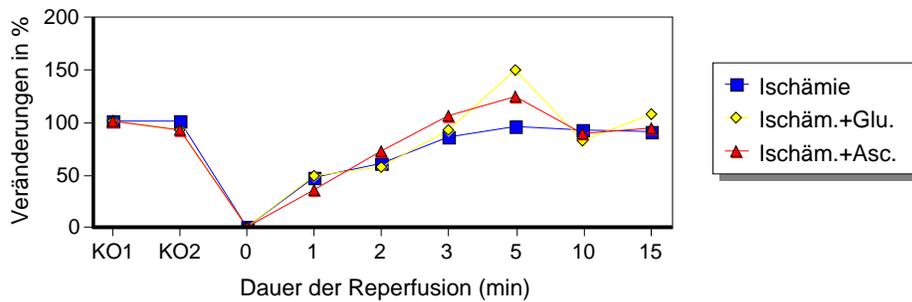
nach 15 min Reperfusion SEM: 2,46

nach 15 min Reperfusion + Glutathion SEM: 4,80

nach 15 min Reperfusion + Ascorbinsäure SEM: 5,91

Verlaufskurve Ischämie - Frequenz

Versuch mit und ohne Protektion (LA/WR)



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

nach 2 min Reperfusion SEM: 9,45

nach 2 min Reperfusion + Glutathion SEM: 9,44

nach 2 min Reperfusion + Ascorbinsäure SEM: 8,26

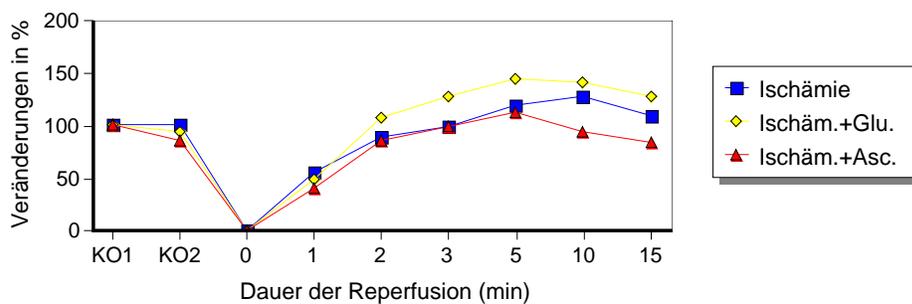
nach 15 min Reperfusion SEM: 3,50

nach 15 min Reperfusion + Glutathion SEM: 17,06

nach 15 min Reperfusion + Ascorbinsäure SEM: 7,18

Verlaufskurve Ischämie - Koronarfluß

Versuch mit und ohne Protektion (LA/WR)



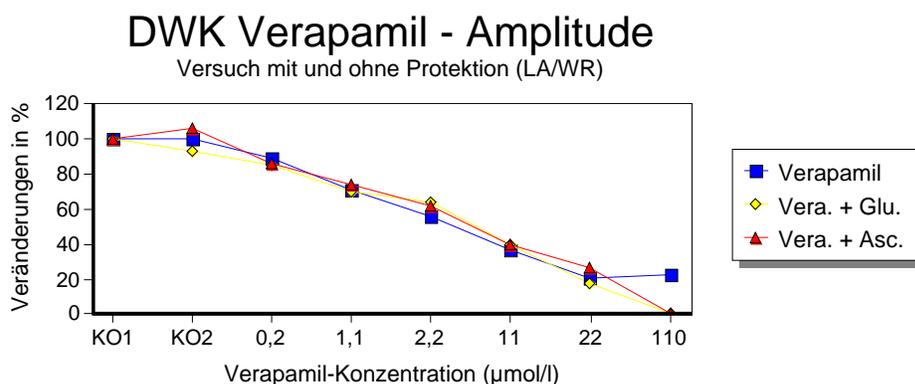
Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

nach 2 min Reperfusion	SEM: 12,15
nach 2 min Reperfusion + Glutathion	SEM: 9,92
nach 2 min Reperfusion + Ascorbinsäure	SEM: 14,91
nach 15 min Reperfusion	SEM: 9,76
nach 15 min Reperfusion + Glutathion	SEM: 10,20
nach 15 min Reperfusion + Ascorbinsäure	SEM: 15,55

Gleich nach Beginn der Reperfusion (1 min) ist bei allen Herzpräparaten nach vorhergegangener Stabilisierung in der Einhängszeit ein Abfall der zu messenden Parameter zu verzeichnen. Obwohl die Amplitude in allen drei Versuchsserien mit steigender Reperfusiondauer prozentual immer mehr abnimmt, kann insgesamt die Rekreation der Herzpräparate nach längerer Reperfusion doch stabiler eingeschätzt werden als zu Beginn derselben. Zu einem abrupten Abfall aller Parameter wie am Anfang der Reperfusion kam es nicht wieder. Signifikante Effekte der eingesetzten Schutzsubstanzen sind nicht erkennbar.

5.2.2. Schädigung durch Verapamil

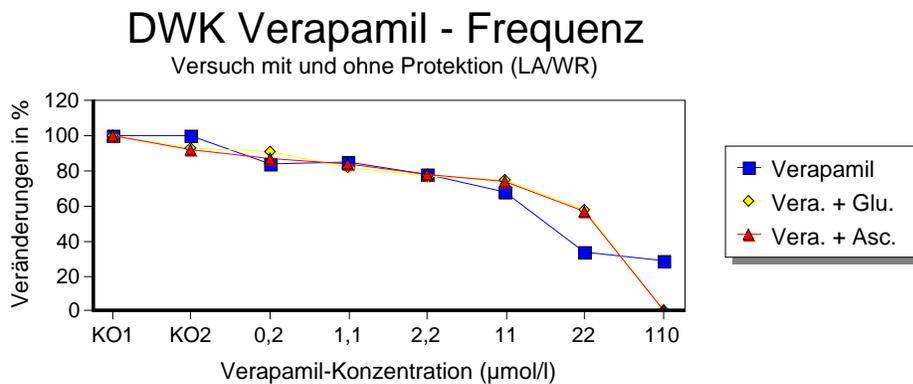
Die Versuche mit Verapamil als Schädiger wurden sowohl an der Langendorffanlage (Wistar-Rattenherzen) als auch an Aurikelpräparaten von Meerschweinchen durchgeführt, wobei jeweils ein Protektor mit der festgelegten Konzentration in der Tyrode präsent war.



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei 1,1 µmol/l	SEM: 7,73
Schädigung + Glu.	bei 1,1 µmol/l	SEM: 9,30
Schädigung + Asc.	bei 1,1 µmol/l	SEM: 7,74

reine Schädigung	bei 110 µmol/l	SEM: 19,27
Schädigung + Glu.	bei 110 µmol/l	SEM: 0,00
Schädigung + Asc.	bei 110 µmol/l	SEM: 0,00



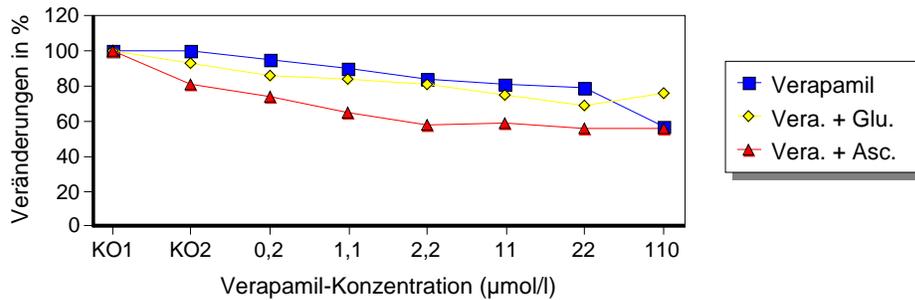
Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei 1,1 µmol/l	SEM: 10,76
Schädigung + Glu.	bei 1,1 µmol/l	SEM: 5,65
Schädigung + Asc.	bei 1,1 µmol/l	SEM: 7,97

reine Schädigung	bei 110 µmol/l	SEM: 14,12
Schädigung + Glu.	bei 110 µmol/l	SEM: 0,00
Schädigung + Asc.	bei 110 µmol/l	SEM: 0,00

DWK Verapamil - Koronarfluß

Versuch mit und ohne Protektion (LA/WR)



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung bei 1,1 µmol/l SEM: 11,81

Schädigung + Glu. bei 1,1 µmol/l SEM: 8,92

Schädigung + Asc. bei 1,1 µmol/l SEM: 4,85

reine Schädigung bei 110 µmol/l SEM: 6,25

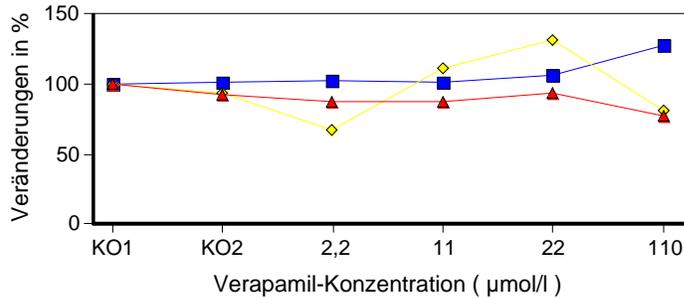
Schädigung + Glu. bei 110 µmol/l SEM: 12,91

Schädigung + Asc. bei 110 µmol/l SEM: 6,24

Die Langendorffpräparate wurden mit Verapamilkonzentrationen von 0,2 µmol/l bis 110 µmol/l geschädigt. Die graphische Auswertung zeigt bei Amplitude und Frequenz zu Beginn des Versuches keine erheblichen Abweichungen der Protektionskurven von der reinen Schädigerkurve. Mit Erhöhung der Verapamilkonzentration stellen sich doch mit stetigem Abfall von Amplitude und Frequenz erhebliche Funktionsverluste ein, bei den mit Ascorbinsäure und Glutathion getesteten Präparaten führte die höchste Schädigungskonzentration sogar zum physiologischen Herztod. Die Perfusion der Herzpräparate gelang mit Ascorbinsäure-versetzter Tyrodelösung am schlechtesten. Eine protektive Wirkung der eingesetzten Reduktionsmittel kann in dieser Kombination ausgeschlossen werden.

DWK Verapamil - Amplitude

Versuch mit und ohne Protektion (AU/MS)



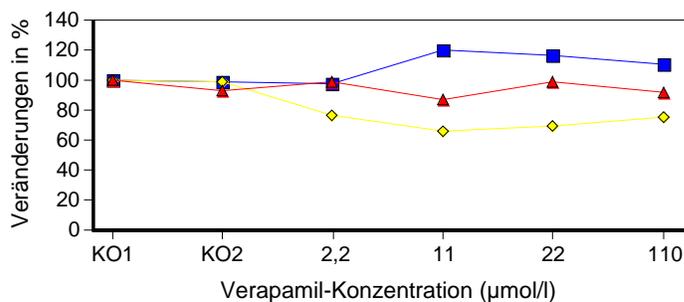
■ Verapamil
 ◆ Vera. + Glu.
 ▲ Vera. + Asc.

Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei 11 µmol/l	SEM: 4,25
Schädigung + Glu.	bei 11 µmol/l	SEM: 11,36
Schädigung + Asc.	bei 11 µmol/l	SEM: 8,05
reine Schädigung	bei 110 µmol/l	SEM: 27,27
Schädigung + Glu.	bei 110 µmol/l	SEM: 68,75
Schädigung + Asc.	bei 110 µmol/l	SEM: 6,05

DWK Verapamil - Frequenz

Versuch mit und ohne Protektion (AU/MS)

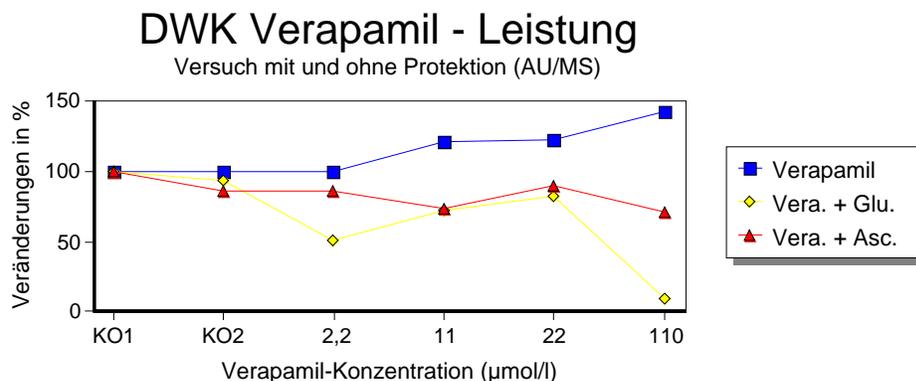


■ Verapamil
 ◆ Vera. + Glu.
 ▲ Vera. + Asc.

Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei 11 µmol/l	SEM: 8,55
Schädigung + Glu.	bei 11 µmol/l	SEM: 8,22
Schädigung + Asc.	bei 11 µmol/l	SEM: 8,65

reine Schädigung	bei 110 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 9,99
Schädigung + Glu.	bei 110 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 0,00
Schädigung + Asc.	bei 110 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 2,46



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei 11 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 12,46
Schädigung + Glu.	bei 11 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 4,15
Schädigung + Asc.	bei 11 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 7,11

reine Schädigung	bei 110 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 42,73
Schädigung + Glu.	bei 110 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 0,00
Schädigung + Asc.	bei 110 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 3,93

Ähnlich dem vorangegangenen Versuch wurden jeweils 6 Aurikelpräparate von Meerschweinchen mit Verapamilkonzentrationen von 2,2 $\mu\text{mol/l}$, 11 $\mu\text{mol/l}$, 22 $\mu\text{mol/l}$ und 110 $\mu\text{mol/l}$ geschädigt.

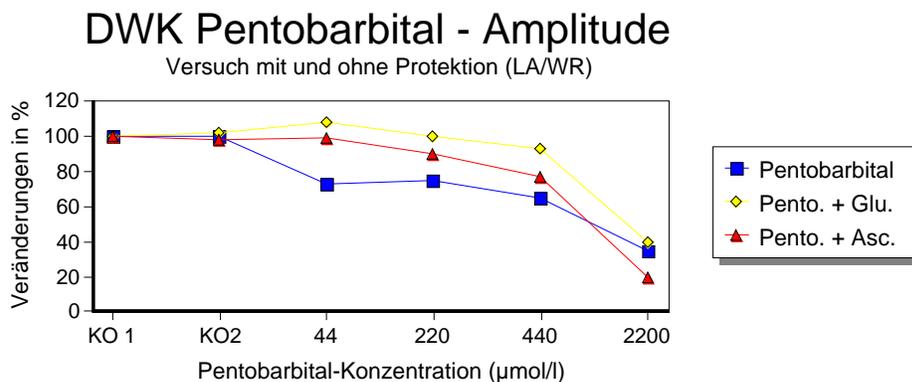
Die größten Schwankungen der Kontraktionskraft traten in der Kombination mit Glutathion auf, die Frequenz fiel hier zeitweise um mehr als 30%. Im Versuch mit Ascorbinsäure erreichten die Aurikelpräparate nach Beginn der Schädigung die Ausgangskontrollwerte nicht wieder, die Registrierung der Parameter zeigt ein wechselndes Ansteigen und Abfallen von Amplitude und Frequenz zwischen 80% und 100% der Ausgangswerte.

Beginnend mit der Konzentrationserhöhung von Verapamil auf 22 $\mu\text{mol/l}$ kam es mit und ohne Protektion zum totalen Funktionsausfall einiger Aurikelpräparate, weshalb die Ergebnisse der

letzten beiden Konzentrationserhöhungen kritischer betrachtet werden müssen. Nach der letzten Konzentrationserhöhung von 110 $\mu\text{mol/l}$ waren im reinen Schädigungsversuch noch zwei Präparate, in der Kombination Verapamil und Glutathion noch ein Präparat und in der Kombination Verapamil und Ascorbinsäure noch drei Präparate funktionstüchtig. Eine protektive Wirkung ist nicht zu erkennen.

5.2.3. Schädigung durch Pentobarbital

Für die Untersuchungen von Pentobarbital fanden an beiden Versuchsanordnungen ausschließlich Herzpräparate von Wistarratten Verwendung. Glutathion und Ascorbinsäure wurden als protektiv wirkende Substanzen in Konzentrationen von 32 $\mu\text{mol/l}$ bzw. von 56 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzt. Während des Versuches erhöhte sich der Pentobarbitalgehalt der Tyrode in den vorgesehenen Intervallen viermal (44 $\mu\text{mol/l}$, 220 $\mu\text{mol/l}$, 440 $\mu\text{mol/l}$ und 2200 $\mu\text{mol/l}$).



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung bei 220 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 11,1

Schädigung + Glu. bei 220 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 6,31

Schädigung + Asc. bei 220 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 5,66

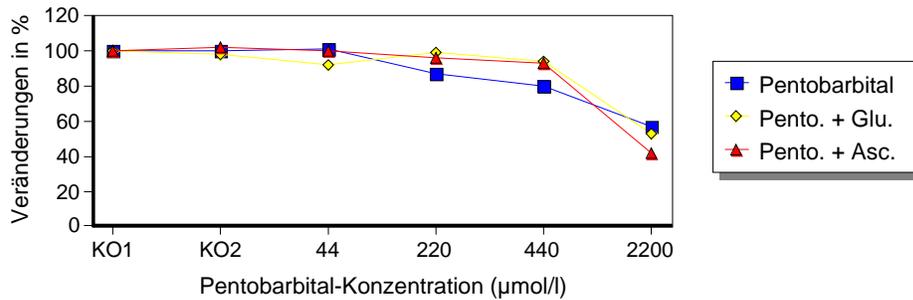
reine Schädigung bei 2200 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 13,9

Schädigung + Glu. bei 2200 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 8,46

Schädigung + Asc. bei 2200 $\mu\text{mol/l}$ SEM: 11,95

DWK Pentobarbital - Frequenz

Versuch mit und ohne Protektion (LA/WR)



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung bei 220 µmol/l SEM: 9,23

Schädigung + Glu. bei 220 µmol/l SEM: 3,90

Schädigung + Asc. bei 220 µmol/l SEM: 1,69

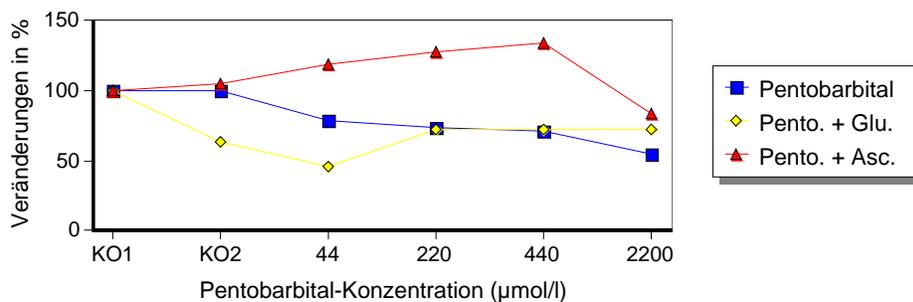
reine Schädigung bei 2200 µmol/l SEM: 16,69

Schädigung + Glu. bei 2200 µmol/l SEM: 3,31

Schädigung + Asc. bei 2200 µmol/l SEM: 14,74

DWK Pentobarbital - Koronarfluß

Versuch mit und ohne Protektion (LA/WR)



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

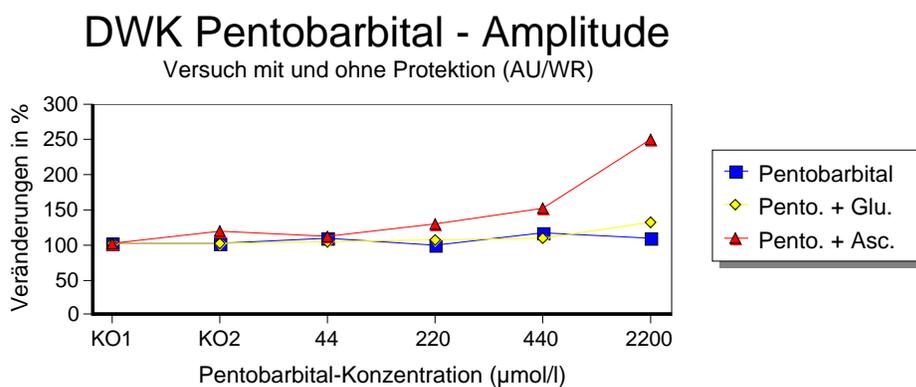
reine Schädigung bei 220 µmol/l SEM: 13,86

Schädigung + Glu. bei 220 µmol/l SEM: 22,2

Schädigung + Asc. bei 220 µmol/l SEM: 8,83

reine Schädigung	bei 2200 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 11,61
Schädigung + Glu.	bei 2200 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 1,47
Schädigung + Asc.	bei 2200 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 42,3

Vergleicht man die Änderungen von Amplitude und Frequenz während der Versuchsdauer, kann mit Erreichen der dritten Pentobarbitalkonzentration von 440 $\mu\text{mol/l}$ ein enormer Abfall beider Parameter registriert werden. Bis zu dieser Konzentrationserhöhung sind die Amplitudenwerte der geschützten Präparate um 10% bis 25% höher (tendenziell) als die Werte bei reiner Schädigung, währenddessen die ermittelten Frequenzen bei den Versuchen mit und ohne Protektion nicht so deutlich differieren. Der Tyrodefluß ist bei Protektion mit Ascorbinsäure gegenüber den anderen Einzelversuchen erhöht (tendenziell). Wegen der größeren Streuungen ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede.

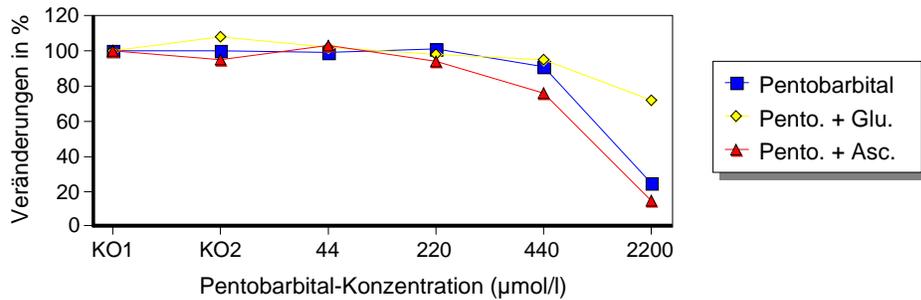


Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei 220 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 3,68
Schädigung + Glu.	bei 220 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 6,22
Schädigung + Asc.	bei 220 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 10,67
reine Schädigung	bei 2200 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 35,79
Schädigung + Glu.	bei 2200 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 0,00
Schädigung + Asc.	bei 2200 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 39,68

DWK Pentobarbital - Frequenz

Versuch mit und ohne Protektion (AU/WR)



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung bei 220 µmol/l SEM: 2,65

Schädigung + Glu. bei 220 µmol/l SEM: 1,41

Schädigung + Asc. bei 220 µmol/l SEM: 4,87

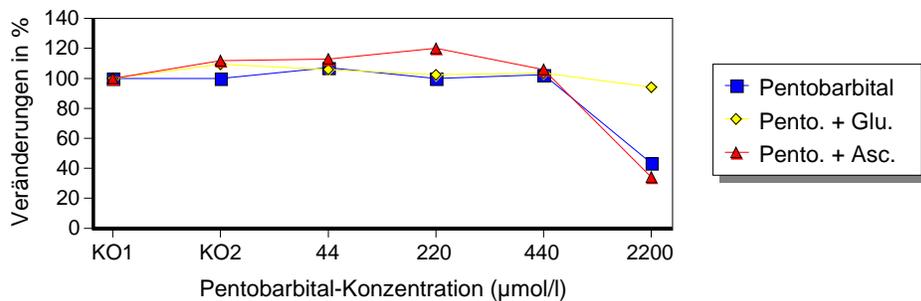
reine Schädigung bei 2200 µmol/l SEM: 10,34

Schädigung + Glu. bei 2200 µmol/l SEM: 0,00

Schädigung + Asc. bei 2200 µmol/l SEM: 2,67

DWK Pentobarbital - Leistung

Versuch mit und ohne Protektion (AU/WR)



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung bei 220 µmol/l SEM: 1,58

Schädigung + Glu. bei 220 µmol/l SEM: 4,98

Schädigung + Asc. bei 220 µmol/l SEM: 5,63

reine Schädigung	bei 2200 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 21,38
Schädigung + Glu.	bei 2200 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 0,00
Schädigung + Asc.	bei 2200 $\mu\text{mol/l}$	SEM: 1,11

Im Aurikelversuch zeigen die Wistar-Rattenherzen ebenfalls ab dritter Konzentrationserhöhung einen markanten Frequenz- und Leistungsabfall. In den Kombinationsversuchen mit Protektion kommt es durch die höchste Pentobarbitalanreicherung in der Tyrode sogar zum vollständigen Funktionsverlust einiger Präparate, wobei im Teilversuch mit Glutathion noch ein Herzpräparat und im Teilversuch mit Ascorbinsäure noch zwei Herzpräparate physiologisch funktionierten. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Protektions-Substanzen.

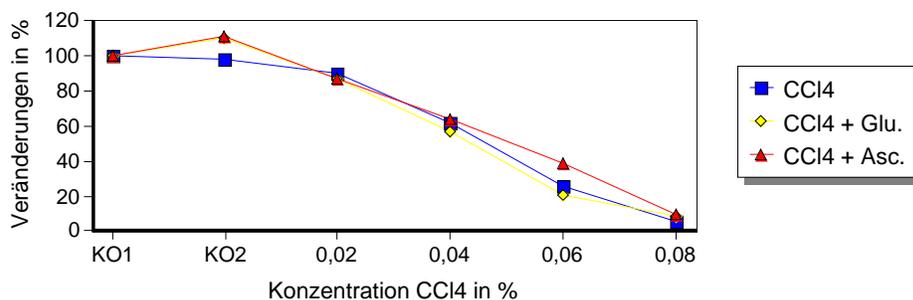
5.2.4. Schädigung durch Tetrachlorkohlenstoff

Auch die Schädigung der Herzpräparate durch Tetrachlorkohlenstoff wurde an beiden Versuchsapparaturen durchgeführt, wobei wiederum für die Langendorffanlage Wistar-Ratten und für das Vorhof-Aurikel-Präparat Meerschweinchen verwendet wurden. Die Konzentration von Glutathion bzw. Ascorbinsäure betrug analog den anderen Versuchen 32 $\mu\text{mol/l}$ bzw. von 56 $\mu\text{mol/l}$.

Die präparierten Wistar-Rattenherzen schädigte man nach den beiden Anfangskontrollen mit Konzentration von 0,02% ($1,3 \times 10^{-3} \text{mol/l}$); 0,04% ($2,6 \times 10^{-3} \text{mol/l}$); 0,06% ($3,9 \times 10^{-3} \text{mol/l}$) und 0,08% ($5,2 \times 10^{-3} \text{mol/l}$) Tetrachlorkohlenstoff, wobei die prozentualen Angaben dem jeweiligen Tetrachlorkohlenstoffgehalt der Tyrode-Lösung entsprechen.

DWK Tetrachlorkohlenstoff - Amplitude

Versuch mit und ohne Protektion (LA/WR)

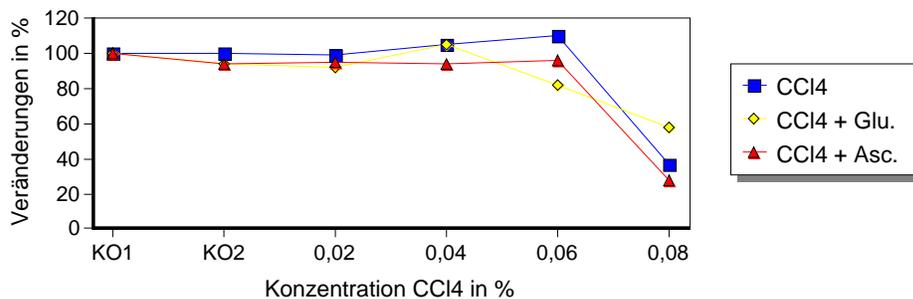


Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 5,33
Schädigung + Glu.	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 7,98
Schädigung + Asc.	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 8,89
reine Schädigung	bei $5,2 \times 10^{-3}$ mol/l (0,08%)	SEM: 3,34
Schädigung + Glu.	bei $5,2 \times 10^{-3}$ mol/l (0,08%)	SEM: 3,92
Schädigung + Asc.	bei $5,2 \times 10^{-3}$ mol/l (0,08%)	SEM: 5,73

DWK Tetrachlorkohlenstoff - Frequenz

Versuch mit und ohne Protektion (LA/WR)

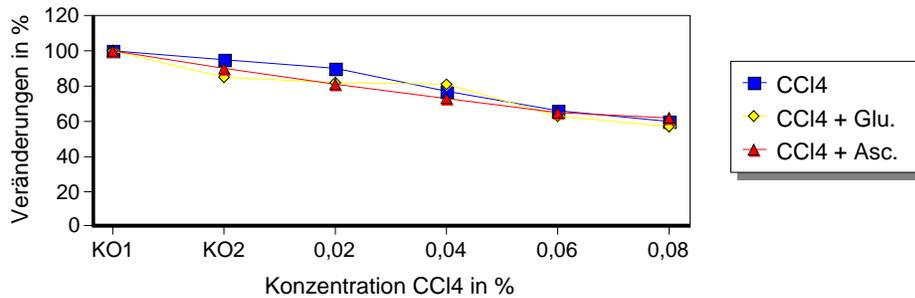


Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 7,02
Schädigung + Glu.	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 6,82
Schädigung + Asc.	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 7,26
reine Schädigung	bei $5,2 \times 10^{-3}$ mol/l (0,08%)	SEM: 23,36
Schädigung + Glu.	bei $5,2 \times 10^{-3}$ mol/l (0,08%)	SEM: 23,53
Schädigung + Asc.	bei $5,2 \times 10^{-3}$ mol/l (0,08%)	SEM: 17,01

DWK Tetrachlorkohlenstoff - Koronarfluß

Versuch mit und ohne Protektion (LA/WR)



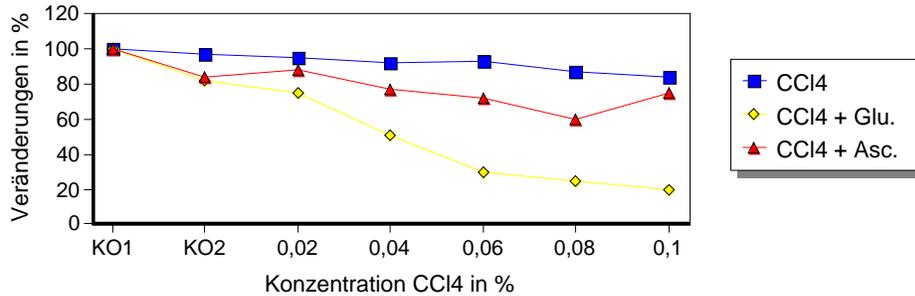
Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei $2,6 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,04%)	SEM: 6,94
Schädigung + Glu.	bei $2,6 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,04%)	SEM: 3,38
Schädigung + Asc.	bei $2,6 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,04%)	SEM: 2,63
reine Schädigung	bei $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,08%)	SEM: 4,90
Schädigung + Glu.	bei $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,08%)	SEM: 6,90
Schädigung + Asc.	bei $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,08%)	SEM: 2,95

Mit Erreichen der ersten Schädigerkonzentration von 0,02% in der Lösung beginnt die Amplitude der Herzpräparate bei den Versuchen mit und ohne Protektion kontinuierlich abzunehmen, wobei die höchste Tetrachlorkohlenstoffkonzentration zu einem mehr als 90% -igen Amplitudenabfall führt. Die Herzfrequenz ändert sich nach anfänglicher Einwirkung unseres Schädigers zunächst nur unwesentlich, um dann in fast allen Einzelversuchen nach der vorletzten Konzentrationserhöhung stark abzusinken. Der Fluß der Tyrodelösung nimmt mit der Dauer aller drei Versuche bis auf 60% ab. Insgesamt kann kein signifikant unterschiedlicher Einfluß der Protektionssubstanzen festgestellt werden.

DWK Tetrachlorkohlenstoff - Amplitude

Versuch mit und ohne Protektion (AU/MS)

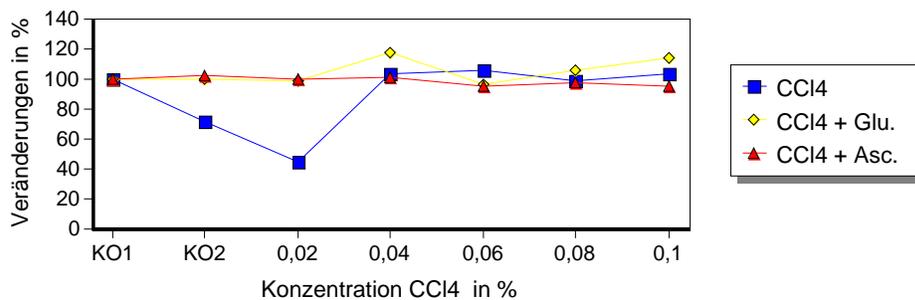


Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 2,58
Schädigung + Glu.	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 10,78
Schädigung + Asc.	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 6,08
reine Schädigung	bei $5,2 \times 10^{-3}$ mol/l (0,08%)	SEM: 3,32
Schädigung + Glu.	bei $5,2 \times 10^{-3}$ mol/l (0,08%)	SEM: 2,02
Schädigung + Asc.	bei $5,2 \times 10^{-3}$ mol/l (0,08%)	SEM: 8,47

DWK Tetrachlorkohlenstoff - Frequenz

Versuch mit und ohne Protektion (AU/MS)



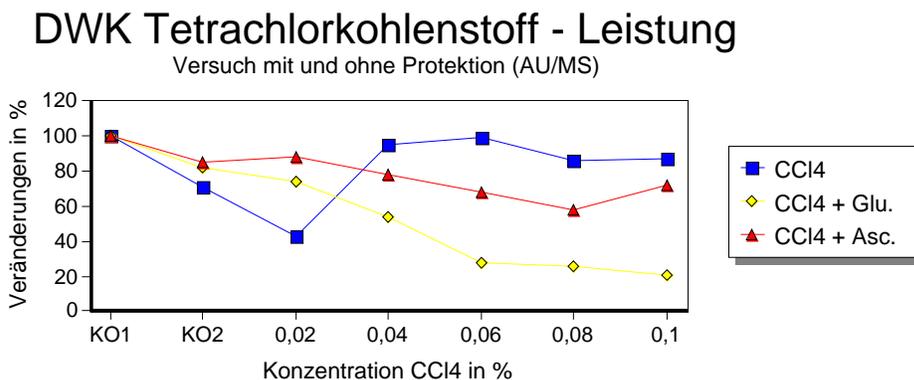
Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 1,33
Schädigung + Glu.	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 19,71
Schädigung + Asc.	bei $2,6 \times 10^{-3}$ mol/l (0,04%)	SEM: 4,29

reine Schädigung	bei $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,08%)	SEM: 2,20
Schädigung + Glu.	bei $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,08%)	SEM: 7,63
Schädigung + Asc.	bei $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,08%)	SEM: 4,86

Die Tetrachlorkohlenstoffschädigung der Vorhof-Aurikel-Präparate erfolgte bei fast gleichen Ausgangsbedingungen (zusätzliches Schädigungsintervall von 0,1% Tetrachlorkohlenstoff). Im Moment der reinen Schädigung zeigt die Amplitude im Vergleich die stabilsten Werte. Die mit einem Protektor geschützten Präparate demonstrieren dagegen einen deutlich stärkeren Verlust der Kontraktionskraft (Amplitude sinkt beim Schutz mit Glutathion auf 19% bei höchster Schädigerkonzentration von 0,1%).

Abgesehen von einem Frequenzabfall bei reiner Schädigung (0,02 % CCl_4 ; Frequenz = 44,3 %) schwankt die Herzfrequenz während der drei Einzelversuche stets um die Ausgangswerte bzw. bewegt sich in der Kombination mit Glutathion teilweise darüber (bei Schädigerkonzentration von 0,04% Frequenzerhöhung auf 117%).



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei $2,6 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,04%)	SEM: 1,85
Schädigung + Glu.	bei $2,6 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,04%)	SEM: 10,92
Schädigung + Asc.	bei $2,6 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,04%)	SEM: 6,31

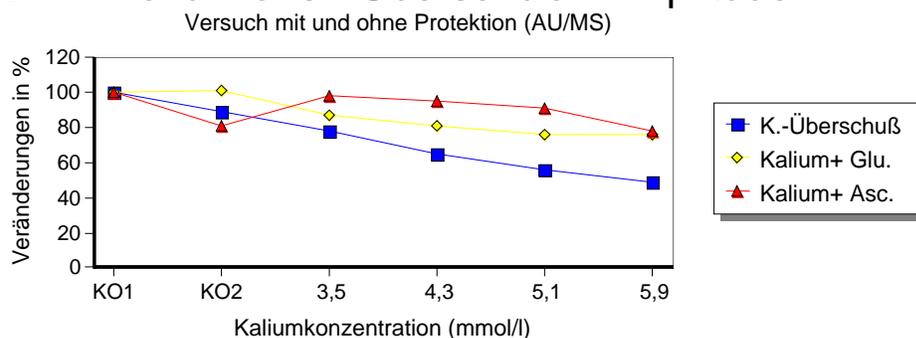
reine Schädigung	bei $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,08%)	SEM: 2,91
Schädigung + Glu.	bei $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,08%)	SEM: 1,00
Schädigung + Asc.	bei $5,2 \times 10^{-3} \text{ mol/l}$ (0,08%)	SEM: 7,63

Visuell wahrgenommen werden konnte, daß sich das Lösungsverhalten von Tetrachlorkohlenstoff in der Tyrode bei reiner Schädigung mit steter Konzentrationserhöhung verschlechterte, was durch die bläschenförmigen bzw. perlenförmigen Ablagerungen dieser chemischen Verbindung deutlich wurde. In Kombination mit Glutathion bzw. Ascorbinsäure konnten diese Lösungsschwierigkeiten von Tetrachlorkohlenstoff jedoch nicht festgestellt werden, da die Protektoren hier vermutlich als Lösungsvermittler fungieren.

5.2.5. Schädigung durch Kaliumionen-Überschuß

Die Schädigung durch K^+ -Überschuß wurde nur an Vorhof-Aurikel-Präparaten von Meerschweinchen durchgeführt. Die Tyrodelösung mußte dazu mit unterschiedlichen Mengen eines Kaliumsalzes versetzt werden. Unter Berücksichtigung des in der Normaltyrode ohnehin vorhandenen Kaliumgehaltes legte man die zu untersuchenden Konzentrationen mit 3,5 mmol/l; 4,3 mmol/l; 5,1 mmol/l und 5,9 mmol/l fest. Die Konzentrationen der mutmaßlichen Protektoren betrug hier analog zu den vorhergegangenen Versuchen $32 \mu\text{mol/l}$ bei Glutathion und $56 \mu\text{mol/l}$ bei Ascorbinsäure.

DWK Kaliumionen-Überschuß - Amplitude



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

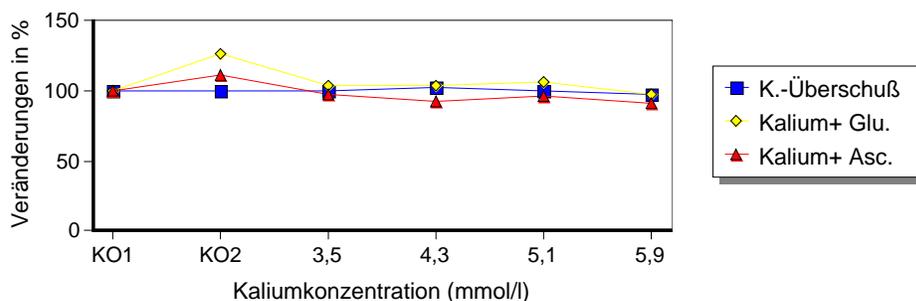
reine Schädigung	bei 4,3 mmol/l	SEM: 2,05
Schädigung + Glu.	bei 4,3 mmol/l	SEM: 4,55
Schädigung + Asc.	bei 4,3 mmol/l	SEM: 7,52

reine Schädigung	bei 5,9 mmol/l	SEM: 3,67
Schädigung + Glu.	bei 5,9 mmol/l	SEM: 5,09
Schädigung + Asc.	bei 5,9 mmol/l	SEM: 3,83

Betrachtet man zunächst die Amplitude, ist bei reiner K⁺-Schädigung ein stetiger Abfall bis unter 50% zu verzeichnen (tendenziell), die geschützten Präparate dagegen weisen durchgehend einen geringeren Verlust der Kontraktionskraft auf (tendenziell), was durchaus auf einen protektiven Effekt von Glutathion bzw. Ascorbinsäure hinweisen könnte.

DWK Kaliumionen-Überschuß - Frequenz

Versuch mit und ohne Protektion (AU/MS)



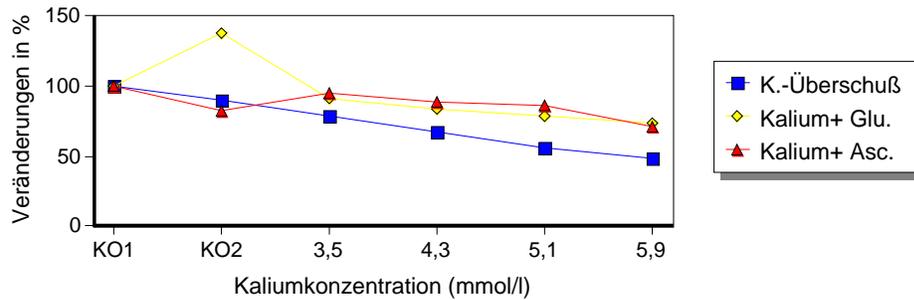
Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei 4,3 mmol/l	SEM: 1,75
Schädigung + Glu.	bei 4,3 mmol/l	SEM: 1,22
Schädigung + Asc.	bei 4,3 mmol/l	SEM: 5,35

reine Schädigung	bei 5,9 mmol/l	SEM: 3,46
Schädigung + Glu.	bei 5,9 mmol/l	SEM: 1,60
Schädigung + Asc.	bei 5,9 mmol/l	SEM: 1,60

DWK Kaliumionen-Überschuß - Leistung

Versuch mit und ohne Protektion (AU/MS)



Streuung (SEM in % des Kontrollwertes)

reine Schädigung	bei 4,3 mmol/l	SEM: 2,77
Schädigung + Glu.	bei 4,3 mmol/l	SEM: 3,82
Schädigung + Asc.	bei 4,3 mmol/l	SEM: 11,45
reine Schädigung	bei 5,9 mmol/l	SEM: 4,68
Schädigung + Glu.	bei 5,9 mmol/l	SEM: 5,03
Schädigung + Asc.	bei 5,9 mmol/l	SEM: 3,40

Die Frequenz ändert sich bei reiner Schädigung wie auch in den Kombinationsversuchen nur unwesentlich. Da durch den Kaliumionen-Anstieg in der Extrazellulärflüssigkeit am Herzen eine Verminderung der Herzfrequenz erfolgt, hätte man wenigstens bei den Versuchen mit reiner Schädigung eine langsamere Herzschlagfolge erwartet (73,77,78,79). Da sich aber ein solcher Effekt nicht erkennen läßt, muß sicherlich der gesamte Versuch sehr kritisch betrachtet werden.

6. Diskussion

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit beinhaltete die Untersuchung der kardioprotektiven Wirkung verschiedener Reduktionsmittel an experimentell geschädigten Herzpräparaten. Hierbei sollte in Form eines "Netzansatzes" überprüft werden, ob überhaupt eine Kardioprotektion für die als protektiv eingestuften Substanzen (Glutathion und Ascorbinsäure) in den verschiedenen Formen der experimentellen Myokardschädigung nachweisbar ist und inwiefern es Unterschiede bezüglich der Wirkmechanismen zwischen beiden Stoffen gibt.

Trotz entsprechender Literaturhinweise wurden in keiner der durchgeführten Versuchsreihen signifikante Veränderungen der ermittelten Parameter festgestellt, die auf kardioprotektive Effekte der angewandten Reduktionsmittel schließen lassen könnten. Zum größten Teil ergaben sich in den einzelnen Versuchsserien nach Kombination der Noxen mit den vermeintlich protektiven Substanzen grenzwertige Tendenzen zur zusätzlichen Verschlechterung der kontraktilen Funktion der Herzpräparate im Vergleich zu alleiniger Noxeneinwirkung. Als Ausnahmen, wo sich eine Protektion vermuten ließe, könnte man eventuell die Schädigung der Untersuchungsmodelle durch K^+ -Überschuß bzw. durch Pentobarbital nennen, wobei die Tendenz zu positiven Ergebnissen in beiden Schädigungsmodellen mehr die Kontraktionsamplitude betraf als die Kontraktionsfrequenz. Da diese dargestellten Veränderungen der Herzparameter jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden konnten, waren auch keine definitiven Schlußfolgerungen bezüglich der Aufgabenstellung möglich.

Der hier im Vordergrund stehende Wirkmechanismus von Glutathion und Ascorbinsäure wird als sogenannte "Scavenger"-Funktion bezeichnet und beruht auf dem "Wegfangen" von Radikalen unterschiedlicher Spezies, bedingt durch den Ablauf einer Redoxreaktion.

Die schon erwähnte Tendenz der zusätzlichen Schädigung (in Einzelfällen bis zum physiologischen Herztod) traf in fast allen Versuchsserien sowohl für Glutathion als auch für Ascorbinsäure zu. Dabei gab es jedoch keine Unterschiede bezüglich der Wirkweise beider Reduktionsmittel. In einigen Kombinationen bewirkte die Anwesenheit von Glutathion einen enormen Abfall der Meßwerte, in anderen Kombinationen wiederum wurden die niedrigsten

Werte für Amplitude und Frequenz bei Präsenz von Ascorbinsäure ermittelt, wobei auch hier eine Verallgemeinerung der Ergebnisse auf Grund der fehlenden Signifikanz ausgeschlossen ist.

Analysiert und bewertet man die vorliegenden Untersuchungen, kommen für das Ausbleiben der vermuteten Kardioprotektion durch die zwei getesteten Reduktionsmittel (Glutathion und Ascorbinsäure) verschiedene Ursachen in Betracht. Die durch die technischen Möglichkeiten gegebenen Voraussetzungen zur Analyse der Herzfunktion beschränkten sich lediglich auf die Messung der Kontraktionswerte, wie Amplitude und Frequenz, wobei weitere potentiell wichtige Mechanismen der Herzfunktion und Kardioprotektion, insbesondere elektrophysiologische Instabilisierungen bzw. die Genese von Arrhythmien nicht erfaßt werden konnten. Eine Interpretation bzw. Beurteilung eventuell aufgetretener Effekte der Antioxidantien auf Entstehung sowie Häufigkeit und Schwere von Arrhythmien war auf Grund dieser experimentellen Gegebenheiten nicht möglich.

Eine nicht ausreichende Konzentration, der als protektiv eingestuften Antioxidantien, könnte ein weitere Hauptursache für das Ausbleiben eines faßbaren Protektionsbefundes sein. Da in den Voruntersuchungen von Glutathion und Ascorbinsäure mit der Bestimmung der Dosiswirkungskurve keine der geprüften Konzentrationen einen signifikanten Effekt aufwies, war die Ermittlung einer optimalen Protektionsdosis aus diesen Vorversuchen nicht möglich. Die Festlegung auf eine Konzentration über den mikromolaren Bereich (32 µmol/l für Glutathion bzw. 56 µmol/l für Ascorbinsäure) erfolgte unter dem Gesichtspunkt einer möglichst hohen Konzentration ohne Hinweis auf eine schädigende Wirkung.

Abschließend muß auch der konzeptionelle Ansatz dieser Studie kritisch untersucht werden. Natürlich ist der Versuch durch relativ einfache "Screening"-Methoden möglichst viele Substanzen, in diesem Fall Kardionoxen mit vermeintlich kardioprotektiven Stoffen, in Kombination zu testen, immer mit einem gewissen Zufallsrisiko, betreffs des zu erwartenden Befundes, behaftet.

Die Wahrscheinlichkeit eines Negativbefundes bei einer eher zufälligen Kombination verschiedener Substanzen ohne detaillierte Arbeitshypothese ist immer sehr groß, ob es sich nun um eine breitangelegte Studie in einem wissenschaftlich wenig erforschtem Gebiet oder ob es

sich um ein Forschungsgebiet mit zahlreichen Voruntersuchungsdaten handelt. Vielversprechende Untersuchungsergebnisse mit dem Nachweis einer deutlichen Kardioprotektion hätten den "Netzansatz" dieser Arbeit aus dem positiven Zufallsbefund heraus gerechtfertigt. In diesem Fall wäre es möglich aus der Analyse des bekannten Schädigungsmusters der Noxe eine sinnvolle Hypothese für den Protektionsmechanismus der Schutzsubstanz zu entwickeln sowie eventuell unzureichende wissenschaftliche Grundlagen über die Wirkmechanismen der Noxen durch neue Erkenntnisse ergänzen zu können.

In der vorliegenden Arbeit hat sich der "Netzansatz" auf Grund der negativen Ergebnisse nicht bewährt. Man kann aber deshalb diese Untersuchungsmethode nicht grundsätzlich ablehnen. In wissenschaftlich wenig erforschten Bereichen ist ein schematischer "Netzansatz" sicherlich eine gute Orientierungsstrategie, wobei die Wahrscheinlichkeit eines positiven Zufallsbefundes aber auch hier sehr niedrig ist.

In Forschungsbereichen mit ausführlichen wissenschaftlichen Erkenntnissen ist die Verwendung eines solchen Arbeitsansatzes nur in Verbindung mit einer klar detaillierten Arbeitshypothese sinnvoll, wobei die "Screening"-Methode natürlich auch auf schon existierenden Hypothesen aufbauen könnte.

7. Zusammenfassung

Der Einsatz von Antioxidantien zur verbesserten Erholung des Myokards nach myokardialer Ischämie ist von erheblichem theoretischem Interesse.

Es ist bekannt, daß nach einer Ischämie oder Hypoxie die Bildung von sauerstoffspezifischen Radikalspezies durch Reperfusion bzw. Reoxygenation bedingt ansteigt. Die entstehenden Radikale können dabei zusätzlich zum ohnehin vorhandenen ischämischen Gewebsschaden die lebensfähigen Gewebe auf vielfältige Art und Weise schädigen. Ein konzeptionell attraktives Konzept könnte darin bestehen, geeignete Schutzfaktoren zu finden, mit denen die durch reaktive Sauerstoffprodukte verursachten Schäden eingedämmt werden können.

Ausgehend davon war die Aufgabenstellung meiner vorliegenden Arbeit, zwei bekannte Reduktionsmittel (Glutathion und Ascorbinsäure) auf ihre Potenz zur Kardioprotektion zu überprüfen.

Dabei wurden die potentiell kardioprotektiven Wirkungen am isolierten Langendorff-Herzen der Ratte während postischämischer Reperfusion untersucht und verglichen mit potentiellen Protektionswirkungen gegenüber Schädigungen des isoliert perfundierten Langendorff-Herzen durch Verapamil, Pentobarbital und Tetrachlorkohlenstoff. Außerdem wurden die gleichen Noxen (Verapamil, Pentobarbital und Tetrachlorkohlenstoff) am isoliert schlagenden Vorhof des Meerschweinchens angewandt und geprüft, ob die zu untersuchenden Reduktionsmittel auch in dieser Versuchsanordnung eine kardioprotektive Wirkung aufweisen. Die Erhöhung der extrazellulären Kaliumionen-Konzentration wurde als zusätzliche Kardionoxe in die Versuche am Meerschweinchenvorhof einbezogen.

Aus Gründen der Speziesvergleichbarkeit wurde Pentobarbital schließlich auch am Rattenvorhof angewandt zur Überprüfung der Protektionswirkung durch die beiden Reduktionsmittel.

Dementsprechend ergaben sich durch diese Untersuchungen mehrerer Noxen zusätzlich zur postischämischen Reperfusion kombinierte Testreihen von Noxen in ansteigender Dosierung mit oder ohne Protektionsmittel an insgesamt drei Untersuchungsmodellen. Mit dieser breiten Kombination von Ansätzen war beabsichtigt in einer Art "screening-Verfahren" auch unbekannt und unerwartete Protektionswirkungen der beiden zu untersuchenden Schutzsubstanzen zu erfassen. Für diesen "screening-Ansatz" wurde entschieden, die Untersuchungen möglichst schematisiert und vereinfacht durchzuführen. Dabei wurde von beiden Schutzsubstanzen nur eine

willkürlich festgelegte Konzentration untersucht, die für Glutathion 32 $\mu\text{mol/l}$ und für Ascorbinsäure 56 $\mu\text{mol/l}$ betrug.

Als zu untersuchende Parameter wurden in den Aurikeln die Kontraktionsamplitude und die Spontanfrequenz herangezogen, im Langendorff-Herzpräparat wurde der Koronarfluß untersucht, die Schlagfrequenz und die Amplitude der systolischen Kontraktion.

Als Schädigung galten Abnahmen von Kontraktionsfrequenz und Kontraktionsamplitude in den Vorhöfen und von Schlagfrequenz und Amplitude im Langendorff-Herzen.

Mit allen Noxen ergaben sich dosisabhängige Abnahmen dieser Parameter. Als Protektionswirkungen wären signifikante Verminderungen dieser noxenbedingten Abnahmen angesehen worden. Sie konnten mit beiden Reduktionsmitteln in keinem der Modelle und gegenüber keiner der Noxen nachgewiesen werden. Auch bei der postischämischen Reperfusion am Langendorff-Herzen konnte durch beide Reduktionsmittel keine signifikant schnellere Erholung der Kontraktionsamplitude erzielt werden.

Mit Hilfe des gewählten schematischen Netzansatzes an mehreren Modellen in Kombination mit einfachen Analysemethoden ergab sich der Vorteil, daß viele Kombinationen von Schutzsubstanz plus Noxe untersucht werden konnten.

Der zwangsläufige Nachteil eines derartigen "screening-Verfahren" lag in der geringen Aussagefähigkeit der vorgegeben Analyseparameter. Hätte dieses "screening-Verfahren" in einer der Kombinationen einen Hinweis auf eine unerwartete Kardioprotektion gegeben, so hätten weitergehende Untersuchungen diese unerwartete Protektion näher analysieren können. Da aber in meinen Untersuchungen keinerlei Hinweise auf eine Kardioprotektion gefunden werden konnten, müssen die Grenzen der Modelle und der gewählten einfachen Analyseverfahren bedacht werden. Für beide Substanzen war keine Protektion nachweisbar, aber die Möglichkeit einer solchen Protektion kann nicht völlig ausgeschlossen werden. Für einen solchen Ausschluß ist die Präzision der vorgegeben Untersuchungsverfahren nicht ausreichend.

8. Literaturverzeichnis

- (1) Werns SW, Lucchesi BR: Free radicals and ischemic tissue injury. *Trends Pharmacol Sci.* 1990; 11: 161-6
- (2) Anon.: Reperfusion injury after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Lancet* 1989; II : 655-7
- (3) Doppelfeld IS, Parnham MJ: Experimental conditions determine effects of ascorbic acid on reperfusion injury - comparison of tissue damage with hemodynamic parameters in rat isolated hearts. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1992; 14: 419-30
- (4) Blaustein A, Deneke SM, Stolz RI, Baxter D, Healey N, Fanburg BL: Myocardial glutathione depletion impairs recovery after short periods of ischemia. *Circulation.* 1989; 80: 1449-57
- (5) Burton KP: Evidence of direct toxic effects of free radicals on the myocardium. *Free Rad Biol Med.* 1988; 4: 15-24
- (6) Meister A, Anderson ME: Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983; 52: 711-60
- (7) Vega JA, Cavalotti C, Collier WL, De-Vincentis G, Rossodivita I, Amenta F: Changes in glutathione content and localization in rat heart as a function of age. *Mech Ageing Dev.* 1992; 64: 37-48
- (8) Singh A, Lee KJ, Lee CY, Goldfarb RD, Tsan MF: Relation between myocardial glutathione content and extent of ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 1989; 80: 1795-804
- (9) Pauly DF, Yoon SB, McMillin JB: Carnithine-acylcarnithine translocase in ischemia - Evidence for sulfhydryl modification. *Am J Physiol.* 1987; H 1557-65
- (10) Ishikawa T, Sies H: Cardiac transport of glutathione disulfide and S-conjugate: Studies with isolated perfused rat heart during hydroperoxide metabolism. *J Biol Chem.* 1984; 259: 3838-43
- (11) Barsacchi R, Pelosi G, Camici P, Bonaldo L, Maiorino M, Ursini F: Glutathione depletion increases chemiluminescence emission and lipid peroxidation in the heart. *Biochem Biophys Acta.* 1984; 804: 356-60
- (12) Ambrosio G, Santoro G, Tritto I, Elia PP, Duilio C, Basso A, Scognamiglio A, Chiariello M: Effects of ischemia and reperfusion on cardiac tolerance to oxidative stress. *Am J Physiol.* 1992; 262: 23-30
- (13) Werns SW, Fantone JC, Ventura A, Lucchesi BR: Myocardial glutathione depletion impairs recovery of isolated blood-perfused hearts after global ischemia. *J Moll Cell Cardiol.* 1992; 24: 1215-20
- (14) Hyslop PA, Hinshaw DB, Halsey WA, Schraufstatter IU, Sauerheber RD, Spragg RG, Jackson JH, Cochran CG: Mechanisms of oxidant mediated cell injury - the glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1988; 263: 1665-75

- (15) Weiss SJ: Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta Physiol Scand.* 1986; 548: 9-37
- (16) Kosower EM: Chemical properties of glutathione - in Arias IM, Jakoby WB: *Glutathione - Metabolism and function.* New York Raven Press; 1976: 1-15
- (17) Ferrari R, Ceconi C, Curello C, Guarnieri C, Caldaresa CM, Albertini A, Visoli O: Oxygen-mediated myocardial damage during ischemia and reperfusion - Role of cellular defenses against oxygen toxicity. *J Mol Cell Cardiol.* 1985; 17: 937-45
- (18) Curello S, Ceconi C, Bignoli C, Ferrari R, Albertini A, Guarnieri C: Changes in cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. *Experientia* 1985; 41: 42-43
- (19) Harlan JM, Levine JD, Callahan KS, Schwartz BR: Glutathione redox cycle protects cultured endothelial cells against lysis by extracellularly generated hydrogen peroxide. *J Clin Invest.* 1984; 73: 706-13
- (20) Menasche P, Grousset C, Gauduel Y, Piwnica A: A comparative study of free radical scavengers in cardioplegic solutions - Improved protection with peroxidase. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986; 92: 264-71
- (21) Meister A: New aspects of glutathione biochemistry and transport - selective alteration of glutathione metabolism. *Fed Proc.* 1984; 43: 3031-42
- (22) Weinberg JM, Davis JA, Abarzua M, Rajan T: Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *J Clin Invest.* 1987; 80: 1446-54
- (23) Nihro Y, Sogawa S, Izumi A, Sasamori A, Sudo T, Miki T, Matsumoto H, Satoh T: 3-O-alkylascorbic acids as free radical quenchers. 3. Protective effect on coronary occlusion-reperfusion induced arrhythmias in anesthetized rats. *J Med Chem.* 1992; 35: 1618-23
- (24) Nihro Y, Miyataka H, Sudo T, Matsumoto H, Satoh T: 3-O-alkylascorbic acids as free-radical quenchers: synthesis and inhibitory effect on lipid peroxidation. *J Med Chem.* 1991; 34: 2152-7
- (25) Kato K, Terao S, Shimamoto N; Hirata-M: Studies on scavengers of active oxygen species. 1. Synthesis and biochemical activity of 2-O-alkylascorbic acids. *J Med Chem.* 1988; 31: 793
- (26) Nihro Y, Sogawa S, Sudo T, Miki T, Matsumoto H, Satoh T: 3-O-alkylascorbic acids as free-radical quenchers: II. Inhibitory effects on some lipid peroxidation models. *Chem Pharm Bull Tokyo.* 1991; 39: 1731-5
- (27) Subramanian R, Plehn S, Nooman J, Schmidt M, Shug AL: Free radical-mediated damage during myocardium ischemia and reperfusion and protection by carnitine esters. *Z Kardiol.* 1987; 76: 41
- (28) Tennant R, Wiggers CJ: The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol.* 112: 351-361
- (29) Heusch G: Koronare Vasomotion bei Myokardischemie. *Z Kardiol.* 1989; 78: 485-99
- (30) Heusch G: Hibernation, Stunning, Ischemic Preconditioning - neue Paradigmen der koronaren Herzkrankheit? *Z Kardiol.* 1992; 81: 596-609
- (31) Ross Jr.J: Mechanisms of regional ischemia and antianginal drug action during exercise. *Prog Cardiovasc Dis.* 1989; 31: 455-66

- (32) Ross Jr.J: Myocardial perfusion-contraction matching. Implications for coronary heart disease and hibernation. *Circulation*. 1991; 83: 1076-83
- (33) Reimer KA, Loewe JE, Rasmussen MM, Jennings RB: The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977; 56: 786-794
- (34) Rahimtoola SH: A perspective on the three large multicenter randomized clinical trials of coronary bypass surgery for chronic stable angina. *Circulation*. 1985; 72: 123-135
- (35) Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF: Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest*. 1975; 56: 978-985
- (36) Bolli R: Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation*. 1990; 82: 723-38
- (37) Braunwald E, Kloner PA: The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 1982; 66: 1146-49
- (38) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: New insights into potential mechanisms of ischemic preconditioning. *Circulation*. 1991; 84: 442-5
- (39) Li Y, Whittaker P, Kloner RA: The transient nature of the effect of ischemic preconditioning on myocardial infarct size and ventricular arrhythmia. *Am Heart J*. 1992; 123: 346-53
- (40) Bolli R: Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol*. 1988; 12: 239-49
- (41) Hearse DJ: Stunning: a radical re-view. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1991; 5: 853-76
- (42) Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB: Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res*. 1989; 65: 607-22
- (43) Triana JF, Li XY, Jamaluddin U, Thornby JI, Bolli R: Postischemic myocardial stunning. *Circ Res*. 1991; 69: 731-47
- (44) Turrens JF, Thornton J, Barnhard ML, Snyder S, Liu G, Downey JM: Protection from reperfusion injury by preconditioning hearts does not involve increase antioxidant defenses. *Am J Physiol*. 1992; 262: 585-589
- (45) Marban E: Myocardial stunning and hibernation. The physiology behind the colloquialisms. *Circulation*. 1991; 83: 681-88
- (46) Schramm M, Bechem M, Franckowiak G, Thomas G, Towart R: Calcium antagonist and calcium agonist drugs. *Ion Channels in Neural membranes*. 1986; 213-25
- (47) Andersson KE, Högestätt ED: On the mechanism of action of calcium antagonists. *Acta Med Scand Suppl*. 1984; 631: 11-24
- (48) Singh BN, Ellrodt G, Peter CT: Verapamil - A review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs* 15. 1978; 169-97
- (49) Srivastava KC, Awasthi KK: Arachidonic acid metabolism in isolated aorta and lung of the rat: Effects of dipyridamole, nifedipine, propranolol, hydralazine and verapamil. *Prostaglandins Leukotrienes Med*. 1983; 10: 411-21
- (50) Schulmann DS, Herman BA, Edwards T, Ziady G, Uretsky BF: Effect on verapamil on ventricular function: studies in denervated human heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 21: 567-72

- (51) Schwinger RH, Bohm M, Erdmann E: Different negative inotropic activity of calcium antagonists in human myocardial tissue. *Klin Wochenschr.* 1990; 68: 797-805
- (52) Li GR, Ferrier GR: Verapamil prevents slowing of transmural conduction and suppresses arrhythmias in an isolated guinea pig ventricular model of ischemia and reperfusion. *Circ Res.* 1992; 70: 651-9
- (53) Brittinger WD, Schwarzbeck A, Wittenmeier KW: Klinisch-experimentelle Untersuchungen über die blutdrucksenkende Wirkung von Verapamil. *Dtsch. med. Wochenschr.* 1970; 95: 1871-74
- (54) Dikshit M, Van Oosten MH, de Graff S, Srimal RC: Free radical scavenger mechanisms in experimentally induced ischaemia in the rabbit heart and protective effect of verapamil. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1992; 318: 55-65
- (55) Nayler WG: Basis mechanisms involved in the protection of the ischaemic myocardium. The role of calcium antagonists. *Drugs.* 1991; 42: 21-7
- (56) Olsen RW: GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions. *J Neurochem.* 1981; 37: 1
- (57) Radtke J u.a.: Pentobarbital -Kurzgutachten für das Bundesgesundheitsamt. 1992
- (58) Wiedemann K: Die Wirkung von Barbituraten auf das Gehirn. In: *Intravenöse Narkosemittel.* Hrsg. v. Lehmann-CH; Landauer-B; Roth-H. Perimed Fachbuchverlag. 1984; S. 31
- (59) Strain JD, Harvey LA, Foley LC, Campbell JB: Intravenously administered pentobarbital sodium for sedation in pediatric CT. *Radiology.* 1986; 161: 105
- (60) Wagner JA, Horvath SM, Dahms TE: Cardiovascular, respiratory and metabolic adjustments to exercise in dogs. *J Appl Physiol.* 1977; 42: 403
- (61) Michenfelder JD, Milde JH, Sundt TM: Cerebral protection by barbiturate anesthesia. Use after cerebral artery occlusion in Java monkeys. *Arch Neurol.* 1976; 33: 345
- (62) Shiu GK, Nemmer JP, Nemoto EM: Reassessment of brain free fatty acid liberation during global ischemia and its attenuation by barbiturate anesthesia. *J Neurochem.* 1983; 40: 880
- (63) Bayliff CD, Schwartz ML, Hardy BG: Pharmacokinetics of highdose pentobarbital in severe head trauma. *Clin Pharmacol Ther.* 1985; 38: 457
- (64) Oguchi T, Kashimoto S, Yamagucchi T, Nakamura T, Kumazawa T: Is pentobarbital appropriate for basal anesthesia in the working rat heart model? *J Pharmacol Toxicol Methods.* 1993; 29: 37-43
- (65) Segal J, Schwalb H, Shmorak V, Uretzky G: Effect of anesthesia on cardiac function and response in the perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol.* 1990; 22: 1317-24
- (66) Menzer RE, Nelson JO: Water and soil pollutants. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 3rd ed. (Klaassen-CD; Amdur-MO; Doull-J) Macmillan Publishing Co. 1985; 825-856
- (67) Masakatsu T, Keiko M, Toshiyuki E, Shoji O: Protective effect of chromium (III) on acute lethal toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J Inorg Biochem.* 1991; 42: 1-8
- (68) Recknagel RO, Glende EH.Jr: Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1973; 2: 263-297

- (69) Slater TF: Free radicals as reactive intermediates in tissue injury. In, *Biological Reactive Intermediates II: Chemical Mechanisms and Biological Effects*. (Snyder R, Parke DV, Kocsis JJ, Jollow DJ, Gibson GG, Witmer CM) Plenum Press. 1982; 575-89
- (70) Kalf GF, Post GB, Snyder R: Solvent toxicology: recent advances in the toxicology of benzene, the glycol ethers and carbon tetrachloride. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1987; 27: 399-427
- (71) Plaa GL: Toxic responses of the liver. In, *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 3rd ed. (Klaassen-CD; Amdur-MO; Doull-J) Macmillan Publishing Co. 1985; 286-309
- (72) Surawicz B: Relationship between electrocardiogram and electrolytes. *Am Heart J*. 1967; 73: 814-34
- (73) Noble D: The surprising heart: a review of recent progress in cardiac electrophysiology. *J Physiol Lond*. 1984; 353: 1-50
- (74) Hariman RJ, Louie EK, Krahrer RL, Bremner SM, Euler D, Hwang MH, Ferguson JL, Loeb HS: Regional changes in blood flow, extracellular potassium and conduction during myocardial ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 1993; 21(3): 798-808
- (75) Gettes LS, Cascio WE, Johnson T, Fleet WF: Local myocardial biochemical and ionic alterations during myocardial ischemia and reperfusion. *Drugs*. 1991; 42: 7-13
- (76) Pelleg A, Mitamura H, Price R: Extracellular potassium ion dynamics and ventricular arrhythmias in the canine heart. *J Am Coll Cardiol*. 1989; 13: 941-50
- (77) Paterson DJ, Blake GJ, Leitch SP, Phillips SM, Brown HF: Effects of catecholamines and potassium on cardiovascular performance in the rabbit. *J Appl Physiol*. 1992; 73: 1413-18
- (78) Ponce Hornos JE, Marquez MT, Bonazzola P: Influence of extracellular potassium on energetics of resting heart muscle. *Am J Physiol*. 1992; 262: H 1081-7
- (79) Surawicz B, Chlebus H, Mazzoleni A, Ky L: Hemodynamic and electrocardiographic effects of hyperpotassemia. Differences in response to slow and rapid increases in concentration of plasma K. *Am Heart J*. 1967; 73: 647-64

9. Thesen

Thema:

Untersuchung der kardioprotektiven Wirkung von Reduktionsmitteln (Glutathion, Ascorbinsäure) an experimentell geschädigten Herzpräparaten

(1) Es erscheint von Interesse, ob Reduktionsmittel (Glutathion, Ascorbinsäure) nach exogener Zufuhr im geschädigten Myokard kardioprotektive Wirkungen zeigen und wie sich diese darstellen.

(2) Herzschädigung und folgende Reperfusion lassen die Produktion von Radikalspezies mit unterschiedlichem Schädigungsvermögen ansteigen. Mit Hilfe antioxidativer Mechanismen können "Scavenger" (Radikalfänger) myokardiale Schäden reduzieren.

(3) Glutathion hat neben anderen wichtigen Stoffwechselfunktionen als Antioxidans auch "Scavenger"-Eigenschaften.

(4) Ascorbinsäure schützt durch antioxidative Mechanismen die Zellen vor Sauerstoffradikalen und anderen toxischen Sauerstoffmetaboliten und hat "Scavenger"-Eigenschaften.

(5) Die "Scavenger"-Wirkungen von Glutathion und Ascorbinsäure sind als potentiell kardioprotektiv zu betrachten.

(6) Ischämie, die klinisch bedeutsamste Kardionoxe ist besonders geprägt durch Radikalfreisetzung und führt zu unterschiedlichen Zuständen mit eingeschränkter Funktion, wie zum "stunning Myokard" nach Reperfusion und zum "hibernating Myokard" während Mangel durchblutung.

(7) Verapamil ist ein spezifischer Kalziumantagonist und mindert durch die negative inotrope Wirkung die kardiale Kontraktionskraft.

(8) Die Anwendung von Pentobarbital als Noxe führt durch negative inotrope Wirkung zur Herzschiidigung.

(9) Tetrachlorkohlenstoff ist ein hoch toxischer Stoff, der im Organismus durch oxidative Dehalogenierung abgebaut wird, was zur Entstehung reaktiver Metabolite fiihrt.

(10) "Scavenger"-Systeme der Zellen werden durch Auftreten freier Radikale aus chlorierten Kohlenwasserstoffen inaktiviert.

(11) Kaliumionen-Überschuß beeinträchtigt die Herzfunktion durch Veränderung an den Membranen und Aktionspotentialen des Myokards bis zur Bradykardie.

(12) Die hier dargestellten Kardionoxen wurden jeweils mit den vermeintlich potentiellen Schutzsubstanzen systematisch in kombinierte Testreihen untersucht, wofür der Begriff "Netzansatz" stehen soll.

(13) Da eine Realisierung des "Netzansatzes" breit angelegte Untersuchungsreihen bedingt, müssen relativ einfache Modelle (Langendorff-Herz, Vorhof-Aurikel-Präparat) verwendet werden, die ein "Screening" ermöglichen.

(14) Glutathion und Ascorbinsäure zeigen in keiner gewählten Konzentration Hinweise hinsichtlich kardioprotektiver Wirkungen.

(15) Es ergeben sich grenzwertige nicht signifikante Hinweise auf zusätzliche Schädigungen des Myokards durch Glutathion und Ascorbinsäure.

(16) Bei einem derartigen "Screening"-Ansatz ohne klar detaillierte Arbeitshypothese ist die Aussagekraft der ermittelten Kontraktionsparameter auf Grund der beschränkten technischen Möglichkeiten nicht optimal.

(17) Die in den Voruntersuchungen vorgegebenen Konzentrationsbereiche zur Ermittlung einer optimalen Protektionsdosis von Glutathion und Ascorbinsäure waren möglicherweise nicht weit genug.

(18) Das hier vorgelegte Negativergebnis spricht dafür, daß das Prinzip des "Netzansatzes", mit dem Ziel ein "screening" hinsichtlich möglicher kardioprotektiver Wirkungen von Reduktionsmitteln vorzunehmen, keine klaren Aussagen über das kardioprotektive Potential der untersuchten Substanzen erbringen kann.

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Frank Kalder
Geburtsdatum	10.09.1967
Geburtsort	Magdeburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet, zwei Kinder

Schulbesuche

09/1974 bis 07/1978	POS Hakeborn
09/1978 bis 07/1984	"Wilhelm-Pieck"-OS in Westeregeln
09/1984 bis 07/1986	EOS "Minna-Faßauer" in Egel

Nationale Volksarmee

11/1986 bis 08/1989	Wehrdienst (Unteroffizier auf Zeit)
---------------------	-------------------------------------

Studium

09/1989 bis 08/1994	Zahnmedizinstudium an der Martin-Luther-Universität
---------------------	---

Beruf

09/1994 bis 09/1996	Tätigkeit als Ausbildungsassistent bei Dres. A. Poetzsch und A. Wilke in Magdeburg
seit 07.10.1996	Tätigkeit als niedergelassener Zahnarzt in eigener Praxis

Prüfungen

Abschluß der 10-klassigen Oberschule
Abitur
Staatsexamen Zahnheilkunde

Ballenstedt, den 01.12.1999

Frank Kalder

11.Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, daß ich die der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

Untersuchung der kardioprotektiven Wirkung von Reduktionsmitteln (Glutathion, Ascorbinsäure) an experimentell geschädigten Herzpräparaten

im Pharmakologischen Institut unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. J. Holtz ohne fremde Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ballenstedt, den 01.12.1999

Frank Kalder

12. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese bzw. eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ballenstedt, den 01.12.1999

Frank Kalder

13. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor, Prof. Dr. med. J. Holtz, für die Überlassung des Themas, die ständige Unterstützung und die zahlreichen kritischen und helfenden Hinweise. Auch möchte ich mich an dieser Stelle bei Dipl.-Ing. Ch. Gießler und den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau E. Liedtke, Frau I. Zobel, Frau M. Voigt und Frau S. Reber für die Unterstützung bei der Einarbeitung in die verschiedenen Methoden sowie für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche recht herzlich bedanken. Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dipl.-Physiker Sperling für die Herstellung der Funktionstüchtigkeit der Versuchsapparaturen.