
1. Einleitung

1.1. Pathophysiologie der Myokardischämie

Die koronare Herzkrankheit (KHK) mit ihren Folgen ist in den westlichen Industrieländern die häufigste Todesursache mit einer Prävalenz von bis zu 20% bei Männern im mittleren Lebensalter (1). Pathophysiologisch steht hierbei eine Koronarinsuffizienz, also ein Mißverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und –bedarf des Herzmuskels im Vordergrund. Ätiologisch wichtigster Hauptfaktor der Koronarinsuffizienz ist eine stenosierende Arteriosklerose, die zu einer Ischämie, also einer Verminderung oder Unterbrechung der Durchblutung des betroffenen Muskelareals führt, wobei es, abhängig vom Ausmaß der Kollateralgefäßversorgung, meist erst ab einer Koronarstenose von über 50% des Gefäßlumens zu regionalen Perfusionsstörungen kommt (2). Durch Aufbrechen eines für die Stenose verantwortlichen arteriosklerotischen Plaques mit nachfolgender Bildung eines Thrombus kann es zum ständigem Verschuß des betroffenen Gefäßes kommen. Die dadurch entstehende Hypoxie bzw. Anoxie bewirkt eine Umstellung des Stoffwechsels auf die weniger effektive anaerobe Glykolyse mit Erschöpfung der Kreatinphosphat- und ATP-Reserven und konsekutiver Anhäufung von anorganischem Phosphat. Es kommt zur Akkumulation weiterer Stoffwechselprodukte wie Laktat und Adenosin, einer intrazellulären Azidose und einem Anstieg des zytosolischen Kalziums (3). Nach 15 bis 20 Minuten erfolgt, beginnend in den subendokardialen Schichten, da hier die Kollateralversorgung am schlechtesten und der Sauerstoffbedarf am höchsten ist, die Nekrose des Myokards (4). Hierbei besteht ein zeitlicher und kausaler Zusammenhang zwischen ATP-Abfall, folgendem Anstieg des zytosolischen Kalziums und nachfolgender ischämischer Zellkontraktur, als erstes Zeichen des Zelluntergangs (5). Während einer Myokardischämie ist der Übergang zwischen vitaler Zelle und Zelltod fließend und kann durch eine rechtzeitige Rekanalisation des Verschlusses mittels Lysetherapie oder PTCA (perkutane transluminale koronare Angioplastie) gestoppt werden. Erfolgt dies nicht, kann ein Myokardinfarkt (ischämische Myokardnekrose) mit Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen, Linksherzinsuffizienz, oder Ausbildung eines Herzwandaneurysmas entstehen (6).

1.2. Phänomen des Reperfusionsschadens

Die Reperfusion, also die Wiederherstellung des Blutflusses in einem ischämischen Areal kann einen Infarkt verhindern, kann aber auch per se zu einer Schädigung des Myokards führen (7). Dieses paradoxe Phänomen wird als „reperfusion injury“ oder im Deutschen auch als „Reperfusionsschaden“ bezeichnet und ist durch reversible oder irreversible, funktionelle und strukturelle Myokardschäden gekennzeichnet, die sich in den vier folgenden verschiedenen klinischen Erscheinungsbildern äußern, welche gemeinsam oder getrennt voneinander auftreten können.

- Das „no-reflow“ Phänomen, welches eine fehlende oder inkomplette Wiederherstellung des Blutflusses nach Wiedereröffnung eines Koronargefäßes beschreibt (8)
- Ventrikuläre Arrhythmie (9),
- „Myocardial stunning“ (englisch: to stun = betäuben), das durch eine reversible kontraktile Dysfunktion für Stunden bis Tage, trotz wiederhergestelltem Blutflusses definiert ist (10),
- „Lethal reperfusion injury“, die irreversible Nekrose von Myozyten, die zum Beginn der Reperfusion noch erholungsfähig gewesen wären (11).

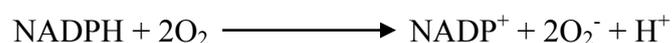
Ursache für diese Phänomene sind zahlreiche kardiodepressorische Mediatoren, wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (12), Interleukine (z.B. IL-6) (13), Plättchen aktivierender Faktor (PAF) (14, 15) und freie Sauerstoffradikale (OFR) (16, 17, 18), die während Ischämie und Reperfusion in dem betroffenen Areal gebildet bzw. eingeschwenkt werden. Als schwerwiegendste Faktoren in der Pathogenese des Reperfusionsschadens gelten eine während der Ischämie beginnende und sich in die Reperusionsphase fortsetzende Überladung der Myozyten mit Kalziumionen (sog. „calcium overload“) (3, 19), sowie die vornehmlich während der Reperfusion stattfindende Bildung freier Sauerstoffradikale (16, 17). Aktivierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) stellen dabei die Hauptquellen von freien Radikalen dar (20) und spielen somit eine tragende Rolle für die Entwicklung von Reperfusionsschäden (21, 22). Die oben genannten Mediatoren agieren zum Teil synergistisch und beeinflussen sich gegenseitig (23). So sind z.B. freie Radikale unter anderem durch Verminderung der sarkolemmalen Kalzium-ATPase (24) und der Natrium-Kalium-ATPase Aktivität (25), sowie durch Störung der sarkoplasmatischen Kalzium-Pumpe (26) am „calcium overload“ mitbeteiligt (27). Neben einem gestörten Kalziumstoffwechsel wird außerdem noch eine verminderte Sensitivität der Aktinmyosin-Fibrillen gegenüber Kalziumionen diskutiert (28, 29, 30) sowie eine Schädigung des kontraktile Apparates, insbesondere des Troponin I, als Ursache der postischämischen reversiblen kontraktile Dysfunktion (31). Bezüglich der

energetisch-metabolischen Situation während des „myocardial stunning“ ist festgestellt worden, dass durch eine beschleunigte Wiederauffüllung der durch die Ischämie erschöpften myokardialen ATP-Reserven mit Nucleotid-Vorläufern die kontraktile Funktion während der Reperfusion nicht gesteigert werden kann (32). Jedoch behält das Myokard auch während des „stunnings“ die Fähigkeit auf positiv inotrope Substanzen zu reagieren (33), ohne dass dies einen schädigenden Effekt oder eine weitere Verschlechterung der metabolischen Situation, wie es im ischämischen Zustand beobachtet wird, nach sich ziehen würde (34, 33). Es scheint hier also eher ein Defekt der Energienutzung, als der adäquaten Energiebereitstellung vorzuliegen (33, 32). In vitro ist eine Abschwächung von Reperfusionsschäden durch verschiedene Substanzen möglich, die jedoch vor Beginn der Ischämie verabreicht werden müssen. Dazu gehören Antioxidantien wie z.B. Superoxiddismutase (SOD) und Katalase (22, 35), die zwar schon in den Myozyten vorhanden sind, deren zelleigene Kapazität alleine jedoch nicht zur kompletten Abfangung freier Radikale ausreicht (36). Auch Adenosin hat bei Gabe vor, während und nach Ischämie eine kardioprotektive Wirkung (37) via Aktivierung von A₁-Rezeptoren (38). Weiterhin ist ein protektiver Effekt durch Gabe von Kalzium-Antagonisten (39, 40) sowie ACE-Hemmern beschrieben worden (39, 41).

1.3. Beteiligung von PMN am Reperfusionsschaden

1.3.1. Physiologische Funktion neutrophiler Granulozyten

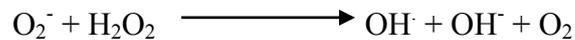
PMN sind eine 50-65% betragende (etwa 4000/μl) Subpopulation der Leukozyten im humanen Vollblut und physiologischerweise an der unspezifischen Infektabwehr beteiligt. Durch chemotaktische Stoffe wie aktivierte Komplementfaktoren, Leukotriene (z.B. LTB₄) oder Bakterientoxine angelockt wandern sie durch Diapedese aus den Kapillaren und werden dort z.B. durch Bakterienoberflächen aktiviert. Im Rahmen der Abwehrfunktion besitzen sie neben zahlreichen Enzymen wie Proteasen, Oxidasen, Lipasen und Lysozym die Fähigkeit zur Bildung freier Sauerstoffradikale, wie Superoxidanionen (O₂⁻), Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Hydroxylradikale (OH[•]) und Hypochloridionen (HOCl). Dabei nimmt der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch der Granulozyten um ein Mehrfaches zu, was als „respiratory burst“ bezeichnet wird (42). Mit Hilfe einer membranständigen NADPH-Oxidase wird während des „respiratory burst“ in neutrophilen Granulozyten Sauerstoff nach der Reaktion



zu Superoxidanionen (O_2^-) reduziert. Superoxidanionen können dann mittels der in den PMN lokalisierten Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert werden:



Sie können aber auch mit schon bereits entstandenem H_2O_2 unter Bildung hochaktiver Hydroxylradikale (OH^\cdot) reagieren:



Mittels eines ebenfalls in den PMN lokalisierten Enzyms, der Myeloperoxidase, können Chloridionen durch H_2O_2 unter Bildung von noch aggressiveren Hypochloridionen ($HOCl$) oxidiert werden (43):



Die Wirkung der vier genannten O_2 -Radikale besteht in der Denaturierung von Enzymen, Peroxidation von Zellmembranlipiden und Depolymerisation von Kollagen des Bindegewebes (42). Zur Radikalbildung stimuliert werden PMN durch ähnliche Stoffe, die auch die Chemotaxis bewirken. Dazu gehören z. B. der Komplementfaktor C5a, Leukotrien B4, bakterielle leukotaktische Peptide wie Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin (FMLP) und opsonierte Bakterien. Als bisher potentester Stimulator hat sich der Tumorpromotor Phorbolmyristylacetat (PMA) erwiesen, der auch in dem später beschriebenen Versuchsablauf als Stimulans zur phagozytären Radikalbildung verwendet wurde (44).

1.3.2. Rolle der PMN beim Reperfusionsschaden

Die Freisetzung freier Radikale stellt einen wichtigen Pathomechanismus des Reperfusionsschadens dar (siehe 1.2.) und wird zusammen mit der intrazellulären Kalzium Überladung vor allem für das „myocardial stunning“ und für Reperfusionsarrhythmien verantwortlich gemacht (19, 16). Es gibt zwei Hauptquellen der Radikalbildung, die bei der Entstehung von Reperfusionsschäden eine Rolle spielen. Zum einem ist dies die bei Reperfusion beginnende, im Gewebe stattfindende Xanthin-Oxidase Reaktion, die im Tierversuch durch Allopurinol hemmbar ist (45). Zum anderen werden PMN bei Reperfusion aktiviert (22, 36) und bilden eine Vielzahl reaktiver Sauerstoffspezies (siehe 1.3.1.). Welche Art der Radikalbildung für die Pathogenese die tragende Rolle spielt wird noch diskutiert. Die Tatsache, dass infundiertes SOD in Verbindung mit Katalase eine effiziente protektive Wirkung hat, läßt W. Forth jedoch eher eine extrazelluläre Radikalquelle, also PMN, vermuten, da SOD und Katalase nicht in die zu schützenden Zellen aufgenommen werden und somit kaum intrazellulär entstandene O_2 -Radikale abgefangen werden können (46). Neueste in vivo Untersuchungen

deuten ebenfalls auf PMN als Hauptquelle von freien Radikalen hin (20). Nach artefiziell, temporärem Koronarverschluss bei Hunden konnte gezeigt werden, dass es durch Blockierung der Adhäsion von PMN ans Endothel und Inhibierung der neutrophilen NADPH-Oxidase zur signifikant verminderten Bildung freier Radikale kam (20). Im Tierversuch konnte gezeigt werden, daß nach einem temporärem Koronarverschluß mit Ausbildung einer Myokardnekrose in Abwesenheit von PMN kleinere Infarktgebiete als in Anwesenheit von PMN entstehen, was für eine Mitbeteiligung der neutrophilen Granulozyten bei irreversiblen postischämischen Myokardschäden spricht (sog. „lethal reperfusion injury“) (11). Weiterhin wird PMN eine Rolle bei der Entstehung des „no-reflow Phänomens“ (siehe 1.2.) zugeschrieben. Der hier zugrunde liegende Pathomechanismus beinhaltet zum einem eine Okklusion der Kapillaren durch eingewanderte Granulozyten (8) (sog. „capillary plugging“), zum anderem verursachen die von PMN gebildeten freie Radikale eine endotheliale Dysfunktion, die durch eine Verminderte Freisetzung von EDRF (= endothelium-derived relaxing factor, gleichbedeutend mit Stickstoffmonoxid = NO) charakterisiert ist (47, 48). Eine verminderte NO-Produktion führt wiederum zu einer Hochregulation endothelialer Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, was die leukozytäre Diapedese noch verstärkt (49). Eine kardioprotektive Wirkung kann demnach also auch durch Gabe von NO oder L-Arginin, einem Substrat der NO-Synthase (NOS) bzw. durch Blockierung von endothelialen Zell-Adhäsionsmolekülen erreicht werden (49, 50). Für die Adhäsion der Granulozyten an das Endothel und damit für die Diapedese, die für den Pathomechanismus des Reperfusionsschadens allgemein eine Rolle spielt ist unter anderem noch der zelluläre CD18 Glykoproteinkomplex nötig (51), bei dessen Blockierung nicht nur die Adhäsion (52), sondern auch die leukozytäre H₂O₂-Produktion vermindert wird (53). Außerdem finden sich Hinweise, daß PAF (Plättchen aktivierender Faktor) nicht nur eine direkt negative inotrope Wirkung auf das Herz hat (15), sondern auch bei dem PMN vermittelten Reperfusionsschäden eine Rolle spielt (54, 55). Bei der Aktivierung der Granulozyten während der Reperfusion ist das Komplementsystem beteiligt (56), wobei hier die alternative Komplementaktivierung sowie der Faktor C5a eine tragende Rolle spielen (57). PMN sind also bei allen vier Formen des Reperfusionsschadens mitbeteiligt, wobei es teils zu einem Synergismus und gegenseitiger Beeinflussung mit anderen kardiodepressorischen Mediatoren kommt.

1.4. β -adrenerge Ansprechbarkeit des Herzens

1.4.1. β -adrenerge Ansprechbarkeit unter physiologischen Bedingungen

Das menschliche Herz wird durch das autonome Nervensystem (Sympathikus und Parasympathikus) innerviert. Die sympathischen Nervenfasern wirken hierbei über die postganglionären Nn. cardiaci auf alle Anteile des Herzens durch lokale Freisetzung von Noradrenalin ein. Außerdem beeinflussen im Blut zirkulierende Katecholamine (hauptsächlich Adrenalin, weniger Noradrenalin) die Herz­­tätigkeit. Die Wirkung beider Mechanismen ist im Wesentlichen auf eine erhöhte Membranleitfähigkeit gegenüber Kalziumionen zurückzuführen (58). Sie ist rezeptorvermittelt, wobei das Herz neben α -adrenergen und β_2 -Rezeptoren hauptsächlich im Sarkolemm lokalisierte β_1 -Rezeptoren besitzt. Durch Stimulation eines β -Rezeptors erfolgt eine Änderung des in der Zellinnenmembran gelegenen G_s -Proteins, so dass GTP (Guanosintriphosphat) gebunden werden kann. Dadurch wird die α -Untereinheit des G_s -Proteins aktiviert. Die aktivierte α -Untereinheit kann sich nun vom G_s -Protein abspalten und an die an der Membraninnenseite gelegene Adenylatzyklase anlagern. Diese wird dadurch aktiviert und wandelt ATP in c-AMP (cyclisches 3, 5-Adenosinmonophosphat) um, welches dann intrazellulär als „second messenger“ agiert. Die c-AMP Wirkung besteht in der Aktivierung von Proteinkinase A, die verschiedene Proteine und Enzyme phosphoryliert. So kommt es zu einem verstärkten Kalzium-Einstrom durch sarkolemmale Kalzium-Kanäle, was eine durch Triggerwirkung vermehrte Freisetzung von Kalzium aus dem Sarkoplasmatischem Retikulum nach sich zieht. Durch das erhöhte intrazelluläre Kalziumangebot erfolgt eine gesteigerte Umsetzung von ATP zu AMP mit erhöhter Myosin ATP-ase Aktivität und einer verstärkten Aktivierung von Troponin C. Die Muskelkontraktion wird damit schneller (positiv klinotrop) und stärker (positiv inotrop). Durch Phosphorylierung des am Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) lokalisierten Phospholamban wird Kalzium nach der Kontraktion wieder schneller in das SR aufgenommen, was eine Steigerung der Relaxationsgeschwindigkeit bewirkt (positiv lusitrop). Am Sinusknoten findet eine analoge Signaltransduktion statt, die eine Erhöhung der Herzfrequenz bewirkt (positiv chronotrop) (59). Außerdem erfolgt eine Steigerung der Erregungsleitung (positiv dromotrop), sowie der Erregbarkeit des Herzens (positiv bathmotrop) (60).

1.4.2. β -adrenerge Ansprechbarkeit und Kalziumsensitivität des „stunned myocardium“

Die reversible postischämische kontraktile Dysfunktion („myocardial stunning“) ist eine der Manifestationsformen des Reperfusionsschadens. Charakteristisch für das „myocardial stunning“ ist unter anderem, dass das Myokard trotz verminderter basaler Kontraktilität die Fähigkeit besitzt auf inotrop wirkende Substanzen zu reagieren (33). Allerdings konnte im Versuch mit isolierten Rattenherzen gezeigt werden, dass nach 30 minütiger Ischämie mit anschließender Reperfusion die positiv inotrope Antwort auf den β -Rezeptor-Agonisten Isoproterenol zwar vorhanden, jedoch vermindert war (61). Die kardialen β -Rezeptoren (β_1 mehr als β_2) waren hierbei in ihrer Dichte und Affinität herunterreguliert und die Aktivität der Adenylatzyklase vermindert. Eine direkte Stimulation der Adenylatzyklase mit Umgehung der β -Rezeptoren durch Forskolin war jedoch unverändert. Durch Gabe von SOD und Katalase konnten diese Effekte aufgehoben werden, was für O_2 -Radikale als Ursache der Schädigung spricht (61). Inkubation isolierter kardialer Zellmembranen mit Xanthin und Xanthinoxidase, H_2O_2 oder HOCl bestätigten diese Vermutung (62, 63, 64). Hierbei erwies sich HOCl als besonders wirksamer Schädigungsfaktor der Signaltransduktion, da neben β_1 -Rezeptoren auch G-Proteine sowie die Adenylatzyklaseaktivität direkt betroffen wurden (65). Hypoxieversuche an isolierten Kardiomyozyten mit anschließender Reoxygenierung zeigten eine verminderte c-AMP Produktion nach Stimulation des β -adrenergen Systems mit Isoproterenol (66). Der durch Hypoxie verursachte Defekt in der Signaltransduktion lag hier also an einer anderen Stelle. Im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen konnte jedoch im Tierversuch gezeigt werden, daß es nach 10 bzw. 30 minütiger Ligatur des Ramus interventrikularis anterior eine Stunde nach Reperfusion zu keiner Downregulation kardialer β -Rezeptoren kommt (67, 68). Es existiert also noch keine klare Aussage ob und wenn ja an welcher Stelle der Kaskade der β -adrenerge Signaltransduktion eine Schädigung im Sinne eines Reperfusionsschadens eintritt.

Für den Kontraktionszyklus der Skelett- sowie der Herzmuskulatur ist u. a. die Anwesenheit von Kalzium notwendig. Durch ein eintreffendes Aktionspotential kommt es zu einem ca. 1000-fachen Anstieg des intrazellulären Kalziums aus dem SR. Kalzium bindet sich dabei an Troponin, wodurch die hemmende Wirkung des Tropomyosins auf die Myosinköpfe aufgehoben wird und sich diese an die Aktinfilamente binden können (69). Eine verminderte Ansprechbarkeit der Aktin-Myosin-Fibrillen auf die Tropomyosin-lösende Wirkung des Kalziums würde eine herabgesetzte Kontraktilität nach sich ziehen und wird als einer der Pathomechanismen des „stunning“ diskutiert (siehe 1.2.). Durch eine Erhöhung der

extrazellulären Kalziumkonzentration mit Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration kann ein positiv inotroper Effekt erzielt werden (70), dessen Ausmaß indirekt Rückschlüsse auf die Kalziumsensitivität bzw. auf eine Schädigung des kontraktiven Apparates von postischämischen Myokard zuläßt. Versuche an isolierten Herzen (28, 29), sowie an isolierten ventrikulären Muskeltrabekeln (30) von Ratten führten zu der Annahme, daß dem „myocardial stunning“ u. a. eine verminderte Kalziumsensitivität zu Grunde liegt bzw. dass eine Schädigung des kontraktiven Apparates, insbesondere von Troponin I mit ursächlich für die reversible postischämische kontraktile Dysfunktion ist (31). Im Gegensatz dazu zeigte Hoffmeister et al. ebenfalls an dem Modell des isolierten Rattenherzens, dass die maximal aktivierbare Kraft im postischämischen Myokard unter Kalzium-Stimulation zwar vermindert ist, der prozentuale Kraftanstieg unter Kalziumerhöhung im prä – und postischämischen Myokard jedoch gleich ist und es zu keiner verminderten Kalziumsensitivität während des „stunning“ kommt (71). Ein in vivo Modell an Schweinen mit Reduzierung des Blutflusses im Ramus interventrikularis anterior bestätigte die Ergebnisse von Hoffmeister et al. (72). Es gibt also bezüglich der Frage, ob eine verminderte Kalziumsensitivität bzw. eine Schädigung des kontraktiven Apparates mitbeteiligt am Phänomen des Reperfusionsschadens ist, ebenfalls noch keine endgültige Aussage.

1.5. Fragestellung

Das Phänomen des Reperfusionsschadens ist nach wie vor Ziel zahlreicher Untersuchungen. Verschiedene Gesichtspunkte vor allem des „myocardial stunning“ werden dabei weiterhin kontrovers diskutiert, da hier wenige und auch widersprüchliche Ergebnisse vorliegen. So herrscht Unklarheit, ob die β -adrenerge Ansprechbarkeit und die Kalziumsensitivität des Herzens im postischämischen bzw. posthypoxischen Zustand beeinträchtigt ist und wenn ja, was die Ursachen dafür sind.

Ziel dieser Arbeit war die Klärung, ob nach Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung eine verminderte Ansprechbarkeit auf β -adrenerge Substanzen, sowie eine verminderte Sensitivität des Myokards auf Kalzium vorliegt. Weiterhin wurde untersucht, ob aktivierte PMN bzw. die von aktivierten PMN freigesetzten O_2 -Radikale, die eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Reperfusionsschadens spielen, eine Verminderung der β -adrenergen Ansprechbarkeit des Myokards oder der Kalziumsensitivität verursachen und ferner, ob es zu einem additiven Effekt bei zusätzlicher Induktion einer Hypoxie kommt. Für die Durchführung der Versuche wurde das Modell des isolierten Papillarmuskels gewählt, da hiermit der Einfluß vaskulärer Faktoren sowie

das Phänomen des capillary plugging außer Acht gelassen werden können. Neben kontraktilen Parametern wurden simultan Veränderungen des intrazellulären Kalziums gemessen, um zu prüfen inwieweit Kontraktilitätsverlust, Störung der β -adrenergen Ansprechbarkeit und Verminderung der Ansprechbarkeit des kontraktilen Apparates auf Kalzium mit einer Störungen des Kalziumhomöostase, im Sinne einer Kalziumüberladung des Herzens, zusammenhängen.