

## **II. Literaturübersicht**

### **II.1. Anatomie des Schweineherzens**

Das Herz passt sich in seiner Stellung im Brustraum der Form des bilateral abgeflachten, kielförmigen Brustkorbes an. Dadurch erscheint es, gegenüber der Lage des Herzens in dem beim Menschen mehr tonnenförmigen Thorax, etwa 90° um seine Längsachse nach links gedreht. Infolgedessen orientieren sich der rechte Vorhof und die rechte Herzkammer nach rechts kranial, der linke Vorhof und die linke Herzkammer nach links kaudal.

Beim Schwein ist die breit-plumpe Kegelform des Herzens mit wenig ausgeprägter Spitze typisch. Der Margo ventricularis dexter ist konvex, der Margo ventricularis sinister aber gerade. Eine weitere Besonderheit beim Schwein ist die Aortenverzweigung. Aus dem Arcus aortae geht kranial gerichtet, der Truncus brachiocephalicus und kurz darauf gesondert die A. subclavia sinistra hervor.

Das Schweineherz verfügt über die als Stützelemente dienenden Herzknorpel, welche im höheren Alter auch verknöchern können (KOCH und BERG 1993, NICKEL, SCHUMMER u. SEIFERLE 1977).

### **II.2. Die Koronargefäße des Schweineherzens**

Für die Dauerleistung der Herzmuskulatur erforderliche Blutmenge wird dem Organ durch zwei große Arterien zugeführt. Diese als Herzkranzarterien (Aa.coronariae) bezeichnet, entspringen als erste Gefäße unmittelbar aus der Aorta. Bei den einzelnen Säugetieren unterscheidet sich der Verzweigungsmodus der A. coronaria sinister und der A. coronaria dexter. Beim Schwein gabelt sich die A. coronaria sin. nach kurzem Verlauf in den Ramus interventricularis paraconalis, der dem Sulcus paraconalis zustrebt und in den Pars sin. des Sulcus coronarius entlangziehenden R. circumflexus (RCX). Dieser erreicht den Margo ventricularis sin. oder auch die Facies atrialis (rechte Herzfläche), um sich dort in mehrere Zweige aufzulösen. Die A. coronaria dext. entläßt den R. interventricularis subsinuosus. Das Schweineherz gehört zum beidseitig koronaren Versorgungstyp, da beide Kranzarterien etwa zu gleichen Teilen an der Versorgung der Herzmuskulatur, einschließlich des Septums beteiligt sind (NICKEL, SCHUMMER und SEIFERLE 1977). Der Ramus interventricularis paraconalis beim Schwein wird beim Menschen als Ramus interventricularis anterior (RIVA) bezeichnet. Diese Nomenklatur wird in der vorliegenden Arbeit verwendet, um eine bessere

Vergleichbarkeit mit der Literatur zu gewährleisten. Das koronare Gefäßsystem des Schweineherzen weist im Vergleich zu anderen Säugern eine große Ähnlichkeit zu dem des menschlichen Herzens auf (ECKSTEIN 1957, SCHAPER 1979, VERDOUW et al. 1983).

### **II.3. Der Koronarkreislauf unter Berücksichtigung der verschiedenen Spezies**

Zur Gewährleistung der Arbeitsfähigkeit müssen dem Herzen ständig in angemessener Weise Sauerstoff und Nährsubstrate zugeführt und die Stoffwechselschlacken abgenommen werden. Das geschieht durch den Koronarkreislauf. Dieser wird beim Warmblüter durch die beiden Koronararterien (Aa. coronariae cordis), welche an der Aortenwurzel unmittelbar über den Semilunarklappen entspringen, gespeist. Die Querverbindungen zwischen den größeren Ästen der Koronararterien sind (besonders beim Menschen) spärlich. Der Verschluss einer größeren Koronararterie führt daher zu schwersten Zirkulationsstörungen im entsprechenden Myokardbezirk, zum Myokardinfarkt (SCHEUNERT und TRAUTMANN 1987). Nach HARKEN et al. (1981) ist die frühe Antwort einer Ischämie abhängig von der Ausdehnung eines existierenden Kollateralkreislaufs. Es existieren wesentliche Unterschiede in der Ausbildung der Kollateralen in den verschiedenen Spezies (SCHAPER et al. 1967). So haben Hunde, Meerschweinchen und Katzen einen gut ausgebildeten Kollateralkreislauf. Meerschweinchen entwickeln nach einer Okklusion eines Koronargefäßes keinen Infarkt, während Katzen trotz Kollateralen keinen genügenden Schutz vor einem Infarkt haben. Kaninchen weisen innerhalb der Spezies Differenzen auf. Ratten besitzen einen spärlich ausgebildeten Kollateralkreislauf und haben sich deshalb unter den kleinen Laboratoriumstieren in der Erforschung der myokardialen Ischämie etabliert. Der kollaterale Blutfluss ist in Herzen von Schweinen und Pavianen am geringsten. Er beträgt bei ihnen weniger als 5 % des transmuralen Blutflusses (WHITE und BLOOR 1981, SHEN et al. 1996, CROZATIER et al. 1978, WINKLER et al. 1984). Das venöse Blut wird durch Herzvenen, speziell die Vena cordis magna, in den rechten Vorhof zurückgeleitet. Ein kleiner Teil desselben gelangt durch die Venulae Thebesii (Gefäßverbindungen zwischen dem Koronarkreislauf und den Herzhöhlen) direkt in die verschiedenen Herzkammern - vor allem in den rechten Vorhof. Etwa 5-10% des gesamten vom Herzen ausgeworfenen Blutes, also eine relativ große Menge, durchströmen den Koronarkreislauf. Der Sauerstoffgehalt des Koronarvenenblutes ist auffallend konstant klein, auch bei einem stark erhöhten O<sub>2</sub>-Verbrauch des Myokards sinkt er nur noch wenig. Dies bedeutet, dass sich bei einem O<sub>2</sub>-

Mehrverbrauch die Koronardurchblutung entsprechend verstärkt (SCHEUNERT und TRAUTMANN 1987).

#### **II.4. Physiologie des Herzens**

Hier sollen nur die relevanten Mechanismen der Beeinflussung der Herzerregung erwähnt werden, insbesondere der Kontraktilität des Herzens – die Inotropie.

Die Erregung des Herzens erfolgt normalerweise durch den Sinusknoten; er ist der physiologische Schrittmacher des Herzens. Die Erregung breitet sich von dort auf beide Vorhöfe und den Artrioventrikularknoten (AV-Knoten) aus und gelangt dann über das Hische Bündel mit seinen beiden Tawara-Schenkeln zu den Purkinjeschen Fäden, die die Erregung auf das Kammermyokard übertragen ( SILBERNAGL und DESPOPOULOS 1991).

Bedingt durch seine Automatie, kann das Herz auch ohne äußere Nervenversorgung schlagen. Die Steigerung der Kontraktilität des Arbeitsmyokards, die positiv inotrope Wirkung, beruht auf einer erhöhten intrazellulären Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ . Durch das Aktionspotential des Myokards wird  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Longitudinalsystem freigesetzt. Während des Aktionspotentials erfolgt über  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle aber außerdem ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum in die Myokardfasern, ein Vorgang der die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Entscheidung wahrscheinlich erst auslöst. Die Höhe dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms bestimmt letztlich die Kontraktionskraft (KLINKE und SILBERNAGL, 1996). Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von außen steigt bei Erhöhung der extrazellulären Kalzium-Konzentration und kann  $\beta_1$ -adrenerg vermehrt werden (direkte positiv-inotrope Sympathikuswirkung). Die für die elektromechanische Kopplung so entscheidene  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird außer vom Einstrom auch vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom aus dem Sarkoplasma bestimmt. Er erfolgt durch primär-aktive „Pumpen“ ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen) sowohl ins Longitudinalsystem als auch in den Extrazellulärraum. In letzteren gelangt  $\text{Ca}^{2+}$  außerdem im Austausch gegen  $\text{Na}^+$  (Antiport). Dieser sekundär-aktive  $\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransport wird letztlich durch die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase getrieben (SILBERNAGL und DESPOPOULOS 1991).

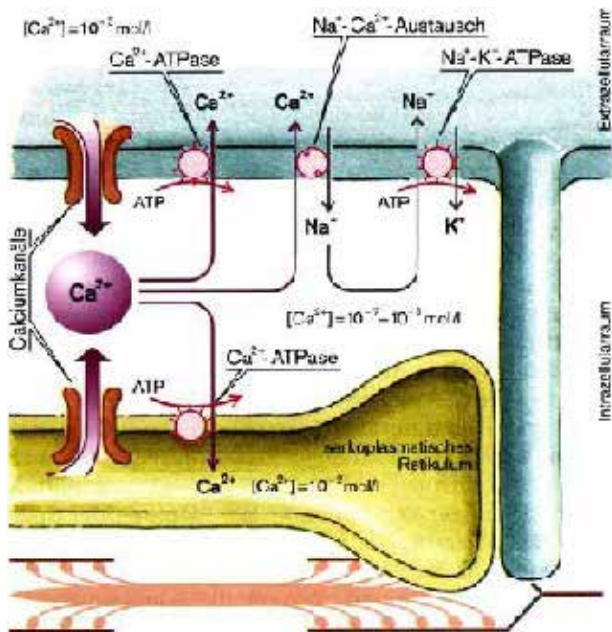


Abbildung 1:  $Ca^{2+}$ -Austauschvorgänge an der Myokardzelle. Nach KLINKE und SILBERNAGL (1996)

## II.5. Der myokardiale Stoffwechsel

Der Herzmuskel ist für seine Energiegewinnung hauptsächlich auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen. Als Substrate für die ATP-verbrauchenden Reaktionen verbrennt das Herz normalerweise freie Fettsäuren 60-70% (SAIKI et al. 1998), gefolgt von Glucose (30%) und Lactat, Pyruvat, Ketonkörper und Aminosäuren (RUSSELL et al. 1991, MALLET und BÜNGER 1991). Die Extraktionsschwelle für Glukose ( $59 \pm 6 \text{ mg/100 ml}$ ), Lactat ( $2,5 \pm 0,5 \text{ mg/100 ml}$ ) und Pyruvat ( $0,6 \pm 0,2 \text{ mg/100 ml}$ ) ist abhängig von der Transportkapazität der Zellmembran (JOBSIS 1964). Der relative Substratanteil hängt von der arteriellen Substratkonzentration ab. Die ATP-Bildung erfolgt am Herzmuskel hauptsächlich durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien, welche einen Volumenanteil von 36 % der Gesamtzelle ausmachen. Neben dem ATP steht dem Herzmuskel im Kreatinphosphat (CrP) eine zusätzliche energiereiche Phosphatverbindung zur Verfügung. Das Kreatinphosphat stellt einen schnell mobilisierbaren Energiespeicher dar, der insbesondere bei vorübergehendem Sauerstoffmangel ein zu rasches Absinken des ATP-Gehaltes verhindert (KLINKE und SILBERNAGL 1996).

Die gemeinsame Endstrecke aller Substrate im Stoffwechsel ist das Acetyl-CoA, das in den Citratcyklus eingeschleust wird. Die acht Enzyme des Citronensäure-Cyklus katalysieren eine Reihe von organischen Reaktionen, die insgesamt ein Acetyl-CoA in zwei  $CO_2$ -Moleküle umwandeln, was drei Moleküle NADH (Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert), ein

Molekül  $\text{FADH}_2$  (Flavin-adenin-dinucleotid, reduziert) und ein Molekül GTP (Guanosintriphosphat) ergibt.  $\text{NADH}$  und  $\text{FADH}_2$  werden in der Elektronentransportkette durch Sauerstoff oxidiert, wobei gleichzeitig elf Moleküle ATP synthetisiert werden (VOET und VOET 1994).

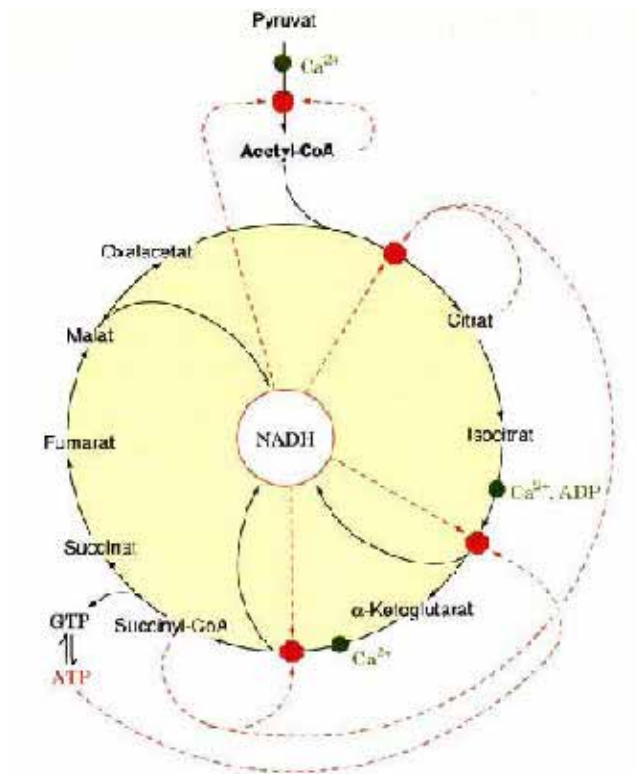


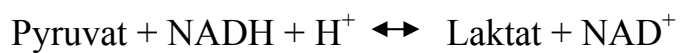
Abbildung 2 : Schema des **Citronensäure-Cyclus** und der **Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion**. Gezeigt sind die Stellen der Hemmung (rote Punkte) und die Zwischenprodukte des Weges, die als Inhibitoren fungieren (gestrichelte rote Pfeile).  $\text{ADP}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  (grüne Punkte) fungieren als Aktivatoren. (VOET und VOET 1994)

### II.5.1. Der myokardiale Stoffwechsel im Zuge einer Ischämie

Das Herz besitzt nur ein sehr beschränktes Vermögen zum Eingehen einer sogenannten Sauerstoffschuld. Die  $\text{O}_2$ -Reserve des oxygenierten Myoglobins ist sehr klein, so dass sie bereits nach 8-10 Schlägen erschöpft ist. So erträgt der Herzmuskel eine vollständige Blockierung der kardialen Blutzirkulation (Ischämie) nur während weniger Minuten (SCHEUNERT und TRAUTMANN 1987). Die  $\text{O}_2$ -Ausschöpfung aus dem Blut ( $\text{O}_2$ -

Utilisation) beträgt im Herzen 10-15 Vol. % und ist somit zwei bis dreimal höher als in den meisten Organen, in denen sie sich auf etwa 5 Vol. % beläuft.

Der normale Vorrat der Myokardzelle an ATP (4-5  $\mu\text{mol/g}$  Gewebe) reicht nur für wenige Herzschläge. Bei Sauerstoffmangel als Folge unzureichender Koronardurchblutung ist die oxidative Phosphorylierung gehemmt, die ATP-Konzentration sinkt ab und es kommt zum Rückstau von Reduktionsäquivalenten, die in Form von NADH im Zytoplasma akkumulieren. Dieses hat die Konsequenz der gesteigerten anaeroben Glycolyse. Glucose und Glycogen werden vermehrt abgebaut, aber können den ATP-Abfall nicht kompensieren. Durch den vermehrten Glucoseabbau entsteht ein erhöhter Gehalt an NADH und Pyruvat, dieser kann aber im Citratcyclus nicht weiter verstoffwechselt werden. Aus Pyruvat entsteht dann Lactat. Es entwickelt sich durch die Laktatakkumulation eine Gewebsazidose (KLINKE und SILBERNAGL 1996).



Der Beitrag der Fettsäureoxidation zur ATP-Produktion steigt bei einem ischämischen Herzen an und stört zusätzlich die kardiale Effizienz – das Verhältnis zwischen Herzarbeit und Sauerstoffverbrauch. Die langkettigen Fettsäuren mindern zudem die linke Ventrikelfunktion und verursachen Arrhythmien in den Herzen. Zusätzlich ist der Glukosetransport in die Zellen gehemmt (NEELEY et al. 1973, LIEDTKE et al. 1978).

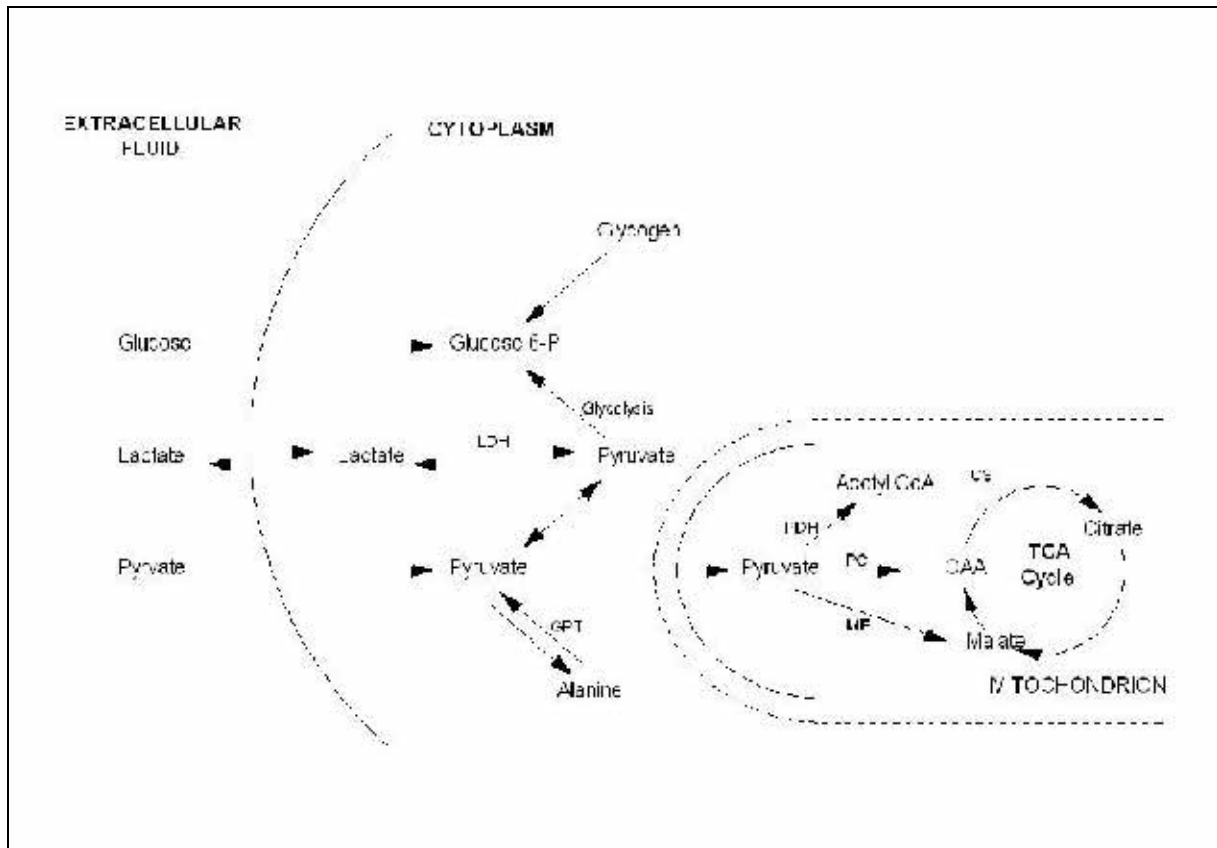


Abbildung 3 : **Metabolismus des Pyruvates in Kardiomyozyten.** LDH: Laktat-Dehydrogenase;  
 GPT: Glutamat-Pyruvat-Transaminase; PDH: Pyruvat-Dehydrogenase; ME: Malat-Enzym;  
 PC: Pyruvat-Carboxylase; CS: Citrat-Synthase; OAA: Oxalacetat

### II.5.2. Die Rolle des Pyruvates im myokardialen Stoffwechsel

Pyruvat, ein Zwischenprodukt der Glycolyse, wird in den Mitochondrien durch die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches in den Citratecyclus eintritt.

Die Oxidation von Pyruvat ist abhängig vom cytoplasmatischen NADH durch die Atmungskette. Dieser Prozeß bewirkt den Transport von Wasserstoff durch die innere Mitochondrienmembran mittels des Malat-Aspartat-Cycluses und im geringeren Umfang durch den  $\alpha$ -Glycerophosphat-Cyclus. Die Effizienz dieser Cyclen resultieren durch eine minimale Laktatproduktion im gesunden Herzen (RANDLE 1976).

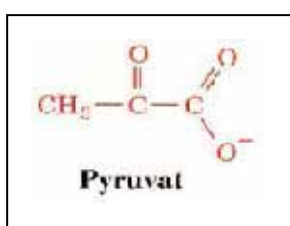


Abbildung 4: Strukturformel von Pyruvat

### II.5.3. Kinetik des Transportes von Laktat und Pyruvat in die Herzmuskelzelle

KÜBLER et al. (1966) zeigten in Versuchen, dass die Laktat / Pyruvat-Permeation durch die Herzmuskelmembran nicht den Gesetzen einer einfachen Diffusion folgt. Der Transport von L-Laktat und Pyruvat durch die Plasmamembran wurde intensiv an Erythrozyten studiert. Dort ist ein spezifischer Monocarboxylat-Carrier präsent (POOLE und HALESTRAP et al. 1989). Auch Messungen von WATTS und RANDLE (1967) von intra- und extrazellulären L-Laktat und Pyruvat haben gezeigt, dass es einen Carrier-vermittelten-Transport geben muß. Pyruvat hat eine 5-10fach höhere Affinität zum Monocarboxylat-Transporter als Laktat. Dieses verleiht dem Pyruvat die Funktion eines effektiven und natürlichen Inhibitors zur myokardialen Laktataufnahme (BASSENGE et al. 2000). POOLE et al. (1989) berichten über die gleiche maximale Geschwindigkeit der Aufnahme von Pyruvat und Laktat in isolierten Herzmuskelzellen, allerdings hat Pyruvat die größere Affinität zum Transporter als Laktat (Michaelis Konstante  $K_m = 70\mu\text{M}$  für Pyruvat im Gegensatz zu 2,3 mM für L-Laktat). Diese Untersuchungen zeigten letztlich nicht nur die Sättigungskinetik für die L-Laktat-Aufnahme, sondern Hemmung der L-Laktat-Aufnahme durch Pyruvat. Die cytoplasmatische Aufnahme des Pyruvates variiert exponentiell mit der extrazellulären Pyruvatkonzentration. Bei einem  $pK_a$  von 2,49 liegt Pyruvat bei physiologischem Plasma-pH-Wert meist komplett dissoziiert zu seiner konjugierten Base vor (POOLE et al. 1989).

### II.5.4. Bedeutung und Regulation des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes

Pyruvat, unter aeroben Bedingungen das Endprodukt der Glycolyse, wird in Acetyl-CoA überführt. Dieses erfolgt durch die Einwirkung des Pyruvat-Dehydrogenase-Multienzymkomplexes, eines symmetrischen Clusters aus drei Enzymen: der Pyruvat-Dehydrogenase, Dihydrolipoyl-Transacetylase und Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (VOET und VOET 1994). Die Pyruvat-Dehydrogenase-Untereinheit katalysiert die Umwandlung von Pyruvat in  $\text{CO}_2$  und ein Hydroxyethyl-TPP-Zwischenprodukt. Letzteres wird an die Dihydrolipoyl-Transacetylase weitergeleitet. Diese oxidiert die Hydroxyethylgruppe zu Acetat und überträgt dieses auf CoA, wodurch Acetyl-CoA gebildet wird. Die Aktivität des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes hängt von den Verhältnissen  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  und  $\text{Acetyl-CoA}/\text{CoA}$  ab. Durch Phosphorylierung wird der Enzymkomplex inaktiviert und durch Dephosphorylierung reaktiviert. Katalysiert werden diese Reaktionen durch die Pyruvat-



Dehydrogenase-Kinase bzw. der Pyruvat-Dehydrogenase-Phosphatase, die in dem Multienzymkomplex enthalten sind und auf die Konzentrationen von Stoffwechselzwischenprodukten wie NADH und Acetyl-CoA und Pyruvat in den Mitochondrien ansprechen (RANDLE 1968, McCORMACK und DENTON 1989, VOET und VOET 1994). Fettsäuren und auch Ketonkörper inhibieren den Pyruvatdehydrogenase-Komplex durch direkte Feedback-Wirkung auf das aktive Enzym und reduzieren den Metabolismus von Pyruvat zu Acetyl-CoA (DENNIS et al.1979, CHATHAM und FORDER 1996, JOHNSTON und LEWANDOWSKI 1991).

Die Effekte unter ischämischen Bedingungen auf die PDH wurden bisher noch nicht komplett aufgeklärt. Isoliert perfundierte Ratten- und Meerschweinchenherzen haben gezeigt, dass die PDH-Aktivität während einer Ischämie entweder unverändert, erhöht oder erniedrigt ist. Die PDH-Aktivität ist stark abhängig von der Pyruvatkonzentration, dem Calcium in der Perfusionslösung und dem Grad der Ischämie (STANLEY et al. 1996, PATEL und OLSEN 1984). Die physiologische Konzentration von Pyruvat beträgt im arteriellen Blut 0,2 – 1,1 mM (PANCHAL et al. 2000). Ein Anstieg der PDH-Aktivität wurde bei einem Zusatz einer überphysiologischen Konzentration von 5 mM Pyruvat berichtet. Während die Aktivität bei geringen Pyruvat-Konzentrationen (0,5 mM) unverändert ist und ein Sinken der PDH-Aktivität bei Abwesenheit von Pyruvat festgestellt wurde (PATEL und OLSEN 1984). DENNIS et al. (1979) geben eine Konzentration von 1-10 mM an, bei der die PDH aktiviert ist.

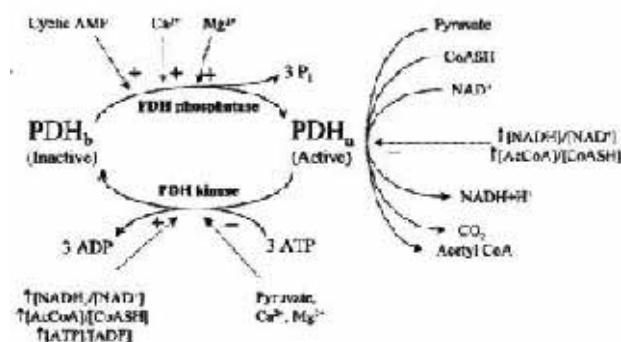


Abbildung 5: Schematische Darstellung der **Regulation der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)**. Die PDH als aktive Form (PDH<sub>a</sub>) und als inaktive Form (PDH<sub>b</sub>) katalysiert durch das PDH-Kinase/Phosphatase-System. Gezeigt werden die metabolischen Faktoren, welche die PDH-Kinase u.-Phosphatase regulieren.

## II.6. Kardioplegie

Die zuverlässigste und quantitativ effizienteste Methode, die Beziehung zwischen Ischämiezeit und ischämischer Schädigung im Sinne einer Verbesserung der Ischämietoleranz des Herzens zu beeinflussen, ist die Kardioplegie (GEBHARD 1990). Die Kardioplegie wird als „reversibler, künstlich induzierter Herzstillstand“ definiert. Grundsätzlich soll die Kardioplegie leicht auslösbar und jederzeit ohne Schädigung des Herzens aufhebbar sein (PULVER 1968). Wichtig für die Kardioplegie, ist die Inaktivierung des kontraktile Apparates, welcher aus den Proteinen Aktin, Myosin und Troponin besteht. Es wird angenommen, dass der kontraktile Apparat nicht bei allen Arten der Kardioplegie inaktiviert ist, denn die Methoden der Kardioplegie differieren bemerkenswert (BRETSCHNEIDER et al. 1975). Die Verwendung des Cholinesterase-Aktivators 2,3 Butandion-Monoxim (BDM) in der Kardioplegie bewirkt eine reversible Reduktion der Sensitivität kontraktile Proteine gegenüber Kalzium. BDM ist eine negativ inotrope und vasodilatierende Substanz. Es lässt sich mittels einer reversiblen elektromechanischen Entkopplung durch Desensitivierung des kontraktile Apparates für Kalzium durch BDM eine bedeutende Verlängerung der Ischämietoleranz bei explantierten Schweineherzen erreichen (VAHL et al. 1995, STOWE et al. 1993). Ursprünglich ist BDM ein Cholinesterase-Aktivator, der zur Behandlung von Vergiftungen mit Organophosphaten entwickelt wurde (ASKEW 1956). Das BDM wird bis heute nur experimentell eingesetzt und ist als Arzneimittelzusatz noch nicht zugelassen (STOWE et al. 1994). Die Wirkung von BDM wurde in einem Großtierexperiment anhand von in-situ perfundierten Schweineherzen überprüft. Es wurde nach Applikation von BDM in Konzentrationen von 0-30 mmol/L, die isovolumetrische Kraftentwicklung und der intrazelluläre Calciumtransient isolierter linksventrikulärer Muskelstreifen aufgezeichnet. Die Ergebnisse zeigten, dass bei 30 mmol/L keine Kraftentwicklung mehr registriert wurde. Durch die Anwendung von BDM in der Kardioplegie könnten die Konservierungszeiten von Spenderherzen im Rahmen von Herztransplantationen erheblich verlängert werden (VAHL et al. 1995).

Neben der Kardioplegie ist die Hypothermie die zweit wirksamste Methode, die Ischämietoleranz des Herzens zu verbessern. Dabei ist es wichtig, dass die Hypothermie das gesamte Myokard homogen betrifft. Inhomogenitäten der Temperatur bedeuten, wie Inhomogenitäten der Kardioplegie, regional eine Reduzierung des protektiven Effektes (GEBHARD 1990).

## **II.7. Die historische Entwicklung der isolierten Herzperfusionen**

Die Geschichte der isolierten Herzperfusion begann 1866 in den Carl-Ludwig-Laboratorien in Leipzig. Dort führte CYON (1866) die Perfusion an isolierten Froschherzen durch. Es folgten 1881 durch MARTIN die ersten Perfusionen von Säugetierherzen. Er isolierte Hunde- und Katzenherzen in-vivo, d.h. Herz und Lunge verbleiben im Körper der Tiere, sind aber funktionell isoliert. 1912 entwickelten KNOWLTON und STARLING die Versuchsanordnung von Martin weiter, indem der Kreislauf einen künstlichen arteriellen Widerstand, dem sogenannten „STARLING-Widerstand“ beinhaltet. 1895 gelang es LANGENDORFF die vollständige Trennung des Herzens vom Gesamtorganismus, die ex-vivo-Isolation. Er führte die retrograde Perfusion der Koronargefäße via Aorta durch.

1910 entwickelte RHODE die Perfusionstechnik nach LANGENDORFF weiter, indem er ein Modell mit intraventrikulärem Ballon und separater Koronarperfusion herstellte. 1932 stellte RIGLER ein Perfusionsmodell vor, in welchem er das linke Atrium des Herzens mit Hilfe des hydrostatischen Druckes mit Perfusat anfüllte, welches gegen diesen Druck zu dem Reservoir vom Herzen wieder ausgeworfen wurde. Er entwickelte auf diese Weise einen „starling-ähnlichen“ künstlichen Widerstand bei einem ex-vivo Herzen. Diesen Aufbau modifizierte schließlich NEELY (1967) zu einem frühen Working-heart Modell.

Das Perfusionsmodell isolierter Organe unterliegt einer ständigen Modifizierung. So ermöglichte die Methode VON BAEYER et al. (1997) eine Perfusion mit körperwarmen Vollblut, das in einem einfachen, einstufigen Verfahren sowohl durch Gasaustausch arterialisiert als auch durch Dialyse entgiftet wird. Ein wesentlicher Vorteil dieses Perfusionsystems besteht darin, dass durch die ständige Regeneration des Blutes nur etwa ein Liter Blut benötigt wird. Der Ersatz von Vollblut, statt der bisher verwendeten kristalloiden Lösungen wirkt einer Ödematisierung des Myokards entgegen. Dadurch ist es möglich wesentlich längere Perfusionszeiten zu erzielen.

Die AG Herzperfusion, der Humboldt-Universität zu Berlin, hat die Methode der Perfusion auf das Schweineherz übertragen und sie durch die Organentnahme am Schlachthof zum Ersatz von Tierversuchen weiterentwickelt (STOLTE 2001).

## **II.8. Myokardiale Ischämie**

Obwohl die myokardiale Ischämie eines der meist untersuchten Studienthemen in der kardiovaskulären Forschung ist, wird über deren Definition immer noch diskutiert (HEARSE

1994). Im strengen Sinne ist Ischämie vom griechischen abgeleitet, „ischo“ (zurückhalten) und „haima“ (Blut), bedeutet „ungenügend Blut“ (VERDOUW et al.1998) und ist der Grund für die rapide Abnahme der Kontraktilität im Herzmuskel (APSTEIN et al. 1977). Die Mehrzahl der Forscher definieren Ischämie als eine Imbalance zwischen der Menge der Sauerstoff- und Substratzufuhr und die Menge, welche für eine normale Herzfunktion benötigt wird (HEARSE 1994). Obwohl eine Ischämie entsprechend dem „Alles-oder-Nichts“-Gesetz zu Nekrosen führt, folgt einer moderaten Ischämie auch eine Erholungsphase (BRAUNWALD et al. 1982).

## **II.8.1. Syndrome der Ischämie**

### **II.8.1.1. Stunning**

Das Phänomen des myokardialen „Stunning“ wird definiert als eine reversible Dysfunktion der Kontraktilität des Myokards, als eine Konsequenz reversibler Ischämie (BOLLI 1990, VERDOUW et al.1998). Die exakte Pathophysiologie des myokardialen „Stunning“ bleibt undefiniert. Die Haupthypothesen über die Pathogenese des „Stunning“ enthalten die „Kalzium-Hypothese“, durch eine vorübergehende Kalziumüberladung während der Ischämie (BOLLI und MARBAN 1999) und die „Sauerstoffradikal-Hypothese“ (BOLLI 1990, HAMMOND und HESS 1985). Die Aktivierung von Leukozyten bedingen die Bildung von freien Radikalen, welche am myokardialen „Stunning“ wesentlich beteiligt sind (ENGLER und COVELL 1987).

### **II.8.1.2. Ischemic Preconditioning**

Ischämisches „Preconditioning“ ist ein Phänomen, bei welchem dem Myokard durch ein oder mehrere kurze ischämische Perioden mit anschließender Reperfusion, paradoxerweise eine gewisse Resistenz gegenüber folgenden langanhaltenden Ischämieperioden verliehen wird (MURRY et al. 1986). Es hat sich herausgestellt, dass ischämisches „Preconditioning“ bemerkenswert in der Limitierung der Infarktgröße und entgegen der Entstehung ventrikulärer Arrhythmien während Reperfusions-Ischämien wirkt (MURRY et al. 1986). Der Mechanismus des ischämischen „Preconditioning“ ist bisher noch nicht ganz bekannt, obwohl

bereits eine hohe Anzahl von wichtigen Beobachtungen gemacht wurden. Eine initiale Periode von kurzen Ischämien gefolgt von Reperfusion haben gezeigt, dass der Verbrauch von energiereichen Phosphaten während einer größeren ischämischen Periode verzögert ist. Ebenfalls wurde eine Reduktion in der Laktatanhäufung im präkonditioniertem ischämischen Myokard beobachtet. Diese Beobachtung lassen MURRY et al. die Hypothese aufstellen, dass die zunehmende ischämische Toleranz durch die Erhaltung von Energiereserven und / oder durch eine reduzierte Akkumulation von toxischen Kataboliten zustande kommt (MURRY et al.1986, MURRY et al.1987).

### **II.8.1.3. Hibernation**

Der Begriff „Hibernation“ wird verwendet für ein Myokard mit reduziertem Blutfluss, eine reversible Beeinträchtigung der kontraktile Funktion, welche durch Normalisierung des Blutflusses wiederhergestellt wird (MAZER et al.1995, BRAUNWALD und RUTHERFORD 1986). Die Effekte der länger andauernden Reduktion des Blutflusses auf die Regulation des Metabolismus und der Funktion der betroffenen Herzregion ist noch nicht vollständig erforscht. Wenn myokardiale Zellen (Myozyten) tatsächlich bei lang andauerndem reduzierten Blutfluss überleben, so muß es dem hypoperfundierten Myokard möglich sein, die Energiebalance wiederherzustellen, um die Zellvitalität aufrechtzuerhalten (PANTELY et al. 1990). FEDELE et al. (1988) studierten am Schweinmodell die metabolische Reaktion bei zwei- bis dreistündiger Reduktion des Koronarblutflusses um 50 %. Die Untersuchungen zeigten eine Abnahme der myokardialen Laktatproduktion und der koronarvenöse pH-Wert normalisierte sich, trotz einer stetig sinkenden systolischen Funktion des Herzens.

### **II.8.2. Pathomechanismus der Ischämie und Reperfusionsschäden**

Das ischämische Myokard entwickelt sich vom reversiblen zum irreversiblen geschädigten Stadium innerhalb von einigen Minuten bis zu einer oder mehreren Stunden, abhängig vom Ausmaß der Ischämie und der Kondition des Herzens. Die Mechanismen für diesen Übergang von der reversiblen zu irreversiblen Schädigung sind noch nicht sicher bekannt. Es wird weit verbreitet angenommen, dass ein Verlust von Adenin-Nucleotiden und ein fehlerhaftes Wiederherstellen des ATP-Spiegels während der Reperfusion ein kritischer Faktor des

Beginns der irreversiblen Schädigung ist (KÜBLER und SPIEKERMANN 1970, JENNINGS et al. 1977, WATTS et al. 1980). Viele verschiedene Faktoren sind daran beteiligt, ein Überladen der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$  (SHEN und JENNINGS 1972), die Akkumulation von metabolischen Produkten (NEELY et al. 1973) und die strukturellen Schäden an den Membranen. In zweiter Linie entweder durch einen niedrigen ATP-Spiegel und Zellschwellung oder durch Akkumulation von metabolischen Produkten mit der Konsequenz der Aktivierung bzw. Hemmung von Schlüsselenzymen (JENNINGS et al. 1977). Auch die zunehmenden Konzentrationen von freien Fettsäuren in ischämischen Geweben lassen die zellulären Prozesse zusammenbrechen (LIEDTKE et al. 1978).

Die Mechanismen der irreversiblen Schädigung des ischämischen Myokards untersuchten NEELY et al. (1984) an perfundierten Rattenherzen. Die Übergangszeit von reversiblen zu irreversiblen Schäden der kontraktilen Funktion wird beschleunigt durch die Akkumulation von Glycolyseprodukten und einem Ansteigen des extrazellulären Kalziums. Kalzium spielt eine bedeutende Rolle in der Schädigung der Myokardzelle. Der Einstrom des Kalziums in die Mitochondrien reduziert die oxidative Phosphorylierung (MARBAN et al. 1989).

„Reperfusion-Injury“ wird definiert als eine funktionelle, metabolische und strukturelle Änderung bedingt durch die Reperfusion, dem Wiedereinsetzen des Koronarflusses in den ischämischen Bereichen. Die Reperfusionsschäden werden charakterisiert durch eine intrazelluläre Kalziumakkumulation, eine explosive Zellschwellung mit reduziertem postischämischen Blutfluss, reduzierter ventrikulärer Compliance und der Unfähigkeit der Sauerstoffabgabe, eben dann wenn der koronare Fluss und der Sauerstoffgehalt gross ist (BUCKBERG 1987). ALANEN et al. (1980) registrierten während einer 90-minütigen globalen Ischämie ein permanentes Absinken der Compliance des linken Ventrikels und einen rapiden Anstieg des enddiastolischen Ventrikeldruckes. BRETSCHEIDER et al. (1975) zeigten in einer Untersuchung über Ischämiedauer die morphologischen Veränderungen des Myokards. Eine 30 Sekunden andauernde Ischämie verursachte keine strukturellen Veränderungen. Bei ein-minütiger andauernder Ischämie nahmen die Mitochondrien-Granula ab, nach vier-minütiger Ischämie kam es zur Schwellung und Abrundung der Mitochondrien. Unter 25 Minuten der Ischämie begann eine Cristolyse und über 25 Minuten eine Zerstörung der Mitochondrien und des kontraktilen Apparates.

Die meisten schweren Myokardschäden entwickeln sich mit Beginn der Reoxygenierung des sauerstofferschöpften Myokards (HEARSE et al. 1973). GANOTE et al. (1983 und 1990) demonstrierten, dass die Wiederaufnahme der Energieproduktion durch Reoxygenierung diese Schäden verursacht. Dieses Phänomen der schweren Zellschädigung, hervorgerufen

durch die Reoxygenierung, wurde „Oxygen Paradox“ genannt. 1996 identifizierten PIPER et al. diese Mechanismen des „Oxygen Paradox“. Die Re-energetisierung verursacht letale Zellschäden durch die Provokation einer Hyperkontraktur – einer irreversiblen Zellverkürzung. Dieser Pathomechanismus, der die mechanische Schädigung durch Re-Oxygenierung induziert, kann verhindert werden, indem während der ersten Phase der Energiegewinnung der kontraktile Apparat inhibiert wird (PIPER et al.1996). In verschiedenen Studien wurde demonstriert, dass ein direkter Blocker der Myofibrillen – 2,3 - Butandion-Monoxim (BDM) den kontraktile Apparat während der frühen „verwundbaren Phase“ der Re-Oxygenierung hemmt (SCHLACK et al.1994 und SCHLÜTER et al.1991).

### **II.9. Die Entwicklung des myokardialen Ödems**

Die Perfusion mit hypotonen kristalloiden Lösungen induzieren ein myokardiales Ödem in den isoliert perfundierten Herzen. Solch ein myokardiales Ödem mindert die systolische Ventrikelfunktion durch eine reduzierte Füllung in der Diastole und ist mitverantwortlich für das Absinken der Compliance im linken Ventrikel (AMIRHAMZEH 1997, WENG 1992). Auch ein niedriger onkotischer Druck der Perfusionslösung ist an der Entwicklung des kardialen Ödems beteiligt. Der Zusatz von Proteinen in dem Perfusionsmodell kann die Ödembildung vermindern, allerdings stört die hierdurch entstehende extreme Schaumbildung den Perfusionsablauf (MODERSOHN et al. 2001). Die Entwicklung des myokardialen Ödems ist zusätzlich extrem speziesabhängig (VAHL et al. 1998). WENG et al. (1992) untersuchten den myokardialen Wassergehalt, das Herzgewicht und den linken Ventrikeldruck vor und nach koronarer Perfusion mit Blut und verschiedenen molaren Lösungen (150, 280, 334 und 380 mOsm/l). Jede Gruppe zeigte einen Anstieg des Herzgewichtes und des myokardialen Wassergehaltes. Die Compliance des linken Ventrikels nahm deutlich nach der Perfusion ab. Blutperfundierte Herzen bilden nur ein minimales Ödem aus im Vergleich zu den perfundierten Herzen mit kristalloider Lösung. In dieser Studie konnte nicht die präzise Lokalisation der Ödementstehung untersucht werden. So sind offensichtlich an der Ödemausbildung intrazelluläre sowie extrazelluläre Komponenten beteiligt (CRYSTAL et al.1981). Eine wichtige Ursache des Wassereinstroms in die reperfundierte ischämische Myokardzelle scheint die cytosolische  $\text{Na}^+$ -Überladung zu sein. Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher nimmt bei der Regulation des Zellvolumens eine wichtige Rolle ein (GRINSTEIN et al.1992). Zudem akkumulieren die Endprodukte des anaeroben

Metabolismus im ischämischen Myokard, welches ein Ansteigen des osmotischen Druckes in der Zelle zur Folge hat (GRACIA-DORADO 1991).

BUCKBERG (1987) empfiehlt nur einen geringen Perfusionsdruck zu wählen (50 mmHg/6,65 kPa bzw nicht über 80 mmHg/10,64 kPa), um ein Reperfusionsodem zu minimieren.

Auch die unterschiedlichen Kardioplegie-Methoden haben Einfluß auf die Entwicklung des myokardialen Ödems. So entsteht unter Verwendung von Bretschneiders Kardioplegie-Lösung schon bereits nach 9 Minuten normothermer Ischämie ein leichtes Ödem im Sarkoplasma, welches sich allerdings während der Reperfusion verbesserte (KIMOSE et al. 1990).

Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten und deren Akkumulation im Myokard verursachen die Entstehung freier Radikale. Eine ganze Reihe proinflammatorischer Mediatoren (Zytokine; Leukotriene, Interferone, Migrationsinhibitionsfaktor (MIF), colony stimulating factors (CSF)) sind für die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten verantwortlich (EDDICKS 2004). Diese gebildeten freien Radikale und die verminderte Radikalfängerfunktion sind für die Entstehung der Reperfusionsschäden und einem interstitiellen Ödem von herausragender Bedeutung (TSAO et al. 1990).

## **II. 10. Die Kardiomyopathien**

Die Kardiomyopathien (KMP) der Tiere werden in Anlehnung an die für den Menschen konzipierte KMP-Definition nach der WHO (1980) eingeteilt. So unterscheidet man einerseits primäre und sekundäre KMP. Unter sogenannten primären KMP versteht man die Formen, deren Entstehung sich nicht durch erkennbare strukturelle oder funktionelle Veränderungen erklären lassen. Ist dagegen die zur Herzmuskelfunktionsstörung führende Ursache bekannt, so spricht man von einer sogenannten sekundären Kardiomyopathie. Andererseits kann man Kardiomyopathien nach dem morphologisch-pathophysiologischen Erscheinungsbild in hypertrophe, restriktive und dilatative Formen bzw. nach ihren funktionellen Konsequenzen in systolische und diastolische Dysfunktionen unterteilen (DAHME und WEISS 1999).

Die zu den sekundären KMP gehörende akute Kardiomyopathie des Schweines ist als Folge des häufig vorkommenden Porcine Stress-Syndroms (PSS) von grosser klinischer Bedeutung. Das Porcine Stress-Syndrom, auch unter dem Begriff Belastungsmyopathie bekannt, ist ein genetisch determinierter Krankheitskomplex, dessen Ursache durch eine Punktmutation in einem Strukturgen von Calciumkanälen im endoplasmatischen Retikulum (Ryanodinrezeptor) begründet ist. Die Folge ist eine Calcium-Stoffwechselstörung in der weißen Muskulatur.



Durch starke und ungewohnte Belastungen (z.B. Transport, Fixation zu Operationen und Blutentnahmen) wird eine klinische Manifestation in Form von metabolischer Azidose, Herz- und Kreislaufinsuffizienz und eventuell plötzlichem Verenden ausgelöst. Das bei Belastung in den Muskelfasern entstehende Energiedefizit wird durch anaerobe Glykolyse nur unvollständig kompensiert, wobei große Mengen Milchsäure produziert werden. Es entsteht in Folge eine dekompensierte metabolische Azidose mit schweren Störungen der Herz- und Kreislauffunktionen. Dabei ist durch Elektrolytverschiebung zwischen intra- und extrazellulärer Flüssigkeit (Natrium-Kalium-Austausch) und durch Änderung der Adrenalin und Noradrenalin reagierenden Strukturen zunächst die Kontraktilität der Herzmuskelfasern (negativ inotrope Wirkung der Azidose) herabgesetzt. Es entwickelt sich zuerst eine Herzinsuffizienz, die bei fortdauernder Belastung innerhalb kurzer Zeit in einen kardiogenen Schock übergeht (PLONAIT und BICKHART 1997).

## II.11. Zusammenfassung der Literatur und die sich daraus ergebenden Fragestellungen

Das koronare Gefäßsystem des Schweineherzen weist im Vergleich zu anderen Säugern eine große Ähnlichkeit zu dem des menschlichen Herzens auf (ECKSTEIN 1957, SCHAPER et al. 1979, VERDOUW et al. 1983). Aufgrund des Verzweigungsmodus der Koronararterien ergeben Okklusionsversuche am Schweineherzen aufschlussreichere Ergebnisse in der Erforschung der myokardialen Ischämie.

Eine Ischämie wird als eine Imbalance zwischen der Menge der Sauerstoff- und Substratzufuhr und der Menge definiert, welche für eine normale Herzfunktion benötigt wird (HEARSE 1994). Dieses ist der Grund für die rapide Abnahme der Kontraktilität im Herzmuskel (APSTEIN et al. 1977).

Im Mittelpunkt unserer Betrachtung steht die kardioprotektive Wirkung von Pyruvat am Herzen durch die Steigerung der Kontraktilität des Myokards während einer Ischämie.

Pyruvat, das Zwischenprodukt der Glykolyse, hat eine zentrale Stellung in der zellulären Energiegewinnung. Ein wichtiger Schritt der Energiegewinnung ist die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA, eine Reaktion die von der PDH katalysiert wird. Die Effekte unter ischämischen Bedingungen auf die PDH wurden bisher noch nicht komplett aufgeklärt (STANLEY et al. 1996, PATEL und OLSEN 1984). Bekannt ist, dass unter dem Zusatz von überphysiologischen Konzentrationen von Pyruvat ein Anstieg der PDH-Aktivität berichtet wurde (PATEL und OLSEN 1984).

Die Aufnahme von Laktat und Pyruvat in die Herzmuskelzelle erfolgt durch einen spezifischen Monocarboxylat-Carrier (POOLE und HALESTRAP et al. 1989). Pyruvat hat eine 5-10fach höhere Affinität zum Monocarboxylat-Transporter als Laktat. Dieses verleiht dem Pyruvat die Funktion eines effektiven und natürlichen Inhibitors zur myokardialen Laktataufnahme (BASSENGE et al. 2000).

Bedingt durch seine Automatie, kann das Herz auch ohne äußere Nervenversorgung schlagen. Demzufolge entwickelte sich die Perfusion isolierter Herzen als Alternative zum Ganztiersversuch. Es ist eine Methode die bereits 1895 von LANGENDORFF beschrieben wurde. Die Langendorff-Herzpräparation wurde bisher überwiegend an kleinen Laboratoriumstieren durchgeführt.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, den Einfluß einer überphysiologischen Konzentration von Pyruvat (5 mMol/l) auf die Inotropie, erstmalig an einem isolierten Großtiermodell, dem

Schweineherzen darzustellen. Untersucht wird der Einfluß von Pyruvat während der physiologischen Hämoperfusion und anschließend unter Erzeugung einer Koronarokklusion im Ramus interventricularis paraconalis (RIVA). Zur Beurteilung des Effektes werden globale (LVP) und lokale (IMP und Wanddickenänderung) Herzfunktionsparameter herangezogen.

Desweiteren soll die experimentelle Brauchbarkeit von Organen im Anschluß an andere Tierversuche beurteilt werden. Dazu wurden Hämodynamik, mechanische Herzfunktion und die Stoffwechsellage dieser Herzen untersucht.

Die Untersuchungen sollen dazu beitragen, Tierversuche einzuschränken. Vor allem durch die Verwendung von Schlachttierherzen, welche in ausreichender Zahl zur Verfügung stehen, kann wichtigen Bestrebungen des Tierschutzgesetzes entsprochen werden.