

4 DISKUSSION

4.1 Methodik

Es wurde ein neuartiges Versuchsmodell etabliert, welches detaillierte Studien der kleinsten koronaren Arteriolen und Venolen erlaubt. Die Kombination bewährter Modellansätze ermöglichte dabei die gezielte Untersuchung druckvermittelter Reaktionen.

4.1.1 Narkose und Präparation

Vor der Dekapitation erhielten die Tiere das Anästhetikum Ketamin, welches starke analgetische Eigenschaften besitzt, und Heparin zur Gerinnungshemmung in die Bauchhöhle. In der sich der Dekapitation anschließenden Präparations- und Stabilisierungsphase vor der Rezirkulation wurden diese Substanzen vollständig ausgewaschen, so dass medikamentenbedingte Nebeneffekte ausgeschlossen werden konnten.

In der Etablierungsphase wurde die Präparation des Herzens durch zusätzliche Ligaturen der Lungenflügel und der linken vorderen Hohlvene sowie das Vorlegen des Fadens zur Kanülierung des Truncus pulmonalis nach Integration des Herzens in das Modell optimiert. Dies leistete einen Beitrag zur 'Dichte' des Herzens, um das Perfusat ausschließlich durch das koronare Gefäßsystem zu leiten. Es gelangten maximal drei Tropfen Perfusat pro Minute direkt über die Herzoberfläche nach außen. Das entspricht der Menge des auf natürlichem Wege durch das Myokard bzw. durch Lymphgefäße abfließenden Transsudats (49). Die Einhaltung dieser Rate während der einzelnen Versuche indizierte konstante Präparationsbedingungen. Des weiteren diente sie als Nachweis einer sich physiologisch vollständig schließenden Aortenklappe bei retrograder Perfusion. Die Ligatur des linken Herzhohls in den Gruppen 'PPArt' und 'PAP+SNP' war nötig, da die Aufweitung desselben bei erhöhten Perfusionsdrücken zu einem Verdrängen der zu untersuchenden Herzoberfläche vom Deckgläschen, an welches sich das Objektiv anschloss, geführt hätte.

4.1.2 Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff

Die von Langendorff entwickelte Methode zur Perfusion und Aufzeichnung der Funktion isolierter Säugetierherzen (52) bietet den Vorteil der Untersuchung bestimmter Reaktionsmuster des isolierten Organs unabhängig vom Systemkreislauf (s. Abb. 58). Neurohumorale Einflüsse sowie kreislaufregulatorische Vorgänge, die sich im Gesamtorganismus direkt auf den koronaren Blutdruck auswirken, bestehen nicht. Im neu etablierten Modell wird der Perfusionsdruck in Untersuchungen arteriolärer Gefäße vom Untersucher als Sollwert vorgegeben und garantiert auf diese Weise eine kontrollierte myogene Reaktion. Die adäquate Pumpreglereinstellung durch den Untersucher während unterschiedlicher Perfusionsdrücke mittels des Programmes Dasy-Lab ermöglicht die Optimierung der Flusskonstanz.

Die Untersuchung des koronaren Gefäßnetzwerkes im isolierten Herzen stellt eine in situ Methode dar, bei der sich die Gefäße in ihrer physiologischen Umgebung befinden. Dies ist ein großer Vorteil gegenüber Untersuchungen isolierter, kanülierter Gefäße, denen die Einbettung in das natürliche Gewebe fehlt. Zudem ist die Isolierung der Blutgefäße selbst

umstritten, da konsekutive Gefäßalterationen nicht unwahrscheinlich sind. Aufgrund technischer Möglichkeiten ist die Untersuchung isolierter Mikrogefäße auf bestimmte Mindestgrößen beschränkt. Die kleinsten bisher mit dieser Methode untersuchten Gefäße hatten einen Durchmesser von 40 μm (43). Der Vorteil dieser Methode gegenüber in situ Methoden bestand bislang in der Möglichkeit der differenzierten Betrachtung einzelner Regulationsmechanismen des koronaren Blutflusses einschließlich der separaten Beurteilung der myogenen und der endothelialen Reaktion (43, 44, 48). Mit dem in dieser Arbeit dargestellten Modell wird die Einzelbeurteilung koronarer Kontrollmechanismen erstmalig in situ möglich.

Nachteile der ex vivo Präparationen ergeben sich, sobald der direkte klinische Bezug der Ergebnisse im Vordergrund steht. Dem Einsatz der anhand eines ex vivo Modells entwickelten, konkreten Therapieansätze müssen Untersuchungen am Gesamtorganismus vorausgehen.

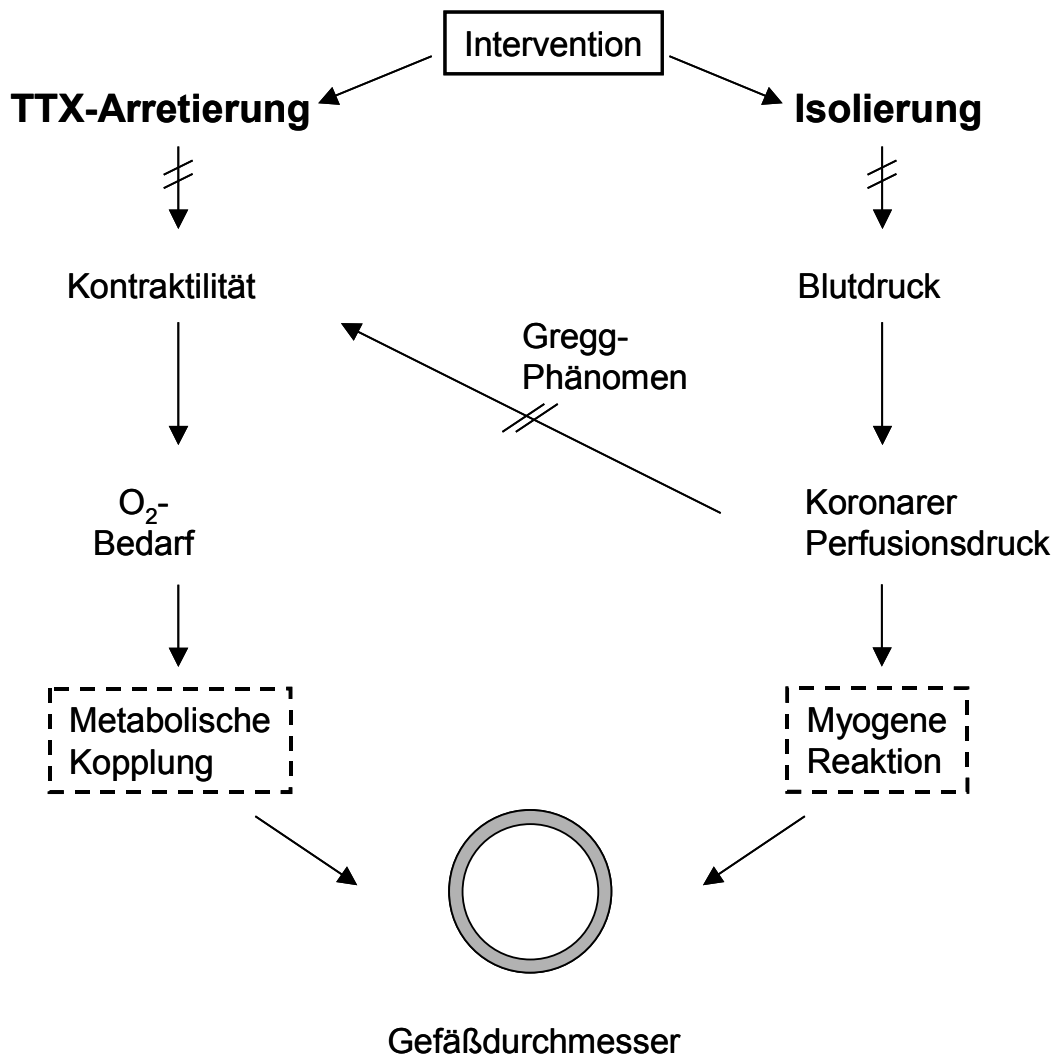


Abb. 58: Auswirkungen der Isolierung und Arretierung des Herzens auf die die Gefäßdurchmesser regulierenden Mechanismen. Am schlagenden Herzen fände auch eine Beeinflussung der Kontraktilität des Herzmuskels durch den koronaren Perfusionsdruck statt (Gregg-Phänomen).

4.1.3 Arretierung der Herzen mittels Tetrodotoxin

Tetrodotoxin arretiert in einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ selektiv herzeigene Muskelzellen, ohne die Reagibilität der glatten Gefäßmuskulatur zu beeinflussen (53). Letzteres wird durch die aktive myogene Reaktion in den Untersuchungen der Gruppe 'PPArt' bestätigt. Mit der Arretierung wurden zwei Ziele verfolgt, einen Beitrag zur maximal möglichen, optischen Auflösung während der Mikroskopie zu liefern und die Minimierung des kardialen Sauerstoffbedarfs auf den Erhaltungsbedarf infolge fehlender elektrischer und mechanischer Aktivität des Herzens herbeizuführen. Der gleichbleibend geringe Sauerstoffverbrauch des Herzens während unterschiedlicher Perfusionsdrücke in der Rezirkulation mit TTX und eine konstante Sauerstoffextraktionsrate von weniger als 30 % erlauben den Ausschluss der ursächlichen Beteiligung metabolischer Kontrollmechanismen am Gesamtergebnis (s. Abb. 14).

Am schlagenden Herzen fließt das Blut im wesentlichen während der Diastole in das arterielle Koronarsystem, da während der Systole eine extravaskuläre Kompression der Gefäße entsteht, die zu einer nahezu völligen Unterbindung des Blutflusses führt (22, 77). Dieser Einfluss kann am arretierten Herzen nicht in die Untersuchungsergebnisse mit einbezogen werden.

4.1.4 Mikroskopie und Durchmesserbestimmung

In bisherigen in situ Untersuchungen der koronaren Mikrogefäße mittels Fluoreszenzmikroskopie dienten die partielle Immobilisierung des Beobachtungsareals und die mit dem Herzzyklus getriggerte Epiillumination mittels eines Stroboskops der Optimierung der optischen Auflösung (s. Kap. 2.7). Das Einbringen von Stahlnadeln in das Myokard und zum Teil in das unmittelbare Beobachtungsfeld kann dabei zu Alterationen des Gewebes und zur Freisetzung gefäßaktiver Substanzen führen, welche die Untersuchungsergebnisse beeinflussen. Den bisherigen Untersuchungsmethoden ist gemeinsam, dass sich die Beobachtungen auf Gefäße mit Durchmessern von $\geq 30 \mu\text{m}$ bis $40 \mu\text{m}$ beschränken. Durch die Arretierung des Herzens und den qualitativ hochwertigen optischen Aufbau war es erstmals möglich, in situ kleinste koronare Gefäße mit Durchmessern bis unter $10 \mu\text{m}$ zu visualisieren. Regulationsmechanismen der Mikrozirkulation konnten untersucht werden, ohne durch methodisch bedingte Faktoren eine Beeinflussung der Ergebnisse befürchten zu müssen.

Ein Kriterium für die Eignung koronarer Gefäßabschnitte für die Fluoreszenzmikroskopie ist ihre Lokalisation in möglichst oberflächlichen Gewebeschichten. Koronare Arteriolen traten wesentlich weniger häufig in den oberflächlichen Schichten des Epikards auf als ursprünglich erwartet. Demzufolge dienten zusätzliche, alternative Protokolle der Studie koronarer Venolen, welche häufiger und in größerer Anzahl dort vorzufinden waren. Dennoch konnte insgesamt nur jeder zweite Mikroskopieversuch zur Auswertung herangezogen werden. Die Ursache dafür liegt u.a. in der Komplexität des Modells, welche zum Teil technische Probleme mit sich brachte. Versuche, während derer der pH-Wert außerhalb von 7,32 bis 7,45 lag, wurden ebenso wie Versuche, in denen die Dauer des Auffindens geeigneter Gefäße zu einer deutlichen Überschreitung der stabilen Rezirkulationsphase von 120 Minuten geführt hätte, von der Auswertung ausgeschlossen. Dies trägt dazu bei, die beobachteten Reaktionen und Ergebnisse tatsächlich auf die entsprechenden Stimuli zurückführen zu können. An einem Tier zeigte sich nach Öffnung der Brusthöhle ein Situs inversus. Dieser Versuch wurde aufgrund nicht eindeutiger anatomischer Verhältnisse aus den Ergebnissen ausgeschlossen. Da auch bei unproblematischen Versuchsabläufen eine exakte Visualisierung und Abgrenzungsmöglichkeit der Gefäßwände zur Durchmesserbestimmung nicht immer zu allen

Beobachtungszeitpunkten möglich war, ist die Optimierung der Bildqualität eine wesentliche Forderung für eine Fortsetzung des Projekts. Eine zusätzliche Kontrastverstärkung während des Versuchs und die Aufarbeitung der Videosequenzen durch eine geeignete Software sind das nächste Ziel zur weiteren Optimierung des Versuchsmodells.

Arteriolen und Venolen wurden zunächst durch den Betrachter aufgrund ihrer typischen Morphologie und ihres Verzweigungsmusters identifiziert und in jedem Versuch durch die Bestimmung der Flussrichtung fluoreszierender Mikrobeads bestätigt. Letzteres geschah vorzugsweise am Ende der Versuchsphase. Zudem konnten Bolusinjektionen von FITC-Dextran Hinweise auf die Art des visualisierten Gefäßbaumes geben, weil dabei Arteriolen zuerst, danach Kapillaren und erst einige Sekunden später Venolen hell aufleuchteten (9). Um eine vasoaktive Wirkung von FITC-Dextran auszuschließen, verglichen Kantsuka et al. (1990) die Gefäßdurchmesser koronarer Arteriolen mit polarisiertem Licht einerseits und mit FITC-Dextran andererseits. Es zeigten sich keine vasoaktiven Effekte des Fluorochroms.

In dem vorgestellten Modell trennt ein Deckgläschen die Herzoberfläche vom Objektiv. Diese Maßnahme ist unumgänglich, da ein Teil des Perfusats mit Fluoreszenzfarbstoff direkt über das Myokard nach außen abgeleitet wird. Die Vermischung des farbstoffhaltigen Perfusats mit dem Tropfen destillierten Wassers bzw. dem Ultraschallgel zur optischen Ankopplung des Immersionsobjektivs würde ansonsten zur Überstrahlung des Bildes mit Fluoreszenzlicht aus der Immersionsflüssigkeit führen. Um die Komprimierung von Gewebe zu verhindern, wurde das Deckglas nur leicht an die Herzoberfläche angelegt.

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Verwendung einer Rollerpumpe mit lediglich drei Pumpenrollen v.a. bei erhöhten Perfusionsdrücken in einigen Experimenten zu Bewegungsartefakten führte, die sich aus der Pulsatilität des Perfusatflusses durch den Rollenantrieb ergaben. Parallel zu der minütlichen Aufzeichnung von Fluss und Perfusionsdruck und pH-Messungen wurde daher das Verfolgen des zu untersuchenden Gebietes mit dem Objektiv erforderlich. Um derartige, die Experimente zusätzlich erschwerende Bewegungsartefakte zu vermeiden, sollte für zukünftige Versuche eine Pumpe mit wesentlich mehr Pumpenrollen und damit geringer Pulsatilität zur Anwendung kommen.

4.1.5 Versuchsprotokoll

Obwohl aus statistischen Gründen eine Randomisierung der Versuchsabfolge wünschenswert gewesen wäre, stand eine feste Reihenfolge der Perfusionsdruckänderungen in den Protokollen fest (s. Kap. 4.7.1 und 4.7.2). Zu Beginn der Studie war es mangels Erfahrung nicht sicher absehbar, ob und in wieweit die Mikroskopie während der gesamten Dauer der Untersuchungen zu den gewünschten, auswertbaren Videosequenzen führen würde. Mit dem feststehenden Protokoll wären mindestens Aussagen zu den initialen Phasen, also zu Reaktionen koronarer Arteriolen auf verminderte Perfusionsdrücke möglich gewesen. Die Überlegung erwies sich als begründet, da sich der Kontrast zwischen den Gefäßen und das sie umgebende Gewebe mit zunehmender Versuchsdauer verminderte. In der Gruppe 'PPArt' gingen nur diejenigen Gefäße in die Auswertung der Ergebnisse ein, die kontinuierlich bis mindestens zu einem Perfusionsdruck von 120 mmHg mit ausreichend optischer Qualität visualisiert werden konnten.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Die myogene Regulationsbreite terminaler, koronarer Arteriolen

4.2.1.1 Gruppenvergleich

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand in der Bestimmung der myogenen Regulationsbreite terminaler, koronarer Arteriolen. Nach der Präparation wurde das Herz in das modifizierte Langendorff-Modell integriert und 30 Minuten zur Stabilisierung perfundiert. Nach Umschalten auf die Rezirkulation und Arretierung des Herzens schlossen sich die spezifischen Protokolle zu den drei Gruppen, 'PPArt', 'PAP+SNP' und 'PPArtKontrolle', an. Um eine Beeinflussung der myogenen Reaktion durch hämodynamische und metabolische Faktoren ausschließen zu können, wurde das Perfusat hinsichtlich Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck und pH-Wert über den gesamten Versuchszeitraum kontrolliert (Tab. 9, 10, 11).

Die Untersuchungsgruppe 'PPArt' stellte die Hauptuntersuchungsgruppe dar. Der Perfusionsdruck wurde gezielt auf unterschiedliche Druckstufen eingestellt, um Änderungen der Gefäßdurchmesser infolge einer aktiven Regulation, der myogenen Reaktion, innerhalb des koronaren Gefäßsystems zu beurteilen. Die beobachteten Arteriolen dilatierten nach Verminderung und konstringierten infolge Erhöhung des Perfusionsdruckes. Die Konstriktion von Gefäßen nach Druckerhöhung stellt eine intrinsische Reaktion glatter Gefäßmuskelzellen dar (42), die von Bayliss nach passiver Dehnung der Gefäßwand schon 1902 beschrieben wurde.

Die Lähmung der glatten Gefäßmuskulatur durch Papaverin und Nitroprussid-Natrium vor Änderung der Perfusionsdrücke führte in der Kontrollgruppe 'PAP+SNP' zu passiven Durchmesseradaptation der Arteriolen. Ein verminderter Perfusionsdruck rief in allen Fällen eine Abnahme der Gefäßdurchmesser hervor, während die Erhöhung des Perfusionsdruckes in den meisten Fällen eine Gefäßdurchmesserzunahme durch eine druckbedingte Aufweitung verursachte. Dieses passive Verhalten der Arteriolen stellt sich graphisch in einer bemerkenswerten Linearität der Abhängigkeit der Durchmesseränderung vom Perfusionsdruck dar. Als weitere Kontrolle diente die Gruppe 'PPArtKontrolle', während der der Perfusionsdruck über einen Zeitraum von 120 Minuten konstant bei 80 mmHg blieb und alle weiteren Bedingungen mit der Gruppe 'PPArt' identisch waren. Die Bestimmung der prozentualen Durchmesseränderungen während analoger Protokollzeitpunkte ergab konstante Gefäßkaliber. Auf diese Weise konnte ein zeitlicher Einfluss auf die Gefäßdurchmesser ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der zwei Kontrollgruppen bekräftigen die Einschätzung, dass die Durchmesseränderungen innerhalb der Gruppe 'PPArt' auf einer aktiven, myogenen Reaktion beruhten und dass die Dauer der Rezirkulationsphase keinen Einfluss auf die Gefäßkaliber hatte. Insgesamt wird die Beobachtung von Larach et al. (1990), dass die Reagibilität glatter Gefäßmuskelzellen nach der Arretierung des Herzens durch TTX in der gewählten Konzentration erhalten bleibt, bestätigt.

Die beobachteten Durchmesseränderungen innerhalb der Gruppe 'PPArt', durch die aktiv zur Blutflussregulation beigetragen wurde, zeigen eine größere Streuung als die Durchmesseränderungen der Gruppe 'PAP+SNP' und 'PPArtKontrolle'. Eine hohe Streuung der Daten infolge aktiver Durchmesserregulation wurde schon in früheren Untersuchungen beobachtet (13, 30). In der vorliegenden Arbeit wurden zwar Mikrogefäße einer bestimmten Größenklasse beurteilt, eine Differenzierung der Lokalisation dieser Gefäße im koronaren Gefäßsystem war methodisch bedingt jedoch nicht möglich. Weder Untersuchungen iso-

lierter Gefäße noch in vivo Experimente erlauben dies. Die Berücksichtigung der Topographie der Segmente bleibt mathematischen Modellen vorbehalten. Es ist anzunehmen, dass sich die beurteilten Arteriolen an unterschiedlichen Stellen im Hinblick auf die Gefäßverzweigung des koronaren Systems befanden, d.h. dass den untersuchten Arteriolen eine unterschiedliche Anzahl verschiedener Gefäßgrößenklassen vorgeschaltet war. Dies hätte einen unterschiedlichen Basistonus dieser Mikrogefäße bedingt. Die Daten führen zu der Annahme, dass der Basistonus einiger Gefäße so hoch war, dass die Zunahme des Perfusions- und somit intravasalen Druckes die Kontraktionskraft, die diese Gefäße im Sinne einer myogenen Konstriktion entgegensetzen konnten, überschritten. In der Gruppe 'PPArt' ist dies unabhängig von der Zugehörigkeit zu einem Herzen zu beobachten (Abb. 19).

Die Analyse der Druck-Fluss-Beziehungen (Abb. 32 bis 34) führte zu dem Ergebnis einer deutlich geringeren Steigung in der Gruppe 'PPArt' verglichen mit der Gruppe 'PAP+SNP' während zunehmender Perfusionsdrücke. Dies ist eine zwingende Folge der aktiven, myogenen Regulation im Sinne der Autoregulation, durch welche der Blutfluss unabhängig von Änderungen des arteriellen Perfusionsdruckes relativ konstant gehalten wird (34). Die Druck-Fluss-Kurve bei normaler Herzarbeit hat einen stufenförmigen Verlauf mit einem Plateau mit geringer Steigung im Druckbereich zwischen 60 mmHg und 120 mmHg (58). Demgegenüber wurde bei verminderter Herzarbeit eine Ausweitung dieses Plateaubereichs auf niedrigere Drücke festgestellt (58). Die Arretierung der Herzen und somit die Herabsetzung der Herzarbeit auf ein Minimum in den vorliegenden Untersuchungen erklärt die lineare Abhängigkeit der einzelnen Flusskurven vom Perfusionsdruck in der Gruppe 'PPArt', da ein steiler Abfall der Druck-Fluss-Beziehung erst bei einem Perfusionsdruck unter 40 mmHg zu erwarten wäre.

In einer früheren Untersuchung an schlagenden Hundeherzen verursachten Adenosin und zu gleichwertiger Hypotension führende Konzentrationen von Nitroglycerin eine äquivalente Dilatation arterieller, koronarer Gefäße mit Ausgangsdurchmessern zwischen 20 μm und 500 μm (30). Dabei konnte ein deutlicherer Effekt auf kleinere Gefäßsegmente beobachtet werden. Der in denselben Experimenten aus der Druck-Fluss-Beziehung ermittelte koronare Gesamtwidestand wurde aber deutlich stärker durch Adenosin als durch Nitroglycerin vermindert. Die vermutete Ursache dieser Diskrepanz lag in einem besonders starken Effekt von Adenosin auf Widerstandsgefäße, die durch die verwendete Methode nicht visualisiert werden konnten, d.h. Gefäße $< 20 \mu\text{m}$. Dies war ein Hinweis auf das enorme Ausmaß der in diesem Falle metabolisch kontrollierten Widerstandsregulierung im am weitesten distal gelegenen, arteriolären Gefäßabschnitt. Weitere Untersuchungsergebnisse weisen darauf hin, dass unter Kontrollbedingungen 55 % des koronaren Widerstandes in Gefäßen $< 100 \mu\text{m}$ liegen (11). In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Widerstandsänderungen der beobachteten Gefäße in den einzelnen Gruppen aufgrund der gemessenen Durchmesser berechnet. In der Gruppe 'PAP+SNP', in der die Gefäße vor Änderung der Perfusionsdrücke gelähmt wurden, führten die Perfusionsdruckminderung und -steigerung zu Widerstandszunahmen bzw. -abnahmen, die aus einem passiven Verhalten resultierten. In der Gruppe 'PPArt' verdeutlicht ein mit abnehmendem Perfusionsdruck sinkender Widerstand durch Dilatation und mit zunehmendem Perfusionsdruck steigender Widerstand durch Konstriktion auch an dieser Stelle die aktive Reaktion der Gefäße. Um die Relevanz der Widerstandsregulation in dem durch Mikroskopie erstmalig untersuchten, präkapillären Gefäßsegment zu beurteilen, wurden die auf Durchmesserdaten basierenden Berechnungen der Widerstandsänderungen des beobachteten Gefäßsegmentes den aus der Druck-Fluss-Beziehung ermittelten, gesamten, koronarvaskulären Widerstandsänderungen gegenübergestellt. Während jeder Stufe der Perfusionsdrucksänderung war das Ausmaß der Wider-

standsänderung größer im terminalen, arteriolären Gefäßsegment als im gesamten koronaren Gefäßsystem. Dies deutet darauf hin, dass das untersuchte, terminal-arterioläre Gefäßsegment an der Regulation des gesamt-koronaren Widerstandes entscheidend beteiligt ist und einen wesentlichen Anteil der myogen vermittelten Anpassung des koronaren Widerstands an den Perfusionsdruck hat.

4.2.1.2 Mögliche Ursachen segmentaler Unterschiede

Die Einteilung aller Gefäße in zwei Segmente mit Ausgangsdurchmessern $< 10 \mu\text{m}$ und $\geq 10 \mu\text{m}$ zeigte einen markanten Unterschied im Ausmaß der myogenen Antwort. Während bei weniger stark geänderten Perfusionsdrücken von 60 mmHg und 100 mmHg die mittlere Durchmesseränderung sehr ähnlich war und nur einzelne Gefäße des kleinsten Segmentes bei 60 mmHg deutlich stärker reagierten, zeigten Kleinstgefäße (Ausgangsdurchmesser $< 10 \mu\text{m}$) bei stärkerer Änderung des Perfusionsdruckes (40 mmHg und 120 mmHg) auch im Median deutlichere Reaktionen als der Gefäßabschnitt mit den größeren Ausgangsdurchmessern.

Die in dieser Arbeit untersuchten Gefäße haben deutlich geringere Ausgangsdurchmesser als diejenigen, die folgenden Untersuchungen zugrunde lagen, dennoch erscheinen die Ergebnisse in diesem Zusammenhang erwähnenswert. Chilian et al. (1990) beschrieben nach dem Vergleich zweier Gefäßgrößenklassen ($< 150 \mu\text{m}$ und $> 150 \mu\text{m}$) und Kanatsuka et al. (1990) für arterielle Mikrogefäße $< 100 \mu\text{m}$ und $> 100 \mu\text{m}$ eine deutlichere Reaktion von Gefäßen mit niedrigeren Ausgangsdurchmessern im Vergleich zu denen mit größeren Ausgangsdurchmessern auf eine Absenkung des Perfusionsdruckes. In beiden Studien wurden Gefäße bis $400 \mu\text{m}$ in vivo beurteilt. Geht man davon aus, dass ein Teil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, präkapillären Mikrogefäße einer große Fülle übergeordneter Segmente nachgeschaltet ist, so ist Folgendes zu bedenken: Mit abnehmendem Ausgangsdurchmesser fällt bei vermindertem Perfusionsdruck der intraluminale Druck in Richtung Kapillargebiet. Intravasale Druckmessungen fanden in der vorliegenden Arbeit zwar nicht statt, doch ist diese Annahme durch plausible Hinweise in der Literatur auf einen stärkeren transmuralen Druck in größeren Gefäßen als in kleineren Arteriolen berechtigt (11, 59, 76). Am schlagenden Hasenherzen in vivo wurde der Druckabfall zwischen Aorta und Arterien mit abnehmenden Durchmessern beurteilt. Zum Vergleich unterschiedlicher Größenklassen erfolgte die Einteilung aller Gefäße in zwei Gruppen, kleiner und größer als $140 \mu\text{m}$ Durchmesser. Es bestand ein umgekehrtes Verhältnis zwischen dem Ausmaß der Druckänderungen und den arteriellen Durchmessern, mit dem stärksten Druckabfall zwischen Aorta und Arterien unter $140 \mu\text{m}$ Durchmesser (59). Eine Studie zu mikrovaskulären Druckverhältnissen in der linken Herzkammerwand der Ratte ergab keine signifikanten Druckgradienten zwischen Aorta und großen Arteriolen bis mindestens $150 \mu\text{m}$ Durchmesser, während sich in Gefäßen $< 100 \mu\text{m}$ ein erheblicher Druckabfall zur Aorta zeigte (76). Als Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse größerer Gefäße ($> 140 \mu\text{m}$ bzw. $> 150 \mu\text{m}$) wird neben der Beurteilung verschiedener Tierspezies die in letztgenannter Studie invasive Methode, die zu einer Beeinflussung der Resultate geführt haben kann, diskutiert (12). In den Experimenten wurde das der Untersuchung unmittelbar zugrunde liegende Kammerareal durch das Einbringen von Nadeln in das Myokard vollständig immobilisiert. Eine traumatisch bedingte Gefäßdilatation hätte eine maßgebliche Beeinflussung der Messungsergebnisse zur Folge.

Indirekte Methoden wie die Computermodellierung, anhand derer das Ziel verfolgt wird, durch mathematische Simulationsmodelle zur Aufklärung der koronaren Blutflusskontrolle beizutragen, bauen auf experimentell erworbenen Erkenntnissen auf. Bekannte Regulationsmechanismen, die insbesondere auf Ergebnissen isolierter Gefäße und auf Interpretationen der anhand von in vivo Experimenten erbrachten Daten beruhen, werden in mathematischen Modellen kombiniert, um die komplexe Interaktion der Mechanismen zu begreifen. Ein wichtiger Aspekt im Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist folgender: Eine myogene Kontrolle kleinster, arteriolärer Mikrogefäße wird zwar nicht grundsätzlich ausgeschlossen, mathematische Berechnungen führen jedoch zu der Einschätzung, dass die myogene Aktivität vorgeschalteter, größerer Gefäße zu einer Attenuierung der Druckänderungen in Kleinstgefäßen führt, wodurch eine myogene Reaktion kleinster Gefäße vermindert wäre bzw. ausbliebe. Diese Hypothese steht in offensichtlichem Gegensatz zu den anhand dieser Arbeit ermittelten Daten. In den vorliegenden Untersuchungen wurden erstmalig auch druckvermittelte Reaktionen präkapillärer Mikrogefäße beurteilt und die Ergebnisse zeigen, dass Änderungen des Perfusionsdrucks durchaus zu Reaktionen der am weitesten distal gelegenen Gefäßgebiete führten. Möglicherweise ist die myogene Reaktion größerer Arteriolen in vivo nicht derartig ausgeprägt, dass die Druckverhältnisse in Kleinstgefäßen von Änderungen des Perfusionsdrucks unbeeinflusst bleiben. Dies sollte bei der Etablierung indirekter Methoden zur Untersuchung der Regulationsmechanismen der koronaren Mikrozirkulation in Zukunft berücksichtigt werden.

Ein weiterer, wichtiger Aspekt der Erklärung des unterschiedlichen Ausmaßes der myogenen Reaktion ist der Aufbau der Gefäßwand in den zwei getrennt betrachteten Segmenten. Histologisch wird die Schicht glatter Muskelzellen ab einem Durchmesser von 20 μm in Richtung Kapillargebiet ansteigend lückenhaft (6, 26). Ein zunehmend lockerer Zellverband der Gefäßwand könnte zu einem deutlicher ausgeprägten Weitungsvermögen führen. Einzelne Kleinstgefäße dilatieren stärker nach Verminderung des Perfusionsdruckes als Arteriolen mit größeren Ausgangsdurchmessern (s. Abb. 30). Bei einem Perfusionsdruck von 40 mmHg war auch im Mittel eine deutlich stärker ausgeprägte Dilatation der kleineren Arteriolen zu beobachten. Die Hypothese eines zunehmenden Weitungsvermögens bei Abnahme des vaskulären Muskelzellenanteils wird durch die stärkere passive Aufdehnung der Kleinstgefäße ($< 10 \mu\text{m}$ Ausgangsdurchmesser) nach Erhöhung des Perfusionsdruckes in der Gruppe 'PAP+SNP' gestützt. Die im Mittel stärkere Konstriktion der kleineren Arteriolen der Gruppe 'PPArt' nach Erhöhung des Perfusionsdruckes auf 120 mmHg lässt sich durch den Anteil gefäßeigener Muskelzellen nicht erklären. Die Erhöhung des Perfusionsdruckes auf 140 mmHg führte in der Gruppe 'PPArt' zu einer Konstriktion, deren Ausmaß in den Kleinstgefäßen ($< 10 \mu\text{m}$ Ausgangsdurchmesser) im Mittel geringer war als bei weniger starken Steigerungen des Perfusionsdrucks (s. Abb. 30). Die Annahme einer ursächlichen Beteiligung hoher Spannungszustände (Basistonus) einiger Gefäßwände während der Ausgangsbedingungen wurde bereits an anderer Stelle (Kap. 6.2.1.1) erläutert.

Chilian et al. (1991) beschreiben eine sehr uneinheitliche Verteilung der α_1 - und α_2 -adrenergen Rezeptoren in der epikardialen Mikrozirkulation. Ähnlich könnten auch die zellulären Strukturen, die die myogene Reaktion vermitteln, wie spannungsaktivierbare Ionenkanäle in den untersuchten Gefäßabschnitten unterschiedlich exprimiert sein. Ein möglicher Einfluss weiterer, bisher unbekannter Faktoren auf die beobachteten Durchmesseränderungen präkapillärer Arteriolen ($< 10 \mu\text{m}$ Ausgangsdurchmesser) kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

4.2.2 Die myogene Regulationsbreite postkapillärer, koronarer Venolen

Die Untersuchung der myogenen Regulationsbreite postkapillärer, koronarer Venolen stellte ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar, welches es alternativ bei Nichtauffinden geeigneter Arteriolen zu verfolgen galt. Bisher fanden Venolen, die in wesentlich höherer Anzahl in den oberflächlichen Schichten des Epikards vorzufinden sind, deutlich weniger Beachtung als arterioläre Widerstandsgefäße. In den Arteriolenversuchen steuerte der Computer zur Aufrechterhaltung eines vorgegebenen Solldrucks die Pumpenleistung. Bei Entschluss zu einem Versuch der Gruppen 'Venolen' oder 'KontrolleVenolen' wurde der vorherrschende Koronarfluss abgelesen und sodann der Pumpenantrieb manuell auf die Leistung eingestellt, die zu der zuvor bestimmten computergesteuerten Flussrate bei einem Perfusionsdruck von 80 mmHg führte. Dem Protokoll entsprechend erfolgte bei konstantem Fluss durch manuellen Pumpenantrieb daraufhin die stufenweise Erhöhung des rechtsatrialen und somit venösen Druckes in der Gruppe 'Venolen' bzw. die Perfusion über 120 Minuten bei konstanten rechtsatrialen Druckverhältnissen.

Aufgrund des geringen Beitrags zum koronaren Gesamtwiderstand, beschränkt sich die Datenauswertung venolärer Gefäße in dieser Arbeit auf die Bestimmung der prozentualen Durchmesseränderungen. Die Ergebnisse der Versuchsgruppe 'Venolen' verdeutlichen, dass die stufenweise, rechtsatriale Drucksteigerung zu einer graduellen Durchmesserzunahme des überwiegenden Teils der Venolen führte, während einige Gefäße ihren Durchmesser bei 5 cmH₂O und 10 cmH₂O verminderten (Abb. 50, 51). Dies bestätigt die zweite Hypothese der vorliegenden Arbeit, die besagt, dass die Erhöhung des Druckes des rechten Vorhofs und damit in den koronaren Venen einen Einfluss auf postkapilläre Venolendurchmesser hat.

In der Gruppe 'KontrolleVenolen' wurden die Herzen im Verlauf der Rezirkulationsphase mit konstanter Flussrate ohne Änderung des rechtsatrialen und somit venösen Druckes perfundiert. Dennoch stieg der Perfusionsdruck im Verlauf einiger Versuche und somit im Mittel der Gruppe deutlich an (Tab. 14). Abbildung 57 veranschaulicht, dass zwar Durchmesseränderungen stattfanden, diese in ihrem Ausmaß aber nicht denen der Gefäße der Gruppe 'Venolen' entsprachen. Des Weiteren ist keine systematische Tendenz der Durchmesseränderungen ersichtlich. Erklären lässt sich die Zunahme des Perfusionsdrucks durch eine im Verlauf der zugrundeliegenden Versuche zunehmende Ödematisierung des Herzwesens. Die mit einem erhöhten Gewebedruck einhergehende Kompression der Gefäße würde sich vor allem auf das Kapillargebiet auswirken, in dem jede Muskelzelle von Austauschgefäßen umgeben ist. Demzufolge würde der Druck in den arteriellen Gefäßen ansteigen, wodurch sich der vor der Aortenkanüle gemessene Perfusionsdruck ebenfalls erhöhte. Venöse Gefäße blieben davon weitgehend unbeeinflusst.

Obwohl die Untersuchungen im hier dargestellten Modell keine intravaskulären Druckmessungen erlaubten, ist davon auszugehen, dass die Erhöhung der dem Koronarsystem nachgeschalteten Wassersäule in der Gruppe 'Venolen' sekundär eine analoge Druckerhöhung in den Venolen zur Folge hatte. Verschiedene Hypothesen können zur Erklärung der Ergebnisse herangezogen werden. Kuo et al. (1993) beobachteten an isolierten Venolen, dass die Erhöhung des intravasalen Druckes auf 20 cmH₂O bis 40 cmH₂O eine deutliche, initiale Durchmesserzunahme hervorrief, der sich eine Gefäßkonstriktion anschloss, welche aber nicht zum Unterschreiten der Ausgangsdurchmesser führte. Eine derartige, schwach ausgeprägte myogene Reaktion ist auch in den hier untersuchten Gefäßen denkbar. Die zu einer Unterschreitung ihrer Ausgangsdurchmesser führende Kontraktion einzelner Venolen könnte ein Hinweis auf eine in diesen Gefäßen ausgeprägtere myogene Reaktion sein.

Alle untersuchten Gefäße wurden ihrem Ausgangsdurchmesser entsprechend in zwei Gruppen ($< 15 \mu\text{m}$ und $\geq 15 \mu\text{m}$) eingeteilt und verglichen. Die Durchmesser kleinerer Venolen nahmen mit steigendem, atrialem Druck stärker zu als diejenigen größerer Venolen. Das vorherrschende Kennzeichen der Venen ist die Dehnungsfähigkeit ihrer Gefäßwand (56). Da gefäßeigene Muskelzellen erst mit zunehmender Größe der Venolen in die Wand eingelagert sind, kommt eine größere Compliance bei geringer ausgeprägter myogener Reaktion in kleineren Gefäßen als Ursache der deutlicheren Durchmesserzunahme bei Druckerhöhung in Betracht. Die Compliance scheint eine wichtige Rolle bei der venösen Widerstandsverteilung zu spielen.

Die Regulationsmechanismen koronarvenöser Gefäße nehmen in ihrer Bedeutung für die Regulation der Herzdurchblutung zu, wenn ihr Anteil am gesamtvasculären Widerstand, z.B. infolge ausgeprägter arteriöler Dilatation, deutlich ansteigt (47).

4.2.3 Gesamtbetrachtung und Ausblick

Ergebnisse experimenteller Untersuchungen und klinische Beobachtungen geben eindeutige Hinweise darauf, dass ein wesentlicher Teil der gesamt-koronaren Widerstandsregulation in der Mikrozirkulation stattfindet. Um das komplexe Wechselspiel verschiedener, interagierender Kontrollmechanismen zu erfassen, ist primär das Verständnis jedes einzelnen involvierten Faktors hinsichtlich der Regulation entlang der Gefäßsegmente, der effektiven Regulationsbreite und der zellulären Signalwege essentiell. Eine separate Betrachtung der beteiligten Regulationsmechanismen in den kleinsten Gefäßen der koronaren Mikrozirkulation wird durch das neu etablierte Modell zum ersten Mal in situ möglich. Einflüsse des Systemkreislaufs werden ebenso wie die neurohumorale Kontrolle durch die Organisierung unterbunden, und wechselnde metabolische Einflussfaktoren können durch Minimierung des Sauerstoffbedarfs auf den Erhaltungsbedarf bei einem kontrollierten Sauerstoffangebot ausgeschlossen werden. Die flussvermittelte, endotheliale Reaktion stellt einen weiteren wichtigen Regulationsmechanismus dar. Eine ursächliche Beteiligung desselben an den dargestellten Ergebnissen ist nicht vollständig auszuschließen, jedoch deuten sowohl in vivo (72) als auch in vitro (43, 48) Studien darauf hin, dass Regulationen, die durch veränderte Flussverhältnisse hervorgerufen werden, ihre Wirkung vornehmlich in stromaufwärts befindlichen Arteriolen der Mikrozirkulation mit Durchmessern um $200 \mu\text{m}$ entfalten. Kuo et al. (1995b) beobachteten ein umso stärkeres Ausmaß der flussinduzierten Reaktion, je größer der Ausgangsdurchmesser der Arteriolen war. Die Untersuchung des flussabhängigen, endothelialen Kontrollmechanismus in Gefäßen mit Durchmessern von $< 30 \mu\text{m}$ war Mangels einer geeigneten Methode bislang nicht möglich, eine Beteiligung an den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen scheint aufgrund genannter Studienergebnisse jedoch eher unwahrscheinlich. Zum Nachweis wird die selektive Enzymblockade der für diesen Mechanismus wichtigen NO-Synthase bei einer zu der Gruppe 'PPart' ansonsten identischen Untersuchung vorgeschlagen.

Bislang galt das Gefäßsegment der kleinsten koronaren Arteriolen, in dem die höchste Sensitivität gegenüber gewebeeigenen Überträgerstoffen beobachtet wird (13, 30, 36, 37, 48), als die Domäne der metabolischen Kontrolle. Die Untersuchungen dieser Arbeit führen zu dem Ergebnis, dass auch die mit Änderungen der Druckverhältnisse einhergehende, myogene Reaktion ein hohes Ausmaß in präkapillären Arteriolen hat und einen wesentlichen Beitrag zur Kontrolle des Gesamtwiderstandes des Koronarsystems leistet.

Das vorgestellte Modell ermöglicht weitere Studien, die zu wichtigen Erkenntnissen einzelner Regulationsmechanismen der koronaren Mikrozirkulation führen können. Bei der Einordnung der erbrachten Ergebnisse in den Gesamtzusammenhang der Herzfunktion ist zu beachten, dass in vivo erst die ständige Interaktion einer ganzen Reihe von Faktoren zur physiologischen und pathologischen Blutflussregulation führt. Vasokonstriktorisches und – dilatatorische Faktoren können dabei in Konkurrenz treten. Es ist ferner zu bedenken, dass Anhaltspunkte für eine unterschiedliche Effektivität der den koronaren Fluss regulierenden Mechanismen in Epi- und Endokard bestehen (41). Durch TTX wurden in den dargestellten Untersuchungen die Kontraktionen des Herzens unterbunden. Diese führen am schlagenden Herzen zu einem Anstieg des intramyokardialen Gewebedrucks, der in der Systole zum Kollabieren eines Teils der Gefäße führt. Es ist zu beachten, dass endokardnahe Schichten deutlich stärker durch den entwickelten Kammerdruck beeinflusst werden als solche des Epikards (26). Der intramyokardiale Einfluss verschiedener Herzzyklusphasen auf die Durchmesser epikardialer, arterieller Mikrogefäße wird kontrovers diskutiert (4, 37, 75).

Um weitere, detaillierte Einblicke in die Regulation der koronaren Durchblutung zu erhalten, bestehen sich dieser Arbeit anschließende Ziele in der Beurteilung des Einflusses der Gewebeoxygenation und in der Untersuchung der Effektivität bestimmter vasodilatierender Verbindungen mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen, z.B. Nitroprussid-Natrium (direkte NO-Freisetzung) und Bradykinin (Rezeptor vermittelte NO-Freisetzung) auf die arterioläre Endstrombahn des Herzens. Dieses Wissen könnte einen wichtigen Schritt zur Bestimmung geeigneter, pharmakologischer Wirkstoffklassen beim Einsatz gegen mikrovasculär bedingte, koronare Herzkrankheiten, wie das Syndrom X, leisten.

Die durch das neuartige Modell mögliche Visualisierung epikardialer Gefäße bis $< 10 \mu\text{m}$ und die Beurteilung der den Blutfluss regulierenden Mechanismen in diesen Gebieten soll auf diese Weise insgesamt zum Verständnis der ätiologischen Rolle kleinster, epikardialer Mikrogefäße bei ischämischen Herzkrankheiten und in Zukunft auch zur Beschreibung geeigneter Therapieansätze beitragen.