

Aus der Klinik für Anästhesiologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Pannen

**Caspase-1-Hemmung mit HMR-3480 während myokardialer Ischämie-Reperfusion:  
Eine Untersuchung am Schweineherzen in vivo**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

**Hendrik Südkamp**

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: PD Dr. med. B. Preckel

Korreferent: Prof. Dr. med. U. Decking

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	6
1.1	Ischämie-Reperfusion und Reperfusionsschaden.....	6
1.2	Stunning .....	6
1.3	Stunning vs. Hibernation .....	7
1.4	Zytokine .....	8
1.5	Interleukin-1 .....	9
1.6	Interleukine/Zytokine bei kardialen Erkrankungen.....	9
1.7	Caspasen .....	10
1.8	Caspase-Hemmer .....	12
1.9	ICE/Caspase-1 und Apoptose .....	13
1.10	Apoptose .....	13
1.11	Ziel der Untersuchung .....	14
2	Methodik.....	15
2.1	Präparation .....	15
2.2	Substanzen und Lösungen .....	17
2.3	Versuchsprotokoll .....	17
2.4	Auswertung und Statistik .....	19
3	Ergebnisse.....	21
3.1	Effekt von HMR-3480 auf normoxisches Myokard .....	21
3.2	Ischämie-Reperfusions-Versuche .....	21
4	Diskussion .....	28
4.1	Übertragbarkeit des Versuchsmodells auf den Menschen .....	28
4.2	Stunning .....	29
4.2.1	Sauerstoffradikal-Hypothese .....	30
4.2.2	Kalzium-Hypothese.....	31
4.2.3	Einflüsse von Genexpression und Proteintranslation.....	32
4.2.4	Einflüsse von extrazellulären Faktoren .....	32
4.2.5	Einflüsse von abnormem Sauerstoffmetabolismus .....	33
4.3	ICE-/Caspase-Hemmung bei Ischämie-Reperfusion .....	33
4.4	Apoptose bei kardialen Erkrankungen .....	35
4.5	Caspase-1 und Apoptose .....	37

4.6 Fazit .....	39
5 Literaturverzeichnis.....	41
6 Danksagung .....	52
7 Lebenslauf .....	53
8 Zusammenfassung .....	54

Die grundlegenden Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits in einem Artikel, an dem ich als Co-Autor mitgearbeitet hatte, an folgender Stelle veröffentlicht:

Barthel H, Südkamp H, Ebel D, Müllenheim J, Schlack W, Preckel B. Influence of the interleukin-converting enzyme inhibitor HMR-3480 on myocardial stunning in pigs in vivo. *Experimental and Clinical Cardiology* 2007; **12**(3): 125-131.

# **1 Einleitung**

## **1.1 Ischämie-Reperfusion und Reperfusionsschaden**

Mit Beginn der Reperfusion eines vorher ischämischen Areals kommt es zur Ausbildung eines Reperfusionsschadens. Die Definition des Reperfusionsschadens umfasst Reperfusionsarrhythmien, den Untergang von Myozyten, die endotheliale und mikrovaskuläre Dysfunktion einschließlich des No-Reflow-Phänomens sowie myokardiales Stunning. Mit Ausnahme des Stunning, auf das ich weiter unten eingehen werde, möchte ich die genannten Begriffe im Folgenden näher erläutern:

Die Reperfusion nach Ischämie kann am Herzen zu potentiell tödlichen Rhythmusstörungen führen. Eine endotheliale Dysfunktion durch erhöhte Produktion von Vasokonstriktoren und Sauerstoffradikalen verstärkt die koronare Vasokonstriktion und reduziert den Blutfluss. Ein Zusammenspiel von endothelialer Dysfunktion, mikrovaskulärer Obstruktion (Mikroembolisationen von Thrombozyten, Mikrothrombosen, Verstopfung der Kapillaren durch neutrophile Granulozyten), Ödemen und oxidativem Stress ist für die mikrovaskuläre Dysfunktion nach Ischämie-Reperfusion verantwortlich. Diese verursacht den Untergang von Zellen und Arrhythmien und begrenzt mitunter eine adäquate Perfusion, ein Phänomen, das als No-Reflow-Phänomen bezeichnet wird. Andere Folgen der mikrovaskulären Dysfunktion sind das linksventrikuläre Remodeling und die Herzwandruptur. Zu Beginn der Reperfusion können die Myozyten durch übermäßige Kontraktion (d.h. anhaltende Verkürzung und Versteifung) geschädigt werden. Diese Kontraktionen können zu einer mechanischen Zerreißung benachbarter Zellen führen. Alle o.g. Ausprägungen des Reperfusionsschadens lassen sich zumindest teilweise durch die Einwirkung von Sauerstoffradikalen und die Kalziumüberladung der Zellen erklären.<sup>1</sup> Zum Einfluss von Leukozyten und hier besonders von neutrophilen Granulozyten auf den Reperfusionsschaden gibt es widersprüchliche Studienergebnisse. So lassen sich alle Ausprägungen des Reperfusionsschadens auch in neutrophilfreien Bedingungen nachweisen. Außerdem verhindern antineutrophile Interventionen das Auftreten von Reperfusionsschäden nur inkonstant und führen auch nur inkonstant zu einer Verringerung der Infarktgröße.<sup>2</sup>

## **1.2 Stunning**

Als myokardiales Stunning bezeichnet man die postischämische Dysfunktion, welche nach Reperfusion fortbesteht, obwohl kein irreversibler Zellschaden vorliegt.<sup>3</sup> Entscheidend ist, dass myokardiales Stunning ein voll reversibler Prozess ist<sup>3</sup> und der myokardiale Blutfluss

zusätzlich wieder normal ist, d.h. dass die mechanische Dysfunktion nicht durch eine andauernde Ischämie verursacht wird.<sup>4</sup> Dieses Phänomen der postischämischen Myokarddysfunktion wurde erstmals 1975 von Heyndrickx et al. an Hunden beschrieben.<sup>5</sup> Die Bezeichnung der postischämischen Myokarddysfunktion mit dem Begriff „myokardiales Stunning“ erfolgte dann 1982 durch Braunwald und Kloner.<sup>6</sup> Zunächst fand dieses Phänomen wenig Beachtung, da die koronare Reperfusion für ein zu seltenes Ereignis gehalten wurde. Die postischämische Myokarddysfunktion ist in den 1980er und 1990er Jahren dann aber zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses bei Klinikern und Forschern gerückt, nicht zuletzt deshalb, weil die koronare Reperfusionstherapie durch Thrombolyse, Koronarangioplastie oder Bypass-Chirurgie zu einem Standardverfahren in der Behandlung des akuten Koronarsyndroms geworden ist.<sup>4, 7</sup> Myokardiales Stunning ist also ein klinisch vorkommendes Phänomen und lässt sich bei Patienten nach instabiler<sup>8</sup> oder vasospastischer Angina pectoris,<sup>9</sup> nach erfolgreicher koronarer Thrombolyse,<sup>10</sup> nach Koronarangioplastien,<sup>11</sup> nach koronaren Bypass-Operationen<sup>12</sup> und nach körperlicher Belastung bei stabiler koronarer Herzkrankheit<sup>13, 14, 15</sup> nachweisen. Für eine vertiefende Betrachtung von Stunning am Menschen liegen einige detaillierte Übersichten vor.<sup>4, 16, 17, 18</sup>

### **1.3 Stunning vs. Hibernation**

Die reversible myokardiale Dysfunktion lässt sich in myokardiales Stunning und myokardiale Hibernation unterteilen.<sup>19</sup> Als myokardiales Stunning wird die mechanische Dysfunktion bezeichnet, die nach Reperfusion fortbesteht, obwohl kein irreversibler Zellschaden vorliegt und der koronare Blutfluss wieder normal ist.<sup>3</sup> Myokardiale Hibernation ist ein durch eine chronische Stenose verursachter Zustand mit andauernder Einschränkung der myokardialen Ruhefunktion, welche durch Revaskularisation weitgehend rückgängig gemacht werden kann. Beiden gemeinsam sind eine Wandbewegungsstörung in Ruhe und die Beibehaltung einer inotropen Reserve, die sich durch Katecholamine mobilisieren lässt. Stunning und Hibernation können in der klinischen Umgebung simultan auftreten und sind nur schwierig voneinander zu unterscheiden, obwohl es sich definitionsgemäß und pathophysiologisch um unterschiedliche Entitäten handelt. Als Hauptunterschied zwischen beiden lässt sich jedoch Folgendes festhalten: Nach myokardialem Stunning kommt es zu einer zeitabhängigen Verbesserung der Myokardfunktion, bei myokardialer Hibernation kommt es nur durch Revaskularisation zu einer Verbesserung der Myokardfunktion.<sup>19</sup>

Mehreren Arbeitsgruppen ist es gelungen, in Tiermodellen chronisch dysfunktionelles Myokard nachzustellen, welches alle pathologischen Eigenschaften von myokardialer

Hibernation besitzt.<sup>20, 21</sup> Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass es eine Entwicklung von einer chronischen kontraktile Dysfunktion (einem chronischen Stunning) mit normalem Blutfluss in Ruhe hin zu einer von morphologischen Veränderungen begleiteten chronischen Dysfunktion mit eingeschränktem Blutfluss in Ruhe gibt.<sup>20, 21</sup> Die Autoren folgern daraus, dass

1. nicht der Prozess einer metabolischen Herunterregulierung als Antwort auf eine reduzierte Perfusion, sondern repetitives Stunning als pathophysiologische Ursache von myokardialer Hibernation zu gelten hat und
2. repetitives Stunning myokardialer Hibernation vorangeht.<sup>20, 21</sup>

Einige Autoren konnten auch an menschlichem, chronisch dysfunktionellem Myokard zeigen, dass Blutfluss und Sauerstoffverbrauch in Ruhe normal sind.<sup>22, 23</sup> Vanoverschelde et al. folgern daraus, dass hierbei die chronische myokardiale Dysfunktion durch repetitive Ischämien mit persistierendem Stunning-Effekt hervorgerufen wird.<sup>22</sup> Für eine detaillierte Betrachtung sei auf die Übersichtsarbeit von Rinaldi und Hall verwiesen.<sup>24</sup>

## **1.4 Zytokine**

Bei Zytokinen handelt es sich um Polypeptide oder Glykoproteine, die der autokrinen und parakrinen Signalübermittlung über spezifische, membrangebundene Rezeptoren dienen. Sie vermitteln eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Effekte. Als Reaktion auf extrinsischen Stress werden sie von unterschiedlichen Zellen, einschließlich aller im Myokard vorkommenden Zelltypen, freigesetzt.<sup>25</sup> Zytokine können anhand ihrer biologischen Aktivität in verschiedene Klassen eingeordnet werden. Bezüglich ihrer Funktion im Rahmen von Infektion bzw. Entzündungsreaktion werden pro- und antiinflammatorische Zytokine voneinander unterschieden. Die proinflammatorischen Zytokine fördern die Entzündungsreaktion durch vermehrte Expression von Genen, welche die Synthese von bestimmten Mediatormolekülen kodieren. Diese werden dann während einer Entzündungsreaktion vermehrt ausgeschüttet. Die antiinflammatorischen Zytokine hemmen die Aktivität der proinflammatorischen Zytokine. Zusammenfassend lässt sich die durch proinflammatorische Zytokine geförderte Entzündungsreaktion als Kaskade von Genprodukten beschreiben, welche normalerweise bei gesunden Menschen nicht produziert werden. Obwohl inflammatorische Produkte wie Endotoxine diese Kaskade auslösen, sind Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) besonders effektiv bei der Stimulierung der Expression dieser Gene und reagieren bei diesem Prozess synergistisch.

Antiinflammatorische Zytokine blockieren diesen Prozess oder schwächen zumindest die Intensität dieser Kaskade ab.<sup>26</sup>

## 1.5 Interleukin-1

Interleukin-1 gehört zur Klasse der proinflammatorischen Zytokine und wird von Monozyten und Endothelzellen freigesetzt.<sup>27</sup> Interleukin-1 kommt als IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vor. Weil beide Unterformen sich an denselben Rezeptor binden, besteht in der biologischen Wirkung kein Unterschied. Bei IL-1 $\alpha$  handelt es sich jedoch um ein zellgebundenes Zytokin, welches auch als Transkriptionsfaktor agieren kann, wohingegen IL-1 $\beta$  sezerniert wird und so wahrscheinlich bei systemischen Entzündungsreaktionen eine Rolle spielt.<sup>28</sup> IL-1 kann die körpereigene Abwehr aktivieren und als Immunstimulans wirken. Wegen der höchstgradig inflammatorischen Wirkung ist der Bereich zwischen klinischem Nutzen und inakzeptabler Toxizität beim Menschen jedoch sehr schmal.

Synthese, Verarbeitung, Sekretion und Funktion von IL-1 $\beta$  sind sehr eng regulierte Abläufe: IL-1 $\beta$  wird durch das IL-1 $\beta$ -Konversionsenzym (ICE), auch Caspase 1 genannt, aus einer biologisch inaktiven Vorstufe synthetisiert und dann von den Zellen in seiner biologisch aktiven Form freigesetzt.<sup>27</sup> IL-1 $\beta$  induziert die Genexpression der meisten anderen Zytokine, wie etwa TNF- $\alpha$  und IL-6, sowie der Chemokine und Adhäsionsmoleküle. Zusätzlich induziert es die Genexpression von verschiedenen Gewebeproteasen und Matrix-Metalloproteasen und hemmt die Synthese von Proteoglykanen. Im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  führt IL-1 $\beta$  im Knochenmark zu einer Zunahme von myeloischen Vorläuferzellen und fördert die Ausschüttung von neutrophilen Granulozyten, was zu einer Neutrophilie führt. Im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  tötet IL-1 $\beta$  keine Zellen ab.<sup>28</sup>

## 1.6 Interleukine/Zytokine bei kardialen Erkrankungen

Erste Hinweise darauf, dass IL-1 und TNF- $\alpha$  die Myokardfunktion direkt verschlechtern, gab es durch Serumuntersuchungen bei Patienten im septischen Schock, die eine deutliche Einschränkung der Myokardfunktion zeigten.<sup>29</sup> Weiterhin sind im Rahmen der verschiedenen pathophysiologischen Abläufe bei chronischer Herzinsuffizienz, Herztransplantationen und Chirurgie am offenen Herzen mit extrakorporaler Zirkulation sowie Myokardinfarkt und Angina pectoris erhöhte Plasmakonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) nachgewiesen worden.<sup>30, 31</sup> Die Effekte von Zytokinen auf das kardiovaskuläre System umfassen die Förderung von Entzündungsreaktionen sowie von intravaskulärer Gerinnung und Zelladhäsion, die Bildung von freien Radikalen, das Entstehen von Endothelschäden und möglicherweise das Fortschreiten von Atherosklerose.<sup>32, 33</sup>

Während einer Ischämie kommt es zur lokalen Produktion von Zytokinen, insbesondere von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ .<sup>34</sup> Diese Zytokine tragen zur ischämischen myokardialen Dysfunktion bei, indem sie die Genexpression der induzierbaren NO-Synthetase, der Cyclooxygenase-2 und der Phospholipase-A2 sowie von vaskulären Adhäsionsmolekülen und mehreren Chemokinen induzieren. Als Ergebnis kommt es zu einer sofortigen Depression der myokardialen Kontraktionskraft. Weiterhin wird das Herz durch Zytokine und Wachstumsfaktoren einem Remodeling-Prozess unterzogen, der zunächst eine Anpassungsfunktion besitzt, letztendlich aber auch von einer verminderten Kontraktilität begleitet wird. Hinweise für eine Modulation des Remodeling-Prozesses durch Zytokine stammen aus Untersuchungen, die eine Steuerung des Wachstums von kardialen Myozyten, der Synthese von kontraktilen Proteinen, der Fibroblastenproliferation und der Genexpression der extrazellulären Matrix durch TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 zeigen können. Es lässt sich nachweisen, dass die Plasmakonzentration von Zytokinen mit myokardialer Ischämie korreliert und möglicherweise sowohl die postischämische Entzündungsreaktion als auch die myokardiale Dysfunktion modulieren kann.<sup>30, 31</sup>

## 1.7 Caspasen

ICE gehört zu einer Familie von intrazellulären Cysteinyl-Aspartat-spezifischen Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden: ICE wird auch Caspase-1 genannt. Caspasen sind Schlüsselenzyme in der Signalkaskade des apoptotischen Zelltodes.<sup>35</sup>

Obwohl der apoptotische Zelltod zu starken ultrastrukturellen Veränderungen führt, kommt es durch Caspasen nicht zur unspezifischen Proteolyse aller Zellbestandteile, sondern nur bei spezifischen intrazellulären Proteinen zu einer proteolytischen Spaltung.<sup>35</sup> Schätzungen gehen von weniger als 200 Proteinen aus, wovon ungefähr 70 identifiziert werden konnten.<sup>36</sup> In den meisten Fällen lässt sich auf zellulärer Ebene die proteolytische Spaltung dieser Zielproteine während des Zelltodes logisch herleiten. Anhand einiger Beispiele möchte ich dies näher erläutern.

Eines der Kennzeichen des apoptotischen Zelltodes ist die Zerlegung des zellulären Genoms und dessen Aufspaltung in oligonucleosomale Fragmente. Caspasen unterdrücken normale DNA-Reparaturprozesse, indem sie mindestens zwei Schlüsselproteine deaktivieren, die an der Aufrechterhaltung der Intaktheit des Genoms beteiligt sind: PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) und DNA-PK (DNA-abhängige Proteinkinase). Gleichzeitig wird eine an Apoptose beteiligte Endonuclease (Caspase-aktivierte DNase = CAD) aktiviert, indem Caspasen ihren Inhibitor-Komplex (ICAD/DFF 45) aufspalten. Gemeinsam tragen diese

proteolytischen Spaltungen zu den Veränderungen der genomischen DNA bei, die den apoptotischen Zelltod begleiten. Strukturelle Komponenten des Zytoskeletts und des Kerngerüsts (Lamine, Fodrin, Gelsolin) müssen während der Apoptose aufgespalten werden, wobei Caspasen hier ebenfalls eine Schlüsselrolle spielen.<sup>36</sup> Auch Regulatoren des Zellzyklus, wie das Retinoblastom-Genprodukt und die  $\delta$ -Isoform der Proteinkinase C, werden durch Caspasen gespalten.<sup>36</sup> Zellen, die in organisierte Gewebestrukturen eingebettet sind, müssen aus diesen herausgelöst werden, was zumindest zum Teil von Caspasen, und zwar durch Spaltung der fokalen Adhäsionskinase (FAK), gefördert zu werden scheint.<sup>35</sup> Zusammenfassend lässt sich Folgendes festhalten: Die Spaltung dieser Zielproteine führt zur Unterdrückung von Reparaturmechanismen und Mechanismen, die die zelluläre Homöostase aufrechterhalten. Weitere Effekte sind das Anhalten des Zellzyklus und die Inaktivierung von Apoptosehemmstoffen. Auch der Abbau struktureller Komponenten von Zytoskelett und Kerngerüst, die Ablösung der Zelle aus den umgebenden Zellstrukturen sowie die Markierung der Zelle für die Aufnahme durch andere Zellen (wie z. B. Makrophagen) stellen Ergebnisse dieser Spaltungen dar. Jedoch führt nur der kollektive Effekt mehrerer Spaltungen einer begrenzten Anzahl von Schlüsselproteinen zu einem systematischen und geordneten Abbau der sterbenden Zelle.<sup>35, 36</sup>

Caspasen lassen sich nach Substratspezifität und Funktion in drei Gruppen einteilen. Caspasen mit proinflammatorischen Eigenschaften gehören zur Gruppe I. Hierzu zählen Caspase-1, -4, -5, -12 und -13. Die bevorzugten Substrate dieser Gruppe sind die Tetrapeptid-Sequenzen YVAD (= Tyr-Val-Ala-Asp) und WEHD (= Trp-Glu-His-Asp). Die proapoptotischen Caspasen werden entweder der Gruppe II zugeordnet, zu welcher Caspase-2, -3 und -7 gehören, oder der Gruppe III, der Caspase-6, -8, -9 und -10 angehören. Gemeinsame Substratspezifitäten sind die Tetrapeptid-Sequenz DEXD (= Asp-Glu-variabel-Asp) für Gruppe II bzw. L/VEXD (Leu/Val-Glu-variabel-Asp) für die Gruppe III. Die proapoptotischen Caspasen werden zusätzlich noch in apoptoseinitiierende (z. B. Caspase-8 und -9) und apoptoseausführende (z. B. Caspase-3 und -7) Caspasen unterteilt. Apoptoseinitiierende Caspasen gehören zur Gruppe III, apoptoseausführende zur Gruppe II. Dabei stehen die apoptoseinitiierenden Caspasen in der Caspasen-Kaskade über den apoptoseausführenden Caspasen. Als ein Beispiel möchte ich kurz die Aktivierung von Caspase-3, der wichtigsten apoptoseausführenden Caspase, über den Todesrezeptor-Signalweg und den mitochondrialen Signalweg beschreiben. Der Todesrezeptor-Signalweg wird durch Bindung eines extrazellulären Liganden (z. B. TNF- $\alpha$ ) an einen an die Zelloberfläche gebundenen Todesrezeptor gestartet und führt zur Aktivierung von Caspase-8.

Der mitochondriale Signalweg wird durch Zellstress (z. B. DNA-Schäden oder oxidativer Stress) begonnen und führt zur Aktivierung von Caspase-9. Procaspase-3 wird durch Caspase-8 oder -9 in Caspase-3 umgewandelt und spaltet eine Reihe von Substraten, welche den Zusammenbruch der DNA verursachen und die charakteristischen Anzeichen des apoptotischen Zelltodes hervorbringen.<sup>36, 37, 38</sup>

## 1.8 Caspase-Hemmer

Die Funktion der einzelnen Caspasen ist durch die Nutzung von spezifischen Hemmstoffen untersucht worden. Einer der am meisten gebrauchten Caspase-1-Hemmer ist der auf einem Peptid basierende Hemmer Ac-YVAD-CMK. Der Ac-Anteil zeigt an, dass er acetyliert ist. YVAD steht für das Tetrapeptid Tyr-Val-Ala-Asp und CMK für Chlormethylketon. Die Peptidsequenz eines Caspase-Hemmers wird durch die Substratpräferenz der entsprechenden Caspase bestimmt. Da alle Caspasen ihre Substrate hinter einem Aspartatrest spalten, enden alle auf einem Peptid basierenden Caspase-Hemmer mit der Aminosäure Aspartat (Kurzform D). YVAD und WEHD sind die bevorzugten Substrate von Caspase-1. Der Wirkmechanismus von auf Peptiden basierenden Caspase-Hemmern wird bestimmt durch die an sie gebundene chemische Gruppe: entweder ein Halomethylketon, z. B. Chloromethylketon (CMK) oder Fluoromethylketon (FMK), oder ein Aldehydrest (CHO). Das Halomethylketon alkyliert den aktiven Cysteinrest der Caspase und führt zu einer irreversiblen Inaktivierung. Der Aldehydrest verändert die Caspase nicht, so dass auf einem Peptid basierende Caspase-Hemmer, die mit einem Aldehyd verbunden sind, nur als Pseudosubstrat bzw. kompetitiver Hemmstoff fungieren. Beide Typen der auf Peptiden basierenden Hemmer können Caspasen *in vitro* effektiv hemmen; *in vivo* sind mit -CHO gekoppelte Hemmer weniger zellpermeabel und benötigen höhere Dosen, um einen Effekt zu erzielen. Substratspezifitäten können sich bei einzelnen Caspasen überschneiden, wobei diese Überschneidung meistens innerhalb einer der drei Caspasegruppen auftritt.

Caspase-1 ist ein Mitglied der Gruppe I, welche Caspase-1, -4, -5, -12 und -13 beinhaltet. Alle Caspasen der Gruppe I haben die Aufgabe der Zytokinverarbeitung, welche zu einer Entzündungsreaktion führt. Die Selektivität eines Caspase-Hemmers wird *in vitro* durch seine Hemmkonstante ( $K_i$ ) bestimmt. So ist zum Beispiel die Hemmkonstante von YVAD-CHO für Caspase-1 0,8 nM, verglichen mit 362 nM für Caspase-4 und 163 nM für Caspase-5. Die Hemmkonstante für Caspase-3, eine Gruppe II Caspase, ist mit >10000 nM dagegen wesentlich höher. Ein Verständnis für die Substratspezifität bei Caspasen ist wichtig, da es in der Literatur widersprüchliche Angaben hierzu gibt. So sind etwa auf YVAD basierende

Hemmer sowohl als selektive Hemmer für Caspase-1 als auch als unselektive Caspase-Hemmer bzw. Pancaspase-Hemmer bezeichnet worden. Bei Zugrundelegung der Hemmkonstante wird klar, dass bei Dosierungen, die in vivo verabreicht werden, ein auf YVAD basierender Hemmer Konzentrationen erreichen kann, die zur Hemmung von Caspase-4 oder -5 führen können; für die Hemmung von Caspase-3 wäre aber eine unüblich hohe Dosierung nötig. Die gebräuchlichsten unselektiven Caspase-Hemmer bzw. Pancaspase-Hemmer sind Z-VAD-FMK und Z-DEVD-FMK; das Z steht hierbei für N-Benzoyloxycarbonyl. Hemmer, die auf VAD und DEVD basieren, inhibieren sowohl die proapoptischen Caspasen als auch die proinflammatorischen Caspasen.<sup>38</sup>

## 1.9 ICE/Caspase-1 und Apoptose

ICE wurde als ein Mitglied der Caspasen-Familie identifiziert (ICE = Caspase 1), welche den apoptotischen Zelltod fördert.<sup>39</sup> Caspase-1 wandelt die Vorläufer von IL-1 $\beta$  und IL-18 (pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18) in biologisch aktives IL-1 $\beta$  und IL-18 um und ist an proinflammatorischen Prozessen beteiligt. Über eine Aktivierung von Caspase 3 ist aber auch eine Beteiligung an proapoptischen Prozessen denkbar.<sup>38</sup> Vermehrt gibt es Hinweise darauf, dass Apoptose eine Rolle bei der Pathophysiologie von Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz und myokardialen Stunning spielt.<sup>40, 41, 42, 43</sup> Auch myokardiale Ischämie-Reperfusion führt zu einem apoptotischen Zelltod von Myozyten. Dieser Prozess kann durch Caspase-Hemmer reduziert werden.<sup>38</sup> So könnte ICE/Caspase-1 theoretisch auch über eine indirekte Förderung der Apoptose – über die Aktivierung von Caspase-3 – zur myokardialen Dysfunktion beitragen.

## 1.10 Apoptose

Bei Apoptose handelt es sich um einen physiologischen Prozess und eine Form des Zelltodes, welcher zu einem Verlust von Einzelzellen mit Zellschrumpfung, DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation führt. Im Gegensatz zu dem nicht-apoptotischen Zelltod bleibt bei Apoptose die Plasmamembran in der Regel intakt.<sup>44, 45</sup> Bei Apoptose werden überschüssige, unerwünschte und gegebenenfalls schädliche Zellen nach Umwandlung zu Apoptosekörperchen von den umgebenden Zellen durch Phagozytose abgebaut, ohne dass eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Hierfür ist das Zusammenwirken von mehreren Proteinklassen mit komplexen apoptotischen Signalen und Signalübertragungswegen notwendig.<sup>45, 46</sup> Apoptose lässt sich in drei unterschiedliche Phasen unterteilen. In der ersten Phase, auch Initiierungsphase genannt, führen proapoptische Stimuli zur Aktivierung des molekularen Apparates der Apoptose. In der zweiten Phase, auch Effektorphase genannt,

werden die ausführenden Anteile des Apoptoseapparates vollständig aktiviert. Erst nachdem dies geschehen ist, lassen sich auch morphologische Kennzeichen in der dritten Phase, die auch als Abbauphase bezeichnet wird, ausmachen.<sup>45</sup> Ein Zelltod, der nicht durch Apoptose verursacht wird, wird von Pathologen als akzidenteller Zelltod bezeichnet. Der Begriff Nekrose wird in diesem Zusammenhang im Allgemeinen zwar gebraucht, ist aber irreführend, da mit Nekrose keine Form des Zelltodes an sich, sondern Veränderungen der Zelle bezeichnet werden, die erst nach dem Zelltod auftreten. Der durch Ischämie verursachte Zelltod kann als eigene Entität definiert werden und wird durch Versagen der Ionenpumpen der Plasmamembran verursacht. Da der ischämische Zelltod von einer Zellschwellung begleitet wird, ist der Begriff Onkose – abgeleitet von dem griechischen Ausdruck für Schwellung – vorgeschlagen worden. Der Begriff Onkose lässt sich als Gegenstück zur Apoptose definieren. Onkose ist gekennzeichnet durch das Anschwellen der Zellen und Zellorganellen sowie durch Bläschenbildung und erhöhte Permeabilität der Plasmamembran. Anschließend werden die Zelltrümmer im Rahmen einer Entzündungsreaktion phagozytiert. Sowohl nach Onkose als auch nach Apoptose kommt es zur Nekrose. Beim ersten Fall könnte man also von ischämischer, beim letzteren Fall von apoptotischer Nekrose sprechen.<sup>47, 48</sup> Um sich gegen fehlgeleitete und unangebrachte Apoptose zu schützen, verfügen Zellen auf allen Stufen des apoptotischen Prozesses über vielfältige protektive Mechanismen.<sup>37, 49</sup>

### **1.11 Ziel der Untersuchung**

Eine Hemmung von Bildung und Freisetzung des biologisch aktiven IL-1 $\beta$  durch einen ICE-/Caspase-1-Hemmer wäre ein potentieller therapeutischer Ansatzpunkt für die Behandlung einer myokardialen Dysfunktion. In Übereinstimmung damit konnten einige Autoren zeigen, dass ein spezifischer Inhibitor von ICE/Caspase-1 die funktionelle Erholung in einem In-vitro-Modell für myokardiales Stunning (Niedrigflussschämie und Reperfusion an isolierten Rattenherzen) verbesserte, wenn dieser entweder vor Ischämie und Reperfusion oder nur während der Reperfusion verabreicht wurde.<sup>50</sup> In der vorliegenden Studie haben wir folgende Fragestellung untersucht: Verbessert der ICE-/Caspase-1-Hemmer HMR-3480, vor Ischämie oder nur während der Reperfusion verabreicht, die Myokardfunktion in vivo nach kurzzeitiger Okklusion einer Koronararterie?

## **2 Methodik**

Die Versuche wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörden an insgesamt 20 Hausschweinen beiderlei Geschlechts durchgeführt.

### **2.1 Präparation**

Die Schweine (Gewicht von 20 bis 25 kg) wurden mit Ketamin (10 mg/kg i.m.) und Azaperon (4 mg/kg i.m.) prämediziert. Anschließend wurde eine Allgemeinanästhesie mit Natrium-Thiopental (20 mg/kg i.v.) eingeleitet. Nach Oberflächenanästhesie des Larynx mit Lidocain vierprozentig wurden die Schweine endotracheal intubiert. Danach wurde die Narkose durch kontinuierliche Infusion von Fentanyl (7,5 µg/kg/h) und kontrollierte Beatmung mit Isofluran (1 Vol. %) in einem Sauerstoff-Luft-Gemisch (30 % Sauerstoff, 70 % Luft) aufrechterhalten (Sulla 19, Pulmomat 19 K.1 Ventilator, Dräger Werke AG, Deutschland).<sup>51</sup> Während der Beatmung wurden die inspiratorische Sauerstoffkonzentration und die Ventilation so angepasst, dass die Blutgase und der pH-Wert in physiologischen Bereichen blieben.

Eine adäquate Narkosetiefe wurde durch das Fehlen von Muskelbewegungen und hämodynamischen Reaktionen während der chirurgischen Präparation angezeigt. Die neuromuskuläre Blockade während der Thorakotomie wurde durch Gabe von Vecuronium-Bromid (0,1 mg/kg i.v.) erreicht. Flüssigkeitsverluste wurden durch kontinuierliche Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (10 ml/kg/h) ausgeglichen. Zusätzlich erfolgten Bolusgaben zum Ausgleich von Blutverlusten. Die Körpertemperatur wurde mit einer Heizmatte und einer Infrarotlampe bei  $36,5\text{ °C} \pm 0,8\text{ °C}$  gehalten.

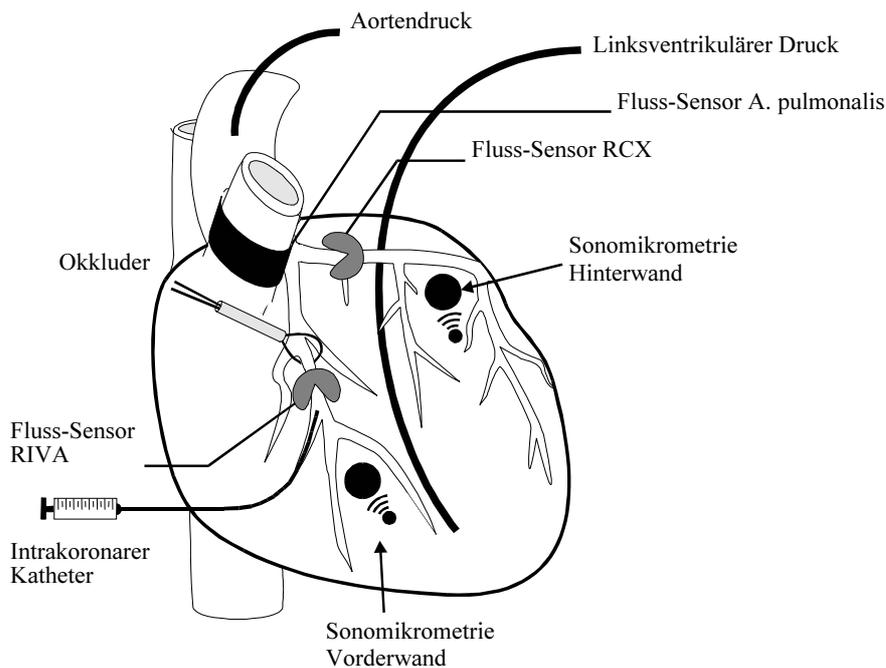
Zur Messung des Aortendrucks wurde ein über die rechte A. carotis bis in den Aortenbogen vorgeschobener Teflonkatheter mit angeschlossenem Druckwandler (Statham PD 23, Gould, USA) verwendet. Ein venöser Zugang über die linke V. jugularis diente der parenteralen Flüssigkeitszufuhr. Nach medianer Sternotomie und Perikardiotomie wurde der linksventrikuläre Druck mittels Katheterspitzenmanometer (Micro-Tip Pressure Transducer, PC-350 A, Millar Instruments, USA) gemessen, das über den linken Vorhof in den linken Ventrikel eingeführt wurde. Der Ramus interventricularis anterior (RIVA) und der Ramus circumflexus (RCX) der linken Koronararterie sowie die A. pulmonalis wurden freipräpariert und zur Messung des Koronarflusses sowie des Herzzeitvolumens mit Ultraschallmessköpfen (T 208, Transonic System Inc., USA) versehen.

Die regionale Myokardfunktion wurde mittels Sonomikrometrie gemessen. Dazu wurden zwei Paar Ultraschallkristalle (Triton Technology Inc., USA) implantiert: eines im vom RIVA

versorgten Gebiet (Vorderwand) und eines im vom RCX versorgten Gebiet (Hinterwand). Dabei lag jeweils der Sender subendokardial und der Empfänger epikardial genau über dem Sender.<sup>52</sup> Es wurde dabei darauf geachtet, die Kristalle mindestens einen Zentimeter von der Grenze der jeweiligen Versorgungsgebiete von RIVA und RCX entfernt zu platzieren. Die korrekte Platzierung der Ultraschallkristalle wurde anhand des auf einem Oszilloskop (Tektronix 453, Tektronix Inc., USA) sichtbar gemachten Ultraschallsignals überprüft.

Der erste Seitenast des RIVA distal des Ultraschallflusssensors wurde dann mit einem Polyethylenkatheter (0,6 mm Außendurchmesser) kanüliert, so dass die Spitze des Katheters an der Einmündung in den RIVA zum Liegen kam. Dies erlaubte eine intrakoronare Infusion in das vom RIVA versorgte Myokard. Einen Effekt auf die Messung der regionalen Wandfunktion hatte dies nicht, da die Kristalle an anderer Stelle innerhalb des Risikogebietes platziert waren (Abbildung 1). Die korrekte Lage des Katheters wurde durch intrakoronare Infusion von Noradrenalin (0,25 µg/min) verifiziert. Die Infusion von Noradrenalin führte zu typischen Veränderungen der regionalen Myokardfunktion in der vom RIVA perfundierten Vorderwand (Anstieg der systolischen Wandverdickung (SWV) um 15 % und der systolischen Wandverdickungs-Geschwindigkeit ( $V_s$ ) um 62 %).<sup>53</sup> Ein Okkluder wurde anschließend um den RIVA gelegt, und zwar zur späteren Okklusion und Auslösung einer Ischämie in der vom RIVA versorgten Vorderwand. Zur Entnahme von venösen Blutproben wurde ein Polyethylenkatheter (0,8 mm Außendurchmesser) in einer interventrikulären Vene platziert, welche die vom RIVA perfundierte Vorderwand distal der Okklusion drainierte. Zu festgelegten Zeitpunkten wurden je 1 ml systemisch-arterielles und koronarvenöses Blut entnommen, um daraus den myokardialen Sauerstoffverbrauch gemäß dem Fick'schen Prinzip zu berechnen.

Um hierbei einen Einfluss der Herzfrequenz auszuschließen, wurde die Frequenz durch einen rechtsatrialen Schrittmacher (USM 30, Biotronik, Deutschland) bei 100 Schlägen pro Minute konstant gehalten. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der Herzpräparation.



**Abbildung 1:** Präparation, *RIVA* Ramus interventricularis anterior; *RCX* Ramus circumflexus der linken Koronararterie

## 2.2 Substanzen und Lösungen

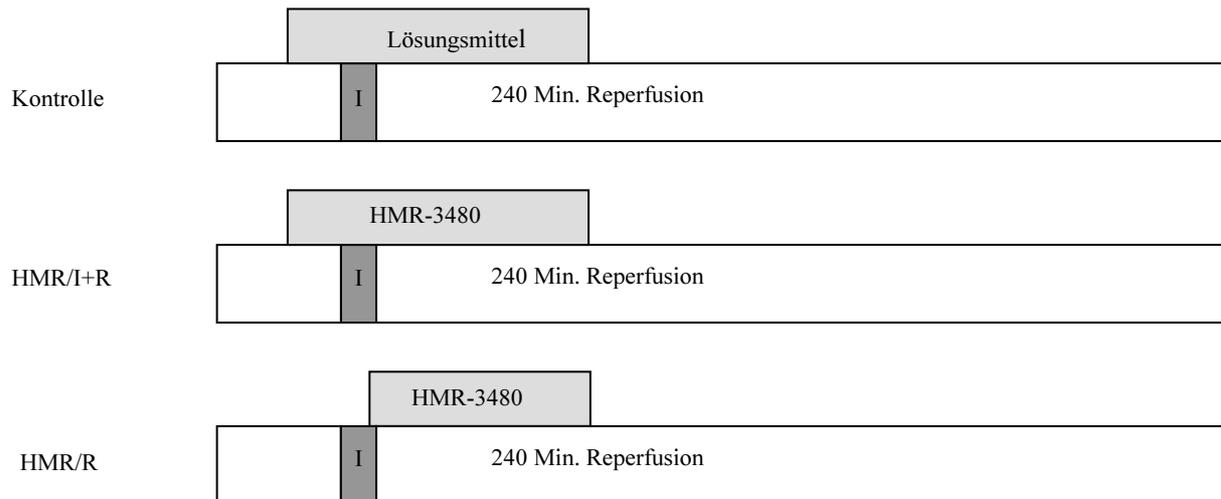
HMR-3480 wurde von Aventis Pharma, Frankreich, bezogen. Dimethyl-Sulfoxid (DMSO 0,01 %, Sigma) als Lösungsmittel und HMR-3480 in 0,01 % DMSO wurden direkt vor der Applikation zubereitet. Physiologische Kochsalzlösung wurde benutzt, um die Lösungen auf die gewünschte Konzentration zu verdünnen.

## 2.3 Versuchsprotokoll

Die Tiere erhielten 10000 I.E. Heparin, um eine RIVA-Thrombose nach der Ischämie zu vermeiden. Nach chirurgischer Präparation und Überprüfung der korrekten Lage des Seitenastkatheters folgte eine 20-minütige Ruhephase, um die Versuche unter stabilen hämodynamischen Verhältnissen beginnen zu können.

Sieben Schweine erhielten den ICE-/Caspase-1-Hemmer HMR-3480 in einer flussadaptierten koronaren Plasmakonzentration von 10µg/ml, beginnend 15 Minuten vor der Ischämie bis 60 Minuten Reperfusion (HMR/I+R, n = 7). Die Infusionsrate während der Ischämie richtete sich nach den Werten, die vor der Okklusion des RIVA gemessen worden waren. Bei gleich bleibender Infusionsrate kommt es hierbei durch den verminderten koronaren Fluss während der Ischämie zu höheren Plasmakonzentrationen von HMR-3480 als vor der Ischämie oder während der Reperfusion.

Weitere sechs Schweine erhielten den ICE-/Caspase-1-Hemmer während der ersten 60 Minuten der Reperfusion (HMR/R, n = 6). Um zu gewährleisten, dass der ICE-Hemmer im Herzen zu Beginn der Reperfusion vorhanden war, wurde die Infusion fünf Minuten vor Beginn der Reperfusion gestartet. Sieben Schweine, die als Kontrollgruppe (KON, n = 6) dienten, erhielten die gleiche Menge des Lösungsmittels, beginnend 15 Minuten vor Ischämie bis 60 Minuten Reperfusion. Das Versuchsprotokoll ist in Abbildung 2 dargestellt.



**Abbildung 2:** Versuchsprotokoll, I = 10-minütige Ischämie

Nach vier Stunden Reperfusion wurde das Herz mittels kardiopleger Lösung, die über die Aortenwurzel infundiert wurde, in der Diastole stillgelegt. Dann wurde der RIVA an der Stelle des Okkluders kanüliert und mit einprozentiger Dextranlösung perfundiert. Gleichzeitig wurde das restliche Myokard über die Aortenwurzel mit 0,2-prozentiger Evans-Blue-Lösung perfundiert. Als Lösungsmittel diente in beiden Fällen physiologische Kochsalzlösung. Durch Perfusion des Myokards mit diesen beiden Lösungen konnte das Risikogebiet als farbloses Areal vom restlichen, blau gefärbten Myokard unterschieden werden.

Das Herz wurde entnommen und parallel zur Herzbasis in sieben bis neun, jeweils vier Millimeter dicke Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden in gepufferter 0,75-prozentiger Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (Temperatur 37 °C) gefärbt, um nekrotisches Gewebe innerhalb des Risikogebietes zu identifizieren.<sup>54</sup> Bei keinem Versuch wurde ein Infarkt nach zehnminütiger RIVA-Okklusion nachgewiesen. Zusätzlich wurde das Gewicht der RIVA- und RCX-versorgten Gebiete bestimmt.

## 2.4 Auswertung und Statistik

Der linksventrikuläre systolische Druck (LVSD), die erste Ableitung des linksventrikulären Drucks über die Zeit ( $dP/dt$ ), der mittlere Aortendruck (MAD), das Herzzeitvolumen (HZV), der koronare Blutfluss im RIVA und im RCX der linken Koronararterie und schließlich die Wanddicke der Vorder- und Hinterwand wurden kontinuierlich über den gesamten Versuch hinweg auf einem Mehrkanalschreiber mitgeschrieben (Recorder 2800, Gould Inc., USA). Die Messsignale wurden mit einem Analog-Digital-Wandler (Data Translation, USA) mit einer Frequenz von 500 MHz digitalisiert und auf einem Personal Computer ausgewertet (Cordat, Schulz/Hücking, Universität Essen, Deutschland). Um atembedingte Schwankungen auszugleichen, wurden die Daten von 20 aufeinander folgenden Schlägen gemittelt.

Die Parameter der linksventrikulären Funktion waren der linksventrikuläre systolische Druck (LVSD) sowie die maximale und minimale linksventrikuläre Druckänderungsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{\max}$  bzw.  $dP/dt_{\min}$ ). Die linksventrikuläre Endsystole wurde als Zeitpunkt der minimalen linksventrikulären Druckänderungsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{\min}$ ) definiert,<sup>55</sup> die linksventrikuläre Enddiastole als Beginn des schnellen Aufstrichs des  $dP/dt$ -Signals. Die Systolendauer wurde als Zeitintervall zwischen Enddiastole und Endsystole bestimmt. Die regionale Endsystole wurde als Zeitpunkt der maximalen Wanddicke innerhalb eines 20 ms-Intervalls vor dem  $dP/dt_{\min}$  definiert.<sup>56</sup>

Als Parameter für die regionale Myokardfunktion dienten die relative systolische Wandverdickung (SWV [%]) und die mittlere systolische Wandverdickungsgeschwindigkeit ( $V_s$  [ $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ ]). Die Messung der Wandverdickung – in unserer Untersuchung durch Sonomikrometrie – ermöglicht eine zusammenfassende Beurteilung der mechanischen Funktion aller Myokardschichten.<sup>57</sup> Während der Ventrikelkontraktion kommt es zu einer relativ gleichmäßigen Einwärtsbewegung des Endokards, welche wiederum zu einer relativ gleichmäßigen Wandverdickung im gesamten Ventrikel während der linksventrikulären Systole führt.<sup>58</sup> Deswegen lässt sich durch einen Vergleich der Wanddicke bei Enddiastole mit der Wanddicke bei linksventrikulärer Endsystole die regionale Kontraktionsfraktion messen.<sup>56</sup> Bei der von uns berechneten relativen SWV handelt es sich um die Veränderung der systolischen Wanddicke zwischen Enddiastole und linksventrikulärer Endsystole, ausgedrückt als prozentualer Anteil der enddiastolischen Wanddicke.<sup>56</sup> Zur Berechnung der relativen SWV wurde die Differenz zwischen endsystolischer Wanddicke ( $WD_{es}$ ) und enddiastolischer Wanddicke ( $WD_{ed}$ ) gebildet. Diese Differenz wurde durch die enddiastolische Wanddicke dividiert und mit dem Faktor 100 multipliziert.

$$SWV = (WD_{es} - WD_{ed}) * \frac{100}{WD_{ed}}$$

Zur Berechnung der  $V_s$  wurde die absolute systolische Wandverdickung [mm] durch die Systolendauer [s] dividiert.

$$V_s = \frac{SWV}{Systolendauer}$$

Hiermit lässt sich die absolute systolische Wandverdickung pro Zeiteinheit, in unserer Berechnung pro Sekunde, darstellen.

Der myokardiale Sauerstoffverbrauch wurde gemäß dem Fick'schen Prinzip durch Multiplikation des RIVA-Flusses mit der Sauerstoffgehaltsdifferenz zwischen systemisch-arteriellem und koronarvenösem Blut abgeschätzt:

$$VO_2 = RIVA - Fluss \times (C_a O_2 - C_v O_2)$$

Der systemisch-arterielle und koronarvenöse Sauerstoffgehalt wurden folgendermaßen berechnet:

$$C_a O_2 = Hb_a \times 1,34 \times S_a O_2 + 0,003 \times p_a O_2$$

$$C_v O_2 = Hb_v \times 1,34 \times S_v O_2 + 0,003 \times p_v O_2$$

Alle Werte werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Um Veränderungen der hämodynamischen Messwerte über die Zeit sowie die Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen und der Kontrollgruppe zu untersuchen, wurde eine Zwei-Wege-Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Dunnett post-hoc-Test durchgeführt. Alle Vergleiche waren zweiseitig, und Unterschiede von  $P \leq 0,05$  wurden als signifikant definiert.

### **3 Ergebnisse**

Insgesamt wurden 32 Hausschweine instrumentiert. Bei neun Schweinen traten schwere Arrhythmien während des Versuchs auf: Fünf dieser Tiere verstarben durch Kammerflimmern und vier durch Asystolie. Bei einem Tier kam es zu einer Dissektion des RIVA, bei zwei Schweinen trat eine Hyperthermie am Ende der Reperfusion auf. Diese Tiere wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Daten von insgesamt 20 Schweinen wurden dann ausgewertet (KON, n = 7; HMR/I+R, n = 7; HMR/R, n = 6).

Das Gewicht des linken Ventrikels betrug  $52 \pm 16$  g bei der Kontrollgruppe (KON),  $56 \pm 10$  g bei HMR/I+R und  $57 \pm 9$  g bei HMR/R [alle: P = nicht signifikant].

Das Risikogebiet umfasste folgenden Anteil des linken Ventrikels:  $29 \pm 3$  % bei KON,  $26 \pm 11$  % bei HMR/I+R und  $31 \pm 9$  % bei HMR/R [alle: P = nicht signifikant]. Nach zehnmütiger RIVA-Okklusion war bei keinem Versuch ein Myokardinfarkt festzustellen.

#### **3.1 Effekt von HMR-3480 auf normoxisches Myokard**

Weder die intrakoronare Infusion des Lösungsmittels, noch jene von HMR-3480 führte zu einer Beeinflussung des koronaren Blutflusses im RIVA (Tabelle 2). Die SWV in der Vorderwand wurde nur leicht reduziert (Abbildung 3) [alle: P = nicht signifikant],  $V_s$  wurde nicht beeinflusst (Abbildung 4). Die SWV und die  $V_s$  im Kontrollgebiet blieben unverändert (Abbildung 3 und 4). Es zeigte sich auch kein signifikanter Effekt auf die globale Myokardfunktion, gemessen anhand LVSD,  $dp/dt_{max}$  und mittlerem Aortendruck (MAD) (Tabelle 1).

#### **3.2 Ischämie-Reperfusions-Versuche**

Nach der hämodynamischen Stabilisierungsphase waren die Gruppen unter Ausgangsbedingungen vergleichbar bezogen auf LVSD, linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDD), LV  $dp/dt_{max}$  und MAD. LVSD und LV  $dp/dt_{max}$  fielen während der RIVA-Okklusion geringfügig ab, erholten sich aber kurz nach Beginn der Reperfusion wieder. In der Reperfusionsgruppe kam es zu einem einzigen Zeitpunkt (10 Minuten Reperfusion) zu einem signifikanten Abfall des LVSD, ansonsten waren keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Behandlungsgruppen zu beobachten. Der MAD wurde zur Beurteilung der myokardialen Nachlast gemessen. Hierbei zeigten sich während der Dauer des Versuchs keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 1).

Der LVEDD als Messgröße der Vorlast betrug unter Ausgangsbedingungen  $8,1 \pm 1,9$  mmHg und war in allen Gruppen ähnlich [ $P = 0,43$  und  $0,49$  vs. KON]. Der LVEDD stieg in allen Gruppen während der RIVA-Okklusion geringfügig an, erholte sich aber sofort mit Beginn der Reperfusion. Der LVEDD war niedriger bei KON, was aber nur zum Ende der Versuche hin zu signifikanten Unterschieden führte ( $5,3 \pm 2,8$  mmHg vs.  $8,7 \pm 1,5$  mmHg;  $P = 0,02$  KON vs. HMR/I+R). Ansonsten gab es während der Versuche keine signifikanten Unterschiede.

Die Ausgangswerte von HZV und koronarem Blutfluss waren in allen Gruppen ähnlich (Tabelle 2). Das HZV blieb im Verlauf der Versuche fast konstant. Während der Koronarokklusion fiel der RIVA-Blutfluss auf 0 ml/min. Bei Beginn der Reperfusion zeigte der RIVA-Blutfluss kurzzeitig eine reaktive Hyperämie in allen Gruppen, ging danach aber wieder auf die Ausgangswerte zurück.

Die Ausgangswerte des absoluten Sauerstoffverbrauchs der ischämischen Region betragen bei KON  $0,75 \pm 0,43$  ml O<sub>2</sub>/min, bei HMR/I+R  $0,84 \pm 0,43$  ml O<sub>2</sub>/min und bei HMR/R  $1,13 \pm 0,54$  ml O<sub>2</sub>/min. Während der Ischämie wurde der Sauerstoffverbrauch von uns nicht bestimmt. Während der Hyperämie zu Beginn der Reperfusion stieg der Sauerstoffverbrauch gegenüber den Ausgangswerten bei KON und HMR/I+R an (KON:  $1,18 \pm 0,19$  ml/min; HMR/I+R  $1,91 \pm 0,54$  ml/min), während er bei HMR/R abfiel (HMR/R:  $0,95 \pm 0,69$  ml/min). Nach 4 Stunden Reperfusion betrug der Sauerstoffverbrauch bei KON  $1,34 \pm 0,69$  ml O<sub>2</sub>/min, bei HMR/I+R  $0,29 \pm 0,26$  ml O<sub>2</sub>/min und bei HMR/R  $1,01 \pm 0,39$  ml O<sub>2</sub>/min. Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Die regionale Wandfunktion während der Versuche, gemessen als SWV und V<sub>s</sub>, ist in Abbildung 3 und 4 gezeigt. Die RIVA-Okklusion führte zu einer verminderten Myokardfunktion und zu einer systolischen Auswärtsbewegung (bulging) der Vorderwand in allen Gruppen (SWV: KON  $-11,6 \pm 7,7$  %, HMR/I+R  $-8,3 \pm 8,6$  %, HMR/R  $-10,2 \pm 6,5$  %;  $P = 1,0$  KON vs. HMR/I+R und  $P = 0,23$  KON vs. HMR/R; V<sub>s</sub>: KON  $-2,2 \pm 1,4$  mm/s, HMR/I+R  $-1,5 \pm 1,7$  mm/s; HMR/R  $-2,1 \pm 1,5$  mm/s;  $P = 0,1$  KON vs. HMR/I+R und  $P = 0,9$  KON vs. HMR/R). Mit Beginn der Reperfusion erholten sich SWV und V<sub>s</sub>: Sie blieben zwar über die gesamte Reperfusiondauer, verglichen mit den Ausgangswerten, vermindert, aber ein signifikanter Unterschied zu den Ausgangswerten war nicht nachweisbar. Zwischen den Gruppen bestanden hinsichtlich SWV und V<sub>s</sub> keine Unterschiede (SWV: KON  $17,3 \pm 7,3$  %, HMR/I+R  $23,2 \pm 9,8$  %, HMR/R  $19,3 \pm 6,1$  %; V<sub>s</sub>: KON  $4,3 \pm 1,1$  mm/s, HMR/I+R  $6,1 \pm 3,9$  mm/s, HMR/R  $5,2 \pm 1,7$  mm/s;  $P =$  nicht signifikant KON vs. HMR/I+R oder HMR/R nach 240 Minuten Reperfusion). In der Hinterwand kam es mit Beginn der RIVA-Okklusion in

allen Gruppen zu einem kompensatorischen Anstieg von SWV und  $V_s$  (SWV: KON  $36,2 \pm 22,0$  %, HMR/I+R  $36,9 \pm 10,1$  %, HMR/R  $40,2 \pm 19,5$  %,  $V_s$ : KON  $6,4 \pm 4,1$  mm/s; HMR/I+R  $9,5 \pm 4,2$  mm/s; HMR/R  $10,4 \pm 4,7$  mm/s). Die Werte für SWV und  $V_s$  in der Hinterwand unterschieden sich zwischen den drei Gruppen während der Versuche nicht.

**Tabelle 1: Globale Hämodynamik**

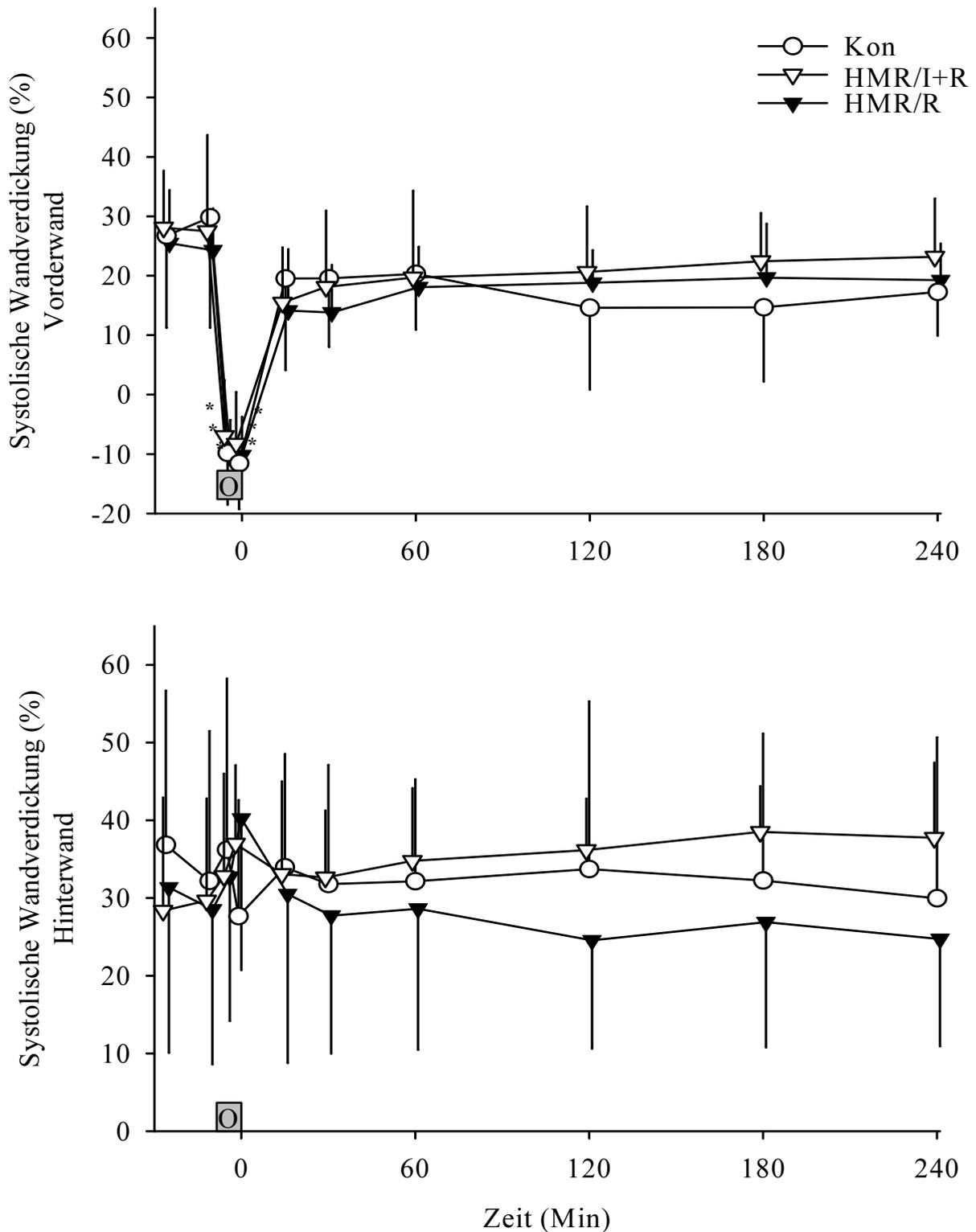
	<b>Kontrolle</b>	<b>HMR/I+R</b>	<b>HMR/R</b>
	<b>LVSD (mm Hg)</b>		
<b>Ausgangswert</b>	74.8 ± 12.9	79.0 ± 8.1	85.9 ± 4.9
<b>HMR-3480/Lösungsmittel</b>	75.2 ± 12.0	77.0 ± 6.3	79.8 ± 5.3
<b>Okklusion</b>			
<b>5 Min.</b>	65.7 ± 11.6	67.6 ± 7.7*	69.6 ± 7.3*
<b>9 Min.</b>	68.6 ± 11.3	68.4 ± 8.6	61.1 ± 14.8*
<b>Reperfusion</b>			
<b>5 Min.</b>	73.5 ± 10.9	78.9 ± 7.7	76.5 ± 5.6
<b>10 Min.</b>	69.5 ± 10.4	69.9 ± 16.6	68.9 ± 11.1*
<b>15 Min.</b>	69.7 ± 9.1	69.8 ± 16.1	77.1 ± 9.6
<b>30 Min.</b>	68.5 ± 9.8	73.7 ± 10.7	73.9 ± 5.5
<b>1 Std.</b>	80.6 ± 9.6	73.2 ± 10.4	76.6 ± 3.0
<b>2 Std.</b>	78.1 ± 7.8	76.1 ± 12.0	75.8 ± 8.4
<b>3 Std.</b>	72.8 ± 8.5	76.8 ± 10.2	71.6 ± 7.3
<b>4 Std.</b>	77.6 ± 14.8	78.1 ± 10.1	69.8 ± 8.0
	<b>dP/dt<sub>max</sub> (mm Hg s<sup>-1</sup>)</b>		
<b>Ausgangswert</b>	1954 ± 1145	2201 ± 480	2853 ± 812
<b>HMR-3480/Lösungsmittel</b>	2218 ± 1193	2127 ± 583	2345 ± 880
<b>Okklusion</b>			
<b>5 Min.</b>	1649 ± 734	1625 ± 498	1803 ± 543
<b>9 Min.</b>	1793 ± 747	1687 ± 469	1493 ± 745
<b>Reperfusion</b>			
<b>5 Min.</b>	1894 ± 919	2141 ± 396	2140 ± 719
<b>10 Min.</b>	1724 ± 855	1753 ± 604	1817 ± 685
<b>15 Min.</b>	1625 ± 799	1697 ± 660	2347 ± 115
<b>30 Min.</b>	1705 ± 702	1811 ± 506	2013 ± 598
<b>1 Std.</b>	2072 ± 1035	2009 ± 534	2178 ± 602
<b>2 Std.</b>	1999 ± 1005	2365 ± 789	2196 ± 691
<b>3 Std.</b>	1857 ± 867	2611 ± 700	2241 ± 719
<b>4 Std.</b>	2035 ± 908	2684 ± 704	2076 ± 708
	<b>MAD (mm Hg)</b>		
<b>Ausgangswert</b>	69.9 ± 15.5	69.9 ± 11.4	71.4 ± 9.1
<b>HMR-3480/Lösungsmittel</b>	69.6 ± 12.8	63.1 ± 8.3	69.5 ± 5.7
<b>Okklusion</b>			
<b>5 Min.</b>	61.6 ± 11.0	55.8 ± 7.3	58.5 ± 9.7
<b>9 Min.</b>	67.0 ± 14.5	51.6 ± 8.8	59.8 ± 11.5
<b>Reperfusion</b>			
<b>5 Min.</b>	66.9 ± 14.4	63.2 ± 5.5	66.1 ± 6.7
<b>10 Min.</b>	64.7 ± 14.5	55.9 ± 18.3	60.2 ± 13.3
<b>15 Min.</b>	67.0 ± 13.5	58.4 ± 15.9	67.5 ± 7.1
<b>30 Min.</b>	64.4 ± 12.2	62.5 ± 9.5	65.4 ± 6.3
<b>1 Std.</b>	72.4 ± 14.4	60.2 ± 12.4	67.0 ± 9.4
<b>2 Std.</b>	69.7 ± 12.3	56.9 ± 11.5	64.4 ± 10.5
<b>3 Std.</b>	67.6 ± 11.4	57.1 ± 8.3	60.3 ± 9.2
<b>4 Std.</b>	72.5 ± 21.2	58.6 ± 10.7	57.5 ± 3.8

Werte angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung, *HMR-3480/Lösungsmittel* Messwerte während Infusion von HMR-3480 oder des Lösungsmittels, *LVSD* linksventrikulärer systolischer Druck, *dP/dt<sub>max</sub>* maximale linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit, *MAD* mittlerer Aortendruck, \* p < 0.05 vs. Ausgangswert

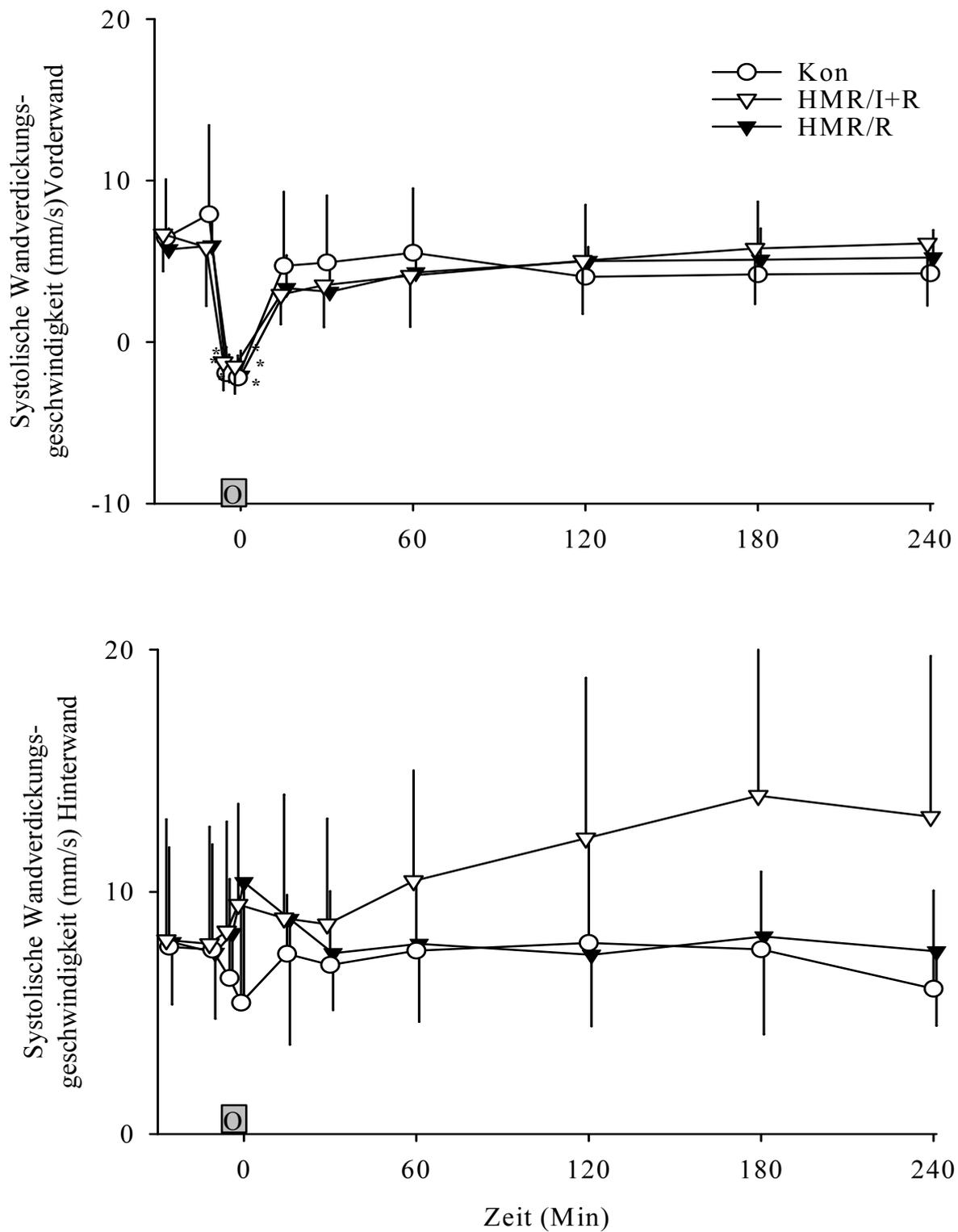
**Tabelle 2:** Herzzeitvolumen, RIVA und RCX-Flüsse

	<b>Kontrolle</b>	<b>HMR/I+R</b>	<b>HMR/R</b>
<b>Herzzeitvolumen (l min<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Ausgangswert</b>	1.9 ± 0.5	2.1 ± 0.7	2.3 ± 0.5
<b>HMR-3480/Lösungsmittel</b>	2.0 ± 0.6	2.3 ± 0.6	2.0 ± 0.6
<b>Okklusion</b>			
<b>5 Min.</b>	1.8 ± 0.5	1.8 ± 0.6	1.9 ± 0.4
<b>9 Min.</b>	1.7 ± 0.7	2.3 ± 0.7	1.6 ± 0.5
<b>Reperfusion</b>			
<b>5 Min.</b>	1.8 ± 0.4	2.2 ± 0.5	2.0 ± 0.3
<b>10 Min.</b>	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.7	1.8 ± 0.4
<b>15 Min.</b>	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.6	1.9 ± 0.7
<b>30 Min.</b>	1.5 ± 0.4	1.9 ± 0.5	2.0 ± 0.7
<b>1 Std.</b>	2.1 ± 0.5	1.9 ± 0.5	1.9 ± 0.4
<b>2 Std.</b>	1.8 ± 0.5	2.1 ± 0.9	1.8 ± 0.3
<b>3 Std.</b>	1.8 ± 0.5	2.2 ± 0.9	1.7 ± 0.6
<b>4 Std.</b>	1.7 ± 0.4	2.3 ± 1.1	1.6 ± 0.4
<b>RIVA-Fluss (ml min<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Ausgangswert</b>	22.0 ± 5.7	23.4 ± 5.2	26.3 ± 10.3
<b>HMR-3480/Lösungsmittel</b>	23.5 ± 8.1	24.3 ± 8.7	21.3 ± 8.8
<b>Okklusion</b>			
<b>5 Min.</b>	0	0	0
<b>9 Min.</b>	0	0	0
<b>Reperfusion</b>			
<b>5 Min.</b>	51.2 ± 33.3*	52.7 ± 16.4*	54.3 ± 19.1*
<b>10 Min.</b>	27.3 ± 9.4	23.9 ± 9.0	23.0 ± 10.9
<b>15 Min.</b>	22.3 ± 6.2	21.1 ± 9.4	22.9 ± 13.0
<b>30 Min.</b>	18.2 ± 8.9	19.3 ± 6.7	18.7 ± 6.8
<b>1 Std.</b>	21.7 ± 9.6	21.7 ± 8.3	19.0 ± 7.5
<b>2 Std.</b>	20.3 ± 9.3	22.7 ± 10.7	18.5 ± 6.4
<b>3 Std.</b>	19.6 ± 12.1	22.4 ± 7.0	19.8 ± 7.5
<b>4 Std.</b>	21.2 ± 10.7	24.3 ± 8.0	19.8 ± 7.4
<b>RCX-Fluss (ml min<sup>-1</sup>)</b>			
<b>Ausgangswert</b>	18.8 ± 11.5	23.1 ± 3.7	25.6 ± 5.5
<b>HMR-3480/Lösungsmittel</b>	17.7 ± 9.1	22.1 ± 4.9	25.6 ± 5.0
<b>Okklusion</b>			
<b>5 Min.</b>	17.8 ± 8.4	22.2 ± 3.9	22.3 ± 6.4
<b>9 Min.</b>	19.6 ± 8.9	23.0 ± 8.0	20.4 ± 7.5
<b>Reperfusion</b>			
<b>5 Min.</b>	20.9 ± 7.0	24.2 ± 6.4	22.9 ± 6.6
<b>10 Min.</b>	18.7 ± 8.9	20.9 ± 6.9	21.1 ± 4.9
<b>15 Min.</b>	18.1 ± 6.4	22.0 ± 4.3	25.6 ± 12.0
<b>30 Min.</b>	15.2 ± 8.3	20.6 ± 4.1	21.7 ± 5.4
<b>1 Std.</b>	19.1 ± 8.8	20.3 ± 1.4	22.8 ± 6.6
<b>2 Std.</b>	18.1 ± 8.8	24.3 ± 2.7	21.0 ± 6.1
<b>3 Std.</b>	21.1 ± 13.1	23.0 ± 4.3	25.7 ± 16.4
<b>4 Std.</b>	22.3 ± 11.8	25.0 ± 6.5	23.9 ± 10.4

Werte angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung, *HMR-3480/Lösungsmittel* Messwerte während Infusion von HMR-3480 oder des Lösungsmittels, *RIVA* Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie; *RCX* Ramus circumflexus der linken Koronararterie, \* p < 0.05 vs. Ausgangswert



**Abbildung 3:** Systolische Wandverdickung in der Vorder- und Hinterwand. *O* bezeichnet die Dauer der RIVA-Okklusion. Bei *Kon* wurde das Lösungsmittel verabreicht. *Kon* diente als Kontrollgruppe. Bei *HMR/I+R* und *HMR/R* wurden HMR-3480 verabreicht, entweder während der Ischämie und den ersten 60 Minuten der Reperfusion oder zu Beginn der Reperfusion. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. \* $P < 0.001$  gegenüber Ausgangswerten



**Abbildung 4:** Mittlere systolische Wandverdickungsgeschwindigkeit in der Vorder- und Hinterwand. *O* bezeichnet die Dauer der RIVA-Okklusion. Bei *Kon* wurde das Lösungsmittel verabreicht. *Kon* diente als Kontrollgruppe. Bei *HMR/I+R* und *HMR/R* wurden HMR-3480 verabreicht, entweder während der Ischämie und den ersten 60 Minuten der Reperfusion oder zu Beginn der Reperfusion. Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. \* $P < 0.001$  gegenüber Ausgangswerten

## **4 Diskussion**

Das in der Untersuchung verwendete Ischämie-Reperfusion-Modell sollte nach Ischämie in der Reperfusion eine verminderte regionale Wandfunktion im Sinne eines Stunning nachweisen. Allerdings ließen die Daten keine signifikante Verminderung der Wandfunktion in der Reperfusion und damit kein Stunning erkennen. Dies schränkt die Aussagekraft der Untersuchung ein. Eine Verlängerung der Ischämiezeit hätte gegebenenfalls zu statistisch signifikanten Unterschieden führen können. Wegen des gleichzeitig auch möglichen Auftretens von Nekrosen wurde die Ischämiezeit aber nicht verlängert. Die Komplexität des von uns gewählten Versuchsaufbaus mit einer hohen Letalität bereits bei der gewählten Ischämiezeit kann ebenfalls zum fehlenden Nachweis eines statistisch signifikanten Unterschieds der regionalen Wandfunktion beigetragen haben.

Wegen des fehlenden Nachweises von Stunning können wir auch keine Aussage darüber treffen, ob der ICE-/Caspase-1-Hemmer HMR-3480 einen Effekt auf die Erholung der Wandfunktion hatte oder nicht. Ein wesentlicher Einfluss auf Hämodynamik und die globale Myokardfunktion durch HMR-3480 selbst ist anhand der gewonnenen Daten nicht nachweisbar: Mit einer Ausnahme, dem signifikanten Abfall des LVSD im Vergleich zu den Ausgangswerten bei HMR/R zum Zeitpunkt „10 Minuten Reperfusion“, unterschieden sich RIVA-Fluss und die globale Myokardfunktion (LVSD,  $dP/dt$ , HZV) nicht zwischen der Kontrollgruppe und den Interventionsgruppen während der Reperfusion. Ein Grund für den signifikanten Abfall beim LVSD könnte möglicherweise auch die o.g. Komplexität des Versuchsaufbaus mit der hohen Letalität bei der gewählten Ischämiezeit sein. Die Ursache für diesen Unterschied bleibt aber insgesamt unklar.

Zusammenfassend lassen die gewonnenen Daten keine signifikante Verminderung der Wandfunktion in der Reperfusion und damit kein Stunning erkennen. Deshalb können wir einen Effekt der ICE-/Caspase-1-Hemmung durch HMR-3480 auf die Erholung der Wandfunktion nach kurzzeitigem Koronararterienverschluss am Schweineherzen in vivo weder nachweisen noch ausschließen.

### **4.1 Übertragbarkeit des Versuchsmodells auf den Menschen**

Zunächst stellt sich bei Untersuchungen am Schweinmodell die Frage nach der Übertragbarkeit auf den Menschen und die klinische Situation.

Für Mensch und Schwein lässt sich festhalten, dass eine ähnliche stammesgeschichtliche Entwicklung zum Allesfresser sowie die Anpassung an einen relativen Bewegungsmangel zur

Ausbildung eines ähnlichen kardiovaskulären Systems und kardialen Metabolismus führten. Die Ähnlichkeit von Mensch und Schwein in Hinblick auf das kardiovaskuläre System führt zu vergleichbaren Modellen des Herzens und der Koronargefäße, die für Untersuchungen von kardialer Funktion, koronarer Arteriosklerose, Angioplastie und Ischämie-Reperfusion genutzt werden. So gleichen sich Blutgase, pH-Wert, zirkulierendes Blut- und Plasmavolumen pro kg Körpergewicht sowie systemischer und pulmonaler Blutdruck. Die Ventrikelfüllung, der enddiastolische Druck, das Druck-Frequenzprodukt und die Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) stehen in ähnlicher Beziehung zum Sauerstoffverbrauch.<sup>59</sup>

Wie bei jedem Modell, so gibt es auch beim Schweinmodell gewisse Einschränkungen, die zu beachten sind. So sind, verglichen mit dem Menschen, das Herzzeitvolumen größer und der pulmonale und systemische Gefäßwiderstand höher, die Hämatokrit- und Hämoglobinwerte hingegen geringfügig niedriger. Das Schwein hat außerdem einen höheren myokardialen Sauerstoffverbrauch als der Mensch. Zusammen mit niedrigeren Hämatokrit- und Hämoglobinwerten führt dies zu einem höheren myokardialen Blutfluss pro g Gewebe.<sup>59</sup> Im Allgemeinen können also – unter Beachtung dieser Einschränkungen – die Ergebnisse am Schweinmodell auf die klinische Situation übertragen werden.

## 4.2 Stunning

Obwohl wir in unserem Ischämie-Reperfusions-Modell keine statistisch signifikante Verminderung der Wandfunktion nach Ischämie bzw. kein statistisch signifikantes Stunning nachweisen können, möchte ich doch auf Stunning eingehen, da die Auslösung von Stunning das eigentliche Ziel der vorliegenden Arbeit war. Das Ausmaß von Stunning bzw. des Verlustes der linksventrikulären Funktion wird durch die ischämische Belastung bestimmt, d.h. durch die Dauer und die Schwere des Sauerstoffdefizits, sowie durch die Größe des ischämischen Gebietes (global vs. regional).<sup>60, 61</sup> Bei Schweinen ist ein zehnminütiger Koronararterienverschluss ausreichend, um mit Beginn der Reperfusion zu einer Einschränkung der Myokardfunktion zu führen, ohne dabei jedoch einen Infarkt zu verursachen.<sup>62</sup> Bei unserem Versuchsaufbau wurde in der jeweils nach Versuchsende durchgeführten TTC-Färbung entsprechend kein nekrotisches Gewebe nachgewiesen. Die Reaktion auf eine Ischämie ist auch abhängig vom Vorhandensein einer Blutversorgung über Kollateralgefäße. Bei Schweinen ist die geringe Zahl von Kollateralgefäßen gut dokumentiert.<sup>63, 64</sup> Dies ist ein weiterer Unterschied im Vergleich zum Menschen: Im Gegensatz zum Schwein kommt es bei kardiovaskulären Risikopatienten mit einer KHK zur

Ausbildung von Kollateralen,<sup>65, 66, 67</sup> und dennoch lässt sich bei diesen Patienten auch das Auftreten von Stunning nachweisen.<sup>8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15</sup> Bei den in der vorliegenden Studie von uns verwendeten Schweinen haben wir die Blutversorgung über Kollateralgefäße wegen ihres geringen Vorhandenseins daher nicht quantifiziert. Bei der regionalen Wandfunktion, welche eine sehr sensitive Abschätzung der Kollateralperfusion im ischämischen Myokard erlaubt,<sup>57</sup> ließen sich während der Koronarakklusion zwischen den einzelnen Gruppen keine Unterschiede feststellen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass hinsichtlich der Kollateralperfusion signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden.

Myokardiales Stunning ist ein multifaktorieller Prozess, welcher selbst nur einen Teil des möglichen Reperfusionsschadens nach einer Ischämie-Reperfusionssituation darstellt. In klinischen Situationen kommen noch Reperfusionarrhythmien, der Untergang von Myozyten und die endotheliale und mikrovaskuläre Dysfunktion einschließlich des No-Reflow-Phänomens hinzu.<sup>1</sup> Myokardiales Stunning erfordert eine Interaktion von mehreren pathophysiologischen Mechanismen, von denen ich die wichtigsten im Folgenden kurz aufzeigen möchte.

#### **4.2.1 Sauerstoffradikal-Hypothese**

Die Sauerstoffradikal-Hypothese postuliert, dass Stunning durch oxidativen Stress nach der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen, wie dem Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder dem Hydroxylradikal ( $OH^\cdot$ ), verursacht wird.<sup>68, 69</sup> Bei isolierten und perfundierten Herzen konnte mit Hilfe von paramagnetischer Elektronen-Resonanz-Spektroskopie die Bildung von Sauerstoffradikalen während der postischämischen Reperfusion dokumentiert werden.<sup>70, 71</sup> Viele Studien konnten zeigen, dass reaktive Sauerstoffradikale, die in den ersten Minuten der Reperfusion gebildet werden, Stunning in vivo und in vitro sowohl bei großen Säugetieren als auch bei Nagetieren verursachen können.<sup>72, 73, 74, 75, 76, 77, 78</sup> Gestützt wurde die Hypothese auch durch Nachweise eines Anstiegs von Sauerstoffradikalen während Stunning,<sup>79, 80</sup> eines Schutzes vor Stunning durch Antioxidanzien<sup>79</sup> und einer kontraktile Dysfunktion durch zugeführte Sauerstoffradikale.<sup>81</sup> Die verfügbaren Daten weisen darauf hin, dass 50 bis 70 % des Stunning-Effektes auf der Freisetzung von Sauerstoffradikalen in den ersten Minuten der Reperfusion beruhen. Dies würde bedeuten, dass sich ein Großteil des Stunning-Effektes auch als Komplikation der Reperfusion bzw. als eine Art Reperfusionsschaden auffassen ließe.<sup>82</sup> Da sich Stunning durch den Einsatz von Antioxidanzien aber nicht vollständig hemmen lässt, ist es wahrscheinlich, dass sich eine weitere Komponente des Stunnings während der Ischämie entwickelt.<sup>68</sup>

## 4.2.2 Kalzium-Hypothese

Die Kalzium-Hypothese postuliert, dass Stunning das Ergebnis einer Störung der intrazellulären Kalzium-Homöostase darstellt. Sie impliziert, dass es in der frühen Phase der Reperfusion in den Muskelzellen zu einer vorübergehenden Kalziumüberladung kommt, welche zum Entstehen von Stunning beiträgt.<sup>83, 84, 85</sup> Es lässt sich nachweisen, dass eine vorübergehende Kalziumüberladung<sup>86</sup> und ein Abfall der Kalziumempfindlichkeit während der frühen Phase der Reperfusion zur kontraktile Dysfunktion beitragen.<sup>87</sup> Als eine mögliche Ursache für die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration wird eine erhöhte intrazelluläre Natriumkonzentration nach metabolischer Hemmung der Na-K-ATPase und Azidose angesehen.<sup>88, 89, 90</sup> Auch eine Störung von Kalziumaufnahme und -abgabe aus dem sarkoplasmatischen Retikulum kommt in Frage.<sup>91, 92</sup> Als eine Auswirkung der erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration kann es, möglicherweise über den Mechanismus der kalziumabhängigen Proteolyse, zu einem Abbau von Myofilamenten kommen.<sup>93, 94, 95</sup>

Beide o. g. Hypothesen könnten auch Teilaspekte ein und desselben pathophysiologischen Mechanismus sein. So könnten zum Beispiel Sauerstoffradikale Zellmembranen schädigen oder Transportprozesse in der Muskelzellmembran verändern. Dies würde dann zum vermehrten Einströmen von Kalziumionen über die Zellmembran und zu einer zellulären Kalziumüberladung führen.<sup>96, 97</sup>

Sauerstoffradikale können ebenfalls die Empfindlichkeit der Myofilamente gegenüber Kalzium herabsetzen, entweder indirekt über erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentrationen oder direkt über eine Veränderung der Troponinstruktur.<sup>98</sup> Diese Veränderung der Troponinstruktur kann durch eine veränderte Phosphorylierung und eine partielle Proteolyse der Myofilamente verursacht werden und führt zu Störungen der systolischen und diastolischen Funktion, welche sich auf molekularer Ebene durch Störung der Querbrückenzyklen und Kraftentwicklung äußern und zu einer ineffizienten Energieverwertung führen können.<sup>99</sup>

Doch auch veränderte Kalziumtransportprozesse könnten eine Rolle spielen. Durch Vergleiche von Myozyten aus Regionen mit Stunning und nicht-ischämischen Regionen konnten Kim et al. am Schwein eine deutliche Reduktion von kalziumgenerierten Spitzenströmen und der Stromdichte von L-Typ Kalziumkanälen zeigen, ohne dass dabei ein Abbau von Troponin nachzuweisen war. Dies deutet auf einen großen Unterschied zu den o.g. Untersuchungsergebnissen zur Kalzium-Hypothese hin, die an Nagetieren erbracht wurden.<sup>100</sup>

### **4.2.3 Einflüsse von Genexpression und Proteintranslation**

Molekularbiologische Untersuchungen deuten zudem auf einen Einfluss von Genexpression und Proteintranslation auf die myokardiale Dysfunktion während Stunning hin.<sup>101</sup> Einige Autoren konnten dabei eine Hochregulierung einiger Proto-Onkogene nach kurzfristigen Koronarokklusionen sowie eine erhöhte Transkription der Gene für die kalziumregulierenden Proteine Ca<sup>2+</sup>-ATPase, Calsequestrin und Phospholamban nachweisen.<sup>102, 103</sup> Dies könnte ein Hinweis auf spezifische Reparationsmechanismen der kalziummodulierenden Proteine sein und ebenso darauf, dass es sich beim Stunning um eine Schädigung von Proteinen handelt, die eine Reparatur benötigen. Die Zeit, die diese Reparationsvorgänge in Anspruch nahmen, entspricht relativ genau der Zeit der funktionellen Erholung.<sup>101</sup> Die Tatsache einer nur teilweisen Bestätigung in anderen Untersuchungen lässt sich durchaus mit technischen und methodischen Unterschieden erklären. So konnten Lüss et al. in ihrem Modell einer koronaren Hypoperfusion keine Erhöhung von Ca<sup>2+</sup>-ATPase-, Calsequestrin- und Phospholamban-Protein nachweisen.<sup>104</sup>

Depré et al. haben die Hypothese überprüft, ob myokardiale Ischämie zur Ausführung eines Genprogramms führt, welches das Überleben der Zellen unterstützt. Durch die Technik der substraktiven Hybridisierung konnten sie zeigen, dass es nach Ischämie zu einer Hochregulierung von einigen antiapoptotischen, zytoprotektiven und wachstumsfördernden Genen kommt, welche das Überleben der Zellen begünstigen.<sup>105</sup> In weiteren Untersuchungen konnten Hofstaetter et al. an isolierten Rattenherzen einen ischämieinduzierten Schutz gegen NO-induzierte Apoptose zeigen. Dieser Schutz wurde von einer verstärkten Induktion antiapoptotischer Gene begleitet.<sup>106</sup>

### **4.2.4 Einflüsse von extrazellulären Faktoren**

Chandrashekar et al. hingegen hinterfragten die Ansicht, dass Stunning auf zellulären Mechanismen beruhe. In ihrer Untersuchung an isolierten Ratten-Myozyten zeigten sich nur geringe Unterschiede bei Kontraktion, Kalziumverarbeitung und Kalziumsensitivität zwischen gesundem und „stunned“ Myokard. Sie deuteten dies als einen Hinweis darauf, dass extrazelluläre Faktoren wie Abnormalitäten der extrazellulären Matrix oder der Kopplung zwischen Myozyten und Interstitium für die Ausbildung der myokardialen Dysfunktion bei Stunning wichtig sind.<sup>107</sup>

#### **4.2.5 Einflüsse von abnormem Sauerstoffmetabolismus**

Ergebnisse aus Tierversuchen deuten auf ein durch Stunning verursachtes Sauerstoffparadoxon hin, was bedeutet, dass der Sauerstoffverbrauch trotz einer verminderten Myokardfunktion gleich bleibt.<sup>108, 109, 110, 111, 112</sup> Bezogen auf den Sauerstoffmetabolismus während Stunning beim Menschen gibt es Untersuchungen, die keinen Unterschied im Sauerstoffverbrauch zwischen dysfunktionellem und funktionellem Myokard nachweisen können.<sup>8, 15</sup> Dies würde auf einen unangemessen hohen Sauerstoffverbrauch – bezogen auf den Grad der gezeigten Dysfunktion – hindeuten.<sup>4</sup> Eine mögliche Erklärung für diese Ineffizienz könnte ein zu hoher Energiebedarf für die elektromechanische Kopplung sein.<sup>109</sup> Auch das Vorkommen eines zusätzlichen metabolischen Stunning wird postuliert.<sup>110</sup> Auf weiterführende Literaturquellen zu den Mechanismen von Stunning sei hier kurz verwiesen.<sup>113, 114, 115, 116, 117</sup>

#### **4.3 ICE-/Caspase-Hemmung bei Ischämie-Reperfusion**

Untersuchungen, die die inflammatorische Reaktion während einer Ischämie-Reperfusionssituation in den Mittelpunkt stellten, konnten einen signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -Plasmakonzentration bei Patienten nach akutem Herzinfarkt zeigen.<sup>118, 119</sup> Weitere Autoren konnten nachweisen, dass die Syntheseleistung von IL-1 $\alpha$ , IL-6, G-CSF und TNF- $\alpha$ , aber nicht von IL-1 $\beta$ , bei Patienten nach Herzinfarkt signifikant gesteigert wurde.<sup>120</sup> Auch Neumann et al. konnten keine signifikante Veränderung der IL-1 $\beta$ -Plasmakonzentration nach Reperfusion feststellen. Ihnen war es aber möglich, signifikante Veränderungen der Plasmakonzentrationen von IL-6 und IL-8 nachzuweisen.<sup>121</sup>

In verschiedenen experimentellen Modellen von Ischämie-Reperfusion haben therapeutische Ansätze, welche die kardiale Entzündungsreaktion begrenzten, positive Effekte gezeigt. In unterschiedlichen Tiermodellen des akuten Herzinfarktes konnte die Infarktgröße durch Gabe von unselektiven Caspase-Hemmern sowie selektiven Caspase-1-Hemmern (ICE = Caspase-1) signifikant reduziert werden. An einem Rattenmodell konnten Yaoita et al. zeigen, dass der unselektive Caspase-Hemmer ZVAD-FMK die Infarktgröße und die Anzahl der apoptotischen Kardiomyozyten im Infarktgebiet und im umgebenden Gewebe reduziert.<sup>122</sup> Holly et al. konnten mit dem selektiven Caspase-1-Hemmer YVAD-CMK eine 31-prozentige Reduktion der Infarktgröße an Kaninchen demonstrieren.<sup>123</sup> Mocanu et al. untersuchten an isolierten Rattenherzen die Effekte der folgenden Inhibitoren: ZVAD-FMK, ein unselektiver Caspase-Hemmer, Z-IETD-FMK, ein selektiver Caspase-8-Hemmer, Z-LEHD, ein selektiver Caspase-9-Hemmer, und Ac-DEVD-CMK, ein selektiver Caspase-3-Hemmer. Alle wurden

vor Ischämie (Ischämiedauer 35 Minuten) verabreicht, und alle reduzierten die Infarktgröße nach zwei Stunden Reperfusion.<sup>124</sup> In einer von Okamura et al. mit negativem Ergebnis durchgeführten Untersuchung an Ratten wurden der selektive Caspase-3-Hemmer DEVD-CHO und der selektive Caspase-1-Hemmer YVAD-CHO fünf Minuten vor Ischämie gegeben. Nach 30 Minuten Ischämie, gefolgt von 6 Stunden Reperfusion war die Infarktgröße unverändert, obwohl die Anzahl von apoptotischen Kardiomyozyten und die myokardiale Caspase-3-Aktivität signifikant reduziert waren.<sup>125</sup> Ein Grund für das negative Ergebnis könnte die Aldehydgruppe sein, welche – wie weiter oben bereits erläutert wurde – zu einer verringerten Zellpermeabilität des entsprechenden Hemmers führt. Deswegen könnten höhere Konzentrationen des Hemmers benötigt werden, um ein ähnliches Ergebnis wie mit Hemmern zu erzielen, die eine Methylketongruppe enthalten. Huang et al. untersuchten an Kaninchen den Effekt einer unselektiven Caspase-Hemmung mit ZVAD-FMK und BocD-FMK, welche entweder vor oder nach Ischämie in einem In-vivo-Modell verabreicht wurden. Bei Gabe fünf Minuten vor Ischämie konnte bei beiden Hemmern eine Reduktion der Infarktgröße gezeigt werden. Bei Gabe 20 Minuten nach Beginn der Ischämie war nur ZVAD-FMK in der Lage, die Infarktgröße zu reduzieren.<sup>126</sup> Kovacs et al. konnten an isolierten Rattenherzen eine Reduktion der Infarktgröße mit selektiver Caspase-1-Hemmung (YVAD-CMK) nachweisen; mit selektiver Caspase-Hemmung durch DEVD-CMK (Caspase-3) und Z-LEHB-FMK (Caspase-9) konnten sie keinen Effekt nachweisen.<sup>127</sup> Pomerantz et al. waren an menschlichem Vorhofgewebe in der Lage zu zeigen, dass sich nach 30 Minuten Ischämie und 45 Minuten Reperfusion mit dem selektiven Caspase-1-Hemmer YVAD-CMK die Funktion und Anzahl der überlebenden Zellen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe verbessern ließ.<sup>128</sup> Chapman et al. konnten sowohl mit dem neuartigen Caspase-Hemmer MMPSI, welcher für Caspase-3 und -7 selektiv ist, als auch mit dem selektiven Caspase-3-Hemmer DEVD-FMK sowie mit dem unselektiven Caspase-Hemmer ZVAD-FMK die Infarktgröße an Kaninchenherzen reduzieren. In diesen von Chapman et al. durchgeführten Untersuchungen in einer Langendorff-Präparation konnte jedoch der vor Ischämie verabreichte selektive Caspase-1-Hemmer YVAD-CMK die Infarktgröße nicht reduzieren.<sup>129</sup> Wang et al. konnten an Kaninchen durch Gabe des selektiven Caspase-1-Hemmers Ac-YVAD-CMK nach 20-minütiger Ischämie und 10 Minuten vor Beginn der Reperfusion die Infarktgröße nach 4 Stunden Reperfusion reduzieren. Sie konnten auch eine Verminderung von Apoptosemarkern und IL-1 $\beta$ -Protein sowie eine verminderte Aktivität von Caspase-1 und -3 zeigen.<sup>130</sup> Armstrong und Mitarbeiter wiederum konnten zeigen, dass der unselektive Caspase-Hemmer

IDN-6734 die Infarktgröße an Rattenherzen reduzieren konnte, wenn dieser vor oder eine Stunde nach Reperfusion des RIVA verabreicht wurde.<sup>131</sup>

#### **4.4 Apoptose bei kardialen Erkrankungen**

Mitglieder der Caspasen-Familie spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose von Kardiomyozyten. Apoptose wiederum ist mit dem Ischämie-Reperfusionsschaden nach Myokardischämie oder nach kardioplegem Herzstillstand bei Herzoperationen in Verbindung gebracht worden.<sup>132, 133</sup>

Zum Nachweis von Apoptose werden biochemische Methoden angewandt. Das biochemische Kennzeichen von Apoptose ist der Abbau von DNA durch endogene DNasen, welche die internukleosomalen Regionen in doppelsträngige DNA-Fragmente von einer Länge von 180 bis 200 Basenpaaren spalten. Der Nachweis dieser internukleosomalen DNA-Fragmentation dient dem Nachweis von Apoptose. Die DNA-Fragmente lassen sich durch Elektrophorese von isolierter DNA als Leiter-Muster sichtbar machen. Zusätzlich werden mit Hilfe der TUNEL-Methode solche Zellen, die DNA-Strangbrüche enthalten, für die lichtmikroskopische Analyse erkennbar. TUNEL steht für „Terminal-Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling“: Hierbei werden die Strangbrüche mit Hilfe des Enzyms Terminale-Desoxyribosyl-Transferase durch markierte Nukleotide zum Vorschein gebracht.<sup>45</sup>

Bei Tiermodellen haben einige Autoren apoptotische Zellen in der ischämischen Region nach Ischämie-Reperfusion nachweisen können.<sup>134, 135, 136, 137</sup> Doch auch nach alleiniger Ischämie ließ sich Apoptose nachweisen,<sup>137, 138</sup> während dies anderen Autoren nach alleiniger Ischämie, ohne Reperfusion, nicht gelang.<sup>134, 135</sup> Hierbei könnten Unterschiede zwischen den Versuchstieren eine Rolle spielen: Die beiden erstgenannten Studien wurden an Ratten, die letztgenannten an Kaninchen und Hunden durchgeführt. Weiterhin kann das Fehlen von Apoptose nach alleiniger Ischämie auch durch die Entleerung der intrazellulären ATP-Speicher während der vorangegangenen Ischämie erklärt werden, da es sich bei Apoptose um einen energieverbrauchenden Prozess handelt.<sup>41</sup> Durch Hypoxie lässt sich an Zellkulturen Apoptose auslösen.<sup>139, 140</sup> Aber auch oxidativer Stress und die zelluläre Kalziumüberladung, welche ebenfalls mit myokardialen Stunning in Verbindung gebracht werden, scheinen bei der Auslösung von Apoptose nach Ischämie-Reperfusion eine Rolle zu spielen.<sup>135, 140, 141</sup> An isolierten Rattenherzen ließ sich zeigen, dass Apoptose nach Auslösung von oxidativem Stress auftrat. Dieser Reperfusionsschaden konnte durch Antioxidanzien rückgängig gemacht

werden.<sup>142, 143, 144</sup> Bei Ratten konnten Kajstura et al. Apoptose von Kardiomyozyten sowohl im frühen als auch im späten Stadium eines Myokardinfarktes nachweisen. In derselben Studie übertraf die Anzahl der apoptotischen Zellen innerhalb von zwei Stunden nach Ligierung einer Koronararterie die Anzahl der nekrotischen Zellen bei weitem. Apoptose war hierbei für bis zu sechs Stunden die Hauptform des Zelltodes.<sup>138</sup> Es handelt sich jedoch hierbei um ein Herzinfarktmodell mit einer permanenten Okklusion, also nur Ischämie ohne Reperfusion, so dass die Übertragbarkeit auf ein Ischämie-Reperfusions-Modell nur vermutet werden kann. Außerdem muss das Ergebnis noch in weiteren Studien bestätigt werden. Es bleibt aber eine sehr detaillierte Darstellung des Beitrags des apoptotischen Zelltodes zum Herzinfarkt im Vergleich zum nicht-apoptotischen Zelltod.<sup>145</sup> Das Vorkommen von Apoptose ist auch bei ischämischen und dilatativen Kardiomyopathien, akutem Myokardinfarkt, Atherosklerose, Myokarditis, kardialer Transplantatabstoßung und Herzerkrankungen, die durch Rhythmusstörungen verursacht werden, nachgewiesen worden.<sup>37, 43</sup>

Auf molekularer Ebene ist man sich aber noch unsicher, welche Mechanismen die Apoptose von Kardiomyozyten bei klinisch manifesten Herzerkrankungen initiieren. Obwohl sich an Zellkulturen von Kardiomyozyten durch mehrere Stimuli (z. B. Katecholamine, Atrialer Natriuretischer Faktor, Angiotensin II, übermäßige Dehnung) Apoptose induzieren lässt, ist die Relevanz in der klinischen Situation bisher unbewiesen. Darüber hinaus bestehen Zweifel, ob der Nachweis von Apoptose mittels alleiniger TUNEL-Färbung für einen Beweis ausreicht und ob zum Nachweis einer Apoptose von Kardiomyozyten nicht auch ultrastrukturelle Zellveränderungen in situ zu fordern sind.<sup>146</sup> Ein weiterer Hinweis darauf, dass das bei experimentellen Ischämie-Reperfusions-Schäden gezeigte Apoptoseausmaß mit Vorsicht zu interpretieren ist, stammt von Ohno et al.<sup>145</sup> Sie haben gezeigt, dass DNA-Fragmentationen, ein anerkanntes Merkmal von apoptotischen Zellen, auch in Myozyten mit elektronenmikroskopischen Merkmalen von irreversibler Onkose vorkommen können. Merkmale von apoptotischen Zellen hingegen konnten die Autoren mit dem Elektronenmikroskop nicht nachweisen.<sup>147</sup> Für einige Autoren ist die DNA-Fragmentation deshalb auch kein eindeutiges Kriterium für die Abgrenzung zwischen apoptotischem und nicht-apoptotischem Zelltod.<sup>145</sup> Im Gegensatz dazu aber konnten in weiteren Untersuchungen keine mit der TUNEL-Methode gefärbten Zellen bei Koagulationsnekrosen nachgewiesen werden. Außerdem konnte belegt werden, dass die post mortem auftretende Autolyse bei Nerven- und Herzgewebe die Zuverlässigkeit der TUNEL-Methode nicht beeinflusst.<sup>45</sup> Trotz Nachweis von Apoptose ist der Anteil der Apoptose am gesamten Zelluntergang sowie an der gesamten Infarktgröße und kardialen Schädigung bislang abschließend nicht geklärt

worden.<sup>145, 146</sup> Die Anzahl von Studien an In-vivo-Modellen von kardialen Erkrankungen ist begrenzt. Als Beispiel sei hier die Studie von Yaoita et al. genannt.<sup>122, 146</sup> Auch ist unklar, ob Apoptose ursächlich für pathologische Zustände am Herzen ist oder erst sekundär nach diesen auftritt. Erschwerend kommt hinzu, dass antiapoptotische Therapien darüber hinaus zum nicht-apoptotischen Zelltod führen könnten und damit keine funktionelle Verbesserung nach sich ziehen würden.<sup>43, 148</sup>

## 4.5 Caspase-1 und Apoptose

Die Mitwirkung von Caspasen bei Apoptose nach Ischämie-Reperfusion konnte in einigen Untersuchungen nachgewiesen werden. Immunhistochemie in Verbindung mit einer TUNEL-Färbung zum Nachweis von Apoptose hat Caspase-3-Aktivierung in apoptotischen Zellen nachgewiesen und die Aktivierung von Caspase-3 vor dem Auftreten einer TUNEL-positiven Färbung gezeigt.<sup>149</sup> Holly et al. konnten eine gesteigerte Umwandlung der Vorläuferformen von Caspase-2, -3 und -7 in ihre jeweils aktive Form durch Immunoblotting nach einem Ischämie-Reperfusionsschaden bei Kaninchen nachweisen.<sup>123</sup> Mit einem simulierten Ischämie-Reperfusionsschaden bei einer Zellkultur aus menschlichen Myozyten konnten Stephanou et al. durch Immunoblotting zeigen, dass Caspase-3, -8 und -9 nach Ischämie in ihre aktive Form umgewandelt werden.<sup>150</sup> Die Aktivierung von Caspasen erfolgt demzufolge rasch nach Beginn der Myokardischämie, aber noch vor dem Auftreten von Apoptose.<sup>38</sup>

Neben der Teilnahme an der proteolytischen Verarbeitung von proinflammatorischen Zytokinen gibt es auch für Caspase-1 Hinweise auf eine zusätzliche Funktion bei der Initiierung von Apoptose nach Ischämie-Reperfusion. Kuida et al. konnten nachweisen, dass Caspase-1/ICE bei Fas-induzierter Apoptose von normalen Thymozyten eine Rolle spielt. Hierbei wurde die Apoptose durch einen agonistischen Fas-Antikörper induziert. Das Fas-Antigen ist ein Protein der Zelloberfläche und ein Mitglied der TNF- $\alpha$ -Rezeptor-Superfamilie, welche die Apoptose in aktivierten T-Zellen vermittelt.<sup>151</sup> Der Todesrezeptor Fas wird während Ischämie und Hypoxie in Kardiomyozyten merklich hochreguliert, und Myozyten könnten so durch die Interaktion mit dem Fas-Liganden für apoptotischen Zelltod empfänglich werden.<sup>37</sup> Während unter Kontrollbedingungen weniger als 1 % der Myozyten Fas exprimieren, so sind es mehr als 50 % innerhalb weniger Stunden nach Ischämie oder Ischämie-Reperfusion.<sup>138, 152</sup> In eine ähnliche Richtung deutet eine Untersuchung, die zeigt, dass eine bei der Umwandlung von Procaspase-1 in Caspase-1 freigesetzte Prodomäne über eine Aktivierung von Caspase-8 die Fas-induzierte Apoptose verstärkt.<sup>153</sup> Andererseits ist jedoch völlig unklar, ob der für die Fas-induzierte Apoptose essentielle Fas-Ligand im

ischämischen Myokard überhaupt gebildet wird.<sup>37</sup> Dimmeler et al. konnten zeigen, dass eine durch TNF- $\alpha$  induzierte Apoptose mittels eines Caspase-1-Hemmers oder eines Caspase-3-Hemmers verhindert werden konnte.<sup>154</sup> Andere Autoren konnten nachweisen, dass es durch Einsatz von selektiven Caspase-1-Hemmern (Ac-YVAD-CMK und Z-YVAD-FMK) ebenfalls zu einer verminderten Produktion von Caspase-3 – einer apoptoseinitierenden Caspase – kommt, und postulieren die Aktivierung von Caspase-3 durch Caspase-1. Die Möglichkeit einer direkten Hemmung von Caspase-3 durch die selektiven Caspase-1-Hemmer wird in diesen Untersuchungen zwar diskutiert, doch bei den erreichten Konzentrationen für nicht relevant erachtet: im Fall von Ac-YVAD-CMK wegen der durch die inhibitorische Konstante ausgedrückten, unterschiedlich starken Hemmwirkung auf Caspase-1 ( $K_i$  0,8 nM) und -3 ( $K_i > 10000$  nM), im Fall von Z-YVAD-FMK wegen der nachgewiesenen Selektivität für Caspase-1. Auch in weiteren In-vitro-Untersuchungen konnten die Autoren zeigen, dass Konzentrationen von 500 nM Ac-YVAD-CMK eine fast ausschließliche Hemmung der Aktivität von Caspase-1 zur Folge hatten und die Aktivität von Caspase-3 fast überhaupt nicht beeinflussten.<sup>130, 155</sup>

Van de Craen et al. haben gezeigt, dass Caspase-1 und Caspase-11 die Procaspasen -3, -6 und -7 in ihre Wirkform umwandeln können. Die Autoren folgern daraus, dass die proinflammatorischen Caspasen in der Aktivierungskaskade oberhalb der apoptoseausführenden Caspasen stehen, da umgekehrt die apoptoseausführenden Caspasen nicht in der Lage waren, Procaspase-1 in die Wirkform umzuwandeln.<sup>156</sup> Diese Ergebnisse lassen sich mit einer Studie in Einklang bringen, die im Rahmen von Fas-induzierter Apoptose eine sequentielle Aktivierung von proinflammatorischen (Caspase-1) und apoptoseausführenden (Caspase-3) Caspasen zeigen konnte.<sup>157</sup> Ebenso konnte Caspase-8 in den durchgeführten Untersuchungen die apoptoseausführenden Caspasen -3, -6 und -7 aktivieren sowie die Procaspasen -1, -11 und -12 in die Wirkform umwandeln. Da die Caspasen -1 und -11 auch effiziente Aktivatoren der apoptoseausführenden Caspasen waren, stellen die Autoren die Hypothese auf, dass die proinflammatorischen Caspasen je nach Zelltyp und Art des apoptotischen Stimulus in die Verstärkung der von Caspase-8 initiierten Aktivierung der apoptoseausführenden Caspasen involviert sein könnten.<sup>156</sup> Einige Zelltypen (Thymozyten und embryonale Fibroblasten) bei Caspase-1 Knock-out-Mäusen weisen einen reduzierten Fas-vermittelten Zelltod auf, was darauf hinweist, dass Caspase-8 hierbei wenigstens teilweise über eine Aktivierung von proinflammatorischen Caspasen wirkt.<sup>151</sup> Der Todesrezeptor-Signalweg benötigt vielleicht in manchen Zelltypen Caspase-1 und/oder

Caspase-11 zur einwandfreien Ausführung, während diese bei anderen Zelltypen nicht benötigt oder überbrückt werden.<sup>156</sup>

An Mäuse-Myozyten konnte gezeigt werden, dass eine Caspase-1-Überexpression und deren Aktivierung durch Hypoxie oder Endotoxine zu Apoptose führen kann.<sup>158, 159</sup> Stephanou et al. konnten an Kardiomyozyten zeigen, dass es sowohl im Rahmen von durch simulierte Ischämie induzierter als auch durch Interferon-Gamma induzierter Apoptose zu einer Überexpression des Transkriptionsfaktors STAT-1 kommt und in deren Folge zu einer Aktivierung des Promotors des Caspase-1-Gens.<sup>160</sup> Die STAT-1-Signalkaskade wird damit – und in Übereinstimmung mit einigen anderen Untersuchungen – für die Expression von Caspase-1 und Apoptose in bestimmten Zelllinien benötigt.<sup>161, 162</sup>

## 4.6 Fazit

In unserer Untersuchung wollten wir die Effekte einer Hemmung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  auf die Myokardfunktion an einem Ischämie-Reperfusion-Modell untersuchen. Als Grundlage für unsere Untersuchung diente eine Studie, in der die Gabe eines selektiven ICE-/Caspase-1-Hemmers (Ac-YVAD-CHO) die postischämische Erholung der Myokardfunktion nach Stunning an isolierten Rattenherzen verbesserte; und zwar sowohl bei Gabe vor Ischämie und Reperfusion als auch bei alleiniger Gabe vor Reperfusion.<sup>50</sup> Da sich jedoch anhand der gewonnenen Daten kein Stunning nachweisen ließ, können wir keine Aussage zu Effekten einer ICE-/Caspase-1-Hemmung auf die Myokardfunktion in unserem Modell treffen.

Zusammenfassend lassen sich während myokardialer Ischämie-Reperfusion sowohl eine inflammatorische Reaktion<sup>118, 119, 120, 121</sup> als auch ein apoptotischer Zelluntergang<sup>132, 133, 134, 135, 136, 137</sup> nachweisen. Die inflammatorische Reaktion kann die myokardiale Funktion beeinträchtigen, wie anhand einer beträchtlichen myokardialen Protektion durch sowohl eine selektive Caspase-1-Hemmung<sup>123, 127, 128, 130</sup> als auch eine unselektive Caspase-Hemmung bzw. Pancaspase-Hemmung<sup>122, 124, 126, 129, 131</sup> gezeigt werden konnte. Eine Beeinträchtigung der myokardialen Funktion erscheint auch für den apoptotischen Zelluntergang denkbar.<sup>37, 43, 138, 145, 146</sup>

Die Enzymfamilie der Caspasen (= Cysteinyl-Aspartat-spezifische Proteasen) ist über die proinflammatorischen und die proapoptotischen Caspasen an beiden Prozessen beteiligt.<sup>35, 36, 37, 38, 39</sup> Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 $\beta$  wird durch das Interleukin-Konversionsenzym (ICE), auch Caspase-1 genannt, in seine aktive Form umgewandelt.<sup>27, 38</sup>

Die Synthese der IL-1 $\beta$ -Vorstufe und die Aktivierung von ICE/Caspase-1 finden während einer Ischämie-Reperfusionssituation statt: An Rattenherzen ließ sich innerhalb von 15 bis 30 Minuten nach Ischämiebeginn ein rascher Konzentrationsanstieg von IL-1 $\beta$ -mRNA nachweisen. Die Konzentration dieser mRNA sank nach 24 Stunden wieder auf die Ausgangswerte ab.<sup>34</sup> IL-1 $\beta$  wird möglicherweise aber auch durch alternative enzymatische Kaskaden gebildet, wie etwa Trypsin, Elastase und andere Proteasen, welche sich im Allgemeinen in inflammatorischen Flüssigkeiten nachweisen lassen.<sup>163</sup> Der Anteil dieser Proteasen an der In-vivo-Umwandlung von präIL-1 $\beta$  in die Wirkform ist unbekannt, es wird aber stets biologisch aktives IL-1 $\beta$  produziert. Neben der Beteiligung an proinflammatorischen Prozessen gibt es für ICE/Caspase-1 Hinweise auf eine indirekte Verstärkung der Signalkaskade der proapoptotischen Caspasen.<sup>151, 153, 155, 156, 157</sup> bzw. zumindest Hinweis auf eine Mitwirkung bei Apoptose.<sup>151, 154, 158, 159</sup>

Aus experimentellen Beobachtungen lässt sich aber auch ableiten, dass unter bestimmten Umständen Caspase-unabhängige Mechanismen zu Apoptose führen können. Dies könnte dann zur Folge haben, dass in diesen Situationen die Caspase-Hemmer als antiapoptotische Wirkstoffe nutzlos sind.<sup>46</sup> So konnten Sperandio et al. einen programmierten nicht-apoptotischen Zelltod nachweisen, der sich durch Caspase-Hemmung nicht unterdrücken ließ.<sup>164</sup> Bei einer Untersuchung von Ruetten et al. an isolierten Rattenherzen wurde nach spezifischer Hemmung von Caspase-3, einer ICE-ähnlichen Protease, eine signifikant verbesserte postischämische Erholung der Myokardfunktion nach Stunning festgestellt.<sup>165</sup> Der Schutzmechanismus schien ebenso unabhängig von Apoptose zu sein.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass nicht ein einzelner Faktor, sondern vielmehr unterschiedliche und vielfältige Mechanismen zur Entwicklung der postischämischen Einschränkung der Myokardfunktion beitragen. Ungeachtet der Ergebnisse unserer Studie stellt die Hemmung von proinflammatorischen Zytokinen eine klinisch relevante therapeutische Strategie zur Reduktion von ischämieinduzierter myokardialer Dysfunktion dar.

## 5 Literaturverzeichnis

- <sup>1</sup> Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, Vrints CJ. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process. *Int. J. Cardiol.* 2005; **100**: 179-190.
- <sup>2</sup> Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res. Cardiol.* 2002; **97**: 268-275.
- <sup>3</sup> Bolli R. Mechanism of myocardial “stunning”. *Circulation* 1990; **82**: 723-738.
- <sup>4</sup> Barnes E, Khan MA. Myocardial stunning in man. *Heart Fail. Rev.* 2003; **8**: 155-160.
- <sup>5</sup> Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J. Clin. Invest.* 1975; **56**: 978-985.
- <sup>6</sup> Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; **66**: 1146-1149.
- <sup>7</sup> Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol. Rev.* 1999; **79**: 609-634.
- <sup>8</sup> Gerber BL, Wijns W, Vanoverschelde JL, Heyndrickx GR, De Bruyne B, Bartunek J, Melin JA. Myocardial perfusion and oxygen consumption in reperfused noninfarcted dysfunctional myocardium after unstable angina: direct evidence for myocardial stunning in humans. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; **34**: 1939-1946.
- <sup>9</sup> Agostini D, Iida H, Takahashi A. Positron emission tomography with oxygen-15 of stunned myocardium caused by coronary artery vasospasm after recovery. *Br. Heart J.* 1995; **73**: 69-72.
- <sup>10</sup> Ito H, Tomooka T, Sakai N, Higashino Y, Fujii K, Katoh O, Masuyama T, Kitabatake A, Minamino T. Time course of functional improvement in stunned myocardium in risk area in patients with reperfused anterior infarction. *Circulation* 1993; **87**: 355-362.
- <sup>11</sup> Sheiban I, Tonni S, Benussi P, Marini A, Trevi GP. Left ventricular dysfunction following transient ischaemia induced by transluminal coronary angioplasty. Beneficial effects of calcium antagonists against post-ischaemic myocardial stunning. *Eur. Heart J.* 1993; **14** (Suppl A): 14-21.
- <sup>12</sup> Gray R, Maddahi J, Berman D, Ralymond M, Waxman A, Ganz W, Matloff J, Swan HJ. Scintigraphic and hemodynamic demonstration of transient left ventricular dysfunction immediately after uncomplicated coronary artery bypass grafting. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1979; **77**: 504-510.
- <sup>13</sup> Ambrosio G, Betocchi S, Pace L, Losi MA, Perrone-Filardi P, Soricelli A, Piscione F, Taube J, Squame F, Salvatore M, Weiss JL, Chiariello M. Prolonged impairment of regional contractile function after resolution of exercise-induced angina. Evidence of myocardial stunning in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; **94**: 2455-2464.
- <sup>14</sup> Barnes E, Dutka DP, Khan M, Camici PG, Hall RJ. Effect of repeated episodes of reversible myocardial ischemia on myocardial blood flow and function in humans. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002; **282**: H1603-H1608.
- <sup>15</sup> Barnes E, Hall RJ, Dutka DP, Camici PG. Absolute blood flow and oxygen consumption in stunned myocardium in patients with coronary artery disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; **39**: 420-427.

- <sup>16</sup> Cooper HA, Braunwald E. Clinical importance of stunned and hibernating myocardium. *Coron. Artery Dis.* 2001; **12**: 387-392.
- <sup>17</sup> Ambrosio G, Tritto I. Clinical manifestations of myocardial stunning. *Coron. Artery Dis.* 2001; **12**: 357-361.
- <sup>18</sup> Kloner RA, Arimie RB, Kay GL, Cannom D, Matthews R, Bhandari A, Shook T, Pollick C, Burstein S. Evidence for stunned myocardium in humans: a 2001 update. *Coron. Artery Dis.* 2001; **12**: 349-356.
- <sup>19</sup> Gowda RM, Khan IA, Vasavada BC, Sacchi TJ. Reversible myocardial dysfunction: basics and evaluation. *Internat. J. Cardiol.* 2004; **97**: 349-363.
- <sup>20</sup> Shivalkar B, Flameng W, Szilard M, Pislaru S, Borgers M, Vanhaecke J. Repeated stunning precedes myocardial hibernation in progressive multiple coronary artery obstruction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; **34**: 2126-2136.
- <sup>21</sup> Fallavollita JA, Canty JM. Differential 18F-2-Deoxyglucose Uptake in viable dysfunctional myocardium with normal resting perfusion: Evidence for chronic stunning in pigs. *Circulation* 1999; **99**: 2798-2805.
- <sup>22</sup> Vanoverschelde JL, Wijns W, Depre C, Essamri B, Heyndrickx GR, Borgers M, Bol A, Melin JA. Mechanisms of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium. *Circulation* 1993; **87**: 1513-1523.
- <sup>23</sup> Marinho NV, Keogh BE, Costa DC, Lammerstma AA, Ell PJ, Camici PG. Pathophysiology of chronic left ventricular dysfunction. New insights from the measurement of absolute myocardial blood flow and glucose utilization. *Circulation* 1996; **93**: 737-744.
- <sup>24</sup> Rinaldi CA, Hall RJ. Evidence that stunning can be cumulative in man. *Heart Fail. Rev.* 2003; **8**: 161-165.
- <sup>25</sup> Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. *Circ. Res.* 2004; **95**: 1140-1153.
- <sup>26</sup> Dinarello CA. Proinflammatory Cytokines. *Chest* 2000; **118**: 503-508.
- <sup>27</sup> Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; **8**: 253-65.
- <sup>28</sup> Dinarello CA. Interleukin-1 $\beta$ . *Crit. Care Med.* 2005; **33**: S460-S462.
- <sup>29</sup> Dinarello CA, Pomerantz BJ. Proinflammatory cytokines in heart disease. *Blood Purif.* 2001; **19**: 314-321.
- <sup>30</sup> Blum A, Miller H. Role of cytokines in heart failure. *Am. Heart J.* 1998; **135**: 181-186.
- <sup>31</sup> Yue P, Massie BM, Simpson PC, Long CS. Cytokine expression increases in nonmyocytes from rats with postinfarction heart failure. *Am. J. Physiol.* 1998; **275**: H250-H258.
- <sup>32</sup> Libby P, Sukhova G, Lee RT, Galis ZS. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1995; **25** (Suppl. 2): S9-S12.
- <sup>33</sup> Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M, Gimbrone MA, Jr., Loskutoff DJ. Cytokine activation of vascular endothelium. Effects on tissue-type plasminogen activator and type 1 plasminogen activator inhibitor. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 5797-5803.
- <sup>34</sup> Herskowitz A, Choi S, Ansari AA, Wesselingh S. Cytokine mRNA expression in postischemic/reperfused myocardium. *Am. J. Pathol.* 1995; **146**: 419-428.

- <sup>35</sup> Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 1997; **22**: 299-306.
- <sup>36</sup> Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 1999; **6**: 1028-1042.
- <sup>37</sup> Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ. Res.* 1998; **82**: 1111-1129.
- <sup>38</sup> Faubel S, Edelstein CL. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Curr. drug targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 2005; **5**: 269-287.
- <sup>39</sup> Gu Y, Sarnecki C, Aldape RA, Livingston DJ, Su MS. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by interleukin-1 beta converting enzyme and its homologs TX and Nedd-2. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 18715-18718.
- <sup>40</sup> Sabbah HN, Sharov VG. Apoptosis in heart failure. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1998; **40**: 549-562.
- <sup>41</sup> Krijnen PAJ, Nijmeijer R, Meijer CJLM, Visser CA, Hack CE, Niessen HWM. Apoptosis in myocardial ischaemia and myocardial infarction. *J. Clin. Pathol.* 2002; **55**: 801-811.
- <sup>42</sup> Dispersyn GD, Borgers M. Apoptosis in the heart: About programmed cell death and survival. *News Physiol. Sci.* 2001; **16**: 41-47.
- <sup>43</sup> Khoynezhad A, Jalali Z, Tortolani AJ. Apoptosis: Pathophysiology and therapeutic implications for the cardiac surgeon. *Ann. Thorac. Surg.* 2004; **78**: 1009-1018.
- <sup>44</sup> Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.* 1982; **17**: 229-259.
- <sup>45</sup> Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 2000; **45**: 528-537.
- <sup>46</sup> Concha O, Abdel-Meguid SS. Controlling Apoptosis by inhibition of caspases. *Curr. Med. Chem.* 2002; **9**: 713-726.
- <sup>47</sup> Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* 1995; **146**: 3-15.
- <sup>48</sup> Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. *Toxicol. Pathol.* 1997; **25**: 82-88.
- <sup>49</sup> Bortner CD, Cidlowski JA. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002; **42**: 259-281.
- <sup>50</sup> Ruetten H, Dimmeler S. Caspase inhibitors improve post-ischemic functional recovery in isolated rat working hearts. *Circulation* 1999; **100 (Suppl. I)**: I-10.
- <sup>51</sup> Husby P, Heltne JK, Koller ME, Birkeland S, Westby J, Fosse R, Lund T. Midazolam-fentanyl-isoflurane anaesthesia is suitable for haemodynamic and fluid balance studies in pigs. *Lab. Anim.* 1998; **32**: 316-323.
- <sup>52</sup> Schipke J, Heusch G, Schulz R, Thämer V. An easy and quick implantation procedure for the measurement of myocardial wall thickness using sonomicrometry. *Basic Res. Cardiol.* 1987; **82**: 411-414.
- <sup>53</sup> Schlack W, Ebel D, Thämer V. Effect of inotropic stimulation on the synchrony of left ventricular wall motion in a dog model of myocardial stunning. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 1996; **40**: 621-630.

- <sup>54</sup> Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 1981; **393**: 287-297.
- <sup>55</sup> Abel FL. Maximal negative dP/dt as an indicator of end of systole. *Am. J. Physiol.* 1981; **240**: H676-H679.
- <sup>56</sup> Theroux P, Franklin D, Ross J Jr., Kemper WS. Regional myocardial function during acute coronary artery occlusion and its modification by pharmacologic agents in the dog. *Circ.Res.* 1974; **35**: 896-908.
- <sup>57</sup> Gallagher KP. Regional myocardial flow-function relationship in ischemia. In: Heusch G, ed. *Pathophysiology and rational pharmacotherapy of myocardial ischemia.* Darmstadt: Steinkopff, Springer 1990: 111-135.
- <sup>58</sup> Guth BD, Schulz R, Heusch G. Evaluation for parameters for the assessment of regional myocardial contractile function during asynchronous left ventricular contraction. *Basic Res. Cardiol.* 1990; **85**: 550-562.
- <sup>59</sup> McKenzie JE. Swine as a model in cardiovascular research. In: Tumbleson ME and Schook LB ed. *Advances in Swine in biomedical research, Vol. 1.* New York: Plenum Press 1996: 7-18.
- <sup>60</sup> Preuss KC, Gross GJ, Brooks HL, Wartier DC. Time course of recovery of “stunned” myocardium following variable periods of ischemia in conscious and anesthetized dogs. *Am. Heart J.* 1987; **114**: 696-703.
- <sup>61</sup> Pagani M, Vatner SF, Baig H, Braunwald E. Initial myocardial adjustments to brief periods of ischemia and reperfusion in the conscious dog. *Circ. Res.* 1978; **43**: 83-92.
- <sup>62</sup> Weisel RD. Models of myocardial stunning. *J. Card. Surg.* 1993; **8**: 287-290.
- <sup>63</sup> Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 1987; **21**: 737-746.
- <sup>64</sup> Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ.Res.* 1990; **66**: 1133-1142.
- <sup>65</sup> Charney R, Cohen M. The role of the coronary collateral circulation in limiting myocardial ischemia and infarct size. *Am. Heart J.* 1993; **126**: 937-945
- <sup>66</sup> Clements IP, Christian TF, Higano ST, Gibbons RJ, Gersh BJ. Residual flow to the infarct zone as a determinant of infarct size after direct angioplasty. *Circulation* 1993; **88**: 1527-1533.
- <sup>67</sup> Sabia PJ, Powers ER, Ragosta M, Sarembock IJ, Burwell LR, Kaul S. An association between collateral blood flow and myocardial viability in patients with recent myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 1992; **327**: 1825-1831.
- <sup>68</sup> Bolli R. Oxyradicals in the pathogenesis of myocardial stunning. In: Heyndrickx G.R., Vatner S.F., Wijns W., eds. *Stunning, hibernation, and preconditioning: Clinical pathophysiology of myocardial ischemia.* Philadelphia: Lippincott-Raven Press 1997: 205-228.
- <sup>69</sup> Kim SJ, Depre C, Vatner SF. Novel mechanisms mediating stunned myocardium. *Heart Fail. Rev.* 2003; **8**: 143-153.

- <sup>70</sup> Ambrosio G, Zweier JL, Flaherty JT. The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1991; **23**: 1359-1374.
- <sup>71</sup> Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; **84**: 1404-1407.
- <sup>72</sup> Sun JZ, Tang XL, Park SW, Qiu Y, Turrens JF, Bolli R. Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late preconditioning against myocardial stunning in conscious pigs. *J. Clin. Invest.* 1996; **97**: 562-576.
- <sup>73</sup> Ambrosio G, Weisfeldt ML, Jacobus WE, Flaherty JT. Evidence for a reversible oxygen radical-mediated component of reperfusion injury: reduction by recombinant human superoxide dismutase administered at the time of reflow. *Circulation* 1987; **75**: 282-291.
- <sup>74</sup> Ambrosio G, Zweier JL, Jacobus WE, Weisfeldt ML, Flaherty JT. Improvement of postischemic myocardial function and metabolism induced by administration of deferoxamine at the time of reflow: the role of iron in the pathogenesis of reperfusion injury. *Circulation* 1987; **76**: 906-915.
- <sup>75</sup> Gross GJ, Farber NE, Hardman HF, Warltier DC. Beneficial actions of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium of dogs. *Am. J. Physiol.* 1986; **250**: H372-H377.
- <sup>76</sup> Johnson DL, Horneffer PJ, Dinatale JM Jr., Gott VL, Gardner TJ. Free radical scavengers improve functional recovery of stunned myocardium in a model of surgical coronary revascularization. *Surgery* 1987; **102**: 334-340.
- <sup>77</sup> Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Roberts R. Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 1985; **72**: 915-921.
- <sup>78</sup> Przyklenk K, Kloner RA. Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the "stunned myocardium". *Circ. Res.* 1986; **58**: 148-156.
- <sup>79</sup> Sekili S, McCay PB, Li XY, Zughuib M, Sun JZ, Tang L, Thornby JI, Bolli R. Direct evidence that the hydroxyl radical plays a pathogenetic role in myocardial "stunning" in the conscious dog and demonstration that stunning can be markedly attenuated without subsequent adverse effects. *Circ. Res.* 1993; **73**: 705-723.
- <sup>80</sup> Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, DuBose CM, Lai EK, Roberts R, McCay PB. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1989; **86**: 4695-4699.
- <sup>81</sup> Przyklenk K, Whittaker P, Kloner RA. In vivo infusion of oxygen free radical substrates causes myocardial systolic, but not diastolic dysfunction. *Am. Heart J.* 1990; **119**: 807-815.
- <sup>82</sup> Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK, McCay PB. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ. Res.* 1989; **65**: 607-622.
- <sup>83</sup> Carrozza JP Jr, Bentivegna LA, Williams CP, Kuntz RE, Grossman W, Morgan JP. Decreased myofilament responsiveness in myocardial stunning follows transient calcium overload during ischemia and reperfusion. *Circ. Res.* 1992; **71**: 1334-1340.

- <sup>84</sup> Kusuoka H, Porterfield JK, Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca<sup>2+</sup> activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J. Clin. Invest.* 1987; **79**: 950-961.
- <sup>85</sup> Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, Yue DT, Chacko VP, Pike MM. Quantification of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. *Circ. Res.* 1990; **66**: 1255-1267.
- <sup>86</sup> Kusuoka H, Marban E. Cellular mechanisms of myocardial stunning. *Annu. Rev. Physiol.* 1992; **54**: 243-256.
- <sup>87</sup> Miller WP, McDonald KS, Moss RL. Onset of reduced Ca<sup>2+</sup> sensitivity of tension during stunning in porcine myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1996; **28**: 689-697.
- <sup>88</sup> Grinwald PM. Calcium uptake during post-ischemic reperfusion in the isolated rat heart: influence of extracellular sodium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1982; **14**: 359-365.
- <sup>89</sup> Pike MM, Kitakaze M, Marban E. <sup>23</sup>Na-NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol.* 1990; **259**: H1767-H1773.
- <sup>90</sup> Kitakaze M, Weisfeldt ML, Marban E. Acidosis during early reperfusion prevents myocardial stunning in perfused ferret hearts. *J. Clin. Invest.* 1988; **82**: 920-927.
- <sup>91</sup> Krause SM, Jacobus WE, Becker LC. Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the postischemic "stunned" myocardium. *Circ. Res.* 1989; **65**: 526-530.
- <sup>92</sup> Valdivia C, Hegge JO, Lasley RD, Valdivia HH, Mentzer R. Ryanodine receptor dysfunction in porcine stunned myocardium. *Am. J. Physiol.* 1997; **273**: H796-H804.
- <sup>93</sup> Van Eyk JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS, Solaro RJ. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification of degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ. Res.* 1998; **82**: 261-271.
- <sup>94</sup> Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ. Res.* 1997; **80**: 393-399.
- <sup>95</sup> McDonough JL, Arrell DK, Van Eyk JE. Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* 1999; **84**: 9-20.
- <sup>96</sup> Kim MS, Akera T. O<sub>2</sub> free radicals: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase. *Am. J. Physiol.* 1987; **252**: H252-H257.
- <sup>97</sup> Kaneko M, Elimban V, Dhalla NS. Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> pump by oxygen free radicals. *Am. J. Physiol.* 1989; **257**: H804-H811.
- <sup>98</sup> Gao WD, Liu Y, Mellgren R, Marban E. Intrinsic myofilament alterations underlying the decreased contractility of stunned myocardium. A consequence of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis? *Circ. Res.* 1996; **78**: 455-465.
- <sup>99</sup> Murphy AM. Heart failure, myocardial stunning, and troponin: a key regulator of the cardiac myofilament. *Congest. Heart Fail.* 2006; **12**: 32-38.

- <sup>100</sup> Kim SJ, Kudej RK, Yatani A, Kim YK, Takagi G, Honda R, Colantonio DA, Van Eyk JE, Vatner DE, Rasmussen RL, Vatner SF. A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca(2+) handling. *Circ. Res.* 2001; **89**: 831-837.
- <sup>101</sup> Heyndrickx GR. Myocardial stunning: an experimental act with a large clinical audience. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 2003; **96**: 665-670.
- <sup>102</sup> Brand T, Sharma HS, Fleischmann KE, Duncker DJ, McFalls EO, Verdouw PD, Schaper W. Proto-oncogene expression in porcine myocardium subjected to ischemia and reperfusion. *Circ. Res.* 1992; **71**: 1351-1360.
- <sup>103</sup> Frass O, Sharma HS, Knoll R, Duncker DJ, McFalls EO, Verdouw PD, Schaper W. Enhanced gene expression of calcium regulatory proteins in stunned porcine myocardium. *Cardiovasc. Res.* 1993; **27**: 2037-2043.
- <sup>104</sup> Luss H, Boknik P, Heusch G, Muller FU, Neumann J, Schmitz W, Schulz R. Expression of calcium regulatory proteins in short-term hibernation and stunning in the in situ porcine heart. *Cardiovasc. Res.* 1998; **37**: 606-617.
- <sup>105</sup> Depre C, Tomlinson JE, Kudej RK, Gaussin V, Thompson E, Kim SJ, Vatner DE, Topper JN, Vatner SF. Gene program for cardiac cell survival induced by transient ischemia in conscious pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001; **98**: 9336-9341.
- <sup>106</sup> Hofstaetter B, Taimor G, Inserte J, Garcia-Dorado D, Piper HM. Inhibition of apoptotic responses after ischemic stress in isolated hearts and cardiomyocytes. *Basic Res. Cardiol.* 2002; **97**: 479-488.
- <sup>107</sup> Chandrashekhara Y, Prahash AJ, Sen S, Gupta S, Anand IS. Cardiomyocytes from hearts with left ventricular dysfunction after ischemia-reperfusion do not manifest contractile abnormalities. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1999; **34**: 594-602.
- <sup>108</sup> Dean EN, Shlafer M, Nicklas JM. The oxygen consumption paradox of "stunned myocardium" in dogs. *Basic Res. Cardiol.* 1990; **85**: 120-131.
- <sup>109</sup> Laster SB, Becker LC, Ambrosio G, Jacobus WE. Reduced aerobic metabolic efficiency in globally "stunned" myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1989; **21**: 419-426.
- <sup>110</sup> Schipke JD, Korbmayer B, Schwanke U, Frehen D, Schmidt T, Arnold G. Basal metabolism does not account for high O<sub>2</sub> consumption in stunned myocardium. *Am. J. Physiol.* 1998; **274**: H743-H746.
- <sup>111</sup> Bergmann SR, Weinheimer CJ, Brown MA, Perez JE. Enhancement of regional myocardial efficiency and persistence of perfusion, oxidative, and functional reserve with paired pacing of stunned myocardium. *Circulation* 1994; **89**: 2290-2296.
- <sup>112</sup> Laxson DD, Homans DC, Dai XZ, Sublett E, Bache RJ. Oxygen consumption and coronary reactivity in postischemic myocardium. *Circ. Res.* 1989; **64**: 9-20.
- <sup>113</sup> Baker CS, Kumar S, Rimoldi OE. Effects of brief ischemia and reperfusion on the myocardium and the role of nitric oxide. *Heart Fail. Rev.* 2003; **8**: 127-141.
- <sup>114</sup> Gross GJ, Kersten JR, Warltier DC. Mechanisms of postischemic contractile dysfunction. *Ann. Thorac. Surg.* 1999; **68**: 1898-1904.
- <sup>115</sup> Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 1. *Circulation* 2001; **104**: 2981-2989.
- <sup>116</sup> Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: stunning, preconditioning, and their clinical implications: part 2. *Circulation* 2001; **104**: 3158-3167.

- <sup>117</sup> Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation* 1998; **97**: 1848-1867.
- <sup>118</sup> Blum A, Sclarovsky S, Rehavia E, Shohat B. Levels of T-lymphocyte subpopulations, interleukin-1 beta, and soluble interleukin-2 receptor in acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 1994; **127**: 1226-1230.
- <sup>119</sup> Guillen I, Blanes M, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. Cytokine signalling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am. J. Physiol.* 1995; **269**: R229-R235.
- <sup>120</sup> Tashiro H, Shimokawa H, Yamamoto K, Nagano M, Momohara M, Muramatu K, Takeshita A. Monocyte-related cytokines in acute myocardial infarction. *Am. Heart J.* 1995; **130**: 446-452.
- <sup>121</sup> Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Richardt G, Holzzapfel H, Jochum M, Schomig A. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 1995; **92**: 748-755.
- <sup>122</sup> Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998; **97**: 276-281.
- <sup>123</sup> Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Klocke FJ, Cryns VJ. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion In vivo. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1999; **31**: 1709-1715.
- <sup>124</sup> Mocanu MM; Baxter GF, Yellon DM. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Brit. J. Pharmacol.* 2000; **130**: 197-200.
- <sup>125</sup> Okamura T, Miura T, Takemura G, Fujiwara H, Iwamoto H, Kawamura S, Kimura, M, Ikeda Y, Iwatate M, Matsuzaki M. Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovasc. Res.* 2000; **45**: 642-650.
- <sup>126</sup> Huang JQ, Radinovic S, Rezaiefar P, Black SC. In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor administered after the onset of ischemia. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; **402**: 139-142.
- <sup>127</sup> Kovacs P, Bak I, Szendrei L, Vecsernyes M, Varga E, Blasig IE, Tosaki A. Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post- ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2001; **364**: 501-507.
- <sup>128</sup> Pomerantz BJ, Reznikow LL, Harken AH, Dinarello CA. Inhibition of caspase 1 reduces human myocardial ischaemic dysfunction via inhibition of IL-18 and IL-1-beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001; **98**: 2871-2876.
- <sup>129</sup> Chapman JG, Magee WP, Stukenbrok HA, Beckius GE, Milici AJ, Tracey WR. A novel nonpeptidic caspase-3/7 inhibitor, (S)-(+)-5-[1-(2methoxymethylpyrrolidinyl)-sulfonyl]isatin reduces myocardial ischemic injury. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; **456**: 59-68.
- <sup>130</sup> Wang TD, Chen WJ, Mau TJ, Lin JW, Lin WW, Lee YT. Attenuation of increased myocardial ischaemia-reperfusion injury conferred by hypercholesterolaemia through pharmacological inhibition of the caspase-1 cascade. *Brit. J. Pharmacol.* 2003; **138**: 291-300.

- <sup>131</sup> Armstrong RC, Li F, Smiley R, Armer N. Caspase inhibitors reduce infarct size when dosed post-perfusion in a rodent cardiac ischemia/reperfusion model. *Circulation* 2001; **104**: II-12.
- <sup>132</sup> Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2000; **45**: 630-641.
- <sup>133</sup> Anselmi A, Abbate A, Girola F, Nasso G, Biondi-Zoccai GG, Possati G, Gaudino M. Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 2004; **25**: 304-311.
- <sup>134</sup> Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Wilcox JN, Shearer S, Ronson RS, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc. Res.* 2000; **45**: 651-660.
- <sup>135</sup> Gottlieb RA, Burlison KO, Kloner RA, Babior BM, Engle RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.* 1994; **94**: 1621-1628.
- <sup>136</sup> Buerke M, Murohara T, Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer AM. Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995; **92**: 8031-8035.
- <sup>137</sup> Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ. Res.* 1996; **79**: 949-956.
- <sup>138</sup> Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab. Invest.* 1996; **74**: 86-107.
- <sup>139</sup> de Moissac D, Gurevich RM, Zheng H, Singal PK, Kirshenbaum LA. Caspase activation and mitochondrial cytochrome C release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2000; **32**: 53-63.
- <sup>140</sup> Chen SJ, Bradley ME, Lee TC. Chemical hypoxia triggers apoptosis of cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases and protein kinases. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; **178**: 141-149.
- <sup>141</sup> Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.* 1989; **10**: 281-285.
- <sup>142</sup> Galang N, Sasaki H, Maulik N. Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy. *Toxicology* 2000; **148**: 111-118.
- <sup>143</sup> Maulik N, Yoshida T, Das DK. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 1998; **24**: 869-875.
- <sup>144</sup> Dobsak P, Siegelova J, Wolf JE, Rochette L, Eicher JC, Vasku J, Kuchtickova S, Horiky M. Prevention of apoptosis by deferoxamine during 4 hours of cold cardioplegia and reperfusion: in vitro study of isolated working rat heart model. *Pathophysiology* 2002; **9**: 27.
- <sup>145</sup> Black SC. In vivo models of myocardial ischemia and reperfusion injury: application to drug discovery and evaluation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2000; **43**: 153-167.
- <sup>146</sup> Haunstetter A, Izumo S. Future perspectives and potential implications of cardiac myocyte apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 2000; **45**: 795-801.

- <sup>147</sup> Ohno M, Takemura G, Ohno A, Misao J, Hayakawa Y, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H. "Apoptotic" Myocytes in Infarct Area in Rabbit Hearts May Be Oncotic Myocytes With DNA Fragmentation: Analysis by Immunogold Electron Microscopy Combined With In Situ Nick End-Labeling. *Circulation* 1998; **98**: 1422-1430.
- <sup>148</sup> Dispersyn GD, Borgers M. Apoptosis in the Heart: About Programmed Cell Death and Survival. *News Physiol. Sci.* 2001; **16**: 41-47.
- <sup>149</sup> Black SC, Huang JQ, Rezaiefar P, Radinovic S, Eberhart A, Nicholson DW, Rodger IW. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after In Vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1998, **30**: 733-742.
- <sup>150</sup> Stephanou A, Brar B, Liao Z, Scarabelli T, Knight RA, Latchman DS. Distinct initiator caspases are required for the induction of apoptosis in cardiac myocytes during ischaemia versus reperfusion injury. *Cell Death Differ.* 2001; **8**: 434-435.
- <sup>151</sup> Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA. Altered Cytokine Export and Apoptosis in Mice Deficient in Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme. *Science* 1995; **267**: 2000-2003.
- <sup>152</sup> Yue TL, Ma XL, Wang X, Romanic AM, Liu GL, Loudon C, Gu JL, Kumar S, Poste G, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. Possible involvement of stress-activated protein kinase signalling pathway and Fas receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced myocyte apoptosis by carvedilol. *Circ. Res.* 1998; **82**: 166-174.
- <sup>153</sup> Tatsuta T, Shiraishi A, Mountz JD. The Prodomain of Caspase-1 Enhances Fas-mediated Apoptosis through Facilitation of Caspase-8 Activation. *J. Biol. Chem.* 2000; **12**: 14248-14254.
- <sup>154</sup> Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.* 1997; **185**: 601-607.
- <sup>155</sup> Benchoua A, Guegan C, Couriaud C, Hosseini H, Sampaio N, Morin D, Onteniente B. Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J. Neurosci.* 2001; **21**: 7127-7134.
- <sup>156</sup> Van de Craen M, Declercq W, Van den brande I, Fiers W, Vandenabeele P. The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ.* 1999; **6**: 1117-1124.
- <sup>157</sup> Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 1996; **380**: 723-726.
- <sup>158</sup> Syed FM, Hahn HS, Odley A, Guo Y, Vallejo JG, Lynch RA, Mann DL, Bolli R, Dorn GW II. Proapoptotic Effects of Caspase-1/Interleukin-Converting Enzyme Dominate in Myocardial Ischemia. *Circ. Res.* 2005; **96**: 1103-1109.
- <sup>159</sup> Gottlieb R. ICE-ing the Heart. *Circ. Res.* 2005; **96**: 1036-1038.
- <sup>160</sup> Stephanou A, Brar BK, Scarabelli TM, Jonassen AK, Yellon DM, Marber MS, Knight RA, Latchman DS. Ischemia-induced STAT-1 expression and activation play a critical role in cardiomyocyte apoptosis. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 10002-10008.
- <sup>161</sup> Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvarth CM, Stark GR. Defective TNF- $\alpha$  induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 1997; **278**: 1630-1632.

- <sup>162</sup> Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY. Activation of the STAT signalling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 1997; **17**: 5328-5337.
- <sup>163</sup> Fantuzzi G, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Sipe JD, Kuida K, Flavell RA, Dinarello CA. Response to local inflammation of IL-1 beta-converting enzyme- deficient mice. *J. Immunol.* 1997; **158**: 1818-1824.
- <sup>164</sup> Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; **97**: 14376-14381.
- <sup>165</sup> Ruetten H, Badorff C, Ihling C, Zeiher AM, Dimmeler S. Inhibition of caspase-3 improves contractile recovery of stunned myocardium, independent of apoptosis-inhibitory effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001; **38**: 2063-2070.

## **6 Danksagung**

Die Anfertigung dieser Dissertation wäre ohne Unterstützung nicht möglich gewesen. Ich bedanke mich herzlich bei Herrn PD Dr. med. B. Preckel für die Überlassung des Themas, die persönliche Betreuung und die kritischen Anmerkungen. Zudem danke ich Herrn Prof. Dr. med. W. Schlack für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe „Anästhesie und Organprotektion“. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. V. Thämer, in dessen Labor die Experimente größtenteils durchgeführt wurden, und Herrn Dr. med. H. Barthel, der die Experimente organisierte und darüber hinaus für Probleme immer ansprechbar war. Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. U. Decking für seine kritischen und sehr hilfreichen Anmerkungen danken. Vielen Dank der gesamten Arbeitsgruppe für die Unterstützung und die freundliche Atmosphäre. Für umfassende und schnelle Korrekturen danke ich Herrn C. Roolf, M.A. Schließlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung bei der Anfertigung dieser Dissertation bedanken. Ihnen sei sie gewidmet.

## **7 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Hendrik Südkamp  
Geburtsdatum: 7. Mai 1974  
Geburtsort: Hamburg  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

09/1981 - 06/1985: Albert-Schweitzer-Grundschule, Neuss  
08/1985 - 06/1994: Alexander-von-Humboldt-Gymnasium, Neuss  
08/1991 - 06/1992: Frenchtown High School, Frenchtown, Montana, USA  
Abschluss: Abitur

### **Zivildienst**

06/1994 - 08/1995: Kurt-Burckhardt-Haus, Neuss (Tagespflegeeinrichtung für Senioren)

### **Ausbildung zum Krankenpfleger**

08/1995 - 09/1998: St. Alexius-Krankenhaus, Neuss

### **Studium der Medizin**

10/1998 - 04/2004: Studium der Medizin an der HHU Düsseldorf  
04/2004 - 03/2005: Praktisches Jahr

### **Beruflicher Werdegang**

07/2005 - 06/2007: Assistenzarzt Abteilung für Anästhesie und  
operative Intensivmedizin, St. Josefs-Krankenhaus Hilden,  
Chefarzt Dr. med. Stephan Oehmen

seit 09/2007: Assistenzarzt Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie,  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,  
Chefarzt Prof. Dr. med. A. E. Goetz

## 8 Zusammenfassung

Während myokardialer Ischämie-Reperfusion lassen sich sowohl eine inflammatorische Reaktion als auch ein apoptotischer Zelluntergang nachweisen. Die inflammatorische Reaktion kann die myokardiale Funktion beeinträchtigen, und auch für den apoptotischen Zelluntergang erscheint dies denkbar. Die Enzymfamilie der Caspasen (= Cysteiny-Aspartat-spezifische Proteasen) ist über die proinflammatorischen und die proapoptotischen Caspasen an beiden Prozessen beteiligt. Das proinflammatorische Zytokin Interleukin-1 $\beta$  wird durch das Interleukin-Konversionsenzym (ICE), auch Caspase-1 genannt, in seine aktive Form umgewandelt. Neben der Beteiligung an proinflammatorischen Prozessen gibt es für ICE/Caspase-1 Hinweise auf eine indirekte Verstärkung der Signalkaskade der proapoptotischen Caspasen.

Die vorliegende Studie untersucht, ob die ICE-/Caspase-1-Hemmung mit der Substanz HMR-3480 die Myokardfunktion nach Ischämie-Reperfusion verbessert. An thorakotomierten Schweinen wurden der linksventrikuläre Druck (LVD), das Herzzeitvolumen (HZV) und der koronare Blutfluss im Ramus interventricularis anterior (RIVA) und im Ramus circumflexus (RCX) gemessen. Die regionale Wandfunktion wurde mittels Sonomikrometrie als systolische Wandverdickung (SWV) und als systolische Wandverdickungsgeschwindigkeit ( $V_s$ ) in der Vorder- und in der Hinterwand bestimmt. Die Tiere wurden einer zehnminütigen Okklusion des RIVA unterzogen, gefolgt von vier Stunden Reperfusion. Die Substanz HMR-3480 (flussadaptiert, um koronare Plasmakonzentrationen von 10  $\mu\text{g/ml}$  zu erzielen) oder das Lösungsmittel wurden während der Ischämie und 60 Minuten Reperfusion (HMR/I+R, n=7; Lösungsmittel: KON, n=7) oder während der ersten 60 Minuten der Reperfusion (HMR/R, n=6) über einen koronaren Seitenast in den RIVA infundiert. Die RIVA-Okklusion führte in allen Gruppen zu einer Verminderung der Parameter der regionalen Wandfunktion in der Vorderwand, doch in der anschließenden Reperfusion erholte sich die Wandfunktion fast bis auf Ausgangswerte. Der Blutfluss im RIVA wurde durch HMR-3480 nicht beeinflusst. Die globale Myokardfunktion (LVSD,  $dP/dt$ , HZV) unterschied sich während der Reperfusion zwischen der Kontrollgruppe und den Interventionsgruppen nicht.

Anhand der gewonnenen Daten lässt sich an unserem Ischämie-Reperfusions-Modell am Schweineherzen in vivo keine signifikante Verminderung der Wandfunktion und damit auch kein Stunning nachweisen. Ein Effekt der ICE-/Caspase-1-Hemmung durch HMR-3480 auf die Erholung der Wandfunktion können wir in unserer Untersuchung daher weder nachweisen noch ausschließen.