

5. Diskussion

5.1. Auswahl der Methoden

Zur Untersuchung des Reperfusionsschadens stehen unterschiedliche in vitro Modelle zur Verfügung. Das Modell des Herzens nach Langendorff ist besonders geeignet um Aussagen über Veränderungen der Kontraktilität zu treffen. Nachteil hierbei ist, dass endotheliale Mediatoren mittels Veränderungen der Myokardperfusion und der Kontraktilität Einfluß auf die Meßergebnisse nehmen können (siehe 1.3). Im Vergleich dazu lassen sich mit dem Modell des isolierten Kardiomyozyten endotheliale Einflußfaktoren ausschalten, jedoch liegt hier ein Nachteil bei der Messung der Kontraktilität vor. Von uns wurde das Modell des isolierten Papillarmuskels gewählt, da das durch aktivierte PMN, die Hauptobjekt unsere Untersuchungen waren, ausgelöste Phänomen des capillary plugging sowie auch andere vom Endothel ausgehende Einflußfaktoren ausgeschaltet werden sollten. Hiermit war die simultane Messung der Kontraktilität und des Kalzium-Transienten unabhängig von Veränderungen der Myokardperfusion oder der Beeinflussung durch endotheliale Faktoren möglich. Dabei wurde die adäquate Versorgung der durch Diffusion ernährten Papillarmuskeln sichergestellt, indem die von Paradise et al. (75) etablierten Rahmenbedingungen zur Muskeldicke, Stimulationsfrequenz und Außentemperatur eingehalten wurden (siehe 3.2.3).

Mit dem zur Messung des Kalzium-Transienten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 ließ sich in der Mehrzahl der Versuche ein klares Kalzium-Signal darstellen. Auf eine Kalibrierung des Fura-Signals wurde dabei wie zuvor erwähnt aus praktischen Gründen verzichtet und statt dessen die „Fura-Ratio-Methode“ angewandt, mit der Konzentrationsunterschiede und nicht Absolutwerte des intrazellulären Kalziums gemessen wurden (siehe 3.1.3.). Diese Methode hat sich in der Praxis wegen ihrer Einfachheit und vor allem wegen der Reduzierung von Artefakten durchgesetzt. Trotzdem war in einigen Versuchsabläufen die Klarheit des Kalzium-Signals durch Artefakte beeinträchtigt. Vorteil bei der Verwendung von Fura-2 gegenüber anderen Farbstoffen wie z.B. Quin-2 ist eine ca. 30-fach stärkere Fluoreszenz. Außerdem bindet sich Fura-2 selektiver an Kalzium als an andere im Zytosol befindliche Ionen wie z.B. Magnesium, Zink oder Eisen (73). Ein Nachteil von Fura-2, der jedoch auch bei anderen Farbstoffen wie z.B. Indo-1 besteht, ist, dass es zu einer Abpufferung von Kalzium durch Fura-2 kommt. Dies hat bei hohen Fura-2-Konzentrationen eine signifikante Reduzierung des gemessenen Peak des Kalzium-Transienten zur Folge. Weiterhin kommt es wie in Abbildung 4 aus 4.1. dargestellt zu einem, im Vergleich zur Muskelrelaxation, verzögertem Abfall des Kalzium-Signals, der mit der

Stärke der Fura-2-Beladung zunimmt. Dies ist bedingt durch die hohe Bindungsaffinität von Fura-2 an Kalzium. Das an Kalzium gebundene Fura-2 dient dabei als eine Art Kalziumquelle während der Muskelrelaxation (74). Dieses Problem der „Überladung“ der Papillarmuskeln trat auch bei einer geringen Anzahl der von uns durchgeführten Versuche auf und ließ sich nicht vollkommen beseitigen. Grund hierfür war offensichtlich die „chemische“ Beladungstechnik, d.h. die Verwendung der Acetoxymethyl (AM) Ester-Form von Fura-2, in der Fura passiv durch Diffusion in die Zelle dringt (70). Dies kann bei festgesetzter Beladungszeit zu unterschiedlichen Fura-2-Konzentrationen im Gewebe führen. Eine Alternative zur chemischen Beladungstechnik wäre die Anwendung der von Backx et al. etablierten „Mikroinjektionstechnik“ von Fura-2 Salz mittels einer Mikropipette gewesen (74). Da hierbei aber eine mechanische Schädigung der Papillarmuskeln nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, wurde die von zahlreichen anderen Autoren ebenfalls verwendete Beladungstechnik mit der AM-Form von Fura-2 bevorzugt.

Zur Isolierung der neutrophilen Granulozyten wurde Polymorphprep verwendet, ein eigens für die PMN-Isolation entwickeltes Präparat, dessen Vorteil in einer schnelleren, einfacheren und vor allem schonenderen Isolationsweise gegenüber z.B. der Isolation mit Ficoll-Hypaque liegt. So konnte eine Voraktivierung der PMN während Isolation und Reinigung sicher vermieden werden. Die Vitalität und Reinheit der isolierten PMN-Fraktion wurde in Vorversuchen durch Prüfung der Anfärbbarkeit mit Trypanblau (vitale Zellen lassen sich nicht anfärben) unter dem Lichtmikroskop getestet.

Zur Aktivierung der PMN wurde aus den verschiedenen möglichen Stimulantien PMA ausgewählt, da es als bisher potentester Stimulator der phagozytären Radikalbildung gilt (44). Die PMA-Dosis wurde dabei, basierend auf Untersuchungen von Newburger et al. (79), so gewählt, dass eine maximale PMN-Aktivierung erreicht wurde. Überprüft wurde der Grad der Aktivierung mit der parallel zum eigentlichen Versuch ablaufenden Chemilumineszenz-Messung (siehe 3.3.2.2.). Bei höheren Konzentrationen ist über eine kardiotoxische Wirkung von PMA berichtet worden (81), die jedoch bei der von uns verwendeten Dosis von 2 nM am Muskel in Vorversuchen ausgeschlossen werden konnte.

5.2. β -adrenerge Ansprechbarkeit des Myokards nach Hypoxie

Mit den von uns durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine 20-minütige Hypoxie des Papillarmuskels mit anschließender Reoxygenierung über 30 min zu einem

statistisch signifikanten verminderten Anstieg der Kontraktilität unter Isoproterenol-Stimulation führt. Dies bekräftigt die Ergebnisse von Persad et al. (61), der im Versuch mit isolierten Rattenherzen demonstrierte, dass nach 30-minütiger Ischämie und anschließender Reperfusion für 60 min die positiv inotrope Antwort auf Isoproterenol reduziert war. Dabei kam es durch die Ischämie, neben der Downregulation kardialer β -Rezeptoren (β_1 mehr als β_2) in ihrer Dichte und Affinität, zu einem Kontraktilitätsverlust, der auch nach 60-minütiger Reperfusion nicht reversibel war, so dass von einer irreversiblen Schädigung des Myokards ausgegangen werden muß. Eine anhaltende Beeinträchtigung der Kontraktilität nach Intervention trat bei den von uns durchgeführten Hypoxie-Versuchen jedoch nicht auf. Die Dauer der Hypoxie wurde im Vorfeld bereits so gewählt, dass eine irreversible Schädigung des kontraktilen Apparates ausgeschlossen werden konnte. Der während der Hypoxie auftretende Anstieg des diastolischen Kalzium-Transienten um 4,91 % bildete sich ebenfalls während der Reoxygenierung weitgehend zurück und war 30 min nach Hypoxieende nicht mehr signifikant erhöht. Trotz vollkommener Erholung der kontraktilen Parameter und anscheinend normalisiertem Kalziumstoffwechsel kam es durch die Hypoxie dennoch zu einer Verminderung der β -adrenergen Ansprechbarkeit in der Reoxygenierungsphase, die unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Persad et al. und anderer Autoren auf eine Störung in der β -adrenergen Signaltransduktion zurückzuführen ist. Dies läßt zum ersten Mal die Schlußfolgerung zu, dass eine durch Hypoxie oder Ischämie ausgelöste Störung in der β -adrenergen Signaltransduktion des Herzens auftritt, noch bevor es zu einer reversiblen oder irreversiblen Schädigung des kontraktilen Apparates kommt.

5.3. Aktivierte PMN reduzieren die β -adrenerge Ansprechbarkeit des Myokards

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass aktivierte PMN zu einer Verminderung der β -adrenergen Ansprechbarkeit des Papillarmuskels führen. Die positiv inotrope Antwort auf Isoproterenol nach 30-minütiger Gabe aktivierter PMN auf den Papillarmuskel und anschließender 20-minütiger Erholungsphase war dabei ähnlich stark reduziert wie nach Induzierung einer 20-minütigen Hypoxie. Der Grad der Reduzierung in der β -adrenergen Ansprechbarkeit durch die beiden auslösenden Noxen (Hypoxie oder PMN) scheint also vergleichbar.

Interessanterweise kam es während der Gabe aktivierter PMN ohne vorheriger Hypoxie zu keiner signifikanten Beeinträchtigung der basalen Kontraktilität. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu Versuchen an isolierten Rattenherzen, bei denen gezeigt werden konnte, dass auch

die alleinige Infusion aktivierter PMN, ohne vorherige Ischämie, eine kontraktile Dysfunktion induzieren kann (22). Diese Diskrepanz ist wohl dadurch erklärbar, dass nicht alle möglichen Schädigungsmechanismen der PMN im Modell des isolierten Papillarmuskels greifen, weshalb auch gerade dieses Modell im Vorfeld ausgewählt wurde. So kommt es nicht zum capillary plugging und somit auch nicht zu einer Minderung der Myokardperfusion, was zu einer Beeinträchtigung der Kontraktilität führen kann. Neben dem capillary plugging (8) und der Bildung freier Radikale (20) spielt die Adhäsion der Granulozyten ans Endothel und ihre Diapedese ins Myokard eine bedeutende Rolle in der Wirkungsweise der PMN im Rahmen des Reperfusionsschadens (52). Durch das alleinige „Umspülen“ des Papillarmuskels mit den PMN war die Kontaktzeit und damit wohl auch der Grad der Adhäsion wesentlich geringer als z.B. im Modell des isolierten Kardiomyozyten mit länger dauernder Inkubation von PMN (53). Die Wirkungsweise der aktivierten PMN in unserem Versuchsmodell beschränkte sich wohl ausschließlich auf die Bildung freier Radikale, durch deren alleinige Wirkung es nicht zu einer Beeinträchtigung der basalen Kontraktilität kam. Der diastolische Kalzium-Transient jedoch stieg im Verlauf der 30-minütigen PMN-Gabe kontinuierlich an. Dieser Anstieg setzte sich, im Gegensatz zu den oben beschriebenen Hypoxie-Versuchen, auch während der Erholungsphase fort, was auf eine irreversible Störung des Kalziumstoffwechsels hinweist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in unserem Modell aktivierte PMN die β -adrenerge Ansprechbarkeit im gleichen Ausmaß beeinträchtigen wie die Induzierung einer Hypoxie. Die durch PMN verursachte Reduzierung in der β -adrenergen Ansprechbarkeit ist dabei nicht mit dem Auftreten einer kontraktile Dysfunktion assoziiert. Anders als nach Hypoxie kommt es jedoch anscheinend zu einer irreversiblen Störung des Kalziumstoffwechsels.

5.4. Kalziumsensitivität des „stunned myocardium“

Die reversible kontraktile Dysfunktion („myocardial stunning“) ist eine der Manifestationsformen des Reperfusionsschadens. Als zugrunde liegender Pathomechanismus wird dabei eine verminderte Ansprechbarkeit der Aktin-Myosin-Fibrillen auf die Tropomyosin-lösende Wirkung des Kalziums, kurz eine verminderte Kalziumsensitivität, diskutiert.

Versuche von Kusuoka et al. an isolierten Rattenherzen zeigten eine verminderte Kalziumsensitivität des Myokards nach 15-minütiger Ischämie (28, 29). Gao et al. bestätigten diese Ergebnisse mit Untersuchungen an isolierten ventrikulären Muskeltrabekeln von Rattenherzen, die zuvor einer 20-minütigen Ischämie und anschließender Reperfusion ausgesetzt

waren (30). Hoffmeister et al. hingegen sah eine verminderte Kalziumsensitivität nicht als Ursache des „stunning“ an. In Versuchen mit isolierten Rattenherzen war hier die durch Kalzium maximal aktivierbare Kraft nach 30-minütiger Ischämie und 15-minütiger Reperfusion zwar vermindert, der prozentuale Kraftanstieg unter Kalzium-Stimulation im prä- und postischämischen Myokard jedoch gleich (71). In vivo Versuche von Heusch et al. an Schweinen mit Reduzierung des Blutflusses im Ramus interventrikularis anterior für 90 min und 30-minütiger Reperfusion zeigten ebenfalls eine Verminderung der maximal aktivierbaren Kraft, jedoch eine normale Kalziumsensitivität (72). Auch konnte bei von Heusch et al. durchgeführten Experimenten mit dem Kalzium-Sensitizer AR-L-57 eine normale Ansprechbarkeit auf Kalzium während des „stunning“ demonstriert werden (82).

Die Diskrepanz der Ergebnisse in den verschiedenen Untersuchungen ist vermutlich auf die Verwendung von unterschiedlichen Versuchsmodellen, sowie auf verschiedene Ischämie- und auch Reperfusionszeiten zurückzuführen. So zeigte Miller et al. in Versuchen an isolierten Kardiomyozyten von Schweineherzen, die zuvor einer 45-minütigen Ischämie und 30-minütiger Reperfusion ausgesetzt worden waren, dass sich eine mögliche Verminderung in der Kalziumsensitivität erst im Laufe der Reperfusion entwickelt (83).

Bei den von uns durchgeführten Versuchen, in denen die Kombination einer 20-minütigen Hypoxie und anschließende Gabe aktivierte PMN während der 30-minütigen Reoxygenierung erfolgte, kam es nicht zu einer verminderten positiv inotropen Antwort bei kurzzeitiger Erhöhung der Kalziumkonzentration im Perfusat (siehe 4.4.). Dies gibt den indirekten Hinweis, dass die Kalziumsensitivität des Papillarmuskels durch die o. g. Intervention nicht beeinträchtigt wurde und dass es auch nicht zu einer Schädigung des kontraktiven Apparates kam. Dazu ist zu sagen, dass der Kontraktilitätsverlust in unserem Versuchsmodell im Vergleich zu Experimenten von anderen Autoren relativ gering war.

Die Hauptaussage dieses Versuchsablaufes ist jedoch, dass durch eine direkte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration die einzelnen Schritte in der Kaskade der β -adrenergen Signaltransduktion umgangen wurden und sich dabei, anders als bei Stimulation mit einem β -Rezeptor Agonisten, keine Verminderung der positiv inotropen Antwort nach Intervention zeigte. Dies läßt vermuten, dass die nach Hypoxie oder PMN-Gabe verminderte Ansprechbarkeit auf Isoproterenol tatsächlich auf eine Störung in der β -adrenergen Signaltransduktion beruht und nicht auf einer Schädigung des kontraktiven Apparates.

An welcher Stelle in der Kaskade der β -adrenergen Signaltransduktion eine Schädigung durch Ischämie und Reperfusion auftritt ist noch ungeklärt. In den von Fu et al. durchgeführten Versuchen im in situ Modell an Schweinen zeigte sich nach 10-minütiger Ligatur des Ramus

interventrikularis anterior, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Persad et al., keine Downregulation der β -Rezeptoren. Die α -Untereinheit des G_s -Proteins, sowie das G_s -Protein selbst und die Aktivität der Adenylatzyklase war dabei ebenfalls unverändert (68). Die β -adrenerge Ansprechbarkeit war hier also unverändert. Eine direkter Stimulationsversuch mit einem β -Rezeptor-Agonisten oder die Bestimmung des c-AMP Levels fand dabei jedoch nicht statt. Hypoxie-Versuche von Delerive et al. an isolierten Kardiomyozyten zeigten ebenfalls keine Downregulation kardialer β -Rezeptoren in Dichte und Affinität, jedoch eine verminderte c-AMP Produktion nach Stimulation des β -adrenergen Systems mit Isoproterenol (66). Van den Ende et al. kam nach Ischämie-Versuchen an isolierten Rattenherzen zu ähnlichen Ergebnissen. Die Beeinträchtigung in der β -adrenergen Signaltransduktion lag dabei nicht auf Rezeptorebene, sondern in einer verminderten Aktivität der Adenylatzyklase mit folgender Erniedrigung des c-AMP Levels (84). Im Tierversuch an Ratten konnte gezeigt werden, dass bei dauerhafter Ligatur des Ramus interventrikularis anterior ohne anschließende Reperfusion die Dichte und Affinität der β -Rezeptoren unverändert bleibt, es jedoch zu einer Dysfunktion des G_s -Proteins kommt (85). Zusammenfassend ist zu sagen, daß die meisten Autoren die Ursache für die Störung in der β -adrenergen Signaltransduktion nicht in einer Affektion der kardialen β -Rezeptoren sehen, sondern eher in einer Beeinträchtigung des second-messenger Systems. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den zahlreichen Versuchen von Persad et al., bei denen es zu einer Downregulation der β -Rezeptoren nicht nur in den oben beschriebenen Ischämie-Versuchen kam, sondern auch bei direkter Inkubation kardialer Zellmembranen mit Xanthin und Xanthinoxidase (62), H_2O_2 (63) oder HOCl (64, 65)

Die von uns durchgeführten Versuche zeigen, dass sowohl eine Hypoxie des Myokards als auch aktivierte PMN zu einer Störung der β -adrenergen Ansprechbarkeit in der Reoxygenierungsphase führen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Störung der β -adrenergen Ansprechbarkeit zeitlich vor einer reversiblen oder irreversiblen kontraktile Dysfunktion auftritt. Die Lokalisation der Schädigung in der Kaskade der β -adrenergen Signaltransduktion ist jedoch noch nicht endgültig geklärt und erfordert weitere Untersuchungen.

5.5. Ausmaß der Schädigung der β -adrenergen Ansprechbarkeit

In den von Delerive et al. durchgeführten Hypoxie-Versuchen am isolierten Kardiomyozyten zeigte sich nicht nur, dass eine Hypoxie zu einer Abnahme der c-AMP Bildung unter Isoproterenol-Stimulation führt, sondern auch, dass diese Abnahme mit der Dauer der Hypoxie

zunimmt. So kam es 1,5 Std. nach Hypoxiebeginn zu einer Reduzierung des c-AMP Levels auf 80 %, nach 2,5 Std. auf 40 % und nach 3,5 Std. auf 30 % im Vergleich zu normoxischen Myozyten (66). Die Dauer der Hypoxie hatte also einen kumulativen Schädigungseffekt. In den von uns durchgeführten Versuchen, bei denen die Kombination einer 20-minütigen Hypoxie mit Gabe aktivierter PMN für 30 min in der Reoxygenierungsphase erfolgte, kam es jedoch zu keiner signifikant zusätzlichen Verminderung der β -adrenergen Ansprechbarkeit im Vergleich zu einer alleinigen Hypoxie oder alleinigen PMN-Gabe. Die beiden unterschiedlichen Noxen hatten also keinen additiv schädigenden Effekt auf die β -adrenerge Ansprechbarkeit.

Zu den Untersuchungen von Delerive et al. ist anzumerken, dass die Hypoxietoleranz der Zellen im Modell des isolierten Kardiomyozyten, verglichen mit unserem Versuchsmodell, wesentlich größer ist. Dennoch wird eine Hypoxie-Dauer von 3,5 Std. im Modell des isolierten Kardiomyozyten als Zeitpunkt des Übergangs von reversibler zu irreversibler Schädigung angesehen (86). Genau nach dieser Hypoxie-Zeit berichtete Delerive et al. von einer Plateaubildung in der Störung der c-AMP Produktion unter Iso-Stimulation (66). Trotz Übergang in die irreversible Zellschädigung behielten die Kardiomyozyten also eine verbleibende positiv inotrope Reserve. Ob dieses Ausmaß der Zellschädigung durch eine 20-minütige Hypoxie und anschließende Gabe aktivierte PMN bei den von uns durchgeführten Versuchen erreicht wurde, ist nicht mit Sicherheit zu sagen. Jedoch kam es, im Gegensatz zur getrennten Einwirkung der beiden Noxen, zu einem signifikanten dauerhaften Kontraktilitätsverlust nach Intervention (Reduzierung von F_{\max} um 11 %, $+dF/dt$ um 8 % im Vergleich zum prähypoxischen Ausgangswert). Die Vermutung, dass hier eine irreversible Zellschädigung auftrat liegt also nahe. Der diastolische Kalzium-Transient zeigte allerdings keinen verstärkten Anstieg im Vergleich zur Induzierung einer alleinigen Hypoxie.

Angesichts der Tatsache, dass es trotz Auftreten einer kontraktilen Dysfunktion zu keiner weiteren Beeinträchtigung der β -adrenergen Ansprechbarkeit kam und mit Berücksichtigung der Ergebnisse von Delerive et al. kann man die Hypothese aufstellen, dass es im postischämischen Myokard zwar zu einer Störung in der β -adrenergen Signaltransduktion kommt, das Myokard jedoch noch eine restliche positiv inotrope Reserve behält. Wie groß diese positiv inotrope Reserve ist bzw. bis zu welchem Ausmaß die Schädigung in der β -adrenergen Signaltransduktion während des stunning geht, ist noch zu klären.

5.6. Ursachen für die Störung der β -adrenergen Ansprechbarkeit

Als einer der Hauptfaktoren in der Pathogenese des Reperfusionsschadens gilt die während der Reperfusion stattfindende Bildung freier Sauerstoffradikale (16,17), deren Hauptquelle wiederum aktivierte PMN darstellen (20). So ist eine Abschwächung von Reperfusionsschäden, zumindest in vitro, durch Gabe verschiedener Antioxidantien möglich. Dazu gehören SOD in Verbindung mit Katalase (35), durch deren Wirkung erst O_2^- mittels SOD zu H_2O_2 umgewandelt wird, welches dann durch Katalase neutralisiert wird (44). Desweiteren ist eine protektive Wirkung gegen HOCl bzw. OH^\cdot durch die Gabe von L-Methionin bzw. Mannitol möglich.

In den unter 5.2. beschriebenen Versuchen von Persad et al. zeigte sich, dass die Applikation von SOD und Katalase nicht nur eine kontraktile Dysfunktion verhindern, sondern auch die Störung in der β -adrenergen Signaltransduktion nach Ischämie aufheben kann (61). Ursache für die Verminderung der β -adrenergen Ansprechbarkeit nach Ischämie scheint hier also die Bildung freier Radikale zu sein. Von Persad et al. durchgeführte Versuche an kardialen Zellmembranen mit direkter Inkubation freier Radikale wie H_2O_2 oder HOCl die zum Auftreten einer Störung in der β -adrenergen Signaltransduktion führte bekräftigen diese Vermutung (63, 64).

Eine protektive Wirkung von Radikalfängern war auch bei den von uns durchgeführten Versuchen festzustellen. Die Intervention in den Versuchen bestand dabei aus der Kombination einer 20-minütigen Hypoxie mit anschließender Gabe aktivierter PMN für 30 min um gewissermaßen einen maximalen Schädigungseffekt durch den oxidativen Stress zu erreichen. Durch die gleichzeitige Gabe von SOD und Katalase war die zuvor beobachtete Reduzierung der β -adrenergen Ansprechbarkeit jedoch nicht mehr signifikant. Außerdem kam es zu keinem signifikanten dauerhaften Kontraktilitätsverlust durch die Intervention. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Persad et al., der zeigte, dass eine durch Ischämie bzw. Hypoxie verursachte Verminderung in der β -adrenergen Ansprechbarkeit ihre Ursache in der Bildung freier Radikale hat.

Wir konnten somit zeigen, dass die von aktivierten PMN verursachte Verminderung der β -adrenergen Ansprechbarkeit auf die Freisetzung und Schädigung durch freie Radikale zurückzuführen ist. Der für das myokardiale stunning allgemein verantwortliche oxidative Stress führt also auch zu einer Verminderung der β -adrenergen Ansprechbarkeit, wobei wiederum aktivierte PMN eine Hauptrolle in der Pathogenese spielen.