

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin

Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Dr.h.c. H. Van Aken

Der Einfluss von Sn-Mesoporphyrin, einem Inhibitor
der Hämoxygenase, auf myokardiales Stunning bei
wachen, chronisch instrumentierten Hunden

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Holger Böhle
aus Kassel

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Prof. Dr.med. W.Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Weber
 2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. T. Schulte
- Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Dr.h.c. H. Van Aken
Referent: Prof. Dr. med. T. Weber
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. T. Schulte

Zusammenfassung

Der Einfluss von Sn-Mesoporphyrin, einem Inhibitor der Hämoxygenase, auf myokardiales Stunning bei wachen, chronisch instrumentierten Hunden

Böhle, Holger

Myokardischämien zählen zu den führenden Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Die Behandlung von Krankheitsbildern wie Angina pectoris, akutem Koronarsyndrom und Myokardinfarkt stellen auch heute noch eine große medizinische Herausforderung dar. Postischämische kontraktile Dysfunktionen des Myokards können bestimmend für Prognose und Verlauf dieses Krankheitsbildes sein. Myokardiales Stunning beschreibt eine vollständig reversible kontraktile myokardiale Dysfunktion nach Ischämie, die in Abwesenheit irreversibler Myokardschädigung auftritt. Es wurde nachgewiesen, dass insbesondere die induzierbare Form der Hämoxygenase nach Induktion positive Effekte auf myokardiales Stunning hat. In dieser Studie wurden die Auswirkungen der pharmakologischen Blockade der Hämoxygenase mittels Sn-mesoporphyrin auf myokardiales Stunning bei wachen, chronisch instrumentierten Hunden untersucht.

Die Versuche wurden durch die Bezirksregierung Münster (Aktenzeichen: 23.0835.1.0 (G 36/98) vom 06.11.1998) genehmigt. Es wurden sechs Hunde der Rasse „Foxhound“ in Allgemeinanästhesie instrumentiert. Messsonden wurden eingebracht, mit deren Hilfe Herzfrequenz, arterieller Blutdruck, linksatrialer Druck, links-ventrikulärer Druck, Blutflussgeschwindigkeit im Ramus interventricularis anterior (RIVA) der linken Koronararterie und die myokardiale Wanddickenfraktion (WDF) aufgezeichnet werden konnten. Um den RIVA wurden Ballonokkluder gelegt, um kurzzeitige Ischämien im RIVA-perfundierten Myokardbereich zu induzieren. Die regionale myokardiale Perfusion konnte mit Hilfe gefärbter Mikrosphären postmortal bestimmt werden. Das Versuchsprotokoll wurde in zwei Versuchsabschnitte unterteilt. Bei drei Tieren wurde im ersten Versuchsabschnitt ohne medikamentöse Vorbehandlung eine zehnminütige Okklusion der LAD durchgeführt. Die übrigen drei Tiere erhielten bis zehn Minuten vor dem ersten Versuchsabschnitt eine intravenöse Injektion von 5 µmol/kg/h Sn-Mesoporphyrin IX. Nach vollständiger Erholung der WTF wurde die zweite Versuchsreihe mit umgekehrtem Prozedere durchgeführt.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Outcome von Kontroll- und Interventionsgruppe. Es wurde kein kardioprotektiver Vorteil der Aktivität der nicht inhibierten Hämoxygenase gegenüber der inhibierten Form nachgewiesen. Die hämodynamischen Parameter, das Verhalten der regionalen Wanddickenveränderung sowie die Veränderungen des regionalen myokardialen Blutflusses gaben keinen Hinweis auf Kardioprotektion in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Interventionsgruppe.

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.09.2009

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Allgemeine Einleitung	1
1.2 Myokardiale Ischämien und myokardiales Stunning	3
1.2.1 Mechanismen des myokardialen Stunnings	6
1.2.2 Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums	6
1.2.3 Entstehung von Sauerstoffradikalen (Oxyradikal-Hypothese)	6
1.2.4 Kalzium-Hypothese	8
1.2.5 Die klinische Bedeutung myokardialen Stunnings	9
1.3 Hitzeschockproteine	11
1.4 Hämoxygenase	15
1.5 Wirkungen der Reaktionsprodukte der Hämoxygenase	19
1.5.1 Kohlenstoffmonoxid	19
1.5.2 Bilirubin und Biliverdin	21
1.5.3 Eisen und Ferritin	22
1.6 Induktion und Hemmung der Hämoxygenase-1	24
1.6.1 Induktion der HO-1	24
1.6.2 Inhibition der HO-1	27
1.7 Sn-Mesoporphyrin	28
1.8 Ziel der Untersuchung	29
2. Material und Methoden	30
2.1 Vorbereitung der Instrumentierung	30

2.2 Instrumentierung	32
2.3 Messmethoden	36
2.3.1 Invasive Blutdruckmessung	36
2.3.2 Linksventrikulärer Druck	36
2.3.3 Messung der koronaren Blutflussgeschwindigkeit	37
2.3.4 Bestimmung der fraktionellen Wanddicke (WTF)	37
2.3.5 Regionale myokardiale Perfusion	38
2.4 Versuchsprotokoll	41
2.5 Datenerfassung und Statistik	45
3. Ergebnisse	46
3.1 Hämodynamik	47
3.1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	50
3.1.2 Linksatrialer Druck (LAP)	51
3.1.3 Linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (LVdP·dt ⁻¹)	52
3.1.5 Blutflussgeschwindigkeit im Ramus interventricularis (BFV LAD)	54
3.2 Regionale Wanddickenveränderung (WTF)	55
3.3 Regionaler myokardialer Blutfluss	56
4. Diskussion	57
4.1 Methoden	57
4.1.2 Instrumentierung und Versuchsdurchführung	64
4.1.3 Methodologische Einflüsse	66
4.2 Diskussion der Versuchsergebnisse	71
4.2.1 Die Bedeutung der Inhibition des HO-Systems während	72
4.2.2 Versuchsergebnisse	75
4.3 Schlussfolgerung und Ausblick	79
Literaturverzeichnis	82
Danksagungen	98
Lebenslauf	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Hämmetabolismus, Reaktionsprodukte und deren Wirkung	Seite 17
Abbildung 2	Induktion der Hämoxygenase-1	Seite 26
Abbildung 3	Strukturformel von Sn-Mesoporphyrin	Seite 29
Abbildung 4	Versuchsablauf	Seite 44
Abbildung 5	Mittlerer arterieller Druck (MAP)	Seite 51
Abbildung 6	Linksatrialer Druck (LAP)	Seite 52
Abbildung 7	Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit	Seite 53
Abbildung 8	Herzfrequenz (HR)	Seite 54
Abbildung 9	Blutflussgeschwindigkeit in der LAD	Seite 55
Abbildung 10	Regionale myokardiale Wanddickenveränderung	Seite 56

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1</i>	Eigenschaften von CO, Wirkmechanismen	Seite 20
<i>Tabelle 2</i>	Ausgangsbedingungen für Experimente	Seite 42
<i>Tabelle 3</i>	Versuchsablauf	Seite 43
<i>Tabelle 4</i>	Zeitpunkte zur Applikation der Mikrosphären	Seite 45
<i>Tabelle 5</i>	Übersicht Hämodynamik 1	Seite 49
<i>Tabelle 6</i>	Übersicht Hämodynamik 2	Seite 50
<i>Tabelle 7</i>	Regionaler myokardialer Blutfluss	Seite 57

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	Aktivatorprotein
ATP	Adenosintriphosphat
BL	Baseline Ausgangswerte, Ausgangsbedingungen
BFV LAD	Blutflussgeschwindigkeit in der linken Koronararterie
°C	Grad Celsius
cGMP	Guaninmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
CoPPiX	Kobald-Protoporphyrin
F_i O₂	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration
g	Gramm
h	Stunde(n)
HO	Hämoxygenase
HR	Herzfrequenz
HSP	Hitzeschockprotein
Hz	Hertz
IL	Interleukin
Isch	Ischämie
iv	Intravenös
IRP	iron regulatoy protein
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
kHz	Kilohertz
LAD	Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie
LAP	Linksatrialer Druck
LV	Linker Ventrikel
LVdP · dt⁻¹	Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
LVP	Linksventrikulärer Druck
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
MAP	Mittlerer arterieller Druck
mg	Milligramm
mHz	Megahertz
Min/min	Minute(n)
ml	Milliliter
MnPPiX	Mangan-Protoporphyrin
NADPH	Nicotinsäure-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
O₂⁻	Superoxid-Anion
OH⁻	Hydroxylradikal
p_ACO₂	Alveolärer Kohlendioxidpartialdruck
p_aCO₂	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
p_aO₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck

PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RCX	Ramus circumflexus der linken Koronararterie
RIVA	Ramus interventrikularis anterior
RMBF	Regionaler myokardialer Blutfluss
ROS	reactive oxygen species
SD	Standardabweichung
SnMP	Zinn-Mesoporphyrin
SnPPIX	Zinn-Protoporphyrin
SOD	Superoxiddismutase
S_pO₂	Periphere Sauerstoffsättigung
SPECT	Single-Photonen-Emissions-Computertomographie
SV	Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
WTF	wall thickening fraction – Wanddickenfraktion
ZnPPIX	Zink-Protoporphyrin
ZTE	Zentrale Tierexperimentelle Einrichtung der Universität Münster

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Die Paradigmen der Erforschung des Hämabbaus haben sich in den letzten Jahrzehnten stark verändert. Häm entsteht beim Abbau roter Blutkörperchen. Es ist Bestandteil des Hämoglobins, dem roten Blutfarbstoff. Außer aus Globulin, das den Proteinanteil des Hämoglobins darstellt, besteht es aus Hämmolekülen, die als prosthetische Gruppe fungieren. Häm ist weiter Bestandteil einer großen Anzahl von Enzymen, bei deren Metabolisierung es freigesetzt wird.

Das Hämmolekül zählt zu den Porphyrinen und ist auch unter der Bezeichnung „Fe-Protoporphyrin-XI“ bekannt. Die Molekülstruktur besteht aus einem Ringsystem mit vier Pyrrolringen, die durch Methinbrücken zu einem Tetrapyrrolysystem verknüpft sind. Für den ständigen Abbau des im Organismus anfallenden Häms ist das Enzym Hämoxxygenase (HO) verantwortlich.

Lange Zeit wurde der HO, von der ein induzierbares (HO-1) und ein konstitutionelles (HO-2) Isoenzym existiert, in der Forschung wenig Beachtung geschenkt. Die beim Hämabbau entstehenden Reaktionsprodukte wie Eisen, Bilirubin und Kohlenmonoxid (CO) wurden lange Zeit als Abfallprodukte mit potentiell toxischen Wirkungen angesehen (123).

Die Entdeckung, dass lösliche Gase wie Stickstoffmonoxid (NO) und CO wichtige Steuerungsfunktionen in der Vasoregulation übernehmen, hat seit den achtziger Jahren zu einer Änderung dieser Sichtweise geführt (116).

Die Tatsache, dass der Großteil des endogen produzierten CO durch den Hämabbau entsteht (114), und dass es sich bei der Hämoxxygenase um das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Hämabbaus handelt, trieb die detaillierte Erforschung der Reaktion der Hämdegradation, der Molekülstruktur der beteiligten Proteine sowie die Entschlüsselung der genauen Reaktionsmechanismen voran. Inhalte der Forschung waren nunmehr die Induktion des induzierbaren Isoenzym HO-1 und die Mechanismen der Genregulation.

In den letzten zehn Jahren wechselte der Fokus der Forschung von der mittlerweile gut definierten metabolischen Funktion der Hämoxigenase zur Betrachtung ihrer Funktion bei der Protektion von Zellen vor Stresseinflüssen wie beispielsweise Ischämie, Hypoxie oder Hitze. Dies geschah anhand einer Vielzahl von verschiedenen Stressmodellen.

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits 2001 zeigen (130), dass die Gabe von Hämin über einen Zeitraum von einer Woche durch die Induktion der Hämoxigenase myokardiales Stunning, eine durch Ischämie induzierte kontraktile Dysfunktion des Myokards, im chronisch instrumentierten Hund abschwächen kann. Die Hämoxigenase ist somit kardioprotektiv wirksam (130). Bei Hämin handelt es sich um das Hämmolekül, wobei sich das zentrale Eisen-Ion in der Oxidationsstufe (+III) befindet. Hämin wird häufig experimentell zur Induktion der HO-1 eingesetzt (20).

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass nach einer langfristigen Induktion der HO die Erholung von myokardialen Stunning verbessert wird, stellt sich die Frage, wie groß der Einfluss der HO in physiologischer Konzentration, ohne vorherige Induktion, auf myokardiales Stunning ist. Kacimi untersuchte 2000 die Induktion der HO-1 an Kardiomyozyten durch Hypoxie und zeigte, dass die mRNA der HO-1 innerhalb eines kurzen Zeitraums stark vermehrt transkribiert wurde (57). Somit könnte die HO-1 beim Stunning, das durch Ischämie ausgelöst wird, in gleicher Weise ihre Expression und Aktivität steigern und dadurch das Versuchsergebnis beeinflussen. Es ist daher denkbar, dass die HO auch unter physiologischen Bedingungen, ohne vorangegangene Induktion, wichtige zytoprotektive Wirkungen vermittelt. Möglicherweise beeinflusst daher eine akute Hemmung der HO myokardiales Stunning (130).

1.2 Myokardiale Ischämien und myokardiales Stunning

Der Begriff Myokardischämie beschreibt den Zustand einer reduzierten oder vollständig unterbrochenen regionalen oder globalen Sauerstoffversorgung des Myokards. Ursache dafür ist eine unzureichende koronare Perfusion der betroffenen Myokardregion. Es entsteht ein Ungleichgewicht aus Sauerstoff- und Nährstoffbedarf der betroffenen Herzmuskelzellen und dem bereitgestellten Angebot an Substraten. Als Folge dieser Mangelversorgung können elektrophysiologische und kontraktile Funktionsstörungen des Myokards auftreten.

In den westlichen Industrieländern ist die Arteriosklerose der Koronararterien die häufigste Ursache für eine verminderte Perfusion eines Herzmuskelareals. Folge sind Krankheitsbilder wie Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen, Herzinsuffizienz, akutes Koronarsyndrom und der Herzinfarkt (35).

Diese Folgekrankheiten der koronaren Herzkrankheit (KHK) zählen zu den führenden Sterbeursachen in den westlichen Industrienationen. Laut Statistischem Bundesamt gehörte 2006 die ischämische Herzerkrankung bei Frauen und Männern zu den häufigsten Todesursachen in der Bundesrepublik Deutschland (117). Durch vermehrten Wohlstand und die damit verbundenen Ernährungsgewohnheiten in den westlichen Industrienationen sind hier die Risikofaktoren für die Atherosklerose überproportional verbreitet.

Die Entwicklung neuer Therapiekonzepte zur Behandlung der KHK schreitet schnell voran. Frühzeitige Herzkatheteruntersuchungen, eventuell mit Ballondilatation und Stent-Einlage, gehören mittlerweile zum klinischen Standard und haben die Lysetherapie in der Akutbehandlung des Myokardinfarktes verdrängt. Eine immer effektivere Behandlung der ischämischen Herzerkrankung ist möglich. Zudem kann durch Identifizierung und Behandlung der Risikofaktoren wie Diabetes, Hyperlipidämie, Adipositas, Nikotinabusus und Bewegungsmangel das Auftreten der KHK vermindert werden. Von der medikamentösen Therapie über interventionelle Herzkatheteruntersuchung bis hin zum koronarchirurgischen Eingriff existieren therapeutische Möglichkeiten, die die Mortalität dieses Krankheitsbildes reduzieren. Deshalb nimmt die Untersuchung der Entstehung und der Therapie

dieser Erkrankung sowie der Primär- und Sekundärprävention eine Schlüsselrolle im heutigen Gesundheitswesen ein.

Die erste dokumentierte Untersuchung der Auswirkung kardialer Ischämien durch koronare Okklusion stammt aus dem Jahr 1698. Chirac ligierte eine Koronararterie beim Hund und beobachtete kurze Zeit darauf den Herzstillstand (18). Herrick demonstrierte Anfang des 20. Jahrhunderts, dass eine dauerhafte Ligatur einer Koronararterie zu einem Herzinfarkt führt (51). Tennant and Wiggers stellten 1935 erstmals am lebenden Tiermodell (open chest dog) fest, dass sich die ischämische Zone des Myokards innerhalb kurzer Episoden koronarer Okklusion (60s) in seiner Funktion änderte: Ein Myokardareal, das sich vorher noch aktiv kontrahierte, bewegte sich nach Okklusion nur noch passiv, indem es durch den noch perfundierten und aktiven Herzmuskel gedehnt wurde (121).

Bis Anfang der achtziger Jahre wurde die Untersuchung der postischämischen Reperfusionphase des Herzmuskels wenig beachtet. Man ging lange Zeit davon aus, dass nur zwei Alternativen für das ischämische Myokard existieren: Im Falle einer rechtzeitigen Reperfusion die vollständige Erholung des Myokards, im anderen Fall die Infarzierung des betroffenen Areals mit komplettem Verlust der Kontraktilität der Myozyten (14).

Die Arbeitsgruppe um Heyndrickx beschrieb 1975 erstmals das Phänomen der postischämischen Dysfunktion (52). An wachen, chronisch instrumentierten Hunden wurde beobachtet, dass nach 5-15 Minuten Ischämie in noch vitalem Myokard und nach vollständiger Reperfusion eine prolongierte kontraktile Dysfunktion bestehen bleiben kann. Dies wurde jedoch zunächst von Klinikern als ein nur unter Laborbedingungen auftretender Zustand betrachtet.

Unter Braunwald und Kloner wurde 1982 der Begriff "myocardial stunning" für dieses Phänomen geprägt (14). Der Begriff „myokardiales Stunning“ beschreibt die mechanische postischämische Dysfunktion des Herzmuskels, die, in Abwesenheit von irreversiblen Schäden, auch nach Reperfusion persistiert (12). Wichtig dabei ist, dass diese postischämische Dysfunktion unabhängig von ihrer Schwere und Dauer vollständig reversibel ist. Das Interesse an diesem Phänomen wuchs erst in den achtziger Jahren mit steigender klinischer

Verwendung von Thrombolytika (9). Durch zunehmenden Einsatz der interventionellen Therapie zur Behandlung der Folgen der KHK gehören Reperfusionenphänomene mittlerweile zum klinischen Alltag. Damit gewinnt auch das myokardiale Stunning als eines dieser Reperfusionenphänomene zunehmend an Bedeutung.

Die wichtigste Differentialdiagnose zum Stunning ist das so genannte „hibernating myocardium“ („winterschlafendes Myokard“). Dieses Phänomen wurde erstmals 1978 von Diamond und Mitarbeitern erkannt (27). 1989 entstand durch Rhamitoola das Konzept der „Hibernation“ als reversible chronische linksventrikuläre Dysfunktion (97). Hibernation bezeichnet eine dauerhafte kontraktile Dysfunktion, die bei chronischer Koronarinsuffizienz im Rahmen der KHK auftritt (132). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um einen Mechanismus des Herzmuskels, den Sauerstoff- und Nährstoffverbrauch an den verminderten koronaren Blutfluss anzupassen. Durch Reduktion der Kontraktionsarbeit des betroffenen Myokardareals wird ein Gleichgewicht zwischen Verbrauch und Angebot aufrechterhalten und dadurch eine Myokardnekrose vermieden. Die Phänomene Stunning und Hibernation sind zwei Formen der kontraktile Dysfunktion des vitalen Myokards, deren Hauptunterschied darin liegt, dass bei Hibernation eine koronare Minderperfusion fortbesteht, während beim Stunning eine normale Blutversorgung oder in der Frühphase der Reperfusion sogar eine reaktive Hyperämie mit supranormalem Blutfluss vorliegt (132).

Aus den oben genannten Gründen muss das myokardiale Stunning strikt von Hibernation und von der myokardialen Infarzierung abgegrenzt werden, auch wenn sie gleichzeitig und nebeneinander an einem Herzen auftreten können. Die Abgrenzung der Phänomene Stunning und Hibernation ist ohne gleichzeitige Messung von koronarer Perfusion und myokardialer Funktion kaum möglich (11).

1.2.1 Mechanismen des myokardialen Stunnings

Bei myokardialem Stunning handelt es sich um einen multifaktoriellen Prozess, in dem mehrere Mechanismen eine wichtige Rolle einnehmen (7). Es bestehen mehrere Hypothesen zu seinem Entstehen:

- 1) Entkopplung der Exzitations-Kontraktions-Kaskade aufgrund einer Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums
- 2) Oxyradikal-Hypothese
- 3) Kalzium-Hypothese

1.2.2 Dysfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums

Das sarkoplasmatische Retikulum zeigt eine verminderte Kalziumtransportkapazität, die mit einer verminderten Aktivität der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATPase einhergeht (62). Dies führt zu einem relativen Kalziummangel an den kontraktile Myofilamenten. Da Kalzium zur Aktivierung dieser kontraktile Proteine notwendig ist, werden weniger Einheiten der Myofilamente aktiviert.

1.2.3 Entstehung von Sauerstoffradikalen (Oxyradikal-Hypothese)

In den frühen achtziger Jahren kamen einige Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass myokardiales Stunning durch reaktive Sauerstoffradikale verursacht wird. Zu ihnen zählen das Superoxid-Anion (O_2^-), Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal (OH^\cdot) (13).

Die Bildung freier Sauerstoffradikale scheint eine signifikante Rolle bei der Entstehung der postischämischen Dysfunktion zu spielen. Die aktivierten Sauerstoffradikale können Proteine denaturieren und Enzyme deaktivieren (24). Durch die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Membranen können wichtige Zellorganellen der Myozyten wie das sarkoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien geschädigt werden.

Durch den Einsatz von Superoxyddismutase (SOD) und Katalase, die den Abbau freier Sauerstoffradikale katalysieren, kann dieser Mechanismus

abgeschwächt werden. Es konnte bei ihrem Einsatz eine signifikant verbesserte Erholung des Herzmuskels von der Ischämie beobachtet werden (83).

In nachfolgenden Untersuchungen mit Verwendung von Antioxidantien konnte gezeigt werden, dass die Reduktion freier Sauerstoffradikale die Erholung von myokardialen Stunning verbessert (42).

Der Nachweis der verbesserten kardialen Erholung durch den Einsatz von Antioxidantien ist jedoch nur ein indirekter Beweis für die Entstehung freier Sauerstoffradikale bei myokardialen Stunning.

In einer Studie konnten Bolli und Mitarbeiter 1988 den direkten Nachweis für die Entstehung von freien Sauerstoffradikalen erbringen. Sie stellten fest, dass es zu einer enormen Anflutung reaktiver Radikale unmittelbar nach der Reperfusion kommt (13). Weiter konnte gezeigt werden, dass die Produktion freier Radikale proportional zur Schwere der vorausgegangenen Ischämie war.

Häufiger Kritikpunkt an oben angeführten Studien ist ihre Durchführung an „open-chest“-Modellen. Dabei handelt es sich um Akutversuche am narkotisierten und sternotomierten Tier. Die Entstehung der Oxyradikale könnte somit auch zu einem großen Teil durch die Präparationsumstände im akut instrumentierten Tier verursacht sein (70). Die Diskussion der verschiedenen Versuchsmodelle erfolgt in einem späteren Teil der vorliegenden Arbeit.

Auch Studien an chronisch instrumentierten Tieren zeigten, dass die Bildung von Oxyradikalen durch die Gabe von Antioxidantien vermindert werden konnte und diese Maßnahme die Erholung von einer 15 minütigen koronaren Okklusion signifikant verbesserte (109). Dies unterstreicht die Hypothese, dass die kontraktile Dysfunktion im Rahmen myokardialen Stunnings durch eine oxyradikalinduzierte Schädigung der Kardiomyozyten verursacht wird.

Über welche zelluläre Mechanismen die Sauerstoffradikale Stunning verursachen ist noch nicht eindeutig geklärt. Das Problem besteht darin, dass Oxyradikale theoretisch auf alle zellulären Bestandteile toxisch wirken und Proteine gleichermaßen wie Lipide geschädigt werden können. Folgen sind Proteindenaturierung, Enzyminaktivierung und Veränderung der Membranpermeabilität (10,24). Diese Permeabilitätsveränderung wird durch eine radikalinduzierte Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren

verursacht. Dies hat eine Beeinträchtigung der selektiven Membranpermeabilität zur Folge. Zudem werden durch diesen Mechanismus Zellorganellen geschädigt (10). Die Wirkung der Oxyradikale auf das Sarkolemm bestehen in einer Hemmung der Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ sowie in einer Hemmung des Kalziumaustausches (58).

1.2.4 Kalzium-Hypothese

Kalzium ist der chemische Aktivator für die Kontraktion der Herzmuskelzelle. Deshalb kann eine Dysfunktion innerhalb dieser Aktivierungskaskade eine Ursache für die Entstehung myokardialen Stunnings darstellen.

Die Kalzium-Hypothese besagt, dass Stunning durch ein Ungleichgewicht des zellulären Kalziumhaushalts verursacht werden könnte.

Bereits Mitte der achtziger Jahre existierten Untersuchungen, die darauf hinwiesen, dass myokardiales Stunning mit einem „Kalzium-Overload“ verbunden ist, der in der Reperfusionsphase entsteht. Dabei handelt es sich um einen starken Kalziumeinstrom in die Kardiomyozyten während der Frühphase der Reperfusion nach myokardialer Ischämie. Es konnte gezeigt werden, dass unter Ryanodin, einem Inhibitor des Kalziumeinstroms, dieser "Kalzium-Overload" verhindert und darüber hinaus die Schwere des Stunnings verringert werden konnte (94). Auch durch Perfusion des Herzens mit einer kalziumarmen Lösung konnte die Erholung des Myokards von einer transienten Ischämie verbessert werden (65).

Es wurde beobachtet, dass besonders in der Frühphase der Reperfusion der Einstrom von Kalzium in die Zellen stark erhöht ist und sich nach einigen Minuten normalisiert (12). Dieser gesteigerte Kalziumeinstrom könnte zu einer Schädigung von Zellorganellen führen. Grinwald vertrat schon 1982 die Hypothese, dass durch Hemmung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ das intrazelluläre Natrium in „stunnendem“ Myokard ansteigt (40). Durch die $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}\text{-Pumpe}$ gelangt während der Reperfusion massiv Kalzium im Austausch gegen Natrium in die Zelle. Dieser Mechanismus hat einen starken Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration zur Folge. Direkte Messungen der intrazellulären

Kalziumkonzentrationen belegten, dass eine Ischämie von 10 Minuten, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, bereits einen Kalzium-Overload verursachen. Dieser wird in der Reperfusionphase noch signifikant erhöht (17). Dies zeigt erneut, dass es sich beim myokardialen Stunning vor allem um die Manifestation eines Reperfusionsschadens handelt.

Zudem ist die Kalzium-Hypothese mit der Oxyradikal-Hypothese vereinbar. Durch Einwirkung von reaktiven Sauerstoffradikalen könnten derartige Veränderungen der myofibrillären Proteine hervorgerufen werden, dass ein vermindertes Ansprechen des kontraktiles Apparates auf Kalzium resultiert (75). Es wurde beobachtet, dass im stunnenden Myokard, bei nachweislich gleichen Kalziumkonzentrationen wie im Kontrollversuch, sowohl die Sensitivität für Kalzium als auch die maximale Kontraktionskraft reduziert war. Dies spricht dafür, dass der Fehler in der Kontraktionskaskade auf dem Niveau der Myofibrillen liegt (38). Diese Filamente reagieren weniger sensitiv auf Kalzium und bilden ein Substrat für das Entstehen von Herzrhythmusstörungen.

Es existieren weitere Hypothesen zur Entstehung des myokardialen Stunnings, so zum Beispiel die Störung der sympathischen Innervation, die verminderte Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) in den Mitochondrien sowie die Schädigung extrazellulärer Matrix. Sie scheinen jedoch von untergeordneter Bedeutung für die Erklärung des Pathomechanismus zu sein. Die verschiedenen existierenden Hypothesen schließen sich jedoch nicht gegenseitig aus, sie beleuchten jeweils nur einen anderen Teil dieses komplexen und wohl multifaktoriellen pathologischen Prozesses.

1.2.5 Die klinische Bedeutung myokardialen Stunnings

Im klinischen Alltag ist die genaue Diagnose „myokardial stunning“ nur schwer zu stellen. Eine genaue Quantifizierung des koronaren Blutflusses sowie der exakten linksventrikulären Funktion ist dort nur indirekt möglich; die Dauer der Ischämie ist meist nicht mehr eindeutig zu verifizieren. Jedoch zeigen einige

Studien, dass myokardiales Stunning im Rahmen postischämischer Dysfunktion auftritt und mit der Morbidität und Mortalität bei koronarer Herzkrankheit verbunden ist (9, 14, 24).

Es gibt zahlreiche klinische Konstellationen, in denen das menschliche Myokard einer transienten Ischämie ausgesetzt ist (11). Darunter fällt die instabile und belastungsinduzierte Angina pectoris, der akute Myokardinfarkt mit früher Reperfusion (sei es spontan, durch thrombolytische Therapie oder durch den Einsatz der perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA)), die Herzchirurgie mit kardioplegischem Herzstillstand oder die Herztransplantation. Obwohl es sich beim myokardialen Stunning um eine reversible Dysfunktion handelt, ist es ein klinisch relevantes Phänomen, das in den oben genannten Fällen isoliert oder in Kombination mit anderen Störungen auftritt (9, 11). Ein Verständnis des zugrunde liegenden Pathomechanismus könnte zu einer gezielten Therapie der postischämischen Dysfunktion führen, wie zum Beispiel durch die Verabreichung von Antioxidantien vor Reperfusion (12).

Die genaue Diagnose des myokardialen Stunnings und die Abgrenzung von Hibernation sind von großer Wichtigkeit für die Therapie der kontraktile Störung.

Der Schwerpunkt der Therapie von Hibernation liegt in der ursächlichen Behebung von Koronarstenosen durch Lysetherapie, PTCA, Stenteinlage sowie im Falle des Scheiterns oder der Undurchführbarkeit interventioneller Verfahren durch operative Anlage eines aortokoronaren Bypasses.

Zahlreiche Untersuchungen des myokardialen Stunnings haben durch den Einsatz von Vasodilatoren, Kalziumkanal-Blockern, sympathikolytischer bzw. bradykardisierender Therapie sowie durch die Gabe von Antioxidantien einen positiven Einfluss auf die Erholung des Myokards während der Reperfusion ausüben können (42,96).

Der Unterschied in der Ursache und der Therapie der beiden oben genannten kontraktile Dysfunktionen Hibernation und myokardiales Stunning zeigt auf, wie wichtig die genaue Trennung beider Phänomene für den weiteren Therapieverlauf ist.

1.3 Hitzeschockproteine

Die Untersuchung der adaptiven Veränderungen bei Zellen, die einem subletalen Temperaturanstieg ausgesetzt wurden, führte zur Entdeckung der Hitzeschockproteine (HSP). Bei der HSP-Antwort handelt es sich um einen endogenen Mechanismus, der Zellen bei Einwirkung von physiologischem Stress vor weiterer Schädigung schützt. Diese Proteine wurden erstmals in der Speicheldrüse der Fruchtfliege (*Drosophila*) nachgewiesen (98) wo sie für die Entstehung chromosomaler Agglomerationen verantwortlich sind. HSP nehmen unter physiologischen Bedingungen wichtige Aufgaben im Zellstoffwechsel ein (47). Dabei unterliegt deren Funktion zwei unterschiedlichen Mechanismen:

1. Die korrekte Funktion von Proteinen erfordert ihre richtige Faltung (Tertiärstruktur). HSP wirken in diesem Zusammenhang als molekulare Chaperone (32,53,93). Chaperone sind Proteine, die die Faltung und Ansammlung von anderen Proteinen erleichtern, jedoch nicht Teil des Endproduktes sind.

2. HSP interagieren mit Proteinen, die sich in einem nicht nativen Zustand befinden, weil sie entweder einem denaturierenden Stress ausgesetzt wurden, nicht vollständig synthetisiert oder falsch gefaltet wurden. Sie bilden Komplexe mit diesen geschädigten, falsch gefalteten oder denaturierten Proteinen, reparieren sie oder führen zu deren Inaktivierung und Abbau (25,36,103).

HSP dienen somit der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase.

Da die Schädigung von Makromolekülen wie Lipiden, DNA und Proteinen in vielen zellulären Kompartimenten auftreten kann, sind die HSP strategisch auf Zytoplasma, Mitochondrien, Peroxisomen und endoplasmatisches Retikulum verteilt. HSP sind in allen zellulären Kompartimenten vorhanden. Sie sind in verschiedene Familien aufgeteilt, deren Name auf ihrem Molekulargewicht basiert, das bei den HSP zwischen 10 und 150 Kilodalton liegt.

Die Synthese von HSP steigt in Zellen an, die Hitze oder einem weiten Spektrum weiterer potentieller schädlicher Stimuli ausgesetzt werden. HSP werden deshalb auch treffender als Stressproteine bezeichnet.

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass die Produktion von HSP beim Auftreten von Hypoxie, Freisetzung bakterieller Endotoxine und inflammatorischer Zytokine, Einwirkung zytotoxischer Substanzen oder reaktiver Sauerstoffradikale sowie bei Glukosemangel und viraler Infektion ansteigt (25,36,72,103). Diese diversen Formen des physiologischen Stresses verursachen multiple zelluläre Veränderungen, die sich unmittelbar auf Struktur und Funktion von Proteinen auswirken.

Hitzestress und Ischämie können exzessive Veränderungen im zellulären Zytoskelett verursachen. Dazu gehören der Kollaps der Intermediärfilamente sowie die Schädigung der Mikrotubuli und der mitotischen Spindel (66,130).

Schwellung und Verlust an Mitochondrien sowie Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung sind sowohl Folge des Hitzestresses als auch der frühen, reversiblen Ischämie (85,91,92).

Die Expression der HSP steigt bei Einwirken oben angeführter Faktoren stark an; durch eine gesteigerte Translation der Proteine kann sich der Anteil der HSP am gesamten Zellprotein innerhalb von Minuten um 15-25% erhöhen (73).

In den 90er Jahren zeigten zahlreiche Untersuchungen, dass die Expression von HSP das Herz vor schädigenden Stimuli wie der Ischämie oder dem Reperfusionsschaden schützen kann (73,135,136). Es wurde demonstriert, dass eine Ganzkörperhyperthermie zu einem Anstieg der myokardialen HSP-Expression führt und dadurch die Resistenz (cross tolerance) des isolierten Herzens gegen Ischämie und Reperfusion erhöht wurde (66,73,135). Marber zeigte 1993, dass Induktion von HSP72 durch Hyperthermie die Größe experimentell erzeugter Infarkte verringert (76).

Bei Patienten mit schwerer Sepsis ist die Produktion an HSP im Vergleich zum gesunden Patienten reduziert (106). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Expression der HSP im schwerkranken Patienten suprimiert ist und damit das Fehlen an protektiven Mechanismen zur schlechten Prognose der Sepsis

beiträgt. Eine Überexpression dieser Proteine könnte hingegen zu einem Schutz der Zellen vor schädigenden Einflüssen führen.

Auch wenn der Mechanismus der zytoprotektiven Effekte der HSP noch nicht vollständig verstanden ist, führt die Induktion dieser Proteine zu einer Verbesserung der Resistenz des Myokards gegenüber struktureller und metabolischer Schädigung (105).

Das Hauptziel der heutigen klinischen Behandlung myokardialer Ischämien ist die Wiederherstellung eines normalen koronaren Blutflusses, sei es durch Thrombolyse, durch direkte Angioplastie oder durch die Bypassoperation.

Dabei wird ein großer Teil des so genannten Reperfusionsschadens durch eine Überproduktion freier Sauerstoffradikale verursacht, die in der hypoxischen Phase entstehen und bei Revaskularisation des Myokards freigesetzt werden.

Freie Sauerstoffradikale spielen eine zentrale Rolle in der Schädigung vitaler Organe wie Gehirn, Niere und Herz. Sie werden mit dem Auftreten von ventrikulären Dysfunktionen, myokardialem Stunning, Arrhythmien und progressivem Zelluntergang nach Ischämie in Verbindung gebracht (10,12,14).

Übersteigt die exzessive Bildung an freien Radikalen die Kapazität der zelleigenen Schutzmechanismen des Herzmuskels, ist eine zelluläre Schädigung die Folge. Die Kardiomyozyten werden entweder direkt durch Sauerstoffradikale oder durch Induktion der Entzündungskaskade beeinträchtigt. Erster Effekt der Sauerstoffradikale ist die Veränderung des Elektrolytmilieus der Zelle. Es kommt zu einem Kaliumausstrom verbunden mit einem Kalziumeinstrom in die Zelle sowie zu einem Verbrauch von energiereichen Phosphaten. Diese Veränderungen führen zu einer Verminderung der myokardialen Kontraktilität (68).

Es ist nachgewiesen, dass ein Grossteil des kardioprotektiven Effektes der HSP durch die Inhibition der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen vermittelt wird (44). Zusätzlich bewirkt die Induktion der NO-Synthase durch HSP eine kardioprotektive Wirkung. Es ist bekannt, dass NO die myokardiale Funktion durch ATP-abhängige Kaliumkanäle steuert (89), sowie über die

Guanylatzyklase eine Vasodilatation und Thrombozytenaggregationshemmung bewirkt. Dies trägt zur Steigerung der Perfusion des Myokards bei.

Strategien zur verbesserten myokardialen Erholung nach Ischämie oder myokardialem Stunning sind bedeutende Ziele heutiger Forschung.

Versuche zur Induktion der HSP-Bildung in vivo sind deshalb von besonderem Interesse. Eine milde Hyperthermie des Spenders vor Transplantatentnahme kann eine schnellere Erholung des Transplantates nach Herztransplantation führen (61). Auch pharmakologische Ansätze zur Induktion der Stressproteinproduktion, wie der Einsatz von Proteaseinhibitoren, sind viel versprechend. Eine Möglichkeit besteht darin, kurzfristig den Anteil an ungefalteten Proteinen im Zytosol medikamentös zu erhöhen und dadurch eine Induktion der HSP hervorzurufen (16). Die Erforschung der HSP im Hinblick auf die Ischämische Herzkrankheit ist von wesentlicher Bedeutung zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien in diesem Bereich.

1.4 Hämoxygenase

Die Hämoxygenase (HO) ist ein mikrosomales Enzym, das in großen Konzentrationen in Leber und Milz exprimiert wird, wo es am Abbau des roten Blutfarbstoffs aus alten Erythrozyten beteiligt ist. Bei diesem Abbau entstehen hohe Konzentrationen an Häm, das in hohen Gewebekonzentrationen zytotoxisch wirken kann (107). Die Aufgabe der HO besteht im Abbau des prooxidativen Häms und damit der Protektion des Gewebes vor oxidativem Stress. Die HO ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym im Hämabbau, denn es katalysiert den ersten Schritt der Hämdegradation. Häm gehört zur Gruppe der Porphyrine. Dies sind farbige Verbindungen, die ubiquitär in der Tier- und Pflanzenwelt vorkommen. Sie bestehen aus einem Ringsystem, das aus vier einzelnen Pyrrolringen zusammengesetzt ist, die über Methin-Brücken miteinander verbunden sind. Die HO öffnet das Pyrrolsystem und setzt dabei äquimolare Teile CO, Eisen und Biliverdin frei (120). Biliverdin wird in einem unmittelbar anschließenden Prozess durch die NADPH-abhängige Biliverdinreduktase in Bilirubin umgewandelt (119). Die Reaktion der Hämdegradation wurde 1968 erstmals von Tenhunen beschrieben. Pro Hämolekül werden drei Mol molekularen Sauerstoffs und drei Mol NADPH als Reduktionsäquivalent benötigt (120) (**Abbildung 1**).

Bei der HO handelt es sich um ein Enzymsystem, das aus drei Isoformen besteht. Metabolisch bedeutend für den Organismus sind das induzierbare Isoenzym HO-1 und das Isoenzym HO-2 (konstitutionelle Form der Hämoxygenase). Des Weiteren wurde das Isoenzym HO-3 in Rattenhirnen nachgewiesen (77), welches relativ geringe katalytische Eigenschaften besitzt und somit eine untergeordnete Rolle spielt. Es scheint beim Menschen nicht exprimiert zu werden (1).

HO-1 und HO-2 weisen große Unterschiede im Hinblick auf ihre Verteilung in verschiedenen Geweben auf, ähneln sich jedoch in ihrem Mechanismus der Häm-Degradation, der Häm-Oxidation und im Hinblick auf Kofaktoren und Substratspezifität.

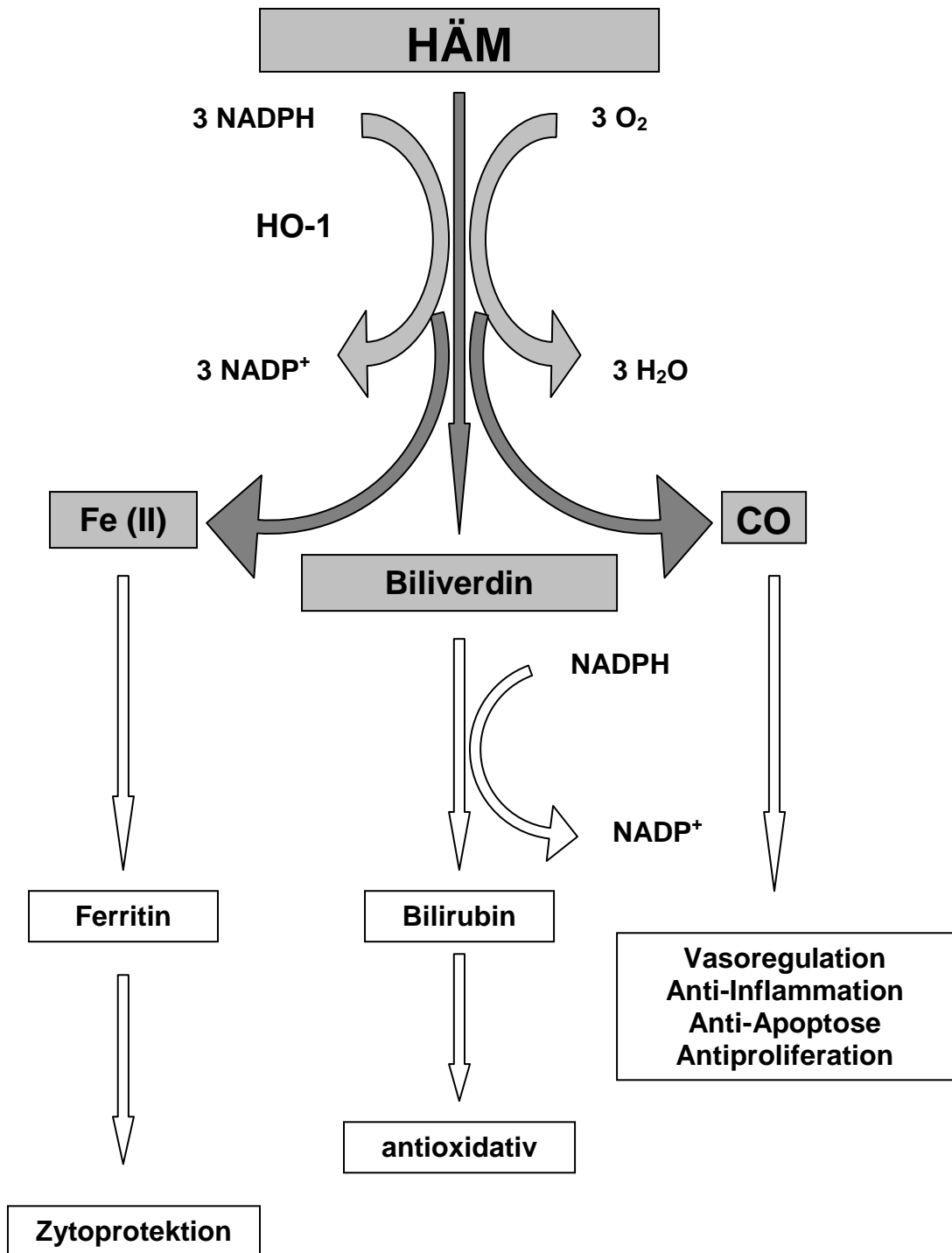


Abbildung 1: Häm-metabolismus, Reaktionsprodukte und deren Wirkung

Die HO-1 wurde in hohen Konzentrationen in Geweben nachgewiesen, die in den Abbau von Erythrozyten und Hämoglobin involviert sind, wie in Milzgewebe

und in spezialisierten retikuloendothelialen Zellen von Leber und Knochenmark (119). Sie ist jedoch auch in den meisten Geweben existent, die nicht direkt in den Erythrozytenabbau eingebunden sind. Dort liegt sie in niedrigen Konzentrationen vor und kann durch zahlreiche chemische oder physikalische Stimuli aktiviert werden.

Die konstitutionelle Form der HO (HO-2) ist ein 36 kDa großes Protein, das aus 316 Aminosäuren besteht (78). Sie übernimmt unter physiologischen Bedingungen den Hauptteil des Hämabbaus.

Die induzierbare Form der HO (HO-1) kann jedoch bei Stress ihre Expression und Aktivität um ein Vielfaches steigern (57). Sie gehört zur Familie der Hitzeschockproteine und ist aufgrund ihres Molekulargewichts von 32 kDa auch unter dem Namen Hitzeschockprotein 32 (HSP 32) bekannt.

Nach bisherigem Forschungsstand besteht die Auffassung, dass das HO-System zur körpereigenen Protektion vor oxidativem Stress beiträgt. Es scheint ein ubiquitär vorkommendes Schutzsystem verschiedenster Zellen zu sein (3, 82). Es spielt für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase und gerade im Bezug auf die myokardiale Erholung nach Ischämie eine wichtige Rolle (20). Die protektiven Effekte, die durch die Wirkung der HO vermittelt werden, bestehen nicht nur in der Beseitigung eines für den Organismus schädlichen Abbauproduktes wie Häm oder Hämin. Zusätzliche zytoprotektive Effekte sind, wie in 1.5 dargestellt, durch die Reaktionsprodukte CO, Bilirubin und Eisen vermittelt, die ihrerseits über ein breit gefächertes Wirkungsspektrum verfügen (15,20,87,90,104,107,132).

Aber auch direkte Einflüsse der HO, die nicht über den Umweg einer Vermittlung von Effekten über Reaktionsprodukte funktionieren, werden diskutiert. Deramaudt und Mitarbeiter transferierten 1998 das humane HO-1 Gen in koronare Epithelzellen von Kaninchen und beobachteten einen 45%-igen Anstieg der Zellproliferation. Aus den Ergebnissen schloss Deramaudt auf einen direkten Einfluss der HO-1 auf die Regulation der Aktivierung und Proliferation von Endothelzellen und auf die Angiogenese (26). Diese Tatsache zeigt den möglichen direkten Einfluss der HO auf die Angiogenese nach Myokardischämien. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass

eine siebentägige Induktion der HO-1 mit 9mg/kg/d Hämin zu einer Verbesserung der kardialen Erholung bei myokardialem Stunning am wachen Hund führt (130). Weiter besitzt die HO antiinflammatorische Eigenschaften. Im Zusammenhang mit Atherosklerose (129), Diabetes (2), koronarer Herzkrankheit und Myokardischämie konnten durch HO vermittelte zytoprotektive Eigenschaften bewiesen werden (136).

Die beim Abbau von Häm freiwerdenden Produkte, besitzen ein breit gefächertes Wirkspektrum. Hierüber wird ein Großteil der protektiven Eigenschaften vermittelt, die bei Induktion der HO-1 beobachtet werden. Die Wirkungsmechanismen der Produkte der HO werden im Folgenden einzeln betrachtet.

1.5 Wirkungen der Reaktionsprodukte der Hämoxigenase

1.5.1 Kohlenstoffmonoxid

Bei Kohlenstoffmonoxid (CO) handelt es sich um ein niedrigmolekulares Gas, das für seine neuro- und zytotoxischen Eigenschaften bekannt ist (123). Im Rahmen des normalen Stoffwechsels produziert der menschliche Organismus signifikante Mengen an CO, die hauptsächlich aus dem Häm-metabolismus stammen (114). Es konkurriert mit einer 245-fach höheren Affinität mit Sauerstoff um die Bindung am Hämoglobin. In hohen Konzentrationen verursacht CO Gewebhypoxien, indem es den Sauerstofftransport und die Sauerstoffversorgung des Gewebes negativ beeinflusst.

Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass CO in niedrigen Konzentrationen gewebeprotektiv wirken kann (87). Die verschiedenen Wirkungen von CO sind in **Tabelle 1** dargestellt.

Wirkungen	Wirkmechanismus
vasodilatatorische Eigenschaften	über lösliche Guanylatzyklase
antiapoptotische Eigenschaften	Tumornekrosefaktor- α ↓ Interleukin-1 ↓
antiinflammatorische Eigenschaften	Tumornekrosefaktor- α ↓ Interleukin-1 ↓ Interleukin-20 ↑ MAP-Kinasen ↑
antiproliferative Eigenschaften	Aktivierung von MAP-Kinasen

Tabelle 1: Eigenschaften von CO, Wirkmechanismen

CO selbst hat keine antioxidative Wirkung, es kann jedoch die Expression antioxidativer Gene induzieren. Zudem wirkt CO als potenter Vasodilatator und besitzt antiapoptotische Wirkung (69,137).

Bevor man die vasodilatierende Wirkung von CO entdeckte, wurde beobachtet, dass die Induktion der HO zu einer Abschwächung einer bestehenden Hypertension führt. Es stellte sich heraus, dass die Wirkungen von NO und CO ähnliche Mechanismen besitzen. Bei beiden handelt es sich

um Gase, die bei Inhalation toxisch für den Organismus sein können. Sie besitzen beide eine hohe Affinität zum Häm-Molekül. NO und CO aktivieren die Guanylatzyklase und wirken als second messenger und Signalmoleküle (116). Die Guanylatzyklase existiert in einer löslichen und in einer membrangebundenen Form, wobei die lösliche im Zytosol gebunden ist. Die lösliche Form fungiert als Rezeptor für NO und CO. Bei der Guanylatzyklase handelt es sich um ein Protein, das Häm als prosthetische Gruppe besitzt. NO bindet mit hoher Affinität an diese Gruppe und führt zu einer starken Aktivierung des Enzyms. CO bindet an die gleiche Gruppe mit ähnlich hoher Affinität, die Aktivierung des Enzyms hingegen ist geringer. Die Kapazität zahlreicher Gewebe, endogenes CO zu bilden, ist jedoch sehr hoch, was die Bedeutung dieses Signalwegs unterstreicht (90). Die Guanylatzyklase katalysiert die Bildung von löslichem Guaninmonophosphat (cGMP). Dieses fungiert als intrazelluläres Signalmolekül und vermittelt eine Inhibition der Thrombozytenaggregation, eine Vasodilatation durch relaxierende Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen sowie eine Beeinflussung der synaptischen Übertragung (39).

Die HO wurde im Hirn in ähnlich hohen Konzentrationen wie in der Milz nachgewiesen, dem Organ, in dem hauptsächlich der Hämabbau stattfindet. Diese Tatsache lässt die Schlussfolgerung zu, dass die HO an dieser Stelle eine andere Aufgabe übernimmt. Dabei könnte es sich um die CO-abhängige Aktivierung der Guanylatzyklase handeln, analog ihrer Aktivierung durch NO.

Die Arbeitsgruppe um Sharma beobachtete das Verteilungsmuster der Hämoxygenase nach künstlich induzierter Koronarischemie. Sie markierten die HO-1 mit Hilfe polyklonaler Antikörper. Es zeigte sich eine Anhäufung des Isoenzym HO-1 im perivaskulären Bereich (111). Dies ist ein Anhaltspunkt für die Bedeutung des von der Hämoxygenase gebildeten CO für die vaskuläre Homöostase.

Zusätzlich zu dem oben genannten Mechanismus werden einige Wirkungen des CO durch cGMP-unabhängige Mechanismen, wie zum Beispiel über MAP-Kinasen (mitogen-activated protein), vermittelt (87). Bei MAP-Kinasen handelt es sich um Serin/Threonin Kinasen, die durch Phosphorylierung aktiviert

werden. Das MAP-Kinasen-System ist an der zellinternen Antwort auf schädigende Stimuli beteiligt. Es steuert Zellwachstum, Zellproliferation, Apoptose sowie Bildung von Zytokinen. CO führt über diesen Signalweg zu einer verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin 1 werden vermindert gebildet, das antiinflammatorische Interleukin 10 hingegen wird vermehrt freigesetzt (87). Über diesen Mechanismus werden einige antiapoptotische Eigenschaften des CO erklärt. Brouard und Mitarbeiter konnten zeigen, dass dieser Effekt, der bei Induktion der Hämoxxygenase beobachtet wurde, eine Wirkung des durch die HO gebildeten CO darstellt und nicht direkt durch die HO mediiert wird (15): Sie demonstrierten, dass exogen zugeführtes CO Endothelzellen vor dem Untergang schützte, auch nachdem die HO durch Zinn-Protoporphyrin inhibiert wurde.

Obwohl die zytoprotektiven Effekte des CO noch nicht völlig entschlüsselt sind, geht man doch davon aus, dass mehr Wirkungen über die MAP-Kinasen als über das cGMP vermittelt werden.

1.5.2 Bilirubin und Biliverdin

Die HO katalysiert den Abbau von Häm zu Biliverdin. Biliverdin wird in einem sich sofort anschließenden Schritt durch die Biliverdinreduktase in Bilirubin umgewandelt. Lange Zeit wurden Bilirubin und Biliverdin als toxische Metaboliten des Hämabbaus betrachtet. Der exzessive Anfall von unkonjugiertem Bilirubin kann beispielsweise neurologische Komplikationen bei Neugeborenen bis hin zum Kernikterus auslösen (59,126). Die pharmakologische Inhibition der Hämoxxygenase durch Metalloporphyrine bei Neugeborenen, um den Anfall an Bilirubin zu verringern, ist Gegenstand der derzeitigen Forschung (59).

Unkonjugiertes Bilirubin und Biliverdin besitzen jedoch in geringen Konzentrationen reduzierende Eigenschaften und dienen deshalb als wirkungsvolle Antioxidantien. Bilirubin fängt in *vitro* und in *vivo* in niedrigen Konzentrationen von 0,5 μ M freie Sauerstoffradikale und vermindert einen durch

oxidativen Stress entstehenden Zellschaden. So zeigte Stocker 1987, dass Bilirubin die Peroxidation von Lipiden in Phospholipid-Mizellen verhindern kann und Biliverdin als Fänger von Peroxyl-Radikalen wirkt (118). Die Arbeitsgruppe um Kushida wies 2002 nach, dass Bilirubin eine durch TNF und Angiotensin II vermittelte Vasokonstriktion verringern kann (64). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass Bilirubin inhibierend auf die NADPH-Oxidase und die Proteinkinase C wirkt, die für die Aktivierung von Angiotensin II verantwortlich sind (55). Bilirubin und Biliverdin üben einen direkten protektiven Einfluss auf Endothelzellen aus (107). Zusätzlich erhöht Bilirubin die Bioverfügbarkeit von NO und wirkt hierüber vasodilatierend.

Durch seine antioxidativen Eigenschaften wirkt Bilirubin zytoprotektiv auf das kardiovaskuläre System. Die Arbeitsgruppe um Clark zeigte bei einem Infarktversuch an isolierten Rattenherzen, dass durch eine Erhöhung der Bilirubinkonzentration typische Ischämiezeichen wie Mitochondrienschwellung vermindert sowie die spätere Infarktgröße reduziert werden konnten (20). Die in Versuchen zur kardialen Ischämie beobachtete Hyperperfusion und koronare Vasodilatation in der Reperfusionsphase könnte somit durch den additiven Effekt von CO und Bilirubin auf Endothelzellen vermittelt sein.

1.5.3 Eisen und Ferritin

Eisen kommt im Organismus größtenteils komplexgebunden vor. Eisen, das aus dem Abbau des Häms freigesetzt wird, besitzt hohe Reaktivität und steht für zahlreiche zelluläre Prozesse zur Verfügung, die freies Eisen benötigen (102). Es existiert die Hypothese, dass das bei der Hämdegradation freiwerdende Eisen für die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) verantwortlich ist und dadurch die Peroxidation von Membranlipiden verursacht (102). Ungebundenes Eisen wirkt somit höchstwahrscheinlich prooxidativ und kann über diesen Mechanismus Gewebe schädigen. Eisen kann zusätzlich die Expression von Genen regulieren, darunter auch die der NO-Synthase, und damit vasoregulatorisch wirken.

Des Weiteren bindet Eisen an Eisen-Regulations-Proteine (iron regulatory proteins = IRPs) und steuert hierüber die Induktion von Ferritin (30). Die vermehrte Bildung von Ferritin durch hohe Eisenkonzentrationen erhöht die Eisenpeicherkapazität der Zelle. Eisen wird durch Ferritin in seiner oxidierten Form gebunden. Untersuchungen haben den Zusammenhang zwischen HO-1 Induktion und der gesteigerten Synthese von Ferritin gezeigt (128). Dieses Phänomen kann anhand des durch HO-1-Induktion erhöhten Anfalls an freiem Eisen erklärt werden, da dieses die Genexpression von Ferritin reguliert. Über diesen Mechanismus führt es zu einer vermehrten Produktion von Ferritin. Die Ferritinspiegel sind bei Induktion der HO-1 erhöht, bei Inhibition jedoch erniedrigt (31).

Ferritin ist ein Akute-Phase-Protein und besitzt antioxidative Wirkung (131). Durch Bindung des Eisens setzt Ferritin die Konzentration der oxidativen Stoffe in der Zelle herab und schützt somit vor oxidativem Stress (5). Es wurde beobachtet, dass die Konzentration an Ferritin bei physikalischem Stress, wie zum Beispiel bei UV-Bestrahlung, intrazellulär ansteigt (128). Dieser Anstieg ist HO-abhängig.

1.6 Induktion und Hemmung der Hämoxxygenase-1

1.6.1 Induktion der HO-1

Die HO-1 gehört, wie oben beschrieben, zu einer größeren Familie von Stressproteinen. Die Hitzeschockproteinantwort stellt eine generelle zelluläre Reaktion auf hyperthermieassoziierte Proteindenaturierung dar (25,36,103). Die HO-1 weist jedoch in der Proteinstruktur starke Unterschiede zu anderen Hitzeschockproteinen auf und dient, anders als viele HSP, nicht als Chaperon. Ähnlichkeiten zu anderen HSP bestehen vielmehr in der Promotorregion der Proteine und ihrer Induzierbarkeit durch Hyperthermie (101).

Die HO scheint ubiquitär vorzukommen und wurde neben ihren Hauptwirkungsorten wie Leber und Milz in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen. So auch in Kardiomyozyten, wo sie zytoprotektiv wirksam ist (4). Die gesteigerte Synthese der HO-1 scheint eine generelle Antwort auf Stress in biologischen Systemen darzustellen.

Eine derartige Reaktion tritt in den meisten untersuchten Geweben und in höheren Organismen auf. Die Induktion der HO beruht größtenteils auf der Aktivierung des HO-1-Gens und der konsekutiven *de novo*-Synthese von mRNA (71).

Zu den möglichen Stimuli zählt, wie oben erwähnt, eine Vielzahl physiologischer Stressfaktoren und Substanzen. Darunter fallen unter anderem die Hypoxie, Ischämie bzw. Reperfusion, Hitze-Schock, Substrate wie Häm oder Hämin, NO sowie verschiedene Schwermetalle (34,82,88).

Eine Übersicht über eine Auswahl an Faktoren, die die Hämoxxygenase induzieren können, findet sich in **Abbildung 2**.

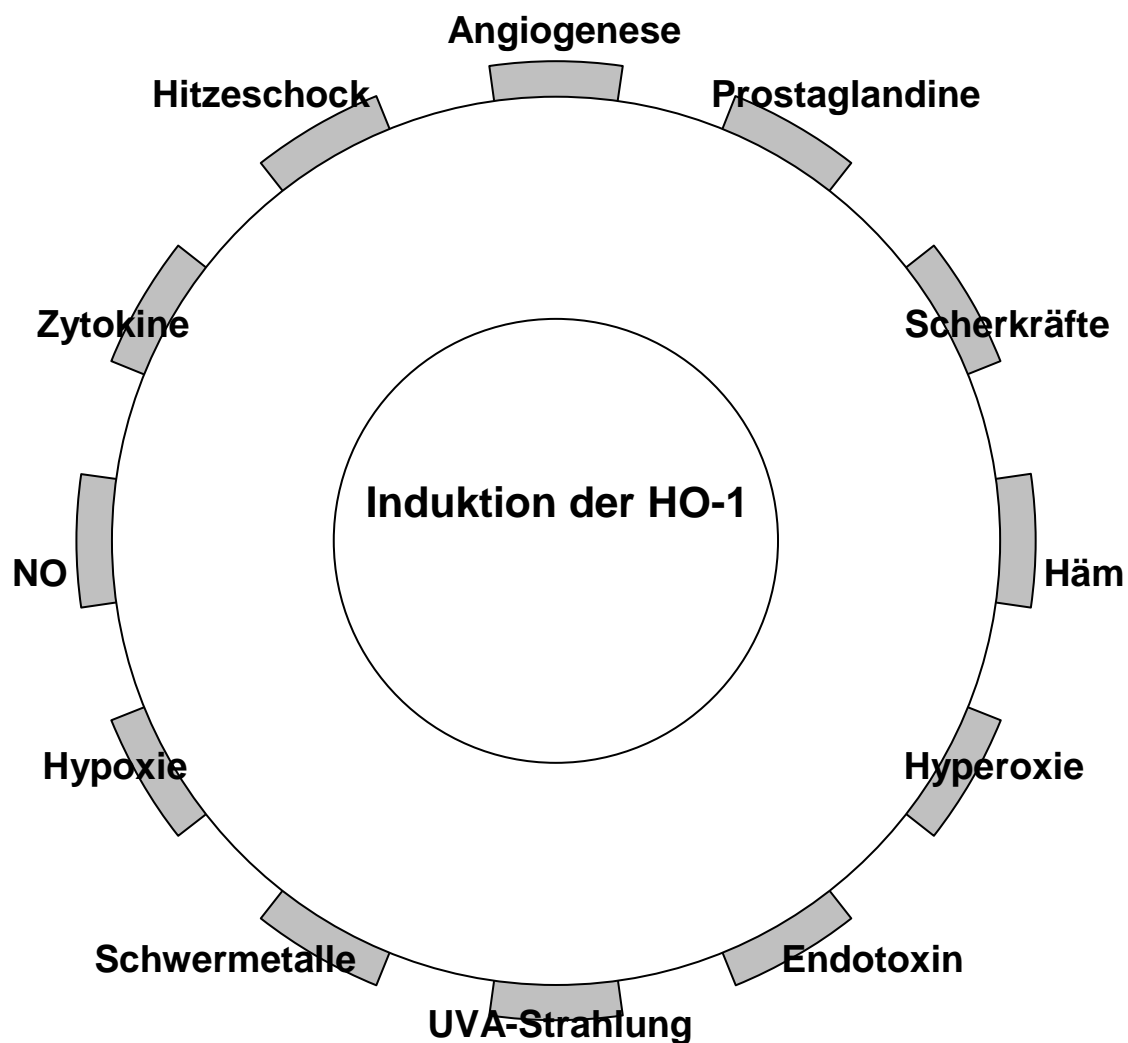


Abbildung 2: Induktion der Hämoxigenase-1 (Otterbein, Choi 2000)

Auch im Falle einer Myokardischämie steigt die Aktivität der HO an. Der Anstieg erfolgt vor allem in der Frühphase der Reperfusion (111). Die Konzentration und Aktivität sinkt danach kontinuierlich wieder ab, wenn keine erneute Ischämie folgt. Es wurde gezeigt, dass bei einer Ischämie sowohl das HO-1-Gen als auch die HO-1-Aktivität induziert wird (37). Die Upregulation der Aktivität sowie der Expression des Enzyms geschieht in einem sehr kurzen Zeitraum. Ewing und Maines beobachteten bereits eine Stunde nach einer Hyperthermiebehandlung einen 33-fachen Anstieg der HO-1 Aktivität in Rattenhirnen (33).

Unter nicht stimulierten Bedingungen liegt die Aktivität der HO-2 zwei- bis dreimal so hoch wie die der HO-1. Durch Induktion der HO-1 mit Kadmium oder Kobalt steigt die Aktivität der HO-1 jedoch über das 100-fache im Vergleich zum Ausgangsniveau. Durch oxidativen Stress, Hypoxie oder massiven Anfall der Substrate Häm oder Hämin ist somit das Isoenzym HO-1 für den Großteil des Hämstoffwechsels verantwortlich (124). Im Rahmen der Induktion der HO-1 durch Hämin wird, ähnlich wie oben für die Ischämie beschrieben, sowohl die Aktivität des Enzyms als auch seine Transkription gesteigert (67). Die Signaltransduktion dafür erfolgt über verschiedene MAP-Kinasen (34). In der Promotorregion des HO-1-Genes wurden Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und Aktivatorprotein-2 (AP-2) identifiziert. Bei beiden handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die mit der Akutantwort auf Zellschädigungen assoziiert werden (67). Wichtig für die Induktion der HO-1 ist auch AP-1, über welches die Induktion der HO durch Häm, Hämin, Kobaltchlorid und Kobalt-Protoporphyrin vermittelt wird (74,110).

Die Konzentration der Substrate Häm und Hämin scheint limitierend für die Aktivität der HO zu sein. Die Induktion der HO in Anwesenheit von Hämin zeigte eine höhere Produktion von Bilirubin als ohne Häminapplikation (37). Hämin ist ein häufig eingesetzter Induktor der Hämoxxygenase. Die Induktion bei Hämingabe tritt schnell ein und hat einen starken Anstieg der HO-Aktivität zur Folge. Bei einer Dosierung von 75 μ mol/kg KG Hämin kann einen Tag nach Applikation ein über 400%-iger Anstieg der HO-Aktivität in Rattenherzen beobachtet werden (20).

1.6.2 Inhibition der HO-1

Die Aktivität der HO kann durch eine große Anzahl an synthetischen Metalloporphyrinen vermindert werden (81). Im Zentrum der Metalloporphyrine, die inhibierend auf die HO einwirken, ist das Eisenatom durch Zink, Zinn oder andere Elemente ersetzt. Beispiele dafür sind die Protoporphyrine Kobalt-Protoporphyrin-IX (CoPPIX), Zinn-Protoporphyrin-IX (SnPPIX), Zink- oder Mangan-Protoporphyrin-IX (ZnPPIX, MnPPIX) sowie die Mesoporphyrine von Zinn oder Chrom (Sn-Mesoporphyrin-IX, Cr-Mesoporphyrin-IX). Die Komplexierung von Protoporphyrin-IX mit Metallen führt zur Bildung von Metalloporphyrinen, die *in vivo* größtenteils eine kompetitive Inhibition der HO bewirken.

Paradoxerweise können Metalloporphyrine wie Sn-Protoporphyrin-IX und Zn-Protoporphyrin *in vitro* und *in vivo* die Transkription der HO-1 induzieren, während sie die Aktivität der HO hemmen (101). Insgesamt verursacht eine Applikation dieser Porphyrine jedoch eine Verminderung der HO-Aktivität.

Die Induktion der HO durch Hämin führte bei experimenteller postischämischer Dysfunktion zu einer verbesserten kardialen Funktion nach totaler Ischämie und Reperfusion (130). Es zeigte sich, dass diese positiven Effekte auf die myokardiale Funktion bei Ischämie nach Induktion der HO vollständig aufgehoben wurden, wenn die HO-Aktivität durch Sn-Protoporphyrin gehemmt wurde (20).

1.7 Sn-Mesoporphyrin

Das auch unter dem Namen Zinn-Mesoporphyrin (SnMP) bekannte Metalloporphyrin entsteht durch die Reduktion der Vinylgruppen an C2 und C4 des Sn-Protoporphyrins zu Ethylgruppen (29). Es teilt zahlreiche Eigenschaften mit der Muttersubstanz Sn-Protoporphyrin, auch Tin-Protoporphyrin genannt. Bei dieser handelt es sich um einen kompetitiven Hemmer der HO, der die HO-Transkription induzieren kann. Das Sn-Protoporphyrin ist in zahlreichen Untersuchungen als Inhibitor der Hämoxxygenase eingesetzt worden (6,29,81). Sn-Mesoporphyrin wirkt in gleicher Weise als kompetitiver Inhibitor der HO. Seine Anwendung führt zur Abschwächung einer Hyperbilirubinämie und verminderter Umwandlung von Häm in Bilirubin (29,126).

Die Wirksamkeit von Sn-Mesoporphyrin wird auf das fünf- bis zehnfache der Wirksamkeit von Sn-Protoporphyrin geschätzt (6, 29). Die Halbwertszeit beträgt wie die von Sn-Protoporphyrin 3,8 Stunden bei einer intravenösen Applikation von 1 $\mu\text{mol/kg}$ KG und sinkt mit abnehmender Dosis. Sn-Mesoporphyrin wird über Urin und Faeces ausgeschieden.

Die Inhibition der HO nach Sn-Mesoporphyringabe tritt rasch ein. Innerhalb von 3 Stunden nach oraler Gabe von Sn-Mesoporphyrin beobachteten Morioka et al. eine 67%ige Hemmung der HO-Aktivität in der Leber von Mäusen (81).

Als dosislimitierend erweist sich lediglich die bei starker Überdosierung auftretende transiente Photosensibilität der Haut.

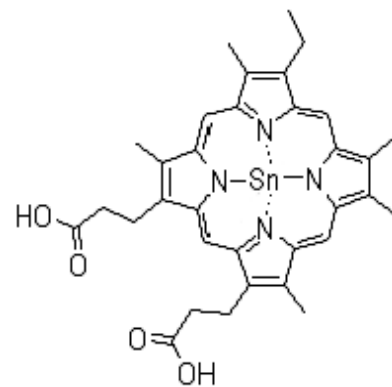


Abbildung 3: Strukturformel von Sn-Mesoporphyrin

1.8 Ziel der Untersuchung

Ischämie induziert die Aktivität und Expression der HO-1, welche gewebeprotective Eigenschaften besitzt. Diese wurden bereits im Hinblick auf Kardioprotektion und im speziellen Fall der kontraktilen postischämischen Dysfunktion nachgewiesen (20,111,130). Deshalb kommen wir zu der Hypothese, dass die Induktion der HO-1 Auswirkungen auf das Entstehen und den Verlauf einer kontraktilen Dysfunktion des Myokards nach Ischämie haben könnte.

Eine akute Hemmung des Enzyms vor einer Ischämie hebt womöglich diese Effekte auf.

Bisherige Arbeiten beobachten die Effekte der HO und ihrer Produkte anhand gesteigerter Enzymaktivität durch vorhergehende Induktion oder gentechnisch erzeugte Überexpression der HO-1 (2,3,20,26,64,79,130). Es existiert eine Arbeit, die myokardiales Stunning unter Induktion, Inhibition und unter Kontrollbedingungen bezüglich der HO-Aktivität untersucht. Hierbei wurde Stunning an Rattenherzen in der Langendorff-Apparatur durch 20 minütige globale Ischämie erzeugt. Zur Induktion der HO-1 wurde Hämin, zur Inhibition wurde ZnPPiX eingesetzt. Die Induktion der HO-1 verbesserte signifikant die kardiale Funktion nach Stunning, während durch Inhibition der HO gegenüber Kontrollbedingungen eine schlechtere kardiale Funktion zu beobachten war.

In der vorliegenden Arbeit soll myokardiales Stunning unter akuter Hemmung der HO und unter Ausgangsbedingungen miteinander verglichen werden. Dies wird mit Hilfe der akuten Inhibition der HO mit dem potenten Inhibitor Sn-Mesoporphyrin erreicht. Die Auswirkung auf eine zehnminütige Myokardischämie im chronisch instrumentierten Hund wird dabei beobachtet. Möglicherweise beeinflusst die akute Hemmung der HO den Verlauf der kontraktilen Dysfunktion nach einer regionalen Myokardischämie im Bereich des *Ramus interventricularis anterior*. Eventuell entstehen hieraus Erkenntnisse über die Effekte der HO unter Normalbedingungen auf myokardiales Stunning.

2. Material und Methoden

2.1 Vorbereitung der Instrumentierung

Die im folgenden Abschnitt beschriebenen tierexperimentellen Versuche wurden durch die Bezirksregierung Münster geprüft und genehmigt (Aktenzeichen: 23.0835.1.0 (G 36/98) vom 06.11.1998). Für die vorliegende Untersuchung wurden sechs Hunde der Rasse „Foxhound“ instrumentiert. Die Tiere beiderlei Geschlechts hatten ein Alter von 11 bis 13 Monaten, ihr Körpergewicht lag zwischen 23 und 33 kg.

Die Vorgehensweise bei der Instrumentierung und der Versuchsdurchführung war bei jedem der Tiere identisch. Im Sinne des Tierschutzes wurde auf eine routinierte und stressfreie Behandlung der Tiere größten Wert gelegt. Die Versuche wurden im Einklang mit den Richtlinien des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ durchgeführt (54).

Nach einer präoperativen Nüchternphase von mindestens 10 Stunden erhielten die Tiere 5 mg/kg KG S-Ketamin (Ketanest S[®], Parke-Davies GmbH, Berlin, Deutschland) und 1 mg/kg KG Piritramid (Dipidolor[®], Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) zur Prämedikation. Die Injektion der Substanzen erfolgte intramuskulär in den *Musculus gluteus maximus*.

Nach Eintritt der Sedierung wurde eine periphere Venenverweilkanüle der Größe 18-Gauge in die *Vena saphena* eingebracht und mit Pflaster fixiert.

Zur Narkoseeinleitung erhielten die Versuchstiere intravenös 5 mg/kg KG Propofol (Disoprivan[®] 1%, Astra Zeneca GmbH, Wedel, Deutschland) und 15µg/kg KG Fentanyl (Fentanyl[®] - Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland).

Hiernach erfolgte die endotracheale Intubation mit einem Trachealtubus nach Magill mit 7,5 mm Innendurchmesser (Super Safety Clear, Rüscher AG, Kernen, Deutschland). Die Tiere wurden danach mit einem Narkoserespirator (AV1, Dräger Medizintechnik GmbH, Lübeck) zur weiteren Beatmung konnektiert.

Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte mit dem volatilen Anästhetikum Isofluran (MAC 1-1,5 Vol % Forene[®], Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) in einem Luft-Sauerstoffgemisch mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (F_iO_2) von 0,35. Der arterielle Kohlendioxidpartialdruck (p_aCO_2) wurde im Bereich von 35-40 mmHg, der Sauerstoffpartialdruck zwischen 90 und 120 mmHg konstant gehalten. Herzfrequenz und periphere Sauerstoffsättigung (SpO_2) wurden über den gesamten Operationsverlauf mit Hilfe eines Pulsoxymeters (Nellcor[®] N-180, Nellcor Puritan Bennett GmbH, Idstein, Deutschland) kontrolliert.

Um einer perioperativen Auskühlung der Tiere entgegenzuwirken, wurden diese auf einer elektrischen Heizmatte gelagert und bedarfsweise zusätzlich mit Rotlicht erwärmt. Abweichungen der Körpertemperatur konnten mit Hilfe einer rektalen Temperatursonde überwacht und frühzeitig durch Erwärmung behoben werden.

Um der Austrocknung der Cornea der Hunde vorzubeugen, wurden präoperativ Salbenverbände mit Augensalbe (Bepanthen[®] Roche, Augen- und Nasensalbe, Roche) angelegt. Der Ausgleich kurzfristiger Volumendefizite durch Blut- und Flüssigkeitsverluste erfolgte durch Infusion von Ringer Laktat-Lösung (Ringer Laktat Braun[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und isotoner Natriumchloridlösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9% Braun[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen).

Hämatokrit, Serumelektrolyte und Urinausscheidung wurden regelmäßig kontrolliert und die Volumentherapie entsprechend angepasst. Durch intermittierende, bedarfsadaptierte Injektionen von Fentanyl wurde eine ausreichende Analgesie über den gesamten Operationsverlauf sichergestellt. Die perioperative Antibiotikaprophylaxe bestand aus einer Einmalgabe von 30 mg/kg KG Cefmandol (Mandokef[®], Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg) am OP-Tag.

2.2 Instrumentierung

Die operative Instrumentierung der Versuchstiere erfolgte unter streng aseptischen Bedingungen. Nach Lagerung der Tiere auf dem Operationstisch und Rasur des Fells im Bereich der linken Thoraxapertur wurde das Operationsgebiet mit Wundbenzin gereinigt und entfettet. An diesen Vorgang schloss sich eine mindestens fünfminütige Desinfektion des Operationsgebietes mit einer Polyvidon–Jod–Alkohollösung an (Betaisodona[®] Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg). Nach sterilem Abdecken erfolgte die Eröffnung der Haut durch einen ca. 15 cm langen Hautschnitt im 5. Interkostalraum. Die Präparation wurde schichtweise in die Tiefe hin fortgesetzt und schließlich der Thorax eröffnet. Mit Hilfe eines Rippensperrers wurde der Zugang erweitert und ein verbesserter Überblick über das Operationsgebiet ermöglicht. Im Anschluss an die Präparation des Herzens wurde die *Aorta descendens* aufgesucht und tangential ausgeklemmt. In diesem Bereich wurde eine Tabaksbeutelnaht angelegt. Danach konnte über eine Stichinzision die Platzierung eines flüssigkeitsgefüllten 18-Gauge „Tygon[®]-Katheters“ in die Aorta, der durch Anziehen der Tabaksbeutelnaht fixiert wurde. Bei einem „Tygon[®]-Katheter“ handelt es sich um einen selbst hergestellten Katheter aus einem transparenten Schlauch aus bioverträglichem Kunststoffmaterial, der zur späteren intraaortalen Blutdruckmessung und zur arteriellen Blutentnahme dient (Tygon[®], Saint-Gobain Performance Plastics, Charny, Frankreich). Direkt nach Fixierung des Katheters wurde dieser auf Dichtigkeit und störungsfreie Funktion überprüft.

Im Anschluss wurde das Perikard mittels Kreuzschnitt eröffnet. Zur experimentellen Messung des linksventikulären Drucks (LVP) sowie der linksventikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit ($LVdP \cdot dt^{-1}$) wurde ein 20-Gauge LVP-Katheter (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien) über die linke Ventikelspitze in die linke Herzkammer eingebracht, der an seiner Spitze mit einem miniaturisierten Druckaufnehmer versehen ist.

Im nächsten Schritt der Instrumentierung wurde der *Ramus interventricularis anterior* (Left anterior descending artery = LAD) der linken Koronararterie aufgesucht und von epikardialem Fett- und Bindegewebe befreit.

Um die LAD wurde ein pneumatischer Ballonokkluder (Dimed medical engineering s.a., Antwerpen, Belgien) geschlungen, der durch Luftinsufflation die Induktion einer reversiblen Ischämie des von der LAD versorgten Herzmuskelareals ermöglichte. Distal dieser Stelle wurde eine 20 MHz gepulste, ringförmige Dopplerflusssonde (Baylor College of Medicine, Houston, USA) um die LAD gelegt. Diese erlaubt die Bestimmung des Blutflusses in der LAD distal des Okkluders während des Versuchsverlaufs.

Zur Messung der relativen regionalen myokardialen Wanddickenveränderung (wall thickening fraction, WTF) wurde ein 10 MHz gepulster Dopplerkristall auf das Epikard des von der LAD versorgten Myokardareals (Baylor College of Medicine, Houston, Texas, USA) aufgenäht.

Um die Applikation von fluoreszierenden Mikrosphären zu ermöglichen und den linksatrialen Druck bestimmen zu können, wurde ein weiterer 18-Gauge Tygon[®]-Katheter in das linke Herzohr eingebracht. Dazu wurde zunächst das linke Atrium tangential ausgeklemmt und eine Tabaksbeutelnaht vorgelegt, der Tygon[®]-Katheter über eine Stichinzision implantiert und durch Anziehen des Tabaksbeutels spannungsfrei fixiert.

Bereits intraoperativ wurden die implantierten Messsonden zur Sicherstellung ihrer Funktionstüchtigkeit an ihre Empfangsgeräte angeschlossen und überprüft.

Anschließend wurde das Perikard durch Einzelknopfnähte partiell verschlossen. Die Verlängerungen der Katheter wurden subkutan bis zwischen die Schulterblätter getunnelt und dort über eine Inzision der Haut nach außen geleitet.

Zur Drainage des Wundsekrets wurde ein Katheter in die linke Pleurahöhle eingelegt, der unter Sog direkt postoperativ entfernt wurde.

Zur Unterstützung der postoperativen Schmerztherapie wurden Interkostalblockaden in Höhe des 4. bis 6. Interkostalraumes vorgenommen.

Dazu wurde 0,125%iges Bupivacain (Carbostesin[®], Astra GmbH, Wedel, Deutschland) an typischer Stelle injiziert.

Um die spätere Pflege des Wundgebiets zu erleichtern und um die Katheter vor Zugkräften zu schützen, wurden die Katheterenden einzeln aufgewickelt, markiert und durch Plasterstreifen spannungsfrei gesichert.

Nach sorgfältiger Blutstillung und nach erneuter Lagekontrolle der Katheter sowie wichtiger Nähte und Ligaturen wurde die Thorakotomie schichtweise verschlossen.

Die Hautränder wurden durch Einzelknopfnähte adaptiert. Zur postoperativen Versorgung der Operationswunde wurde diese mit Povidon-Iod-Salbe (Betaisodona[®], Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland) bestrichen und mit sterilen Kompressen bedeckt. Der Hund wurde anschließend mit einer Textiljacke verbunden. Unter ständiger Kontrolle von Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Schutzreflexen wurde das Tier postoperativ schonend von der Beatmung entwöhnt und extubiert, sobald es eine suffiziente Spontanatmung, konstante Vitalparameter und adäquate Schutzreflexe zeigte. Nach Extubation wurde es in seine Haltebox verbracht, in der es freien Zugang zu Futter und Wasser hatte.

Die Tiere wurde zur Sicherstellung einer konsequenten Analgesie am OP-Tag sowie an den folgenden Tagen drei- bis sechsstündlich auf Befinden und eventuelle Schmerzreaktionen untersucht.

Zur postoperativen Schmerztherapie erfolgten bedarfsadaptierte intramuskuläre Injektionen von Piritramid (Dipidolor[®], Janssen-Cilag GmbH, Neuss) und Clonidin (Catapresan[®]; Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG)

Im Rahmen der operativen Nachsorge wurde täglich neu verbunden, die Operationswunde und die Austrittsstellen der Sonden gereinigt und mit Povidon-Iod-Salbe versorgt. Bei jeder Verbandsvisite wurde die Durchgängigkeit des linksatrialen und aortalen Tygon[®]-Katheters durch Aspiration von Blut überprüft. Anschließend erfolgte eine Spülung der Katheter mit heparinisierter 0,9 %iger Kochsalzlösung (1000 IE Heparin pro Spülung und Katheter (Liquemin[®]N, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen)).

Innerhalb der ersten fünf postoperativen Tage wurde eine Antibiose mit täglich 30mg/kg KG Cefamandol (Mandokel[®], Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) durchgeführt. Die Verbandswechsel und das Spülen der Katheter wurden unter vergleichbaren Bedingungen und in denselben Räumlichkeiten durchgeführt, in denen später auch die Experimente stattfanden. Dadurch konnten die Tiere an die Prozedur gewöhnt und eine stressfreie Versuchsdurchführung ermöglicht werden. Die sonstige Pflege und Fütterung der Tiere wurde von ausgebildeten Mitarbeitern der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universität Münster (ZTE) übernommen. Nach einer Zeitraum von 10 bis 12 Tagen hatten die Tiere sich soweit erholt, dass mit der Durchführung der Untersuchung begonnen werden konnte.

2.3 Messmethoden

Der lange Zeitraum von drei bis vier Wochen, in dem die implantierten Messsonden im Körper der Versuchstiere verbleiben, spielte für die Auswahl der Sonden und Katheter eine entscheidende Rolle. So waren vor allem eine zuverlässige Funktion, gute Bioverträglichkeit, geringes Gewicht sowie stabile Ausgabesignale ausschlaggebende Kriterien für das verwendete Material.

2.3.1 Invasive Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte im linken Atrium sowie in der Aorta descendens über die dort implantierten Tygon[®]-Katheter. Diese wurden vor jeder Messung mit sterilen Einmaltransducern (Becton Dickinson Critical Care Systems, Utah, USA) konnektiert und gegen atmosphärischen Druck kalibriert. Die Lumina der Katheter wurden nach jeder Messung mit heparinisierter 0,9%iger Kochsalzlösung gespült, um eine Blutkoagelbildung im Katheter zu verhindern.

2.3.2 Linksventrikulärer Druck/ Linksventrikuläre

Druckanstiegsgeschwindigkeit

Bei dem im linken Ventrikel im Bereich der Herzspitze implantierten Katheter handelt es sich um ein Mikromanometer, das in vivo nach Implantation kalibriert werden kann (115). Damit wurde kontinuierlich der linksventrikuläre Druck (LVP) und somit die systolische und die diastolische Myokardfunktion gemessen. Vor jeder Messung wurde das Mikromanometer gegen den linksatrialen und den aortalen Druck „kreuzkalibriert“. Es bedeutet, die über die Tygon[®]-Katheter bestimmten und gegen atmosphärischen Druck kalibrierten Werte wurden als Bezugspunkt für die vom Mikromanometer gelieferten Signale verwendet, die zur Berechnung des linksventrikulären Drucks dienen.

2.3.3 Messung der koronaren Blutflussgeschwindigkeit

Die koronare Blutflussgeschwindigkeit wurde mit Hilfe einer 20 MHz gepulsten Dopplersonde gemessen, die distal des pneumatischen Ballonokkluders um die LAD appliziert wurde. Der Dopplereffekt beruht auf der Veränderung der gemessenen Frequenz von Wellen jeder Art in Abhängigkeit davon, ob Quelle und Empfänger sich einander annähern oder sich voneinander entfernen. Bewegen sich Quelle und Empfänger aufeinander zu, erhöht sich die Frequenz, entfernen sie sich voneinander, verringert sich die gemessene Frequenz. Das hier eingesetzte Messverfahren bestimmt die Blutflussgeschwindigkeit indirekt aus der Frequenzablenkung des vom fließenden Blut reflektierten Ultraschallsignals und dem bekannten Durchmesser der Flusssonde. Dieses Verfahren wurde 1978 von Hartley beschrieben (50).

2.3.4 Bestimmung der fraktionellen Wanddicke (WTF)

Die Messung der fraktionellen Wanddicke ist ein weit verbreiteter und gut etablierter Index für die regionale myokardiale Kontraktilität.

Die myokardiale Kontraktilität kann durch eine Funktion aus der myokardialen Wandspannung und der dreidimensionalen Kontraktion über einem definierten Myokardareal beschrieben werden.

Im vorliegenden Versuch wurde ein weitgehend atraumatisches Verfahren zur Bestimmung der fraktionellen Wanddicke gewählt, das mit einem 10 MHz gepulsten Dopplerkristall arbeitet und erstmals 1983 ebenfalls von Hartley beschrieben wurde (49).

Hierbei dient ein einzelner Transducer, der epikardial aufgenäht wird, gleichzeitig als Sender und Empfänger der Dopplersignale, die vom Myokard reflektiert werden. Die Geschwindigkeit der Bewegung der verschiedenen Myokardschichten durch ein definiertes Probenvolumen, das in einem festgelegten Abstand zum Epikard liegt, wird zur Berechnung der myokardialen Wanddicke bestimmt (49). Zur Kalibrierung der Messelektrode wird zuvor das Probenvolumen definiert. Dies geschieht, indem der Messbereich am Empfangsgerät entsprechend eingestellt wird. Er wird in 1,5 mm-Schritten vom

Epikard aus in Richtung Endokard vergrößert. Dabei wird die Veränderung der Signalqualität beobachtet. Bei einem Auftreffen des Messbereichs auf das Lumen der linken Herzkammer kann eine Änderung der Signalqualität festgestellt werden, die durch die Bewegung des vorbeifließenden Blutes entsteht und durch ein hochfrequentes Flussgeräusch hörbar wird. Zur Eichung wird nun das Probevolumen wiederum 1,5 mm in Richtung epikardial zurück verschoben und der resultierende Wert als transmurale Wanddicke definiert. In dieser Versuchsreihe wurde der Transducer im Bereich des Versorgungsgebiets der LAD platziert.

Mit der folgenden Formel wurde die fraktionelle Wanddicke errechnet:

$$\text{WTF (\%)} = \text{SE/R} \times 100$$

SE = Systolische Exkursion in mm

R = Tiefe des Probevolumens in mm

Zur Messung wurden die Punkte für Beginn und Ende der Systole wie folgt definiert:

Der Beginn der Systole wurde auf den Beginn des schnellen Anstiegs des linksventrikulären Drucks (LVP) festgelegt, das Ende auf den Zeitpunkt 20 ms vor dem Tiefpunkt der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit ($\text{LVdP} \cdot \text{dt}^{-1}$).

2.3.5 Regionale myokardiale Perfusion

Die regionale myokardiale Perfusion wurde in der vorliegenden Studie mit Hilfe von fluoreszierenden Mikrosphären bestimmt.

Mikrosphären sind unverformbare fluoreszierende Polystyrenkugeln deren Durchmesser im Mikrometerbereich liegt. In dieser Studie wurden Partikel von

15µm ±1µm (SD) Durchmesser (Dye-Trak[®], Triton Technologies, San Diego, USA) eingesetzt.

Das Messprinzip besteht in der Injektion einer durch Ultraschallwellen homogenisierten Mikrosphärensuspension in das linke Atrium. Im vorliegenden Versuch wurde eine Menge von 9×10^6 Mikrosphären in einem Volumen von 3 ml Injektionslösung injiziert. Die Partikel vermischen sich in der Diastole gleichmäßig im linken Ventrikel und werden durch den Pumpvorgang des Herzens gleichmäßig im zirkulierenden Blutvolumen verteilt. Sie gelangen nachfolgend mit dem Blutstrom entsprechend der regionalen Perfusion in alle Organsysteme.

Aufgrund ihrer Größe von 15µm (SD) und ihrer fehlenden Verformbarkeit erzeugen die Mikrosphären bei der ersten Kreislaufpassage Mikroembolien im Kapillarnetz der abhängigen Organe.

Nach Arbeiten von Consigny und Mitarbeitern sind Mikrosphären in der von uns verwendeten Größe geeignet, um auch Shuntgefäße zu erfassen (23).

Die Menge der eingelagerten Mikrosphären in einer Gewebeprobe ist proportional zum regionalen Blutfluss. Zur späteren *ex vivo* Bestimmung der Organperfusion ist die Entnahme einer Referenzprobe mit definierter Flussgeschwindigkeit notwendig, die zeitgleich zur Injektion der Mikrosphären erfolgt. Dadurch wird ein künstliches „Referenzorgan“ geschaffen, in das der Blutfluss über die ausgewählte Aspirationsgeschwindigkeit gleich bleibend und definiert ist.

Für die Bestimmung der Organperfusion wurden die Mikrosphären über den linksatrialen Katheter injiziert. Gleichzeitig erfolgte über 90 Sekunden die Entnahme einer Referenzblutprobe aus dem aortalen Katheter mit einer kontinuierlichen Flussgeschwindigkeit von 10ml/min mit Hilfe einer Aspirationspumpe (Harvard Apparatus Pump 22[®], South Natick, Massachusetts). Die Aspirationsrate von genau 10ml/min wurde nach jeder Entnahme verifiziert.

Die Applikation der Mikrosphären hatte keine Wirkung auf die myokardiale Perfusion sowie auf Vitalparameter wie Herzfrequenz und Blutdruck.

Nach Beendigung der Versuche wurden die Versuchstiere in Allgemeinanästhesie mit einer intravenös injizierten Kaliumchloridlösung euthanasiert.

Im Rahmen der nachfolgenden Sektion wurde das Herz entnommen und von Strukturen wie Fettgewebe und Gefäßen getrennt. Es wurden zunächst durch makroskopische Begutachtung Anzeichen einer Myokardnekrose aufgesucht, um diese Tiere von der Auswertung auszuschließen.

Nachdem der Mikrometerkristall zur Messung der fraktionellen Wanddicke lokalisiert wurde, erfolgte von dieser Region die Entnahme von transmuralen Biopsien von 1-3g. Diese Proben des Myokards wurden jeweils in ihren subendokardialen und subepikardialen Anteil unterteilt. Zur Kontrolle wurden zusätzliche Biopsien von nichtischämischen Bereichen wie den beiden Atrien und dem rechten Ventrikel entnommen.

Zur weiteren Aufbereitung und zur durchflußzytometrischen Quantifizierung der Mikrosphären wurden die Gewebeproben sowie die Referenzblutprobe an ein externes Labor (Interactive Medical Technologies, Ltd., Irvine, USA) weitergeleitet. Hier erfolgte die Bestimmung und Berechnung der regionalen Perfusion.

2.4 Versuchsprotokoll

Nachdem sich die sechs Hunde von dem chirurgischen Eingriff völlig erholt hatten und durch die regelmäßigen Verbandswechsel unter Versuchsbedingungen an den Versuchsablauf gewöhnt wurden, konnte in einem Zeitraum von ca. 10 bis 12 Tagen nach Instrumentierung mit der Untersuchung begonnen werden.

Um bei allen Versuchstieren gleiche Ausgangsbedingungen sicherzustellen, wurden einige Kriterien festgelegt, die unmittelbar vor Versuchsbeginn erfüllt sein mussten:

Herzfrequenz von unter 90 Schlägen pro Minute in Ruhe
Keine Anzeichen von systemischen oder lokalen Infektionen
Normale Werte bei der Blutgasanalyse unter Ruhebedingungen
Entspanntes Tier bei Anschluss an die Datenaufzeichnungsgeräte

Tabelle 2: Ausgangsbedingungen für Experimente

Zur Aufrechterhaltung der Normovolämie erhielt jedes Tier während der Versuchsdurchführung eine Flüssigkeitssubstitution von 2 ml/kg KG pro Stunde; verwendet wurde Ringer-Laktat-Lösung (Ringer Laktat Braun[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Eine ausreichende Flüssigkeitssubstitution ist von großer Bedeutung für kardiale Untersuchungen, da kardiale Vorlast gerade in der Postischämie erhebliche Auswirkung auf die myokardiale Kontraktilität hat (8).

Um gleiche Rahmenbedingungen bei den Versuchen zu garantieren, wurde auf eine gleichbleibende Umgebungstemperatur, Normothermie der Tiere und ruhige Umgebung während der Durchführung geachtet.

An jedem Tier wurde eine Ischämie unter Sn-Mesoporphyrin und eine Ischämie unter Kontrollbedingungen ohne Sn-Mesoporphyrin vorgenommen.

Die Tiere wurden vor Versuchsdurchführung in zwei Gruppen randomisiert, die Versuche wurden in alternierender Reihenfolge durchgeführt. Damit wurden mögliche Auswirkungen der ersten ischämischen Episode auf den zweiten

Versuchsabschnitt gleichmäßig verteilt. Aufgrund der Möglichkeit, durch multiple koronare Okklusionen eine Bildung von Kollateralen zu induzieren, wurde die Zahl der ischämischen Episoden in jedem Tier auf maximal zwei begrenzt (96). Bei drei Tieren wurde im ersten Versuchsabschnitt eine zehnminütige Okklusion der LAD durchgeführt, ohne medikamentöse Vorbehandlung. Die übrigen drei Tiere erhielten bis zehn Minuten vor dem ersten Studienteil eine intravenöse Injektion von 5 µmol/kg/h Sn-Mesoporphyrin IX. Das hier verwendete Sn-Mesoporphyrin (Porphyrin Products, Inc., Logan, USA) wurde in 0,2 N Natronlauge (NaOH) aufgelöst und anschließend der pH-Wert durch Zugabe von 0,3 N Salzsäure (HCl) auf ca. 8 eingestellt. Danach wurde die Substanz den Tieren in einer Konzentration von 5 µmol/kg KG, intravenös injiziert.

Der zweite Versuchsabschnitt, der erst nach vollständiger Erholung der WTF und Normalisierung der Carboxyhämoglobinwerte durchgeführt werden konnte, fand frühestens eine Woche nach dem ersten Teil statt (96). Im zweiten Versuchsabschnitt wurde jeweils das andere Vorgehen durchgeführt.

Der koronare Blutfluss wurde zu vier Zeitpunkten durch fluoreszierende Mikrosphären bestimmt. Die Reihenfolge der durchgeführten Maßnahmen während des Versuchsablaufes sind in **Tabelle 3** und **Abbildung 4** aufgelistet.

1	Messung der Baseline-Werte (BL) von WTF, allen Druckwerten und hämodynamischen Parametern beim wachen Hund ohne Intervention
2	Injektion von 5 µmol/kg KG Sn-Mesoporphyrin IX bis zehn Minuten vor Ischämie
3	Induktion einer Ischämie im Bereich der LAD durch Füllen der Ballonokkluder mit Luft über einen Zeitraum von 10 Minuten, dabei Messung aller Druckwerte, hämodynamischer Parameter und der WTF
4	Aufhebung der Ischämie und weitere Aufzeichnung aller Parameter zu festgelegten Zeitpunkten nach Reperfusion

Tabelle 3: Versuchsablauf

Die folgenden Parameter wurden mit Hilfe der implantierten Messsonden bei jedem der oben genannten Messzeitpunkte erfasst und mit Hilfe eines PC gespeichert:

- Mittlerer systemarterieller Druck (MAP)
- Herzfrequenz (HR)
- Linksatrialer Druck (LAP)
- Linksventrikulärer Druck (LVP)
- Linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (LV dp/dt)
- Fraktionelle myokardiale Wanddicke (WTF)
- Blutflussgeschwindigkeit in der linken Koronararterie (BFV LAD)

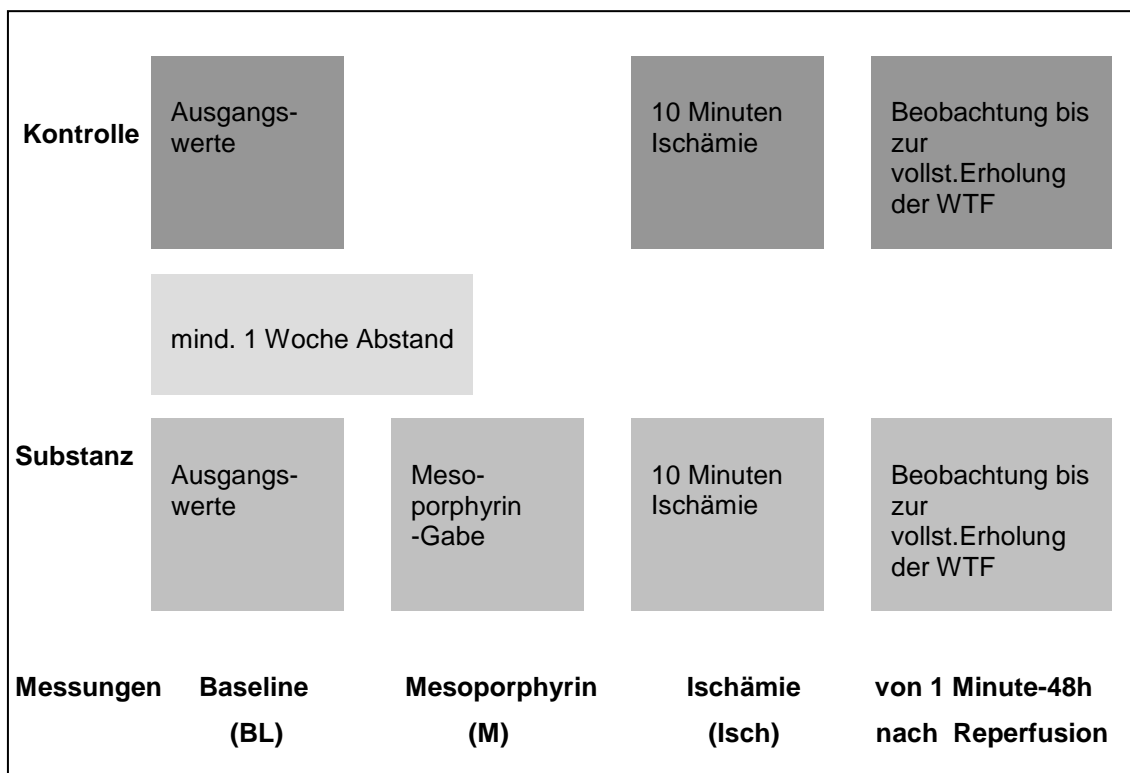


Abbildung 4: Versuchsablauf

Zur Bestimmung der regionalen myokardialen Perfusion erfolgte zu festgelegten Zeitpunkten die Injektion der farbigen Mikrosphären. Es wurde jeweils eine unterschiedliche Farbe eingesetzt und diese dokumentiert. Die Applikation der Mikrosphären erfolgte zu den vier folgenden Zeitpunkten (**Tabelle 4**):

1	Ohne Ischämie und ohne Sn-Mesoporphyringabe
2	Mit Ischämie und ohne Sn-Mesoporphyringabe
3	Ohne Ischämie und mit Sn-Mesoporphyringabe
4	Mit Ischämie und mit Sn-Mesoporphyringabe

Tabelle 4: Zeitpunkte zur Applikation der Mikrosphären

2.5 Datenerfassung und Statistik

Die oben genannten Messwerte wurden mit Hilfe eines Apple Power Macintosh 8500/120 (Apple Inc., Cupertino, USA), der über eine Erweiterung zur Online-Datenerfassung verfügte, in Echtzeit elektronisch verarbeitet und gespeichert. Als Software diente das Programm Labview 4.0[®] (National Instruments Germany GmbH, München, Deutschland).

Die erfassten Daten wurden auf CD-ROM gesichert. Zusätzlich wurden die Daten von einer Hilfskraft in regelmäßigen Abständen abgelesen und digital gespeichert. Die Ergebnisse der Blutgasanalysen (ABL 520[®], Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) wurden manuell in einem Datenerfassungsprotokoll dokumentiert.

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit handelsüblicher Software (Excel[®] (Microsoft Inc., Redmond, USA), Statview 5[®] (SAS, New York, USA), Graphpad Prism 4[®] (Graphpad Software Inc., San Diego, USA)).

Zur statistischen Auswertung wurde bei Vergleichen der Werte innerhalb einer Gruppe, wie zum Beispiel beim Vergleich von Werten innerhalb der Kontrollgruppe, ANOVA als statistischer Test eingesetzt.

Für Vergleiche zwischen den Gruppen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Bei der Auswertung wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant betrachtet. Bei den Werten, die im Ergebnisteil dieser Arbeit aufgeführt sind, handelt es sich um die errechneten Mittelwerte und der zugehörigen Standardabweichungen.

3. Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten und Werte konnten im vollen Umfang verwendet werden und fanden uneingeschränkten Eingang in die Auswertung. Es trat kein Informationsverlust durch Erkrankung oder vorzeitigen Tod eines Tieres ein. Eine Fehlfunktion der implantierten Biokatheter und Sonden oder eine Myokardnekrose trat nicht auf. Daher musste kein Tier vom Eingang in die Versuchsauswertung ausgeschlossen werden. Die durch Ballonokklusion erzeugte myokardiale Ischämie und die konsekutiv erzeugte kontraktile Dysfunktion war in den Versuchsgruppen vergleichbar.

Die in den nachfolgenden Abbildungen, Tabellen und Texten dargestellten Versuchsergebnisse sind jeweils als Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen (SD) aufgeführt.

3.1 Hämodynamik

Vom Zeitpunkt des Beginns der Versuche (Baseline, BL) bis zum Zeitpunkt der vollständigen Erholung der regionalen Wanddickenveränderung (WTF) wurden die hämodynamischen Parameter mit Hilfe der oben beschriebenen implantierten Messsonden zu definierten Zeitpunkten aufgezeichnet.

Gemessen wurde zu folgenden Zeiten:

Baseline (BL), Ischämie (Isch) sowie zu definierten Zeitpunkten nach Reperfusion. Mit Hilfe der implantierten Katheter konnten die nachfolgenden hämodynamischen Parameter erfasst werden:

1. Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)
2. Linksatrialer Druck (LAP)
3. Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ($LVdP \cdot dt^{-1}$)
4. Herzfrequenz (HR)
5. Blutflussgeschwindigkeit in der LAD (BFV LAD).

Variable	Experiment	BL	Ischämie	1 min	5 min	10 min	15 min
MAP (mmHg)	Kontrolle	96±27	69±26*	71±25*	88±32	91±21	88±20
	Mesoporphyrin	91±22	65±21*	71±23*	85±18	86±13	84±18
LAP (mmHg)	Kontrolle	3±2	8±18*	5±8	4±5	3±3	4±3
	Mesoporphyrin	4±6	9±12*	6±4	2±4	2±4	4±4
HR (bpm)	Kontrolle	86±23	111±32*	124±18*	93±28	91±32	88±26
	Mesoporphyrin	88±18	116±37*	118±29*	92±25	88±29	92±17
LVdp·dt⁻¹ (mmHg/s)	Kontrolle	2506±976	1698±1092*	1741±641*	1697±678*	1689±583*	2611±751
	Mesoporphyrin	2578±887	1604±997*	1596±686*	1605±674*	1701±503*	2601±498
BFV LAD (kHz)	Kontrolle	3±4	0*	12±9*	10±6*	5±4	3±6
	Mesoporphyrin	4±4	0*	11±8*	7±9*	5±3	4±5

*: Signifikant gegenüber Baseline ($p \leq 0,05$)

Tabelle 5: Übersicht über die hämodynamischen Werte in den Versuchsreihen ohne (=Kontrolle) und mit (=Verum, Mesoporphyrin) präischämischer Mesoporphyringabe unter Baselinebedingungen, in der Ischämie und in den ersten 10 Minuten nach Beginn der Reperfusion

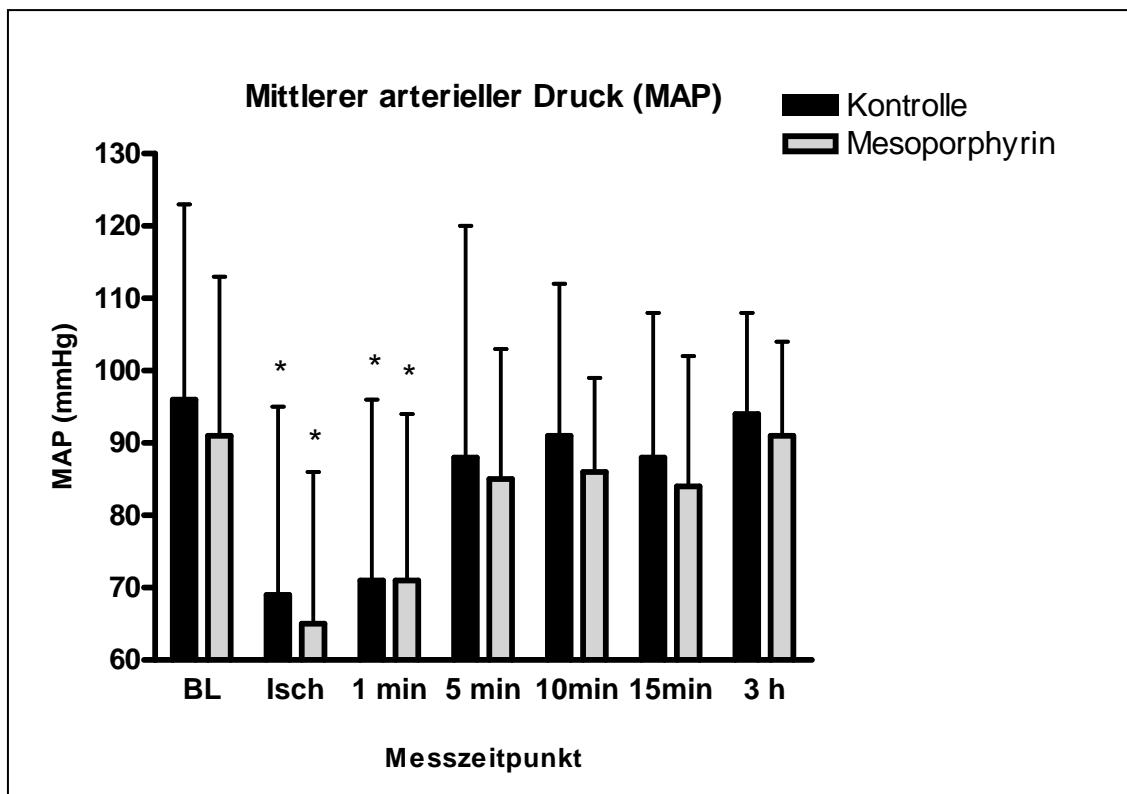
Variable	Experiment	3h	6h	12h	24h	48h
MAP (mmHg)	Kontrolle	94±14				
	Mesoporphyrin	91±13				
LAP (mmHg)	Kontrolle	2±4				
	Mesoporphyrin	3±2				
HR (bpm)	Kontrolle	92±26	88±21	93±16	90±18	93±24
	Mesoporphyrin	90±18	91±18	91±14	92±15	89±26
LVdP·dt⁻¹ (mmHg/s)	Kontrolle	2564±764	2464±962	2621±908	2575±875	2622±1105
	Mesoporphyrin	2603±907	2555±875	2561±967	2654±1042	2691±1112
BFV LAD (kHz)	Kontrolle	4±5	2±3	3±3	2±5	3±6
	Mesoporphyrin	5±2	3±4	3±5	2±4	2±5

*: Signifikant gegenüber Baseline ($p \leq 0,05$)

Tabelle 6: Übersicht über die hämodynamischen Werte in den Versuchsreihen ohne (=Kontrolle) und mit (=Verum, Mesoporphyrin) präischämischer Mesoporphyringabe von 3 bis 48 Stunden nach Beginn der Reperfusion

3.1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Zu den Zeitpunkten Ischämie (Isch) sowie in der ersten Minute nach Reperfusion war sowohl in der Verum- als auch in der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme des arteriellen Mitteldrucks im Vergleich zu BL beobachten. Zwischen beiden Gruppen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied.

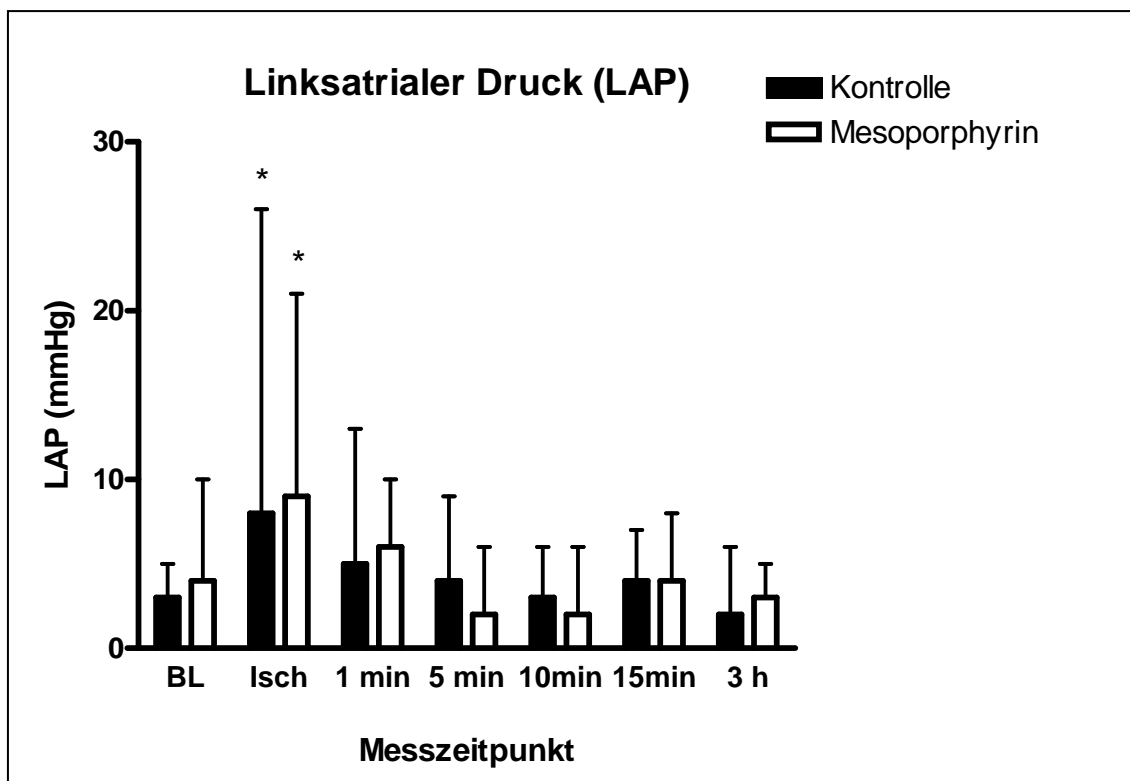


*: Signifikant gegenüber Baseline ($p \leq 0,05$)

Abbildung 5: Entwicklung des mittleren arteriellen Drucks während des Versuchs

3.1.2 Linksatraler Druck (LAP)

Der linksatriale Druck war während der Ischämie (Isch) signifikant in beiden Versuchsgruppen gegenüber BL erhöht. Während der Reperfusion bestanden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des LAP zur Baseline. Die zum Ischämiezeitpunkt beobachteten Veränderungen traten in Kontroll- sowie Verumgruppe in gleicher Weise auf, es bestanden keine signifikanten Intergruppenunterschiede

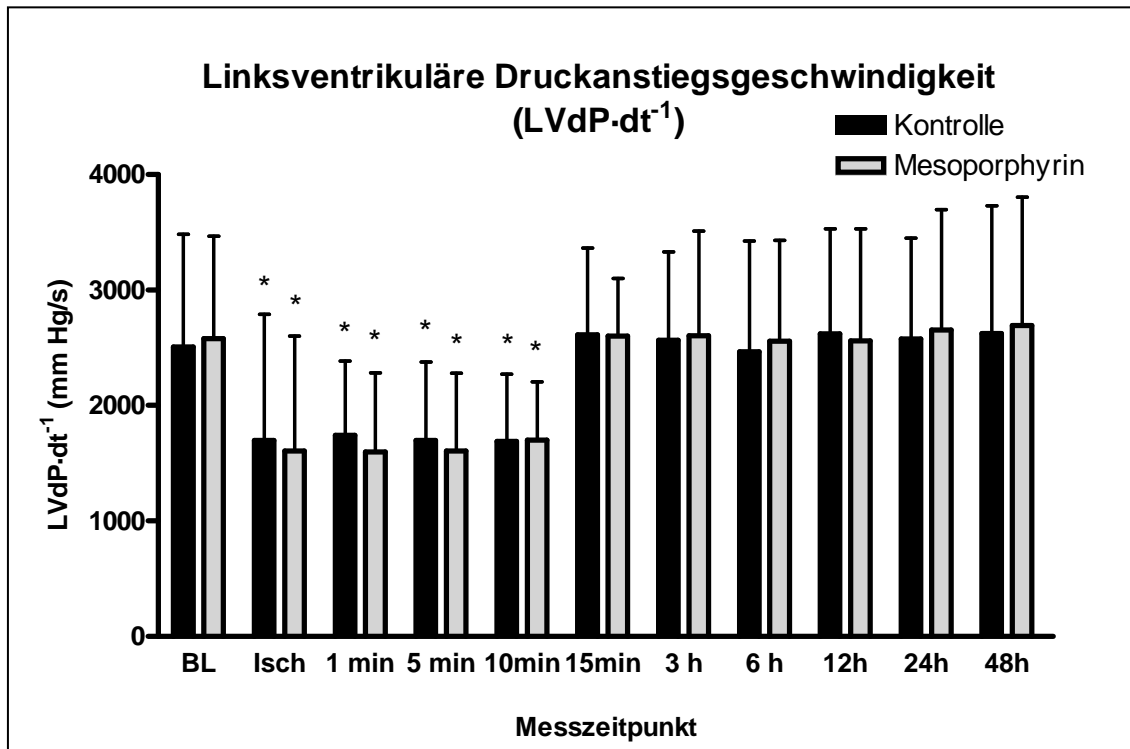


*: Signifikant gegenüber Baseline ($p \leq 0,05$)

Abbildung 6: Verlauf des linksatrialen Drucks während des Versuchs

3.1.3 Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (LVdP-dt¹)

Die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit war vom Beginn der Ischämie (Isch) bis einschließlich zehn Minuten nach Reperfusion signifikant gegenüber Baseline verringert. Eine Normalisierung auf Ausgangsniveau stellte sich erst 15 Minuten nach Reperfusion ein. Zwischen Kontroll- und Verumgruppe waren keine signifikanten Abweichungen zu beobachten.

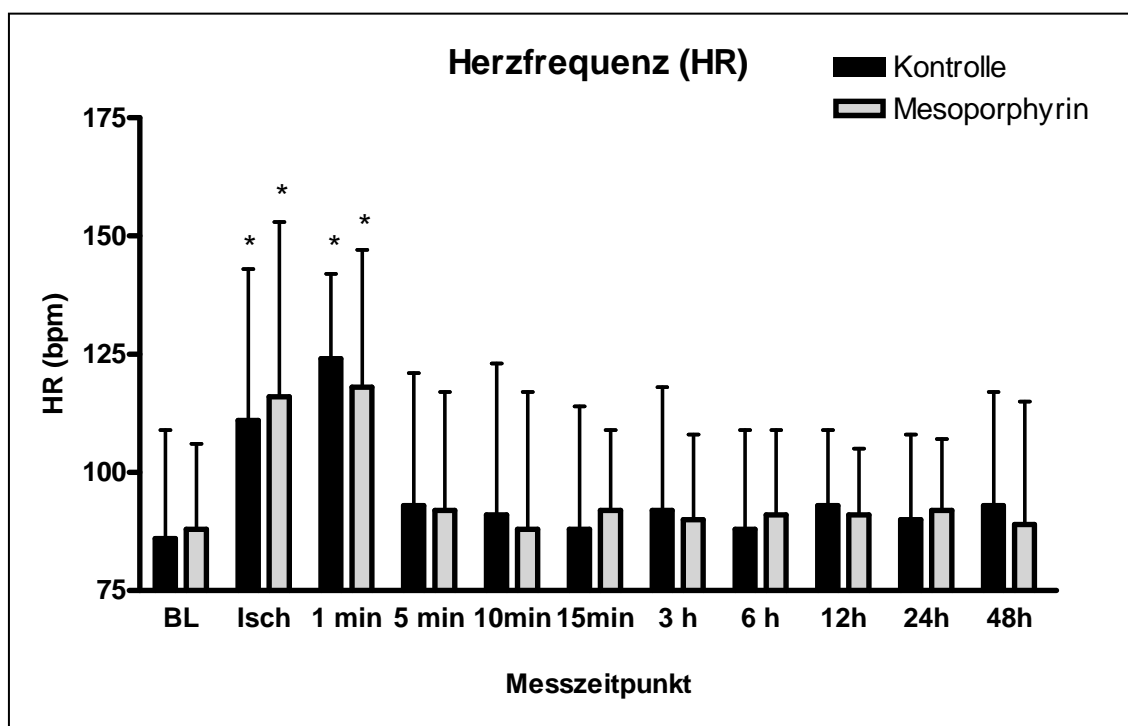


*: Signifikant gegenüber Baseline ($p \leq 0,05$)

Abbildung 7: Entwicklung der linksventrikulären Druckanstiegsgeschwindigkeit während des Versuchs

3.1.4 Herzfrequenz (HR)

Die Herzfrequenz zeigte in beiden Versuchsgruppen einen signifikanten Anstieg gegenüber BL, die sich von Beginn der Ischämie bis eine Minute nach Reperfusion manifestierte. Danach war gleichermaßen eine schnelle Normalisierung der Herzfrequenz zu beobachten.



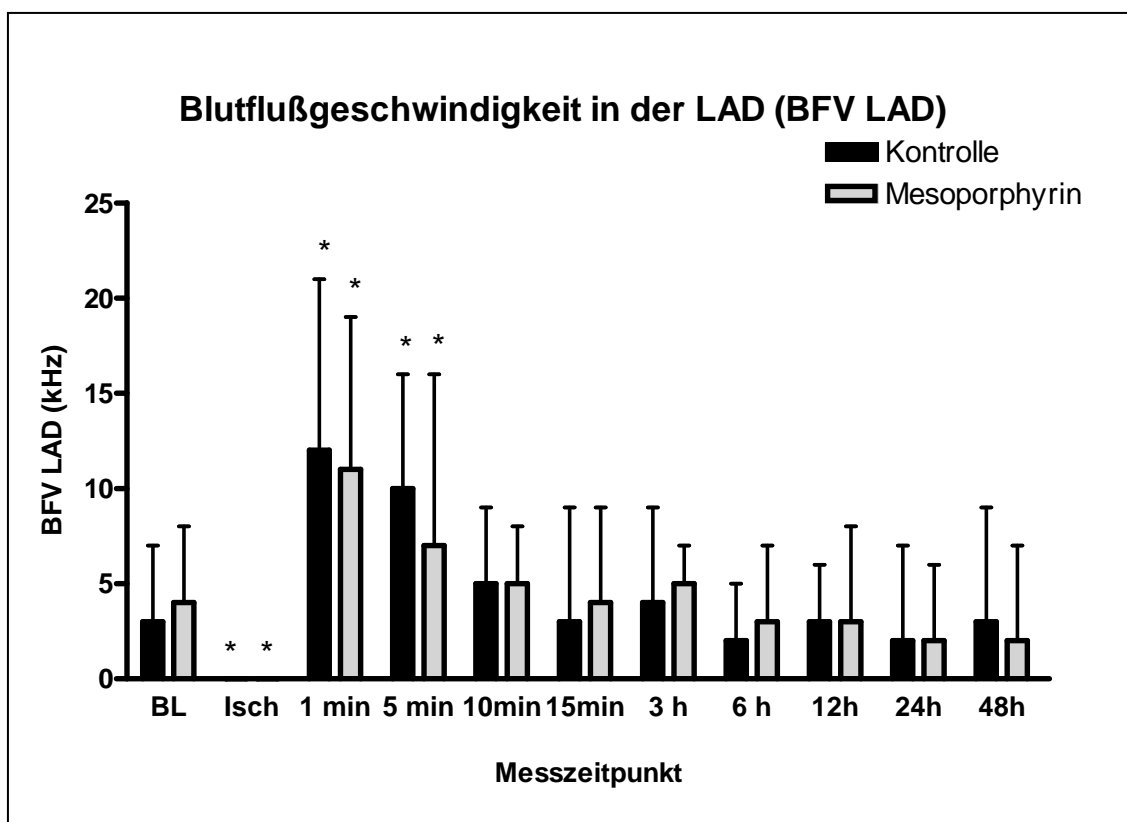
*: Signifikant gegenüber Baseline ($p \leq 0,05$)

Abbildung 8: Verlauf der Herzfrequenz während des Versuchs

3.1.5 Blutflussgeschwindigkeit im Ramus interventricularis (BFV LAD)

Während der Ischämie sank die Blutflussgeschwindigkeit in der LAD definitionsgemäß auf Null ab.

Nach Reperfusion zeigte sich bis zum Zeitpunkt 5 Minuten nach Reperfusion ein signifikanter Anstieg der Blutflussgeschwindigkeiten in der LAD gegenüber BL. Es bestand allerdings auch hier kein Unterschied im Ausmaß des Anstiegs zwischen beiden Gruppen.

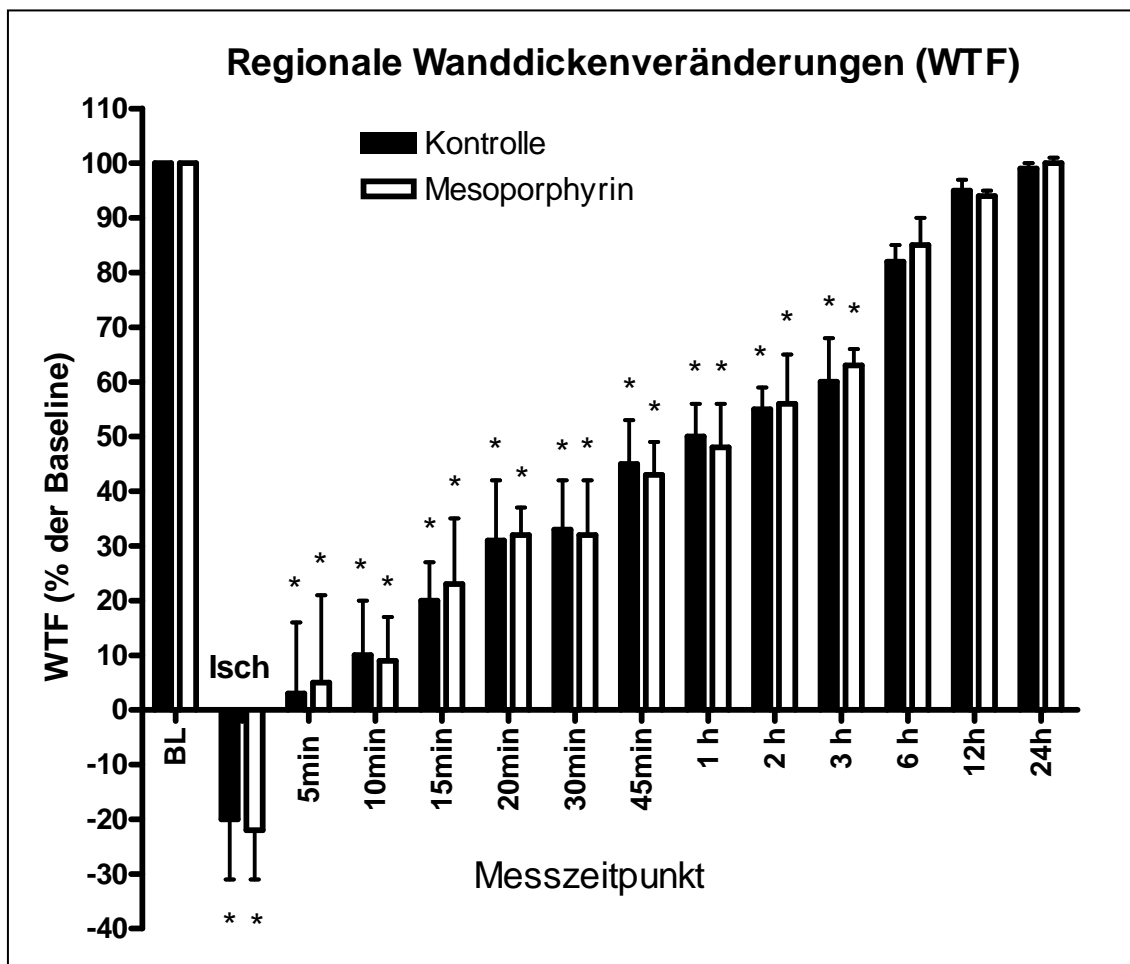


*: Signifikant gegenüber Baseline ($p \leq 0,05$)

Abbildung 9: Veränderung der Blutflussgeschwindigkeit in der LAD während des Versuchs

3.2 Regionale Wanddickenveränderung (WTF)

Die fraktionelle myokardiale Wanddicke veränderte sich zum Zeitpunkt der durch Okklusion der LAD hervorgerufenen Ischämie in beiden Versuchsgruppen hin zu negativen Werten. Mit -20% in der Kontrollgruppe und -22% in der Substanzgruppe war die Veränderung der WTF in beiden Gruppen als gleich zu werten. Die Erholung der WTF war bei beiden Versuchsgruppen identisch. Die Werte stiegen kontinuierlich an und erreichten zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Reperfusion den Ausgangswert.



*: Signifikant gegenüber Baseline ($p \leq 0,05$)

Abbildung 10: Entwicklung der regionalen myokardialen Wanddickenveränderung während des Versuchs

3.3 Regionaler myokardialer Blutfluss

	Subepikardialer Blutfluss BL in (mL·g ⁻¹ ·min ⁻¹)	Subepikardialer Blutfluss Isch in (mL·g ⁻¹ ·min ⁻¹)
Kontrolle	0.83 ± 0.11	0.18 ± 0.05*
Verum	0.90 ± 0.15	0.21 ± 0.07*
	Subendokardialer Blutfluss BL in (mL·g ⁻¹ ·min ⁻¹)	Subendokardialer Blutfluss Isch in (mL·g ⁻¹ ·min ⁻¹)
Kontrolle	0.87 ± 0.16	0.17 ± 0.16*
Verum	0.91 ± 0.06	0.10 ± 0.16*

*: Signifikant gegenüber Baseline (p ≤ 0,05)

Tabelle 7: Regionaler myokardialer Blutfluss aufgeteilt in subepikardialen und subendokardialen Blutfluss

Der subendokardiale sowie der subepikardiale Blutfluss sank in beiden Versuchsgruppen während der Ischämie signifikant ab. Die Perfusion zum Zeitpunkt BL waren in der Kontrollgruppe und in der Gruppe, die mit Mesoporphyrin behandelt wurde, vergleichbar. Ein Unterschied in der Abnahme der Perfusion während der Ischämie war zwischen den beiden Versuchsgruppen nicht zu beobachten.

4. Diskussion

4.1 Methoden

4.1.1 *Das Versuchsmodell*

Nach der Beschreibung des Phänomens „Stunning“ im Jahr 1975 durch Heyndrickx und Kollegen wurde es Gegenstand zahlreicher experimenteller Untersuchungen (52). Eine positive Beeinflussung von Dauer und Schweregrad dieser postischämischen myokardialen Dysfunktion durch Pharmaka oder andere Interventionen konnte in unterschiedlichsten Experimenten an verschiedenen Versuchsmodellen nachgewiesen werden. Methodologische Einflüsse und eventuelle Artefakte müssen unbedingt bei der Einordnung der Versuchsergebnisse berücksichtigt werden (8).

Die Funktion von gesundem Myokard unterliegt einer Vielzahl von Variablen. Myokard im Stunning muss als sehr sensibel betrachtet werden. Faktoren, die auf die Kontraktilität von gesundem Myokard wirken haben hier einen noch weitaus stärkeren Einfluss auf die Myokardiale Funktion (12).

Zur Untersuchung des myokardialen Stunnings werden zahlreiche unterschiedliche Versuchsmodelle eingesetzt. Es existieren Modelle an isolierten Herzmuskelzellen, an isolierten Herzen in der Langendorff-Apparatur, im Akutversuch und am chronisch instrumentierten Tier. Es wurden im Laufe der Zeit viele Modifikationen der einzelnen Modelle entwickelt, die sich im Ablauf und in der Methodik der Induktion der Ischämie zum Teil stark unterscheiden.

Allen Modellen zum Thema Stunning gemeinsam ist die Erzeugung beziehungsweise Simulation einer Myokardischämie. Diese darf per definitionem keine Myokardnekrose erzeugen (12). Die postischämische Dysfunktion muss vollständig reversibel sein.

Modelle an isolierten Kardiomyozyten

Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten sind besonders geeignet zur Entschlüsselung zellulärer Mechanismen (21). Coetzee konnte mit Hilfe dieses Modells darstellen, dass Kardiomyozyten, die einer hohen Konzentration an Sauerstoffradikalen ausgesetzt waren, einen hyperkontraktilen Zustand annehmen. Dieser wird vermutlich durch eine erhöhte Kalziumkonzentration im Zytosol hervorgerufen.

In derartigen Modellen lassen sich Pathomechanismen simulieren, wie sie auch beim Stunning auftreten können. Eine eindeutige Zuordnung zum myokardialen Stunning ist jedoch nicht möglich, da gleiche Umstände bei einer Vielzahl von kontraktilen Störungen und ischämischen Schädigungen des Herzmuskels auftreten. Der bereits oben erwähnten exakten Definition von Bolli werden Modelle an isolierten Herzmuskelzellen nicht gerecht, denn eine Reversibilität des Phänomens ist nicht überprüfbar. Die Versuchsergebnisse lassen sich nur schwer eindeutig dem Stunning zuordnen, da es sich kaum nachweisen lässt, ob im Versuchsverlauf tatsächlich Stunning aufgetreten ist (12).

Modelle am isolierten Herz

Modelle an isolierten Herzen werden meist mit Hilfe einer modifizierten Langendorff-Apparatur durchgeführt. Das Herz ist dabei komplett vom Kreislauf getrennt und wird mit einer Nährlösung beziehungsweise Blut perfundiert. Die Reversibilität der Dysfunktion lässt sich auch bei diesen Modellen nicht beweisen, da eine Erholung des Gesamtorganismus von der Ischämie nicht mehr möglich ist. Lediglich die Normalisierung von Parametern wie dem Phosphokreatin Gehalt und dem intrazellulären pH lassen Rückschlüsse zu, dass die Ischämie subletal gewesen sein muss (12,94). Nur unter bestimmten Voraussetzungen kann mittels dieser Modelle myokardiales Stunning reproduziert werden, anderenfalls ist die Ischämie mit Zellnekrose verbunden. Ist das Herz vom normalen Kreislauf getrennt, ist eine Übertragung der

Resultate auf einen lebenden Organismus nur mit großen Einschränkungen möglich, da nervöse und humorale Einflüsse ausgeschaltet sind. Damit ist auch die Relevanz derartiger Modelle für die Erforschung des myokardialen Stunnings fraglich (7,12).

Akutmodelle

Beim akut instrumentierten Tier werden nach chirurgischer Eröffnung des Thorax Messsonden und Katheter eingebracht. Der Versuch wird nach kurzer Erholungsphase unter fortwährender Allgemeinanästhesie durchgeführt. Allein aufgrund des chirurgischen Traumas kann das Versuchsergebnis beeinflusst werden, Einfluss nehmen können zusätzlich folgende Punkte (70,125,127):

- perioperative Hypothermie
- Bildung freier Sauerstoffradikale
- Flüssigkeitsverlust über den offenen Hemithorax
- Wirkung der Anästhetika
- Ausschaltung/ Abschwächung der humoralen Kompensationsmechanismen des Organismus durch die Allgemeinanästhesie.

Bereits durch chirurgische Manipulationen an den Koronarien könnte myokardiales Stunning ausgelöst werden, das dann eventuell Auswirkungen auf das weitere Versuchsergebnis haben kann.

Zusätzliche Faktoren sind der offene Hemithorax, der gesteigerte Flüssigkeitsumsatz und Blutverlust, die perioperative Hypothermie und die veränderte Kreislagsituation während des Versuchs. Es werden Zytokine ausgeschüttet, durch die Flüssigkeitsverluste können Ionenungleichgewichte entstehen (7).

Li und Mitarbeiter führten 1993 einen Vergleich von akutem und chronischen Hundemodell durch (70). An open-chest dogs und am chronisch instrumentierten Hund wurden identische Versuche zum myokardialen Stunning durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass die Ergebnisse von gleichartig generiertem Stunning stark differierten. So war die Erholung der WTF im

Akutversuch signifikant schlechter als im chronischen Modell. Die Produktion an freien Radikalen lag im open-chest Versuch fünfmal höher als im chronischen Tiermodell. Li und Mitarbeiter kamen zu dem Schluss, dass Ergebnisse aus Versuchen mit isolierten Herzen und open-chest Tieren nicht auf den chronischen Versuch übertragbar waren. Die von Li gemessene fünffache Konzentration an freien Radikalen ist vermutlich durch das chirurgische Trauma induziert (70). Diese hat wiederum eine schlechtere Erholung von der Myokardischämie zur Folge. Die große Schwierigkeit bei Akutmodellen besteht darin, die Veränderungen der Parameter eindeutig dem interventionell hervorgerufenen Stunning zuordnen zu können, da viele Störgrößen Einfluss auf das Versuchsergebnis nehmen. Bei den oben genannten Modellen lässt sich die Reversibilität der kontraktilen Dysfunktion meist nicht überprüfen. Häufig treten Myokardnekrosen auf und machen dadurch den Bezug der Ergebnisse auf das myokardiale Stunning fraglich.

Der chronisch instrumentierte, wache Hund

Die zuvor erwähnten Einflüsse des Akutmodells auf das Versuchsergebnis treten beim Modell des chronisch instrumentierten Hundes nicht auf, da zwischen chirurgischem Trauma und dem Experiment eine angemessene Erholungsphase von zehn bis zwölf Tagen liegt. Zudem steht das Tier während des Versuchs nicht unter dem Einfluss von Anästhetika oder Sedativa. Ein entscheidender Vorteil des verwendeten chronischen Tiermodells, auch im Sinne des Tierschutzes, liegt in der Durchführbarkeit serieller Experimente an ein und demselben Versuchstier. An jedem Tier konnte nach entsprechender Erholungsphase von mindestens einer Woche ein zweiter Versuch durchgeführt werden (96). Verum und Kontrolle konnten an ein und demselben Tier überprüft werden. Um das Entstehen einer Bias zu verhindern, wurde die Reihenfolge der Versuche randomisiert. Durch die Möglichkeit, jedes Tier als seine eigene Kontrolle einzusetzen, konnte die Anzahl der Versuchstiere auf die Hälfte reduziert werden. Zudem kann sich in diesem Modell eine Verlaufsbeobachtung über einen beliebig langen Zeitraum nach Intervention anschließen.

Ein Nachteil des in dieser Untersuchung eingesetzten Versuchsmodells liegt im großen methodischen Aufwand. An die operative Instrumentierung schloss sich eine 10 bis 12 tägige Pflegephase der Versuchstiere an, in der regelmäßige Verbandswechsel, Wundpflege und die Spülung der Katheter durchgeführt werden mussten. Die Tiere werden gleichzeitig an die Umstände der späteren Versuchsdurchführung gewöhnt, indem die Verbandswechsel in der gleichen Umgebung und unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wurden. Diese Adaptation ist nötig, um die Versuche unter bekannten Bedingungen an einem stressfreien Tier durchführen zu können. Diese Form der Versuchsvorbereitung ist mit einem hohen organisatorischen, zeitlichen und personellen Aufwand verbunden. Inklusive der Erholungsphasen erstreckte sich der Beobachtungszeitraum eines Tieres über mehr als 20 Tage. Der Verlust eines Tieres oder das Versagen der Messsonden hat einen nicht kompensierbaren Informationsverlust zur Folge. Das Modell des chronisch instrumentierten Hundes ist mit einer Ausfallquote von bis zu zehn Prozent verbunden. Durch die Bewegungen der Tiere können Messsonden, Katheter sowie die elektrischen Leitungen beschädigt werden. Postoperative Infektionen können im schlimmsten Fall den Tod des Tieres bedingen.

Heyndrickx und Kollegen untersuchten erstmals das myokardiale Stunning am chronisch instrumentierten Hund (52). Die Versuchsanordnung wurde in zahlreichen Studien mehr oder weniger modifiziert verwendet und etabliert (7). Der Versuchsaufbau wurde auch auf andere Spezies wie z.B. das Schwein übertragen, ebenso wurden Variationen der Dauer der koronaren Okklusion angewendet.

Zu Dauer und Anzahl der Koronarokklusionen besteht eine große Auswahl an Modellen, die am häufigsten verwendeten Versuchsmodelle werden im Folgenden kurz vorgestellt (12):

Myokardiales Stunning nach einer einzelnen reversiblen Ischämie

Beim Hund führt eine komplette koronare Okklusion von weniger als 20 Minuten zu keiner myokardialen Infarzierung (12). Folge kann jedoch eine länger anhaltende kontraktile Dysfunktion sein (52). Bei dem hier angeführten Modell handelt es sich um das klassische Modell des Stunnings, wie es 1975 von Heyndrickx beschrieben wurde.

Myokardiales Stunning nach mehreren reversiblen Ischämien

Wiederholte kurze Ischämien von 5 bis 10 Minuten Dauer führen zu einer Kumulation der depressiven Effekte auf die kardiale Kontraktilität (86).

Dieses Vorgehen unterscheidet sich von vorgenannten Modellen zusätzlich in der effektiven Dauer der Ischämie. Diese kann durch die zwischenzeitliche Reperfusion und durch die häufige Wiederholung in der Summe einen weitaus längeren Zeitraum betragen, ohne eine Infarzierung des Myokards zu verursachen. Die größte Reduktion der myokardialen Kontraktilität ist dabei bei der ersten Okklusion zu beobachten und nimmt mit steigender Anzahl der Okklusionen ab. Dieser Zustand ist mit dem Phänomen des Preconditionings zu erklären, einer Anpassung des Myokards an wiederholte ischämische Episoden wie sie auch bei Angina pectoris auftritt (22). Im Gegensatz zur einzelnen Ischämie von unter 20 Minuten kann die effektive Ischämiezeit in diesem Modell zwischen 50 und 60 Minuten liegen.

Myokardiales Stunning nach partiell reversibler Ischämie (subendokardialer Infarkt)

Eine kardiale Ischämie beim Hund, die länger als 20 Minuten aber kürzer als 3 Stunden andauert, kann den subendokardialen Teil des Myokards irreversibel schädigen. Es ist mit einer Infarzierung dieser Zonen des Myokards zu rechnen, während der subepikardiale Abschnitt über einen langen Zeitraum im Stunning bleibt, ohne einen irreversiblen Schaden zu erleiden (56).

Die Schwierigkeit bei diesem Versuchsmodell besteht darin, genaue Rückschlüsse auf die postischämische Dysfunktion zu ziehen, da es sich bei dem reperfundierten Myokard um eine Kombination aus nekrotischem und Subendokard im Stunning handelt. Wird ein subendokardialer Infarkt verursacht, ist die genaue Zuordnung der beobachteten Veränderung nicht möglich. Ursache der kontraktilen Dysfunktion kann sowohl der subendokardiale Infarkt als auch das gestunnte subepikardiale Myokard sein.

Myokardiales Stunning nach Kardioplegie in vivo

Trotz Anwendung der hypothermen hyperkalämischen Kardioplegie, die schwerere myokardiale Schädigungen abwehren soll, folgt auf die globale Ischämie eine kontraktilen Dysfunktion des Myokards sowie eine Schwellung der Myozyten. Stunning scheint hierbei als zugrunde liegender Mechanismus eine wichtige Rolle einzunehmen (113).

Myokardiales Stunning nach belastungsinduzierter Ischämie

In Versuchsmodellen, bei denen lediglich eine koronare Stenose aber keine komplette Okklusion vorliegt, führt körperliche Belastung zu einer Differenz zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf und damit zu einer Hypoxie des Myokards. Die dadurch hervorgerufene kontraktile Dysfunktion persistiert auch nach Beendigung der Belastung. Diese Mechanismus erklärt das klinische Auftreten von Stunning. Diese kann beispielsweise durch Single-Photonen-

Emissions-Computertomographie (SPECT) bei Ein-Gefäß-KHK nachgewiesen werden (122).

In der vorliegenden Studie wurden die Experimente an einem Tier auf zwei begrenzt, da durch häufigere Ischämien eine Ausbildung von Kollateralkreisläufen induziert werden könnte. Diese würde einen nicht zu benennenden Einfluss auf das Versuchsergebnis ausüben (22). Der wichtigste Einflussfaktor in diesem Fall ist das oben beschriebene Preconditioning. Dabei unterscheidet man ischämisches und pharmakologisches Preconditioning. Letztes entsteht nicht durch wiederholtes Durchführen subletaler Ischämien sondern durch präischämische Gabe von Substanzen, die die Toleranz des Myokards gegenüber Ischämie verbessern (138).

Die Auswirkungen der Myokardischämie auf den Herzmuskel werden durch diesen Mechanismus abgeschwächt.

Für die Erfassung des kollateralen Blutflusses eignen sich die von uns eingesetzten Mikrosphären.

4.1.2 Instrumentierung und Versuchsdurchführung

Die Instrumentierung der Versuchstiere wurde in Intubationsnarkose durchgeführt. Die in dieser Studie eingesetzte Einleitungsmethode ist für den Hund etabliert. Eine Arbeit zu dieser Einleitungsmethode und ihren Auswirkungen auf die myokardiale Funktion wurde von Wouters veröffentlicht (133).

Aus den oben genannten Gründen wurde in dieser Studie eine Ischämiezeit von 10 Minuten gewählt, da dies nachweislich keine Infarzierung des Myokards hervorruft aber trotzdem eine reproduzierbare myokardiale Dysfunktion erzeugt (12).

Das eingesetzte *in-vivo*-Modell wurde an chronisch instrumentierten 11 bis 13 Monate alten Foxhounds durchgeführt.

In-vivo-Modelle können Konstellationen, wie sie beim klinischen Patienten auftreten, am besten simulieren.

Das bei dieser Untersuchung eingesetzte chronische Tiermodell minimiert gegenüber dem Akutmodell die Anzahl der möglichen Störgrößen und verbessert damit die Übertragbarkeit des Messergebnisses auf klinische Begebenheiten. Die von uns eingesetzten Versuchstiere wurden unter Allgemeinanästhesie thorakotomiert. Messsonden und Katheter wurden implantiert und die Zuleitungen nach Verschluss des Thorax subkutan zwischen die Scapulae getunnelt. Dabei handelt es sich um eine für das Tier nicht zugängliche Stelle. Für die anschließende Wundversorgung und Pflege erleichterte die Lokalisation das Reinigen der Austrittsstelle beziehungsweise die Begutachtung der Wundverhältnisse.

Der Vorteil des chronischen Tiermodells liegt in der Tatsache, dass sich nach dem chirurgischen Trauma eine ausreichend lange Erholungsphase anschließt. Der Einfluss des Traumas auf das Versuchsergebnis kann somit minimiert werden (66). Die Versuche wurden erst durchgeführt, nachdem sich die Tiere hinreichend erholt hatten und sämtliche Vitalparameter im Normalbereich lagen. Der kürzeste Zeitraum zwischen Instrumentierung und Versuch lag bei 10 Tagen. Somit konnten die Untersuchungen an weitestgehend unbeeinträchtigten Tieren unter physiologischen Bedingungen durchgeführt werden. Das verwendete Versuchsmodell ist gut etabliert (43,130,133) und wurde bereits in zahlreichen Studien in gleicher oder gering modifizierter Form eingesetzt. Inwiefern die Ergebnisse aus diesem Bereich der Grundlagenforschung auf den Menschen übertragbar sind, müssen klinische Studien zeigen. Aufgrund der Tatsache, dass die Untersuchungen an einem weitgehend intakten Organismus durchgeführt werden, kann das Modell des chronisch instrumentierten Hundes klinische Konstellationen besser simulieren als die oben beschriebenen Alternativmodelle.

4.1.3 Methodologische Einflüsse

Ein während der Ischämie auftretender kollateraler Blutfluss hat gravierende Auswirkungen auf myokardiales Stunning. Dies wurde in akuten als auch in chronisch instrumentierten Tiermodellen nachgewiesen (108). Für ein valides Versuchsergebnis sollte deshalb sichergestellt sein, dass der kollaterale Blutfluss in den Versuchsgruppen auf vergleichbarem Niveau liegt. Eine Messung des Kollateralfusses bietet die Möglichkeit, diesen in die Versuchsauswertung mit einzubeziehen (133).

Zur Kontrolle der myokardialen Perfusion und des kollateralen Blutflusses wurde das Mikrosphärenverfahren eingesetzt. Die Verwendung radioaktiv markierter Mikrosphären wurde erstmals von Rudolph und Heymann 1967 zur Messung der fetalen Perfusion in utero beschrieben (99). Später wurde dieses Verfahren auch für die Messung der Koronarperfusion beim Hund validiert (28). Die Messung mit Hilfe kolorierter Mikrosphären löste Mitte der neunziger Jahre das bis dahin verwendete Verfahren mit radioaktiv markierten Mikrosphären ab, nachdem verschiedene Untersuchungen eine exzellente Korrelation zwischen diesen beiden Methoden gezeigt hatten (46). In der vorliegenden Studie wurden für die Bestimmung der Organperfusion fluoreszierende Mikrosphären der Größe 15µm (Dye-Trak[®], Triton Technologies, San Diego, USA) eingesetzt. Eine hämodynamisch relevante Agglomeration von Mikrosphärenpartikeln kann durch adäquaten Einsatz der Suspension leicht vermieden werden (84). Der Nachteil dieser Methode liegt jedoch darin, dass die Organperfusion lediglich zum Zeitpunkt der Injektion der Mikrosphären bestimmt werden kann, eine kontinuierliche Messung ist nicht möglich.

Wiederholte koronare Okklusionen können eine Kollateralisierung des myokardialen Blutflusses induzieren (22). Deshalb wurden in der vorliegenden Studie die Ischämien pro Tier auf maximal zwei begrenzt (96).

Bei open-chest Präparationen kann die Körpertemperatur Einfluss auf die Ausprägung der postischämischen kontraktile Dysfunktion nehmen (125). In dem hier angewendeten Versuchsmodell des chronisch instrumentierten Hundes wurde auf gleich bleibende Umgebungstemperaturen während der

Versuchsdurchführung geachtet und eine Temperaturhomöostase der Hunde zu jeder Zeit gewährleistet. Deshalb kann ein Einfluss der Körpertemperatur des Versuchstieres auf das Versuchsergebnis im vorliegenden Fall eindeutig ausgeschlossen werden.

Eine einwandfreie Funktion der verwendeten Sonden und Katheter sind für das angewandte Modell von größter Bedeutung. Eine rasche, routinierte und atraumatische Instrumentierung war Voraussetzung für das Gelingen der durchgeführten Untersuchungen. Neben der Erholung von dem chirurgischen Trauma ist ein Zeitraum von ca. Tagen notwendig, um von den implantierten Sensoren verlässliche Messwerte zu erhalten und eine Beeinträchtigung der Homöostase des Tieres durch den Eingriff weitestgehend auszuschließen. Der Sensor für die Bestimmung der WTF muss zunächst einwachsen, um exakte Messergebnisse zu liefern (49).

In konventionellen Versuchsmodellen wird die Messung der fraktionellen Wanddicke mit Hilfe der Methode der Transit-Zeit-Bestimmung vorgenommen. Bei diesem Verfahren werden zwei Ultraschall-Kristalle benötigt, wobei eine Sonde auf dem Epikard aufgenäht, die andere im Myokard subendokardial platziert wird (139). Ein großer Nachteil dieser Methode liegt in der Traumatisierung des Myokards durch die Implantation der subendokardialen Sonde, von dem negativer Einfluss auf die regionale myokardiale Funktion und Perfusion ausgehen könnte. Zudem ist eine genaue transmurale Ausrichtung mit deutlichen technischen Schwierigkeiten verbunden.

Die hier verwendete Methode zur Bestimmung der WTF stellt ein weitgehend atraumatisches Verfahren dar. Es arbeitet mit einem 10 MHz gepulsten Dopplerkristall und wurde 1983 erstmals von Hartley (49) beschrieben. Ein Nachteil dieser Methode der Messung der fraktionellen Wanddicke liegt darin, dass die absolute Wanddicke nur mit Hilfe einer zusätzlich durchgeführten M-Mode-Echokardiographie bestimmt werden kann.

Bei Aufbringen der Dopplerkristalle ist auf eine genaue Platzierung in dem Myokardareal zu achten, das durch die spätere koronare Okklusion einer Ischämie unterworfen sein wird. Liegt die Sonde in einem Bereich, der sich im Rand der Ischämiezone befindet, kann eine beschleunigte Erholung und eine

weniger starke Dysfunktion vorgetäuscht werden. Um diese Störvariable auszuschalten, wurde bei der Instrumentierung darauf geachtet, dass die Ultraschallkristalle in ausreichendem Abstand von der Grenzzone zwischen ischämischem und normal perfundiertem Myokard appliziert wurden. Durch die Verwendung derselben Tiere im Interventions- und Kontrollversuch konnte ein eventuell auftretender Fehler minimiert werden.

Die Bestimmung der koronaren Blutflussgeschwindigkeit erfolgte mit Hilfe einer 20 MHz gepulsten Dopplersonde, die distal des pneumatischen Ballonokkluders auf der LAD angebracht wurde. Die Blutflussgeschwindigkeit wurde indirekt aus der Frequenzablenkung des Ultraschallsignals durch den Blutfluss und dem bekannten Durchmesser der Sonde errechnet. Gegenüber der elektromagnetischen Blutflussbestimmung besteht der Vorteil dieser Methode im geringen Gewicht der Implantate sowie in dem stabilen Nullsignal der Dopplersonde. Dadurch ist im Gegensatz zur elektromagnetischen Flussbestimmung keine Nullkalibrierung bei koronarer Okklusion notwendig, was für das verwendete Versuchsmodell einen entscheidenden Vorteil darstellt. Bei der Festlegung des ischämischen Areal ist dessen Größe von großer Bedeutung (13). Bei einem zu klein gewählten Areal bestünde eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass die Dopplerkristalle zur Bestimmung der WTF nur im Randbereich der ischämischen Zone zu liegen kommen. Ein zu groß gewähltes Areal wäre mit massiven hämodynamischen Auswirkungen verbunden und könnte die Entwicklung von Arrhythmien oder einer kardialen Dekompensation begünstigen. Durch die jeweilige Durchführung von Verum- und Kontrollversuch an einem Tier wurde der Einfluss eventuell unterschiedlich großer Ischämiezonen auf das Versuchsergebnis minimiert, da sich Einflüsse in diesem Fall gegenseitig aufheben.

Obwohl es sich bei myokardialen Stunning um eine Manifestation des Reperfusionsschadens handelt, beeinflusst die Dauer der vorausgehenden Ischämie und das Ausmaß der Reduktion des koronaren Blutflusses die Schwere der induzierten kontraktile Dysfunktion des Myokards (7,12). Da eine Okklusion von weniger als zwanzig Minuten nachweislich keine

Myokardnekrosen hervorruft (12), wurde die Ischämiezeit im vorliegenden Versuch auf 10 Minuten festgesetzt.

Im vorliegenden Versuchsmodell sind die hämodynamischen Parameter des chronisch instrumentierten Tieres als Einflussgrößen zu werten. Die koronare Perfusion wird unter anderem von der Nachlast beeinflusst.

Um Unterschiede in der Koronarperfusion und damit in der Schwere des Stunnings auszuschließen, wurde jeweils der invasiv gemessene arterielle Blutdruck zur Abschätzung der Nachlast verglichen. In der vorliegenden Studie bestanden zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede im mittleren arteriellen Blutdruck. Das bedeutet, dass zu keinem Zeitpunkt Unterschiede in der Nachlast und somit auch in der koronaren Perfusion zwischen den Untersuchungen auftraten.

Auch Vorlast und Herzfrequenz üben einen Einfluss auf die kardiale Funktion aus. Die Vordehnung der Herzmuskelfasern verstärkt die myokardiale Kontraktilität im Sinne des Frank-Starling-Mechanismus. Da die enddiastolische Wandspannung in diesem Modell nicht auf einfache Art messbar ist, können der linksventrikuläre enddiastolische Druck und der linksatriale Druck als Anhaltspunkt für die Vorlast eingesetzt werden (8). Der linksatriale Druck zeigte bei der vorliegenden Untersuchung keine signifikanten Differenzen zwischen den Versuchsgruppen. Dies wurde durch Infusion isotoner Lösungen über den Versuchsverlauf ermöglicht. Hieraus kann geschlossen werden, dass auch die Vorlast während der Untersuchung in beiden Gruppen in einem vergleichbaren Rahmen lagen.

Die Herzfrequenz nimmt Einfluss auf die koronare Perfusion, die aufgrund der sich verkürzenden Diastole bei zunehmender Herzfrequenz abnimmt. Weiter werden die diastolische Füllung und damit die enddiastolische Segmentlänge negativ beeinflusst. Es bestanden keine signifikanten Differenzen der Herzfrequenzen im Kontroll- und Interventionsversuch. Die Schwankungen in der Herzfrequenz sind durch die Auswirkung der koronaren Okklusion sowie Reperfusion bedingt und traten in der Kontroll- sowie Interventionsgruppe gleichsam auf. Aus den oben genannten Gründen lässt sich schließen, dass

alle Messungen unter vergleichbaren kardialen Ausgangsbedingungen durchgeführt wurden.

4.2 Diskussion der Versuchsergebnisse

Zum Thema Stunning existiert eine Vielzahl an Arbeiten, deren Ziel es ist, Mechanismen zu entschlüsseln, die eine Verringerung dieser Dysfunktion zur Folge haben (42,43,65,108,109,111,113,130,138). Es liegen Studien vor, die z.B. durch den Einsatz von Adenosin, inhalativen Anästhetika, selektiven Opioidrezeptorantagonisten, Radikalfängern oder durch Induktion der Hämoxigenase eine Reduktion dieser myokardialen Dysfunktion erreichten (42,43,48,108,111).

Nach Veröffentlichung von Untersuchungen, die reaktive Oxyradikale für die Entstehung von myokardialem Stunning verantwortlich machten (13,21,70,83,109,125), erlangte das antioxidativ wirkende Enzymsystem der HO größere Beachtung, dies besonders auch in Hinblick auf seine Auswirkungen auf den Reperfusionsschaden. Dazu zählen vor allem die zytoprotektive Wirkung vermittelt durch CO, Bilirubin und Ferritin (15,20,65,87,90,100,104,107). Zusätzlich wurden jedoch auch durch Bilirubin vermittelte negative Einflüsse dargestellt (41).

Untersuchungen von Sharma haben gezeigt, dass die Induktion myokardialen Stunnings durch Koronarokklusion eine vermehrte Expression der HO-1 in der Erholungsphase nach Reperfusion hervorrief (111, 112). Es wurde demonstriert dass die höchste Konzentration an HO-RNA jeweils nach zwei Zyklen einer zehnminütigen Ischämie gefolgt von einer 30 minütigen Erholungsphase erreicht wurden. Die Arbeitsgruppe um Sharma schloss daraus, dass die RNA vor allem in der Reperusionsphase exprimiert wird. Daher ist diese Phase für die Induktion der HO von größter Bedeutung. Allerdings erlaubt diese Studie keine Aussage bezüglich positiver myokardialer Effekte durch Induktion der HO in der Reperusionsphase. Dass eine vorausgegangene Induktion des HO-Systems die Schwere der kontraktile Dysfunktion nach zehnminütiger Okklusion der LAD von Hunden abmildert, konnte eine Arbeit von Weber und Mitarbeitern zeigen (130). In dieser Untersuchung wurde nachgewiesen, dass bei einwöchiger präischämischer Induktion der HO durch Applikation von Hämin ein kardioprotektiver Effekt, vermittelt durch die HO, messbar ist. Die Erholung des

Myokards nach Stunning wurde verbessert. Dies konnte anhand der hämodynamischen Parameter sowie anhand des Verhaltens der WTF beobachtet werden (130). Wie einleitend bereits erwähnt, behandelt eine Arbeit von Kukoba und Kollegen das Verhalten der myokardialen Funktion nach globaler 20 minütiger Ischämie durch vorausgegangene Induktion und Inhibition der HO. Die positiven Effekte, die durch Induktion der HO-1 erreicht wurden, waren in der Inhibitionsgruppe nicht mehr zu beobachten. Vielmehr wurde gegenüber der Kontrollgruppe eine verschlechterte myokardiale Funktion und ein größerer postischämischer Gewebeschaden beobachtet (63). Bei dieser Arbeit bleibt jedoch fraglich, ob überhaupt myokardiales Stunning erzeugt wurde oder ob nach Ischämie bereits Myokardnekrosen entstanden sind. Zudem ist die Durchführung der Untersuchung in der Langendorff-Apparatur mit den oben genannten methodologischen Problemen verbunden.

In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, welchen Einfluss die Blockade des HO-Systems auf eine einzelne koronare Okklusion von 10 Minuten ausübt. Diese Untersuchung bewegt sich auf dem Gebiet der Grundlagenforschung; eine genauere Untersuchung und Darstellung des HO-Systems in Hinblick auf den Reperfusionsschaden des Herzens nach koronarer Ischämie könnte unter anderem zur Entwicklung neuer Therapieansätze und Behandlungsverfahren für die ischämische Herzkrankheit beitragen.

4.2.1 Die Bedeutung der Inhibition des HO-Systems während myokardialen Stunnings

Myokardiales Stunning wurde in der vorliegenden Studie durch eine komplette Okklusion der LAD erzeugt. Voraussetzung für das Vorliegen myokardialen Stunnings ist definitionsgemäß die Persistenz der Dysfunktion auch nach Normalisierung des koronaren Blutflusses. Zusätzliche Bedingung ist das Fehlen irreversibler Zellschädigungen.

Bei einer derartig durchgeführten Koronarokklusion sind die Herzmuskelzellen zahlreichen schädigenden Einflüssen ausgesetzt und endogene zelluläre und

zellübergreifende Schutzmechanismen nötig, um Schäden an Zellen oder Zellbestandteilen zu verringern.

Wie oben beschrieben, ist das HO-System bereits als protektiver Mechanismus identifiziert worden. Es kann Zellen, die multiplen Stressfaktoren ausgesetzt wurden, vor physiologischem Stress schützen (45,136).

Die Ischämie zählt zu den stärksten Formen physiologischen Stresses. Ischämie beziehungsweise Hypoxie sind in Studien häufig eingesetzte Stressoren, mit deren Hilfe das Verhalten und die Wirkungsweise des Enzymsystems HO untersucht werden können. Es gibt eine Vielzahl an Untersuchungen, die zytoprotektive Auswirkungen durch Steigerung der HO-Aktivität oder Induktion des HO-Systems beschreiben (2,3,34,37,64,79,130,136). Außerdem existieren Arbeiten, die die Eigenschaften der Produkte des Hämabbaus wie CO, Bilirubin und Eisen in Hinblick auf ihre zytoprotektive Wirkung untersuchen. Es wurden ihre antiapoptotischen, antiinflammatorischen, antiproliferativen und antioxidativen Eigenschaften beobachtet, sowie ihre Rolle in zellulären Signalwegen und der Regulation der vaskulären Homöostase dargestellt (15,20,69,87,90,100,104,107). Die Wirkung der HO und ihrer Produkte kann jedoch nicht generell als protektiv gewertet werden. Die Effekte sind jeweils abhängig von der vorliegenden Störung, den physiologischen Begebenheiten und der Zielsetzung der Untersuchung.

CO und Bilirubin sind bekannte zellschädigende Noxen und haben nur unter speziellen Begebenheiten positive Effekte auf die zelluläre Homöostase. Bei Neugeborenen beispielsweise kann eine Hyperbilirubinämie zum gefährlichen Kernikterus führen. In diesem Fall kann die Blockade der HO zu einer Verbesserung der klinischen Situation führen, da hierdurch weniger Bilirubin anfällt (59). Eine Induktion hätte in diesem Fall zytotoxische Wirkung.

Die Rolle der HO-1 in der Immunmodulation wurde bereits oben erwähnt. So fanden Sass und Kollegen 2003 heraus, dass eine Upregulation der HO-1 zu einer Verringerung von immunmedierten Leberschädigungen führte. Durch HO-1-Induktion und die damit verbundene Mehrproduktion an CO konnte in Mäuselebern ein apoptotischer Leberschaden reduziert werden, der durch anti-

CD95-AK oder D-Galaktosamin in Kombination mit anti-CD3-AK, LPS oder TNF- α mediiert wird (104).

Bilirubin wiederum inhibiert die IL-1 und IL-2 Produktion, vermindert die Aktivität natürlicher Killerzellen, antikörperabhängige Zytotoxizität, sowie DNA Synthese. Dies sind Effekte, die zur Abwendung von Gewebeschäden bei Immunreaktionen erwünscht sind und einen Zellschaden vermindern können.

In einem anderen Zusammenhang könnten diese Effekte jedoch Abwehrmechanismen des Organismus schwächen und somit potentiell schädigend wirken. Während die reduzierte Produktion proinflammatorischer Zytokine positive Auswirkungen auf entzündliche Prozesse wie die Endotoxämie hat (87,101,104), bleibt die Frage, ob diese Suppression der inflammatorischen Antwort die Fähigkeit des Immunsystems, auf Pathogene adäquat zu reagieren, negativ beeinflusst. Dieser Frage wurde kürzlich durch Chung und Mitarbeiter nachgegangen. Sie untersuchten, inwieweit sich die HO-1 Aktivität auf die mikrobielle Sepsis und Abwehr gegen *E. faecalis* und *E. coli* auswirkt. Sie begünstigte das mikrobielle Wachstum nicht, sondern steigerte vielmehr CO-vermittelt die Phagozytose von Mikroorganismen (19).

Obwohl die Effekte der HO mit einer antiapoptotischen Wirkung vergesellschaftet wird, führt ihre Aktivität im Falle einer Hyperbilirubinämie bekannterweise zur Apoptose von sich entwickelnden Nervenzellen (41). Es handelt sich hierbei jedoch um die Auswirkungen sehr hoher Bilirubinkonzentrationen, die die oben erwähnten gewebeschädigende Einflüsse besitzen.

In gleicher Weise verhält sich CO als Produkt der HO. Es ist bekannt für seine zytotoxische Wirkung in hoher Konzentration (123). Auch Eisen gilt als prooxidativ (30). Studien zeigten, dass durch Induktion der HO und durch die damit verbundene Eisenspeicherung im Gewebe Endothelzellen geschädigt werden können. Bei der Induktion der HO treten somit nicht nur antioxidative Effekte auf (102).

Auf der anderen Seite wird durch die Aktivierung der HO-1 und die vermehrte Bildung von Eisen das Enzym Ferritin induziert, das wiederum antioxidative Eigenschaften entfaltet (131).

Für die Untersuchung der Auswirkungen auf einen Organismus im Falle des kompletten Fehlens des Enzymsystems der HO-1 eignet sich besonders der Einsatz von HO-1-knockout-Mäusen. Porterfield und Mitarbeiter konnten zeigen, dass ein Vorhandensein der HO-1 unverzichtbar für das Überleben des Organismus ist. Diese Tatsache ist vor allem durch den fehlenden Schutz vor oxidativem Stress bedingt (95). Betroffene Mäuse zeigen eine verminderte Geburtenrate, vermindertes Wachstum, eine mikrozytäre hypochrome Anämie, Ablagerungen von Eisen im Gewebe sowie Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie, Leukozytose und Glomerulonephritis (34).

Von Yachie ist der Fall eines HO-1 defizienten sechsjährigen Jungen publiziert worden. Die Auswirkungen auf den menschlichen Organismus zeigten große Übereinstimmungen zu den schon bei den Mäusen beobachteten Symptomen. Der Junge litt unter gehemmttem Wachstum, Anämie, Eisenspeicherung im Gewebe und einer Leukozytose. Zudem wurde eine persistierende Proteinurie und Hämaturie beobachtet und eine Hyperlipidämie und Hypobilirubinämie festgestellt. Es traten Blutgerinnungsstörungen auf. In Nierenbiopsien zeigten sich Proliferation von Mesangiumzellen, lymphozytäre Infiltrationen und die Ablösung des glomerulären Kapillarendothels (134). Der Junge starb im Alter von 6 Jahren an einer intrakraniellen Blutung (60).

Dieser Fall zeigt die fundamentale Bedeutung der HO-1 für das Überleben eines Organismus und den Schutz vor oxidativem Stress. Aus oben genannten Gründen war durch Inhibition der HO in der vorliegenden Arbeit ein eher negativer Einfluss auf myokardiales Stunning zu erwarten.

4.2.2 Versuchsergebnisse

Die ausgewerteten Messwerte haben eindeutig gezeigt, dass zwischen den Versuchsgruppen bei keinem der Parameter ein signifikanter Unterschied in der Reaktion auf myokardiales Stunning sowie in der Erholung des Myokards vom myokardialen Stunning zu beobachten war.

Zu keiner Zeit bestanden signifikante Unterschiede zwischen dem Outcome der Kontrollgruppe und dem der Gruppe, in der die HO-1 durch Sn-Mesoporphyrin

inhibiert wurde. Es konnte kein kardioprotektiver Vorteil der Hämoxigenaseaktivität unter Ausgangsbedingungen gegenüber der inhibierten HO nachgewiesen werden. Die hämodynamischen Parameter, das Verhalten der regionalen Wanddickenveränderung sowie die Veränderungen des regionalen myokardialen Blutflusses gaben keinen Hinweis auf Kardioprotektion in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Interventionsgruppe.

Wie bereits oben erläutert, übernimmt die HO-2 unter Ruhebedingungen den Großteil der enzymatischen Aktivität des HO-Systems. Die HO-1 kann jedoch ihre Aktivität bei Auftreten von oxidativem Stress um ein vielfaches steigern und damit zur Zellprotektion beitragen (3,5,124,128).

Durch Blockade der HO-1 und 2 durch Sn-Mesoporphyrin-Gabe wird die Enzymaktivität vermindert, beziehungsweise die Induktion des Enzyms inhibiert. Es wäre folglich mit einer Reduktion zytoprotektiver Kompensationsmechanismen und somit mit einer schlechteren Erholung vom myokardialen Stunning zu rechnen, wie es auch von Kukoba beobachtet wurde (63).

Die gewonnenen Daten zeigen eindeutig, dass die akute Hemmung der HO mit Sn-Mesoporphyrin in der von uns verwendeten Dosierung keinen Einfluss auf myokardiales Stunning in dem von uns gewählten Modell hat. Ob eine höhere Dosierung zu einem anderen Versuchsergebnis führen würde, ist fraglich. Die von uns eingesetzte Dosierung von 5µmol/kg KG ist weitaus höher als die in Versuchen zu Sn-Mesoporphyrin verwendete Dosierung von 1µmol/kg KG (6, 29). Eine mögliche Schlussfolgerung aus diesem Ergebnis ist, dass der Einfluss der HO ohne vorherige Induktion der Enzymaktivität auf myokardiales Stunning geringer ist als erwartet. Es ist jedoch auch möglich, dass die Induktion der HO-1 durch den von uns verwendeten Reiz einer zehnminütigen Koronarokklusion nicht ausreichend hoch war, um einen signifikant messbaren Unterschied in der Erholung des Myokards zu beobachten.

Zum anderen könnte dem Faktor Zeit in diesem Zusammenhang eine große Bedeutung zukommen. Geschieht die Enzyminduktion der HO-1 nicht schnell genug, um einen protektiven Einfluss auf ein Akutereignis wie eine einmalige koronare Okklusion zu haben, können sich die positiven Einflüsse der HO-1 erst

längerfristig auswirken und wären dann in dem von uns gewählten Beobachtungszeitraum und Modellaufbau nicht zu erkennen. Jedoch wurde in einer Arbeit von Ewing und Maines 1991 bereits eine Stunde nach Hyperthermiebehandlung einen 33-fachen Anstieg der HO-1 Aktivität beobachtet (33). Es wäre jedoch möglich, dass dieser Zeitraum im Falle myokardialen Stunnings bereits zu lang ist.

Eine zentrale Rolle kommt zusätzlich der von uns verwendete Stimulus für die Enzyminduktion zu:

Das durch Okklusion der LAD induzierte myokardiale Stunning wurde gewählt, um Vergleichbarkeit zu bisherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe herzustellen (130). Die Reduktion des Blutflusses oder die Dauer der Ischämie war unter Umständen nicht ausreichend, um die HO-1 in dem Maße zu induzieren, dass ein relevanter Unterschied zwischen beiden Versuchsgruppen zu beobachten gewesen wäre. An dieser Stelle ist anzumerken, dass zur weiteren Diskussion des oben behandelten Problems eine Bestimmung der Enzymaktivität von HO-1 und HO-2 über den Versuchsverlauf nötig wäre, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt wurde.

Kukoba und Mitarbeiter beobachteten die postischämische Dysfunktion des Myokards in der Langendorff-Apparatur nach 20 minütiger globaler Ischämie (63). Die Ischämiezeit von 20 Minuten befindet sich wie einleitend behandelt an der zeitlichen Grenze von der an eine irreversible Dysfunktion mit Myokardnekrosen induziert werden kann. Verbunden mit der Explantation des Herzens, der künstlichen Perfusion und anschließender globaler Ischämie kann aufgrund oben genannter Vergleiche verschiedener Versuchsmodelle mit einem weitaus höheren Auftreten von oxidativem Stress gerechnet werden als in dem von uns verwendeten Modellaufbau.

Die Aktivität der HO sowie die Enzyminduktion waren in der vorliegenden Arbeit anscheinend nicht ausreichend, um eine bessere Erholung des Myokards in der Kontrollgruppe gegenüber der Verumgruppe zu beobachten. Unter Umständen waren auch die von uns eingesetzten Indikatoren nicht sensitiv genug, um einen Effekt nachzuweisen. Um eine Komplettierung der Versuchsergebnisse

zu erhalten, wäre eine Bestimmung der Enzymaktivität der HO über den Versuchsverlauf notwendig, was zukünftigen Versuchen vorbehalten sein wird. Über die längerfristigen Auswirkungen der HO-Inhibition können in dieser Untersuchung daher keine Aussagen getroffen werden, da dafür der Beobachtungszeitraum nicht ausreicht.

Es steht außer Frage, dass es sich beim HO-System um einen endogenen Schutzmechanismus vor oxidativem Stress und anderen Noxen handelt. Dies haben zahlreiche Untersuchungen belegt (u.a. 95,131,134). Dieser Mechanismus kommt womöglich, wie sich anhand dieser Arbeit vermuten lässt, erst bei länger einwirkenden oder stärkeren Stimuli oder nach vorheriger, langfristiger Induktion der HO-1 zum Tragen. Anhand der oben angeführten Ergebnisse könnte man die Upregulation des Isoenzym HO-1 somit eher als Anpassung des Organismus an einen längerfristig einwirkenden, starken Stimulus sehen. Hiefür sind jedoch weitere Untersuchungen nötig, die auch die Entwicklung der Enzymaktivität der HO über einen längeren Zeitraum miteinbeziehen.

4.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Bisherige Untersuchungen zum Verhalten der HO auch im Hinblick auf myokardiales Stunning wurden hauptsächlich nach vorheriger Induktion des induzierbaren Isoenzym HO-1 durchgeführt. Dabei wurde zweifelsfrei ein zyto- sowie kardioprotektiver Effekt nachgewiesen. Hieraus ließe sich die Schlussfolgerung ableiten, dass die HO, z.B. im Falle einer akuten Myokardischämie, eine wichtige Aufgabe zum Schutz des Organismus übernimmt. Die Datenlage hingegen für Arbeiten, die die Hemmung der HO unter Stunning behandeln ist bisher schlecht. Die Frage, ob die Induktion des Enzyms HO-1 schnell genug abläuft und ob die Aktivität des Enzyms ausreicht, um einen messbaren kardioprotektiven Effekt zu beobachten, ist bisher unbeantwortet.

Ziel dieser Arbeit war, die Wirkungsweise des Enzymsystems unter möglichst physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Es sollte das Bild der Funktion des HO-Systems erweitert und die Reaktion auf ein Akutereignis wie eine zehnminütige koronare Okklusion unter physiologischen Bedingungen beleuchtet werden. Dadurch wird der Blick in eine bisher noch wenig untersuchte Richtung gelenkt.

Die akute Hemmung der HO durch Sn-Mesoporphyrin in der von uns verwendeten Dosierung hat keine Auswirkungen auf myokardiales Stunning im chronisch instrumentierten wachen Hund gezeigt. Für die Frage, ob in der Kontrollgruppe eine signifikant höhere Enzymaktivität der HO vorlag und zu welchem Versuchszeitpunkt die Enzyminduktion stattfand, sind Konzentrationsbestimmungen der HO und ihrer Enzymaktivität zu festgelegten Zeitpunkten während des Versuchsablaufes notwendig. Diese Erweiterung des von uns eingesetzten Modells könnte weitere Erkenntnisse über die Bedeutung der HO für eine akute Myokardischämie liefern.

Aussagen über die Wirkung des Enzymsystems HO bei Akutereignissen wie einem Herzinfarkt ohne längere vorherige Angina pectoris Symptomatik oder bei einem akuten Koronarspasmus können bisher noch nicht getroffen werden.

Es handelt sich bei dem HO-System wahrscheinlich um einen protektiven Anpassungsmechanismus, der vor allem vor länger einwirkenden, chronischen Noxen schützen soll. Für akute Ischämien ohne vorausgegangene Präkonditionierung spielt die HO-1 vermutlich eine untergeordnetere Rolle. Die Wirkung des Enzymsystems HO auf Akutereignisse wie den Herzinfarkt ohne längere vorherige Angina pectoris-Symptomatik oder einen akuten Koronarspasmus können bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden. Außer Frage steht jedoch, dass bei absehbaren ischämischen Ereignissen (z.B. vor Koronarangiographie oder koronarchirurgischen Eingriffen) eine vorausgehende Induktion der HO-1 positive Auswirkungen haben kann. Dies würde eine Möglichkeit darstellen, um den zellprotektiven Effekt der HO klinisch zu nutzen. Eine pharmakologische Präkonditionierung vor geplanten Eingriffen, wie zum Beispiel vor Organtransplantationen wäre denkbar. So wurde 2006 von McNally und Mitarbeitern nachgewiesen, dass durch Induktion der Hämoxigenase-1 mit Curcumin, einem möglicherweise klinisch einsetzbaren pharmakologischen Induktor der Hämoxigenase, Hepatozyten vor oxidativen Schäden geschützt werden konnten (79). Eine Curcumin-Vorbehandlung vor Lebertransplantationen kann beispielsweise genutzt werden, um die Kaltischämiezeit des Transplantates zu verlängern. Die genauen Mechanismen der Gewebeprotektion durch HO-1 sind bisher nur unvollständig geklärt. Es hat sich jedoch gezeigt, dass sie durch ihre Produkte in Reaktionskaskaden eingreift, die auf intrazelluläre Signalwege wirken (100).

In den letzten Jahren ist der pharmakologische Einsatz von Hämometaboliten in vielen Modellen zur Zytoprotektion aus den oben genannten Gründen vermehrt untersucht worden. Die protektiven Eigenschaften der HO können auch durch direkte Applikation der HO-Produkte, wie CO oder Bilirubin simuliert oder durch Stimulation ihrer HO-unabhängigen Bildung genutzt werden. Prodrugs, die zum Beispiel die Freisetzung von CO erhöhen, könnten eine viel versprechende Alternative zum inhalativen Einsatz von CO darstellen. Jedoch sind hierfür zunächst Studien zur Pharmakokinetik und Dosisfindung nötig, bevor ein therapeutischer Einsatz denkbar wäre.

Aufgrund ihrer breiten Wirkungsweise und ihrer Fähigkeit, auf unterschiedlichste Stimuli mit Steigerung ihrer Expression und Aktivität zu reagieren, wird die HO-1 auch in Zukunft in der klinischen Forschung und vielleicht auch in der späteren klinischen Anwendung interessante Möglichkeiten bieten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Hämmetaboliten sowie Induktoren der HO für eine Vielzahl an Erkrankungen, die mit Apoptose, Entzündung, oxidativem Stress oder Gewebeproliferation einhergehen, zukünftig interessante therapeutische Möglichkeiten bieten könnten .

Literaturverzeichnis

- (1) Abraham, N.G. & Kappas, A. 2005, "Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system", *Free radical biology & medicine*, vol. 39, no. 1, pp. 1-25.
- (2) Abraham, N.G., Rezzani, R., Rodella, L., Kruger, A., Taller, D., Li Volti, G., Goodman, A.I. & Kappas, A. 2004, "Overexpression of human heme oxygenase-1 attenuates endothelial cell sloughing in experimental diabetes", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 287, no. 6, pp. H2468-77.
- (3) Abraham, N.G., Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L., Stoltz, R.A., Levere, R.D., Gerritsen, M.E., Shibahara, S. & Kappas, A. 1995, "Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, no. 15, pp. 6798-6802.
- (4) Abraham, N.G., Pinto, A., Levere, R.D. & Mullane, K. 1987, "Identification of heme oxygenase and cytochrome P-450 in the rabbit heart", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 19, no. 1, pp. 73-81.
- (5) Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W. & Vercellotti, G.M. 1992, "Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium", *The Journal of biological chemistry*, vol. 267, no. 25, pp. 18148-18153.
- (6) Berglund, L., Angelin, B., Hultcrantz, R., Einarsson, K., Emtestam, L., Drummond, G. & Kappas, A. 1990, "Studies with the haeme oxygenase inhibitor Sn-protoporphyrin in patients with primary biliary cirrhosis and idiopathic haemochromatosis", *Gut*, vol. 31, no. 8, pp. 899-904.
- (7) Bolli, R. & Marban, E. 1999, "Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning", *Physiological Reviews*, vol. 79, no. 2, pp. 609-634.
- (8) Bolli, R. 1995, "Common methodological problems and artifacts associated with studies of myocardial stunning in vivo", *Basic research in cardiology*, vol. 90, no. 4, pp. 257-262.

- (9)Bolli, R. 1992, "Myocardial 'stunning' in man", *Circulation*, vol. 86, no. 6, pp. 1671-1691.
- (10)Bolli, R. 1991, "Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: an overview", *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, vol. 5 Suppl 2, pp. 249-268.
- (11)Bolli, R., Hartley, C.J. & Rabinovitz, R.S. 1991, "Clinical relevance of myocardial "stunning"", *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*, vol. 5, no. 5, pp. 877-890.
- (12)Bolli, R. 1990, "Mechanism of myocardial "stunning"", *Circulation*, vol. 82, no. 3, pp. 723-738.
- (13)Bolli, R., Patel, B.S., Jeroudi, M.O., Lai, E.K. & McCay, P.B. 1988, "Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron", *The Journal of clinical investigation*, vol. 82, no. 2, pp. 476-485.
- (14)Braunwald, E. & Kloner, R.A. 1982, "The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction", *Circulation*, vol. 66, no. 6, pp. 1146-1149.
- (15)Brouard, S., Otterbein, L.E., Anrather, J., Tobiasch, E., Bach, F.H., Choi, A.M. & Soares, M.P. 2000, "Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis", *The Journal of experimental medicine*, vol. 192, no. 7, pp. 1015-1026.
- (16)Bush, K.T., Goldberg, A.L. & Nigam, S.K. 1997, "Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 14, pp. 9086-9092.
- (17)Carrozza, J.P., Jr, Bentivegna, L.A., Williams, C.P., Kuntz, R.E., Grossman, W. & Morgan, J.P. 1992, "Decreased myofilament responsiveness in myocardial stunning follows transient calcium overload during ischemia and reperfusion", *Circulation research*, vol. 71, no. 6, pp. 1334-1340.
- (18)Chirac P. 1698, *De Motu Cordis*.

- (19) Chung, S.W., Liu, X., Macias, A.A., Baron, R.M. & Perrella, M.A. 2008, "Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice", *The Journal of clinical investigation*, vol. 118, no. 1, pp. 239-247.
- (20) Clark, J.E., Foresti, R., Sarathchandra, P., Kaur, H., Green, C.J. & Motterlini, R. 2000, "Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 278, no. 2, pp. H643-51.
- (21) Coetzee, W.A. & Opie, L.H. 1992, "Effects of oxygen free radicals on isolated cardiac myocytes from guinea-pig ventricle: electrophysiological studies", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 24, no. 6, pp. 651-663.
- (22) Cohen, M.V. & Downey, J.M. 1990, "Myocardial stunning in dogs: preconditioning effect and influence of coronary collateral flow", *American Heart Journal*, vol. 120, no. 2, pp. 282-291.
- (23) Consigny, P.M., Verrier, E.D., Payne, B.D., Edelist, G., Jester, J., Baer, R.W., Vlahakes, G.J. & Hoffman, J.I. 1982, "Acute and chronic microsphere loss from canine left ventricular myocardium", *The American Journal of Physiology*, vol. 242, no. 3, pp. H392-404.
- (24) Davies, K.J. 1987, "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects", *The Journal of biological chemistry*, vol. 262, no. 20, pp. 9895-9901.
- (25) De Maio, A. 1999, "Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams", *Shock (Augusta, Ga.)*, vol. 11, no. 1, pp. 1-12.
- (26) Deramaudt, B.M., Braunstein, S., Remy, P. & Abraham, N.G. 1998, "Gene transfer of human heme oxygenase into coronary endothelial cells potentially promotes angiogenesis", *Journal of cellular biochemistry*, vol. 68, no. 1, pp. 121-127.
- (27) Diamond, G.A., Forrester, J.S., deLuz, P.L., Wyatt, H.L. & Swan, H.J. 1978, "Post-extrasystolic potentiation of ischemic myocardium by atrial stimulation", *American Heart Journal*, vol. 95, no. 2, pp. 204-209.

- (28) Domenech, R.J., Hoffman, J.I., Noble, M.I., Saunders, K.B., Henson, J.R. & Subijanto, S. 1969, "Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microspheres in conscious and anesthetized dogs", *Circulation research*, vol. 25, no. 5, pp. 581-596.
- (29) Drummond, G.S., Galbraith, R.A., Sardana, M.K. & Kappas, A. 1987, "Reduction of the C2 and C4 vinyl groups of Sn-protoporphyrin to form Sn-mesoporphyrin markedly enhances the ability of the metalloporphyrin to inhibit in vivo heme catabolism", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 255, no. 1, pp. 64-74.
- (30) Eisenstein, R.S. 2000, "Iron regulatory proteins and the molecular control of mammalian iron metabolism", *Annual Review of Nutrition*, vol. 20, pp. 627-662.
- (31) Eisenstein, R.S., Garcia-Mayol, D., Pettingell, W. & Munro, H.N. 1991, "Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 3, pp. 688-692.
- (32) Ellis, R.J. & Hemmingsen, S.M. 1989, "Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures", *Trends in biochemical sciences*, vol. 14, no. 8, pp. 339-342.
- (33) Ewing, J.F. & Maines, M.D. 1991, "Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 88, no. 12, pp. 5364-5368.
- (34) Farombi, E.O. & Surh, Y.J. 2006, "Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection", *Journal of biochemistry and molecular biology*, vol. 39, no. 5, pp. 479-491.
- (35) Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL 1998, "Harrison's Principles of Internal Medicine" in , 14th edition edn, McGraw-Hill, .
- (36) Feder, M.E. & Hofmann, G.E. 1999, "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology", *Annual Review of Physiology*, vol. 61, pp. 243-282.

- (37) Foresti, R., Goatly, H., Green, C.J. & Motterlini, R. 2001, "Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 281, no. 5, pp. H1976-84.
- (38) Gao, W.D., Atar, D., Backx, P.H. & Marban, E. 1995, "Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle", *Circulation research*, vol. 76, no. 6, pp. 1036-1048.
- (39) Garthwaite, J., Charles, S.L. & Chess-Williams, R. 1988, "Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain", *Nature*, vol. 336, no. 6197, pp. 385-388.
- (40) Grinwald, P.M. 1982, "Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: influence of extracellular sodium", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 14, no. 6, pp. 359-365.
- (41) Grojean, S., Koziel, V., Vert, P. & Daval, J.L. 2000, "Bilirubin induces apoptosis via activation of NMDA receptors in developing rat brain neurons", *Experimental neurology*, vol. 166, no. 2, pp. 334-341.
- (42) Gross, G.J., Farber, N.E., Hardman, H.F. & Wartier, D.C. 1986, "Beneficial actions of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium of dogs", *The American Journal of Physiology*, vol. 250, no. 3 Pt 2, pp. H372-7.
- (43) Grosse Hartlage, M.A., Theisen, M.M., Monteiro de Oliveira, N.P., Van Aken, H., Fobker, M. & Weber, T.P. 2006, "Kappa-opioid receptor antagonism improves recovery from myocardial stunning in chronically instrumented dogs", *Anesthesia and Analgesia*, vol. 103, no. 4, pp. 822-832.
- (44) Grunenfelder, J., Zund, G., Stucki, V., Hoerstrup, S.P., Kadner, A., Schoeberlein, A. & Turina, M. 2001, "Heat shock protein upregulation lowers cytokine levels after ischemia and reperfusion", *European surgical research. Europaische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes*, vol. 33, no. 5-6, pp. 383-387.

- (45) Guo, Y., Stein, A.B., Wu, W.J., Tan, W., Zhu, X., Li, Q.H., Dawn, B., Motterlini, R. & Bolli, R. 2004, "Administration of a CO-releasing molecule at the time of reperfusion reduces infarct size in vivo", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 286, no. 5, pp. H1649-53.
- (46) Hakkinen, J.P., Miller, M.W., Smith, A.H. & Knight, D.R. 1995, "Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat", *Cardiovascular research*, vol. 29, no. 1, pp. 74-79.
- (47) Hartl, F.U. 1996, "Molecular chaperones in cellular protein folding", *Nature*, vol. 381, no. 6583, pp. 571-579.
- (48) Hartlage, M.A., Berendes, E., Van Aken, H., Fobker, M., Theisen, M. & Weber, T.P. 2004, "Xenon improves recovery from myocardial stunning in chronically instrumented dogs", *Anesthesia and Analgesia*, vol. 99, no. 3, pp. 655-64, table of contents.
- (49) Hartley, C.J., Latson, L.A., Michael, L.H., Seidel, C.L., Lewis, R.M. & Entman, M.L. 1983, "Doppler measurement of myocardial thickening with a single epicardial transducer", *The American Journal of Physiology*, vol. 245, no. 6, pp. H1066-72.
- (50) Hartley, C.J., Hanley, H.G., Lewis, R.M. & Cole, J.S. 1978, "Synchronized pulsed Doppler blood flow and ultrasonic dimension measurement in conscious dogs", *Ultrasound in medicine & biology*, vol. 4, no. 2, pp. 99-110.
- (51) Herrick, J.B. 1983, "Landmark article (JAMA 1912). Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. By James B. Herrick", *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 250, no. 13, pp. 1757-1765.
- (52) Heyndrickx, G.R., Millard, R.W., McRitchie, R.J., Maroko, P.R. & Vatner, S.F. 1975, "Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs", *The Journal of clinical investigation*, vol. 56, no. 4, pp. 978-985.
- (53) Hightower, L.E. 1991, "Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity", *Cell*, vol. 66, no. 2, pp. 191-197.

- (54) Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences 1996, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. National Academy Press, Washington D.C.
- (55) Ishizaka, N., Aizawa, T., Mori, I., Taguchi, J., Yazaki, Y., Nagai, R. & Ohno, M. 2000, "Heme oxygenase-1 is upregulated in the rat heart in response to chronic administration of angiotensin II", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 279, no. 2, pp. H672-8.
- (56) Jennings, R.B. & Reimer, K.A. 1983, "Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood", *Circulation*, vol. 68, no. 2 Pt 2, pp. I25-36.
- (57) Kacimi, R., Chentoufi, J., Honbo, N., Long, C.S. & Karliner, J.S. 2000, "Hypoxia differentially regulates stress proteins in cultured cardiomyocytes: role of the p38 stress-activated kinase signaling cascade, and relation to cytoprotection", *Cardiovascular research*, vol. 46, no. 1, pp. 139-150.
- (58) Kaneko, M., Elimban, V. & Dhalla, N.S. 1989, "Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca²⁺ pump by oxygen free radicals", *The American Journal of Physiology*, vol. 257, no. 3 Pt 2, pp. H804-11.
- (59) Kappas, A. 2004, "A method for interdicting the development of severe jaundice in newborns by inhibiting the production of bilirubin", *Pediatrics*, vol. 113, no. 1 Pt 1, pp. 119-123.
- (60) Kawashima, A., Oda, Y., Yachie, A., Koizumi, S. & Nakanishi, I. 2002, "Heme oxygenase-1 deficiency: the first autopsy case", *Human pathology*, vol. 33, no. 1, pp. 125-130.
- (61) Kevelaitis, E., Patel, A.P., Oubenaissa, A., Peynet, J., Mouas, C., Yellon, D.M. & Menasche, P. 2001, "Backtable heat-enhanced preconditioning: a simple and effective means of improving function of heart transplants", *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 72, no. 1, pp. 107-12; discussion 112-3.
- (62) Krause, S.M., Jacobus, W.E. & Becker, L.C. 1989, "Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium", *Circulation research*, vol. 65, no. 2, pp. 526-530.

- (63)Kukoba, T.V., Kotsiuruba, A.V. & Moibenko, O.O. 2006, "Effect of heme oxygenase-1 expression and activity on the heart function in ischemia-reperfusion", *Fiziologichnyi zhurnal (Kiev, Ukraine : 1994)*, vol. 52, no. 1, pp. 41-48.
- (64)Kushida, T., LiVolti, G., Goodman, A.I. & Abraham, N.G. 2002, "TNF-alpha-mediated cell death is attenuated by retrovirus delivery of human heme oxygenase-1 gene into human microvessel endothelial cells", *Transplantation proceedings*, vol. 34, no. 7, pp. 2973-2978.
- (65)Kusuoka, H., Porterfield, J.K., Weisman, H.F., Weisfeldt, M.L. & Marban, E. 1987, "Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca²⁺ activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts", *The Journal of clinical investigation*, vol. 79, no. 3, pp. 950-961.
- (66)Laszlo, A. 1992, "The thermoresistant state: protection from initial damage or better repair?", *Experimental cell research*, vol. 202, no. 2, pp. 519-531.
- (67)Lavrovsky, Y., Schwartzman, M.L., Levere, R.D., Kappas, A. & Abraham, N.G. 1994, "Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 13, pp. 5987-5991.
- (68)Lefer, D.J. & Granger, D.N. 2000, "Oxidative stress and cardiac disease", *The American Journal of Medicine*, vol. 109, no. 4, pp. 315-323.
- (69)Leffler, C.W., Nasjletti, A., Yu, C., Johnson, R.A., Fedinec, A.L. & Walker, N. 1999, "Carbon monoxide and cerebral microvascular tone in newborn pigs", *The American Journal of Physiology*, vol. 276, no. 5 Pt 2, pp. H1641-6.
- (70)Li, X.Y., McCay, P.B., Zughaib, M., Jeroudi, M.O., Triana, J.F. & Bolli, R. 1993, "Demonstration of free radical generation in the "stunned" myocardium in the conscious dog and identification of major differences between conscious and open-chest dogs", *The Journal of clinical investigation*, vol. 92, no. 2, pp. 1025-1041.

- (71) Lin, J.H., Villalón, P., Martasek, P. & Abraham, N.G. 1990, "Regulation of heme oxygenase gene expression by cobalt in rat liver and kidney", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 192, no. 3, pp. 577-582.
- (72) Lindquist, S. & Craig, E.A. 1988, "The heat-shock proteins", *Annual Review of Genetics*, vol. 22, pp. 631-677.
- (73) Liu, X., Engelman, R.M., Moraru, I.I., Rousou, J.A., Flack, J.E., 3rd, Deaton, D.W., Maulik, N. & Das, D.K. 1992, "Heat shock. A new approach for myocardial preservation in cardiac surgery", *Circulation*, vol. 86, no. 5 Suppl, pp. II358-63.
- (74) Lu, T.H., Shan, Y., Pepe, J., Lambrecht, R.W. & Bonkovsky, H.L. 2000, "Upstream regulatory elements in chick heme oxygenase-1 promoter: a study in primary cultures of chick embryo liver cells", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 209, no. 1-2, pp. 17-27.
- (75) MacFarlane, N.G. & Miller, D.J. 1992, "Depression of peak force without altering calcium sensitivity by the superoxide anion in chemically skinned cardiac muscle of rat", *Circulation research*, vol. 70, no. 6, pp. 1217-1224.
- (76) Marber, M.S., Latchman, D.S., Walker, J.M. & Yellon, D.M. 1993, "Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction", *Circulation*, vol. 88, no. 3, pp. 1264-1272.
- (77) McCoubrey, W.K., Jr, Huang, T.J. & Maines, M.D. 1997, "Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3", *European journal of biochemistry / FEBS*, vol. 247, no. 2, pp. 725-732.
- (78) McCoubrey, W.K., Jr, Ewing, J.F. & Maines, M.D. 1992, "Human heme oxygenase-2: characterization and expression of a full-length cDNA and evidence suggesting that the two HO-2 transcripts may differ by choice of polyadenylation signal", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 295, no. 1, pp. 13-20.
- (79) McNally, S.J., Harrison, E.M., Ross, J.A., Garden, O.J. & Wigmore, S.J. 2006, "Curcumin induces heme oxygenase-1 in hepatocytes and is protective in simulated cold preservation and warm reperfusion injury", *Transplantation*, vol. 81, no. 4, pp. 623-626.

- (80) Mizutani, S., Al-Dadah, A.S., Bloch, J.B., Prasad, S.M., Diodato, M.D., Schuessler, R.B., Damiano, R.J., Jr & Lawton, J.S. 2006, "Hyperkalemic cardioplegia-induced myocyte swelling and contractile dysfunction: prevention by diazoxide", *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 81, no. 1, pp. 154-159.
- (81) Mizutani, S., Al-Dadah, A.S., Bloch, J.B., Prasad, S.M., Diodato, M.D., Schuessler, R.B., Damiano, R.J., Jr & Lawton, J.S. 2006, "Hyperkalemic cardioplegia-induced myocyte swelling and contractile dysfunction: prevention by diazoxide", *The Annals of Thoracic Surgery*, vol. 81, no. 1, pp. 154-159.
- (82) Morioka, I., Wong, R.J., Abate, A., Vreman, H.J., Contag, C.H. & Stevenson, D.K. 2006, "Systemic effects of orally-administered zinc and tin (IV) metalloporphyrins on heme oxygenase expression in mice", *Pediatric research*, vol. 59, no. 5, pp. 667-672.
- (83) Motterlini, R., Foresti, R., Bassi, R., Calabrese, V., Clark, J.E. & Green, C.J. 2000, "Endothelial heme oxygenase-1 induction by hypoxia. Modulation by inducible nitric-oxide synthase and S-nitrosothiols", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 18, pp. 13613-13620.
- (84) Myers, M.L., Bolli, R., Lekich, R.F., Hartley, C.J. & Roberts, R. 1985, "Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia", *Circulation*, vol. 72, no. 4, pp. 915-921.
- (85) Naredi, P., Mattsson, J. & Hafstrom, L. 1991, "Aggregation of microspheres in blood flow measurements", *International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation*, vol. 10, no. 2, pp. 169-180.
- (86) Neely, J.R. & Grotyohann, L.W. 1984, "Role of glycolytic products in damage to ischemic myocardium. Dissociation of adenosine triphosphate levels and recovery of function of reperfused ischemic hearts", *Circulation research*, vol. 55, no. 6, pp. 816-824.
- (87) Nicklas, J.M., Becker, L.C. & Bulkley, B.H. 1985, "Effects of repeated brief coronary occlusion on regional left ventricular function and dimension in dogs", *The American Journal of Cardiology*, vol. 56, no. 7, pp. 473-478.

- (88) Otterbein, L.E., Bach, F.H., Alam, J., Soares, M., Tao Lu, H., Wysk, M., Davis, R.J., Flavell, R.A. & Choi, A.M. 2000, "Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway", *Nature medicine*, vol. 6, no. 4, pp. 422-428.
- (89) Otterbein, L.E. & Choi, A.M. 2000, "Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress", *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, vol. 279, no. 6, pp. L1029-37.
- (90) Pagliaro, P., Gattullo, D., Rastaldo, R. & Losano, G. 2001, "Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection", *Life Sciences*, vol. 69, no. 1, pp. 1-15.
- (91) Pannen, B.H., Kohler, N., Hole, B., Bauer, M., Clemens, M.G. & Geiger, K.K. 1998, "Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory dysfunction after hemorrhagic shock in rats", *The Journal of clinical investigation*, vol. 102, no. 6, pp. 1220-1228.
- (92) Patriarca, E.J., Kobayashi, G.S. & Maresca, B. 1992, "Mitochondrial activity and heat-shock response during morphogenesis in the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*", *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, vol. 70, no. 3-4, pp. 207-214.
- (93) Patriarca, E.J. & Maresca, B. 1990, "Acquired thermotolerance following heat shock protein synthesis prevents impairment of mitochondrial ATPase activity at elevated temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*", *Experimental cell research*, vol. 190, no. 1, pp. 57-64.
- (94) Pelham, H.R. 1986, "Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins", *Cell*, vol. 46, no. 7, pp. 959-961.
- (95) Porterfield JK, Kusuoka H, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E 1987, "Ryanodine prevents the changes in myocardial function and morphology induced by reperfusion after brief periods of ischemia", *Circ Res*, vol. 35, no. 315A.
- (96) Poss, K.D. & Tonegawa, S. 1997, "Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 20, pp. 10925-10930.

- (97)Preuss, K.C., Gross, G.J., Brooks, H.L. & Wartier, D.C. 1987, "Time course of recovery of "stunned" myocardium following variable periods of ischemia in conscious and anesthetized dogs", *American Heart Journal*, vol. 114, no. 4 Pt 1, pp. 696-703.
- (98)Rahimtoola, S.H. 1989, "The hibernating myocardium", *American Heart Journal*, vol. 117, no. 1, pp. 211-221.
- (99)Ritossa F. 1962, "A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*", *Experientia*, vol. 18, pp. 571-575.
- (100)Rudolph, A.M. & Heymann, M.A. 1967, "The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow", *Circulation research*, vol. 21, no. 2, pp. 163-184.
- (101)Ryter, S.W., Morse, D. & Choi, A.M. 2007, "Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease", *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 36, no. 2, pp. 175-182.
- (102)Ryter, S.W., Alam, J. & Choi, A.M. 2006, "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications", *Physiological Reviews*, vol. 86, no. 2, pp. 583-650.
- (103)Ryter, S.W. & Tyrrell, R.M. 2000, "The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties", *Free radical biology & medicine*, vol. 28, no. 2, pp. 289-309.
- (104)Santoro, M.G. 2000, "Heat shock factors and the control of the stress response", *Biochemical pharmacology*, vol. 59, no. 1, pp. 55-63.
- (105)Sass, G., Soares, M.C., Yamashita, K., Seyfried, S., Zimmermann, W.H., Eschenhagen, T., Kaczmarek, E., Ritter, T., Volk, H.D. & Tiegs, G. 2003, "Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice", *Hepatology (Baltimore, Md.)*, vol. 38, no. 4, pp. 909-918.

- (106) Schroeder, S., Bischoff, J., Lehmann, L.E., Hering, R., von Spiegel, T., Putensen, C., Hoeft, A. & Stuber, F. 1999, "Endotoxin inhibits heat shock protein 70 (HSP70) expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with severe sepsis", *Intensive care medicine*, vol. 25, no. 1, pp. 52-57.
- (107) Schroeder, S., Lindemann, C., Hoeft, A., Putensen, C., Decker, D., von Ruecker, A.A. & Stuber, F. 1999, "Impaired inducibility of heat shock protein 70 in peripheral blood lymphocytes of patients with severe sepsis", *Critical care medicine*, vol. 27, no. 6, pp. 1080-1084.
- (108) Sedlak, T.W. & Snyder, S.H. 2004, "Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle", *Pediatrics*, vol. 113, no. 6, pp. 1776-1782.
- (109) Sekili, S., Jeroudi, M.O., Tang, X.L., Zughuib, M., Sun, J.Z. & Bolli, R. 1995, "Effect of adenosine on myocardial 'stunning' in the dog", *Circulation research*, vol. 76, no. 1, pp. 82-94.
- (110) Sekili, S., McCay, P.B., Li, X.Y., Zughuib, M., Sun, J.Z., Tang, L., Thornby, J.I. & Bolli, R. 1993, "Direct evidence that the hydroxyl radical plays a pathogenetic role in myocardial "stunning" in the conscious dog and demonstration that stunning can be markedly attenuated without subsequent adverse effects", *Circulation research*, vol. 73, no. 4, pp. 705-723.
- (111) Shan, Y., Lambrecht, R.W. & Bonkovsky, H.L. 2004, "Identification of key elements that are responsible for heme-mediated induction of the avian heme oxygenase-1 gene", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1679, no. 2, pp. 87-94.
- (112) Sharma, H.S., Das, D.K. & Verdouw, P.D. 1999, "Enhanced expression and localization of heme oxygenase-1 during recovery phase of porcine stunned myocardium", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 196, no. 1-2, pp. 133-139.
- (113) Sharma, H.S., Maulik, N., Gho, B.C., Das, D.K. & Verdouw, P.D. 1996, "Coordinated expression of heme oxygenase-1 and ubiquitin in the porcine heart subjected to ischemia and reperfusion", *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 157, no. 1-2, pp. 111-116.

- (114)Sjostrand, T. 1951, "Formation of carbon monoxide in connexion with haemoglobin catabolism", *Nature*, vol. 168, no. 4287, pp. 1118-1119.
- (115)Smet, F., D'Aubioul, J., van Gerven, W., Xhonneux, R. & Reneman, R.S. 1979, "A chronically implantable catheter-tip micromanometer (JSI 0400) that can be calibrated after implantation", *Cardiovascular research*, vol. 13, no. 10, pp. 601-605.
- (116)Snyder, S.H. & Baranano, D.E. 2001, "Heme oxygenase: a font of multiple messengers", *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, vol. 25, no. 3, pp. 294-298.
- (117)Statistisches Bundesamt Deutschland 2006, "Statistisches Jahrbuch 2006 für die Bundesrepublik Deutschland", .
- (118)Stocker, R., Yamamoto, Y., McDonagh, A.F., Glazer, A.N. & Ames, B.N. 1987, "Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 235, no. 4792, pp. 1043-1046.
- (119)Tenhunen, R., Ross, M.E., Marver, H.S. & Schmid, R. 1970, "Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization", *Biochemistry*, vol. 9, no. 2, pp. 298-303.
- (120)Tenhunen, R., Marver, H.S. & Schmid, R. 1968, "The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 61, no. 2, pp. 748-755.
- (121)Tennant T, Wiggers CJ "Effect of coronary occlusion on myocardial contraction", 1935, vol. 112, pp. 351.
- (122)Toba, M., Kumita, S., Cho, K., Ibuki, C., Kumazaki, T. & Takano, T. 2004, "Usefulness of gated myocardial perfusion SPECT imaging soon after exercise to identify postexercise stunning in patients with single-vessel coronary artery disease", *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*, vol. 11, no. 6, pp. 697-703.
- (123)Tofighi, R., Tillmark, N., Dare, E., Aberg, A.M., Larsson, J.E. & Ceccatelli, S. 2006, "Hypoxia-independent apoptosis in neural cells exposed to carbon monoxide in vitro", *Brain research*, vol. 1098, no. 1, pp. 1-8.

- (124)Trakshel, G.M., Kutty, R.K. & Maines, M.D. 1986, "Purification and characterization of the major constitutive form of testicular heme oxygenase. The noninducible isoform", *The Journal of biological chemistry*, vol. 261, no. 24, pp. 11131-11137.
- (125)Triana, J.F., Li, X.Y., Jamaluddin, U., Thornby, J.I. & Bolli, R. 1991, "Postischemic myocardial "stunning". Identification of major differences between the open-chest and the conscious dog and evaluation of the oxygen radical hypothesis in the conscious dog", *Circulation research*, vol. 69, no. 3, pp. 731-747.
- (126)Valaes, T., Petmezaki, S., Henschke, C., Drummond, G.S. & Kappas, A. 1994, "Control of jaundice in preterm newborns by an inhibitor of bilirubin production: studies with tin-mesoporphyrin", *Pediatrics*, vol. 93, no. 1, pp. 1-11.
- (127)Vatner, S.F., Franklin, D. & Braunwald, E. 1971, "Effects of anesthesia and sleep on circulatory response to carotid sinus nerve stimulation", *The American Journal of Physiology*, vol. 220, no. 5, pp. 1249-1255.
- (128)Vile, G.F. & Tyrrell, R.M. 1993, "Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 20, pp. 14678-14681.
- (129)Wang, L.J., Lee, T.S., Lee, F.Y., Pai, R.C. & Chau, L.Y. 1998, "Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions", *The American journal of pathology*, vol. 152, no. 3, pp. 711-720.
- (130)Weber, T.P., Meissner, A., Boknik, P., Hartlage, M.G., Mollhoff, T., Van Aken, H. & Rolf, N. 2001, "Hemin, inducer of heme-oxygenase 1, improves functional recovery from myocardial stunning in conscious dogs", *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*, vol. 15, no. 4, pp. 422-427.
- (131)Weiss, G., Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Grunewald, K., Wachter, H. & Hentze, M.W. 1994, "Iron regulates nitric oxide synthase activity by controlling nuclear transcription", *The Journal of experimental medicine*, vol. 180, no. 3, pp. 969-976.
- (132)Wijns, W., Vatner, S.F. & Camici, P.G. 1998, "Hibernating myocardium", *The New England journal of medicine*, vol. 339, no. 3, pp. 173-181.

- (133)Wouters, P.F., Van Aken, H., Marcus, M.A., Van De Velde, M., Van Herck, A. & Flameng, W. 1993, "Effects of halothane and isoflurane on collateral dependent myocardium in chronically instrumented dogs", *Anesthesia and Analgesia*, vol. 77, no. 3, pp. 516-525.
- (134)Yachie, A., Niida, Y., Wada, T., Igarashi, N., Kaneda, H., Toma, T., Ohta, K., Kasahara, Y. & Koizumi, S. 1999, "Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency", *The Journal of clinical investigation*, vol. 103, no. 1, pp. 129-135.
- (135)Yellon, D.M., Pasini, E., Cargnoni, A., Marber, M.S., Latchman, D.S. & Ferrari, R. 1992, "The protective role of heat stress in the ischaemic and reperfused rabbit myocardium", *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 24, no. 8, pp. 895-907.
- (136)Yet, S.F., Tian, R., Layne, M.D., Wang, Z.Y., Maemura, K., Solovyeva, M., Ith, B., Melo, L.G., Zhang, L., Ingwall, J.S., Dzau, V.J., Lee, M.E. & Perrella, M.A. 2001, "Cardiac-specific expression of heme oxygenase-1 protects against ischemia and reperfusion injury in transgenic mice", *Circulation research*, vol. 89, no. 2, pp. 168-173.
- (137)Zhang, F., Kaide, J., Wei, Y., Jiang, H., Yu, C., Balazy, M., Abraham, N.G., Wang, W. & Nasjletti, A. 2001, "Carbon monoxide produced by isolated arterioles attenuates pressure-induced vasoconstriction", *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, vol. 281, no. 1, pp. H350-8.
- (138)Zhang, J.H., Chen, Z.W. & Wu, Z. 2008, "Late protective effect of pharmacological preconditioning with total flavones of rhododendra against myocardial ischemia-reperfusion injury", *Canadian journal of physiology and pharmacology*, vol. 86, no. 3, pp. 131-138.
- (139)Zhu, W.X., Myers, M.L., Hartley, C.J., Roberts, R. & Bolli, R. 1986, "Validation of a single crystal for measurement of transmural and epicardial thickening", *The American Journal of Physiology*, vol. 251, no. 5 Pt 2, pp. H1045-55.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei einigen Menschen bedanken, ohne deren Beitrag diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. H. Van Aken möchte ich für die Möglichkeit danken, in seiner Klinik arbeiten zu dürfen, Forschungseinrichtungen der Klinik für Anästhesiologie zu nutzen und damit die Promotion erlangen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. Thomas P. Weber, möchte ich für die gute Themenvergabe, seine konstante Unterstützung und Ermutigungen danken.

Herrn Dr. med. Marc Theisen danke ich für die gute und stets freundliche Zusammenarbeit sowie die hilfreichen Ratschläge für das Anfertigen und die Korrektur dieser Arbeit. Beide standen mir immer als geduldige Ansprechpartner zur Seite und haben damit maßgeblich zu ihrem Gelingen beigetragen.

Danken möchte ich auch besonders meinen Eltern Karl-Heinz und Elisabeth Böhle, die durch Ihre langjährige Unterstützung in jeder Form den erfolgreichen Abschluss des Studiums und das Anfertigen der Promotionsarbeit ermöglicht haben.

Natürlich gilt mein Dank auch den Menschen, mit denen ich im Rahmen dieser Arbeit zusammenarbeiten durfte. Hier möchte ich vor allem meine Mitdoktoranden Werner Wysokinski, Daniel Pfeifer, Björn Hussmann und Britta Feldkeller nennen.

Lebenslauf

Holger Böhle

Persönliche Daten

Geboren am 04.12.1979 in Kassel

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang

1986- 1990	Besuch der Grundschule in Wolfsanger/Kassel
1990-1999	Besuch der Goetheschule in Kassel (Gymnasium)
1999	Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

08/1999- 07/2000	Zivildienst beim Arbeiter-Samariter-Bund in Kassel mit Ausbildung zum Rettungshelfer und später zum Rettungssanitäter an der ASB-Rettungsschule in Wiesbaden
------------------	--

Studium

16.10.2000	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Göttingen
13.09.2002	Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
16.10.2002	Wechsel an die Westfälische Wilhelms-Universität Münster
28.08.2003	Ablegen des ersten Teils der Ärztlichen Prüfung
05.09.2005	Ablegen des zweiten Teils der Ärztlichen Prüfung
17.10.2005	Beginn des Praktischen Jahres

Praktisches Jahr

17.10.05-29.01.06	Innere Medizin, Klinikum Dortmund
01.02.06-28.05.06	Chirurgie, Hôpital de Sierre (Wallis/Schweiz)
01.06.06-13.09.06	Anästhesie, Universitätsklinikum Marseille

Promotion/Approbation

ab Oktober 2006	Fertigstellung der Promotionsarbeit an der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Universitätsklinikum Münster
15.05.2007	Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung
18.07.2007	Approbation als Arzt

Facharztausbildung

Seit 01.11.2007	Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie an der Universitätsklinik Mainz
-----------------	---

Mainz, den 15.01.09



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis!

Herrn

Dr. med. Thomas Weber
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
und operative Intensivmedizin der
Westf. Wilhelms-Universität Münster
Albert-Schweitzer-Straße 33
48149 Münster

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers
Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 36/98)

6 . November 1998

Betr.: Tierschutz;

hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 05.08.1998, hier eingegangen am
25.08.1998, sowie Ihre Ergänzungen vom 30.10.1998

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Dr. Weber,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) i.d.F. der Bekanntmachung
vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung
zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

*Die medikamentöse Beeinflussung der Perfusion und Funktion von
normalem, ischämischen und postischämischen Myokard bei
chronisch-instrumentierten Hunden.*

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dhp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525
Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Dr. med. Thomas Weber
Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und
operative Intensivmedizin
Albert-Schweitzer-Str. 33
48149 Münster

Herr
PD Dr. med. Norbert Rolf
Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und
operative Intensivmedizin
Albert-Schweitzer-Str. 33
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum 31.05.2000.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

40 Hunde.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der o.g. Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Pi-ll.

(Dr. Piontkowski)