

Wirkung der systemischen selektiven Inhibition des Komplementsystems mit C1-Esteraseinhibitor auf den Myokardschaden nach Myokardinfarkt und Revaskularisation in einem Schweinemodell

Catalin Constantin Badiu

Deutsches Herzzentrum München
des Freistaates Bayern
Abteilung für Herz- und Gefäßchirurgie
Klinik an der Technischen Universität München

Wirkung der systemischen selektiven Inhibition des Komplementsystems mit C1-Esteraseinhibitor auf den Myokardschaden nach Myokardinfarkt und Revaskularisation in einem Schweinemodell

Catalin Constantin Badiu

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Dieter Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Robert Franz Bauernschmitt

2. Univ.-Prof. Dr. Karl-Ludwig Laugwitz

Die Dissertation wurde am 07.08.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2007 angenommen.

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis:

1.	<i>Einführung</i>	1
1.1.	Hintergrund und Problemstellung	1
1.2.	Der Ischämie- und Reperfusionsschaden	2
1.2.1.	Schädigungsmechanismen nach Ischämie und Reperfusion im Myokard	3
1.2.2.	Das Komplement-System	4
1.2.3.	Körpereigene Schutzmechanismen	8
1.3.	C1-Esterase Inhibitor (C1-INH) und sein	10
	therapeutischer Einsatz	10
1.3.1.	Biochemie, Synthese und Inaktivierung des C1-Esterase Inhibitors	10
1.3.2.	Funktion des C1-INH	11
1.3.3.	Therapeutische Ansätze mit C1-INH und Wirkung bei Myokardischämie und Reperfusion	13
2.	<i>Ziel</i>	15
3.	<i>Material und Methodik</i>	16
3.1.	Tierpräparation und apparativer Aufbau	16
3.1.1.	Versuchstiere	16
3.1.2.	Protokoll des Versuchs	16
3.1.3.	Versuchsgruppen	17
3.2.	Operationsablauf	18
3.2.1.	Anästhesie und Beatmung	18
3.2.2.	Präparation, Monitoring und Organentnahme	19
3.2.3.	Herz-Lungen-Maschine (HLM)	22
3.3.	Leitfähigkeits-Messung (Conductance)	23
3.3.1.	Conductance-Technik	23
3.3.2.	Berechnung des ventrikulären Blutvolumens	24
3.3.3.	Datenaufnahmen und Analyse	27
3.3.4.	Parameter zur Bestimmung der globalen und regionalen Kontraktilität des Ventrikels	28
3.3.5.	Determinanten der diastolischen Erschlaffung und Füllung	37

3.4.	Hämodynamische Messparameter	37
3.5.	Messungen des O₂- Partialdruckes im Myokard	39
3.6.	Bestimmung der Infarktgröße und der „area at risk“ (AaR)	40
3.7.	Regionale Gewebperfusionsmessung (RGP)	41
3.7.1.	Theorie zur regionalen Gewebperfusionsmessung (RGP) mit fluoreszenz-markierten Mikrosphären (FMS)	41
3.7.2.	Durchführung der Injektion und der Emissionsmessung	42
3.8.	Statistische Auswertung	46
4.	<i>Ergebnisse</i>	48
4.1.	Volumetrie, Biventrikuläre Druck-Volumen Relation	48
4.2.	Koronarfluss- und Gewebs-pO₂ –Messung	57
4.3.	Relation zwischen Infarktfläche und AaR	60
4.4.	Regionale Gewebperfusionsmessung	61
4.4.1.	Infarktareal	61
4.4.2.	Area at risk (AaR)	62
4.4.3.	Normal perfundiertes Myokard	63
4.4.4.	Endo-/Epikardiale Perfusion	64
4.4.5.	Nierenrinde	65
4.4.6.	Dünndarm	66
5.	<i>Diskussion</i>	67
5.1.	Volumetrie und biventrikuläre Druck-Volumen Relation	68
5.2.	Koronarfluss- und Gewebs-pO₂-Messungen	69
5.3.	Relation zwischen Infarktfläche und AaR	69
5.4.	Ergebnisse der RGP-Messung	70
5.5.	Bisherige experimentelle Modelle und Unterschiede zu unserem Tiermodell	71
5.6.	Limitierungen und Vorteile des Studiendesigns	74
6.	<i>Schlussfolgerung</i>	76
7.	<i>Zusammenfassung</i>	77
8.	<i>Literaturverzeichnis</i>	78
9.	<i>Anhang</i>	78
9.1.	Tabellen	87
9.2.	Bilder	93
10.	<i>Danksagung</i>	96
11.	<i>Lebenslauf</i>	97

Verwendete Abkürzungen:

AaR	„area at risk“
AHA	American Heart Association
ATP	Adenosintriphosphat
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
DAF	„Decay accelerating factor“
EDV	Enddiastolisches Volumen
EDPVR	End-diastolic pressure volume relationship
Ees	Endsystolische Elastance
EF	Ejektionsfraktion
ESPVR	Endsystolische Druck-Volumen Beziehung
ESV	Endsystolisches Volumen
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
FMS	Fluoreszierende Mikrosphären
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HMV	Herzminutenvolumen
HSP	„heat shock proteins“
HSV	Herzschlagvolumen
IFN	Interferon
IRS	Ischämie und Reperfusionsschaden
KS	Komplementsystem
LAD	Ramus interventricularis anterior
LCX	Ramus circumflexus der linken Koronararterie
LV	Linker Ventrikel
MAC	Membranangreifendes Komplex
MBL	Manose bindendes Lektin
MI	Myokardinfarkt
NG	Neutrophile Granulozyten
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂ ⁻	Sauerstoffradikal
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PMN	Polymorphonukleäre Leukozyten
PRSW	„Preload recruitable stroke work“
RV	Rechter Ventrikel
SV	Schlagvolumen
SW	Schlagarbeit
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TTC	Triphenyl tetrazolium chlorid
WHO	World Health Organization
ZVD	Zentralvenöser Druck

1. Einführung

1.1. Hintergrund und Problemstellung

Laut jüngsten WHO Berichten starben im Jahre 2002 weltweit 16,7 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen, was ungefähr ein Drittel der Gesamtsterbeursache ausmacht (Atlas of Heart Disease and Stroke, WHO, Sept. 2004). In Europa sind die kardiovaskulären Erkrankungen die häufigste Todesursache mit ca. vier Millionen Sterbefällen (49%) jährlich (British Heart Foundation. European Cardiovascular Disease Statistics, 2002 Edition.)

Von allen kardiovaskulären Erkrankungen spielt die koronare Herzerkrankung die wichtigste Rolle. Laut WHO Statistik starben im Jahre 2002 weltweit 7,22 Millionen Menschen an koronarer Herzerkrankung. In Europa ist die koronare Herzerkrankung die häufigste Todesursache (20 %) mit ca. zwei Millionen Fällen pro Jahr (British Heart Foundation. European Cardiovascular Disease Statistics, 2002 Edition.).

Der Myokardinfarkt ist eine Folge der koronaren Herzerkrankung, mit einer Prävalenz von 3,5%, oder in Absolutzahlen ausgedrückt, 7,1 Millionen Erkrankten im Jahr 2002 in den USA. Im selben Jahr betrug die Inzidenz des Myokardinfarktes 865.000 Fälle (davon waren über 50% Rezidive), mit einer Letalität von 179.514 (AHA). Ähnliche Angaben finden sich auch in Deutschland, wo im Jahre 2002 insgesamt 64.218 Patienten (7,6% aller Sterbefälle) an einem Myokardinfarkt starben.

Um die Behandlung des akuten Myokardinfarktes zu optimieren, und um dadurch eine bessere Überlebensrate und Langzeitprognose erreichen zu können, wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedene Anstrengungen unternommen. Nach wie vor wird die koronare Reperfusionstherapie des von Ischämie betroffenen Myokardareals, die sich in den letzten zwei Jahrzehnten durchgesetzt hat, als wichtigste therapeutische Maßnahme betrachtet (Markins JE, 1981). Die Tatsache, dass eine Arterienokklusion zu einem irreversiblen myokardialen Schaden führt, der sich zeitabhängig vom subendokardialen zum subepikardialen Gewebe ausbreitet, führte zur Entwicklung verschiedener Reperfusionstherapien bei myokardialem Infarkt. Die Therapie kann medikamentös, durch perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), oder

chirurgisch durch eine Bypass-Operation durchgeführt werden. Die frühe Reperfusion ist eine absolute Notwendigkeit für das Überleben des ischämischen Myokards.

1.2. Der Ischämie- und Reperfusionsschaden

Die Myokardischämie und die darauf folgende Reperfusion sind konsekutive Ereignisse, die in der Herzchirurgie, der Herztransplantation, bei der perkutanen transluminalen Koronarangioplastie und bei der Thrombolysetherapie hohe Bedeutung haben. Sie können aber auch spontan auftreten in Form transitorischer Koronarspasmen oder transitorischer Gefäßverschlüsse.

Obwohl die frühe Reperfusion eine Voraussetzung für das Überleben des von Ischämie betroffenen Gewebe ist, können parallel auftretende Schädigungsmechanismen die betroffenen Gewebsareale weiter schädigen. Die derzeitige wissenschaftliche Hypothese besagt, dass zumindest ein Teil der ischämischen Myozyten, die bei Beginn der Reperfusion noch vital sind, durch eine Reihe von zusätzlichen Noxen und pathophysiologischen Phänomenen letztendlich irreversibel geschädigt werden. Der Schädigungsmechanismus der nach Gewebsischämie und –reperfusion auftreten kann ist für viele Organe beschrieben, wie z. B. Skelettmuskulatur (Chan RK, 2004), Niere (de Vries B, 2004), Darm (Malick IH, 2004) oder Gehirn (Pratschke J, 2004). Im klinischen Verlauf nach Myokardinfarkt manifestiert sich der Reperfusionsschaden nach Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes mit „myocardial stunning“ (passagere kontraktile Dysfunktion), Rhythmusstörungen, Mikrozirkulations- und Endothelstörungen, erhöhter Gefäßpermeabilität und Expression von Leukozytenadhäsionsmolekülen sowie Apoptoseerscheinungen. Eine besonders wichtige Rolle in der komplexen Schädigungskette spielt jedoch die Aktivierung des Komplementsystems. Im Gegensatz zum Myozytenzerfall, der durch eine über Stunden andauernde Ischämie verursacht wird, kommt es mit Beginn der Reperusionsphase zur Induktion einer inflammatorischen Reaktion, an deren Anfang eine Aktivierung des Komplementsystems steht. Dieser Reaktion folgt eine Rekrutierung und Akkumulation von neutrophilen Lymphozyten. Aus diesen Gründen steht die Inhibition der Entzündungsreaktion im Zentrum der Bemühungen zur Vermeidung oder mindestens Verminderung des Ischämie/Reperfusionsschadens (Park JL, 1999).

Das erste Mal erkannte Jennings im Jahre 1960 den Schaden durch die Reperfusion nach Ischämie, indem er das „explosive swelling“ beobachtete (zitiert bei Jennings RB, 1975). Dieses Phänomen besteht aus Zellzerstörung, Bildung von Kontraktionsbanden und intramitochondrialen Kalziumphosphateinlagerungen. Siebzehn Jahre später beschrieben Bulkley und Hutchins das Paradoxon der myokardialen Nekrose nach Revaskularisation durch Bypassoperation, und erklärten diese Läsionen als Folge der intrazellulären Hyperkalzämie und des Myozytenoedems (Hutchins GM, 1977).

1.2.1. Schädigungsmechanismen nach Ischämie und Reperfusion im Myokard

Einer der wichtigsten Mechanismen, der zum myokardialen Schaden nach Ischämie und Reperfusion führt, ist die Kalziumüberladung, im engen Zusammenhang stehend mit dem Sauerstoffmangel und der initialen ATP-Verarmung. Die verstärkte Ansammlung des intrazellulären Kalziums während einer transienten arteriellen Okklusion erkannten Anfang der siebziger Jahre Shen und Jennings im Hundeherzmodell (Shen AC, 1972). Die Kalziumüberladung führt vor allem in der Reperfusionsphase und nicht während der Ischämie zur Störung der Muskelfunktion (Herzog WR, 1997).

Freie Sauerstoffradikale werden nur während des normalen Zellmetabolismus erzeugt und danach inaktiviert. Der reichlich zugeführte Sauerstoff während der Reperfusionsphase nach einer Ischämie führt in den ersten Minuten zu einer Anhäufung von hochreaktiven Sauerstoffradikalen, wie das Superoxid-Anion (O_2^-), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal (OH^\cdot). Das konnte sowohl in experimentellen Studien als auch klinisch bei Myokardinfarktpatienten beobachtet werden, die entweder interventionell oder operativ behandelt wurden (Kloner RA, 1989). Das O_2^- scheint keine direkte schädliche Wirkung zu besitzen, spielt aber eine wichtige Rolle als Vorläufer des Hydroxylradikals oder des Wasserstoffperoxids. Zwei bis vier Minuten nach Reperfusionsbeginn erreicht die Konzentration der Sauerstoffradikale und der Peroxidationsprodukte das Maximum, um danach an Intensität zu verlieren (Tsao PS, 1990; Bolli R, 1988). Die Lipidmembran, die die Integrität der Zelle sichert, wird durch Peroxidation denaturiert, was zur Zellnekrose führt (Lazzarino G, 1994).

Eine Ischämiephase gefolgt von Reperfusion führt nicht nur zur direkten Schädigung des Myokards, sondern hat auch Folgen auf vaskulärer Ebene. Im Jahre 1982 wurde zum ersten Mal die endotheliale Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion beschrieben (Ku DD, 1982). Die Funktionsstörung des Endothels ist schon ganz früh während der Reperfusionsperiode zu erkennen, und wird von einer starken Ansammlung von aktivierten neutrophilen Granulozyten gefolgt (Tsao PS, 1990). Diese aktivierten Neutrophilen geben zytotoxische und chemotaktische Substanzen, wie Zytokine, Proteasen, Leukotriene und O₂-Radikale ab, die eine Gewebsschädigung fördern.

Im Jahre 1974 beschrieben Kloner et al. zum ersten Mal einen typischen vaskulären Schaden, der sich durch Ausfall des koronaren Blutflusses nach Revaskularisation bemerkbar macht, und als „no-reflow“-Phänomen definiert wurde. Typisch für dieses Phänomen ist nicht nur die Abnahme des myokardialen Blutflusses, sondern auch der Umbau der Gefäßstruktur in den Reperfusionarealen (Kloner RA, 1974).

Die Rolle des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) an der Pathogenese des Ischämie- und Reperfusionsschadens scheint sich in den letzten Jahren immer mehr zu bestätigen (Neves LA, 1997). Das Endprodukt des RAS, das Angiotensin II, erhöht den intrazellulären Kalzium-Spiegel, was zu erhöhter Inotropie, Verschlechterung der diastolischen Funktion und zur koronaren Vasokonstriktion führt. Dadurch kommt es bei Anreicherung von Angiotensin II zur Myozytennekrose.

Die lokale Thrombozytenaggregation und die darauf folgende Mikroembolisation ist teilweise auch verantwortlich für den Ischämie- und Reperfusionsschaden (IRS) durch eine mikrovaskuläre Störung. Der IRS verstärkt seinerseits die Thrombozytenaktivierung, die dann wiederum den Myokardschaden fördert. Die Thrombozyten setzen Faktoren frei (Thromboxan A₂, Serotonin), die die Mikrozirkulation einschränken, zur mikrovaskulären Kongestion und Thrombose führen und den koronaren Blutfluss weiterhin vermindern (Xiao CY, 2001).

1.2.2. Das Komplement-System

Die Aktivierung des Komplementsystems spielt eine zentrale Rolle in der Pathologie des Reperfusionsschadens.

Das Komplementsystem ist ein Komplex von Plasmaproteinen, die mit Antikörpern interagieren, nachdem diese ein Antigen gebunden haben. Dieser Proteinkomplex besteht

insgesamt aus über dreißig verschiedenen Proteinen, die in Form ihrer Vorstufen, meistens als Proenzym, im Blutplasma zirkulieren. Mit der Aktivierung des Komplementsystems (siehe Abbildung 1.1), kommt es zu einer kaskadenartigen Kettenreaktion, in deren Verlauf alle Komponenten in ihre enzymatisch aktive Form überführt werden. Damit weist dieses System eine gewisse Ähnlichkeit zum Gerinnungs-, Fibrinolyse-, Renin-Angiotensin- und Kininsystem auf, da alle diese Systeme eine sequentielle Aktivierung erfahren und als schnelle und verstärkte Reaktion auf einen spezifischen Stimulus dienen.

Wie im Fall des Gerinnungssystems, besteht auch beim Komplementsystem die Möglichkeit der Aktivierung über mehrere Wege, einen klassischen, einen alternativen und den Lektin Weg der über das MBL (Manose bindendes Lektin) zur beschriebenen kaskadenartigen Reaktion führt. Alle Wege münden in eine gemeinsame Endstrecke, und führen zur Spaltung und Aktivierung von C3.

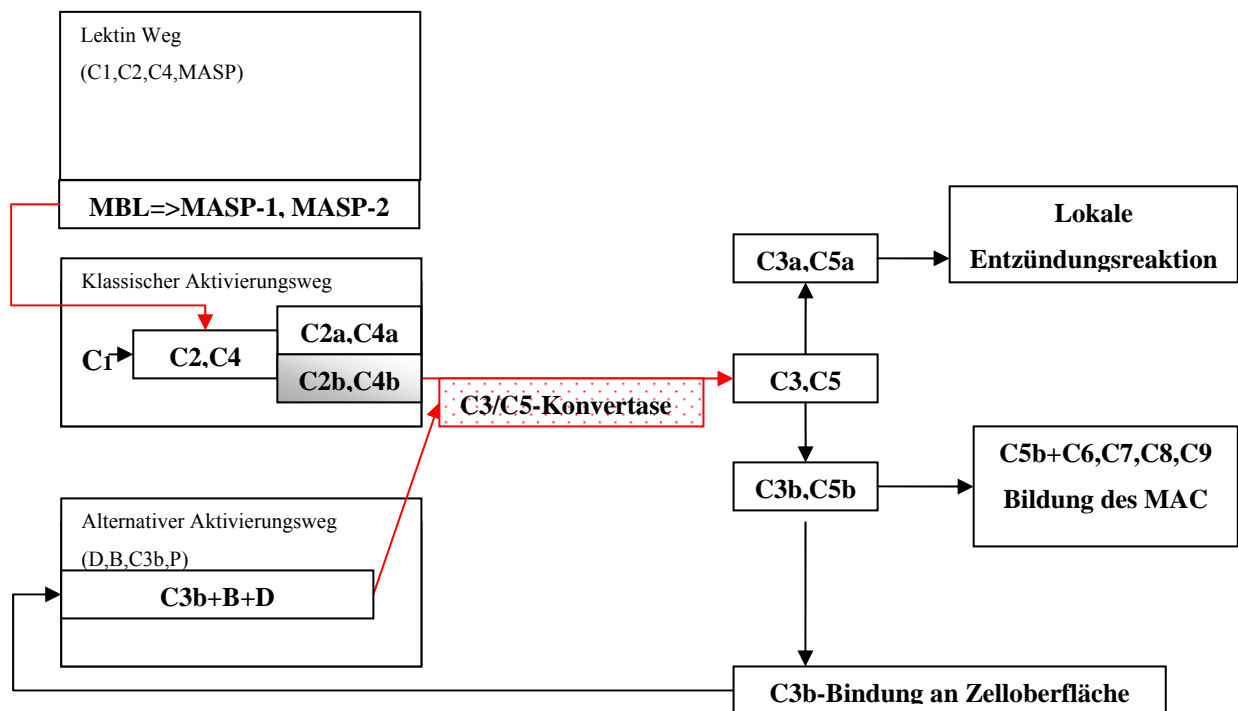


Abbildung. 1.1: Komplementaktivierung über alle drei Wege. MAC = membranangreifender Komplex, MBL = Manose bindendes Lektin, MASP = MBL-assoziierte Serinproteinase (rote Pfeile = Aktivierungswege)

Die molekulare Grundlage der Komplementwirkung ist die Assoziation der einzelnen Komponenten, die durch hydrolytische Abspaltung von Peptidfragmenten oder allosterische Effekte bewirkt wird, die ihrerseits von einer Freilegung von Rezeptoroberflächen oder enzymatisch aktiven Bereichen begleitet wird.

Am klassischen Aktivierungsweg des Komplementsystems sind neun Glykoproteine (C1 bis C9) beteiligt. Diese haben Molekulargewichte von 24 bis 410 kD und werden nach Bildung in der Leber in die Blutbahn sezerniert, wo sie etwa 10% der Globulinfraction ausmachen.

Eingeleitet wird die Reaktion im Anschluss an die Bindung von Antikörpern an Membranoberflächen. Der Kontakt mit dem Antigen führt zu einer Konformationsänderung, was die Aktivierung der C1-Komponente ermöglicht. Die C1-Komponente ist ein Multiproteinkomplex bestehend aus jeweils einem C1q Molekül, zwei Molekülen C1r und einem Molekül C1s. Das C1q Molekül weist eine architektonische Besonderheit auf, gleichend einem Strauß aus sechs Tulpen. Jeder dieser sechs globulären Köpfe kann eine Fc-Domäne eines Antikörpers binden. Die Bindung von mindestens zwei globulären Köpfen führt zu einer Aktivierung des C1q-Moleküls. Deswegen reicht ein einziger IgM-Antikörper aus, das eine pentamere Struktur aufweist, oder mindestens zwei IgG-Antikörper, um über den klassischen Weg das Komplementsystem zu aktivieren. Die Anlagerung von C1q an ein IgM-Molekül oder an mindestens zwei IgG-Molekülen führt zu einer Aktivierung von C1r, das die Serinprotease C1s schneidet und aktiviert.

Weiter kommt es durch die aktive C1s-Serinprotease zu einer Spaltung des Plasmaproteins C4 in die aktiven Formen C4a und C4b, welches an die Oberfläche der Zelle bindet und dort mit einem C2-Molekül reagiert, welche in C2a und C2b gespalten wird. C2b ist ebenfalls eine Serinprotease. Der so entstandene Komplex aus C2b und C4b bildet die so genannte C3/C5-Konvertase des klassischen Aktivierungsweges. Dieses Enzym konvertiert weiter die Moleküle C3 und C5 in ihre aktiven Formen (C3a, C3b und C5a und C5b). C3a setzt eine lokale Entzündungsreaktion in Gang, während C3b für die Bindung an der Zelloberfläche verantwortlich ist. C3 ist das quantitativ bedeutendste Komplementprotein im Plasma. Durch die Aktivierung des Komplementsystems kommt es zu einer starken C3b-Ablagerung an der Oberfläche der Zelle, was das Signal für die Zerstörung der Zelle durch phagozytierende Zellen darstellt. Die Rolle des C5b-Moleküls besteht in der Initiierung der Bildung des membranangreifenden Komplexes (MAC), während C3a und C5a starke lokale Entzündungsmediatoren sind, die zusammen mit C4a zur Kontraktion der glatten Muskulatur führen, die Gefäßpermeabilität erhöhen und zur Rekrutierung polymorphkerniger Granulozyten und Monozyten an Gefäßwänden führen, was die

Voraussetzung für die Einwanderung in das Entzündungsgebiet darstellt (siehe Abbildung 1.2). Die Phagozytose ist aber nicht der einzige Mechanismus der zum Zelluntergang nach Aktivierung des Komplementsystems führt. Die Zellen können auch durch die Bildung des membranangreifenden Komplexes oder von Poren in der Membran zerstört werden. Der MAC bildet sich durch die Anlagerung des C6 und C7 Moleküls an das C5b Molekül, das schon an der Zelloberfläche gebunden ist. Dieser Komplex von drei Molekülen macht eine Konformationsänderung durch, wodurch er hydrophober wird und dadurch in die Lipiddoppelschicht der Zellmembran eindringen kann. Durch die darauf folgende Anlagerung des C8 und C9 Moleküls und dessen Polymerisierung wird eine Pore in der Zellmembran gebildet. Durch den so gebildeten Kanal können Ionen, Wasser und Enzyme in die Zelle eindringen, wodurch es zum Zelluntergang kommt.

Der alternative Weg der Komplementaktivierung führt zu enzymatischen Ereignissen durch die der klassische Weg verstärkt wird. Das C3b Molekül, das an der Zelloberfläche gebunden ist, bindet den Faktor B. Erst durch diese Verbindung kann der Faktor B von der Plasmaprotease, Faktor D, gespalten werden, was zur Entstehung eines Komplexes führt, der der C3/C5-Konvertase des klassischen Weges entspricht (Löffler; Petrides: Biochemie und Pathobiochemie 5. Auflage, 1997).

Der Lektin Weg, wird durch die Bindung des MBL an Polysaccharide verschiedener Mikroben ausgelöst. Das MBL fördert unter diesen Umständen die Aktivierung der MBL-assoziierten Serinproteinasen 1 und 2 (MASP-1 und MASP-2), die weiterhin C4 spalten und so zur Aktivierung des klassischen Weges führen (Turner M W, 1996).

Komponente	Wirkung
C4a	Schwaches Anaphylatoxin; löst Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten und Mastzellen aus
C3a	Anaphylatoxin; löst Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten und Mastzellen aus
C5a	Anaphylatoxin, starker chemoaktischer Faktor für Monozyten und neutrophile Granulozyten; Induziert Synthese und Freisetzung von Cytokinen, IL-1; IL-6; TNF α
C3b, C3bi	Verstärkung der Phagozytose-Aktivität von NG; Aktivierung des alternativen Komplementsweges
C5-9	Membran-Angreifender Komplex (MAC); bildet transmembranöse Kanäle die zur Zerstörung der Zelle führen

Abbildung 1.2: Biologische Wirkungen wichtigster Komplement-Komponenten

Die Rolle des Komplementsystems während den Entzündungsvorgängen nach Reperfusionbeginn, durch die Anreicherung von C3-Fragmenten in infarzierten Rattenherzen, wurde zum ersten Mal 1969 beschrieben (Hill JH, 1969). Elf Jahre danach konnte in einer Studie mit Pavianherzen bewiesen werden, dass bei Tieren mit einer C3-Defizienz die C3 Anreicherung in infarzierten Herzen nicht vorhanden war. Im Gegensatz dazu konnte durch Immunfluoreszenz in der Gruppe genetisch gesunder Affen C3 im nekrotischen Myokard vermehrt nachgewiesen werden (Pinckard R.N., 1980). Des Weiteren zeigten Versuche mit C6-defizienten Kaninchen eine signifikante Verminderung des Infarktareales nach Ischämie und Reperfusion im Vergleich zu C6-kompetenten Tieren. Im selben Experiment waren das „no reflow“ Phänomen und die reperfusionssassoziierten Arrhythmien signifikant kleiner in der Gruppe der C6-defizienten Kaninchen (Ito W., 1996).

In einer weiteren Versuchsreihe konnte die drastische Auswirkung der Reperfusion nach Ischämie auf die Aktivierung des Komplementsystems zurückgeführt werden. Auffällig war eine frühe Anreicherung des MAC (C5b-9) nach Reperfusion in infarzierten Kaninchenherzen. In einer parallelen Tiergruppe, in der keine Reperfusion der Ischämieperiode folgte, war die MAC-Anreicherung nur eine späte Folge des nekrotischen Zellzerfalls (Mathey D., 1994).

Als Ursache für eine Aktivierung des Komplementsystems während der Myokardischämie wurde das, durch Mitochondrienzerfall freigestellte Cardiolipin, verantwortlich gemacht (Kagiyama A., Circulation Research 1989; Rossen R.D., 1994).

1.2.3. Körper eigene Schutzmechanismen

Das aktivierte Komplementsystem kann unter Fremd- und Eigenzellen nicht unterscheiden, was zu einer Schädigung des eigenen Organismus führen kann. Dieses Phänomen ist aber nur im Falle genetischer Defekte möglich, da im Normalfall der Wirtsorganismus ein vielfältiges Kontrollsystem besitzt, das ihn vor potentiell schädigenden Wirkungen des Komplementsystems schützt. DAF (Decay-accelerating-factor), CD59 und CR1 (complement receptor 1) sind Membranproteine, die eine Gewebsschädigung infolge einer zufälligen Bindung von aktivierten Komplementkomponenten an den Wirtszellen verhindern, sowie die spontane Aktivierung von plasmatischen Komplementfaktoren hemmen können. In einer Studie Anfang der neunziger Jahre am Rattenmodell konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe des genetisch

manipulierten Proteins sCR1 (soluble complement receptor 1), ein Komplementinhibitor, die Aktivierung der Polymorphonuklearen Leukozyten (PMN) hemmt, was sekundär die Freisetzung freier O₂-Radikale vermindert (Shandelya S.M.L., 1993).

Des Weiteren wird die Aktivierung des C1-Multiproteinkomplexes durch ein Plasmaprotein, den C1-Inhibitor, eng kontrolliert. Dieses Protein bindet an den aktiven Enzymteil von C1, das heißt an den Molekülen C1s und C1r, was zu deren Abtrennung von dem C1q Molekül führt. Dadurch wird eine Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen Weg gehemmt.

Zwei weitere autoprotektive Mechanismen des Organismus bei Myokardischämie sind die Präkonditionierung und die Bildung unter bestimmten Bedingungen der sog. „heat shock proteins“ (HSP). An Hundeherzen erkannte man, dass der Schaden des Myokardinfarkts nach wiederholten Ischämie- und Reperfusionsepisoden signifikant geringer ist. Das ist wahrscheinlich auf den verminderten ATP-Verbrauch und der verminderten Kataboliten-Akkumulation während der anhaltenden Koronarokklusion zurückzuführen (Murry C.E., 1986).

Die Produktion der HSP ist eine intrazelluläre Antwort auf verschiedene Stressfaktoren. Der exakte Wirkungsmechanismus dieser Proteine ist nicht bekannt, man vermutet aber verschiedene schützende Funktionen, wie die Stabilisierung der Ionenkanäle, die Interaktion mit dem Stickoxid, die Hemmung der entzündungsfördernden Zytokine oder die Unterdrückung der Apoptosemechanismen. Es konnten Nachweise erbracht werden, dass Kardiomyozyten, die einer Hyperthermiephase oder anderen Stressfaktoren, wie z.B. einer Ischämie, ausgesetzt wurden, mit einer gesteigerten Bildung an HSP reagierten. Diese Anreicherung an HSP garantiert eine Schonung der Kardiomyozyten bei weiteren, stärkeren Stressepisoden (Latchman D.S., 2001; Delogu G., 2002).

1.3. C1-Esterase Inhibitor (C1-INH) und sein therapeutischer Einsatz

Der C1-Esterase Inhibitor (C1-INH) ist ein Glykopeptid, das vom Organismus hergestellt wird und eine führende Rolle beim Verlauf verschiedener Erkrankungen spielt, die durch die Freisetzung und Aktivierung endogener Entzündungsmediatoren hervorgerufen werden. Zwei dieser Mediatoren sind das Kontakt- und Komplementsystem, die bei Aktivierung vasoaktive Peptide wie Bradykinin und Anaphylatoxin freisetzen, was auch ihre Rolle als entzündungsfördernde Systeme erklärt. Das C1-INH Protein kann die Aktivierung dieser zwei plasmatischen Systeme hemmen und wird dadurch seiner entzündungshemmenden Rolle gerecht. Die Rolle dieses Glykopeptids ist am besten durch Abwesenheit oder vermindertes Vorkommen im Organismus beim genetisch verursachten C1-Inhibitormangel zu beweisen. Die ständig stattfindende spontane Komplementaktivierung führt in diesem Fall zur Produktion großer Mengen verschiedener Komplementfragmente. Diese verursachen im betroffenen Organismus starke Schwellungen, die vor allem im Bereich der Luftröhre zur lebensbedrohlichen Erstickung führen können. Diese klinische Manifestation des C1-INH Mangels ist unter dem Namen angioneurotisches Ödem bekannt und wurde zum ersten Mal von Quinke 1882 beschrieben. In den fünfziger Jahren konnte zum ersten Mal das Vorhandensein eines Proteins nachgewiesen werden, das die esterolytische Aktivität der ersten Komponente der Komplementkaskade hemmt und damit den klassischen Aktivierungsweg blockiert. Dieses Protein erhielt den Namen C1-Esterase Inhibitor (Lepow I.H., 1956). Die Verbindung zwischen dem angioneurotischen Ödem und einem reduzierten C1-INH Serumspiegel konnte sieben Jahre später bewiesen werden (Lander mann N.S., 1962).

1.3.1. Biochemie, Synthese und Inaktivierung des C1-Esterase Inhibitors

Der C1-Esterase Inhibitor ist ein Polypeptid bestehend aus 478 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von ca. 105 kDa. Die Plasmakonzentration ist ca. 240mg/l. C1-INH gehört zur

Familie der Serin-Proteinase Inhibitoren, kurz auch Serpine genannt, zusammen mit α 1-antitrypsin, Antithrombin, und dem Plasminogen-Aktivator Inhibitor Typ I (Schapira M, 1985).

Dieses Polypeptid wird von Hepatozyten, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Amnionepithelzellen und in der Mikroglia gebildet, vor allem unter Stimulation des IFN- γ , aber auch in geringerem Maß unter Stimulation anderer Zytokine wie TNF- α , IFN- α , Interleukin-6 und Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (Lotz M., 1987; Katz Y., 1995; Heda G.D., 1990; Zuraw B.L., 1990; Schmidt B., 1991; Lappin D.F., 1992).

C1-INH ist ein Akut-Phase Protein, dessen Plasmaspiegel als Folge vermehrter Zytokinausschüttung schon im Falle einer unkomplizierten Infektion auf das Doppelte des Normalwertes ansteigt und Werte von mehr als das 2,5-fache des Normalwertes im Falle einer rheumatoiden Arthritis erreicht.

Die Interaktion des C1-INH mit der Zielproteinase führt zu einem Inhibitor-Proteinase Komplex, der eine Halbwertszeit im Kreislauf von 20 bis 47 Minuten besitzt. Der Serpin-Enzym-Komplex bindet an Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten und Monozyten befinden, die zum Abbau dieser Komplexe führen (Perlmutter D.H., 1990).

Die Inaktivierung des C1-INH wird durch die von aktivierten neutrophilen Granulozyten freigesetzte Elastase initiiert, die durch eine limitierte proteolytische Spaltung zur Bildung verschiedener Derivate, den „modified C1-INH“ führt (Brower M.S., 1982). Des Weiteren können auch bakterielle Elastasen und Proteinasen oder Plasmin zur Spaltung und Inaktivierung des C1-INH führen.

1.3.2. Funktion des C1-INH

Die Funktion des C1-INH beschränkt sich nicht auf die Hemmung der Komplementsystemaktivierung über den klassischen Aktivierungsweg, sondern er spielt auch eine besonders wichtige Rolle bei der Inaktivierung der Gerinnungskaskade, durch Hemmung der aktivierten Faktoren XII und XI. Dadurch ist C1-INH ein wichtiges Steuerungselement der entzündlichen Reaktion und des intrinsischen Gerinnungssystems (Caliezi C., 2000).

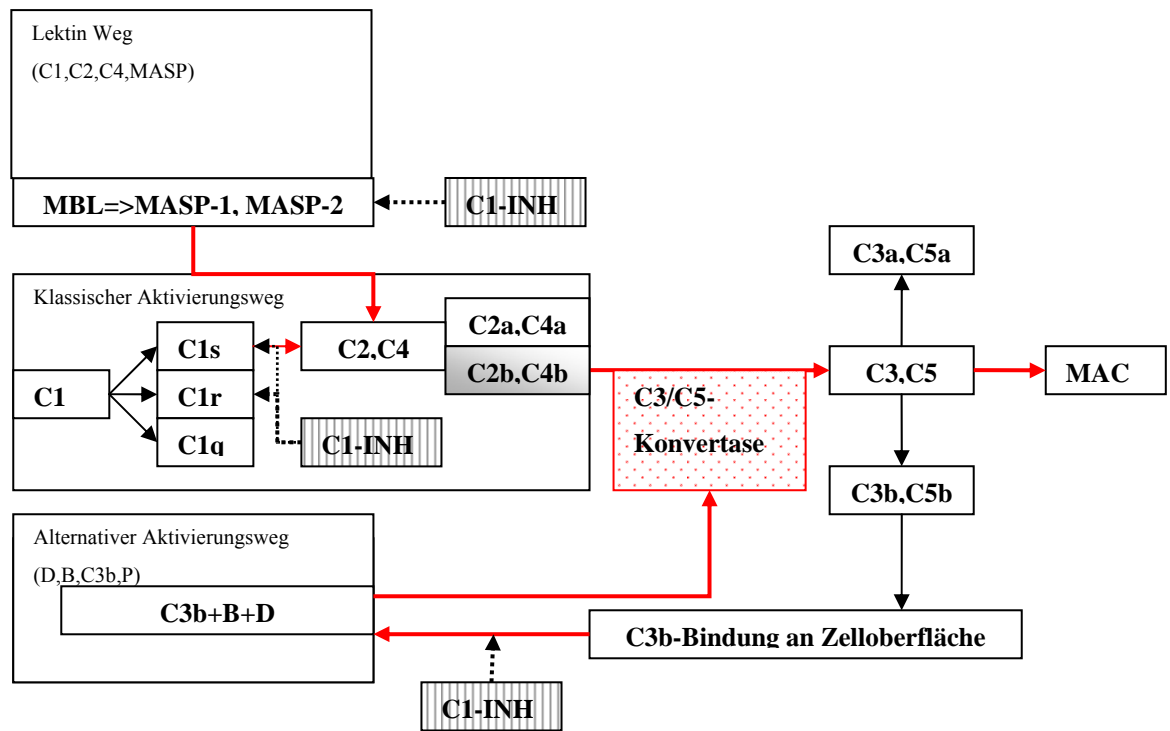


Abbildung 1.3: Hemmung des Komplementsystems durch C1-INH. Einzelheiten siehe Text (rote Pfeile = Aktivierungswege; gestrichelte Pfeile = Hemmungsmöglichkeit durch C1-INH)

Der C1-INH kann die Aktivierung des Komplementsystems stoppen, und damit die Hemmung einer entzündlichen und zellzerstörenden Reaktion bewirken (siehe Abbildung 1.3). Erstens hemmt es als einziger bekannter Faktor die aktivierten Serin-proteinasen C1s und C1r des klassischen Weges (Sim R.B., 1980). Zweitens kann es mit C3b interagieren und so die Reaktion mit dem Faktor B hemmen, was zu einer Inhibition des alternativen Weges führt. Drittens kann es MASP-1 und MASP-2 hemmen, was eine Aktivierung über den Lektin Weg unmöglich macht (Jiang H., 2001; Caliezi C., 2000).

1.3.3. Therapeutische Ansätze mit C1-INH und Wirkung bei Myokardischämie und Reperfusion

Die Therapie des akuten angeborenen angioneurotischen Ödems mit C1-INH ist eine mittlerweile etablierte Methode. In unterschiedlichen Tiermodellen wurden aber auch weitere Therapieansätze untersucht, die in der Abbildung 1.4. aufgeführt werden.

Kondition	Spezies	C1-INH Dosierung	Autor, Jahr
Sepsis	Pavian	500IE/kg Bolus+200IE/kg/9h	Jansen et al, 1998
Sepsis	Kaninchen	400IE/kg Bolus+400IE/kg/4h	Scherer et al, 1997
Sepsis	Mäuse mit C3/C4 Mangel	200 µg	Fischer et al, 1997
Pulmonale Dysfunktion	Hunde	500 IE Bolus	Guerrero et al,1993
Hämorrhagische Pankreatitis	Ratten	3X:250IE/kg +Antithrombin	Yamaguchi et al,1997
Ödematöse hämorrhagische Pankreatitis	Mäuse/Ratten	100IE/kg	Niederau et al,1995
Akute Pankreatitis	Ratten	400IE/kg	Veseotini et al,1993
Akute Pankreatitis	Schweine	50IE/kg Bolus 2 Mal	Ruud et al, 1986
Akuter Myokardinfarkt	Katzen	15mg/kg	Buerke et al 1995
Akuter Myokardinfarkt	Schweine	20IE/kg	Horstick et al,1997
Akuter Myokardinfarkt	Ratten	100IE/kg	Murohara et al 1995
Lungentransplantation	Hunde	500IE/Spender,Empfänger	Salvatierra et al,1997
Trauma	Ratten	15IE/kg/10 Min posttrauma	Kochilas et al,1997
Thermischer Schaden	Schweine	100IE/kg Bolus	Henze et al,1997

Abbildung 1.4.: C1-INH Therapieansätze in unterschiedlichen Tiermodellen (1mg = 2IE)

In allen bisher publizierten Myokardinfarktmodellen konnte in der C1-INH Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine reduzierte Infarktausdehnung und eine Verbesserung der Myokardfunktion nach Ischämie und Reperfusion festgestellt werden. Im Rattenmodell wurden

nach einer Ischämiephase von zwanzig Minuten und noch vor der vierundzwanzigstündigen Reperfusionperiode 100IE/kg C1-INH i.v. injiziert. Die Autoren beschreiben nach dieser Dosierung eine Reduktion des Infarktareales um 60-70%, wobei gleichzeitig eine geringere Neutrophilenanreicherung im betroffenen Gewebe erkennbar war (Murohara T, 1995). Im Schweinmodell wurde der C1-INH intrakoronar appliziert und es wurden geringere Dosierungen von nur 20IE/kg gewählt. Trotzdem konnten auch in dieser Versuchsreihe um ca. 33% kleinere Infarktareale in der C1-INH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ausgemessen werden (Horstick G, 1997).

2. Ziel

Das Ziel dieser experimentellen Studie am Tiermodell war, die Wirkung der systemischen Gabe des C1-Esterase-Inhibitors nach Ischämie mit darauf folgender Reperfusion im Schweinmodell zu untersuchen.

Die Komplementinhibition durch Gabe des C1-INH hat in früheren tierexperimentellen Studien eine positive Auswirkung auf die Myokardfunktion gezeigt (Buerke M, 1995; Horstick G, 2001). Als mögliche Ursache dafür kann die nachgewiesene Verminderung des Reperfusionsschadens angenommen werden. Die klinische Relevanz dieser tierexperimentellen Studien ist aber nach unserem Ermessen nicht eindeutig, da die Inhibitorgabe früh nach Koronarokklusion stattfand und die Tiere nicht von der EKZ entwöhnt wurden. Im vorgelegten Versuchsprotokoll sollte eine klinische Situation nachgestellt und die Therapie mit C1-INH 90 Minuten nach Koronarverschluss, zu Beginn der extrakorporalen Zirkulation, systemisch durchgeführt werden. Weiterhin wurde in unserem Modell die myokardiale Funktionseinschränkung bzw. Funktionserholung durch die Conductance-Katheter-Methode quantifiziert, was die Subjektivität der Transösophagealen Echokardiographie (TEE) durch den Untersucher eliminierte. Außerdem wurde die regionale Gewebsperfusion mit Hilfe der Mikrosphärentechnik untersucht.

3. Material und Methodik

3.1. Tierpräparation und apparativer Aufbau

3.1.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum von September 2001 bis August 2003 an juvenilen Hausschweinen beiderlei Geschlechts am Deutschen Herzzentrums München durchgeführt. Das Versuchsvorhaben war von der zuständigen Genehmigungsbehörde der Regierung von Oberbayern unter der Antragsnummer 209.1/211-2531-98/01 genehmigt worden. Die Tiere wurden von dem staatlichen Versuchsgut Thalhausen bezogen. Alle Tiere wurden ohne bekannte Erkrankungen am Morgen des Versuchstages in unserer experimentellen Abteilung geliefert, nachdem sie im Klinikum Rechts der Isar vor dem Transport prämediziert wurden. Das mittlere Gewicht der Tiere zum Zeitpunkt der Operation betrug 30 ± 4 kg.

3.1.2. Protokoll des Versuchs

Im folgenden Diagramm ist der Ablauf des Versuches dargestellt.

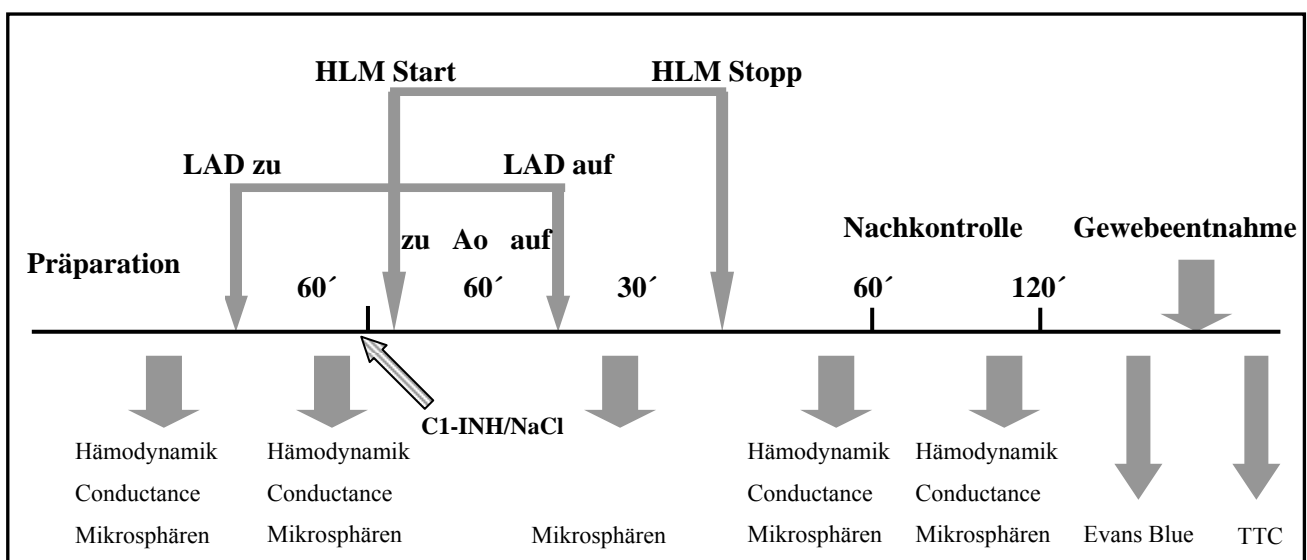


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

Nach Einleiten der Narkose und nach Intubation erfolgte die Präparation der Gefäße (siehe auch Kapitel 3.2.) zur Platzierung der Katheter für Messungen und Medikamenteninjektion. Danach wurde das Tier in rechtslaterale Position umgelagert, um eine linkslaterale Thorakotomie zu ermöglichen. Nach der Thorakotomie und Perikardiotomie wurden weitere Katheter für Datenaufzeichnung und Messungen angebracht. In stabiler Kreislaufsituation wurden dann die Kontrollmessungen (Baseline) durchgeführt und die ersten Mikrosphären zur regionalen Perfusionsmessung injiziert. Nach einer kurzen Okklusionsprobe zur Risikoeinschätzung, wurde die LAD nach Abgang des ersten Diagonalastes verschlossen. Es folgten 60 Minuten nach Okklusion eine erneute Messung und die zweite Mikrosphäreninjektion. Kurz vor Abklemmen der Aorta erfolgte eine randomisierte systemische Gabe von 25IE/kg KG C1-INH oder eine entsprechende Menge von 0,9% NaCl bei den Tieren der Kontrollgruppe. Nach weiteren 30 Minuten, kurz nach der dritten Mikrosphäreninjektion, wurden die Tiere von der EKZ entwöhnt. Sechzig und hundertzwanzig Minuten nach Ende des EKZ führten wir zwei weitere hämodynamische Messungen und Mikrosphäreninjektionen durch. Nach den hundertzwanzig Minuten Nachbeobachtungszeit wurden die Tiere, während sie sich in tiefer Analgosedierung befanden, mit einer KCl Überdosis eingeschlafert. Das Herz wurde dann freipräpariert und entnommen um Infarktgröße und „area at risk“ bestimmen zu können.

Bei allen Tieren dieser Versuchsreihe wurde auf eine Unterstützung der Herzfunktion durch Volumengabe oder durch Kathecholamine zur Verbesserung der hämodynamischen Parameter verzichtet.

3.1.3. Versuchsgruppen

Die Tiere wurden randomisiert. In beiden Gruppen, Kontrollgruppe und C1-INH-Gruppe befanden sich zehn Tiere. Die Substitution erfolgte für die Operateure nicht geblindet.

Beim C1-INH handelt es sich um ein Präparat der Firma Aventis-Behring, Marburg Deutschland (Berinert®), das mit Ringerlösung verdünnt über einem Zeitraum von fünf Minuten kontinuierlich appliziert wurde.

3.2. Operationsablauf

Die Operationen wurden von PD Dr. med. Christian Schreiber (DHM) und Catalin Constantin Badiu (DHM) durchgeführt. Die Anästhesie und die hämodynamischen Messungen wurden von Dipl.-Ing. Dr. rer. biol. hum. Werner Heimisch (DHM) und Prof. Dr. med. Hubert Schad (DHM) übernommen. Die Mikrosphäreninjektion und die Entnahme der Gewebeproben erfolgte durch Prof. Dr. med. Hubert Schad (DHM) und Catalin Constantin Badiu (DHM).

3.2.1. Anästhesie und Beatmung

Die Tiere wurden prämediziert in unsere Klinik geliefert. Gleich nach Ankunft wurden 5 mg Ketamin (Ketanest®, Parke Davis, Deutschland) und 25µg/kg KG Atropin (Braun, Melsungen, Deutschland) i.m. appliziert. Danach erfolgten die Kanülierung einer Ohrvene mit einer Venenverweilkanüle (Vasofix®, Braunüle®, B.Braun Melsungen AG, Deutschland) und die Einleitung der Anästhesie mit 12,5 mg/kg KG Thiopental (Trapanal®, Byk-Gulden, Deutschland), 30µg/kg KG Sufentanil (Sufenta®, Janssen-Cilag, Deutschland) und zur Muskelrelaxation 0,1mg/kgKG Pancuronium Bromid (Pancuronium Curamed®, Curamed, Deutschland). Dann wurden die Tiere in Rückenlage orotracheal intubiert und mit einem 1:1 Gemisch von Sauerstoff und Lachgas (N₂O) beatmet. Die Beatmung erfolgte über einen Luftbefeuchter mit dem Beatmungsgerät Dräger Servo Ventilator 900 (System Siemens Elema, Drägerwerk AG, Lübeck).

Um ein EKG Monitoring zu ermöglichen, wurden entsprechende EKG Elektroden angebracht.

Nach Präparation der rechten Vena jugularis externa, wurde ein Multi-Lumen-Katheter (Arrows®, Reading, U.S.A) eingeführt. Über diesen Katheter erfolgte die kontinuierliche Zufuhr eines Gemisches aus 0,1mg/kgKG/h Midazolam (Midazolam-ratiopharm®, Ratiopharm, Deutschland) und 1,25µg/kgKG/h Sufentanil (Sufenta®, Janssen-Cilag, Deutschland). Die kontinuierliche Muskelrelaxation wurde über die ganze Versuchsperiode durch 4µg/kgKG/min

Pancuronium-Bromid gewährleistet. Die kontinuierliche Medikamentengabe erfolgte durch Perfusoren (Pilot Anästhesie, Vial Medical).

Um einer Elektrolytverschiebung außerhalb des Normbereiches entgegenwirken zu können, wurde kontinuierlich Inzolen (Dr. Franz Köhler Chemie GmbH, Alsbach-Hähnlein) zugeführt. Die Elektrolytbestimmung sowie die Bestimmung der Blutgasparameter wurde mit Hilfe des Blutgasanalysators (GEM® Premier, Mallinckrodt Sensorsystem) durchgeführt. Die dazu benötigten arteriellen Blutmengen wurden aus einem in der linken Arteria femoralis eingeführten Katheter (Cavafix® Certo® 358, 16G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) alle 30 Minuten entnommen.

Eine Auskühlung des Tieres während des Versuchs konnte durch eine auf dem Operationstisch gelegene Wärmematte (Hico-Thermomat 420, Hirtz&Co) vermieden werden. Die Körpertemperatur wurde mit einer rektal eingeführten Sonde (9230-20, Ellab, DK) kontinuierlich beobachtet und zwischen 36,5° und 38°C gehalten.

Nach Ablauf des Experimentes wurde die Narkose mit Thiopental vertieft und die Tiere mit KCL eingeschläfert.

3.2.2. Präparation, Monitoring und Organentnahme

Nach Intubation und Narkoseeinleitung wurden die rechten Vv. Jugulare interna und externa dargestellt. Über die Vena Jugularis externa wurde ein Multi-Lumen-Katheter eingeführt, fixiert und an den Perfusoren angeschlossen. In die rechte Vena Jugularis interna wurde ein Ballon-Okklusionskatheter (*Fogarty-Okklusionskatheter 62080814F mit 10 cm³ Füllvolumen von Edwards Lifesciences Corporation*) eingeführt, der zur kurzzeitigen Drosselung des venösen Rückstroms benötigt wurde. Als nächster Schritt wurden die Aa. femorales bds. präpariert. Über die linke Arteria femoralis wurde ein einlumiger Katheter platziert, der sowohl zur Abnahme der arteriellen Blutprobe zur Blutgasbestimmung, als auch zur Abnahme des arteriellen Blutes für die Eichung der Mikrosphärenmessungen diente. Über die rechte A. femoralis wurde ein Katheter Spitzenmanometer (SPR 350, Mikro-Tip One Pressure Sensor, Millar Instruments Inc., U.S.A.) in die Aorta vorgeschoben zur kontinuierlichen Messung des intraaortalen Blutdrucks (AoP).

Nach der Katheterplatzierung wurde das Schwein in rechtslaterale Lage gedreht um die linkslaterale Thorakotomie zu ermöglichen. Wir eröffneten den Thorax nach Exzision der Pectoralmuskulatur und legten das Herz nach Perikardiotomie und Hochnaht des Perikards frei.

Im nächsten Schritt wurden sowohl die großen herznahen Gefäße als auch die Koronarien inspiziert. Dabei wurde die Stelle der zukünftigen LAD-Okklusion gewählt, freipräpariert und mit einem Faden umschlungen, an dem ein Tourniquet festgemacht wurde. An einer weiteren Stelle, proximal der LAD-Okklusion wurde die Koronarie zur Anbringung eines Ultraschall Flussmesskopfes (2SB, Transonic Systems Inc., USA) freigelegt. Weitere Flussmessköpfe wurden an den proximalen Ramus circumflexus der linken Koronararterie (LCX) (2,5SB, Transonic Systems Inc., USA) und den Truncus Pulmonalis angelegt (Probe 16A, Transonic Systems Inc., USA). Letzterer diente der Messung des Herzzeitvolumens (siehe Abbildung 3.2 und Anhang Bild 1).

Für unsere hämodynamischen Messungen führten wir zwei Conductance-Katheter mit jeweils 12-Elektroden (6Fr, Elektroden-Abstand 0,5 cm, Länge 110cm, GW 0,035``; NuMed, Inc.U.S.A.) ein. In den linken Ventrikel wurde der Katheter über die Aorta eingeführt und dementsprechend in den rechten Ventrikel über den Truncus Pulmonalis. Zwei Druckkatheter (SPR 524, Disposable Intraoperative Monitoring Transducer, Millar Instruments Inc., U.S.A.) wurden über den Vorhof zur Messung des LVP und RVP eingeführt.

Zur Messung des Sauerstoffpartialdrucks im Myokardgewebe wurden im Perfusionsgebiet der LAD und der LCX Miniatur pO₂-Katheter 0,5mmØ (LICOX® CC1, GMS, Deutschland) fixiert.

Zur Bestimmung der Parallel Conductance (siehe 3.3.2) wurde 1ml/10kgKG hypertone (10%) Kochsalzlösung über den Truncus Pulmonalis injiziert. Zur PAP-Messung platzierten wir einen Polyurethan-Katheter (Cavafix®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) in den Truncus pulmonalis (siehe Anhang Bild 1).

Nach Beendigung der Präparation wurde die LAD probeweise okkludiert. Wir führten diese Probeokklusion durch, um eine starke hämodynamische Instabilität zu vermeiden. Dabei orientierten wir uns an dem gemessenen Fluss über die LAD. Die Werte nach Verschluss sollten nicht weniger als die Hälfte des Kontrollwertes betragen. Nach hämodynamischer Stabilisierung erfolgten die Kontroll-Messungen und die erste Mikrosphäreninjektion über den linken Vorhof. Anschließend folgte die Okklusion der LAD mit Hilfe des Tourniquets.

Nach Stabilisierung der hämodynamischen Parameter führten wir die Kanulation für die Herz-Lungen-Maschine durch. Die arterielle Kanüle wurde an der Aorta descendens angeschlossen, die venöse Kanüle am rechten Vorhof und die Ventkanüle über den linken Vorhof am linken Ventrikel.

Vor der EKZ und eine Stunde nach Okkludieren der LAD führten wir die zweite Messung durch, gefolgt von der zweiten Mikrosphäreninjektion.

Danach wurde die extrakorporale Zirkulation gestartet, die Aorta abgeklemmt und durch Infusion der kardioplegischen Lösung (1000 ml, Custodiol®, Köhler Chemie, Deutschland) und Kühlung bis auf 30°C die Herzaktivität gestoppt. Weitere 60 Minuten danach wurde die LAD-Okklusion entfernt. Nach 30 Minuten Reperfusion und wurde die dritte Mikrosphäreninjektion durchgeführt, gefolgt von der Eröffnung der Aorta und Wiedererwärmung auf normale Körpertemperatur. In den darauf folgenden Minuten wurde das Tier von der EKZ entwöhnt. Es folgte die Nachbeobachtungsperiode von zwei Stunden in der nach 60 und 120 Minuten erneut Messungen und Mikrosphäreninjektionen erfolgten (siehe Abbildung 3.1).

Nach der fünften Messung haben wir die LAD erneut ligiert und bei flimmerndem Herzen und abgeklemmter Aorta über die Aortenwurzel den Farbstoff Evans Blue (Evans Blue Standard Fluka, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Buchs SG) injiziert, der nur die perfundierten Myokardanteile anfärbte.

Anschließend wurde das Tier in tiefer Analgosedierung mit einer hohen KCl Dosis eingeschläfert und das Herz, das Duodenum und die linke Niere wurden entnommen. Das Herz wurde gewaschen, abgetrocknet und vor und nach Entfernen der Vorhöfe auf AV-Klappenebene gewogen. Dann wurde es in acht Scheiben parallel zur AV-Klappenebene geschnitten. Die Myokardschnitte wurden einzeln gewogen und von apikal und basal mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Nikon D 1) fotografiert. Um das nekrotische Gewebe von der „Area at Risk“ unterscheiden zu können wurden die Scheiben in TTC-Lösung (TTC, Merck KGaA, Darmstadt) für ca. 15 Minuten eingelegt. Anschließend wurden sie erneut von apikal und basal fotografiert.

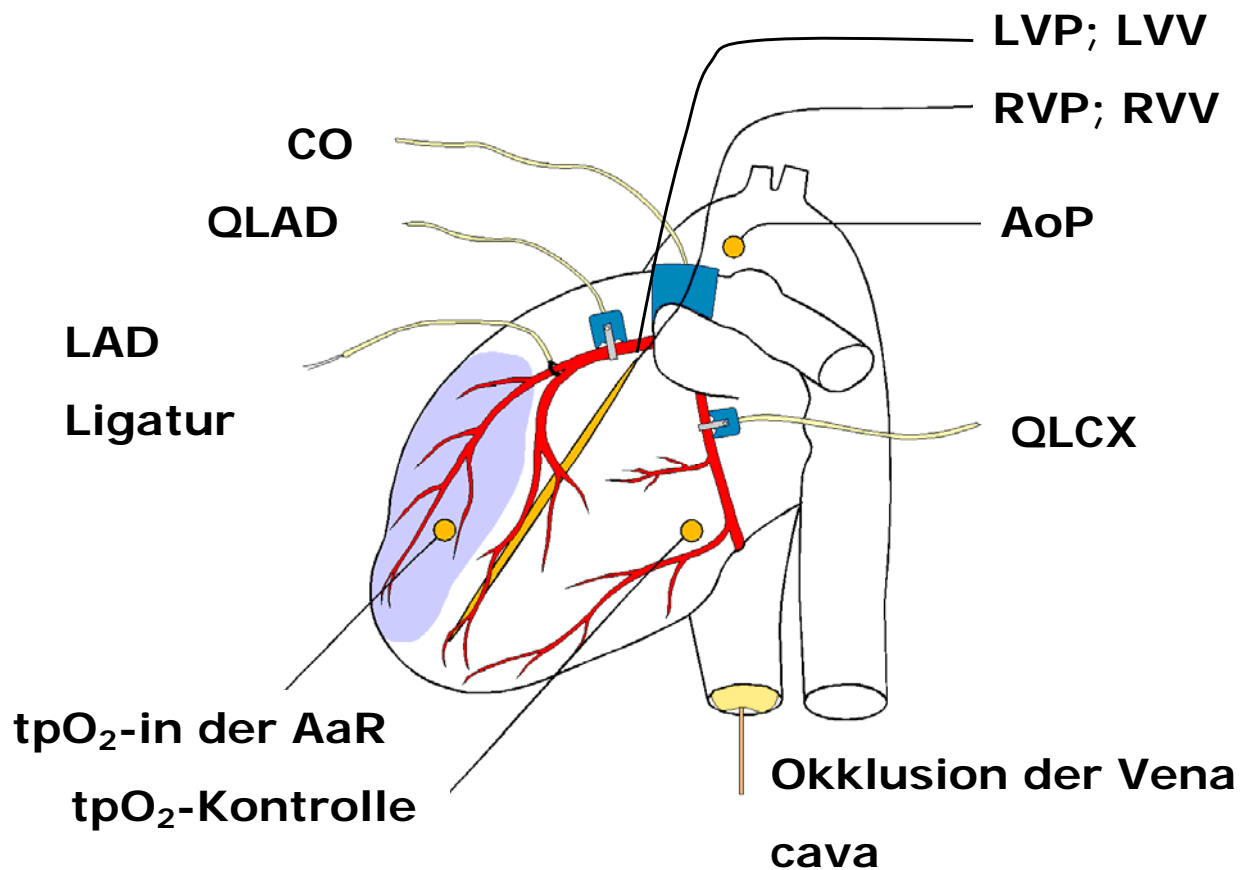


Abbildung 3.2.:

In dieser Abbildung wird schematisch unser Operationssitus mit den angewendeten Kathetern dargestellt. tpO₂-Kontrolle steht für tpO₂ im perfundierten Gewebsareal

3.2.3. Herz-Lungen-Maschine (HLM)

Die HLM (Stöckert, Deutschland) entspricht dem Aufbau der beim Menschen verwendeten Apparatur und umfasst neben dem Membranoxigenator einen Wärmeaustauscher, der kontrollierte Temperaturen ermöglicht, ein Kardiotomie-Reservoir mit Filter (Cobe Cardiovascular[®], Sorin Biomedica U.K. Ltd, Gloucester), sowie ein entsprechendes Druckmonitoring. Der extrakorporale Kreislauf wurde mit Ringerlactat (2000ml), Mannitol 20% (3ml/kg), Bicarbonat 8,4% (50 ml), Inzolen (10ml) und Heparin (1ml) gefüllt.

3.3. Leitfähigkeits-Messung (Conductance)

3.3.1. Conductance-Technik

Für die Beschreibung und genauen Messung der Herzfunktion bedient man sich einer Reihe von Parameter, die die Kontraktilität, die Relaxation und die Pumpfunktion widerspiegeln. Die Kontraktilität kann man aus der Geschwindigkeit der Druckentwicklung (dP/dt) oder aus der endsystolischen Elastance (E_{es}) ableiten. Im Gegensatz dazu beschreibt sich die Relaxation durch die Geschwindigkeit der Druckabnahme während einer Herzaktion. Weiterhin lässt sich die Pumpfunktion aus dem HSV, HMV, der EF oder der Schlagarbeit (SW) bestimmen.

Voraussetzung für die Bestimmung der oben genannten Parameter sind fortlaufende Druck- und Volumenmessungen, die am genauesten mit der Conductance-Technik durchgeführt werden. Das Prinzip dieser Technik beruht auf der Messung der elektrischen Leitfähigkeit („Conductance“, G) im linken oder rechten Ventrikel, die sich synchron zum intraventrikulären Blutvolumen im Verlauf eines Herzzyklus ändert. Um die Messungen möglich zu machen wird ein Katheter in den linken oder rechten Ventrikel eingeführt. Für eine genaue Positionierung des Katheters wurden ventrikuläre Volumenmessungen durchgeführt. Das Volumen wird über Impedanzmessungen des Blutes aus 12 Platin-Ring-Elektroden gemessen, die sich am Conductance-Katheter befinden. Bei der Platzierung muss man darauf achten, dass nur die beiden proximalen Elektroden in der Aortenwurzel liegen (siehe Abbildung 3.3.A.). Über diese Elektroden und über das distale Elektrodenpaar wird ein Strom von $30 \mu A$ und 20 kHz angelegt. Dadurch wird ein homogenes elektrisches Feld im Ventrikel erzeugt. Zwischen den restlichen Elektroden die sich in einem Abstand von $0,5 \text{ cm}$ voneinander befinden wird fortlaufend die Feldstärke gemessen, die sich proportional zum Widerstand ändert ($U=R \cdot I$), der seinerseits vom intrakavitären Blutvolumen abhängig ist. Dabei werden jeweils zwei benachbarte Elektroden so zusammengeschaltet, dass das Cavum des Ventrikels durch 5 einzelne Volumensegmente repräsentiert wird (siehe Abbildung 3.3.B.). Zwei benachbarte Elektroden registrieren den Feldstärke innerhalb eines virtuellen Segments.

Aus dem Kehrwert des Widerstandes R wird Leitfähigkeit G bestimmt ($G=1/R$).

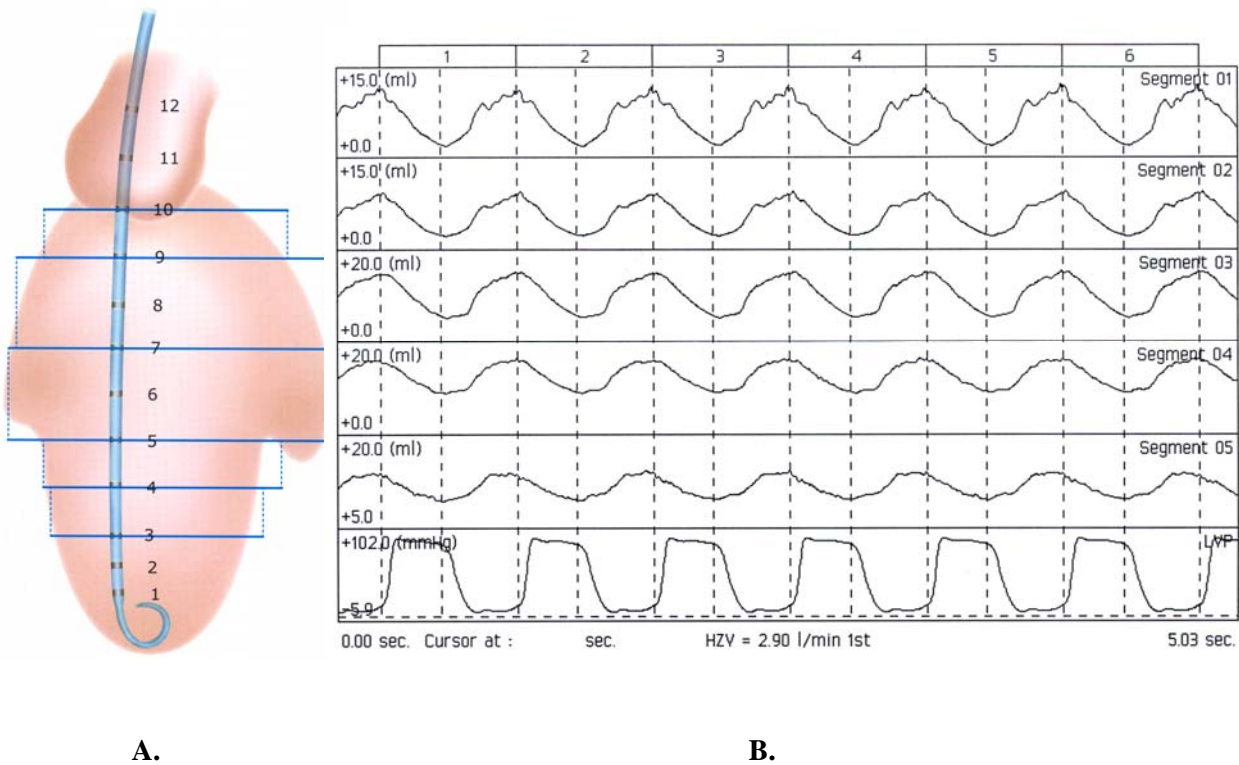


Abbildung 3.3.:

- A. In dieser Abbildung wird die Platzierung des Conductance Katheter im linken Ventrikel dargestellt
 B. Die Signalregistrierung der einzelnen Elektroden auf dem Monitor

3.3.2. Berechnung des ventrikulären Blutvolumens

Das durch die Leitfähigkeitsmethode bestimmte intrakavitäre Blut-Volumensignal wird durch die Leitfähigkeit des umgebenden Gewebes (kardiales und perikardial) beeinflusst (Baan, J et al, 1989). Das geschieht, weil sich das elektrische Feld des Conductance-Katheters über das Cavum des Ventrikels hinaus ausdehnt. Zum umgebenden Gewebe gehören sowohl das Myokard des linken und/oder rechten Ventrikels und das Blutvolumen des benachbarten Ventrikels, als auch bei in vivo Modellen, die perikardialen Strukturen im Mediastinum und im gesamten Thorax. Als Folge entsprach das „cardiac output“ gemessen durch diese Methode nicht den Werten die durch andere Techniken, z.B. Thermodilutionsmethode, eruiert wurden. Von dieser so genannten Parallelen Leitfähigkeit (parallel – Conductance, V^p) nimmt man an, dass sie während

des gesamten Herzzyklus konstant bleibt, weswegen sie, zur Berechnung des absoluten intrakavitären Blutvolumens vom gemessenen Volumen subtrahiert werden muss (Gleichung 1).

$$(1) \quad V_{LV}(t) = \alpha [V_i^{tot}(t) - V_i^p(t)]$$

V_i^{tot} steht in der Gleichung (1) für den mit Hilfe der Leitfähigkeitmethode bestimmten Gesamtvolumen, aus dem die Parallel-Conductance subtrahiert werden muss. Der Faktor α repräsentiert dabei einen dimensionslosen, empirischen Korrekturfaktor (Steendijk P, 1993).

Zur Berechnung der Volumens aus der gemessenen Leitfähigkeit G in einem der fünf ($i=1-5$) virtuellen Volumensegmente zum gegebenen Zeitpunkt (t) im Laufe eines Herzzyklus befolgt man Gleichung (2) (Baan J, 1984).

$$(2) \quad V_i^{tot}(t) = (1/\alpha) * (L^2/\rho) * [G_i(t) - V_i^p]$$

L ist der Abstand zwischen zwei benachbarten Elektroden (in unserem Fall 0,5 cm). Der Faktor ρ ($\Omega^{-1} * \text{cm}^{-1}$) ist der spezifische Leitfähigkeit des Blutes, der vor jeder Messung in einer speziellen Küvette (4ml) bestimmt wird, die im Datenaufzeichnungsgerät integriert ist. Der Faktor α ist wie schon oben beschrieben, ein dimensionsloser Korrekturfaktor, der für jede Messung aus der Gleichung (3) aktuell bestimmt wurde.

$$(3) \quad \alpha = \text{HZV}_a / \text{HZV}_c$$

HZV_a ist das Herzzeitvolumen, das durch die Ultraschallaufzeitmethode bestimmt wurde, während HZV_c das Herzzeitvolumen repräsentiert, das durch die Leitfähigkeitsmethode gemessen wurde.

Das gesamte Blutvolumen stellt sich dann aus der Summe der fünf Volumensegmente zusammen.

$$(4) \quad V(t) = \sum_{i=1}^5 V_i(t)$$

Wie schon oben erwähnt entspricht das gemessene intracavitäre ventrikuläre Blutvolumen, eruiert durch die Leitfähigkeitstechnik, nicht dem reellen Wert, da die Leitfähigkeit des umgebenden Gewebes in der Messung nicht einkalkuliert wird. Um diese Paralleleitfähigkeit getrennt messen zu können, behilft man sich der „Hypertonen Kochsalz-Methode“ (Steendijk P, 2001 und 2000). Dabei injiziert man ca. 1 ml/10kgKG hypertoner (10%) Kochsalzlösung in den Truncus Pulmonalis, was die spezifische Leitfähigkeit des Blutes für einige Herzzyklen verbessert. Dadurch nimmt laut Gleichung (2) das scheinbar intraventrikuläre Volumen gemessen mit dem Conductance-Katheter zu, obwohl es in Wirklichkeit keine Veränderung gibt. Während dieser Einwaschphase des Kochsalzbolus werden die endsystolischen und enddiastolischen Volumina einzelner Herzzyklen registriert und gegeneinander aufgetragen (siehe Abbildung 3.4.).

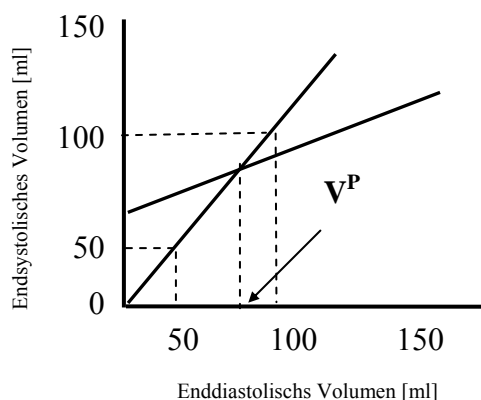


Abbildung 3.4.:

Bestimmung der Parallel-Conductance V^P durch Extrapolation der linearen Regression zwischen endsystolischen und enddiastolischen Volumen zum Zeitpunkt an dem gilt: $V_{ed} = V_{es} = V^P$

An der Schnittstelle der Regressionsgeraden durch die endsystolisch-enddiastolischen Volumenpunkte mit der 45°-Geraden (line of identity) ist das endsystolische Volumen dem enddiastolischen gleich, was zur Schlussfolgerung führt, dass das intracavitäre Volumen gleich null ist. Demzufolge entspricht laut Gleichung Nr.1 das gemessene Volumen der Parallel-Conductance ($V_i^{tot}(t)=V_i^P(t)$). Das gemessene Signal ist ausschließlich auf die Leitfähigkeit der Strukturen außerhalb des Ventrikels zurückzuführen. Dementsprechend errechnet sich das reelle

intrakavitäre Volumen indem man aus dem totalen gemessenen Volumen den subtrahiert, der für die Parallel-Conductance zuständig ist (Gleichung 1).

3.3.3. Datenaufnahmen und Analyse

Die Katheter zur Leitfähigkeitsmessung wurden nach der Freilegung des Herzens über die Aorta ascendens und dem Truncus pulmonalis im linken bzw. im rechten Ventrikel positioniert. Durch Anschluss an den Signal-Prozessor (Leycom CFL 512, CD Leycom, Zoetermeer Niederlande), der einerseits den Strom für die Erzeugung des intrakavitären elektrischen Feldes über die Stimulationselektroden lieferte, konnte andererseits die Leitfähigkeit in den fünf virtuellen Volumensegmenten des Ventrikels kontinuierlich registriert werden.

Die Vorteile des Signalprozessors sind:

- durch Zu- und Abschalten von Elektroden konnte der Katheter an die unterschiedlichen Ventrikelgrößen angepasst werden
- es besteht die Möglichkeit der Ableitung eines intrakavitären EKG-Signals
- die spezifische Leitfähigkeit des Blutes, die für die Volumenbestimmung unabdingbar ist, konnte mit einer integrierten Messküvette bestimmt werden
- sowohl das Volumen der fünf Einzelsegmente, als auch das totale intraventrikuläre Volumen konnte berechnet werden
- über den Monitor konnten die Signale der einzelnen Segmente dargestellt und verfolgt werden. Wenn sich alle fünf Einzelsegmente in Phase bewegten, konnte man davon ausgehen, dass der Katheter korrekt liegt (siehe Abbildung 3.3.)
- zur Weiterverarbeitung konnten die Daten vom Signal-Prozessor zur dazugehörigen Computereinheit übertragen werden

Außerdem können mit CFL-512 folgende allgemeine hämodynamischen Parameter bestimmt werden:

- Herzzeitvolumen (HZV)
- Schlagvolumen (SV)
- Ejektionsfraktion (EF%)
- Schlagarbeit (SW)

- enddiastolisches und endsystolisches Volumen (EDV, ESV)
- enddiastolischer und endsystolischer Druck (EDD, ESD)
- dP/dt max, dP/dt min, Tau

Die gemessenen Leitfähigkeits- und Drucksignale wurden weiterhin mit Hilfe des interaktiven Software-Programms (Conduct 2000 Acquisition / Conduct 2000 Analysis) ausgewertet. Dementsprechend wurden dadurch folgende Daten eruiert und dargestellt:

- Druck- und Volumendaten
- Parallel-Conductance
- reales intraventrikuläres Volumen, nach der Subtraktion der Parallel-Conductance vom gemessenen Volumen
- Darstellung der digitalisierten Druck- und Volumenkurven
- Darstellung der Druck-Volumenschleifen
- Berechnung der endsystolischen Druck-Volumenbeziehung ESPVR und ihrer Steigung, der endsystolischen Elastance (Ees)
- Berechnung der enddiastolischen Druck-Volumenbeziehung EDPVR und ihrer Steigung
- Berechnung des Preload Recrutable Stroke Work (PRSW)
- Berechnung der Druck-Volumen-Fläche (PVA) „Pressure Volume Area“

3.3.4. Parameter zur Bestimmung der globalen und regionalen Kontraktilität des Ventrikels

3.3.4.1. Endsystolische Elastance, Ees

3.3.4.1.1. Die ventrikuläre Druck-Volumen-Schleife

Um die endsystolische Elastance beschreiben zu können, muss zuerst auf den einzelnen Herzzyklus eingegangen werden. Während eines Herzzyklus variiert, abhängig von den unterschiedlichen Zeitpunkten, sowohl das intrakavitäre Blutvolumen als auch der intrakavitäre Druck. Da diese Variationen simultan stattfinden, kann man Volumen und Druck in einem

Diagramm gegeneinander auftragen. Dabei wird der intrakavitäre Druck, der mit dem Tip-Manometer gemessen wird, auf die Ordinate aufgetragen, während das Volumen, gemessen durch die Leitfähigkeitsmethode, auf die Abszisse aufgetragen wird. Die dadurch entstandene Druck-Volumen-Schleife ist die Basis für die Analyse der Herzfunktion (siehe Abbildung 3.5.).

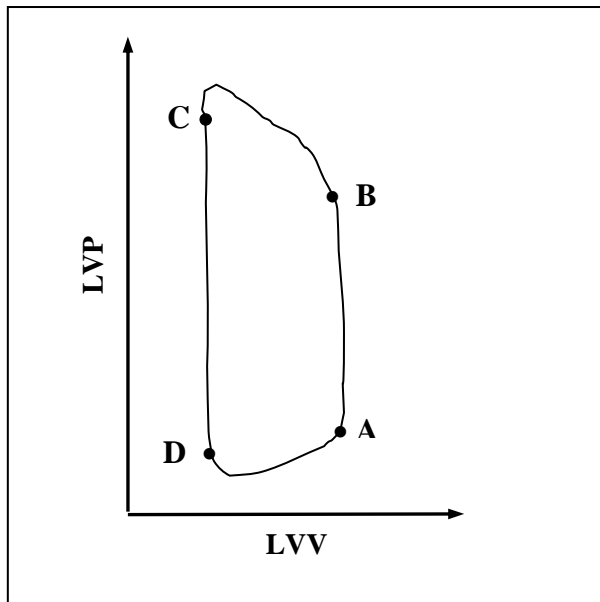


Abbildung 3.5.:

In dieser Abbildung wird die Druck-Volumen-Schleife für den linken Ventrikel dargestellt. Die Buchstaben A-D kennzeichnen die verschiedenen Zeitpunkte eines Herzzyklus, während die Strecken dazwischen die verschiedenen Phasen eines Zyklus darstellen. Erläuterung siehe Text.

Die Druck-Volumen-Schleife ist durch vier Zeitpunkte gekennzeichnet, zwischen denen sich die Druck-Volumen-Beziehung kontinuierlich verändert. Diese vier Zeitpunkte repräsentieren die End-Diastole (A), den Beginn der Auswurfphase nach Öffnen der Aortenklappe (B), die End-Systole (C), und den Beginn der Füllungsphase nach Öffnen der Mitralklappe (D).

Zwischen diesen vier Zeitpunkten eines Herzzyklus werden vier verschiedene Phasen beschrieben:

- von Punkt A bis B wird die isovolumentrische Kontraktion beschrieben. In dieser Phase, in der die Mitralklappe schon geschlossen und die Aortenklappe noch

nicht geöffnet ist, ändert sich das intrakavitäre Volumen nicht, während der intrakavitäre Druck kontinuierlich ansteigt.

- von Punkt B bis C wird die Auswurfphase beschrieben. Punkt B ist der Moment an dem der intraventrikuläre Druck den Aortendruck übersteigt, was zur Öffnung der Aortenklappe führt. Als Folge der Klappenöffnung entleert sich der Ventrikel (Linkswanderung der Schleife) bis der intraaorale Druck den intrakavitären übersteigt, was zum erneuten Schluss der Klappe führt. In diesem Moment ist das Ende der Systole erreicht.
- von Punkt C bis D wird die isovolumetrische Relaxation beschrieben. In dieser Phase entspannt sich bei konstantem Volumen der Ventrikel und der intrakavitäre Druck nimmt ab. In dem Moment aber, in dem der intraventrikuläre Druck unter den intraatrialen Druck fällt, öffnet sich wieder die A-V-Klappe und die Füllungsphase beginnt.
- von Punkt D bis A wird die diastolische Füllungsphase beschrieben, in der sich der Ventrikel so lange füllt, bis es durch Anstieg des Drucks erneut zum A-V-Klappenschluss kommt.

3.3.4.1.2. Die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung, ESPVR

Die endsystolische Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR), ist ein wichtiger Parameter zur Bestimmung der myokardialen Kontraktilität. Zur Eruiierung der ESPVR muss man mehrere aufeinander folgende Druck-Volumen-Schleifen, die durch Vorlastsenkung oder Nachlasterhöhung entstehen, im selben Diagramm auftragen (siehe Abbildung Nr. 3.7.). Die Vorlastsenkung führt zur Abnahme des intrakavitären Drucks und Volumen, im Gegensatz zur Nachlasterhöhung, das zur Erhöhung der zwei Werte führt (siehe Abbildung 3.6.). Da die ESPVR durch beide Methoden gleich gut ausgerechnet werden kann, haben wir die Vorlastreduktion gewählt, die durch Aufblähen eines Okklusionskatheters in der V. Cava erreicht wurde (*Fogarty-Okklusionskatheter 62080814F mit 10 cm³ Füllvolumen von Edwards Lifesciences Corporation*).

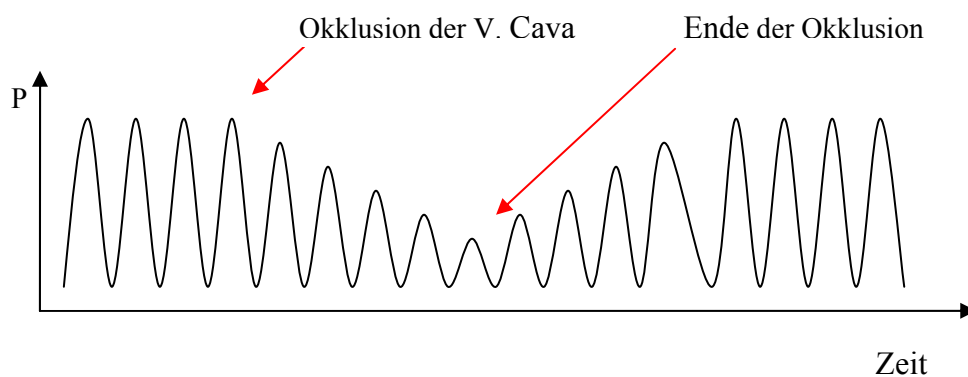
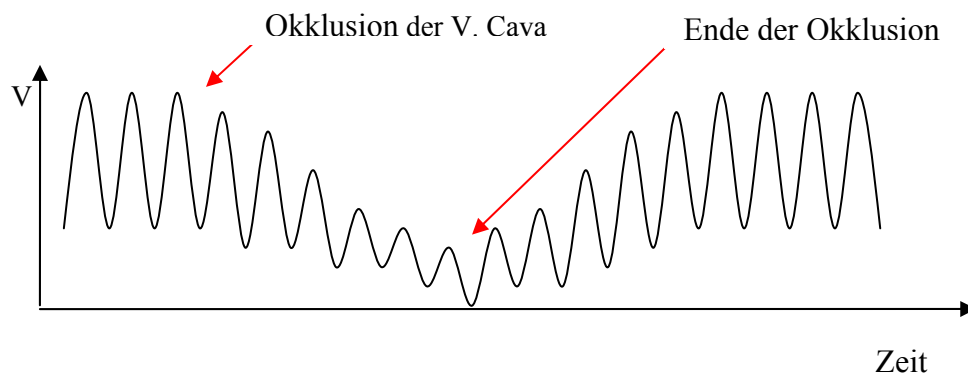


Abbildung 3.6.:

In dieser Abbildung wird schematisch die intrakavitäre Druck- und Volumenveränderung bei Vorlastreduktion nach Okklusion durch den V. Cava - Katheter dargestellt.

Wenn man während der Vorlastreduktion mehrere aufeinander folgende Druck-Volumen-Schleifen in einem Diagramm aufträgt, und durch die daraus resultierende endsystolischen Punkte (C_1, C_2, \dots, C_n) eine Regressionsgerade legt, so entspricht diese Gerade der endsystolischen Druck-Volumen-Beziehung (ESPVR) (siehe Abbildung Nr.3.7.) (Kass DA, 1988; Sagawa K, 1984). Die Steigung dieser Gerade repräsentiert die endsystolische Elastance (E_{es}), die von SUGA und SUGAWA Anfang der siebziger Jahre als lastunabhängiges Maß für die kardiale Kontraktilität eingeführt wurde (Suga H., 1976; Burkhoff D, 1987).

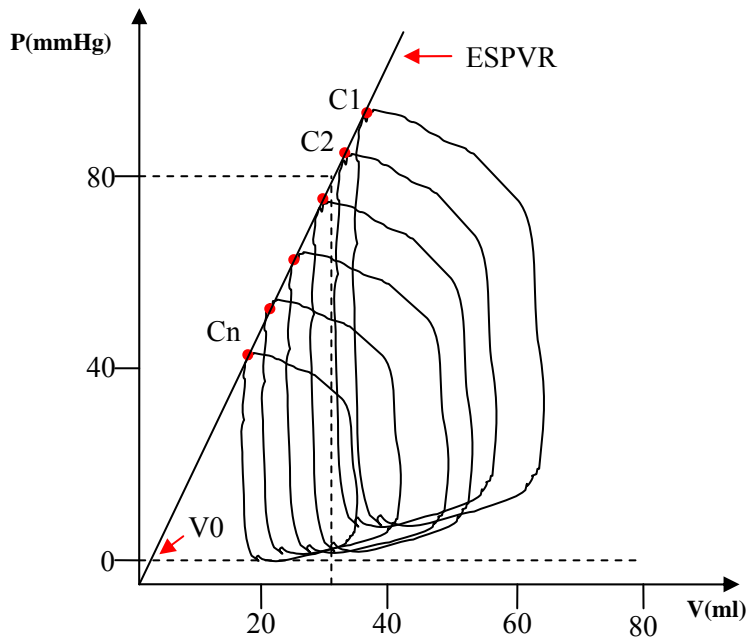


Abbildung 3.7.:

Schematische Darstellung mehrerer nebeneinander liegenden Druck-Volumen-Schleifen, die durch Reduktion der Vorlast zustande kommen. C1, C2, ..., Cn markieren die jeweiligen endsystolischen Punkte und entsprechen der maximalen Elastance (E_{max}). Die Regressionsgerade durch die jeweiligen E_{max} -Punkte ergibt die ESPVR. Der Schnittpunkt mit der gestrichelten Gerade ($P=0$) entspricht dem „unstressed Volumen“ des Ventrikels (V_0).

Die ESPVR ist eine lineare Beziehung und wird nach der Gleichung 5 berechnet. Dabei sind P_{es} und V_{es} endsystolischer Druck und endsystolisches Volumen.

$$(5) \quad E_{es} = \frac{P_{es}}{V_{es} - V_0}$$

Die Verwendung eines linearen mathematischen Modells zur Beschreibung der ESPVR hat den Vorteil, dass Veränderungen der Kontraktilität durch Zu- oder Abnahme der Steigung der ESPVR und Veränderung der relativen Position der ESPVR erfasst werden können.

3.3.4.1.3. Kontraktilitätsveränderung und ESPVR-Veränderung

Die ESPVR und dementsprechend die endsystolische Elastance, E_{es} , wird durch die Veränderung der Kontraktilität des Myokards beeinflusst. Diese Relation wurde in zahlreichen

tierexperimentellen und klinischen Untersuchungen gezeigt (Sagawa K, 1978; Mehmel HC, 1981; Sagawa K, 1981; Sodums MT, 1984).

In der Abbildung Nr. 3.8. haben ich versucht die Beziehung zwischen ESPVR und/oder Ees und myokardiale Kontraktilität schematisch zu verdeutlichen. Dementsprechend führt eine Zunahme der Steigung der Regressionsgerade (Ees) und/oder eine Linksverschiebung der ESPVR eine Zunahme der Kontraktilität. Das bedeutet, dass das Herz ausgehend von derselben Vorlast einen höheren intrakavitären Druck erzeugen kann oder anders formuliert, dass es eine geringere Vorlast benötigt um den gleichen Druck zu erzeugen (Crottogini AJ, 1987). Analog bedeutet eine flachere Regressionsgerade (Ees) und/oder eine nach rechts verschobene ESPVR eine Abnahme der Kontraktilität.

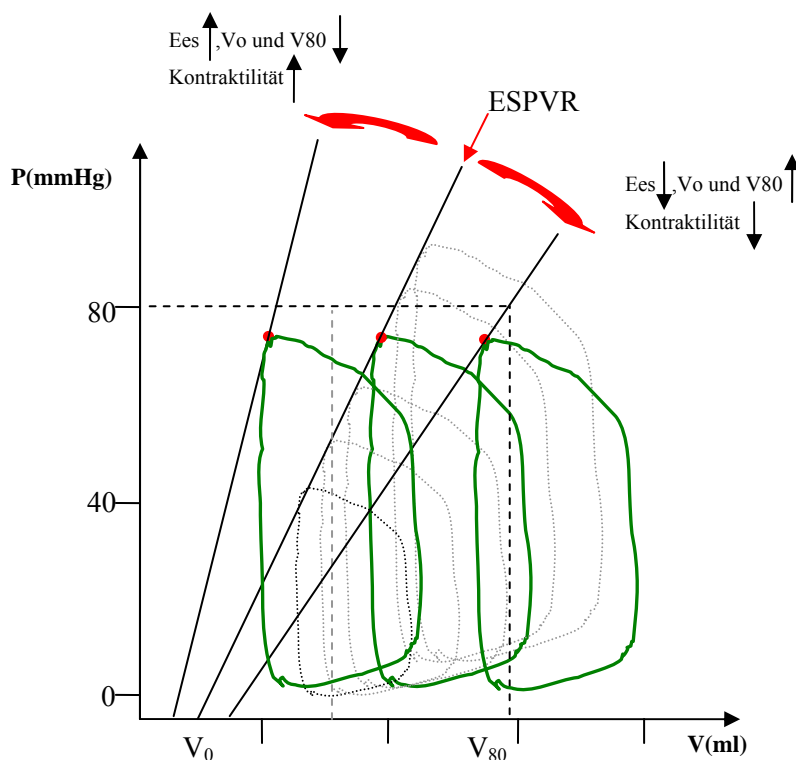


Abbildung 3.8.:

Eine Zunahme der Steigung der ESPVR und/oder eine Linksverschiebung der ESPVR einer Zunahme der myokardialen Kontraktilität entsprechen. Analog bedeutet eine Rechtsverschiebung und/oder Reduktion der Steigung eine Abnahme der Kontraktilität. V_0 und V_{80} sind Parameter, die eine Links- oder Rechtsverschiebung erfassen. Erläuterung siehe Text.

V_0 ist der Schnitt der ESPVR mit der Volumenachse und beschreibt das Volumen, das der Ventrikel noch enthalten würde, wenn er sich am Ende der Systole lastfrei bis zu einem intrakavitärem Druck von 0 mmHg verkürzen könnte (unstressed volume) (Carabello BA, 1984). Da sich bei einer Zunahme der Kontraktilität der Ventrikel stärker kontrahiert und so mehr Blutvolumen auswerfen kann, kommt es in diesem Fall zur Reduktion von V_0 .

V_{80} ist das Volumen, das sich intrakavitär befindet, wenn der Druck im Ventrikel einen Wert von 80 mmHg erreicht. Nach Auflösen der Gleichung Nr. 5 nach V_{es} kann das jeweilige endsystolische Volumen abhängig von der Elastance bestimmt werden, und ist umgekehrt proportional zu dieser.

$$(6) \quad V_{80} = (80 / E_{es}) + V_0$$

Man kann an den drei grün eingezeichneten Druck-Volumen-Schleifen der Abbildung Nr. 3.8. erkennen, dass ganz links, bei einem niedrigerem Volumen aber erhöhter Elastance der gleiche intrakavitäre Druck erreicht werden kann wie in den anderen zwei Schleifen, bei denen das intrakavitäre Blutvolumen höher war.

3.3.4.2. Preload Recrutable Stroke Work, PRSW

Ein weiterer Inotropie-Index, (Mw) die Steigung der Gerade, die die Beziehung zwischen ventrikulärer Schlagarbeit (SW) und enddiastolischem Volumen (EDV) angibt, wurde zum ersten Mal 1985 in einer Studie am Hundemodell von Donald. D. Glower beschrieben. Dieser Index ist unabhängig sowohl von der Füllung und der Geometrie des Ventrikels als auch vom Herzindex (Glower, DD, 1985).

Um die PRSW berechnen zu können, werden mehrere Druck-Volumen-Schleifen z.B. während der Okklusion der V. Cava und der daraus resultierenden Vorlastreduktion, auf demselben Diagramm aufgezeichnet (siehe Abbildung 3.9.A.). Die SW jedes Herzzyklus wird als Integral der von der Druck-Volumen-Schleife umschlossenen Fläche berechnet. In einem zweiten Diagramm (siehe Abbildung Nr. 3.9.B.) wird auf der Abszisse die ausgerechnete Schlagarbeit

gegen dem dazugehörigen enddiastolischen Volumen auf der Ordinate aufgetragen. Durch diese SW-EDV Punkte wird mittels linearer Regression eine Gerade gelegt, die die PRSW beschreibt. Die lineare Beziehung zwischen Schlagarbeit und enddiastolischem Volumen wird durch die Gleichung Nr. 7 beschrieben (Feneley PM, 1992).

$$(7) \quad SW = M_W * (EDV - V_W)$$

Dabei sind:

- SW = die ventrikuläre Schlagarbeit während des Herzzyklus
- M_W = die Steigung der Beziehung zwischen SW und EDV
- EDV = das enddiastolische Volumen
- V_W = der Schnittpunkt mit der Volumenachse

Das EDV wurde mit dem Conductance-Katheter gemessen.

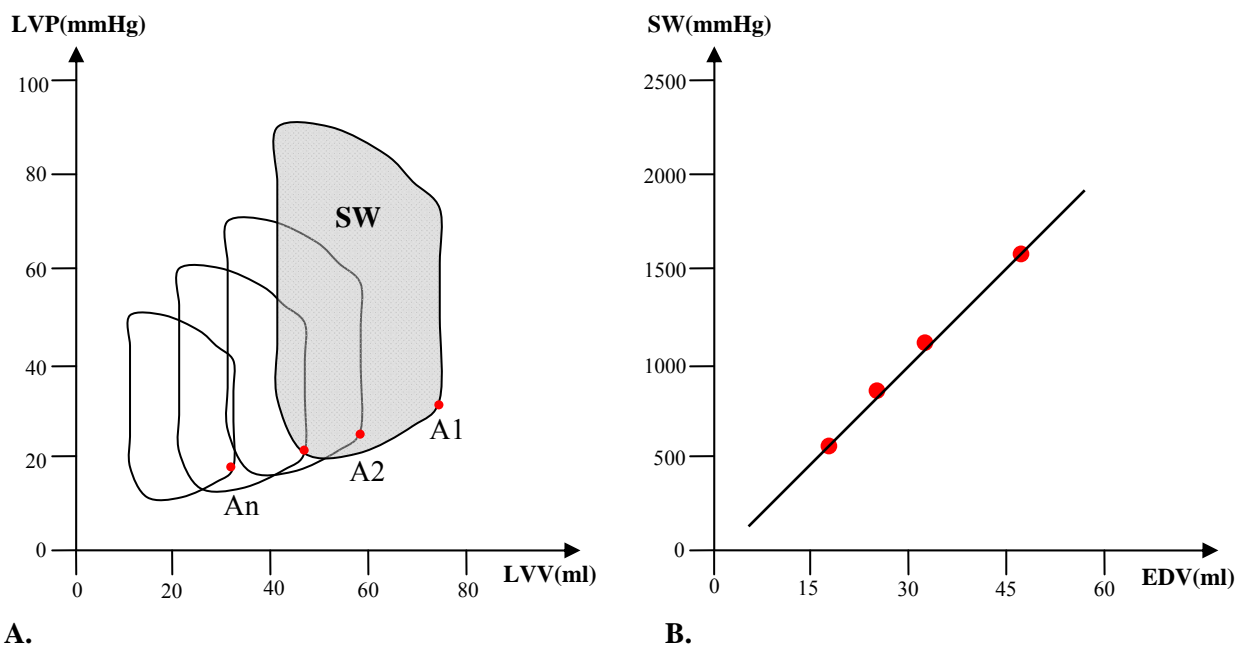


Abbildung 3.9.:

A: Die Okklusion des Katheters in der V. Cava inferior führt zur Vorlastreduktion, die auf dem Monitor durch Druck-Volumen-Schleifen abnehmender Größe dargestellt wird. Die Schlagarbeit jedes Herzzyklus, SW, wurde als Integral der von Druck-Volumen Schleife umschlossenen Fläche berechnet. A stellt den Zeitpunkt am Ende der diastolischen Füllungsphase dar.

B: Wird dann das SW jedes Herzzyklus gegen das enddiastolische Füllungsvolumen des jeweiligen Herzschlages aufgetragen, wird die durch diese Punkte durchgezogene Regressionsgerade dem Kontraktilitätsparameter „Preload Recrutable Stroke Work“, PRSW entsprechen.

Dem Diagramm kann man entnehmen, dass sowohl eine Zunahme der Steigung M_W der Regressionsgerade als auch eine Linksverschiebung des V_W ein Anstieg der myokardialen Kontraktilität bedeutet. Analog dazu führt eine schwächere ventrikuläre Funktion zu einer Abnahme der Steigung und/oder zu einer Rechtsverschiebung.

3.3.4.3. Parameter der isovolumischen Kontraktionsphase (dP/dt_{\max}) und der isovolumischen Relaxation (dP/dt_{\min})

Zur Kontraktilitätsbestimmung des Myokards wurde ein weiterer, lastabhängiger Parameter gemessen, der vor allem die systolische Funktion der Ventrikel während der isovolumischen Kontraktionsphase widerspiegelt, weshalb er auch als Präejektionsphasenparameter bezeichnet wird. Es handelt sich um die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{\max}).

Analog dazu wird die Relaxationseigenschaft durch dP/dt_{\min} repräsentiert. Beide Parameter werden durch Differenzierung des LV-Drucksignals nach der Zeit bestimmt.

3.3.4.4. Kontraktilitätsparameter der Auswurfphase

Die Ejektionsfraktion (EF) beschreibt vor allem das Kontraktionsvermögen des Ventrikels während der Auswurfphase eines Herzzyklus (Kass DA, 1987). Dieser Ejektionsphasenparameter wurde unter Verwendung der enddiastolischen und endsystolischen Volumen aus der Gleichung Nr. 8 berechnet. Diese Volumina konnten mit Hilfe des Conductance Katheter bestimmt werden.

$$(8) \quad EF = \frac{EDV - ESV}{EDV} * 100(\%)$$

Dabei sind:

- EDV = enddiastolisches Volumen
- ESV = endsystolisches Volumen

3.3.5. Determinanten der diastolischen Erschlaffung und Füllung

Ein häufig bestimmter Faktor, der die Füllung der Ventrikel beeinflusst, ist die Elastizität [Compliance, dV/dP (ml/mmHg)]. Die Elastizität der Ventrikel wird durch Füllungszustand und Druck des benachbarten Ventrikels und durch Spannung des beide Ventrikel gemeinsam umfassenden Muskelfaserzugs bestimmt. Des Weiteren ist die Elastizität auch von der Zellstrukturveränderung abhängig, die während der pathologischen Prozesse eines Myokardinfarkts vorkommt (Mann T, 1979). Möglicherweise ist der ATP-Mangel für die Compliance-Einschränkung verantwortlich, da das ATP für die Disoziation des Aktin-Myosin-Komplexes benötigt wird. Physiologischerweise spielt das Perikard eine wichtige Rolle für die Compliancebestimmung. In unserem Versuch wurde das Perikard aber eröffnet.

Die Compliance wurde nach folgender Gleichung 9 ausgerechnet:

$$(9) \quad L_{vedP} \cong e^{t L_{vedV}}$$

Des Weiteren untersuchten wir in unseren Experimenten auch die Veränderung der Relaxationszeit τ (ms) und des diastolischen Relaxationsparameter dP/dt_{\min} (siehe 3.3.4.3.).

3.4. Hämodynamische Messparameter

Zum Kreislaufmonitoring wurden weiter der Zentralvenöse Druck (ZVD), der arterielle Druck (AP) und die Herzfrequenz (HF) überwacht.

Die ZV-Druckmessung wurde an dem im rechten Atrium platzierten Multi-Lumen-Katheter (Arrows®, Reading, U.S.A.) angeschlossen und über einem Verstärker (GOULD 4600 Series, Gould Inc., Valley View-OH, U.S.A.) auf einem 8-Kanal-Registrierer (GOULD TA 5000) kontinuierlich aufgezeichnet.

Der arterielle Druck wurde über den in die rechte arteria femoralis platzierten Katheter (SPR 350, Mikro-Tip One Pressure Sensor, Millar Instruments Inc., U.S.A.) bestimmt. Die Daten wurden dann in gleicher Weise wie der ZVD registriert.

Die Herzfrequenz wurde durch die Eindhoven Standardableitungsmethode bestimmt. Die EKG Ableitungen wurden während der gesamten Operation an einem Oszilloskop (Oscilloscope System Siemens) verfolgt. Die Herzfrequenz wurde fortlaufend registriert (Gould TA 5000).

Zum Monitoring der links- und rechtsventrikulären Drücke (LVP, RVP) wurden retrograd über den linken bzw. rechten Vorhof jeweils ein Druckkatheter (SPR 524, Mikro-Tip Disposable Intraoperative Monitoring Transducer, Millar Instruments Inc., U.S.A.) eingeführt, der an den Mehrkanalschreiber (GOULD TA 5000) angeschlossen wurde.

Das Herzzeitvolumen (HZV) wurde durch die Platzierung eines Ultraschall-Flusskopfes (Probe 16A, Transonic Systems Inc., USA) an den Truncus Pulmonalis kontinuierlich gemessen und registriert. Die Platzierung des Messkopfes erfolgte gleich nach Präparation der Gefäße.

Des Weiteren wurden die Flüsse über die Koronararterien (LAD und LCX) über Ultraschall-Flussköpfe (2SB und 2,5SB, Transonic Systems Inc., USA) gemessen und kontinuierlich registriert (GOULD TA 5000). Nach Freilegung des Herzens und Präparation der zwei Koronargefäße wurden die zwei Ultraschall-Flussmessköpfe um die Koronarien fixiert. Mit Hilfe des Flussmesskopfes über die LAD konnten wir schon bei der Probeokklusion des Gefäßesabschnittes den Fluss bestimmen. Dementsprechend konnten wir die Okklusion so wählen, dass der Gesamtfluss nur um ca. 50% durch den Gefäßverschluss sinkt. Dieser Wert wurde empirisch festgelegt, um die Kammerflimmerwahrscheinlichkeit nach der Okklusion zu minimieren.

Die Flussmessung an uneröffneten Gefäßen läuft nach dem Ultraschallaufzeitverfahren, das erstmals von Franklin et al (Franklin DL, 1965) beschrieben wurde. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht darin, dass vom relativ großflächigen Ultraschallsender eine breite Schallfront abgestrahlt wird, welches das gesamte Messfenster der Sonde, in der das Blutgefäß liegt, überstreicht. Der Schallpuls gelangt an einem Reflektor wo er umgelenkt wird, das Gefäß erneut passiert und von einem Empfänger aufgenommen wird (siehe Abbildung 3.10.). Je nach Flussrichtung wird die Durchlaufzeit der Schallwelle für die Strecke Sender-Reflektor-Empfänger vom strömenden Medium verlängert oder verkürzt. Durch eine stehende Blutsäule ist die Schallausbreitungsgeschwindigkeit $c \approx 1550$ m/s. Im darauf folgenden Messzyklus werden Sender und Empfänger in ihrer Funktion vertauscht, so dass die Schallwelle das Meßlumen in umgekehrter Richtung durchläuft, wobei die jetzt gemessene Schallaufzeit von der vorherigen subtrahiert wird. Aus diesen konsekutiv errechneten Differenzen wird unabhängig von den Gefäßabmessungen der intraluminale Volumenfluss fortlaufend bestimmt (Heimisch W, 1996).

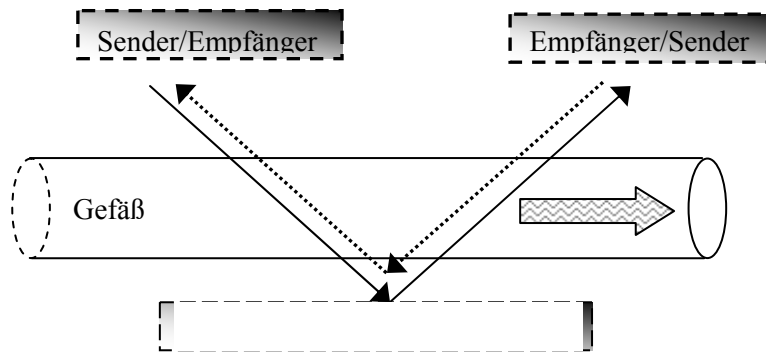


Abbildung 3.10.:
Schematische Darstellung der Ultraschalllaufzeitmethode

3.5. Messungen des O_2 - Partialdruckes im Myokard

Die Messungen des myokardialen O_2 -Partialdruckes im perfundierten Areal und im Ischämiegebiet wurden unter Verwendung von Licox PO_2 -Kathetern (Revoxode $P_{ti}O_2$ Sonde Typ CC1 0,5mmØ, Licox CMP) durchgeführt. Am Anfang des Versuchs wurden die zwei Katheter in den LCX- und LAD-Arealen eingeführt. Nach Okklusion des LAD-Abschnittes wurden, abhängig von dem pO_2 -Abfall, die notwendigen Justierungen durchgeführt. Die zwei Katheter wurden an den Licox PO_2 Computer angeschlossen und der O_2 -Partialdruck im Gewebe kontinuierlich gemessen (Anhang Bild Nr.1).

Der Partialdruck des in der interstitiellen Flüssigkeit physikalisch gelösten O_2 , der „ $P_{ti}O_2$ -Wert“, entspricht der Verfügbarkeit von O_2 auf zellulärer Ebene, und spiegelt die Balance zwischen O_2 -Angebot und Bedarf des oxidativen Energiestoffwechsels direkt am Zielpunkt des komplexen Sauerstofftransportes wider. Die $P_{ti}O_2$ -Messung erfasst nicht nur Durchblutung und Mikrozirkulation, sondern auch die kapillare O_2 -Abgabe aus Hämoglobin, die O_2 -Diffusion durch die Kapillarwand und Parenchym, sowie die funktionelle Kapillardichte. Deshalb ist die $P_{ti}O_2$ -Messung auch in einem Infarktareal, in einer Ischämie- oder Reperfusionzone aussagekräftig und ein wichtiger diagnostischer Parameter.

3.6. Bestimmung der Infarktgröße und der „area at risk“ (AaR)

Zur Bestimmung des durch die LAD-Okklusion entstandenen Infarkts wurde die Triphenyltetrazoliumchlorid– Evans Blue Technik verwendet. Am Ende jedes Experiments wurde die LAD-Arterie erneut okkludiert, das Herz zum Flimmern gebracht und die Aorta abgeklemmt. Danach wurden 100 ml dreiprozentiges Evans Blue in die Aortenwurzel zur Perfusion der Koronararterien injiziert. Das durchströmte Myokard färbte sich blau, während der nicht perfundierte Herzmuskel, die so genannte area at risk (AaR), ungefärbt blieb. Nach suffizienter Anfärbung wurde das Herz in toto entfernt und gespült. Danach wurden die Vorhöfe auf atrioventrikulärer Ebene abgetrennt und die Ventrikel gewogen. Diese wurden in 7 bis 8 Scheiben von apikal nach basal parallel zur Herzbasis geschnitten. Die ca. 1 cm dicken Scheiben wurden dann mit einer digitalen Spiegelreflexkamera (Nikon D 1) und mit Millimeterpapier als Hintergrund fotografiert (Anhang Bild Nr.2).

Im nächsten Schritt wurden die Ventrikelscheiben für ca. 15 Minuten in warmer einprozentiger TTC-Lösung, die mit Phosphatpuffer neutralisiert war, eingelegt. Herzmuskelgewebe, das zum Zeitpunkt der Herzentnahme noch vital war, enthält aktive Dehydrogenase, die mit TTC einen roten Farbkomplex bildet. Aus abgestorbenen Zellen ist die Dehydrogenase ausgewaschen. Das Gewebe wird unter der Einwirkung von TTC weiß. Die Scheiben wurden erneut gespült und vor Millimeterpapier fotografiert (Anhang Bild Nr.2).

Folgende Areale der Herzscheiben wurden auf den Fotos durch computerisierte Planimetrie (AutoCAD 2000 Software) ausgemessen: Gesamtfläche, area at risk (nicht blau gefärbt vor TTC) und infarziertes Gebiet (weiß nach TTC). Das Infarktareal wurde als Prozent der AaR angegeben und die AaR als Prozent des Gesamtgewebes. Da beim Einlegen der Scheiben in der TTC-Lösung das Gewebe schrumpfte, wurden die nach TTC-Färbung bestimmten Flächen mit einem entsprechenden Faktor (Schrumpfungsfaktor) korrigiert. Der Schrumpfungsfaktor wurde wie folgt ausgerechnet:

$$(10) \quad S = \frac{\text{Gesamtfläche}_{\text{ nach_TTC}}}{\text{Gesamtfläche}_{\text{ vor_TTC}}}$$

3.7. Regionale Gewebsperfusionmessung (RGP)

Um die Perfusion in den unterschiedlichen Myokardarealen und in anderen Organen zu messen, wurde die Mikrosphärentechnik gewählt. Dafür wurden fluoreszenz-markierte Mikrosphären (FluoSpheres®, Molecular Probes, MoBiTec, Göttingen) mit einem Durchmesser von 15µm verwendet, die in den Kreislauf eingebracht wurden und im Kapillarbett der verschiedenen Organe stecken blieben. Um die Veränderung des Blutflusses während des Versuches im Myokard, Duodenum und Niere beobachten zu können, wurden fünf Injektionszeitpunkte gewählt. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils Mikrosphären mit einer anderen Farbe injiziert, d.h. die an die Kunststoffkügelchen gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe hatten unterschiedliche Anregungs- und Emissionsmaxima (siehe Abbildung 3.11.).

Injektion	Farbe	Anregungs-/Em-maximum	Zeitpunkt
1	red	580/605	vor LAD Okklusion
2	Yellow-green	505/515	vor EKZ Start
3	crimson	625/645	vor EKZ Stop
4	Blue-green	430/465	60 Minuten nach EKZ Stop
5	orange	540/560	120 Minuten nach EKZ Stop

Abbildung 3.11.: Mikrosphäreninjektionszeitpunkt

Die Injektion Nummer drei wurde zwar ausgewertet aber bei der Darstellung der Daten nicht verwendet (siehe auch 5.4).

3.7.1. Theorie zur regionalen Gewebsperfusionmessung (RGP) mit fluoreszenz-markierten Mikrosphären (FMS)

Durch die Injektion der FMS in den systemischen Kreislauf kommt es zu einer Anreicherung dieser im Gewebe, die proportional zu der spezifischen Perfusion der einzelnen

Organe zu dem Injektionszeitpunkt ist. Um eine genaue Verteilung der FMS gewährleisten zu können muss es zu einer homogenen Durchmischung mit dem Blut kommen. Nach Fixierung im Kapillarnetz kann durch Messung der Mikrosphärenkonzentration im Gewebe die momentane regionale Perfusion quantifiziert werden. Um aus dem Fluoreszenzsignal eine Durchblutung errechnen zu können, bedarf es einer Referenzprobe, die in Form einer Blutprobe abgenommen wird. Die Abnahme erfolgte zum Zeitpunkt der Injektion und wurde durch eine Pumpe mit einer Geschwindigkeit von 6,2 ml/min standardisiert durchgeführt. Somit ist die Emission der Blutprobe proportional zur Abnahmegeschwindigkeit. Der Katheter (Cavafix® Certo® 358, 16G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen), durch den die Blutprobe abgenommen wurde, ist am Anfang des Experimentes über die A. Femoralis in die Aorta descendens platziert worden.

Demzufolge lässt sich die regionale Gewebsperfusion aus folgender Gleichung errechnen:

$$(11) \quad RGP = \frac{E_G * F_B}{E_B}$$

- E_G = Emission der Gewebeprobe
- F_B = Abnahmegeschwindigkeit der Pumpe
- E_B = Emission der Blutprobe
-

3.7.2. Durchführung der Injektion und der Emissionsmessung

3.7.2.1. Injektionslösung

Die Konzentration der gelieferten Mikrosphärenlösung beträgt 1.000.000 FMS /ml. Gelöst sind die Mikrosphären in einer Suspension aus 10ml 0,15 M NaCl mit 0,05% Tween 20 und 0,02% Thimerosal. Vor der Abnahme der gewünschten Menge aus der Ampulle mussten die Mikrosphären in der Lösung gleichmäßig verteilt werden. Das wurde durch dreiminütiges Durchmischen der Ampullen auf dem Vortexgerät, gefolgt von fünfminütiger Inkubation in einem Ultraschallbad und erneutes dreiminütiges Durchmischen gewährleistet. Die gewählte Menge für die Injektion betrug 100.000 FMS/kgKG des Versuchstieres.

3.7.2.2. Injektionsablauf

Die aus der Ampulle entnommene Lösung wurde unverdünnt als Bolus über einen im linken Vorhof platzierten Katheter (Cavafix ® Certo ® 344, 14G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) über einen Dreiweghahn injiziert. Danach wurde die Injektionsspritze zwei Mal hintereinander mit 0,9% NaCl Lösung über den Dreiweghahn gespült, wobei die jeweilige Spülmenge in den Katheter eingespritzt wurde. Bei der dritten Injektion, die während der EKZ stattfand, führten wir die Mikrosphärenlösung über die arterielle Kanüle zu. Die erwünschte Durchmischung der FMS mit dem Blut wurde bei der Injektion aufgrund der Turbulenzen am Kanülenausgang gewährleistet. Diese dritte Injektion konnte aber nicht ausgewertet werden (siehe Kapitel 5.4). Die Injektion des Bolus und der 2x5ml Spülung wurde über einen Zeitraum von 15 Sekunden durchgeführt. 15 Sekunden vor Beginn der Injektion wurde die Pumpe zur Abnahme der Blutprobe gestartet und 1,5 Minuten nach Injektion wurde sie gestoppt.

3.7.2.3. Probenverarbeitung

3.7.2.3.1. Blutprobe

Die abgenommene Blutprobe wurde in eine Filtereinheit der so genannten Sample Processing Unit (SPU) (Raab S, 1999) gegeben, die sich am Sog einer Wasserstrahlpumpe befand. Durch den erzeugten Unterdruck wurde das Blut aus dem Filter abgesaugt. Da aber die Filtermaschen einen Durchmesser von nur 7µm haben, blieben die FMS (Ø 15µm) auf der Filtermembran und konnten weiter verarbeitet werden. Um Blutrückstände zu entfernen, wurde die Filtereinheit anschließend mit einem Phosphatpuffer dreimal gespült. Der Phosphatpuffer, der auch bei der Verarbeitung der Gewebeproben verwendet wurde, hatte folgende Zusammensetzung: 29,9g Dikaliumhydrogenphosphat trihydrat 99% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gelöst in 800 ml Aqua ad injectabilia (Delta Select GmbH, Pfullingen), vermischt mit einer Lösung aus 5,88 g Kaliumhydrogenphosphat 99% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 200 ml Aqua ad injectabilia (Delta Select GmbH, Pfullingen). Da die

Blutproben genau wie die Organproben und zum gleichen Zeitpunkt verarbeitet wurden, mussten sie bis zu fünf Tage in lichtgeschützten Gefäßen bei einer Temperatur von 10° gelagert werden.

3.7.2.3.2. Organproben

Am Ende des Versuches und nach Einschlafen des Versuchstieres wurden die Organe Herz, linke Niere und Duodenum entnommen. Die Nierenkapsel wurde entfernt und die Niere wurde halbiert, der 10 cm lange Duodenumanteil wurde abgeschnitten und gereinigt und das Herz wurde in Scheiben aufgeteilt und fotografiert. Die entnommenen Gewebeteile wurden für fünf Tage in einer 4,5% Formaldehyd-Lösung (Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken) eingelegt. Durch die Einwirkung der Formaldehyd-Lösung konnten die Organproben exakter präpariert werden.

Nach der Entnahme aus der Formaldehyd-Lösung wurden die Organe wie folgt präpariert. Von der linken Nierenrinde wurden drei Proben entnommen, aus dem oberen und dem unteren Nierenpol und aus dem Anteil gegenüber dem Nierenhilus. Am Duodenum wurden die Ränder verworfen und die Probe wurde aus dem mittlerem Teil entnommen. Die Herzscheiben wurden nach der Entnahme aus der Formaldehyd-Lösung unter einem Operationsmikroskop (Leika M650/MS-D, Bensheim, Deutschland) weiter präpariert. Die entnommenen Myokardproben stammten aus dem Infarktareal, aus der AaR und aus dem perfundiertem Areal, das weiterhin in Epikard und Endokard getrennt wurde.

Nach Wiegen der einzelnen Organproben, um später eine Perfusion pro Gramm Gewebe angeben zu können, wurde das entnommene Gewebe in den Filter (\varnothing 7 μ m) der SPU zur weiteren Verarbeitung eingeführt. Um die Mikrosphären aus dem Gewebe auf dem Filter einfangen zu können, wurde die Organprobe mit Hilfe einer Digestionsflüssigkeit aufgelöst. Die Digestionslösung, die verwendet wurde, hatte folgende Zusammensetzung: 222,44 g Kaliumhydroxid Plätzchen (Merck KGaA, Darmstadt) aufgelöst in 1000 ml Aqua ad injectabilia (Delta Select GmbH, Pfullingen), 10 ml 2%igem Tween 80 (Schuhardt, Hohenbrunn) und 90 ml 100% igem Isopropanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim).

Die Filtereinheiten der SPU mit den Organproben wurden in ein Edelstahlgefäß eingeführt und mit 15 ml Digestionslösung aufgefüllt. Da die FMS, die sich aus dem Gewebe lösen, nach oben in der Digestionslösung wandern, wurde mit Hilfe von 1,5 ml Isopropanol eine Deckschicht auf die Digestionslösung pipettiert. Die FMS bleiben so zwischen der KOH-Lösung und dem Isopropanol-Film gefangen. Ein Heften der FMS an der Filtereinheit wird durch das Tween 80

verhindert. Das Edelstahlgefäß wird schließlich für sechs Stunden in einen Heizblock (60°C) gestellt und, um ein Verdampfen des Isopropanols zu verhindern, mit einem Deckel verschlossen (siehe Abbildung 3.12.)

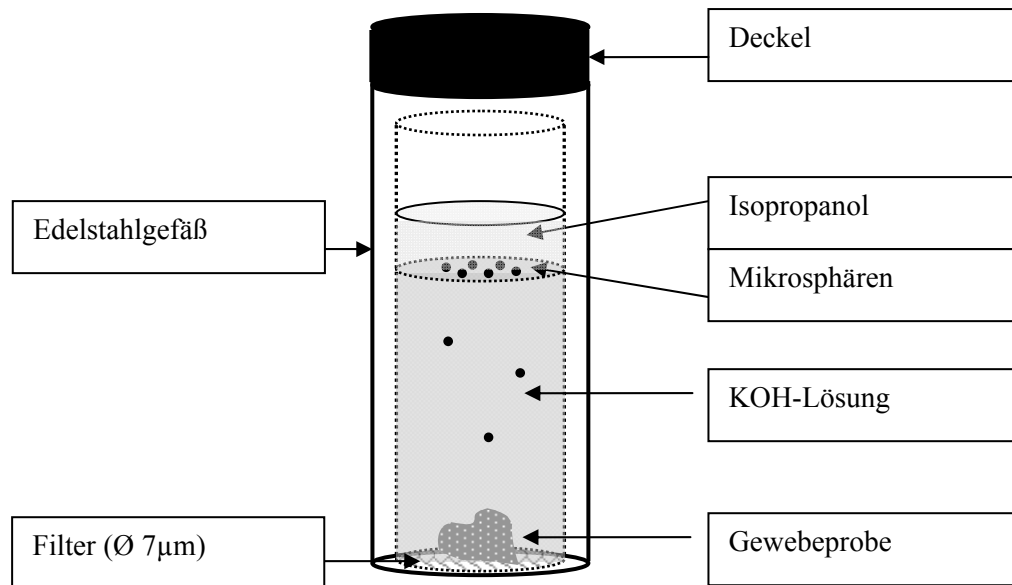


Abbildung 3.12.: Schematische Darstellung Auflösung der Gewebeprobe im Heizblock.
Mikrosphären lösen sich und wandern nach oben

Nach Auflösen der Gewebeproben und vollständige Freisetzung aller Mikrosphären wurde die Filtereinheit an der Wasserstrahlpumpe fixiert und die KOH-Lösung zusammen mit dem verflüssigten Gewebe und dem Isopropanol bei leichtem Unterdruck entfernt, während die Mikrosphären auf dem Filter hängen blieben. Anschließend wurde der Filter dreimal mit dem Phosphatpuffer gespült und bei 2800 U/min für zwei Minuten zentrifugiert (Megafuge 2.oR, Heraeus Instruments). Im nächsten Schritt wurde der Filterhalter mit dem Messröhrchen konnektiert und die Filtereinheit eingeführt (siehe Abbildung 3.13.). Um die Mikrosphären auflösen und dadurch die Farbe freisetzen zu können, wurden auf den Filter 2 ml Cellusolve (Essigsäure-2-ethoxyethylester 99%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) pipettiert. Nach zweiminütigem Durchmischen der SPU auf dem Vortexgerät wurde sie verschlossen und für zwei Minuten bei 2800 U/min zentrifugiert, wodurch der ganze Farbstoff aus den gelösten Mikrosphären in die Messröhrchen gelangte. Diese wurden mit Vorsicht entnommen und nach

Organprobe nummeriert in der vollautomatischen Messeinheit fixiert. Die Messeinheit bestand aus einem Probentisch, einem Spektrophotometer (LS 55B, PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau-Jüngesheim), einem Diluter, einem Controller und einem Rechner (Betriebssystem Windows 98). Die Software, die zur Messung verwendet wurde (WINFAC), misst die „peak emission“ der Proben. Nach Messung und Speichern der Daten wurden die Proben entsorgt.

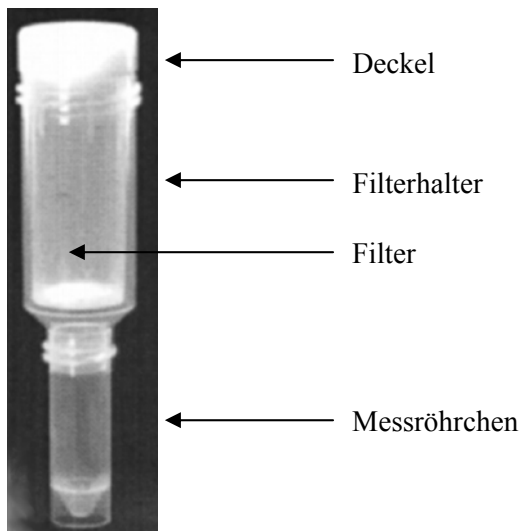


Abbildung 3.13.: die „sample-processing unit“ (SPU) und ihre Einzelteile

3.8. Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse wurde mit der Software SPSS 12.0 durchgeführt. Für die Werte der AaR, der Infarktgröße und der RGP werden N, Minimum und Maximum angegeben und die statistischen Kennzahlen, Median, erstes Quartil ($X_{0,25}$) und drittes Quartil ($X_{0,75}$), errechnet. Die Daten sind graphisch als „Boxplots“ dargestellt. Der Boxplot besteht aus einer Box, die vom ersten und dritten Quartil begrenzt wird und als innere Linie den Median aufweist. Die Whisker, die maximal 1.5 Quartile lang sind, zeigen die Extremwerte an. Sollten Ausreißer außerhalb dieser Distanz liegen, dann werden sie mit einem Kreis (Wert, der um mehr als anderthalb Kastenlängen außerhalb liegt) oder mit einem Stern (Wert, der um mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegt) gekennzeichnet.

Die Werte der Hämodynamik und Herzfunktion werden in den Graphiken als Mittelwert \pm SEM dargestellt und in den Tabellen als Mittelwert \pm SD aufgeführt.

Für die Analyse der unverbundenen Stichproben, das heißt für den Vergleich der zwei Gruppen (C1 und C0), wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test angewandt. Eine Signifikanz wurde ab einem p Wert $\leq 0,05$ angenommen.

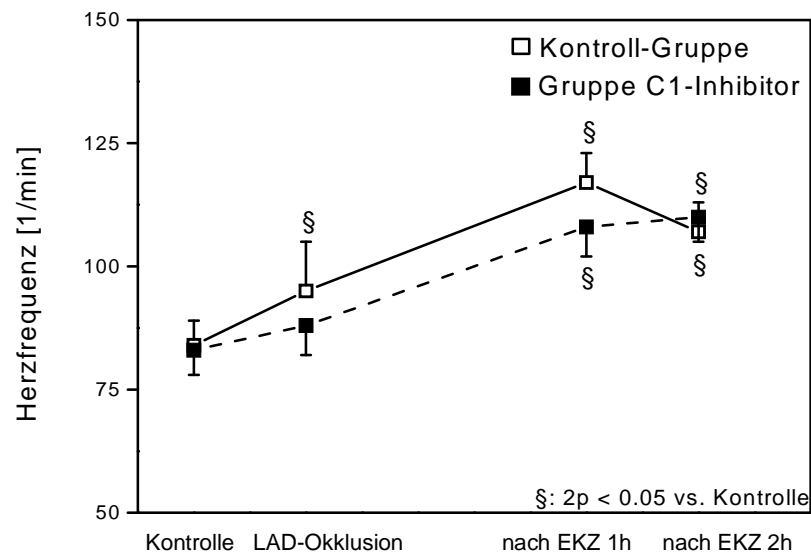
In den zwei Gruppen wurden dieselben Parameter zu verschiedenen Zeitpunkten während des Versuchs gemessen. Für den Vergleich der Mediane über alle vier Zeitpunkte, wurde der nichtparametrische Friedman-Test für abhängige Stichproben angewandt. Für den Vergleich der Mediane zweier Zeitpunkte wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt. Eine Signifikanz wurde ab einem p Wert $\leq 0,05$ angenommen.

4. Ergebnisse

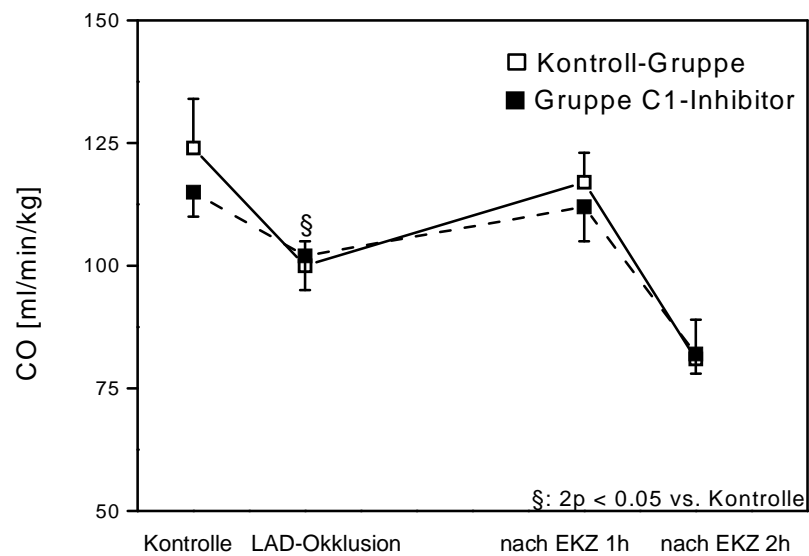
4.1. Volumetrie, Biventrikuläre Druck-Volumen Relation

Alle hämodynamischen Daten, die in den folgenden Graphen dargestellt sind, wurden zu den vier beschriebenen Messzeitpunkten aufgezeichnet und postoperativ ausgewertet. Wir haben die graphische Darstellung so gewählt, dass ein Vergleich zwischen den zwei Gruppen (Kontrolle und C1-INH) gewährleistet ist. Ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen konnte nicht ausgerechnet werden. Signifikante Unterschiede bestehen bei den verschiedenen Messparametern über den Versuchsverlauf. Berechnet wurden zur Graphikdarstellung der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes.

Die dargestellten hämodynamischen Parameter sind Herzfrequenz, Cardiac Output (CO), linksventrikuläres Volumen (LVVolumen), rechtsventrikuläres Volumen (RVVolumen), enddiastolischer Druck im rechten und linken Ventrikel (edP), endsystolischer Druck im rechten und linken Ventrikel (esP), dP/dt min und dP/dt max für den rechten und den linken Ventrikel, Schlagarbeit für den rechten und den linken Ventrikel und „Preload Recrutable Stroke Work“ (PRSW) für den rechten und den linken Ventrikel.



A.



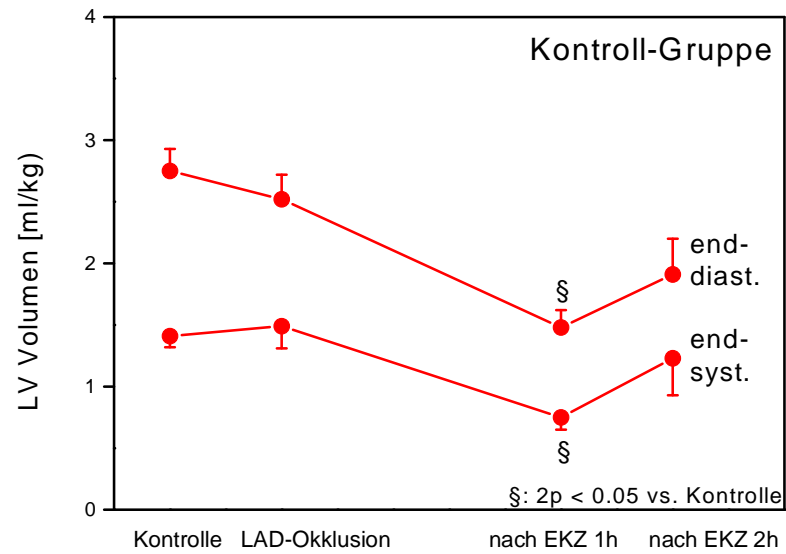
B.

Abbildung 4.1:

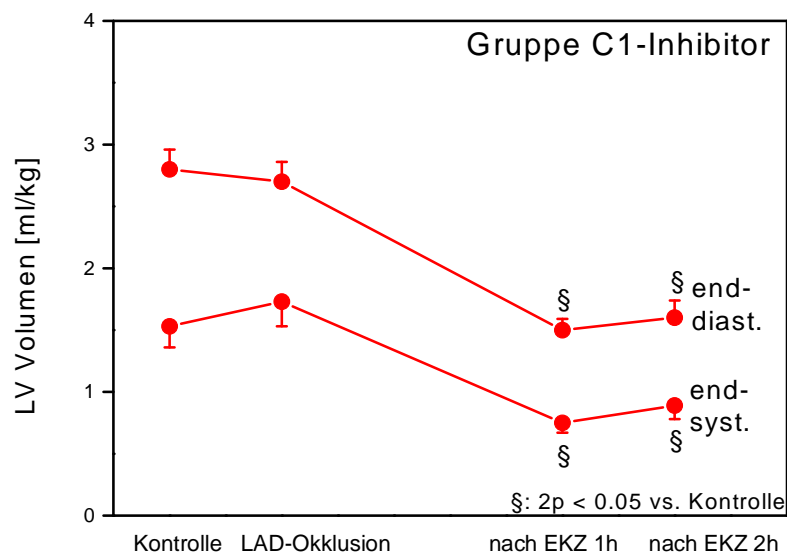
A. Herzfrequenz. Kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen

B. Schlagvolumen. Kein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen.

Die Herzfrequenz steigt in den post-EKZ Messungen bei den Tieren beider Gruppen signifikant an, verglichen mit der Kontrollmessung. Nachdem in beiden Gruppen 2 Stunden nach EKZ der CO bei 4 Tieren einen Anstieg gegenüber der Kontrolle zeigte, erreichte der mittlere Abfall keine Signifikanz.



A.



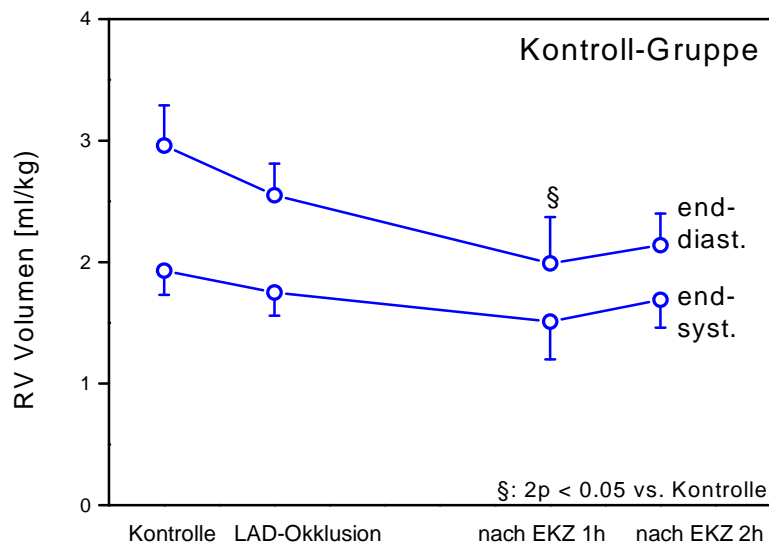
B.

Abbildung 4.2:

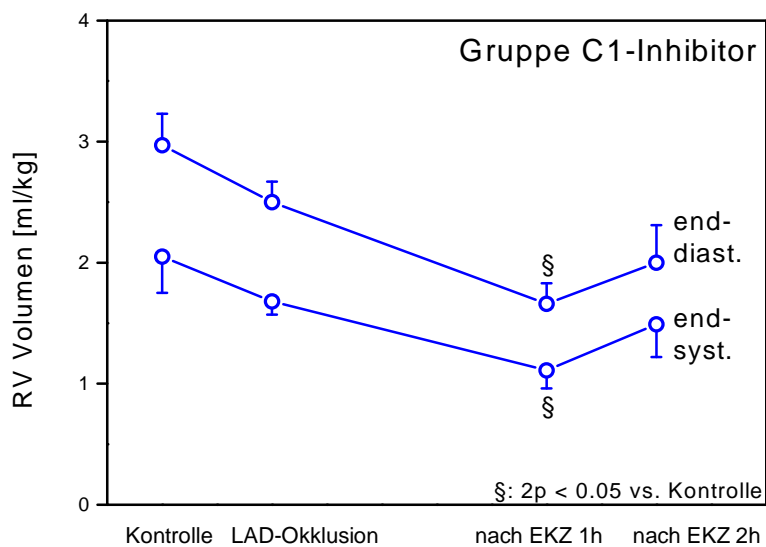
A. LVVolumen am Ende der Diastole und am Ende der Systole in der Kontrollgruppe

B. LVVolumen am Ende der Diastole und am Ende der Systole in der C1-INH Gruppe

In beiden Gruppen zeigt sich im Schlagvolumen, der Differenz aus enddiastolischem und endsystolischem Volumen, trotz Verringerung der Absolutvolumina kein Unterschied über den Versuchsverlauf.



A.



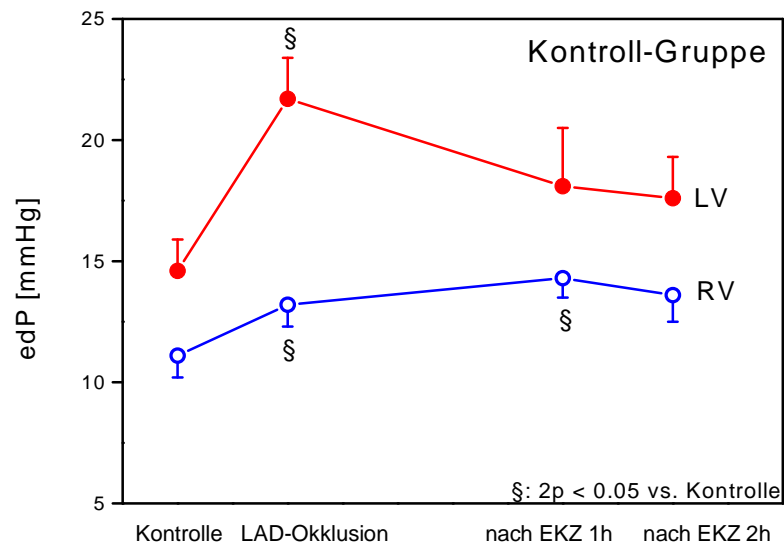
B.

Abbildung 4.3:

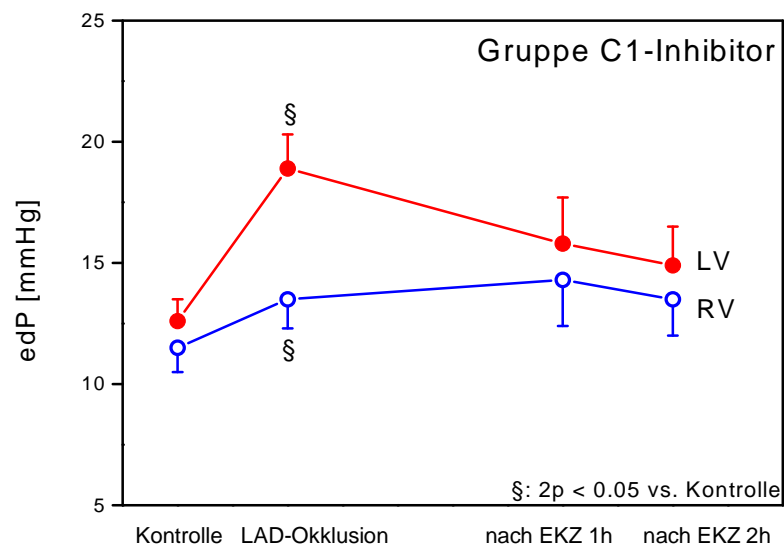
A. RVVolumen am Ende der Diastole und am Ende der Systole in der Kontrollgruppe

B. RVVolumen am Ende der Diastole und am Ende der Systole in der C1-INH Gruppe

Ähnlich wie bei den linksventrikulären Volumina ist auch beim rechten Ventrikel eine Verkleinerung bei weitgehend stabilem Schlagvolumen zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied ist nach Abreichung des C1-INH aber nicht zu erkennen.



A.



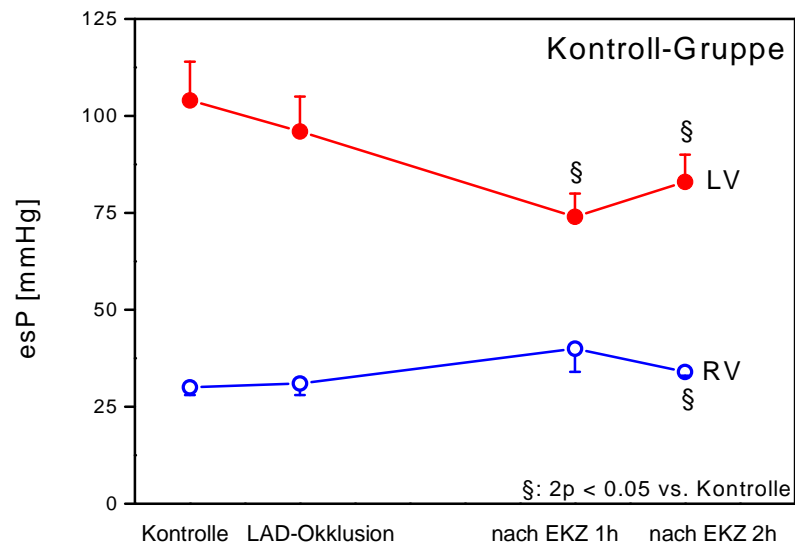
B.

Abbildung 4.4:

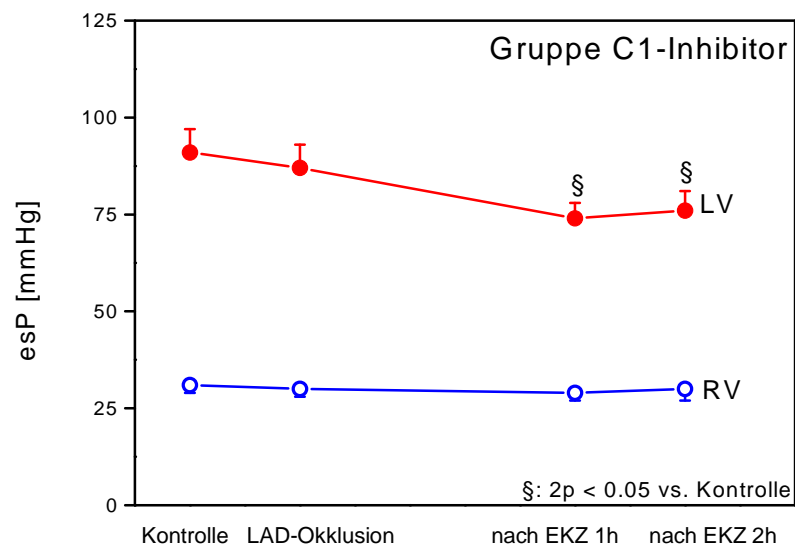
A. Enddiastolischer Druck im linken und im rechten Ventrikel in der Kontrollgruppe

B. Enddiastolischer Druck im linken und im rechten Ventrikel in der C1-INH Gruppe

Die LAD-Okklusion resultiert in einem deutlichen Anstieg vor allem des LVedP. Ein ähnlicher Verlauf des enddiastolischen Druckes in den zwei Gruppen, ohne signifikante Unterschiede nach Abreichung des Inhibitors ist aus den Graphen zu erkennen.



A.



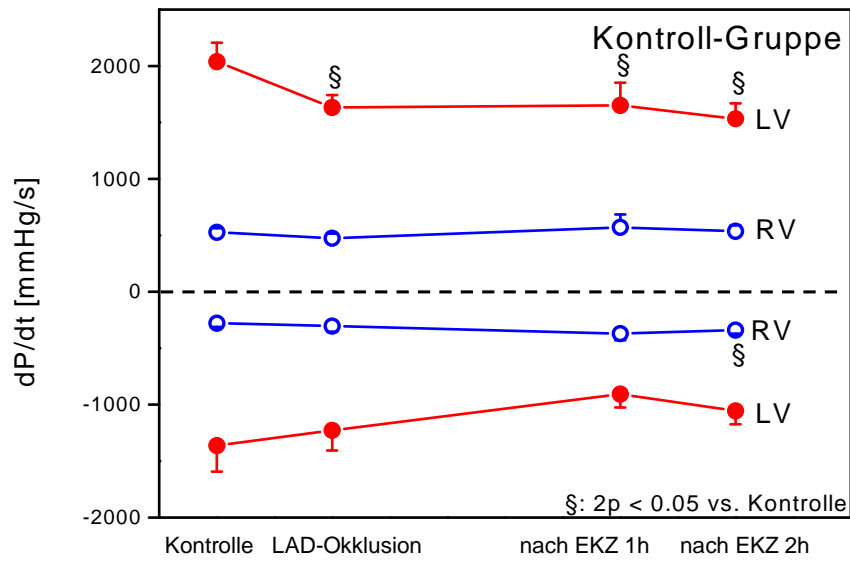
B.

Abbildung 4.5:

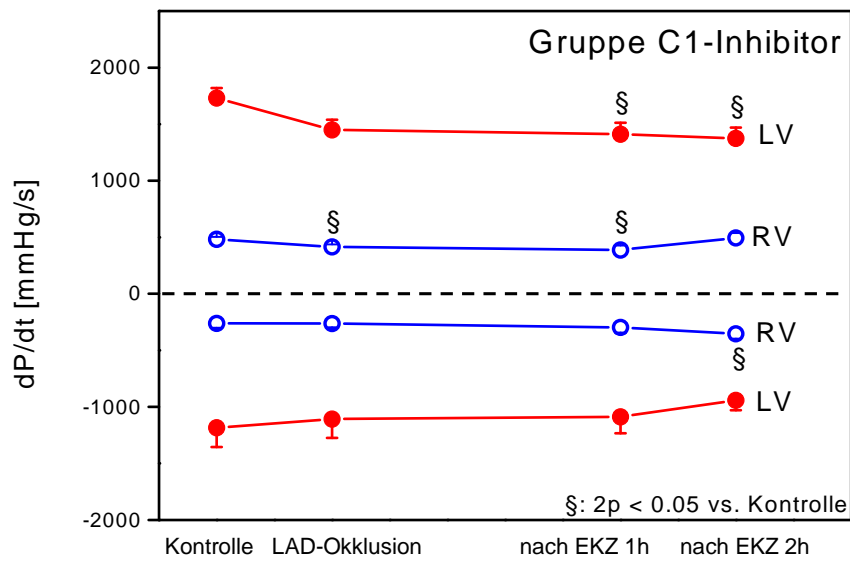
A. Endsystolischer Druck im linken und im rechten Ventrikel in der Kontrollgruppe

B. Endsystolischer Druck im linken und im rechten Ventrikel in der C1-INH Gruppe.

Die endsystolischen Drücke unterscheiden sich nicht in den zwei Gruppen. Bei beiden Gruppen ist aber der post-EKZ endsystolischer Druck im LV signifikant geringer als in der Kontrollmessung.



A.

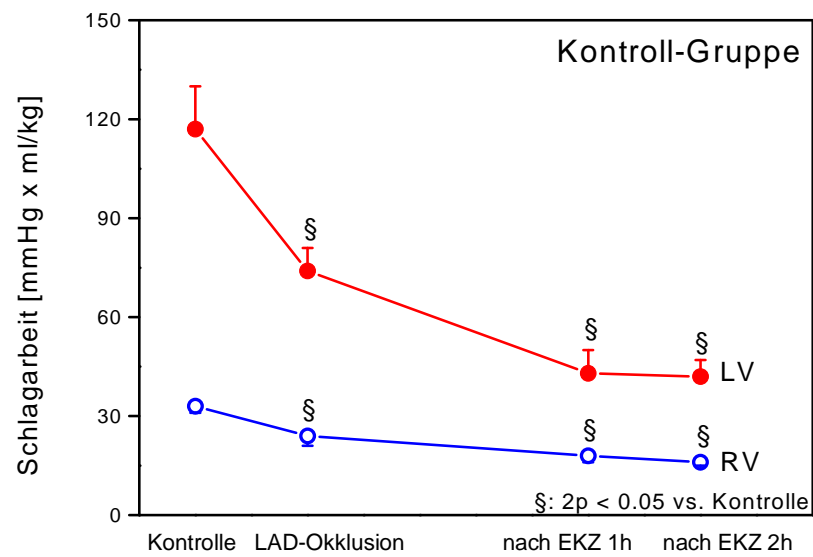


B.

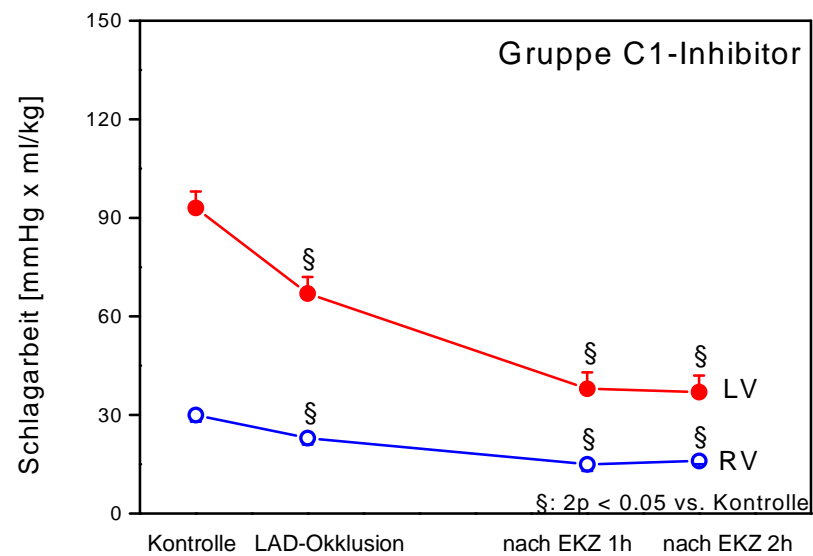
Abbildung 4.6:

- A. dP/dt_{max} und dP/dt_{min} im linken und im rechten Ventrikel in der Kontrollgruppe
 B. dP/dt_{max} und dP/dt_{min} im linken und im rechten Ventrikel in der C1-INH Gruppe

dP/dt_{min} und dP/dt_{max} haben einen ähnlichen Verlauf in beiden Gruppen. Ein signifikanter Unterschied ist nur zwischen den verschiedenen Messmomenten zu erkennen, nicht aber im Vergleich der beiden Tiergruppen.



A.

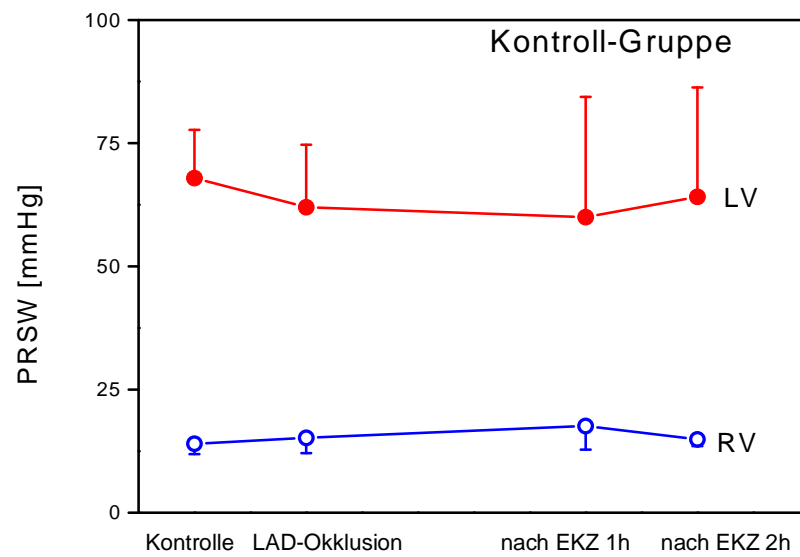


B.

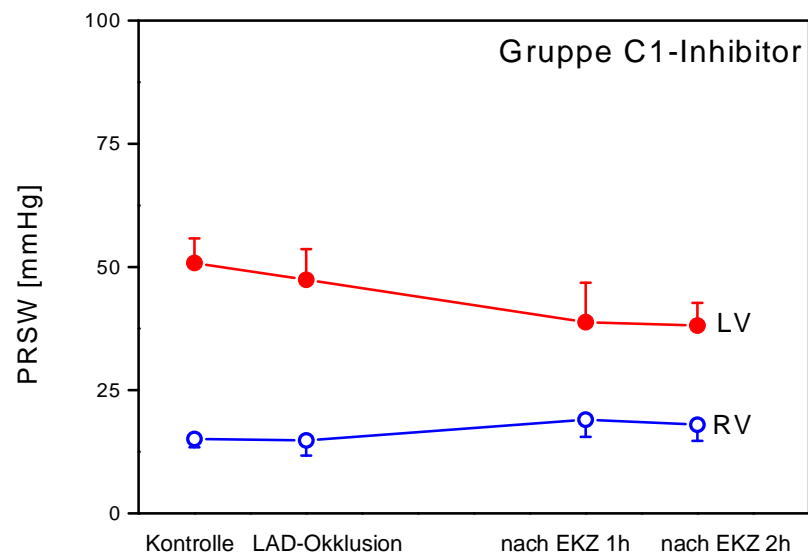
Abbildung 4.7:

- A. Schlagarbeit im linken und im rechten Ventrikel in der Kontrollgruppe
- B. Schlagarbeit im linken und im rechten Ventrikel in der C1-INH Gruppe

Die Schlagarbeit beider Ventrikel nimmt im Versuchsverlauf in beiden Tiergruppen signifikant ab. Ein signifikanter Unterschied zwischen den mit C1-INH therapierten Tieren und den Kontrolltieren ist aber nicht zu erkennen.



A.



B.

Abbildung 4.8:

A. PRSW im linken und im rechten Ventrikel in der Kontrollgruppe

B. PRSW im linken und im rechten Ventrikel in der C1-INH Gruppe

Bei der Berechnung des PRSW war in beiden Gruppen eine starke Streuung der Daten zu erkennen. Einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen konnten wir aber auch in diesem Fall nicht feststellen.

4.2. Koronarfluss- und Gewebs-pO₂ –Messung

Sowohl die Messungen Blutfluss über die Koronararterien (LAD, LCX) als auch die Messungen der myokardialen O₂ Partialdrücke wurden kontinuierlich durchgeführt. Ausgewertet wurden aber nur die Daten, die zu den vier Messzeitpunkten gehören. Es konnte kein signifikanter Gruppenunterschied für den Blutfluss in beiden Koronargefäßen eruiert werden. Auch für den O₂-Partialdruck ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar. Signifikante Unterschiede bestehen jedoch zwischen den vier Messzeitpunkten und sind anhand der Graphen beschrieben.

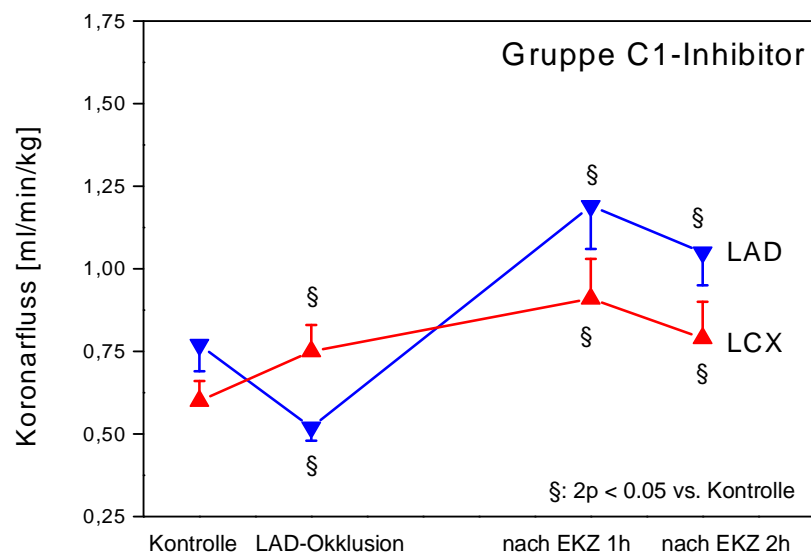
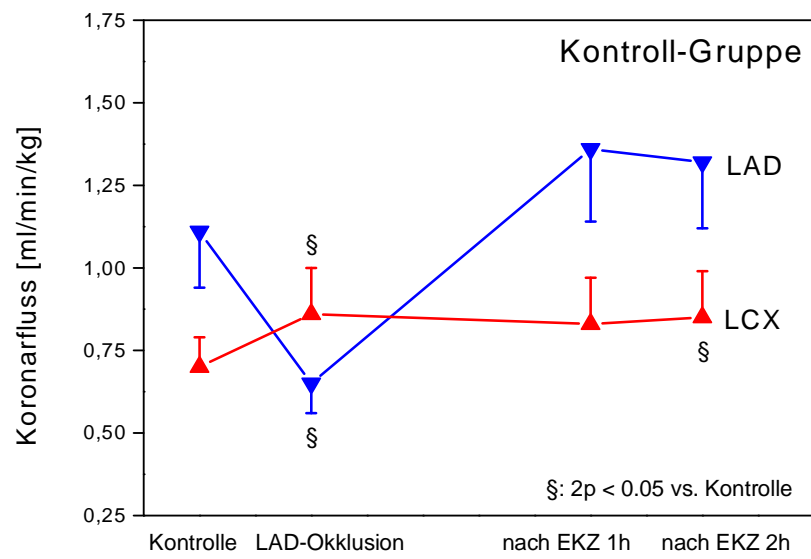


Abbildung 4.9:
Koronarflussdiagramme über LAD und LCX in den zwei Gruppen. § = signifikanter Unterschied zur Kontrolle

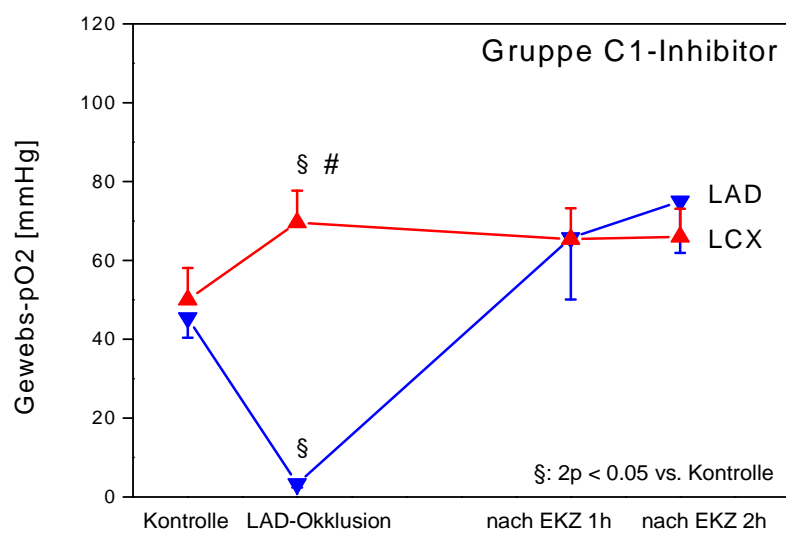
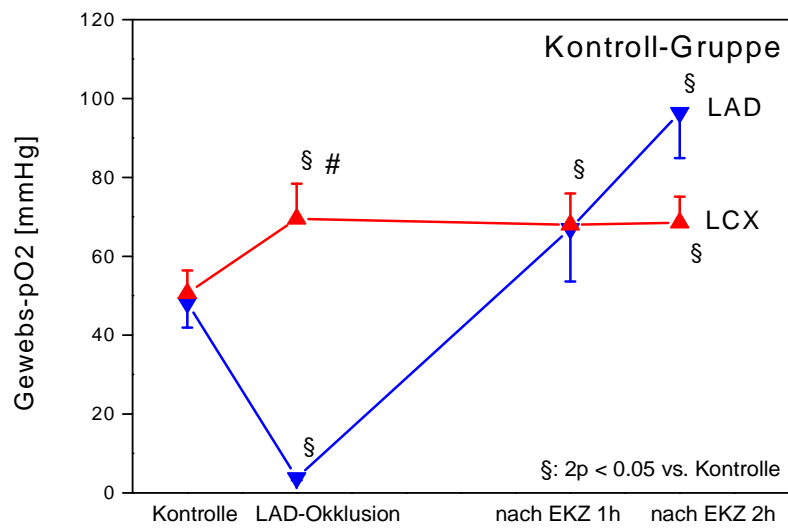


Abbildung 4.10:

O₂-Partialdruckdiagramme des Myokards im LAD- und LCX-Versorgungsgebiet in den zwei Gruppen. § = signifikanter Unterschied zur Kontrolle; # = signifikanter Unterschied zwischen LCX und LAD O₂-Partialdruck

4.3. Relation zwischen Infarktfläche und AaR

Das Infarktareal wurde als Prozent der AaR angegeben und die AaR als Prozent der Gesamtfläche der Herzscheiben. Es ergaben sich aus unseren Messungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Gruppen, sowohl bei der AaR als auch bei der Infarktfläche. Eine Signifikanz konnte im Vergleich der AaR zum Infarktareal in beiden Gruppen nachgewiesen werden ($2p < 0,05$).

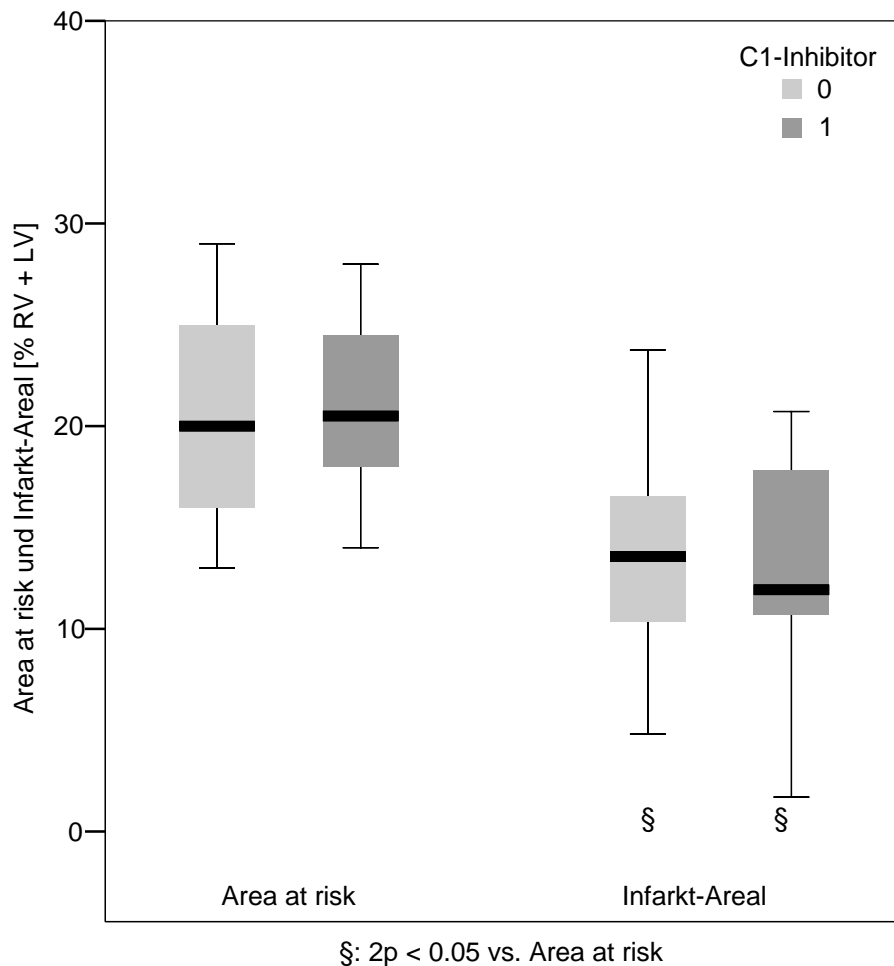


Abbildung 4.11:
C0 = Kontrollgruppe; C1 = Berinertgruppe

4.4. Regionale Gewebsperfusionmessung

4.4.1. Infarktareal

Die Perfusionsbestimmung im Infarktareal ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen. Ein signifikanter Unterschied ($2p < 0,05$) ist in beiden Gruppen zwischen den ersten zwei Messzeitpunkten gegeben, Kontrolle vs. Messung nach Okklusion der LAD.

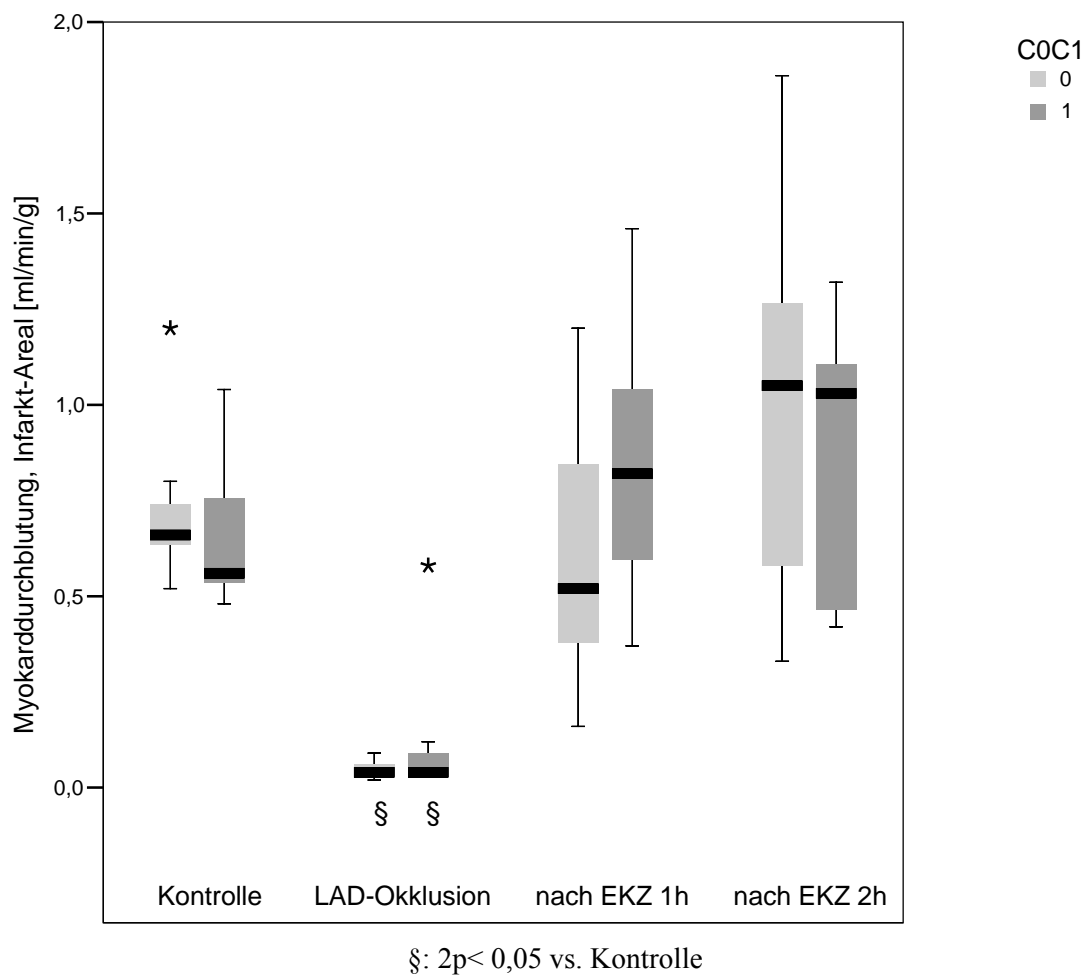


Abbildung 4.12:

C0 = Kontrollgruppe; C1 = Berinertgruppe

Die vier Zeitpunkte der Messung sind Kontrolle, nach LAD Okklusion, eine Stunde nach EKZ und zwei Stunden nach EKZ. * sind Ausreißer.

4.4.2. Area at risk (AaR)

Die Perfusionsbestimmung in der Area at Risk ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen. Ein signifikanter Unterschied ($2p < 0,05$) ist in beiden Gruppen zwischen den ersten zwei Messzeitpunkten gegeben, Kontrolle vs. Messung nach Okklusion der LAD und in der Berinertgruppe zwischen dem dritten Messzeitpunkt (eine Stunde nach EKZ) und der Kontrollmessung.

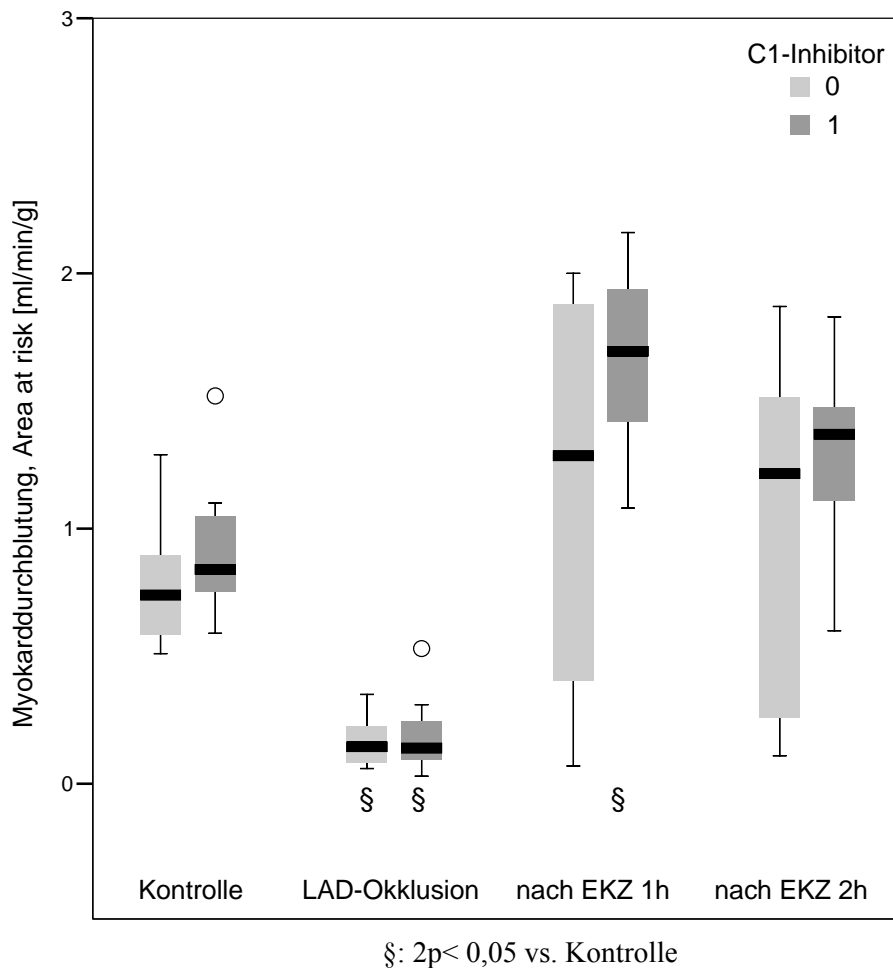


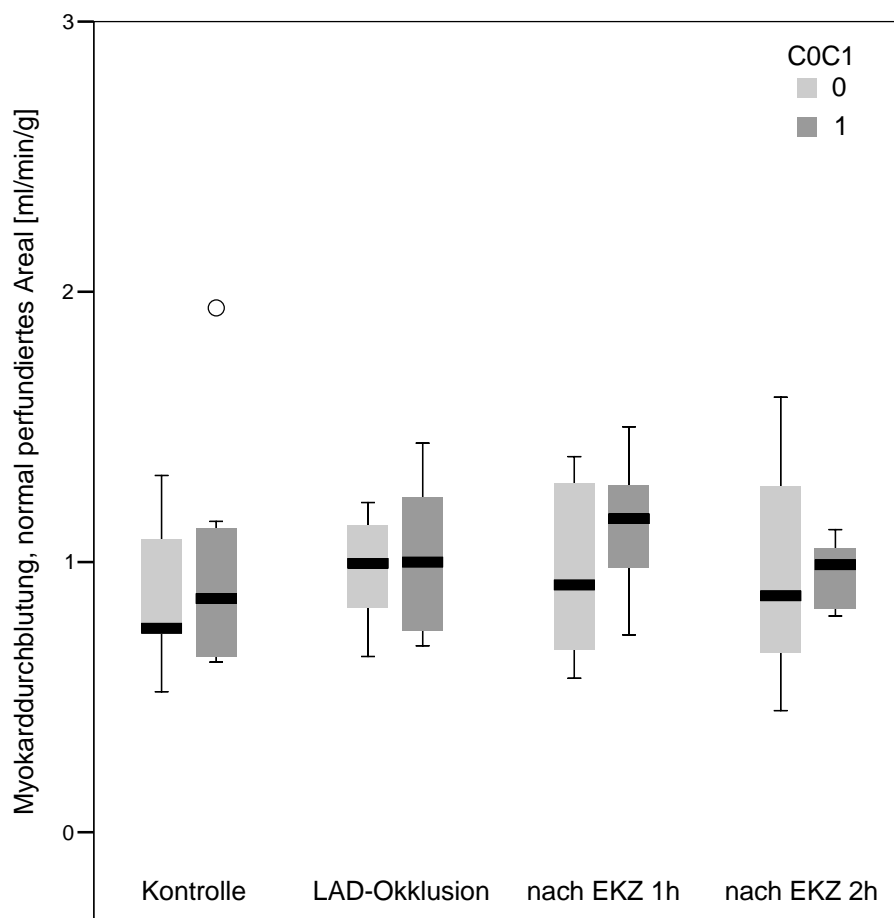
Abbildung 4.13:

C0 = Kontrollgruppe; C1 = Berinertgruppe

Die vier Zeitpunkte der Messung sind Kontrolle, nach LAD Okklusion, eine Stunde nach EKZ und zwei Stunden nach EKZ. O sind Ausreißer.

4.4.3. Normal perfundiertes Myokard

Die Perfusionsbestimmung im perfundiertem Myokardareal ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen, oder zwischen den vier Messzeitpunkten.



keine signifikanten Unterschiede 1 vs. 0 und X vs, Kontrolle

Abbildung 4.14:

C0 = Kontrollgruppe; C1 = Berinertgruppe

Die vier Zeitpunkte der Messung sind Kontrolle, nach LAD Okklusion, eine Stunde nach EKZ und zwei Stunden nach EKZ

4.4.4. Endo-/Epikardiale Perfusion

Im normal perfundiertem Myokard fand sich in beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied zwischen endo- und epikardialer Durchblutung zu allen vier Messzeitpunkten.

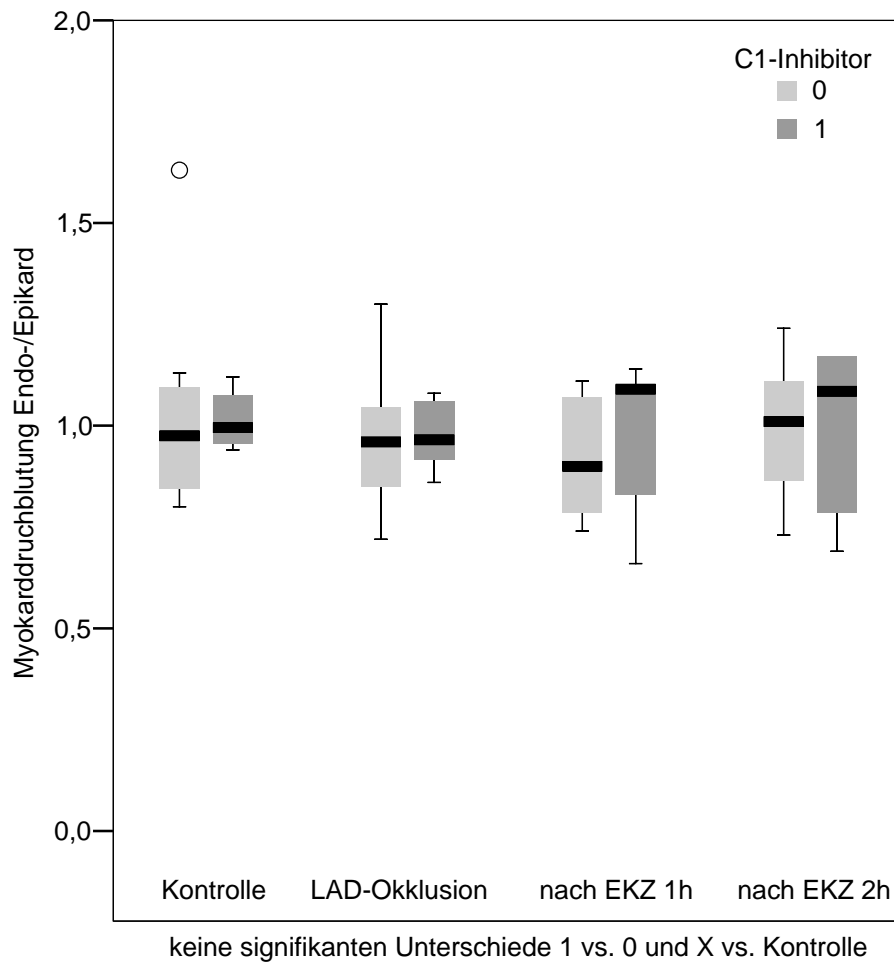


Abbildung 4.15:

C0 = Kontrollgruppe; C1 = Berinertgruppe

Die vier Zeitpunkte der Messung sind Kontrolle, nach LAD Okklusion, eine Stunde nach EKZ und zwei Stunden nach EKZ

4.4.5. Nierenrinde

Die Perfusionsbestimmung in der Nierenrinde ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen, und zwar war die Durchblutung eine Stunde nach EKZ in der C1-INH Gruppe signifikant ($p < 0,05$) besser als in der Kontrollgruppe. Außerdem ist ein signifikanter Unterschied ($2p < 0,05$) in beiden Gruppen zwischen den letzten zwei Messzeitpunkten (eine und zwei Stunden nach EKZ) und der Kontrollmessung gegeben.

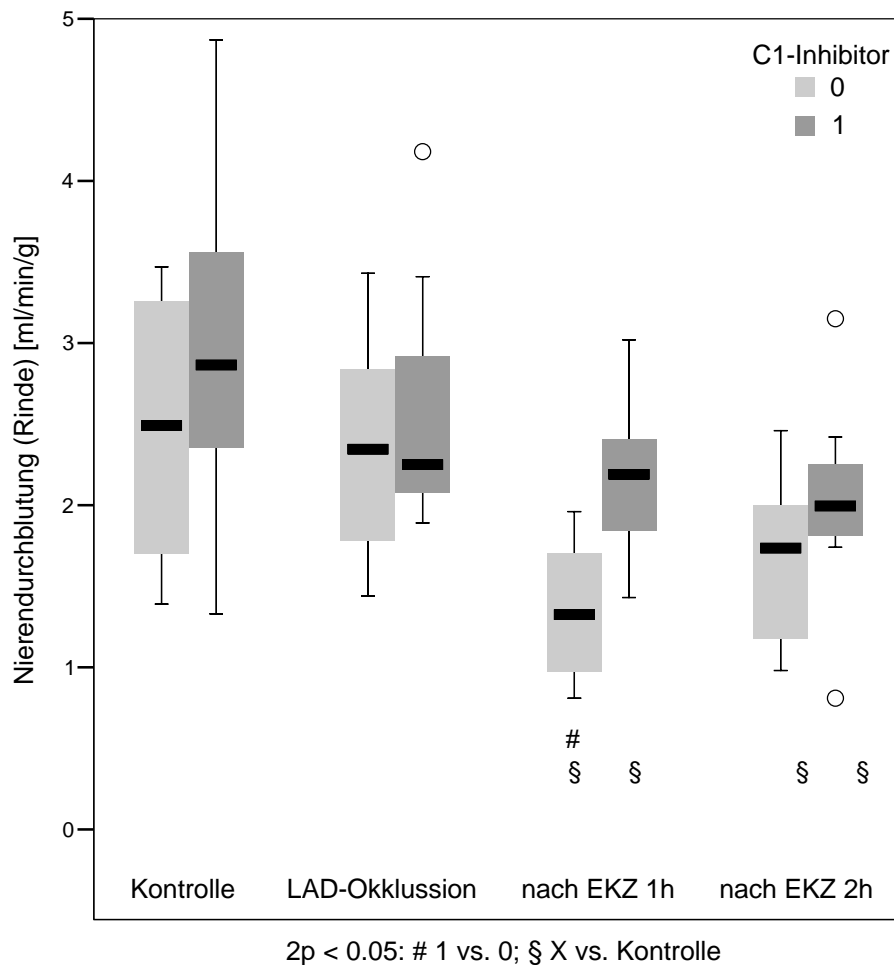


Abbildung 4.16:

C0 = Kontrollgruppe; C1 = Berinertgruppe

Die vier Zeitpunkte der Messung sind Kontrolle, nach LAD Okklusion, eine Stunde nach EKZ und zwei Stunden nach EKZ

4.4.6. Dünndarm

Die Perfusionsbestimmung im Dünndarmgewebe ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen oder den vier Messzeitpunkten.

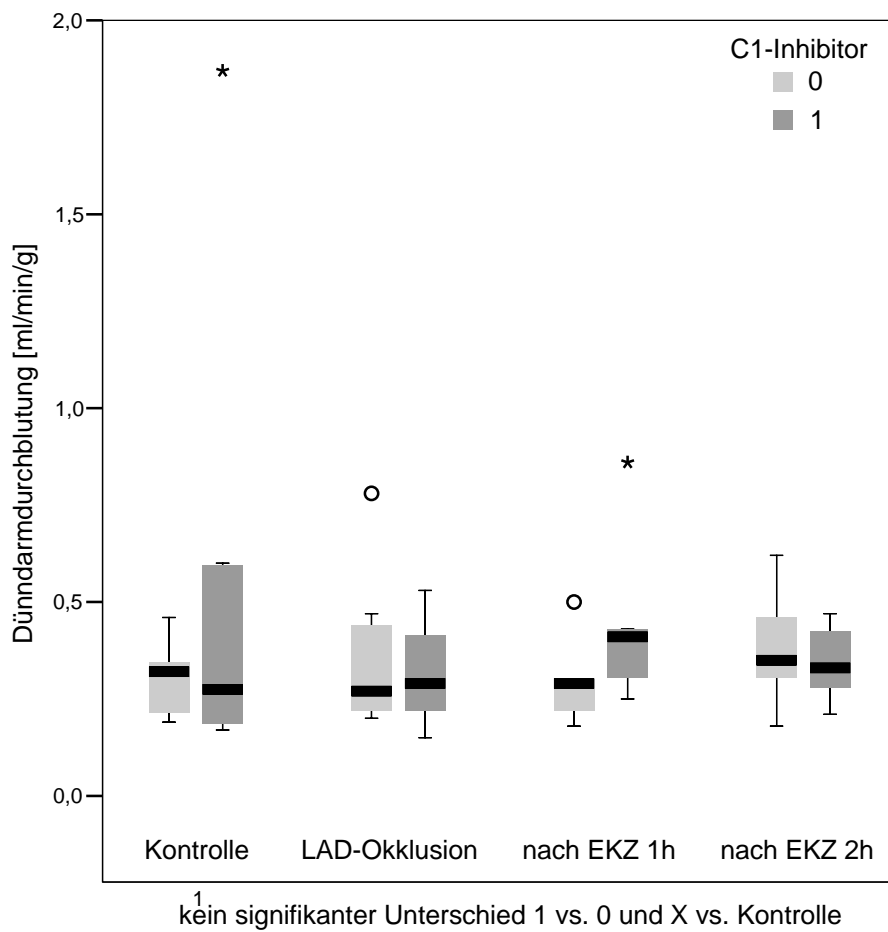


Abbildung 4.17:

C0 = Kontrollgruppe; C1 = Berinertgruppe

Die vier Zeitpunkte der Messung sind Kontrolle, nach LAD Okklusion, eine Stunde nach EKZ und zwei Stunden nach EKZ

5. Diskussion

Sowohl bei systemischer als auch bei lokaler, intrakoronarer Applikation des C1-INH (Berinert) konnten wir in unserem experimentellen Tiermodell einer passageren Okklusion einer Koronararterie keine Verbesserung der Myokardfunktion und keine Verminderung des Infarktareales nachweisen. Unsere Ergebnisse stehen nicht im Einklang mit denen aus anderen experimentellen oder klinischen Vorarbeiten.

Obwohl bekannt ist, dass die frühe Reperfusion in einem ischämischen Areal die wichtigste Voraussetzung für das Überleben des Gewebes ist, wurde in mehreren experimentellen Studien bewiesen, dass parallel auftretende Mechanismen zumindest einen Teil der ischämischen Myozyten, die bei Beginn der Reperfusion noch vital sind, weiter schädigen können. Zu diesen zusätzlichen Noxen und pathophysiologischen Phänomenen gehören unter anderem die Ca^{2+} -Überladung (Herzog WR, 1997), die hochreaktiven Sauerstoffradikale (Asano G, 2003) und die Ansammlung von neutrophilen Granulozyten (Tsao PS, 1990). Eine besonders wichtige Rolle in der komplexen Schädigungskette aber spielt die Aktivierung des Komplementsystems (Hill JH, 1969). Aus diesem Grund konzentrierten sich mehrere Arbeitsgruppen auf eine Hemmung der Komplementkaskade.

Die Vorteile einer Inhibition der Komplementaktivierung durch das Glykopeptid C1-Esterase Inhibitor (C1-INH) bestehen in einer gleichzeitigen Hemmung aller drei möglichen Aktivierungswege, des klassischen, des alternativen und des Lektin Weges (siehe 1.3.2.).

Die Komplementinhibition wurde sowohl in *in vitro* (Shandelaya SM, 1993), als auch in mehreren *in vivo* (Weisman HF, 1990; Gillinov AM, 1993; Buerke M, 1995; Horstick G, 1997) Modellen von Myokardischämie und Reperfusion untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien konnten eine Verbesserung der hämodynamischen Parameter und eine Verminderung des Infarktareales nach Hemmung der Komplementkaskade aufweisen. Des Weiteren konnte auch nach klinischen Erfahrungen eine Effektivität der Komplementinhibition nachgewiesen werden (Bauernschmitt R, 1998).

5.1. Volumetrie und biventrikuläre Druck-Volumen Relation

Der Grund weshalb wir zur Beurteilung der Herzfunktion als Zusatz zu den konventionellen Methoden die Conductance-Technik wählten, besteht in der Objektivität und Genauigkeit der Erfassung der Funktionsveränderungen durch diese Methode. Die erhobenen Parameter beschreiben nicht nur die Kontraktilität, sondern auch die Relaxation und die globale Pumpfunktion des Myokards.

Um die Funktion beider Ventrikel beurteilen zu können, verwendeten wir in unserem Versuch zwei Katheter, die dementsprechend im linken und rechten Ventrikel platziert wurden. Wir führten, wie in Kapitel 3 beschrieben, vier Messungen durch. Dabei versuchten wir jedes Mal die Datenerhebung im Sinusrhythmus durchzuführen um so störende Artefakte zu vermeiden.

Wir konnten eine Verschlechterung der linksventrikulären Herzfunktion nach Ischämie und Reperfusion in beiden Gruppen erkennen. Sowohl die Schlagarbeit als auch die Geschwindigkeit der Druckentwicklung (dp/dt_{max}) nehmen im Versuchsverlauf signifikant ab (siehe Abbildung 4.6. und 4.7.). Des Weiteren erkannten wir eine signifikante Abnahme des endsystolischen Druckes im linken Ventrikel nach Ischämie (siehe Abbildung 4.5.).

Durch die Erhebung der hämodynamischen Daten des rechten Ventrikels bestätigte sich der intraoperative Befund der gleichzeitigen Verhärtung und Complianceverminderung dieser Herzkammer nach Ischämie. Die Relaxationsgeschwindigkeit (dp/dt_{min}) des rechten Ventrikels nahm nach 120 Minuten Reperfusion signifikant ab (siehe Abbildung 4.6.).

Trotz dieser Daten konnten signifikante Unterschiede zwischen den zwei Therapiegruppen nicht erkannt werden.

5.2. Koronarfluss- und Gewebs-pO₂-Messungen

Eine interessante Beobachtung, die wir bei der Auswertung machten, ist das Verhältnis Fluss/ P_{ti}O₂ im LAD-Versorgungsbereich (Ischämieareal) in den zwei Gruppen. Dabei erkennt man, dass in der Kontrollgruppe der Fluss über die LAD eine Stunde nach Reperfusionbeginn nicht signifikant erhöht war gegenüber der Kontrollmessung, während der P_{ti}O₂ zum selben Messzeitpunkt signifikant erhöht war im Vergleich zur Kontrollmessung. In der C1-INH-Gruppe ist es genau umgekehrt. Die Messung eine Stunde nach Reperfusionbeginn zeigt einen signifikant erhöhten LAD-Fluss im Vergleich zur Kontrolle, während der P_{ti}O₂ Wert keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollmessung aufweist. Daraus können wir schließen, dass das geschädigte Myokard in der C1-INH Gruppe das Sauerstoffangebot erheblich besser verwerten konnte und dementsprechend einen größeren Anteil an noch vitalen Myozyten enthielt.

5.3. Relation zwischen Infarktfläche und AaR

Die durch Planimetrie bestimmten Infarkt- und AaR-Areale zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tiergruppen. Die Richtigkeit der Messungen wird, wie erwartet, durch einen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen AaR- und Infarktareal in beiden Gruppen bestätigt.

Dadurch dass, die Auswertung der digitalen Fotos nicht automatisch erfolgte, sondern die gesuchten Flächen von einem Untersucher ausgemessen wurden, besteht bei dieser Methode eine gewisse Abhängigkeit vom Untersucher. Um diesen Störfaktor so weit wie möglich zu minimieren, erfolgte die Ausmessung der Flächen nach einem zuvor festgelegten Schema und wurde von einer einzigen Person durchgeführt. Wir wählten nur rotes Gewebe als nicht perfundiert und nur weißes Gewebe als infarziertes Myokard. Desweiteren wurden Papillarmuskelflächen mit eingerechnet, während epikardiales Fettgewebe nicht berücksichtigt wurde.

Wichtig zu erwähnen ist, dass wir nach Einlegen des Gewebes in die TTC-Lösung, eine Strukturveränderung, im Sinne einer Schrumpfung bemerkten. Um diese Veränderung beim

Flächenvergleich in Betracht ziehen zu können, wurde bei unseren Rechnungen ein Schrumpfungsfaktor (S) bestimmt.

Nach Auswerten der Ergebnisse konnten wir keinen Anhalt für methodische Fehler erkennen.

5.4. Ergebnisse der RGP-Messung

Die Mikrosphärenmessung ist eine etablierte Methode zur Bestimmung des regionalen Blutflusses. Die Untersuchung erlaubt genaue Aussagen über die Durchblutung auf mikrovaskulärer Ebene, die in der Pathophysiologie des Ischämie- und Reperfusionsschadens eine wichtige Rolle spielt. Wir untersuchten aber nicht nur das Myokard mit dieser Methode, sondern auch Dünndarm und Nierenrinde. Es ist zu erwarten, dass die Perfusion dieser Organe durch eine Veränderung der hämodynamischen Parameter nach Myokardinfarkt und Reperfusion eingeschränkt wird.

In einigen Versuchen machten wir eine interessante Beobachtung bei der Auswertung der Daten die während der dritten Mikrosphäreninjektion erhoben wurden. Dabei ergaben die Messungen der Gewebepfusion eine minimale Durchblutung die in starkem Gegensatz zu den externen Flussmessungen stand. Nach überprüfen der zu diesem Zeitpunkt erhobenen hämodynamischen Werte erkannten wir, dass sich nach Eröffnen der Aorta und bis zur Injektion der mit der Farbe crimson markierten Mikrosphären die Pumpfunktion der Herzen unterschiedlich erholt hatte. Das hatte als Folge eine steigende linksventrikuläre Ejektionsfraktion bei manchen Tieren. Dadurch konnten die in der Aortenkanüle injizierten Mikrosphären nicht retrograd in Richtung Koronarostien fließen. Demzufolge wurde diese Messung als ungenau erkannt und die erhobenen Daten wurden nicht in den Ergebnissen dargestellt.

Unsere Ergebnisse konnten aber auch durch diese Methode die Schlussfolgerungen anderer Studiengruppen nicht unterstützen. Wir konnten auch im Falle der regionalen RGP-Messung keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Tiergruppen erkennen. Lediglich bei der Messung der Fluoreszenz der Nierenrinde eine Stunde nach EKZ konnte ein signifikant besserer Blutfluss in der C1-INH Gruppe bestimmt werden (siehe 4.5.5.).

5.5. Bisherige experimentelle Modelle und Unterschiede zu unserem Tiermodell

Früheren Studien, die eine Inhibition der Komplementaktivierung bei Myokardischämie gefolgt von Reperfusion als Ziel hatten, fehlte der klinische Zusammenhang, der bei unserem Modell eine Voraussetzung für den Experimentverlauf darstellte.

In einer *in vitro* Studie an Rattenherzen konnten 1993 Shandelya et al. nachweisen, dass die Komplementinhibition durch die Gabe des genetisch manipulierten Proteins, „soluble complement receptor 1“ (sCR1), die postischämische Kontraktilität des LV signifikant verbessert. Dabei wurden isolierte Rattenherzen nach der Methode von Langendorff perfundiert, einer zwanzigminütigen globalen Ischämiephase ausgesetzt, und postischämisch für 45 Minuten mit polymorphonuklearen Leukozyten (PMNs) und Plasma reperfundiert. Die Autoren beobachteten, dass sCR1 als Komplementinhibitor die Aktivierung der PMNs hemmte, was sekundär die Freisetzung freier O₂-Radikale einschränkte und dadurch den Reperfusionsschaden verminderte (Shandelya SML, 1993). Da es sich in diesem Fall aber um ein *in vitro* Modell handelt mit einer Ischämiezeit von nur zwanzig Minuten, ist aus unserer Sicht die klinische Relevanz dieser Studie eingeschränkt.

Weismann et al. beobachtete in einem *in vivo* Rattenmodell mit ähnlichem Studiendesign, dass nach Ischämie und Reperfusion das Infarktareal in der Gruppe der sCR1-Ratten um 44% geringer war als in der Kontrollgruppe (Weisman HF, 1990). An einem weiteren Rattenmodell mit zwanzigminütiger Koronarokklusion und vierundzwanzigstündiger Reperfusion untersuchten Murohara et al. die Wirkung des C1-INH (100IE/kgKG) und des sCR1 auf die Myokardnekrose. Dabei wurde der Inhibitor immer eine Minute vor Reperfusionbeginn zugeführt. Die Autoren beschrieben eine signifikante Verminderung der CK-Aktivität in den Gruppen der zwei Komplementinhibitoren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Murohara T., 1995). Die klinische Relevanz dieser Studie ist aber nur aus interventioneller Sicht gegeben, da die Autoren auf eine Kardioplegie mit EKZ verzichteten.

In weiteren Studien am Schweinemodell konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Komplementkaskade und der dadurch ausgelösten Entzündungsreaktion eine positive Auswirkung auf die Funktion des reperfundierten, postischämischen Myokard hat.

Lazar et al. wählte 1998 ein Schweinemodell, bei dem der zweite und dritte Diagonalast der LAD okkludiert wurden. Nach einer neunzigminütigen Ischämie folgte eine fünfundvierzigminütige Kardioplegie mit EKZ, gefolgt von 180 Minuten Reperfusion. Bei 10 von 20 Tieren wurden 30 Minuten vor Okklusion der Koronarien 10 mg/kgKG sCR1 infundiert, während der Rest zur Placebogruppe gehörte. Dabei konnte beobachtet werden, dass es in der sCR1-Gruppe nach 180 Minuten Reperfusion zu einer geringeren Komplementaktivierung kam (1,1 +/-0,09% versus 7,8 +/-0,04%). Des Weiteren war die Infarktgröße signifikant geringer in der sCR1-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (24,6 +/- 2,0% versus 41 +/- 1,3%) (Lazar HL, 1998). Ähnliche Ergebnisse erzielte diese Forschungsgruppe ein Jahr später in einem ähnlichen Modell. Vierzig Schweine wurden in vier Therapiegruppen unterteilt. Die erste Gruppe erhielt fünf Minuten nach der Koronarokklusion sCR1, die zweite Gruppe bekam keinen Komplementinhibitor sondern nur eine EKZ mit Heparinisierung ohne Kardioplegie, die dritte Gruppe bekam sowohl den Inhibitor als auch die unter Heparinisierung durchgeführte EKZ, während die letzten 10 Schweine keine Therapie erhielten. Die Okklusionszeit der Koronarien war auch dieses Mal 90 Minuten, gefolgt von 45 Minuten EKZ und 180 Minuten Reperfusion. Dabei beschrieben die Autoren eine signifikant verminderte Myokardnekrose in der sCR1+HepEKZ-Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen. Des Weiteren waren die Ergebnisse auch in den anderen zwei Therapiegruppen signifikant besser als in der Kontrollgruppe (Lazar HL, 1999).

In den Modellen von Lazar et al. wurde die Injektion des Komplementinhibitors entweder 30 Minuten vor der Koronarokklusion (Lazar H.L., 1998), oder fünf Minuten danach (Lazar HL, 1999) durchgeführt, was im klinischen Alltag überhaupt nicht nachzuvollziehen ist. Im Gegensatz dazu wurde in unserem Versuch C1-INH erst eine Stunde nach Verschluss der LAD und eine Stunde vor Revaskularisation appliziert.

Buerke et al untersuchten die Wirkung der Komplementinhibition auf den Ischämie- und Reperfusionsschaden an Katzen. Die Ischämiezeit betrug 90 Minuten gefolgt von einer Reperusionsperiode von 270 Minuten. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe wurden den therapierten Tieren 15 mg/kgKG C1-INH zehn Minuten vor der Reperfusion appliziert. Die Autoren beschrieben ein signifikant geringeres Infarktareal (Prozent der AaR) in der C1-INH Gruppe (10 +/- 2% versus 29 +/- 2%). Des Weiteren war nach der Therapie mit dem Inhibitor die PMN Akkumulation in dem ischämischen Areal signifikant geringer (Buerke M., 1995). In einer zweiten Studie der selben Forschungsgruppe wurde die Wirkung von C1-INH in einem Rattenmodell nach Ischämie und Reperfusion beobachtet. Die Ischämiezeit betrug 20 Minuten,

gefolgt von einer Reperfusionperiode über 24 und 48 Stunden. Die Medikamentendosis von 10, 50, 100 U/kgKG wurde zwei Minuten vor der Reperusionszeit injiziert. Auch in dieser Untersuchungsreihe beschreiben die Autoren die positive Auswirkung des Inhibitors auf den Myokardschaden und auf die Ansammlung der PMN im betroffenen Myokard (Buerke M., 1998).

Horstick et al. untersuchten 1997 die Wirkung des C1-INH in einem Schweinemodell, bei dem einer sechzigminütigen Koronarokklusionszeit 120 Minuten Reperfusion folgten. Die C1-INH Gabe erfolgte in den ersten fünf Minuten nach Eröffnen des okkludierten Koronargefäßes in einer Dosis von 20 IE/kgKG des Tieres. In der Gruppe der C1-INH Tieren konnte eine signifikante Verminderung des nekrotischen Areals in Vergleich zu den Kontrolltieren nachgewiesen werden (48,8 +/- 7,8% versus 73,4 +/- 4,0%). Des Weiteren konnte eine Reduktion der Plasmakonzentration verschiedener Komplementfaktoren (C3a und C5a) nachgewiesen werden. Obwohl eine Verbesserung der hämodynamischen Parameter nicht zu erkennen war, verbesserte sich in der Inhibitorgruppe die lokale Kontraktilität des ischämischen Myokards begleitet von einer verminderten plasmatischen Enzymaktivität (CK und Troponin-T) (Horstick G, 1997). In einem weiteren Schweinemodell ohne EKZ, wurde die Okklusionszeit der Koronarien auf 60 Minuten angesetzt, gefolgt von einer Reperfusion über zwei Stunden. Fünf bis zehn Minuten vor Reperfusion der Koronarien wurden den Tieren entweder nur NaCl oder 40, 100 und 200 IE/kgKG C1-INH iv appliziert. Überraschenderweise zeigte nur die erste C1-INH-Gruppe (40 IE/kgKG) eine signifikant verminderte Infarktgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe (44,1 +/- 13,8% versus 76,7 +/- 4,6%). In der 100 IE/kgKG-Gruppe konnten keine therapeutischen Vorteile erkannt werden. In der Gruppe mit der höchsten Dosis (200IE/kgKG) wurden sogar starke Nebenwirkungen der Therapie erkennbar. Die Autoren schließen daraus, dass die Dosierung eine wichtige Rolle zum Erreichen der therapeutischen Ziele spielt (Horstick G, 2001).

Die Versuchmodelle von Horstick und Buerke waren näher an einem klinisch reellen Verlauf als die von Lazar, da die Injektion des Inhibitors fünf Minuten vor und fünf Minuten nach Reperusionsbeginn, bzw. zehn und zwei Minuten vor Reperusionsbeginn durchgeführt wurde. Die klinische Relevanz ist aber auch in diesen Fällen auf eine interventionelle Revaskularisation eingeschränkt, da die Autoren auf eine Kardioplegie mit EKZ verzichteten (Horstick G, 1997 und 2001; Buerke M, 1995 und 1998). Im Gegensatz dazu versuchten wir einen klinisch relevanten Verlauf darzustellen. Wir entwarfen das Versuchsprotokoll nach dem Ereignis eines akuten Myokardinfarkts mit nachfolgender chirurgischer Revaskularisation mit Kardioplegie und EKZ. Im Gegensatz zu anderen Versuchsgruppen entwöhnten wir nach 90 Minuten unsere Tiere von der

EKZ. Nach Entwöhnen vom kardiopulmonalem Bypass beobachteten wir die Versuchstiere noch weitere zwei Stunden. Außerdem wäre noch wichtig zu erwähnen, dass die Okklusionszeit der Koronararterie in unserer Versuchsreihe 120 Minuten dauerte, in Vergleich zu 20, 45 oder 60 Minuten in den diskutierten Vorversuchen.

5.6. Limitierungen und Vorteile des Studiendesigns

Im Gegensatz zu anderen Studien wurde in unserer Versuchsreihe zwar die Therapie mit dem Komplementinhibitor durchgeführt, auf eine Kontrolle der Aktivität der Komplementkaskade durch laborchemische Untersuchungen wurde aber verzichtet. Im Vergleich dazu, führten andere Gruppen Messungen unterschiedlicher Parameter der Komplementkaskade durch. Demzufolge bestimmten sie die C3a, C5a und die C1q Aktivität (Buerke M., 1995/1998; Horstick G., 1997/2001; Lazar H.L. 1999). Durch den Verzicht auf diese Messungen konnten wir nicht beobachten ob und wann eine Komplementaktivierung stattfand und ob es nach Inhibition der Komplementkaskade doch noch zur Verminderung des Reperfusionsschadens kam.

In den beschriebenen Studien wurde außerdem der Infarktverlauf durch Enzymbestimmungen (Creatinkinase und Troponin-T) beobachtet (Horstick G., 1997/2001). Wir dagegen, haben den Zellzerfall nicht laborchemisch dokumentiert. Wir verzichteten in unserem Studiendesign auch auf die Messungen der PMN-Aktivität (Buerke M., 1995/1998), was ein weiterer Parameter für die Bestimmung des Myokardschadens nach Ischämie und Reperfusion darstellt.

In unserer ersten Versuchsreihe (Schreiber C, 2006) wurde der C1-INH kurz vor dem Perfusionsbeginn, d.h. 120 Minuten nach LAD-Verschluss in die Aortenwurzel injiziert. Da die Ergebnisse keine Verbesserung der Myokardfunktion und keine Verminderung des Infarktareals erbrachten, gingen wir davon aus, dass die Hemmungsmaßnahmen zu spät nach der Komplementaktivierung zum Einsatz kamen. Demzufolge versuchten wir in unserer zweiten Versuchsreihe den C1-INH 30 Minuten früher zu injizieren. Des Weiteren erfolgte die Inhibitorgabe nicht lokal, wie in der ersten Versuchsreihe, sondern systemisch und in einer höheren Dosis (25 IE/kgKG).

Im Gegensatz zu anderen Studien, bei denen nur die konventionellen hämodynamischen Parameter bestimmt wurden, führten wir in unserer Versuchsreihe ein genaues Funktionsmonitoring beider Ventrikel durch die Conductance Methode durch. Dabei konnten wir nach Ischämie und Reperfusion eine Einschränkung, vor allem der linksventrikulären, aber im gewissen Maß auch der rechtsventrikulären Funktion objektiv messen. Diese Funktionseinschränkung wurde ähnlich in beiden Tiergruppen beobachtet. Die Triphenyltetrazoliumchlorid-EvansBlue-Methode bestätigte die Conductance Katheter Messungen. Um die Mikrozirkulationstörungen nach Ischämie und Reperfusion besser beurteilen zu können, und um eine genaue Perfusionsmessung in den betroffenen Myokardarealen durchführen zu können, beschlossen wir in der zweiten Versuchsreihe, die Fluoreszenzmessung anzuwenden. Die Methode bestätigte die Ergebnisse der anderen Messungen.

Unser Studiendesign wies einerseits die größte klinische Relevanz auf, führte aber andererseits zu einem komplexeren pathophysiologischen Verlauf. Die EKZ wird mit dem „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) in Zusammenhang gebracht, weswegen die EKZ auch als Trigger für die Komplementaktivierung steht (Kirklin J.K., 1983). Demzufolge wurde von Chai et al bewiesen, dass eine Inhibition der Komplementkaskade zur Einschränkung des post-EKZ-Syndroms führt (Chai PJ, 2000). Diese Ergebnisse konnten aber von unseren Daten nicht bestätigt werden. In unserem Fall wurde aber die Komplementaktivierung durch zwei Faktoren ausgelöst: erstens durch die Myokardischämie gefolgt von der Reperfusion und zweitens durch die EKZ. Daraus entsteht die Überlegung die Inhibitorgabe früher und/oder in einer höheren Dosierung durchzuführen. Eine Injektion nach der Koronarokklusion, aber noch vor dem EKZ-Beginn, könnte zu einer besseren Blockierung der Immunreaktion führen und dadurch zu einem vermindertem Zellschaden.

6. Schlussfolgerung

In einem Tiermodell (Schweine), das eine chirurgische Revaskularisation nach Myokardinfarkt durch Einsatz der EKZ mit Kardioplegie simulierte, führte die Gabe des Komplementinhibitors C1-INH nicht zu einer Verkleinerung des Infarktareals und auch nicht zu einer Verbesserung der postoperativen Myokardfunktion. Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede in der Mikrozirkulation beider Tiergruppen beobachtet werden. Möglich ist, dass die Inhibitorinjektion zu einem zu späten Zeitpunkt oder in einer zu geringen Dosierung gegeben wurde, was eine Hemmung der schon aktivierten Komplementkaskade nicht mehr ermöglichte. Deswegen bleibt weiterhin offen, ob ein anderes Studiendesign mit einer früheren Inhibitorgabe zu einer Verminderung des Myokardschadens nach Ischämie und Reperfusion führen könnte. Desweiteren könnte man durch die Bestimmung mehrerer Komplementkaskadenparameter im Serum beobachten ob die gewählte Inhibitor-dosis überhaupt zu einer Hemmung der Komplementkaskade führt.

7. Zusammenfassung

Wir untersuchten in unserer Studie am Schweinemodell die Wirkung des C1-Esterase Inhibitors Berinert auf den Ischämie- und Reperfusionsschaden am Myokard. Dabei versuchten wir ein möglich reelles und kliniknahes Studiendesign zu erstellen. In früheren Studien wurden durch Gabe des Inhibitors und der daraus resultierenden Komplementinhibition eine verbesserte Myokardfunktion und eine verminderte Infarktgröße nachgewiesen. Durch den Versuchsablauf aber hatten diese Studien keine klinische Relevanz.

Wir untersuchten die Wirkung des C1-INH an 20 juvenile Hausschweine, bei denen ein Myokardinfarkt durch LAD-Okklusion induziert wurde. Nach einer Stunde Okklusion wurde die EKZ eingeleitet und die Aorta abgeklemmt. Weitere 60 Minuten später wurde die Okklusion der LAD entfernt und es folgte eine Reperfusionszeit von 150 Minuten. Dabei wurden die Tiere von der EKZ entwöhnt, um den klinischen Ablauf so genau wie möglich zu befolgen. Kurz vor Einleiten der EKZ erfolgte eine randomisierte systemische itraaortale Injektion von 25IE/kgKG C1-INH.

Wir verglichen die C1-INH Gruppe (n=10) mit einer Kontrollgruppe (n=10). Dabei wurde die Funktion des linken und rechten Ventrikels durch die Conductance-Katheter Messung untersucht. Das Infarktareal und die „AaR“ wurden mit Hilfe der TTC-Evans Blue Methode durch Planimetrie bestimmt. Des Weiteren wurde die regionale Gewebsperfusion mit Hilfe der FMS bestimmt.

Unsere Ergebnisse zeigten keine eindeutige Verbesserung der Myokardfunktion durch Injektion des C1-INH. Des Weiteren konnten wir auch keine Verbesserung der regionalen Gewebsperfusion oder eine signifikante Verminderung der Infarktgröße bei diesen Tieren erkennen. Eine positive Wirkung der Komplementinhibition ist aber trotzdem nicht auszuschließen und sollte in weiteren Versuchen mit einem veränderten Studiendesign untersucht werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Asano G, Takashi E, Ishiwata T, Onda M, Yokoyama M, Naito Z, Ashraf M, Sugisaki Y: Pathogenesis and protection of ischemia and reperfusion injury in myocardium. *J Nippon Med Sch* 2003;70:384-392.
2. Baan J, Noordergraaf A: Some methods to control the natural frequencies in the three different modes of a 3-degree of freedom ultra-low frequency ballistocardiograph. *Bibl Cardiol* 1968;20:12-19.
3. Baan J, van der Velde ET, de Bruin HG, Smeenk GJ, Koops J, van Dijk AD, Temmerman D, Senden J, Buis B: Continuous measurement of left ventricular volume in animals and humans by conductance catheter. *Circulation* 1984;70:812-823.
4. Bauernschmitt R, Bohrer H, Hagl S: Rescue therapy with C1-esterase inhibitor concentrate after emergency coronary surgery for failed PTCA. *Intensive Care Med* 1998;24:635-638.
5. Bauernschmitt R, Schreiber C, Lange R: C1 esterase inhibitor concentrate during surgery with cardiopulmonary bypass: is there an indication beyond substitution therapy in patients with hereditary angioneurotic edema? *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:427-428.
6. Bock SC, Skriver K, Nielsen E, Thogersen HC, Wiman B, Donaldson VH, Eddy RL, Marrinan J, Radziejewska E, Huber R, et al.: Human C1 inhibitor: primary structure, cDNA cloning, and chromosomal localization. *Biochemistry* 1986;25:4292-4301.
7. Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, McCay PB: Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest* 1988;82:476-485.
8. Brower MS, Harpel PC: Proteolytic cleavage and inactivation of alpha 2-plasmin inhibitor and C1 inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem* 1982;257:9849-9854.

9. Buerke M, Murohara T, Lefer AM: Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995;91:393-402.
10. Buerke M, Prufer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H: Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286:429-438.
11. Burkhoff D, Sugiura S, Yue DT, Sagawa K: Contractility-dependent curvilinearity of end-systolic pressure-volume relations. *Am J Physiol* 1987;252:H1218-1227.
12. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE: C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev* 2000;52:91-112.
13. Carabello BA, Spann JF: The uses and limitations of end-systolic indexes of left ventricular function. *Circulation* 1984;69:1058-1064.
14. Chai PJ, Nassar R, Oakeley AE, Craig DM, Quick G, Jr., Jagers J, Sanders SP, Ungerleider RM, Anderson PA: Soluble complement receptor-1 protects heart, lung, and cardiac myofilament function from cardiopulmonary bypass damage. *Circulation* 2000;101:541-546.
15. Chan RK, Austen WG, Jr., Ibrahim S, Ding GY, Verna N, Hechtman HB, Moore FD, Jr.: Reperfusion injury to skeletal muscle affects primarily type II muscle fibers. *J Surg Res* 2004;122:54-60.
16. Crottogini AJ, Willshaw P, Barra JG, Armentano R, Cabrera Fischer EI, Pichel RH: Inconsistency of the slope and the volume intercept of the end-systolic pressure-volume relationship as individual indexes of inotropic state in conscious dogs: presentation of an index combining both variables. *Circulation* 1987;76:1115-1126.
17. de Vries B, Walter SJ, Wolfs TG, Hochepped T, Rabina J, Heeringa P, Parkkinen J, Libert C, Buurman WA: Exogenous alpha-1-acid glycoprotein protects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of inflammation and apoptosis. *Transplantation* 2004;78:1116-1124.
18. Delogu G, Signore M, Mechelli A, Famularo G: Heat shock proteins and their role in heart injury. *Curr Opin Crit Care* 2002;8:411-416.

19. Feneley MP, Skelton TN, Kisslo KB, Davis JW, Bashore TM, Rankin JS: Comparison of preload recruitable stroke work, end-systolic pressure-volume and dP/dtmax-end-diastolic volume relations as indexes of left ventricular contractile performance in patients undergoing routine cardiac catheterization. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:1522-1530.
20. Franklin DL: Techniques for Measurement of Blood Flow through Intact Vessels. *Med Electron Biol Eng* 1965;34:27-37.
21. Gillinov AM, DeValeria PA, Winkelstein JA, Wilson I, Curtis WE, Shaw D, Yeh CG, Rudolph AR, Baumgartner WA, Herskowitz A, et al.: Complement inhibition with soluble complement receptor type 1 in cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1993;55:619-624.
22. Glower DD, Spratt JA, Snow ND, Kabas JS, Davis JW, Olsen CO, Tyson GS, Sabiston DC, Jr., Rankin JS: Linearity of the Frank-Starling relationship in the intact heart: the concept of preload recruitable stroke work. *Circulation* 1985;71:994-1009.
23. Griswold DE, Hillegass L, Hill DE, Sherief HT, Kopia GA: Evaluation of the effect of evan's blue and triphenyltetrazolium chloride dyes on myeloperoxidase activity in canine cardiac tissue. *J Pharmacol Methods* 1989;21:13-19.
24. Heda GD, Mardente S, Weiner L, Schmaier AH: Interferon gamma increases in vitro and in vivo expression of C1 inhibitor. *Blood* 1990;75:2401-2407.
25. Heimisch W, Meisner H, Schober R: [Experiences with an electrically conducting plastic electrode for transient cardiac pacing in infants]. *Langenbecks Arch Chir* 1975;Suppl:31-34.
26. Herzog WR, Vogel RA, Schlossberg ML, Edenbaum LR, Scott HJ, Serebruany VL: Short-term low dose intracoronary diltiazem administered at the onset of reperfusion reduces myocardial infarct size. *Int J Cardiol* 1997;59:21-27.
27. Hill JH, Ward PA: C3 leukotactic factors produced by a tissue protease. *J Exp Med* 1969;130:505-518.
28. Horstick G: C1-esterase inhibitor in ischemia and reperfusion. *Immunobiology* 2002;205:552-562.

-
29. Horstick G, Berg O, Heimann A, Gotze O, Loos M, Hafner G, Bierbach B, Petersen S, Bhakdi S, Darius H, Horstick M, Meyer J, Kempfski O: Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. *Circulation* 2001;104:3125-3131.
 30. Horstick G, Heimann A, Gotze O, Hafner G, Berg O, Boehmer P, Becker P, Darius H, Rupprecht HJ, Loos M, Bhakdi S, Meyer J, Kempfski O: Intracoronary application of C1 esterase inhibitor improves cardiac function and reduces myocardial necrosis in an experimental model of ischemia and reperfusion. *Circulation* 1997;95:701-708.
 31. Ito W, Schafer HJ, Bhakdi S, Klask R, Hansen S, Schaarschmidt S, Schofer J, Hugo F, Hamdoch T, Mathey D: Influence of the terminal complement-complex on reperfusion injury, no-reflow and arrhythmias: a comparison between C6-competent and C6-deficient rabbits. *Cardiovasc Res* 1996;32:294-305.
 32. Jennings RB, Ganote CE, Kloner RA, Whalen DA, Jr., Hamilton DG: Explosive swelling of myocardial cells irreversibly injured by transient ischemia. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1975;6:405-413.
 33. Jiang H, Wagner E, Zhang H, Frank MM: Complement 1 inhibitor is a regulator of the alternative complement pathway. *J Exp Med* 2001;194:1609-1616.
 34. Kagiya A, Savage HE, Michael LH, Hanson G, Entman ML, Rossen RD: Molecular basis of complement activation in ischemic myocardium: identification of specific molecules of mitochondrial origin that bind human C1q and fix complement. *Circ Res* 1989;64:607-615.
 35. Kass DA, Maughan WL, Guo ZM, Kono A, Sunagawa K, Sagawa K: Comparative influence of load versus inotropic states on indexes of ventricular contractility: experimental and theoretical analysis based on pressure-volume relationships. *Circulation* 1987;76:1422-1436.
 36. Kass DA, Midei M, Graves W, Brinker JA, Maughan WL: Use of a conductance (volume) catheter and transient inferior vena caval occlusion for rapid determination of pressure-volume relationships in man. *Cathet Cardiovasc Diagn* 1988;15:192-202.
 37. Katz Y, Gur S, Aladjem M, Strunk RC: Synthesis of complement proteins in amnion. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:2027-2032.

-
38. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD: Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983;86:845-857.
 39. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB: The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974;54:1496-1508.
 40. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P: Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 1989;80:1115-1127.
 41. Ku DD: Coronary vascular reactivity after acute myocardial ischemia. *Science* 1982;218:576-578.
 42. Lappin DF, Guc D, Hill A, McShane T, Whaley K: Effect of interferon-gamma on complement gene expression in different cell types. *Biochem J* 1992;281 (Pt 2):437-442.
 43. Latchman DS: Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res* 2001;51:637-646.
 44. Lazar HL, Bao Y, Gaudiani J, Rivers S, Marsh H: Total complement inhibition: an effective strategy to limit ischemic injury during coronary revascularization on cardiopulmonary bypass. *Circulation* 1999;100:1438-1442.
 45. Lazar HL, Hamasaki T, Bao Y, Rivers S, Bernard SA, Shemin RJ: Soluble complement receptor type I limits damage during revascularization of ischemic myocardium. *Ann Thorac Surg* 1998;65:973-977.
 46. Lepow IH, Ratnoff OD, Pillemer L: Elution of an esterase from antigen-antibody aggregates treated with human complement. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956;92:111-114.
 47. Loeffler, G. ; Petrides, P.E.: Immunsystem, Komplement-System
In: "Biochemie und Pathobiochemie" Springer Verlag 1997, 5.Auflage, 1080-1100.
 48. Lotz M, Zuraw BL: Interferon-gamma is a major regulator of C1-inhibitor synthesis by human blood monocytes. *J Immunol* 1987;139:3382-3387.
 49. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM: Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 2004;49:1359-1377.

-
50. Mann T, Goldberg S, Mudge GH, Jr., Grossman W: Factors contributing to altered left ventricular diastolic properties during angina pectoris. *Circulation* 1979;59:14-20.
 51. Markis JE, Malagold M, Parker JA, Silverman KJ, Barry WH, Als AV, Paulin S, Grossman W, Braunwald E: Myocardial salvage after intracoronary thrombolysis with streptokinase in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1981;305:777-782.
 52. Mathey D, Schofer J, Schafer HJ, Hamdoch T, Joachim HC, Ritgen A, Hugo F, Bhakdi S: Early accumulation of the terminal complement-complex in the ischaemic myocardium after reperfusion. *Eur Heart J* 1994;15:418-423.
 53. Mehmel HC, Stockins B, Ruffmann K, Schwarz F, Kubler W: [The end-systolic pressure-volume relationship in the assessment of left ventricular function (author's transl)]. *Herz* 1981;6:209-216.
 54. Mehmel HC, Stockins B, Ruffmann K, von Olshausen K, Schuler G, Kubler W: The linearity of the end-systolic pressure-volume relationship in man and its sensitivity for assessment of left ventricular function. *Circulation* 1981;63:1216-1222.
 55. Murohara T, Guo JP, Delyani JA, Lefer AM: Cardioprotective effects of selective inhibition of the two complement activation pathways in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1995;17:499-507.
 56. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-1136.
 57. Neves LA, Almeida AP, Khosla MC, Campagnole-Santos MJ, Santos RA: Effect of angiotensin-(1-7) on reperfusion arrhythmias in isolated rat hearts. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:801-809.
 58. Park JL, Lucchesi BR: Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1905-1912.
 59. Perlmutter DH, Glover GI, Rivetna M, Schasteen CS, Fallon RJ: Identification of a serpin-enzyme complex receptor on human hepatoma cells and human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:3753-3757.

-
60. Pratschke J, Tullius SG, Neuhaus P: Brain death associated ischemia/reperfusion injury. *Ann Transplant* 2004;9:78-80.
 61. Raab S, Thein E, Harris AG, Messmer K: A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *Am J Physiol* 1999;276:H1801-1806.
 62. Rossen RD, Michael LH, Hawkins HK, Youker K, Dreyer WJ, Baughn RE, Entman ML: Cardioprotein-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion. *Circ Res* 1994;75:546-555.
 63. Sagawa K: The ventricular pressure-volume diagram revisited. *Circ Res* 1978;43:677-687.
 64. Sagawa K: The end-systolic pressure-volume relation of the ventricle: definition, modifications and clinical use. *Circulation* 1981;63:1223-1227.
 65. Sagawa K: End-systolic pressure-volume relationship in retrospect and prospect. *Fed Proc* 1984;43:2399-2401.
 66. Sagawa K, Suga H, Shoukas AA, Bakalar KM: End-systolic pressure/volume ratio: a new index of ventricular contractility. *Am J Cardiol* 1977;40:748-753.
 67. Schapira M, de Agostini A, Schifferli JA, Colman RW: Biochemistry and pathophysiology of human C1 inhibitor: current issues. *Complement* 1985;2:111-126.
 68. Schmidt B, Gyapay G, Valay M, Fust G: Human recombinant macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) increases C1-esterase inhibitor (C1-INH) synthesis by human monocytes. *Immunology* 1991;74:677-679.
 69. Schreiber C, Heimisch W, Schad H, Brkic A, Badiu C, Lange R, Bauernschmitt R: C1-INH and its Effect on Infarct Size and Ventricular Function in an Acute Pig Model of Infarction, Cardiopulmonary Bypass, and Reperfusion. *Thorac Cardiovasc Surg* 2006;54:227-232.
 70. Shandelya SM, Kuppusamy P, Herskowitz A, Weisfeldt ML, Zweier JL: Soluble complement receptor type 1 inhibits the complement pathway and prevents contractile failure in the postischemic heart. Evidence that complement activation is required for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation* 1993;88:2812-2826.

-
71. Shen AC, Jennings RB: Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol* 1972;67:417-440.
 72. Sim RB, Arlaud GJ, Colomb MG: Kinetics of reaction of human C1-inhibitor with the human complement system proteases C1r and C1s. *Biochim Biophys Acta* 1980;612:433-449.
 73. Sodums MT, Badke FR, Starling MR, Little WC, O'Rourke RA: Evaluation of left ventricular contractile performance utilizing end-systolic pressure-volume relationships in conscious dogs. *Circ Res* 1984;54:731-739.
 74. Steendijk P, Baan J: Comparison of intravenous and pulmonary artery injections of hypertonic saline for the assessment of conductance catheter parallel conductance. *Cardiovasc Res* 2000;46:82-89.
 75. Steendijk P, Staal E, Jukema JW, Baan J: Hypertonic saline method accurately determines parallel conductance for dual-field conductance catheter. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;281:H755-763.
 76. Suga H, Sagawa K, Kostiuk DP: Controls of ventricular contractility assessed by pressure-volume ration, Emax. *Cardiovasc Res* 1976;10:582-592.
 77. Tsao PS, Aoki N, Lefter DJ, Johnson G, 3rd, Lefter AM: Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the cat. *Circulation* 1990;82:1402-1412.
 78. Turner MW: The lectin pathway of complement activation. *Res Immunol* 1996;147:110-115.
 79. Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Boyle MP, Marsh HC, Jr., Carson GR, Roux KH, Weisfeldt ML, Fearon DT: Recombinant soluble CR1 suppressed complement activation, inflammation, and necrosis associated with reperfusion of ischemic myocardium. *Trans Assoc Am Physicians* 1990;103:64-72.
 80. Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, Marsh HC, Jr., Carson GR, Concino MF, Boyle MP, Roux KH, Weisfeldt ML, Fearon DT: Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of

complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 1990;249:146-151.

81. Xiao CY, Hara A, Yuhki K, Fujino T, Ma H, Okada Y, Takahata O, Yamada T, Murata T, Narumiya S, Ushikubi F: Roles of prostaglandin I(2) and thromboxane A(2) in cardiac ischemia-reperfusion injury: a study using mice lacking their respective receptors. *Circulation* 2001;104:2210-2215.
82. Zuraw BL, Lotz M: Regulation of the hepatic synthesis of C1 inhibitor by the hepatocyte stimulating factors interleukin 6 and interferon gamma. *J Biol Chem* 1990;265:12664-12670.

9. Anhang

9.1. Tabellen

§= Signifikanz gegenüber Kontrolle

Regionale Ventrikelperfusion

Parameter	Einheit	Messzeitpunkt	Kontrollgruppe			C1-INH Gruppe		
			$\bar{X} \pm S.D.$	2p<0,05	n	$\bar{X} \pm S.D.$	2p<0,05	n
QLAD	ml/min/kg	Kontrolle	1,11 ± 0,54		10	0,77 ± 0,25		11
		1h Okklusion	0,65 ± 0,30	§	10	0,52 ± 0,14	§	10
		1h Reperf.	1,36 ± 0,71	n.s.	10	1,19 ± 0,4	§	10
		2h Reperf.	1,32 ± 0,63	n.s.	10	1,05 ± 0,33	§	11
QLCX	ml/min/kg	Kontrolle	0,7 ± 0,28		10	0,6 ± 0,2	10	
		1h Okklusion	0,86 ± 0,42	§	10	0,75 ± 0,24	§	10
		1h Reperf.	0,83 ± 0,44	§	10	0,91 ± 0,37	§	10
		2h Reperf.	0,85 ± 0,42	§	9	0,79 ± 0,35	§	11
pO ₂ LAD	mmHg	Kontrolle	48,2 ± 20		10	45,4 ± 15,9		10
		1h Okklusion	3,8 ± 1,9	§	10	3,3 ± 2,6	§	9
		1h Reperf.	67 ± 42,5	n.s.	10	65,7 ± 46,9	n.s.	9
		2h Reperf.	96,4 ± 36,4	§	9	75 ± 41,5	n.s.	10
pO ₂ LCX	mmHg	Kontrolle	50,6 ± 18,2		10	50,3 ± 26,7		11
		1h Okklusion	69,5 ± 28,3	§	10	69,6 ± 25,6	§	10
		1h Reperf.	68,0 ± 25,1	§	10	65,4 ± 24,8	n.s.	10
		2h Reperf.	68,5 ± 20,9	§	10	66 ± 23,6	n.s.	11

QLAD,QLCX sind die Flüsse über die Koronarien LAD und LCX.

Globale Ventrikelfunktionsparameter

Parameter	Einheit	Messzeitpunkt	Kontrollgruppe			C1-INH Gruppe		
			$\bar{X} \pm S.D.$	2p<0,05	n	$\bar{X} \pm S.D.$	2p<0,05	n
AoPm	mmHg	Kontrolle	97,4 ± 26,7		10	84,4 ± 16,8		11
		1h Okklusion	93 ± 19,9	n.s.	10	81 ± 11	n.s.	10
		1h Reperf.	71,6 ± 16,6	n.s.	10	70,6 ± 17,6	n.s.	10
		2h Reperf.	74 ± 15,9	n.s.	10	72 ± 18,52	n.s.	11
PAPm	mmHg	Kontrolle	19,4 ± 3,9		10	17,9 ± 3,2		11
		1h Okklusion	22,1 ± 4,9	n.s.	10	19,8 ± 3,1	n.s.	10
		1h Reperf.	25,2 ± 5,3	n.s.	10	23,7 ± 3,8	n.s.	10
		2h Reperf.	26 ± 6,1	n.s.	10	24,4 ± 4,1	n.s.	11
CVPm	mmHg	Kontrolle	5,2 ± 2		9	4,3 ± 1,5		11
		1h Okklusion	6,4 ± 1,9	n.s.	9	5,4 ± 1,4	n.s.	10
		1h Reperf.	11,5 ± 4,1	n.s.	10	10,2 ± 3,2	n.s.	10
		2h Reperf.	10 ± 3,6	n.s.	10	9,7 ± 3	n.s.	11
Cpulm	Units	Kontrolle	27,1 ± 5,2		10	26 ± 4,7		11
		1h Okklusion	28,4 ± 3,8	n.s.	10	27,8 ± 4,4	n.s.	10
		1h Reperf.	26 ± 5,8	n.s.	10	25,2 ± 4,7	n.s.	10
		2h Reperf.	24,7 ± 4,7	n.s.	10	22,9 ± 4,5	n.s.	11
HR	1/min	Kontrolle	84 ± 16		10	83 ± 17		11
		1h Okklusion	95 ± 31	§	10	88 ± 21	n.s.	11
		1h Reperf.	117 ± 18	§	8	108 ± 20	§	11
		2h Reperf.	107 ± 18	§	10	110 ± 18	§	11
CO	ml/min/kg	Kontrolle	124 ± 33		10	115 ± 18		11
		1h Okklusion	100 ± 16	§	10	102 ± 24	n.s.	11
		1h Reperf.	117 ± 18	n.s.	8	112 ± 22	n.s.	11
		2h Reperf.	81 ± 24	n.s.	10	82 ± 14	n.s.	11

Linksventrikuläre Funktionsparameter

Parameter	Einheit	Messzeitpkt	Kontrollgruppe			C1-INH Gruppe		
			$\bar{X} \pm S.D.$	2p<0,05	n	$\bar{X} \pm S.D.$	2p<0,05	n
edP	mmHg	Kontrolle	14,6 ± 4		10	12,6 ± 2,9		11
		1h Okklusion	21,7 ± 5,5	§	10	18,9 ± 4,7	§	11
		1h Reperf.	18,1 ± 6,9	n.s.	8	15,8 ± 6,4	n.s.	11
		2h Reperf.	17,6 ± 5,4	n.s.	10	14,9 ± 5,4	n.s.	11
esP	mmHg	Kontrolle	104 ± 32		10	91 ± 20		11
		1h Okklusion	96 ± 27	n.s.	10	87 ± 19	n.s.	11
		1h Reperf.	74 ± 16	§	8	74 ± 13	§	11
		2h Reperf.	83 ± 22	§	10	76 ± 18	§	11
dP/dtmax	mmHg/s	Kontrolle	2038 ± 532		10	1731 ± 296		11
		1h Okklusion	1632 ± 348	§	10	1450 ± 295	n.s.	11
		1h Reperf.	1651 ± 571	§	8	1411 ± 337	§	11
		2h Reperf.	1532 ± 432	§	10	1375 ± 312	§	11
dP/dtmin	mmHg/s	Kontrolle	1361 ± 735		10	1184 ± 576		11
		1h Okklusion	1227 ± 570	n.s.	10	1107 ± 554	n.s.	11
		1h Reperf.	906 ± 336	n.s.	8	1088 ± 480	n.s.	11
		2h Reperf.	1055 ± 372	n.s.	10	942 ± 290	n.s.	11
edV	ml/kg	Kontrolle	2,75 ± 0,56		10	2,80 ± 0,54		11
		1h Okklusion	2,52 ± 0,63	n.s.	10	2,70 ± 0,55	n.s.	11
		1h Reperf.	1,48 ± 0,41	§	8	1,50 ± 0,32	§	11
		2h Reperf.	1,91 ± 0,92	n.s.	10	1,60 ± 0,45	§	11

esV	ml/kg	Kontrolle	1,41 ± 0,29		10	1,53 ± 0,58		11
		1h Okklusion	1,49 ± 0,56	n.s.	10	1,73 ± 0,65	n.s.	11
		1h Reperf.	0,75 ± 0,28	§	8	0,75 ± 0,28	§	11
		2h Reperf.	1,23 ± 0,96	n.s.	10	0,89 ± 0,35	§	11
SW	mmHg*ml/kg	Kontrolle	117 ± 40		10	93 ± 16		11
		1h Okklusion	74 ± 22	§	10	67 ± 16	§	11
		1h Reperf.	43 ± 21	§	8	38 ± 15	§	11
		2h Reperf.	42 ± 17	§	10	37 ± 18	§	11
esPVR	mmHg/ml	Kontrolle	1,29 ± 0,71		10	1,17 ± 0,61		11
		1h Okklusion	1,46 ± 0,83	n.s.	10	1,31 ± 0,60	n.s.	8
		1h Reperf.	1,19 ± 0,60	n.s.	8	1,58 ± 0,82	n.s.	9
		2h Reperf.	1,58 ± 0,61	n.s.	10	2,08 ± 1,24	n.s.	10
PRSW	mmHg	Kontrolle	67,9 ± 29,4		9	50,8 ± 16,6		11
		1h Okklusion	62,0 ± 35,8	n.s.	8	47,4 ± 17,4	n.s.	8
		1h Reperf.	60,0 ± 68,9	n.s.	8	38,8 ± 19,5	n.s.	6
		2h Reperf.	64,1 ± 70,1	n.s.	10	38,1 ± 13,7	n.s.	9

Rechtsventrikuläre Funktionsparameter

Parameter	Einheit	Messzeitpkt	Kontrollgruppe			C1-INH Gruppe		
			$\bar{X} \pm S.D.$	2p<0,05	n	$\bar{X} \pm S.D.$	2p<0,05	n
edP	mmHg	Kontrolle	11,1 ± 3,0		10	11,5 ± 3,3		11
		1h Okklusion	13,2 ± 2,8	§	10	13,5 ± 3,8	§	10
		1h Reperf.	14,3 ± 4,2	§	8	14,3 ± 5,5	n.s.	8
		2h Reperf.	13,6 ± 3,5	n.s.	10	13,5 ± 4,7	n.s.	10
esP	mmHg	Kontrolle	30 ± 5		10	31 ± 6		11
		1h Okklusion	31 ± 8	n.s.	10	30 ± 6	n.s.	10
		1h Reperf.	40 ± 18	n.s.	8	29 ± 7	n.s.	8
		2h Reperf.	34 ± 4	§	10	30 ± 8	n.s.	10
dP/dtmax	mmHg/s	Kontrolle	527 ± 112		10	482 ± 71		10
		1h Okklusion	474 ± 131	n.s.	10	415 ± 69	§	10
		1h Reperf.	570 ± 325	n.s.	8	387 ± 106	§	7
		2h Reperf.	536 ± 168	n.s.	10	494 ± 128	n.s.	9
dP/dtmin	mmHg/s	Kontrolle	278 ± 106		10	261 ± 135		10
		1h Okklusion	304 ± 154	n.s.	10	263 ± 116	n.s.	10
		1h Reperf.	371 ± 167	n.s.	8	297 ± 126	n.s.	7
		2h Reperf.	339 ± 98	§	10	354 ± 138	§	9
edV	ml/kg	Kontrolle	2,96 ± 0,66		9	2,97 ± 0,83		10
		1h Okklusion	2,55 ± 0,78	n.s.	9	2,50 ± 0,50	n.s.	9
		1h Reperf.	1,99 ± 1,0	§	7	1,66 ± 0,48	§	8
		2h Reperf.	2,14 ± 0,78	n.s.	9	2,00 ± 0,94	n.s.	9

esV	ml/kg	Kontrolle	1,93 ± 0,63		10	2,05 ± 0,96		10
		1h Okklusion	1,75 ± 0,60	n.s.	10	1,68 ± 0,33	n.s.	9
		1h Reperf.	1,51 ± 0,88	n.s.	8	1,11 ± 0,43	§	8
		2h Reperf.	1,69 ± 0,73	n.s.	10	1,49 ± 0,80	n.s.	9
SW	mmHg*ml/kg	Kontrolle	33 ± 7		10	30 ± 5		10
		1h Okklusion	24 ± 10	§	10	23 ± 6	§	10
		1h Reperf.	18 ± 7	§	8	15 ± 7	§	8
		2h Reperf.	16 ± 3	§	10	16 ± 3	§	10
esPVR	mmHg/ml	Kontrolle	0,36 ± 0,11		10	0,44 ± 0,16		11
		1h Okklusion	0,47 ± 0,16	§	10	0,35 ± 0,11	n.s.	8
		1h Reperf.	0,66 ± 0,21	§	6	0,85 ± 0,36	n.s.	6
		2h Reperf.	0,79 ± 0,44	§	9	0,72 ± 0,52	n.s.	8
PRSW	mmHg	Kontrolle	14,0 ± 6,6		10	15,1 ± 5,6		11
		1h Okklusion	15,2 ± 9,4	n.s.	9	14,8 ± 6,9	n.s.	5
		1h Reperf.	17,6 ± 12,7	n.s.	7	19,0 ± 7,8	n.s.	5
		2h Reperf.	14,9 ± 4,1	n.s.	8	18,0 ± 8,6	n.s.	7

9.2. Bilder

Bild 1. Operationssitus

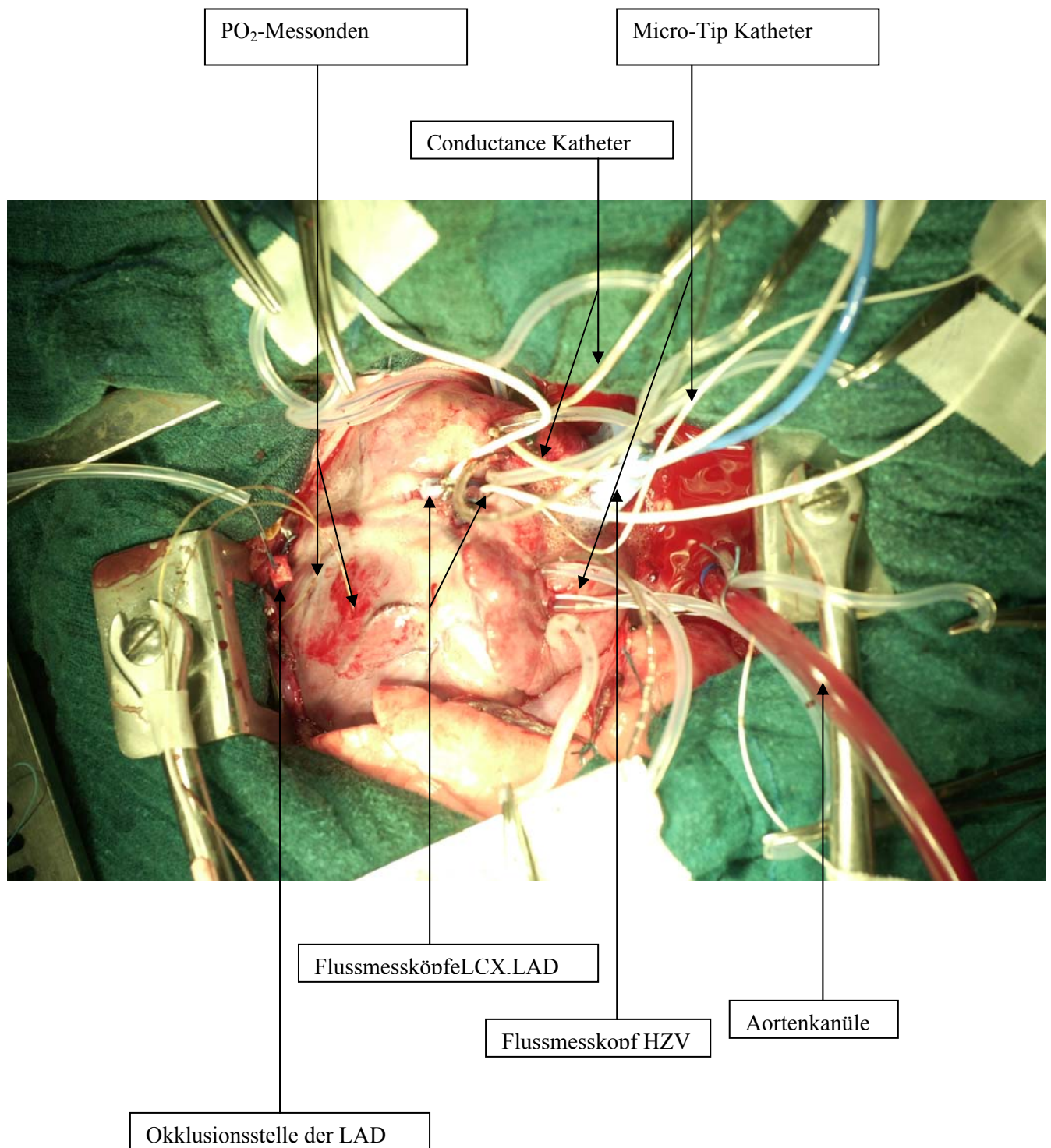


Bild 2. Herzschnitt nach Evans Blue und nach TTC

Nach Evans Blue Injektion färbt sich das perfundierte Areal blau, während das nicht durchblutete Myokard rot bleibt (Area at risk).

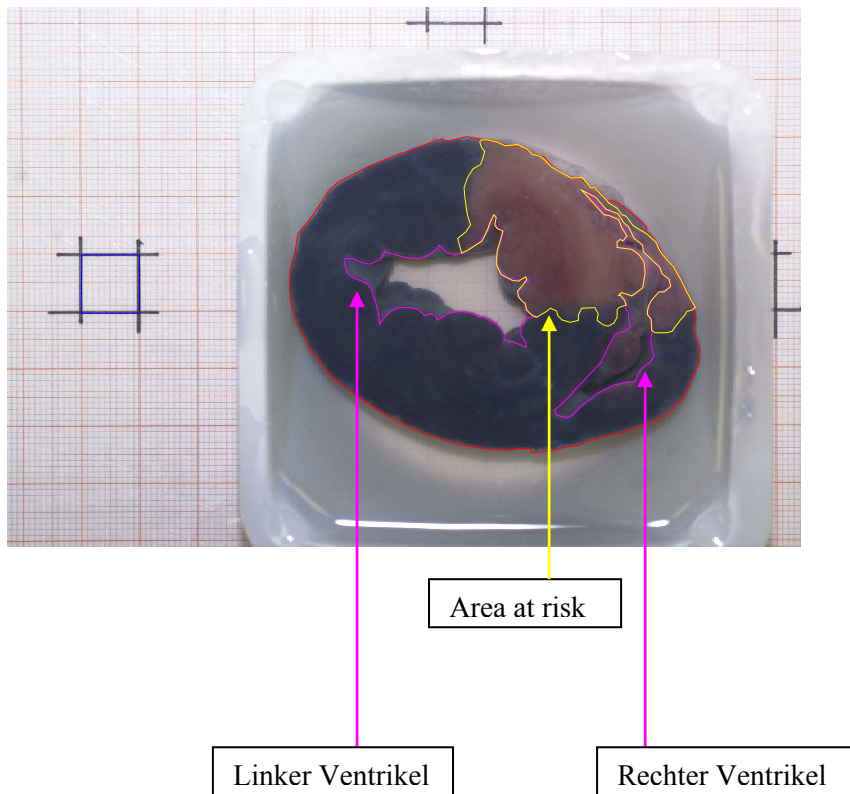
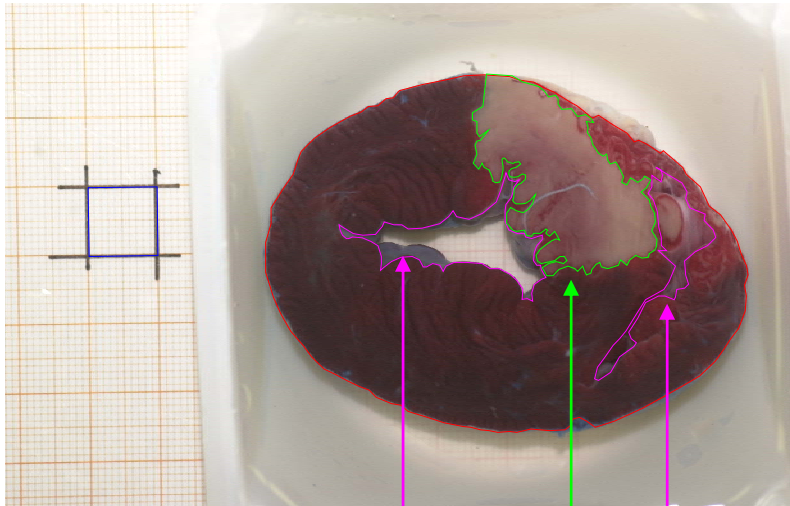


Bild 2. Herzschnitt nach Evans Blue und nach TTC

Nach dem TTC Bad wird das nekrotische Areal (Infarkt) weiß.



Linker Ventrikel

Rechter Ventrikel

Infarktareal

10. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. R. Lange, Klinikdirektor der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie am Deutschen Herzzentrum München, möchte ich mich für die Aufnahme als Doktorand in der herzchirurgischen Forschungsabteilung und für seine Förderung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Bauernschmitt für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die fachliche Unterstützung und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. C. Schreiber für die Geduld bei der Klärung meiner Fragen und die Betreuung während der Arbeit.

Viel Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und viele Anregungen und Ideen habe ich von Prof. Dr. med. H. Schad und Dipl.-Ing. Dr. rer. biol. hum. W. Heimisch erhalten. Dafür möchte ich Ihnen ganz herzlich danken.

Ich danke den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe Herrn H. Erk. und Frau A. Berhard ohne deren Assistenz und Mitarbeit die Durchführung dieses Versuchsprojekts nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Familie und meiner Verlobten möchte ich für die Unterstützung danken.

11. Lebenslauf

Catalin Constantin Badiu

Geburtsdatum und- ort: 28.06.1975, Bukarest

Schulbildung:

September 1981 – Juni 1985 Grundsschule „Deutsche Schule“, Bukarest

September 1985 – Juni 1993 Gymnasium „Hermann Oberth“, Bukarest

Juli 1993 Abitur (“Bacalaureat”), Bukarest

September 1995 – Juli 1996 Gymnasium, Schweinfurt, Deutschland

Juli 1996 Abitur

Studium:

September 1994 – Juni 1995 Universität Bukarest/ Fakultät der Biochemie

Mai 1997 – September 2002 Studium der Humanmedizin
Ludwig Maximilian Universität München

September 2002 – Oktober 2003 Praktisches Studienjahr
Technische Universität München

November 2003 Staatsexamen / Teilapprobation als Arzt

Oktober 2004 Approbation als Arzt

Berufserfahrung:

Januar 2004-September 2004

Arzt im Praktikum

Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
des Deutschen Herzzentrum München

Direktor: Prof. Dr. med. R. Lange

Seit Oktober 2004

Assistenzarzt

Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie
des Deutschen Herzzentrum München

Direktor: Prof. Dr. med. R. Lange