

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Heinrich–Heine–Universität Düsseldorf
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

Adenosin
als Marker für eine akute Myokardischämie
bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung–
Relation zur ventrikulären Vulnerabilität

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Bita Gholamalizadeh
2009

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

gez.:

Dekan:	Professor Dr. Joachim Windolf
Referent:	Professor Dr. med. Ernst Günter Vester
Korreferent:	Professor Dr. med. Malte Kelm

Meiner Familie in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Liste der Abkürzungen

5'-AMP	Adenosin 5'-Monophosphat
ACVB	Aortokoronarer Venenbypass
ADA	Adenosin-Desaminase (EC 3.5.4.4.)
ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AVD	arteriovenöse Differenz
AVD ADO	arteriokoronarvenöse Adenosin-Differenz (ADO _{arteriell} -ADO _{c.v.})
AVD Laktat	arteriokoronarvenöse Laktat-Differenz
AVDO ₂	arteriokoronarvenöse Sauerstoffdifferenz
c.v.	koronarvenös
-CH ₃	Methylgruppe
D I	R. diagonalis I der Linken Koronararterie
D II	R. diagonalis II der Linken Koronararterie
DIP	Dipyridamol
EF	Ejektionsfraktion
EHNA	Erythro 9(2-Hydroxy-3-Nonyl)-Adenin
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
Hb	Hämoglobin
HBE	Katheterposition am HIS-Bündel
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HRA	Katheterposition im hohen rechten Vorhof
HW	Hinterwand

HWI	Hinterwandinfarkt
ICD	Implantierbarer Kardioverter/Defibrillator
IMP	Inosinmonophosphat
INO	Inosin
K_2HPO_4	Dikalium-Hydrogen-Phosphat
K_3PO_4	(Tri)-Kalium-Phosphat
KH_2PO_4	Kalium-Dihydrogen-Phosphat
LVEDV	Linksventrikuläres Enddiastolisches Volumen
M I	R. marginalis I der Linken Koronararterie
M II	R. marginalis II der Linken Koronararterie
NH_3	Ammoniak
O_2	Sauerstoff
PC	Personal Computer
RCA	Rechte Koronararterie
RCX	Ramus circumflexus der linken Koronararterie
RIVA	Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie
Ruhe	Ruhe nach zehn Minuten Stimulationspause
RVA	Rechtsventrikuläre Spitze (Apex)
S1	ein vorzeitiger Stimulus
S2	zwei vorzeitig Stimuli
S3	drei vorzeitige Stimuli
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SEM	Standardfehler
S_{O_2}	Sauerstoffsättigung

SR	Sinusrhythmus
UVA	Ultraviolett-A
VT	Ventrikuläre Tachykardie
VW	Vorderwand
VWI	Vorderwandinfarkt

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	10
1.1.	Rolle des Adenosin im myokardialen Stoffwechsel	10
1.2.	Myokardialer Adenosin-Stoffwechsel.....	11
1.3.	Wertigkeit von Adenosin als Index einer myokardialen Ischämie.....	14
2.	Methodik	16
2.1.	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC).....	16
2.1.1.	Analytik im wässrigen Medium.....	19
2.1.2.	Analytik im menschlichen Plasma.....	21
2.1.2.1.	Aufarbeitung der Blutproben.....	21
2.1.2.2.	Enzymatischer Peak-shift.....	22
2.1.2.3.	Bestimmung der Adenosin-Konzentration.....	25
2.1.3.	Biochemisch-metabolische Messungen.....	26
2.1.3.1.	Adenosin.....	26
2.1.3.2.	Myokardiale Laktat-Extraktion und Sauerstoffgehalt.....	27
2.2.	Klinisch-elektrophysiologische Untersuchung.....	28
2.2.1.	Patientenkollektiv.....	28
2.2.2.	Untersuchungsprotokoll.....	32
2.2.3.	Ventrikuläre Vulnerabilität.....	34
2.2.4.	Mathematisch-statische Methoden.....	36
3.	Ergebnisse	37
3.1.	HPLC.....	37

3.1.1.	Messungen im wässrigen Milieu.....	37
3.1.2.	Messungen im menschlichen Plasma.....	39
3.1.2.1.	Myokardiale Adenosin-Konzentrationen	39
3.1.2.2.	Myokardiale Laktat-Extraktion und Sauerstoffgehalt.....	42
3.2.	Ventrikuläre Vulnerabilität.....	46
3.2.1.	Adenosin-Konzentrationen in Relation zur ventrikulären Vulnerabilität.....	48
3.2.2.	Laktat-Extraktion in Relation zur ventrikulären Vulnerabilität.....	50
3.2.3.	Sauerstoffgehalt im Blut in Relation zur ventrikulären Vulnerabilität.....	52
3.3.	Klinische Untersuchungen.....	54
3.3.1.	Ejektionsfraktion (EF) als Maß für linksventrikuläre Pumpfunktion.....	54
4.	Diskussion.....	55
4.1.	Methodenvergleich zur Bestimmung von Adenosin im menschlichen Blut.....	57
4.1.1.	Adenosin-Metabolismus – Entwicklung einer Stopp-Lösung.....	57
4.1.2.	Etablierung einer sensitiven Messmethode.....	59
4.2.	HPLC.....	60
4.3.	Myokardischämie.....	62
4.3.1.	Laktat als Marker einer akuten Myokardischämie..	62
4.3.2.	Adenosin als Ischämiemarker im Vergleich zu Laktat.....	63
4.4.	Ventrikuläre Vulnerabilität.....	65
4.4.1.	Zusammenhang mit Laktat.....	65
4.4.2.	Zusammenhang mit Adenosin.....	67

5.	Klinische Bedeutung und Ausblick.....	70
6.	Limitationen.....	71
7.	Literaturverzeichnis.....	72
8.	Danksagung.....	83
9.	Lebenslauf.....	84
10.	Zusammenfassung.....	85

.

1. Einleitung

1.1 Rolle des Adenosin im myokardialen Stoffwechsel

Adenosin wird heute in der klinischen Praxis zunehmend eingesetzt, um im Rahmen bildgebender Verfahren (MRT, Myokardszintigraphie) eine myokardiale Ischämie nachzuweisen. Primär führt Adenosin zu einer Vasodilatation.

Aufgrund der engen Kopplung an den zellulären Energiestoffwechsel spielen die regulatorischen Effekte von Adenosin am Herzen eine besondere Rolle. Im Rahmen einer Myokardischämie kommt es zur extra- und intrazellulären Akkumulation von Adenosin, welches wiederum über eine Vielzahl von Mechanismen einen kardioprotektiven Summeneffekt ausübt. Adenosin ist deshalb als homöostatisches Molekül des Herzen bezeichnet worden ¹. Dabei spielt die durch Adenosin vermittelte Regulation der lokalen Durchblutung eine wichtige Rolle ²⁻⁷. Am Herzen bewirkt Adenosin durch koronare Vasodilatation ⁸⁻¹² eine Steigerung der myokardialen Perfusion. Hierdurch wird bei zellulärem Energiemangel durch die resultierende Vasodilatation vermehrt Sauerstoff an den Ort des Bedarfes im Sinne einer Autoregulation gesteuert. Allerdings kann es durch diesen Effekt des Adenosins zu einem koronaren Steal-Phänomen kommen. Hierbei führt Adenosin in bereits stenosierte Gebieten zu einem verminderten Blutfluss während nicht stenosierte Versorgungsbereiche bzw. die Kollateralen besser durchblutet werden ^{72,73}. Andererseits wird Adenosin bei Auftreten einer Myokardischämie vermehrt vom Herzmuskel produziert und kann in erhöhter Konzentration im Koronarsinus nachgewiesen werden, wie in einigen Studien untersucht wurde ^{13-18,55,63,64}.

Aufgrund seiner zentralen Rolle im myokardialen Energiestoffwechsel als Basismolekül der energiereichen Phosphate AMP, ADP und ATP kommt es bei Hypoxie oder Ischämie zur intrazellulären Akkumulation ⁵⁰ und nachfolgend extrazellulärer Freisetzung von Adenosin ^{13-18,55,84}. So vermag Adenosin durch seine

stark dilatierenden Eigenschaften eine Myokardischämie zu limitieren und den Reperfusionsschaden nach Ischämie zu reduzieren¹⁹⁻²⁴. Folglich bewirkt Adenosin durch Remodelling und Preconditioning eine Begrenzung der Infarktgröße²⁵⁻²⁸ und lindert die Schwere der postischämischen kontraktile Dysfunktion des noch vitalen Myokards (myokardiales stunning)²⁹⁻³⁶. Bereits seit Jahren werden elektrophysiologische Effekte des Adenosin⁴¹ am Herzen zur klinischen Diagnostik und zur Therapie spezifischer Herzrhythmusstörungen insbesondere supraventrikulärer Tachykardien genutzt⁴⁰. Adenosin wirkt durch eine Hyperpolarisation am Sinusknoten negativ chronotrop^{37,38} und durch eine dosisabhängige Blockade der Erregungsleitung am AV-Knoten negativ dromotrop^{39,42,43}.

Am adrenerg stimulierten Ventrikelmyokard wird ein negativ inotroper Effekt von Adenosin beschrieben^{44,45}. Die pharmakologischen Effekte von Adenosin werden über zwei Rezeptoren (A1- und A2-) vermittelt⁴⁶⁻⁴⁸. A1-Rezeptoren hemmen die Adenylatzyklase-Aktivität und sind im Vorhof- und Ventrikelmyokard sowie im Sinus- und AV-Knoten lokalisiert. A2-Rezeptoren, lokalisiert im Koronarendothel und in der glatten Muskulatur, stimulieren die Adenylatzyklase^{22,23}.

Der vasodilatatorische Effekt von Adenosin erfolgt hauptsächlich über A2-Rezeptoren. Die kardioprotektiven Effekte scheinen über die A1-Rezeptoren vermittelt zu werden („myocardial stunning“ und „preconditioning“)^{25-26,69,71}. Die Rezeptoren können durch Methylxanthine inhibiert werden⁴⁹.

1.2. Myokardialer Adenosin-Stoffwechsel

Eine schematische Darstellung des Adenosin-Metabolismus zeigt **Abbildung 1**. Während Ischämie erfolgt die Bildung von Adenosin hauptsächlich über die Dephosphorylierung von 5'-AMP durch die 5'-Nukleotidase (EC 3.1.3.5.)⁵¹, die sowohl intrazellulär als

auch als membrangebundenes Ekto-Enzym vorliegt ⁵⁶. Bei Normämie wird Adenosin über die Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein (SAH), das kontinuierlich irreversibel aus SAM (S-Adenosylmethionin) produziert wird, mittels SAH-Hydrolase (EC 3.3.1.1.) gebildet ^{1,52,61}. Die Dephosphorylierung von 5'-AMP zu Adenosin erfolgt über die zytosolische Adenosin-Kinase (EC 2.7.1.20) ⁵⁸. Der irreversible Abbau des Adenosin zu Inosin erfolgt nach Desaminierung durch die extrazelluläre Adenosin-Desaminase (EC 3.5.4.4) ^{53,54}.

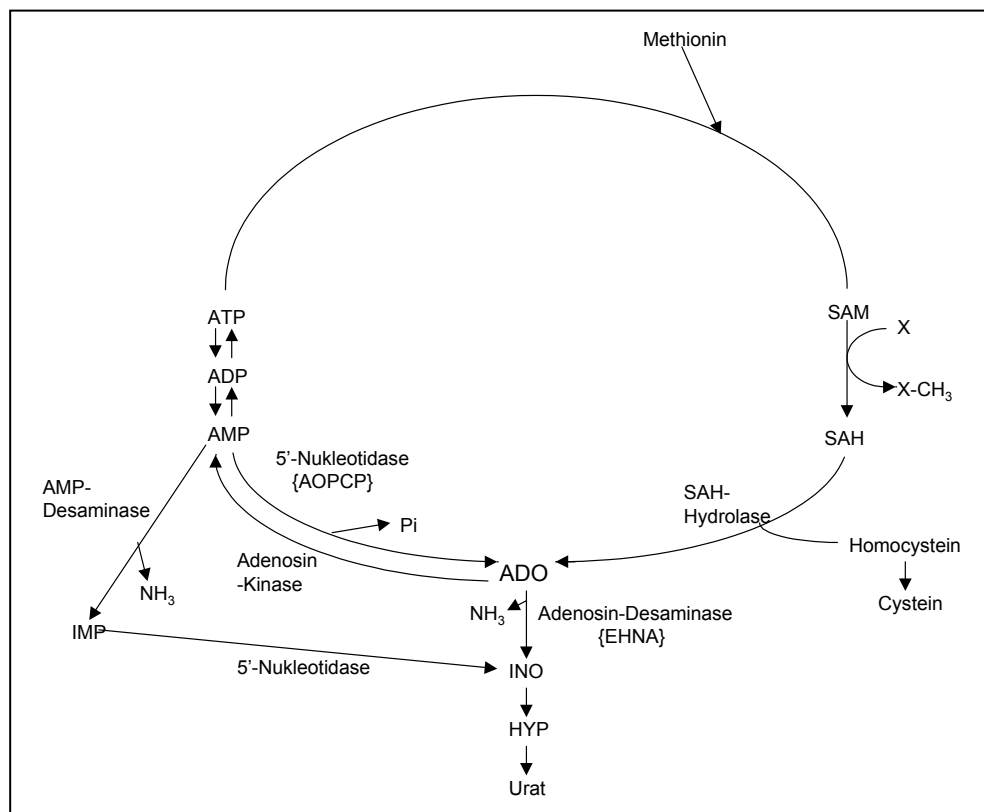


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Adenosin Metabolismus. SAM, S-Adenosylmethionin; AMP, Adenin 5'-Monophosphat; IMP, Inosin 5'-Monophosphat; INO, Inosin; HYP, Hypoxanthin; EHNA, Erythro-9(2-Hydroxy-3-Nonyl) Adenosin). Modifiziert nach Schrader J: Metabolism of adenosine and site of production in the heart, in Berne RM, Rall TW, Rubio R (eds): Regulatory Function of Adenosin. Boston, Martinus Nijhoff Publisher, 1983, pp 133-156 ⁵⁴.

Bei Gewebshypoxie wird vermehrt Adenosin zu Inosin abgebaut^{55,57}. Bei Normoxie erfolgt die Adenosin-Verstoffwechselung überwiegend durch die Adenosin-Kinase^{54,58}. Endmetabolit des Adenosin-Stoffwechsels ist Urat (über Hypoxanthin, Xanthin und Purinribosid). Um Adenosin während Hypoxie direkt zu bestimmen, ist es möglich dessen Abbau zu Inosin zu hemmen. Ein Inhibitor der Adenosin-Desaminase ist Erythro-9(2-Hydroxy-3-Nonyl)Adenosin (EHNA)⁵⁹. Andererseits kann der extrazelluläre Verbleib von Adenosin verlängert werden. Die zelluläre Wiederaufnahme von extrazellulärem Adenosin erfolgt über einen Nukleosidtransporter, der durch Dipyridamol inhibiert werden kann⁶⁰. Bei unserer Messmethode wurde die von Ontyd und Schrader entwickelte, spezifische Stopp-Lösung⁶² verwendet, die beide Stoffwechselwege berücksichtigt. In **Abbildung 2** sind die intra- und extrazellulären Stoffwechselwege von Adenosin vereinfacht dargestellt.

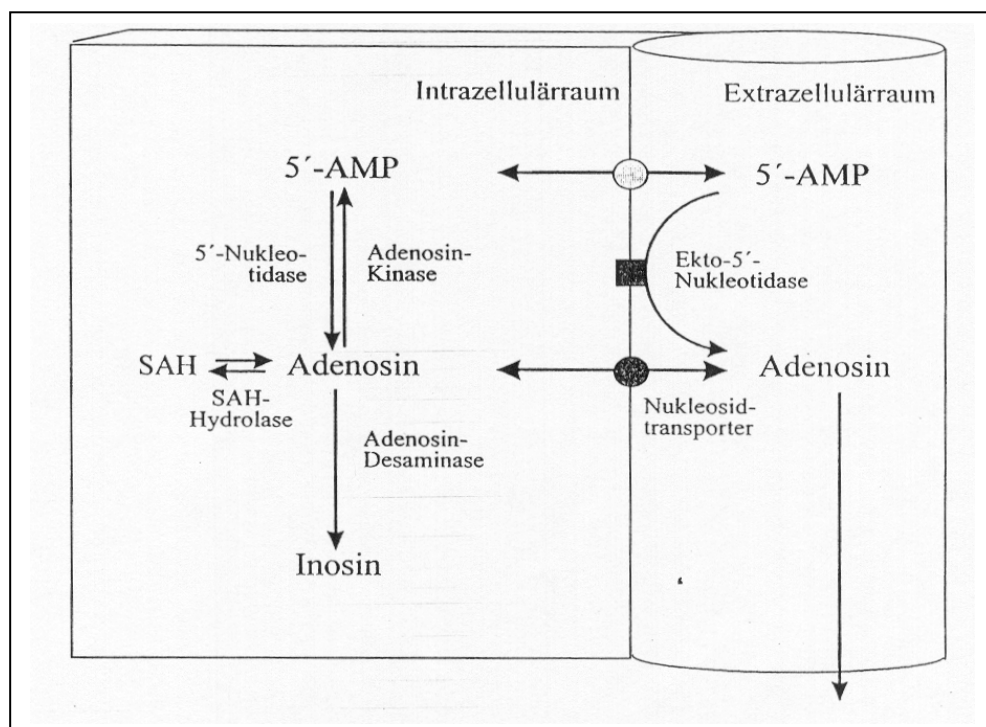


Abbildung 2: Stoffwechselwege von Adenosin. Reproduziert aus Margit Becker: Quantifizierung extra- und intrazellulärer Adenosinproduktionsraten am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen, *Circulation* 1999;99;2041-2047.

1.3. Wertigkeit von Adenosin als Index einer myokardialen Ischämie

Wegen ihrer strengen Kopplung an den myozytären Energiestoffwechsel wurde die extrazelluläre Adenosin-Freisetzung in vielen Studien als biochemischer Indikator für das Vorliegen einer Myokardischämie herangezogen ^{13-18,55,63,64}. Die Bedeutung des Adenosin als sensibler Marker ⁶⁸ für eine myokardiale Ischämie ist sowohl tierexperimentell ^{66,67} als auch am Menschen im Rahmen klinischer Studien untersucht worden ^{64-68,70}. Seit der Erstbestimmung der myokardialen Laktat-Extraktion am Menschen durch Gorlin ⁷⁴ wird die sogenannte Laktat-Umkehr als Index einer Hypoxie des Myokards ⁷⁵⁻⁷⁷ in klinischen Studien herangezogen. Eine Laktat-Umkehr zeigt den Umschlag von Laktat-Extraktion zu Laktat-Produktion. Für die Bestimmung der Laktat-Konzentration im menschlichen Blut stehen heute einfache und standardisierte Messmethoden zur Verfügung. Dennoch wird bei Patienten mit chronisch ischämischer Herzerkrankung die Laktat-Umkehr meist nur bei starker Ischämie beobachtet. Deswegen ist es nötig, sensitivere Methoden zu entwickeln, wie zum Beispiel die Bestimmung von Adenosin. Aber aufgrund der kurzen Halbwertszeit von wenigen Sekunden ⁷⁸ und aufgrund der eiweißhaltigen Bestandteile im Plasma ist die Analyse von Adenosin im Blut problematisch und mit aufwendigen analytischen Methoden behaftet. In den letzten Jahren hat sich neben dem Radioimmunoassay (RIA) ^{68,79} die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie als eine sensitive Methode zur quantitativen Bestimmung von Adenosin herausgestellt ⁸⁰⁻⁸⁴. Adenosin scheint als Indikator einer Myokardischämie eine hohe Sensitivität zu besitzen. Allerdings wurde jedoch der Zusammenhang zwischen Myokardischämie, Adenosin-Produktion und Arrhythmogenese bislang nicht hinreichend untersucht. Hierzu entwickelten wir einen aufwendigen Untersuchungsansatz und evaluierten diesen an 11 Patienten mit schweren Arrhythmien auf

dem Boden einer schweren Koronaren Herzerkrankung. Zusammenfassend wurde folgende Ziele bei dieser Arbeit verfolgt:

1. Etablierung einer sensitiven und klinisch anwendbaren Methode zur quantitativen Bestimmung von Adenosin im menschlichen Blut.
2. Anwendung der Methodik im Rahmen einer klinischen Pilotstudie bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie.
3. Untersuchung der Wertigkeit von Adenosin als Marker einer myokardialen Ischämie im Vergleich zu Laktat.
4. Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der myokardialen Adenosin - Konzentration und der Arrhythmieauslösbarkeit während elektrophysiologischer Untersuchung (EPU) am ischämischen Herzen.

2. Methodik

2.1 Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

Die Entwicklung einer hochsensitiven Methode war notwendig, um Adenosin und Inosin qualitativ und quantitativ zu messen, da die zu messenden Konzentrationen im nanomolaren Bereich erwartet wurden⁸⁵. Hierzu wurde die Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (reversed-phase-high-pressure chromatography, HPLC) in den letzten Jahren etabliert. Sie wurde bereits in vielen Studien zur direkten Bestimmung von Adenosin und anderer Nukleoside oder zur indirekten Bestimmung von Adenosin, z.B. mittels reduzierter SAH-Hydrolase⁸⁶ in mikro- bis nanomolaren Konzentrationen modifiziert und eingesetzt^{62,81-84,86}. Prinzipiell werden bei der HPLC die Nukleoside nach Durchlaufen einer Trennsäule durch ultraviolettes Licht detektiert. Deren Konzentrationen werden dann photometrisch ermittelt. Die HPLC zur Bestimmung des Adenosin und Inosin besteht hier aus einer Doppelhub-Pumpe S 1100 mit einer aktiven Niederdruckmischkammer S 7110 (beide Sykam, Gilching, Deutschland). Ein eingeschleiftes Injektionsventil 7125 (Rheodyne, Cotati CA, USA) sowie ein kühlbarer Probenaufgeber Triathlon (Spark Holland, Emmen, Niederlande) werden an diese gekoppelt. Die photometrische Messung erfolgt mit dem Detektor UVIS 200 (Linear Instruments, Reno NE, USA), bei einer Extinktionswellenlänge von 254 nm. Dabei wird eine Standard Deuterium-Lampe (D2, 50 Watt, Lampenfrequenz 50-60 Hz) verwendet. Der Meßbereich des am 1-Volt-Ausgang angeschlossenen Detektors wird auf 0.1 - 0.005 AUFS (Absorption Units, Full Scale) festgelegt. Die digitale Filterkonstante wird auf 0.3 Sekunden und der Photomultiplier auf 600 Volt eingestellt. Die Steuerung der Pumpe und der Mischkammer für den Lösungsgradienten sowie die digitale Datenaufnahme erfolgen mit dem Axxiom-System 727 (Moorpack, CA, USA).

Als Säulen werden Reversed-Phase- C_{18} -Säulen (3,9 x 150 mm innerer Durchmesser) mit einer Körnungsgröße des Trennungsmaterials von 10 μ m sowie eine austauschbare Vorsäule des gleichen Materials (beide Waters, Milford) verwendet. Das binäre Eluentensystem besteht aus dem Eluenten A, der sich aus 26 mmol/L Ammoniumazetatpuffer (Merck, Stuttgart, Deutschland) und 100% (v/v) Essigsäure LiChrosolv® (Merck) pH 4.8- 5 zusammensetzt. Eluent B besteht aus 70% (v/v) Methanol LiChrosolv® (Merck). Der Ammoniumazetat-Puffer wird vor Eintritt in das HPLC-System über einen Membranfilter (0,2 μ m Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert. Beide Eluenten werden 10 Minuten mit Helium 5.0 (Linde, Höllriegelskreuth) begast und das Gradientensystem schrittweise von 95 % Eluent A und 5% Eluent B zunächst auf 75% A und 25% B (0-8 min) gefahren. Dieser Gradient wird zunächst über 3 min konstant gehalten und dann auf 5% A und 95% B variiert (8-11 min). Bis zur 20. Minute wird dieses Mischverhältnis dann beibehalten. Anschliessend erfolgt die Wiederherstellung des ursprünglichen Gradienten von 95% A und 5% B binnen 5 Sekunden. Die Eluenten A und B werden in der Niederdruckmischkammer gemischt und dann über die Hochdruckpumpe einer analytischen Trennsäule zugeführt. Die zu analysierenden Proben werden durch den automatischen Probenaufgeber Autosampler Triathlon (Spark Holland, Emmen, Niederlande) über das Injektionsventil auf die Säule gegeben und die Signale der getrennten Substanzen kontinuierlich im UVA-Detektor detektiert. Die Datenaufnahme erfolgt über einen Standard PC mit entsprechender Datenaufnahme-Software. Die Flussgeschwindigkeit des Lösungsmittels beträgt konstant 1 mL/min. Eine schematische Übersicht über den Aufbau der Applikation zeigt **Abbildung 3**. Um Adenosin und Inosin in den Chromatogrammen identifizieren und bestimmen zu können, werden externe Standards aus sieben Bestandteilen mitgeführt.

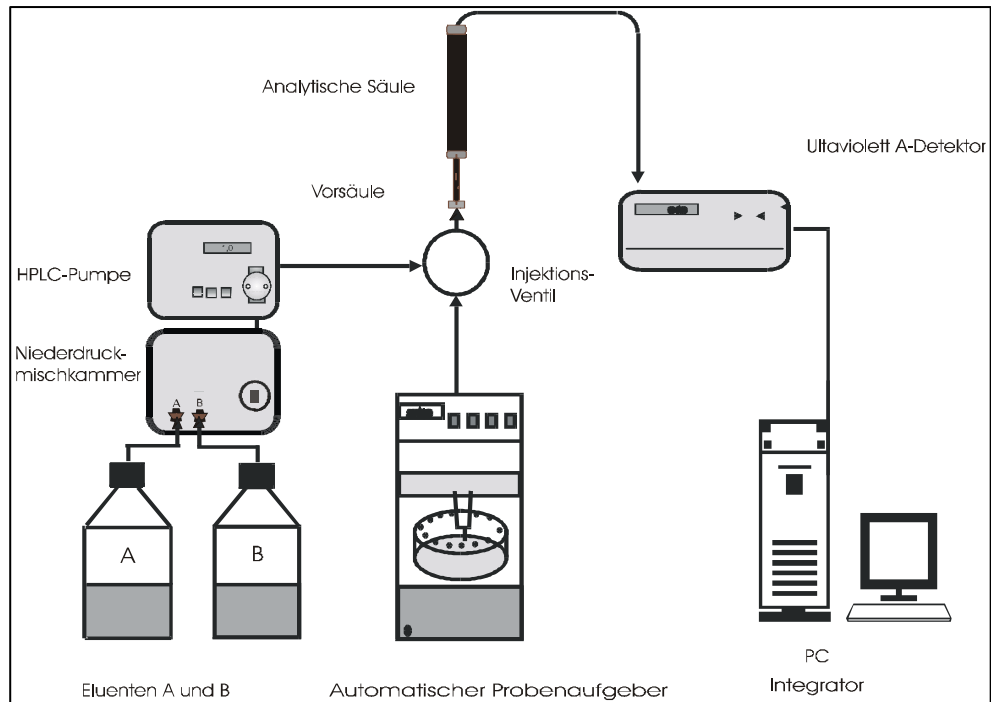


Abbildung 3: Darstellung der HPLC-Anlage zur Analytik von Adenosin und Inosin. Die Eluenten wurden in der Niederdruckmischkammer gemischt und anschließend durch die Hochdruckpumpe auf die analytische Trennsäule gebracht. Die zu analysierenden Substanzen wurden durch einen automatischen Probenaufgeber über ein Injektionsventil auf die Säule aufgegeben. Die Signale der getrennten Substanzen wurden kontinuierlich im UVA-Detektor detektiert. Die Datenaufnahme erfolgte mit einem Computer.

Die sieben Analyten waren Adenosin, Adenin, Hypoxanthin, Inosin, Purinribosid, Urat und Xanthin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Von jeder Substanz wurden zunächst 1 mol/L Lösungen angesetzt, und daraus Standards in aufsteigenden Konzentrationen hergestellt (0,05 $\mu\text{mol/L}$, 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 0,2 $\mu\text{mol/L}$ und 0,5 $\mu\text{mol/L}$). Zur Bestimmung der Retentionszeiten der einzelnen Purine wurden Standards verschiedener Konzentration in der Trennsäule getrennt. Die Identifizierung der zugehörigen Peaks erfolgte anhand simultan mitlaufender reiner Purinlösungen höherer Konzentration, die abwechselnd eingesetzt wurden. Die Flächenintegrale (AUC, "area under the curve") unter den jeweiligen Peaks wurden auf die bekannten Konzentrationen geeicht. Das Injektionsvolumen betrug bei allen Meßreihen 180 μL und die Analysezeit 27 min bei einer Flußrate von 1 mL/min. Ein Beispiel für die Zuordnung der Peaks zu den bestimmten Retentionszeiten zeigt die **Abbildung 4**.

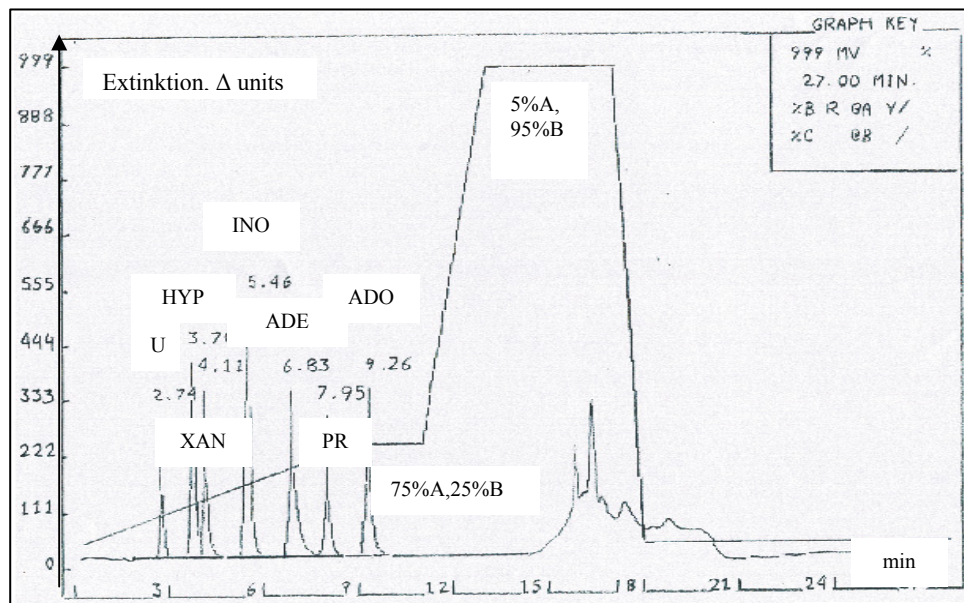


Abbildung 4: Originalchromatogramm zur Identifizierung der Purine und Bestimmung der Retentionszeiten mit der HPLC. Anhand eines externen 0,5 µmol/L Standards ist die Zuordnung der einzelnen Peaks zu den jeweiligen Purinen bei gegebenen Retentionszeiten dargestellt. Im einzelnen sind dies: Urat bei 2,74 Minuten, Hypoxanthin 3,70 Minuten, Xanthin 4,11 Minuten, Inosin 5,46 Minuten, Adenin 6,83 Minuten, Purinribosid 7,95 Minuten und Adenosin bei 9,26 Minuten.

2.1.1 Analytik im wässrigen Medium

Es wurden wässrige Standards eingesetzt, um Inosin – Eichreihen zu erstellen, welche einerseits der Identifizierung der Inosin - Peaks in den analysierten Plasmaproben dienen sollten, andererseits aber auch als Maß für die Adenosin-Konzentration nach enzymatischem Peak-shift galten.

Der Mittelwert der ermittelten Flächenintegrale von jeweils zwei bis drei Standards der Konzentrationen 0,05 $\mu\text{mol/L}$, 0,1 $\mu\text{mol/L}$ und 0,2 $\mu\text{mol/L}$ ($n=7$) wurde dann auf die jeweilige Konzentration geeicht. Die in der Plasmaprobe gemessene Inosin-Konzentration entsprach folglich nach Korrektur mit dem Recovery-Faktor der eigenen Eichreihe der Adenosin-Konzentration im Plasma (**Abbildung 5**).

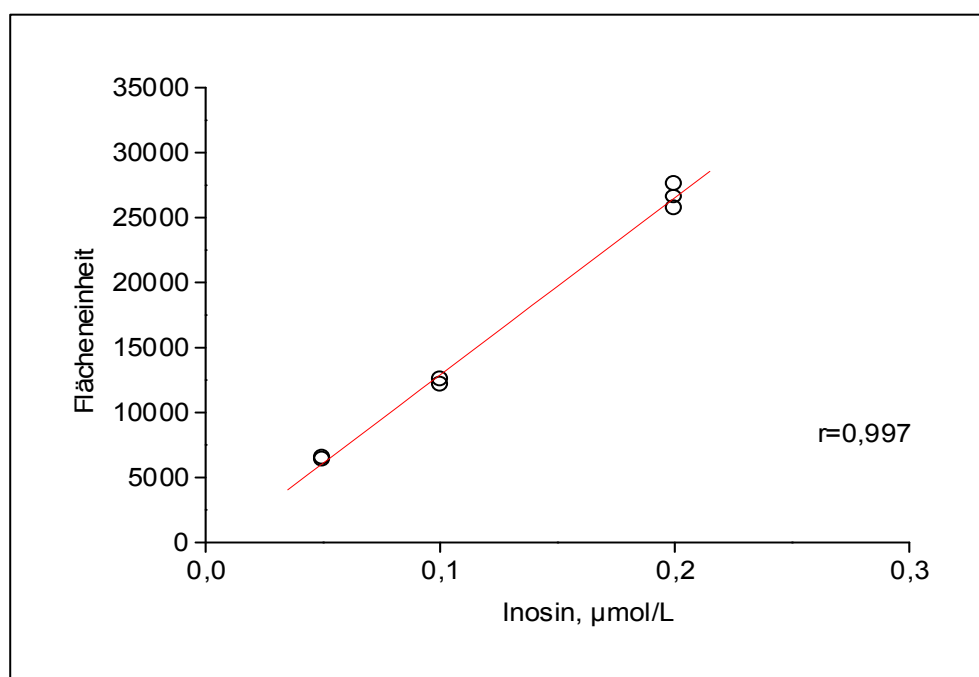


Abbildung 5: HPLC – Bestimmung von Inosin in wässrigen Standards. Die gemessenen Flächeneinheiten (AUC, „area under curve“) dienen als Funktion der eingesetzten Inosin - Konzentrationen in den verschiedenen externen Standards. Die durch lineare Regression ermittelten Eichgeraden in den Konzentrationsbereichen 0,05 – 0,2 $\mu\text{mol/L}$ dienen dem Nachweis der Linearität und Sensitivität (Korrelationskoeffizient $r = 0,997$).

2.1.2. Analytik im menschlichem Plasma

2.1.2.1 Aufarbeitung der Blutproben

Adenosin weist im menschlichen Blut eine Halbwertszeit von weniger als zwei Sekunden auf ⁷⁸. Aus diesem Grund ist eine sofortige Aufarbeitung der Blutproben unmittelbar nach Blutentnahme notwendig ⁶². 6 – 7 mL Blut wurden direkt in vorbereitete 10 mL Spritzen aufgezogen, in denen jeweils 1mL einer spezifischen „Stopp-Lösung“ vorgelegt wurde. Diese besteht aus Dipyridamol (DIP, 20 µmol/L), Erythro-9(2-Hydroxy-3-Nonyl)-Adenin (EHNA, 4.2 µmol/L) und Heparin 5000 IE (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Dipyridamol blockiert den transmembranösen Transport von Adenosin in die zellulären Bestandteile des Blutes, EHNA inhibiert den Abbau des Adenosin zu Inosin durch die extrazelluläre Adenosin-Desaminase ^{53,54}. Das Heparin diene zu Antikoagulation des Blutes. Mit dieser Stopp-Lösung konnte der weitere Metabolismus des extrazellulären Adenosins direkt nach Austritt aus dem Koronarsinus-Katheter verhindert werden. Diese wurde zunächst unter sterilen Bedingungen angesetzt. Sofort nach Blutentnahme wurden 2 mL der Vollblutproben für 30 Sekunden bei 3,15 g zentrifugiert. Jeweils 750 µL des Plasmaüberstandes wurden mit 750 µL Perchlorsäure 70 - 72% (z.A. Merck) zur Deproteinisierung der Proben versetzt. Die so behandelten Proben wurden bis zur weiteren Aufarbeitung kühl gelagert. Die Bestimmung der Laktat-Konzentration (Nova biomedical, Stat profile 1) und der Sauerstoffsättigung (Radiometer ABL System 615, Copenhagen) erfolgten aus dem verbliebenem Vollblut. Die gekühlten, deproteinisierten Plasma-Proben wurden mit einer 1 mol/L K₃PO₄-Lösung pH 7.4 (Merck) neutralisiert und erneut bei 3,15 g für 15 min zentrifugiert. Daraufhin erfolgte die Filtration des Plasmaüberstandes in einem Unterdruck-Filtersystem Adsorbex® (Merck, Stuttgart, Deutschland). Zur Äquilibration wurde der Filter (Waters C₁₈)

mehrfach im Wechsel mit 2 mL eines 1 $\mu\text{mol/L}$ $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffers (Merck) und 60% (v/v) Methanol LiChrosolv® (Merck) gespült. Die Nukleoside der organischen Proben wurden mit 60% (v/v) Methanol ausgewaschen. Anschließend wurden die filtrierten Proben zunächst bei 60° C mit N_2 oder Druckluft (Linde, Höllrigelskreuth) in einem Inkubator (Unitek HB 130, Deutschland) getrocknet und jeweils in 250 μL HPLC-Wasser LiChrosolv® (Merck) gelöst.

2.1.2.2. Enzymatischer Peak-shift

Aufgrund von Störsignalen in der Plasmaprobe gelingt keine eindeutige Identifizierung von Adenosin allein durch die Retentionszeit. Für die saubere Auflösung der jeweiligen Chromatogramme ist ein weiterer Analyseschritt notwendig. Zur Identifizierung von Adenosin und Inosin wurde deshalb die Methode des „enzymatischen Peak-shiftes“ verwendet^{53,54,62}. Demnach wurde zur Bestimmung der Adenosin-Konzentration eine zweifache Trennung der Plasmaprobe im HPLC-System durchgeführt. Im ersten Chromatographieschritt wurde die Adenosin enthaltende Eluat-Fraktion aufgefangen. Das Adenosin wurde dann durch die Zugabe von Adenosin-Desaminase spezifisch und äquimolar in Inosin umgewandelt. Dieser Schritt wird Peakshift genannt. In einem zweiten Chromatographieschritt wurde die Konzentration von Inosin als direkter Marker der Adenosin-Konzentration mittels Inosin-Eichgeraden bestimmt. Die Retentionszeit des Inosins variierte dabei zwischen 6 – 7 Minuten. Die in den bestimmten Zeitintervallen fraktionierten Adenosin-Proben wurden mittels eines automatischen Probensammlers (Foxy Scientific Instruments, Basel, Schweiz) in Reagenzröhrchen (ca. 3 mL) gesammelt. Parallel laufende Standards wurden auf die gleiche Weise fraktioniert, um später enzymatisch umgewandelt zu werden. Anhand dieser Standards wurde das

jeweilige Zeitfenster für das Sammeln der Adenosin-Fraktion ermittelt. Weiterhin konnten durch die Analyse der Standards mögliche Analysefehler erkannt werden. Die Wiederfindungsrate (Recovery) der jeweiligen Messreihe wurde ebenfalls mit Hilfe dieser Standards bestimmt. Für den Peakshift wurde die Adenosin-Desaminase mit einem 1 $\mu\text{mol/L}$ $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer pH 7.4 Merck im Verhältnis 1:100 gemischt. Jeder Probe der Adenosin enthaltenden Eluat-Fraktion aus dem ersten Chromatographieschritt wurde das Enzymgemisch auf ein Endvolumen von 200 μL zugesetzt. Nach 30 minütiger Inkubationszeit wurde die Enzymaktivität mit 50 μL Perchlorsäure 70 - 72% (z.A. Merck) unterbrochen. Es erfolgte nach weiteren 2 Minuten die Neutralisierung der Lösung mit 50 μL 1 mol/L K_3PO_4 pH 7.4 (Merck). Nach 10 minütiger Zentrifugation mit 3,15 g bei 4° C (Sorval Super T21, Du Pont, Wilmington, USA) wurden 250 μL des Überstandes aliquotiert und dem zweiten Chromatographieschritt zugeführt. Flussrate, Injektionsvolumen und Analysedauer erfolgten analog zu Schritt 1. Beispiele für die Analyse einer filtrierten Plasmaprobe vor und nach Peak-shift zeigen **Abbildungen 6 A und B**.

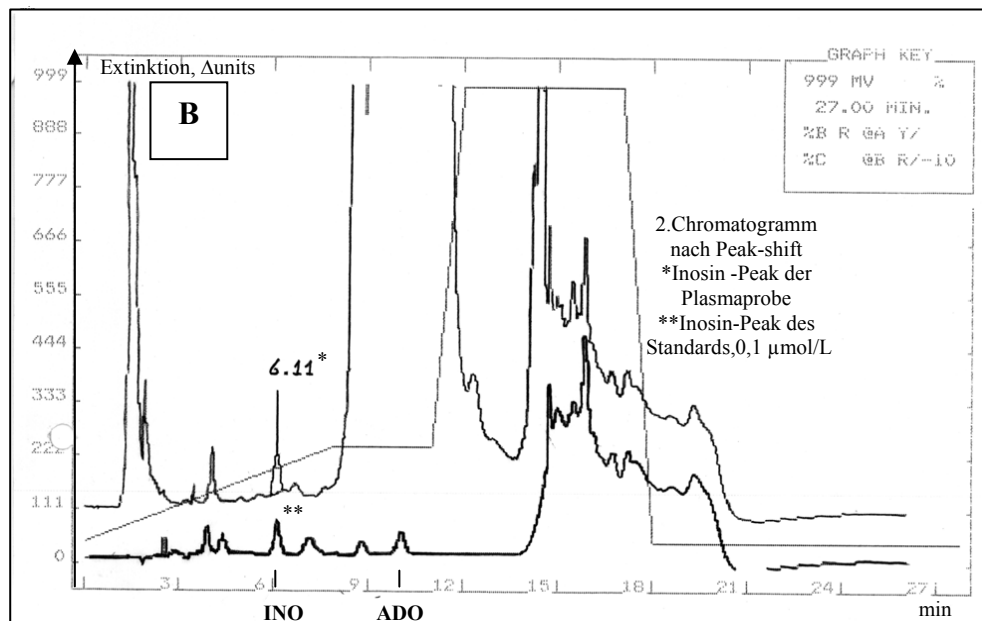
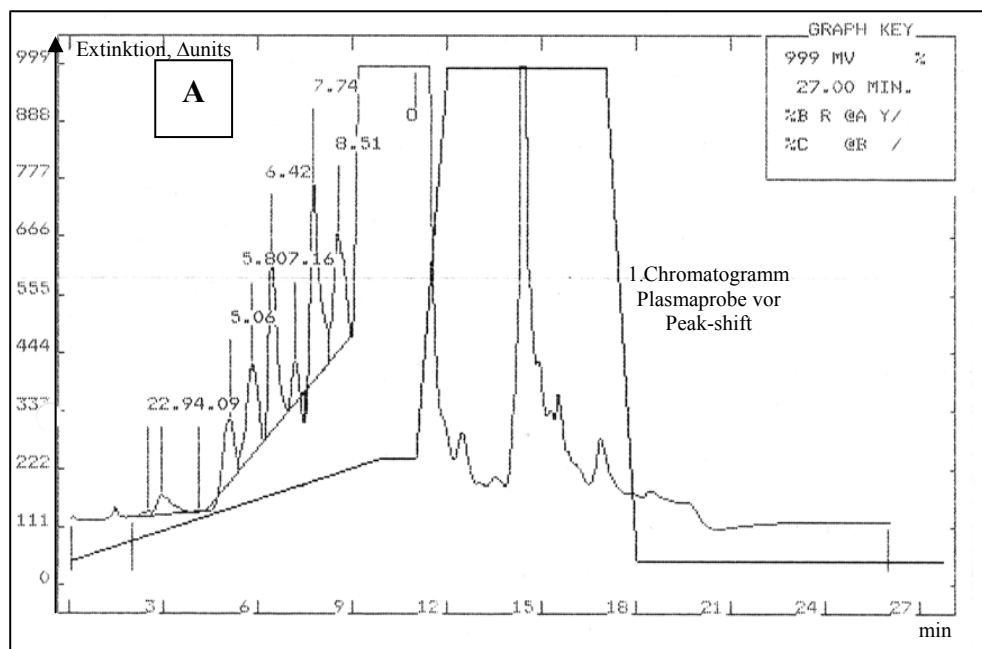


Abbildung 6 A und B: Originalchromatogramme einer Plasmaprobe vor und nach Peak-shift. Nach Sammeln der Adenosin-Fraktion im ersten Analyseschritt erfolgt die Bestimmung der Inosin-Konzentration als Marker der Adenosin-Konzentration nach enzymatischem Peak-shift in einem zweiten Analyseschritt. Zur Identifizierung des Inosin-Peaks (*) dient ein 0,1 µmol/L Standard (**).

2.1.2.3.

Bestimmung der Adenosin - Konzentration

Für die Analyse wurden die ermittelten Peaks auf diejenigen der Standards projiziert. Dies erleichterte die Identifikation der Inosin-Peaks. Die errechneten Flächenintegrale ergaben dabei Inosin-Mengen, mit denen die ursprünglichen Inosin- bzw. Adenosin-Konzentrationen der jeweiligen Proben anhand des bekannten Injektionsvolumens und der durchgeführten Eichreihen ermittelt werden konnten. Die nach dem ersten Chromatographieschritt gesammelten Standards wurden nach anschliessendem enzymatischen Peak-shift in einem zweiten Chromatographieschritt analysiert. Anhand dieser Standards konnte so die jeweilige Wiederfindungsrate (Recovery) ermittelt werden. Die errechneten Adenosin-Konzentrationen der Plasmaproben wurden dann im letzten Schritt mit den jeweiligen Recovery-Faktoren korrigiert (Abbildung 7).

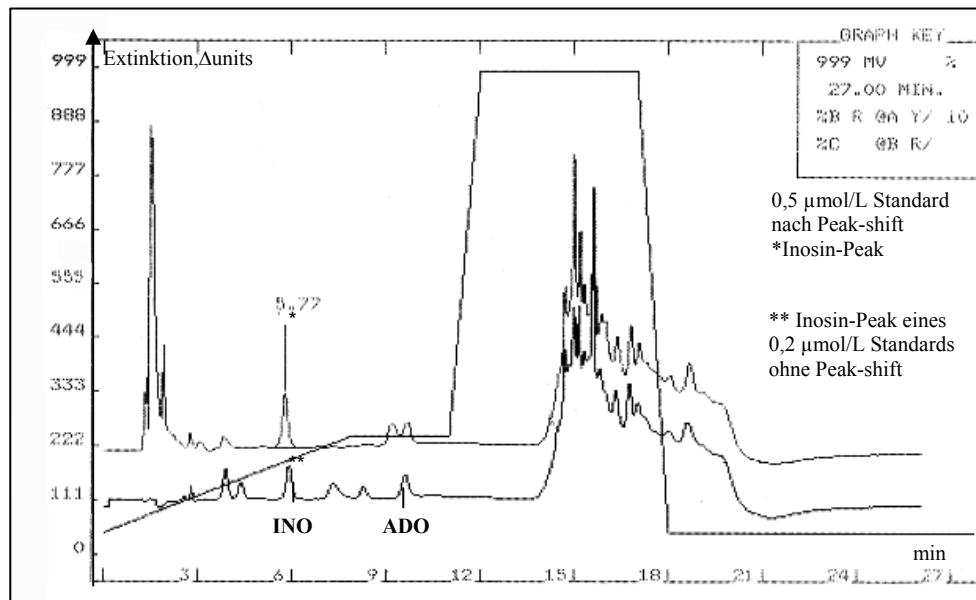


Abbildung 7: Bestimmung des Recovery-Faktors anhand eines Originalchromatogrammes einer Standardprobe nach Peak-shift. Bei einer Retentionszeit von 5,77 Minuten kann der Inosin-Peak des enzymatisch umgewandelten 0,5 $\mu\text{mol/L}$ Standards durch den darunter projizierten 0,2 $\mu\text{mol/L}$ externen Standard deutlich identifiziert werden. Anhand der jeweiligen Eichreihe ergibt die Fläche unterhalb des markierten Peaks eine Inosin-Konzentration von 276 nmol/L. Somit beträgt hier die Wiederfindungsrate (Recovery) für Adenosin 55 %.

2.1.3. Biochemisch–metabolische Messungen

2.1.3.1. Adenosin

Extrazelluläres Adenosin wird mittels Adenosin–Desaminase zu Inosin umgewandelt. So kann nach der enzymatischen Umwandlung (stöchiometrisches Verhältnis von 1 : 1) der Plasmaprobe (Peak-shift) die gemessene Inosin-Konzentration, nach Korrektur mit der entsprechenden Wiederfindungsrate (Recovery-Faktor), der ursprünglichen Adenosin-Konzentration der Plasmaprobe gleichgesetzt werden. Folgendes Beispiel zeigt die Berechnung der Adenosin-Konzentration einer Plasmaprobe mit Hilfe eines externen Standards bzw. des zugehörigen Recoveryfaktors:

- Die Eichreihe hatte ergeben:
Die Injektion von 180 µL des Standards (0,1 µmol/ L) ergibt 18 pmoles Inosin bei einer gemessenen Fläche von 7219 AUC (Area Under Curve)
$$7219 \text{ AUC} = 18 \text{ pmoles}$$
- Verdünnungsfaktor in den Analyseschritten: $250/180 \times 300/180$
$$= 2,3$$
- Fläche des Inosin-Peaks in der Plasmaprobe
$$\begin{aligned} 3631 \text{ AUC} &= 3631 \times 18 / 7219 \times 2,3 \\ &= 20,82 \text{ pmol/ 750 µL Plasma} \\ &= 27,76 \text{ nmol/ L} \end{aligned}$$
- Recovery = 41,7%
$$\begin{aligned} &= 27,76 \text{ nmol/ L} \times 100 / 41,7 \\ &= 66,57 \text{ nmol/ L} \end{aligned}$$

Die ursprüngliche Adenosin-Konzentration der Plasmaprobe beträgt demnach 67 nmol/ L.

2.1.3.2. Myokardiale Laktatextraktion und Sauerstoffgehalt

In der klinischen Diagnostik wird die myokardiale Laktatextraktion bzw. eine Umkehr der myokardialen Laktatextraktion zu Laktatproduktion als biochemischer Marker einer akuten Myokardischämie gesehen^{74-77,105}. Ein Ziel der Studie war es, die Wertigkeit von Adenosin als Marker für Ischämie im Vergleich zu Laktat zu untersuchen. Somit wurden neben der Adenosinbestimmungen die Laktat-Konzentrationen in den arteriellen und koronarvenösen Vollblutproben mit einem photometrischen Standardmessverfahren (Nova biomedical, Stat profile) gemessen. Zur Bestimmung der myokardialen Laktat-Extraktion wurde die arteriokoronarvenöse Laktatdifferenz aus der arteriellen und koronarvenösen Laktatkonzentration (mmol/ L) gebildet.

Nach einem standardisiertem Routineverfahren (Radiometer, ABL System 615, Copenhagen) wurden desweiteren die O₂-Sättigungen und der Hämoglobin- Gehalt aus den gleichen Proben photometrisch bestimmt, um den Sauerstoffgehalt der Probe zu errechnen. Diese lässt sich mit der folgenden Formel ermitteln: (1 g Hb bindet 1,39 ml O₂)

$$\text{O}_2\text{-Gehalt} = \text{Hb} \times 1,39 \times \text{S}_{\text{O}_2} \times 10 \text{ [mL O}_2 \text{ /L Blut]}$$

2.2. Klinisch-elektrophysiologische Untersuchung

2.2.1. Patientenkollektiv

Die Adenosin-Messungen im Rahmen der elektrophysiologischen Untersuchung wurden an insgesamt 11, ausschließlich männlichen Patienten, im mittleren Alter von 68 Jahren (min. 63 Jahre, max. 79) durchgeführt: Diese befanden sich in einem Zeitraum zwischen Juni 1996 bis Dezember 1997 in stationärer Behandlung in der Medizinischen Klinik B der Heinrich-Heine-Universität. Anamnestisch war bei allen Patienten mittels einer Standard - Koronarangiographie eine koronare Herzerkrankung gesichert worden. In allen Fällen waren kurz zuvor lebensbedrohliche, ventrikuläre Herzrhythmusstörungen (anhaltende ventrikuläre Tachykardie oder Kammerflimmern) aufgetreten, die Reanimationsmaßnahmen inklusive externer Defibrillation erforderlich gemacht hatten. Demzufolge war bei allen Patienten die Indikation zu einer invasiven elektrophysiologischen Herzkatheteruntersuchung gegeben. Diese Untersuchung diente dem Nachweis bzw. Ausschluß einer belastungsinduzierten Myokardischämie als mögliche Ursache der malignen Herzrhythmusstörung. Des weiteren sollte die ventrikuläre Vulnerabilität als Voraussetzung für eventuell notwendige weiterführende elektrotherapeutische Maßnahmen (Medikation/ implantierbarer Kardioverter/ Defibrillator, ICD) ermittelt werden. Mit Ausnahme von zwei Patienten mit einer Koronaren-Zwei-Gefäßerkrankung waren in den anderen neun Fällen alle drei Koronararterien (RCA, RIVA und RCX) mittel- bis hochgradig stenosierte. Sechs der insgesamt elf Patienten wiesen einen bis mehrere Myokardinfarkte in der Anamnese auf (4 x Hinterwandinfarkt, 1 x Vorderwandinfarkt und 1 x Hinterwand- und Vorderwandinfarkt). Bei vier Patienten war bereits eine operative Myokardrevaskularisierung (Ein- bis Mehrfach-ACVB-Operation) erfolgt. Die Ejektionsfraktion als Maßstab für die Funktion des linken

Ventrikels, sowie mögliche Bewegungsstörungen im Bereich der Ventrikelwand waren zuvor bei allen Patienten im Rahmen der Linksherzkatheter-Untersuchung lävokardiographisch ermittelt worden. Im Gesamtkollektiv betrug die mittlere linksventrikuläre Ejektionsfraktion LVEF 49 ± 10 %. Die einzelnen Befunde sind aus der **Tabelle 1** zu entnehmen.

Tabelle 1: Patientenkollektiv

Gruppe	Nr.	Myokard-Infarkt	LV-Funktion	KHK	ACVB	LCA		RCA
						RIVA	RCX	RIVP
A	1	keinen	Diffus hochgradig eingeschränkt, EF = 39%	3	nein	RIVA-Abbruch nach Abgang des Diagonalastes (D), hochgradige Abgangstenose des D	Höhergradige Abgangstenose	RCA 50%ige Stenose im mittleren Drittel (m/3), RIVP mit 60-70%iger Abgangstenose
	2	keinen	Hochgradig eingeschränkt, EF = 40%	3	ja	RIVA hochgradige Abgangstenose, IMA-Bypass zu	Hochgradige Abgangstenose der RCX, Abbruch im m/3, Einzelvene (EV) offen	Proximaler Abbruch der RCA, EV offen
	3	keinen	Schwere Hypokinesie Hinterwand (HW) und Posterolateral-wand (PLW), mässige Hypokinesie Septum und Apex, EF = 50%	3	nein	Filiforme Stenosierung des RIVA nach Abgang der Diagonaläste I und II, mäßiggradige Stenosen in D I und D II	Höchstgradige Abgangstenose des RCX, funktioneller Verschluss	Funktioneller Verschluss der RCA mit subtotaler Stenosierung des RIVP
	4	Hinterwand-infarkt	Septumhypokinesie, mittelgradig eingeschränkte Pumpfunktion (PF), EF = 64%	3	nein	Höhergradige Stenose des RIVA am Abgang des Diagonalastes und Stenose im m/3, D hochgradig stenosierte	Subtotale Stenose des RCX nach Abgang der drei Marginaläste (M I-III), M I – III diffus sklerosiert	Ostiumstenose der RCA, hochgradige Abgangstenose des R. ventrikularis II, proximal grenzwertige Stenose des RIVP
	5	Vorderwand-infarkt	Hypokinesie Vorderwand (VW), Apex, Septum und basale Regionen, EF = 55%	3	nein	RIVA-Verschluss direkt am Stamm	90%ige Abgangstenose des RCX, vor Abgang des Marginalastes 70%ig	70%ige Stenose der RCA an der Crux cordis, Verschluss des RIVP

B	6	keinen	Inferobasale Akinesie, Hypokinesie VW und Septum, PF hochgradig eingeschränkt, EF = 50%	3	nein	RIVA proximal 40%ig stenosierte	RCX im m/3 50-60%ig stenosierte, subtotale Abgangstenose des Marginalastes	Proximal funktioneller Verschluss der RCA
	7	Vorderwand- und Hinterwand- infarkt	Lokale Akinesie an der HW und VW, EF = 60%	2	nein	Keine Stenosierung des RIVA	Proximaler Abbruch des RCX, gut kollateralisiert	Proximaler Abbruch der RCA, relativ gut kollateralisiert
	8	Hinterwand- infarkt und Reinfarkt	Hypokinesie VW, Apex, Hypo- bis Akinesie im Bereich der Hinterwand, EF = 37%	3	nein	RIVA vor Apex hochgradig stenosierte	RCX proximal 50%ig stenosierte, distal subtotale, langstreckige Stenose, Marginaläste I und II diffus stenosierte	Proximaler Abbruch der RCA
	9	Hinterwand- infarkt und Reinfarkt	Inferobasale Akinesie, Hypokinesie des restlichen Myokards, PF hochgradig eingeschränkt, EF = 37 %	3	ja	RIVA proximal 60%ig stenosierte, im m/3 diffuse Stenosierung, IMA offen, EV am Diagonalast offen	RCX ab m/3 subtotale, langstreckig diffuse Stenosierung, EV auf Marginalast offen	Abbruch im m/3
	10	keinen	Lokale Hypokinesie inferobasal, PF mittelgradig eingeschränkt, EF = 50 %	3	ja	70%ige Stammstenose, RIVA- Abbruch, IMA offen, EV auf Diagonalast offen	Stammnaher Abbruch des RCX, Sequentialvene auf Marginalast I 40-50%ig stenosierte	Funktioneller Verschluss der RCA
	11	Hinterwand- infarkt	Hypokinesie gesamte HW und im Bereich der PLW, Hypokinesie basale VW, EF = 51%	2	Ja	RIVA im proximalen Drittel höhergradig stenosierte, IMA funktionsuntüchtig, proximaler, EV auf den Diagonalast offen, retrograde Versorgung des RIVA	Proximaler Abbruch des RCX, EV auf den Marginalast offen	Verschluss der RCA am Ostium, EV offen

2.2.2. Untersuchungsprotokoll

Die koronarvenösen und arteriellen Proben wurden während der elektrophysiologischen Untersuchung am Herzen von insgesamt 11 Patienten entnommen. Alle Untersuchungen wurden aus klinischer Indikation bei gesicherter Koronarer Herzkrankheit und stattgehabtem Ereignis einer malignen ventrikulären Arrhythmie (anhaltende ventrikuläre Tachykardie oder Kammerflattern/-flimmern) durchgeführt. Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden nach einem standardisierten Stimulationsprotokoll¹⁰⁶ durchgeführt. Hierfür wurden drei Elektrodenkabel über die V.femoralis (5F oder 6F Schleusen, Cordis, Johnson&Johnson) in den rechten Vorhof eingeführt und im hohen rechten Vorhof (HRA), am HIS- Bündel (HBE) und der ventrikulären Spitze (RVA) positioniert. Ein weiterer diagnostischer Hämodynamik-Katheter wurde in den Koronarsinus (Multipurpose-Katheter mit Seitenlöchern, 6F, Cordis, Johnson&Johnson) zur koronarvenösen Blutentnahme platziert. In die A. femoralis wurde eine 5F Schleuse (Cordis, Avanti, Johnson&Johnson) zur arteriellen Blutentnahme eingelegt. Bei den elektrophysiologischen Kathetern kamen zur Anwendung: quadripolarer Elektroden-Katheter in HRA- (Vaiking Bard™), bipolarer Katheter in HIS- und RVA-Position (Cordis). Die Stimulation erfolgte über einen routinemässig verwendeten Stimulator (Universal Heart Stimulator UHS 20, Biotronik). Hierüber wurde zunächst schrittweise mit steigenden Frequenzen im rechten Vorhof (HRA-Position) stimuliert. Analog erfolgte anschließend die Stimulation im rechten Ventrikel (RVA-Position). Die abgeleiteten intrakardialen Elektrokardiogramme wurden über das Quinton- Pulmokard EPU System (Pulmokard, Herdecke) aufgezeichnet und vermessen. Es erfolgte zunächst eine fixfrequente Stimulation über zehn Minuten im hohen rechten Vorhof mit einer Zykluslänge von 500 ms entsprechend 120 Schlägen/Minute, darauffolgend eine zehnminütige fixfrequente Stimulation an der ventrikulären Spitze (RVA) ebenfalls mit gleicher Zykluslänge. Anschliessend wurde mit

der programmierten Ventrikelstimulation begonnen, zunächst im Sinusrhythmus mit ein und zwei vorzeitig angekoppelten Schlägen (RVA SR S2 S3). Hiernach folgten fixfrequente Stimulationen mit Basiszykluslängen zwischen 500 und 330 ms (entsprechend 120 – 180 Schlägen/ Minute) über jeweils acht Zyklen mit Ankopplung von ein, zwei und drei Extrastimuli (RVA S2 S3 S4; S1=500, 430, 370 und 330 ms) und einer Pausenlänge von drei Sekunden. Die Stimulation wurde beim Auftreten einer anhaltenden ventrikulären Tachykardie oder beim Auftreten gravierender klinischer Symptome (Angina Pectoris, Luftnot) umgehend beendet. Die Blutabnahmen aus Arterie und Koronarsinus erfolgten jeweils simultan, als Ruhebasiswert vor Beginn der Stimulation. In die mit Stopp-Lösung präparierten Spritzen wurde jeweils 6 - 7mL Blut aufgezogen. Nach zehnminütiger fixfrequenter atrialer und ventrikulärer Stimulation mit Frequenzen zwischen 120 und 180 Schlägen/Minute wurden weitere Proben simultan aus Koronarsinus und A. femoralis entnommen. Bei Auftreten anhaltender ventrikulärer Tachykardien mit Defibrillationspflichtigkeit wurde auf eine Blutentnahme zu diesem Zeitpunkt verzichtet. Nach einer zehnminütigen Erholungsphase folgte die dritte bzw. vierte Blutabnahme. Sofort nach der Entnahme wurden 2 mL aus den jeweiligen Blutproben bei 3,15 g für 30 Sekunden zentrifugiert und den in 2.1.2.1 näher erläuterten Analyseschritten zugeführt. In den restlichen 4 – 5 mL Vollblut wurden die Laktat-Konzentration und die Sauerstoffsättigung photometrisch bestimmt. Die arteriokoronarvenöse Differenz der Adenosin-Konzentrationen (AVD-ADO) in den einzelnen Plasmaproben wurde aus den Einzelkonzentrationen ermittelt, um eine myokardiale Adenosin-Nettoproduktion bzw. –Extraktion feststellen zu können. Dabei wurde die koronarvenöse Konzentration von der arteriellen subtrahiert. Analog dazu wurden die arteriokoronarvenöse Laktat-Differenz (AVD-Laktat) und die arteriokoronarvenöse Sauerstoff-Differenz (AVD_{O₂}) bestimmt.

2.2.3. Ventrikuläre Vulnerabilität

Aufgrund der Ergebnisse der Elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt. In die Gruppe A wurden Patienten mit leicht erhöhter bis normaler ventrikulärer Vulnerabilität eingeteilt ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Bei diesen konnte im Rahmen der Ventrikelstimulation bei der Katheterposition in der rechtsventrikulären Spitze (RVA) keine oder bei der Katheterposition im rechtsventrikulären Ausflusstrakt (RVOT) nur schwer (bis zu drei vorzeitigen Stimulationen) eine anhaltende ventrikuläre Tachykardie (VT) ausgelöst werden. Bei den Patienten in der Gruppe B mit deutlich erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität konnte hingegen leicht (mit maximal zwei vorzeitigen Stimulationen) eine anhaltende ventrikuläre Tachykardie induziert werden.

Folgende Kriterien wurden zur Einteilung der Patienten in die Gruppe A mit normaler bis erhöhter und in die Gruppe B mit deutlich erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität festgelegt:

Gruppe	Kriterien der ventrikulären Vulnerabilität
A	Normale bis leicht erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität
Definition	Schwer auslösbar, d.h. in RVA bei bis zu drei vorzeitigen Extraschlägen (S4) oder in RVO bei bis zu zwei vorzeitigen Extraschlägen (S3) nicht auslösbare oder anhaltende VT
B	Deutlich erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität
Definition	Leicht auslösbar, d.h. in RVA bei bis zu zwei vorzeitigen Extraschlägen (S2 S3) auslösbare, anhaltende VT oder Kammerflimmern

2.2.4. Mathematisch-statistische Methoden

Alle statistischen Daten wurden als Mittelwerte ($\bar{x}$) $\pm$ Standardfehler (SEM) angegeben. Zweizeitige P-Werte von $<0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Zunächst wurden die Daten mit dem Kolgomorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung überprüft. Wenn eine Normalverteilung anhand dieses Tests nicht ausgeschlossen werden musste, wurde der t-Test zur Prüfung signifikanter Differenzen herangezogen. Lag keine Normalverteilung vor, so wurden die Werte mit dem Wilcoxon-rank-Test auf mögliche Signifikanzen getestet. Die Analyse der Daten wurde mittels der Software SPSS für Windows (Statistical Package for Analysis ans Social Sciences, Version 5.0.1.; SPSS-Inc., Chicago, ILL USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. HPLC

3.1.1. Messungen im wässrigen Milieu

Zur Überprüfung einer Linearität ($r \geq 0,99$) zwischen der Konzentration von Adenosin bzw. Inosin und Detektorsignal wurden 15 externe Standards unterschiedlicher Konzentration (0,05 $\mu\text{mol/L}$, 0,1 $\mu\text{mol/L}$, 0,2 $\mu\text{mol/L}$ und 0,5 $\mu\text{mol/L}$) in einer Messreihe analysiert. Der Korrelationskoeffizient lag sowohl bei Inosin als auch bei Adenosin jeweils $> 0,997$. Diese Linearität war bei jeder erneut durchgeführten Messreihe reproduzierbar. Sie ist in **Abbildung 8 A und B** dargestellt. Der Variationskoeffizient bei Aufgabe eines 0,5 $\mu\text{mol/L}$ Standards betrug 4% für Inosin und 3% für Adenosin. (bei 0,05 $\mu\text{mol/L}$ Standard für Inosin 15% und für Adenosin 6%). Bei der Analyse von wässrigen Proben blieben die Retentionszeiten der einzelnen Purine innerhalb der einzelnen Messreihen konstant. Bei Vorhandensein von organischen Proben und bei zunehmender Abnutzung der Trennsäule kam es jedoch zu Verschiebungen der Retentionszeiten, so dass sowohl innerhalb einer als auch zu jeder neuen Analysesequenz mehrfach Eichreihen neu definiert wurden. So konnten die einzelnen Purine weiterhin eindeutig identifiziert werden. Die Änderungen der Retentionszeit für Standards lag im wässrigen Milieu bei Inosin bei 1,2 – 3,6 %, bei Vorhandensein von Plasmaproben jedoch bei 2,5 – 8,9 %.

Nach der Analyse der Inosin–Eichreihen bei Vorhandensein von Plasmaproben wurde die Wiederfindungsrate (Recovery-Faktor) bestimmt. Die gemessenen Inosin–Konzentrationen in den einzelnen Plasmaproben wurden mit dem jeweils ermittelten Recovery - Faktor aus der eigenen Messreihe korrigiert. Der Recovery – Faktor variierte zwischen 0,412 – 0,556 bzw. es ergaben sich Wiederfindungsraten von 41 - 54%.

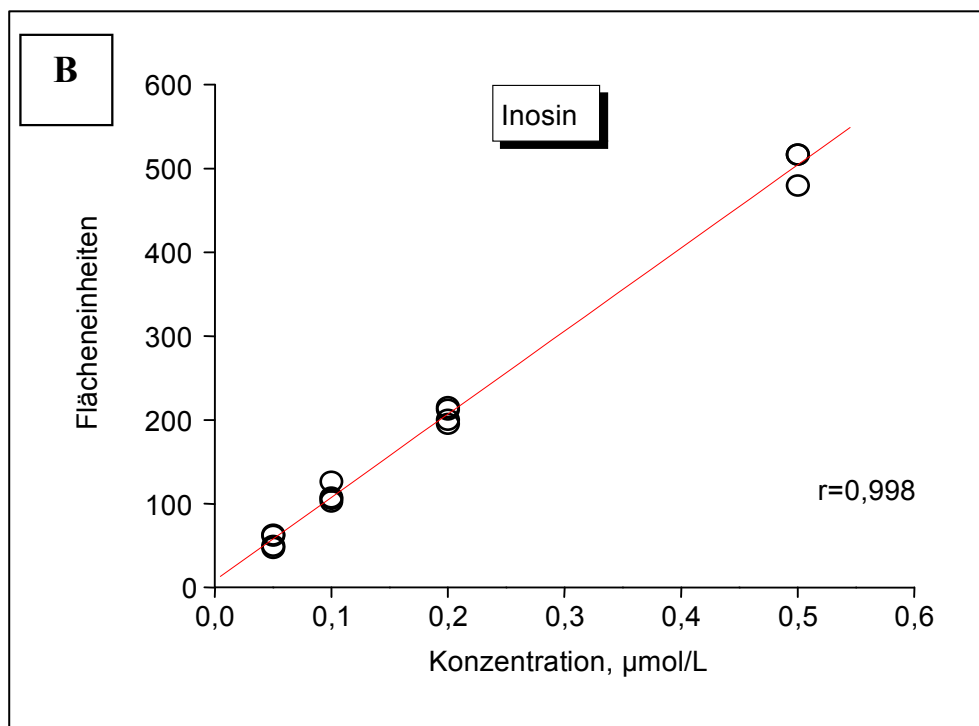
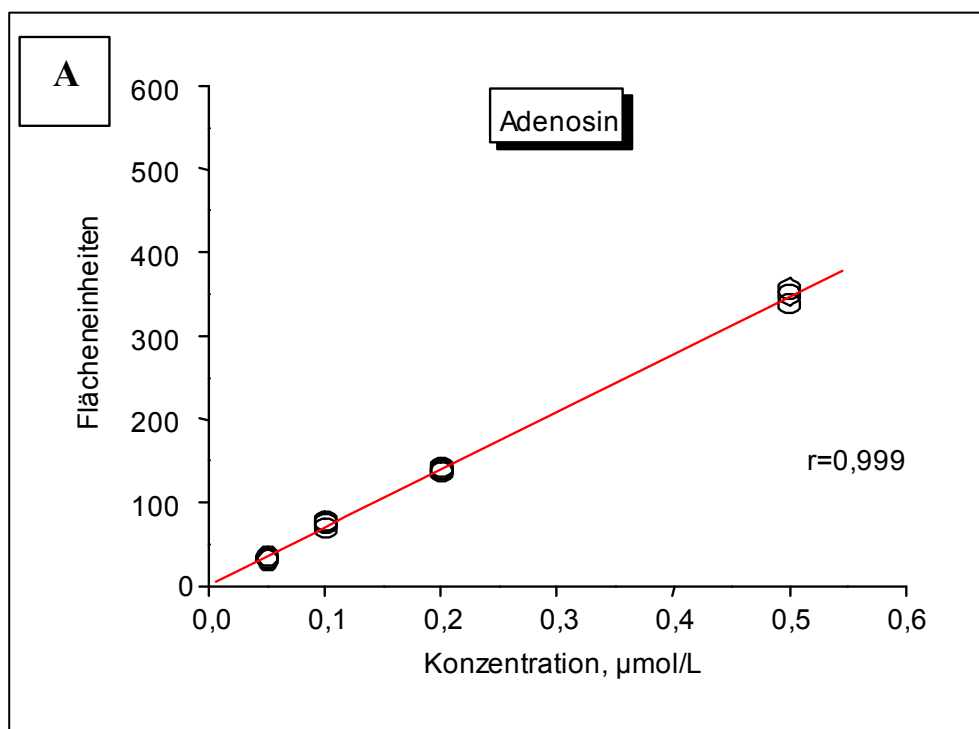


Abbildung 8 A und B: HPLC-Bestimmung von Adenosin und Inosin. Die gemessenen Flächeneinheiten (AUC, "area under the curve") dienen als Funktion der eingesetzten Konzentrationen an Adenosin und Inosin in den verschiedenen externen Standards im wässrigen Milieu. Die durch die lineare Regression ermittelten Eichgeraden in den Konzentrationen 0,05 – 0,5 $\mu\text{mol/L}$ dienen zum Nachweis der Linearität und Sensitivität.

3.1.2. Messungen im menschlichen Blut

3.1.2.2 Myokardiale Adenosin - Konzentration

Von jeder entnommenen Plasmaprobe aus der Arteria femoralis und dem Koronarsinus wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert aus diesen als Ergebnis der Messung interpretiert. Ein signifikanter Anstieg der Adenosin-Produktion, erkennbar an einer Zunahme der arteriokoronarvenösen Adenosin-Differenz wurde als eine möglicherweise durch Belastung (programmierte Vorhof- bzw. Ventrikelstimulation) induzierte Ischämie gedeutet. Im Vergleich dazu wurden die arteriovenösen Laktat-Differenzen in den Blutproben bestimmt im Hinblick auf eine „Laktat-Umkehr“ (Umkehr von myokardialer Laktat-Extraktion zu Laktat-Produktion) als bislang üblichen Indikator einer Myokardischämie. Ungeachtet der Auslösbarkeit einer ventrikulären Tachykardie wurde zunächst das Gesamtkollektiv auf eine Ischämie während Stimulation überprüft. In **Abbildung 9** sind die Mittelwerte der arteriellen und koronarvenösen Adenosin-Konzentrationen in Ruhe und während Stimulation dargestellt. Die arteriokoronarvenöse Adenosin-Differenz (AVD ADO) beträgt in Ruhe $-4,3 \pm 13,8$ nmol/L (arteriell $77,2 \pm 22,6$ nmol/L, koronarvenös $81,4 \pm 19,3$ nmol/L) und steigt tendentiell während Stimulation auf $-31,1 \pm 8,6$ nmol/L (art. $52,8 \pm 11,8$ nmol/L, c.v. $84,0 \pm 16,7$ nmol/L) an. In der nachfolgenden Ruhemessung (Ruhe') beträgt sie noch $-16,3 \pm$ nmol/L.

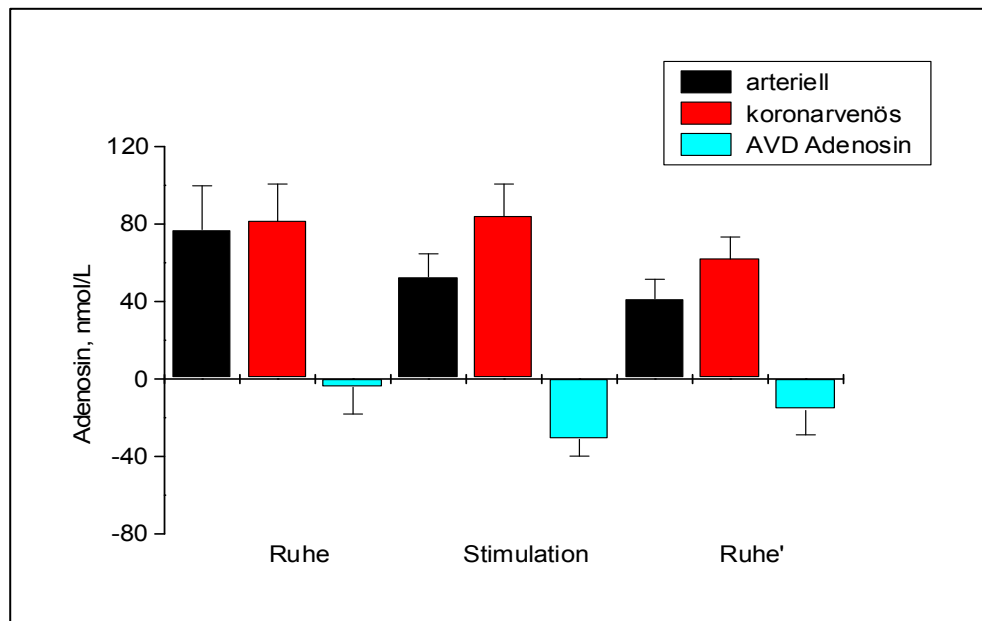


Abbildung 9: Adenosin-Konzentration vor, während und nach Schrittmacherstimulation. Die arteriokoronarvenöse Differenz der Adenosin-Konzentration (AVD ADO, n=11) nimmt unter Stimulation als Zeichen einer myokardialen Adenosin-Netto-Produktion zunächst tendentiell zu ($p > 0,05$). Nach zehnminütiger Stimulationspause (Ruhe') nähert sie sich wieder dem Basiswert vor Stimulation.

Die einzelnen Ergebnisse der jeweiligen Versuchsreihen sind in der **Tabelle 3** aufgelistet:

Gruppe	EPU	Ruhe			Stimulation			Stimulation		
		arteriell [nmol/l]	Koronar- venös [nmol/l]	AVD [nmol/l]	arteriell [nmol/l]	Koronar- venös [nmol/l]	AVD [nmol/l]	arteriell [nmol/l]	Koronar- venös [nmol/l]	AVD [nmol/l]
A	1	3,8	4,2	-0,4	4,1	6,9	-2,8	3,3	10,0	-6,7
	2	22,5	23,2	-1,2	35,9	49,2	-13,3	25,1	20,5	4,6
	3	56,5	113,4	-56,9	12,1	45,8	-33,7	56,5	113,4	-56,9
	4	223,4	228,8	-5,4	87,2	104,9	-17,7	45,6	95	-49,4
	5	58,4	132,3	-74,0	82,5	103,2	-20,6	31,6	104,7	-73,1
B	6	26,8	28,1	-1,4	38,9	58,9	-20,0	26,8	32,74	-5,97
	7	39,7	70,8	-31,1	37,1	46,5	-9,4	39,7	70,8	-31,1
	8	123	66,4	56,6	130,4	218	-87,6	123	66,4	56,6
	9	49,4	55,2	-5,8	28,2	110,9	-82,8	49,4	19	30,4
	10	208,3	119,8	88,5	91	105,0	-14,0	63,9	49,7	14,2
	11	37,1	53,4	-16,4	33,7	74,2	-40,5	36,9	98,7	-61,9

3.1.2.2. Myokardiale Laktat-Extraktion und Sauerstoffgehalt

Die arteriovenöse Laktat-Differenz ergab in Ruhe $0,16 \pm 0,06$ mmol/L (art. $0,81 \pm 0,05$ mmol/L, c.v. $0,65 \pm 0,07$ mmol/L). Unter Stimulation nahm die Laktat-Extraktion auf $0,01 \pm 0,08$ mmol/L (art. $0,95 \pm 0,08$ mmol/L, c.v. $0,94 \pm 0,12$ mmol/L) ab. Nach Stimulation stieg sie erneut auf $0,16 \pm 0,06$ mmol/L (art. $0,97 \pm 0,06$ mmol/L, c.v. $0,06 \pm 0,07$ mmol/L) an. **Abbildung 10** zeigt die arteriokoronarvenöse Differenz der Laktat-Konzentration in Ruhe und während Stimulation.

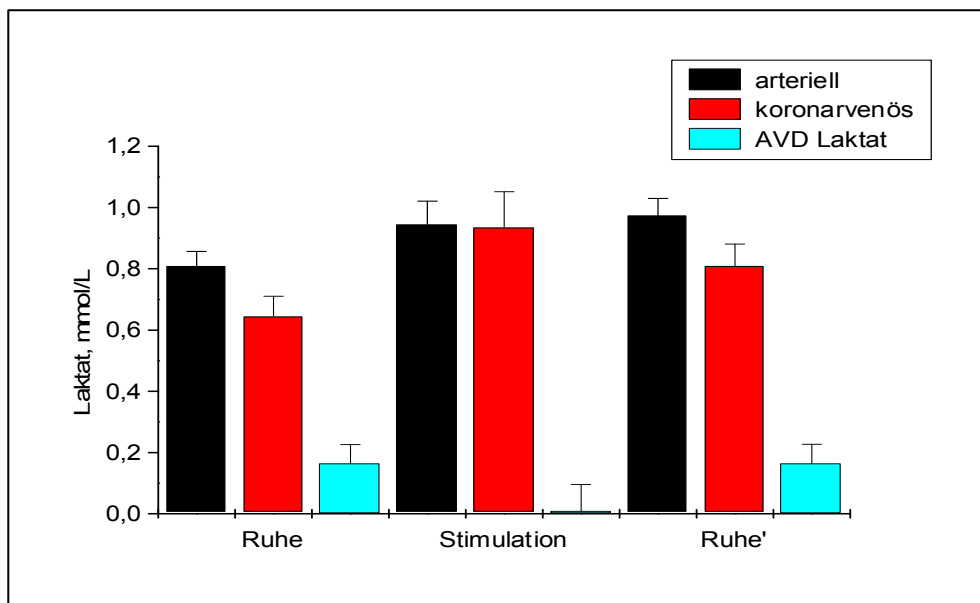


Abbildung 10: Laktat-Konzentration vor, während und nach Schrittmacherstimulation. Die arteriokoronarvenöse Laktat-Differenz (AVD Laktat, n=11) bleibt unter Stimulation positiv. Es erfolgt keine Laktat-Umkehr als Zeichen einer akuten Myokardischämie bzw. einer myokardialen Laktat-Nettoproduktion. Die in Ruhe gegebene myokardiale Laktat-Extraktion nimmt während Stimulation tendentiell ab und erreicht nach zehn Minuten wieder den Ausgangswert (Ruhe').

Die Einzelergebnisse der Laktat-Messungen sind in der **Tabelle 4** aufgelistet:

Gruppe	EPU	Ruhe			Stimulation			nach Stimulation		
		arteriell [mmol/l]	koronar- venös [mmol/l]	AVD [mmol/l]	arteriell [mmol/l]	koronar- venös [mmol/l]	AVD [mmol/l]	arteriell [mmol/l]	koronar- venös [mmol/l]	AVD [mmol/l]
A	1	0,7	0,5	0,2	0,8	0,7	0,1	1	0,8	0,2
	2	0,7	0,7	0	0,7	0,5	0,2	0,5	0,7	-0,2
	3	1	0,7	0,3	1	1	0	1	0,7	0,3
	4	1	1,1	-0,1	1	1,3	-0,3	1,2	1,2	0
	5	0,9	0,8	0,1	1,1	0,9	0,2	1,1	0,8	0,3
B	6	0,5	0,5	0	0,5	0,4	0,1	1	1	0
	7	0,9	0,3	0,6	1,4	0,9	0,5	0,9	0,3	0,6
	8	0,7	0,7	0	1,1	1,2	-0,1	1,1	1	0,1
	9	0,9	0,8	0,1	1	1,1	-0,1	1,1	1	0,1
	10	0,9	0,5	0,4	0,7	0,6	0,1	0,8	0,7	0,1
	11	0,7	0,5	0,2	1,1	1,7	-0,6	1	0,7	0,3

Mittels arterieller und koronarvenöser Sauerstoffsättigung wurde der Sauerstoff-Gehalt (O_2 -Gehalt) des Blutes errechnet und die arteriokoronarvenöse Sauerstoffdifferenz ($AVDO_2$) bestimmt. Die $AVDO_2$ blieb während des Stimulationsvorgangs weitgehend konstant. Sie betrug in Ruhe $9,3 \pm 0,4$ mL O_2 /100 mL (art. $14,8 \pm 0,7$ mL O_2 /100 mL, c.v. $5,4$ mL O_2 /100 mL $\pm 0,6$ mL O_2 /100 mL), unter Stimulation $9,3 \pm 0,4$ mL O_2 /100 mL (art. $14,6 \pm 0,7$ mL O_2 /100 mL, c.v. $5,4 \pm 0,4$ mL O_2 /100 mL) und nach Erholung $9,4 \pm 0,7$ mL O_2 /100 mL (art. $14,9 \pm 0,8$ mL O_2 /100 mL, c.v. $5,5 \pm 0,6$ mL O_2 /100 mL). In **Abbildung 11** ist die arteriokoronarvenöse Sauerstoffdifferenz unter Stimulationsbedingungen dargestellt.

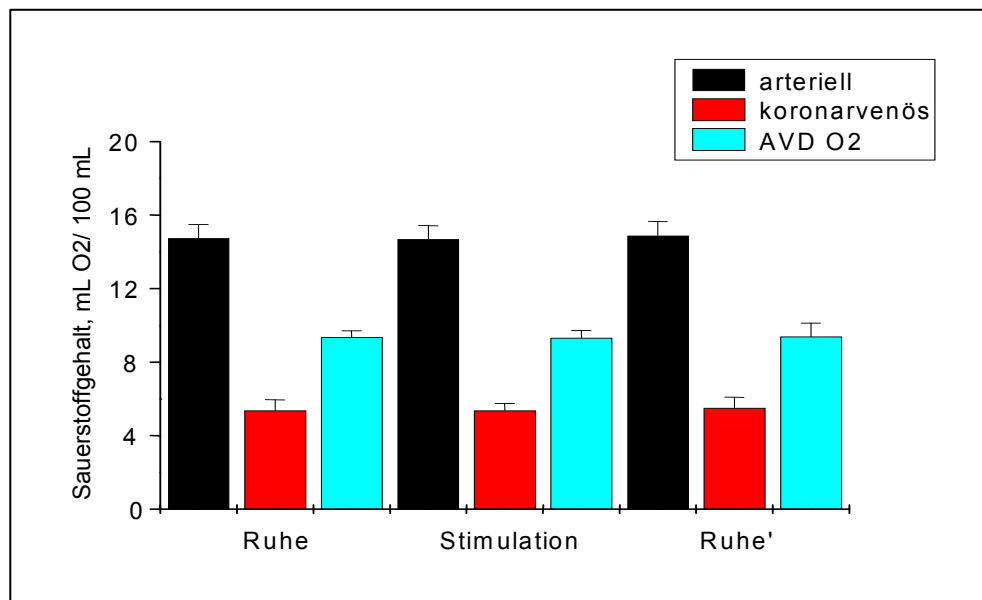


Abbildung 11: Sauerstoffgehalt des Blutes vor, während und nach Stimulation. Die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz ($AVDO_2$, $n=11$) bleibt unter Stimulationsbedingungen weitgehend konstant.

Die Einzelergebnisse der O_2 –Messungen sind in der **Tabelle 5** aufgelistet:

Gruppe EPU		Ruhe			Stimulation			nach Stimulation		
		arteriell [ml / L Blut]	koronar- venös [ml / L Blut]	AVD [ml / L Blut]	arteriell [ml / L Blut]	koronar- venös [ml / L Blut]	AVD [ml / L Blut]	arteriell [ml / L Blut]	koronar- venös [ml / L Blut]	AVD [ml / L Blut]
A	1	170	85	85	171	65	106	176	77	99
	2	140	62	78	142	65	77	142	60	82
	3	146	42	104	136	48	88	146	42	104
	4	113	33	80	112	33	79	112	30	82
	5	148	52	96	149	50	99	148	49	99
B	6	198	89	109	198	77	121	200	58	142
	7	170	65	52	169	63	106	168	68	100
	8	146	40	102	147	54	93	152	53	99
	9	142	46	96	138	51	87	141	40	101
	10	117	43	74	119	41	78	119	33	86
	11	132	33	99	134	44	90	134	95	39

3.2. Ventrikuläre Vulnerabilität

Um die Relation einer tachykardieinduzierten Myokardischämie zur ventrikulären Vulnerabilität differenziert zu analysieren, wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen A und B getrennt untersucht. Dabei wurde je nach Ergebnis der elektrophysiologischen Untersuchung am Herzen (EPU) das Patientenkollektiv in Gruppe A mit normaler oder leicht erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität (n=5) und Gruppe B mit deutlich erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität (n=6) eingeteilt (Kriterien siehe 2.2.3.). Einzelergebnisse der EPU mit jeweils Endpunkt der Untersuchung und eine sich daraus ergebene Defibrillationspflicht, sowie eine Übersicht der Adenosin- und Laktat-Einzelbestimmungen zeigt **Tabelle 5**:

PU-Nr.	Gruppe	Ventrikuläre Vulnerabilität	Endpunkt	Defibrillation
1	A	Normal; in RVA und RVO bis 330 S3 bzw. 500 S4	Kein Abbruch	Keine
2	A	Normal; in RVA und RVO bis 500 S4	Kein Abbruch	Keine
3	A	Leicht erhöht; in RVO bei 430 S3 160 Kammerflattern, durch Defibrillation terminiert, in RVA bis 500 S4 keine VT-Induktion	Synkope, Kammerflattern	Ja
4	A	Leicht erhöht; in RVO bei 330 S3 170 Kammerflattern, durch Defibrillation terminiert, in RVA bis 500 S4 höchstens 13 ventrikuläre Extrasystolen auslösbar	Kammerflattern	Ja
5	A	Normal; in RVA und RVO bis 500 S4	Keine	Nein
6	B	Erhöht; in RVA bei 500 S3 230 Auslösung einer ventrikulären Tachykardie (VT), durch Overdrive terminierbar	Anhaltende VT	Defibrillationspflicht bei Anlage des Katheters, da Kammerflattern
7	B	Erhöht; in RVA bei 500 S3 200 hochfrequente VT (230-250 ms), durch Defibrillation terminiert	Hochfrequente, anhaltende VT	Ja
8	B	Erhöht; in RVA bei 430 S3 VT (330 ms), nach Überstimulation Akzeleration in Kammerflimmern, terminiert durch Defibrillation	Anhaltende VT	Ja
9	B	Erhöht; in RVA bei 330 S3 170 Kammerflimmern, bei 500 S4 190 Kammerflattern, beide durch Defibrillation terminiert	Kammerflimmern	Ja
10	B	Erhöht; in RVA bei SR S2 320 anhaltende VT, Akzeleration mittels Overdrive und Terminierung durch Defibrillation	Anhaltende VT	Ja
11	B	Erhöht; in RVA bei 430 S3 220 Kammerflimmern, durch Defibrillation terminiert	Kammerflimmern	Ja

3.2.1. Adenosin-Konzentration in Relation zur ventrikulären Vulnerabilität

In Gruppe A war die arteriokoronarvenöse Adenosin-Differenz (AVD ADO) sowohl in Ruhe als auch unter Stimulation als Zeichen einer myokardialen Adenosin-Netto-Produktion negativ. Sie betrug in Ruhe $-27,6 \pm 15,7$ nmol/L (arteriell $72,9 \pm 39,1$ nmol/L, koronarvenös $100,4 \pm 41,0$ nmol/L) und änderte sich unter Stimulation nicht signifikant auf $-17,6 \pm 5,0$ nmol/L (art. $44,4 \pm 17,1$ nmol/L, c.v. $62 \pm 18,7$ nmol/L). Nach zehnminütiger Stimulationspause betrug diese $-36,3 \pm 15$ nmol/L (art. $32,4 \pm 9$ nmol/L, c.v. $68,7 \pm 22,1$ nmol/L) ohne einen signifikanten Anstieg. In **Abbildung 12a** ist die arteriokoronarvenöse Adenosin-Differenz in Gruppe A dargestellt.

In Gruppe B zeigte sich als Zeichen der akuten Ischämie ein signifikanter Anstieg der myokardialen Adenosin-Produktion. Es erfolgte ein signifikanter Umschlag von Adenosin-Extraktion in Ruhe zu einer Adenosin-Produktion unter Stimulation. In Ruhe betrug die arteriokoronarvenöse Differenz $15,1 \pm 19,1$ nmol/L (art. $80,7 \pm 29,2$ nmol/L, c.v. $65,6 \pm 12,4$ nmol/L), und unter Stimulation war sie signifikant auf $-32,5 \pm 24,4$ nmol/L (art. $59,9 \pm 17$ nmol/L, c.v. $102,3 \pm 25,3$ nmol/L; $p < 0,05$) abgefallen. Die Differenz lag nach zehnminütiger Erholungspause bei $0,4 \pm 17,5$ nmol/L (art. $50,0 \pm$ nmol/L, c.v. $56,2 \pm 11,7$ nmol/L; $p < 0,05$). **Abbildung 12 b** zeigt die arteriokoronarvenöse Differenz der Adenosin-Konzentration in Gruppe B.

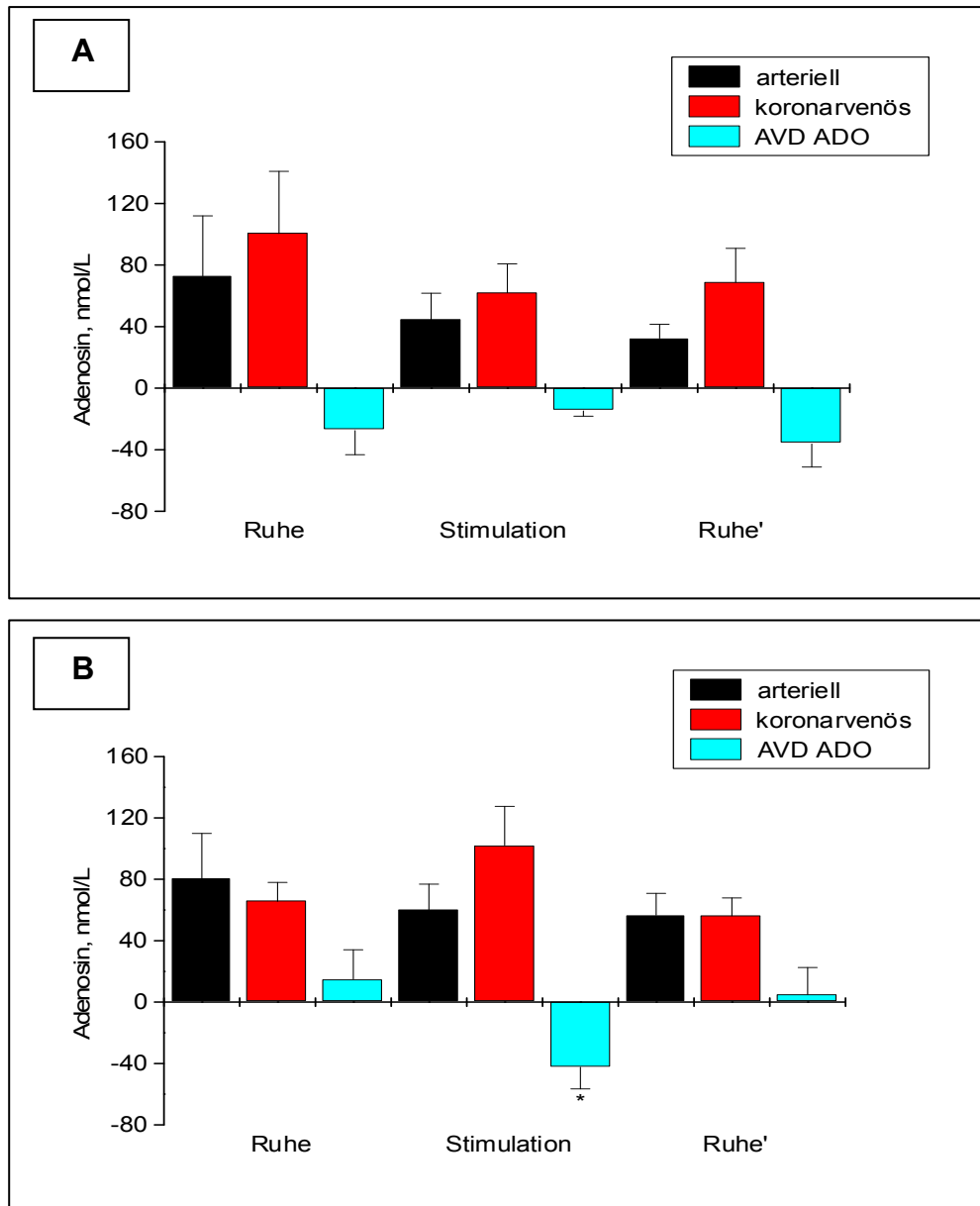


Abbildung 12 a und b: Adenosin-Konzentrationen vor, während und nach Schrittmacherstimulation in Gruppe A und B. Die arteriokoronarvenöse Differenz (AVD ADO, n=5) in der Gruppe A mit normaler bis leicht erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität ist sowohl in Ruhe als auch unter Stimulation negativ und ändert sich nicht signifikant. In der Gruppe B mit deutlich erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität erfolgt eine Umkehr von Adenosin-Extraktion unter Ruhebedingungen zu myokardialer Adenosin-Produktion unter Stimulation (* $p < 0,05$ vs. Ruhe und Ruhe'=10 Minuten nach Stimulation).

3.2.2. Laktat-Konzentration in Relation zur ventrikulären Vulnerabilität

Vergleichend zu den Adenosin-Bestimmungen wurden die arteriokoronarvenösen Differenzen der Laktat-Konzentrationen in den Gruppen A und B ermittelt. In Gruppe A mit normaler bis leicht erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität zeigte sich eine Abnahme der myokardialen Laktat-Extraktion unter Stimulation. Die arteriokoronarvenöse Laktat-Differenz ergab in Ruhe $0,14 \pm 0,10$ mmol/L (art. $0,92 \pm 0,07$ mmol/L, c.v. $0,76 \pm 0,10$ mmol/L) und fiel unter Stimulationsbedingungen auf $0,04 \pm 0,1$ mmol/L (art. $0,92 \pm 0,07$ mmol/L, c.v. $0,88 \pm 0,14$ mmol/L) ab. Nach zehnminütiger Erholung stieg sie auf $0,19 \pm 0,10$ mmol/L (art. $0,96 \pm 0,12$ mmol/L, c.v. $0,84 \pm 0,10$ mmol/L) an. Die arteriokoronarvenöse Laktat-Differenz in Gruppe A ist in **Abbildung 13 a** dargestellt. In Gruppe B mit deutlich erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität zeigte sich als Zeichen der akuten Ischämie eine signifikante Laktat-Umkehr von Laktat-Extraktion in Ruhe zu myokardialer Laktat-Produktion unter Stimulationsbedingungen. Die arteriovenöse Differenz lag in Ruhe bei $0,21 \pm 0,1$ mmol/L (art. $0,78 \pm 0,1$ mmol/L, c.v. $0,58 \pm 0,08$ mmol/L) und betrug unter Stimulation $-0,02 \pm 0,15$ mmol/L (art. $1,0 \pm 0,12$ mmol/L, c.v. $1,02 \pm 0,17$ mmol/L). In der nachfolgenden Ruhephase stieg die arteriovenöse Differenz mit $0,21 \pm 0,09$ mmol/L (art. $1,02 \pm 0,03$, c.v. $0,78 \pm 0,11$ mmol/L) wieder auf den Ruhe-Basiswert an. **Abbildung 13 b** zeigt die arteriovenöse Laktat-Differenz unter Stimulation in Gruppe B.

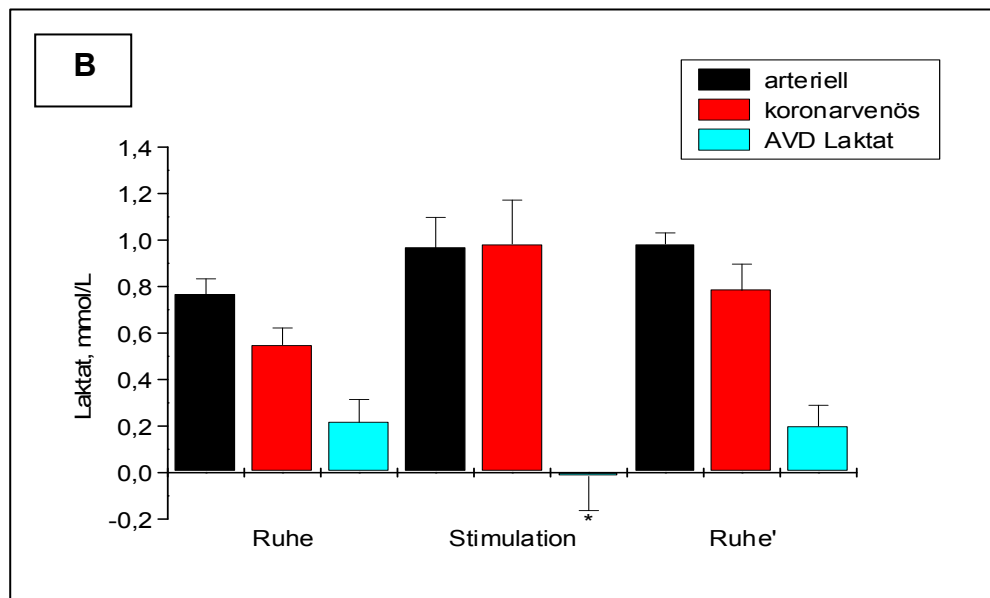
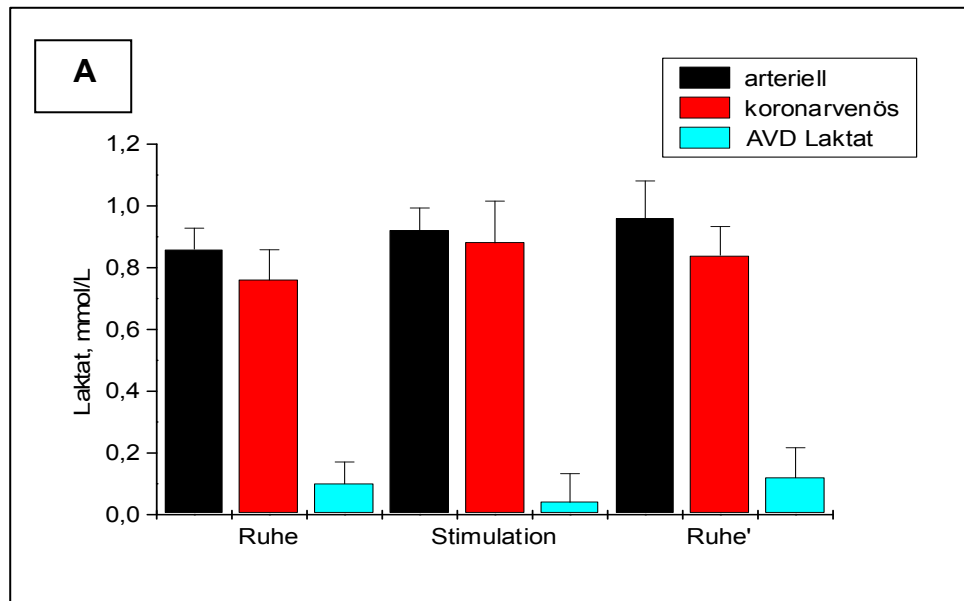


Abbildung 13 a und b: Laktat-Konzentration vor, während und nach Schrittmacherstimulation in Gruppe A und B. Die arteriokoronarvenöse Differenz der Laktat-Konzentration (AVD Laktat, n=5) zeigt in Gruppe A mit normaler bis leicht erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität keine signifikanten Änderungen in Ruhe und unter Stimulation. Als Zeichen der myokardialen Ischämie zeigt sich in Gruppe B (n=6) mit deutlich erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität eine signifikante Laktat-Umkehr unter Stimulation (* $p < 0,05$ vs. Ruhe und Ruhe' = nach zehn Minuten Stimulationspause). Es erfolgt ein Umschlag von Laktat-Extraktion unter Ruhebedingungen zu Laktat-Produktion unter Stimulation.

3.2.3 Sauerstoffgehalt im Blut in Relation zur ventrikulären Vulnerabilität

Der Sauerstoffgehalt der arteriellen und koronarvenösen Vollblutproben wurde anhand der Sauerstoffsättigung des Hämoglobingehaltes (Hb in mg/ dL) ermittelt. In der Gruppe A und in der Gruppe B fanden keine signifikanten Änderungen des O₂-Gehalts während Stimulation und in der Erholungsphase statt (**Abbildung 14 a und b**). Der arterielle Wert betrug in der Gruppe A: $143,4 \pm 9,14$ ml/L Blut in Ruhe, $142 \pm 9,56$ ml/L Blut während Stimulation und $146,8 \pm 8,64$ ml/ L Blut nach der Erholungsphase.

Die koronarvenösen O₂-Werte verhielten sich analog zu den arteriellen Konzentrationen. Der O₂-Gehalt fiel von $54,8 \pm 8,97$ ml/ L in Ruhe auf $52,2 \pm 6,0$ ml/ L während Stimulation und nach zehn Minuten Pause auf $51,6 \pm 8,0$ ml/ L Blut. Die arteriokoronarvenösen Differenz AVDO₂ zeigte als Zeichen des akuten myokardialen Sauerstoffverbrauches keinen signifikanten Unterschied unter Stimulation. Sie betrug $88,6 \pm 4,96$ ml/ L Blut, unter Stimulation $89,8 \pm 5,61$ ml/ L und in der Erholungsphase $93,2 \pm 4,66$ ml/ L Blut.

In Gruppe B ergab der arterielle O₂-Gehalt sowohl vor als auch während Stimulation $150,8 \pm 11,82$ ml/ L Blut (bzw. 11,6) und lag in der Erholungsphase bei $152,3 \pm 11,7$ ml/ L. Der koronarvenöse O₂-Gehalt betrug in Ruhe $52,7 \pm 8,5$ ml/ L Blut, unter Stimulation $55 \pm 5,42$ ml/ L und lag nach der Stimulationspause bei $57,8 \pm 9,02$ ml/ L. Im Gegensatz zu Gruppe A kam es in Gruppe B zu einem tendentiellen Anstieg der AVDO₂ von $82,5 \pm 9,85$ ml/ L Blut in Ruhe auf $95,8 \pm 6,30$ ml/ L Blut (nicht signifikant) unter Stimulation. In der Erholungsphase blieb die AVDO₂ mit $94,5 \pm 13,54$ ml/ L Blut weiterhin erhöht.

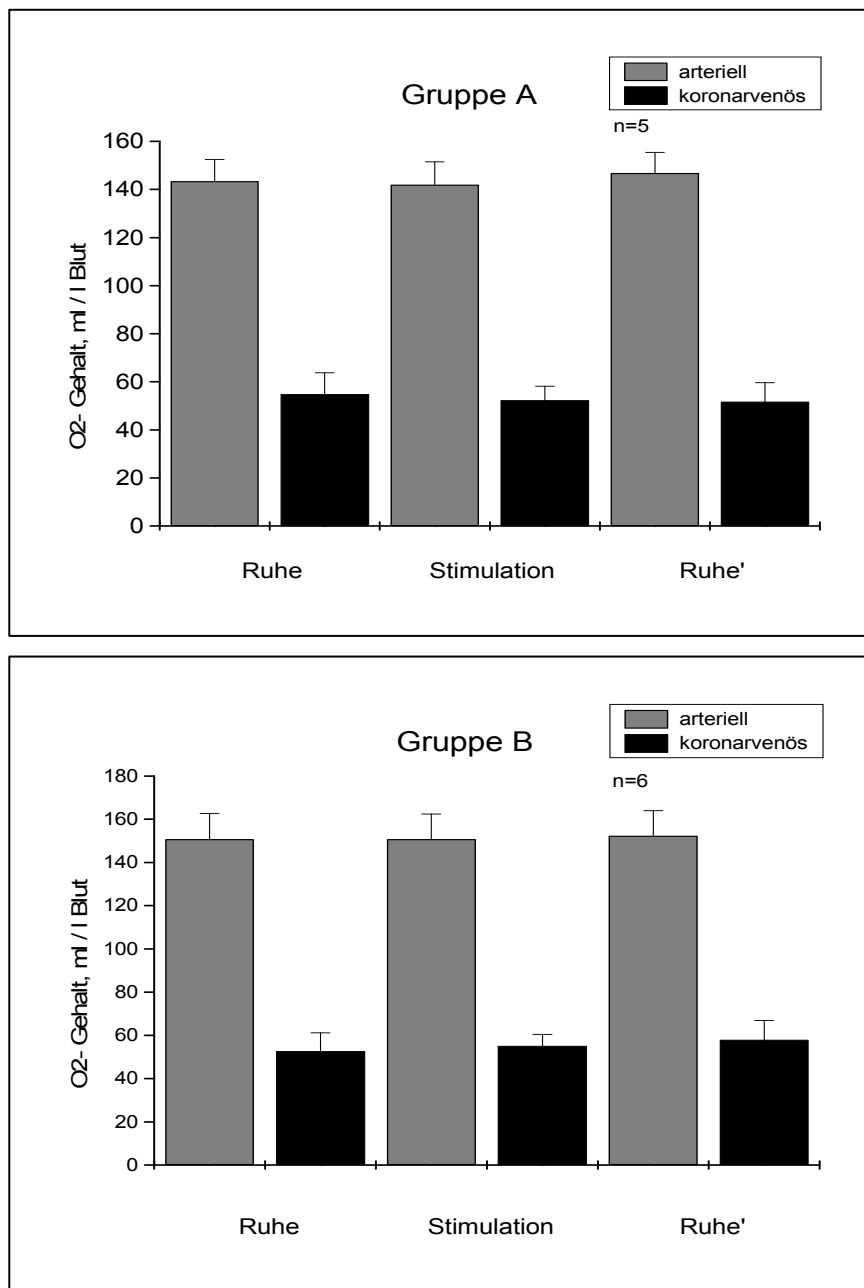


Abbildung 14 a und b: O₂-Gehalt vor, während und nach Schrittmacherstimulation in Gruppe A und B. Die arteriokoronarvenöse Sauerstoffdifferenz zeigt weder in Gruppe A mit normaler bis erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität noch in Gruppe B mit deutlich erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität signifikante Änderungen. Tendenziell kommt es in der Gruppe B zu einem Anstieg der AVDO₂ unter Stimulation, welche in der Erholungsphase erhöht bleibt (nicht signifikant).

3.3. Klinische Untersuchungen

3.3.1. Ejektionsfraktion als Maß für die linksventrikuläre Pumpfunktion

Im Rahmen klinischer Routine – Untersuchungen war bei allen der in der Studie teilnehmenden Patienten die Ejektionsfraktion (EF) als Maß für die linksventrikuläre Pumpfunktion angiographisch bestimmt worden ($EF\% = [(Linksventrikuläres\ enddiastolisches\ Volumen - Linksventrikuläres\ endsystolisches\ Volumen) / LVEDV] \times 100$). Bei der Betrachtung der Mittelwerte in den Gruppen A und B ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Ejektionsfraktion (EF). In Gruppe A betrug die EF $50 \pm 5\%$ und in Gruppe B $48 \pm 4\%$. In der **Abbildung 14** sind die Ejektionsfraktionen beider Gruppen gegenübergestellt:

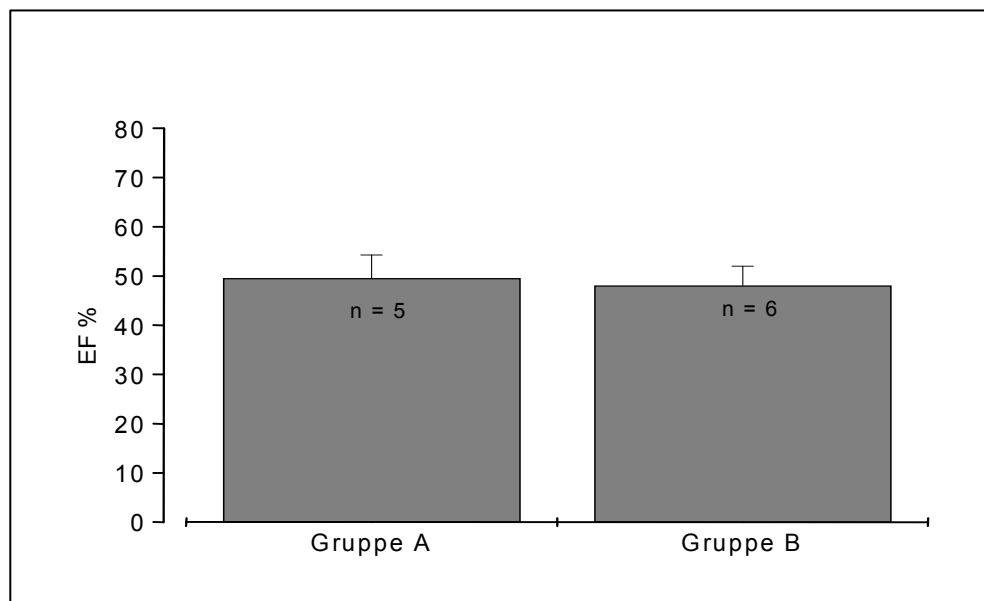


Abbildung 14: Ejektionsfraktion als Maß für die linksventrikuläre Pumpfunktion. Beim Vergleich der Mittelwerte der Ejektionsfraktionen (EF) in Gruppe A und B zeigte sich kein signifikanter Unterschied

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine klinisch anwendbare Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität zur Quantifizierung von Adenosin im menschlichen Plasma zu etablieren und diese im Rahmen einer klinischen Pilotstudie bei Patienten mit schwerer koronarer Herzerkrankung anzuwenden. Hierzu wurde die Wertigkeit von Adenosin als Marker einer akuten myokardialen Ischämie wie der von Laktat verglichen. Des Weiteren wurde die Relation der myokardialen Adenosin-Konzentration zur Arrhythmieauslösbarkeit am ischämischen Herzen während elektrophysiologischer Untersuchung geprüft.

Es ist in dieser Studie gelungen, in einem mehrschichtigen Ansatz diese Ziele zu erreichen. Im wässrigen Milieu erlaubt die HPLC als sensitive Methode eine parallele Messung von Adenosin und seiner Metaboliten in nanomolaren Konzentrationen. Doch im menschlichen Plasma ist aufgrund eiweisshaltiger Bestandteile die Identifizierung von Adenosin durch eine einfache chromatographische Trennung nicht möglich. Mit Hilfe der von Schrader entwickelten Peakshiftmethode ist es dennoch möglich, Adenosin nach enzymatischer Umwandlung zu Inosin als solche zu identifizieren und quantitativ zu bestimmen. Es ist uns gelungen durch kombinierte Anwendung beider Methoden und Modifizierung der Analyseschritte, Adenosin ausreichend sensitiv zu messen.

Die Eignung der Methode zur klinischen Anwendbarkeit wurde im Rahmen einer klinischen Pilotstudie zur tachykardieinduzierten Myokardischämie bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und malignen ventrikulären Tachykardien getestet. Ein temporärer, frequenzinduzierter Anstieg des myokardialen Sauerstoffverbrauchs bei einem limitierten koronaren Sauerstoffangebot kann eine akute Ischämie verursachen.

Eine Laktat-Umkehr, d.h. der Umschlag von myokardialer Laktat-Extraktion zur Laktat-Produktion gilt als Index für eine akute Ischämie. In der klinischen Diagnostik sind bereits standardisierte, einfache Messverfahren zur Laktat-Bestimmung etabliert. Ziel war es die Wertigkeit von Adenosin als Marker einer myokardialen Ischämie im Vergleich zu Laktat zu untersuchen. Es konnte im Rahmen elektrophysiologischer Untersuchungen am Herzen bewiesen werden, dass zur Ischämiediagnostik eine Adenosin-Bestimmung im Koronarsinus trotz seiner kurzen Halbwertszeit möglich, und im Vergleich zu Laktat ebenso klinisch anwendbar ist. Darüber hinaus zeigte die Pilotstudie, dass mit Hilfe von Adenosin als Ischämieindikator klinisch und differenzialdiagnostische Aussagen getroffen werden können. Im Rahmen der elektrophysiologischen Untersuchungen konnte ein signifikanter Anstieg der Adenosin-Netto-Produktion als Zeichen einer akuten Myokardischämie bei den Patienten mit deutlich erhöhter Vulnerabilität und Auslösbarkeit anhaltender ventrikulärer Tachykardien nachgewiesen werden. Dies spricht für die kausale Bedeutung einer myokardialen Ischämie für die Induktion einer ventrikulären Tachyarrhythmie – zumindest bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

4.1. Methodenvergleich zur Bestimmung von Adenosin im menschlichen Blut

4.1.1. Adenosin-Metabolismus – Entwicklung einer Stopplösung

Adenosin, ein ubiquitär vorkommendes Nukleosid wird nach Hydrolyse durch die 5'-Nukleosidase zu Adenosin-5'-Phosphat (AMP) umgewandelt ⁵¹. Durch die Adenosin-Desaminase, welche sowohl intra- als auch extrazellulär vorhanden ist, wird Adenosin zu Inosin verstoffwechselt ^{53,54}. Durch den rapiden Abbau von Adenosin zu Inosin und die Wiederaufnahme in Erythrozyten weist Adenosin eine extrem kurze Halbwertszeit von weniger als zehn Sekunden im Blut auf ⁷⁸. Somit ist die quantitative Bestimmung von Adenosin im Blut zeitlich limitiert und einer Analyse schwer zugänglich. Im Rahmen vergangener Studien wurden sogenannte „Stopp-Lösungen“ entwickelt ^{62,87-90}, um den Adenosin-Stoffwechsel zu hemmen. Capogrossi et al ⁸⁸ hatten bei Gesunden nur in den Plasmaproben Adenosin messen können, denen sofort nach der Blutentnahme 2'-Desoxycoformycin (DCF) - ein Inhibitor der Adenosin-Desaminase - hinzugefügt worden war. Die Plasmakonzentration betrug hier 0,07 - 1 µmol/L. In anderen Studien wurde neben EHNA (erythro-9(2-Hydroxy-3-Nonyl)-Adenin) oder MnCl₂ – ebenfalls Inhibitoren der Adenosin-Desaminase – zusätzlich Dipyridamol der Stopp-Lösung beigefügt ^{49,60}, um die Wiederaufnahme von Adenosin in die Zelle zu verhindern. Dabei wurden höhere Plasma-Konzentrationen gemessen. Diese betrugen 0,22 – 0,67 µmol/L, wobei Adenosin im Koronarsinus von Patienten mit ischämischer Herzerkrankung gemessen wurde. Für die Gewinnung von Blut aus dem Koronarsinus sind lange Katheter notwendig. Ontyd und Schrader ⁶² führten die „double-syringe“- Katheter-Technik ein, um das entnommene Blut aus dem Koronarsinus direkt nach Durchtritt aus

dem Katheter in die Stopp-Lösung aufzufangen. Der Abbau von Adenosin im Katheterlumen konnte jedoch nicht verhindert werden. Feldman et al ⁹¹ entwickelten einen „double-lumen metabolic“-Katheter, bei der das Blut direkt an der Spitze des Katheters mit der Stopp-Lösung vermischt werden konnte. Sie hatten trotz der verbesserten Entnahmetechnik geringere Adenosin-Konzentrationen gemessen als in vergleichbaren Studien, die keinen 5'-Nukleosidase-Inhibitor verwendet hatten. Diese hatten die sogenannte artefaktbedingte Adenosin-Produktion ⁹⁴ aus Adenin-Nukleotiden, die bei der Plättchen-Aggregation freigesetzt werden, mit berücksichtigt und neben Dipyridamol und EHNA zusätzlich einen 5'-Nukleotidase-Inhibitor (AOPCP) und EDTA verwendet ^{89,90}. Die im Koronarsinus gemessene Adenosin-Konzentration betrug in dieser Studie im Durchschnitt 0,132 µmol/L. Sovelli et al ⁸⁹ hatten Indomethacin eingesetzt, um während der Zentrifugation die Freisetzung von Adenin-Nukleotiden aus den Plättchen zu verhindern. Die koronarvenöse Adenosin-Konzentration bei Patienten mit ischämischer Herzerkrankung und instabiler Angina pectoris ergab hier durchschnittlich 0,22 µmol/L.

Im Rahmen unserer Pilotstudie verwendeten wir eine Stopplösung mit den Bestandteilen EHNA, Dipyridamol und Heparin. Schrader hatte in Vorversuchen (im eigenen Labor) bei dieser Zusammensetzung der Stopplösung eine Wiederfindungsrate von ca. 50% nach externer Zugabe definierter Adenosinmengen zu Blutproben nachgewiesen. Auf den Einsatz eines 5'-Nukleotidase-Inhibitors wurde in dieser Studie verzichtet, zumal Versuche diesbezüglich keinen signifikanten Vorteil erbrachten. Für die Blutentnahme aus dem Koronarsinus wurden sogenannte weiterentwickelte Hämodynamik-Katheter (Cordis, Johnson & Johnson) eingesetzt. Diese weisen mehrere Seitenlöcher auf, und können weniger aufwendig in den Koronarsinus platziert werden. Anders als beim „double lumen“-Katheter wird das Blut erst nach Durchtritt durch den langen Katheter in die Stopplösung aufgefangen.

Unter dem Aspekt der einfacheren Handhabung und der Verringerung des Infektionsrisikos im Vergleich zur „double lumen“-Technik wurde ein weiterer Verlust an Adenosin in Kauf genommen.

4.1.2. Etablierung einer sensitiven Messmethode

Zur Quantifizierung von Adenosin wurden verschiedene Messmethoden entwickelt, um entweder Adenosin direkt oder indirekt über seine Metabolite (Inosin, Hypoxanthin u.a.) im Blut zu bestimmen. Neben spektrophotometrischen^{93,95} und fluorimetrischen^{10,97} Methoden kamen auch radioimmunologische Messmethoden^{68,79} zum Einsatz. Zum Beispiel hatten Gardiner et al⁹⁷ eine fluorimetrische Methode entwickelt, bei der Adenosin und Inosin zunächst zu Hypoxanthin enzymatisch abgebaut wurden. Nach Zugabe von Xanthin-Oxidase war deren Konzentration anhand des anfallenden Hydrogenperoxids indirekt bestimmt worden. Schrader et al verwendeten einen Radioimmunoassay (RIA), wobei spezifische Antikörper gegen ein Adenosin enthaltendes Antigen eingesetzt wurden. Einige wenige Methoden mittels HPLC-(Hochdruck-Flüssigkeit-Chromatographie) Technik für die Analyse von Adenosin werden seit Ende 1970 beschrieben. Pfadenauer und Tong⁸² isolierten das Plasma-Adenosin in einem Gel, welches den Ribosidanteil des Adenosins bindet. Das Eluat analysierten sie dann mittels HPLC in einer „reversed-phase“-Säule mit Phosphatpuffer (pH 3,5) als mobile Phase. Die freie Adenosin-Konzentration, gemessen an sechs gesunden Probanden betrug durchschnittlich 62 µg/ L.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der Adenosin-Konzentration im Plasma sind nicht zuletzt auf den schnellen Metabolismus von Purinen im Blut zurückzuführen. Neben der Optimierung der Entnahmetechnik und dem Versuch, den vorzeitige Abbau von Adenosin möglichst zu verringern wurden verschiedene Filtrationstechniken etabliert, um Adenosin und seine Metabolite vor

der analytischen Trennung mittels HPLC zunächst zu isolieren. Trotz der Ultrafiltration können andere im Plasma enthaltene Substanzen mit Adenosin eluiert werden, die die direkte Analyse von Adenosin mittels HPLC erschweren. Ontyd und Schrader⁶² entwickelten daher die „Peak-shift“-Methode zur indirekten Bestimmung von Adenosin im menschlichen Plasma. Bei dieser Methode wird das Adenosin in einem ersten Chromatographieschritt zunächst gesammelt. Die gesammelte Adenosin-Fraktion wird dann durch Adenosin-Desaminase in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 : 1 in Inosin umgewandelt. In einem zweiten Chromatographieschritt wird dann die Inosin-Konzentration bestimmt, und der ursprünglichen Adenosin-Plasmakonzentration gleichgesetzt.

4.2. HPLC

Aufgrund der methodischen Schwierigkeiten zur Bestimmung von Adenosin im menschlichen Plasma mittels HPLC und nicht zuletzt aufgrund geringer Sensitivität der anderen oben genannten Methoden hat sich Adenosin in der klinischen Routine-Diagnostik einer akuten Myokardischämie bislang nicht durchgesetzt. In Einzelpublikationen wurde die Analyse von Adenosin mittels Radioimmunoassay als eine ausreichend sensitive und spezifische Methode dargestellt. Sie ist jedoch aufwendig und an bestimmte Zentren gebunden.

Um die Anwendbarkeit in der klinischen Forschung zu gewährleisten, wurde daher in dieser Studie versucht, einen Kompromiss zwischen hoher Sensitivität, geringem Aufwand bei der Entnahmetechnik und kurzer Analysedauer mittels HPLC zu finden. Mittels Stopp-Lösung (Ontyd und Schrader) und sofortiger Zentrifugation und Deproteinisierung durch Perchlorsäure sollte der Abbau zu Inosin und die Produktion von Adenosin aus Adenin-Nukleotiden durch die

5'-Nukleosidase weitgehend verhindert werden. Es wurde durch Ultrafiltration mit einer C¹⁸-Sep-Pak-reversed-phase-Säule und Methanol das Adenosin aus dem Plasma isoliert und anschließend vaporisiert. Bei dieser Aufarbeitung war mit einem weiteren Verlust an Adenosin von ca. 10% zu rechnen. Trotz der Ultrafiltration vor der Analyse mittels HPLC konnte keine vollständige Isolierung des Adenosin von anderen Substanzen erreicht werden, so dass eine zweifache Trennung der Probe durch die HPLC-Säule notwendig wurde. Im ersten Chromatographieschritt war eine Quantifizierung des Adenosin nicht möglich, da Störsubstanzen den Adenosin-Peak überlagerten. Hierbei wurde die Adenosin-Fraktion mit den gleichzeitig die Säule verlassenden Substanzen zunächst gesammelt. Dadurch, dass Inosin zu einer früheren Retentionszeit als Adenosin die Säule verlässt, befand sich das zuvor im Plasma vorhandene Inosin nicht in dieser Fraktion. Die Adenosin-Fraktion wurde mittels Peak-shift-Methode mit Adenosin-Desaminase enzymatisch zersetzt, und theoretisch alles Adenosin in Inosin umgewandelt. Der Kontrolle dienten externe Standardlösungen, die ebenfalls die zuvor genannten Analyseschritten durchliefen. Im zweiten Chromatographieschritt konnte das zu Inosin umgewandelte Adenosin von den in der Fraktion enthaltenen Substanzen deutlich getrennt und quantifiziert werden. Die Wiederfindungsrate (Recovery) für Adenosin nach Peak-shift betrug durchschnittlich 49%. Anhand der externen Standards sah man in einigen Fällen, dass nicht alles Adenosin zu Inosin umgewandelt worden war. In anderen Fällen war die Abnutzung der Säule nach der Analyse mehrerer Plasmaproben für den Verlust an Adenosin verantwortlich zu machen. Dies zeigte sich an Peakdeformitäten der mitanalysierten Standards. So wurde die Säule nach jeder 40. – 50. Plasma-Probe erneuert. Rasch ansteigende Gradienten bis 95% mit 70%igem Methanol gegenüber 5% Ammoniumazetat am Ende jeder analysierten Probe dienten der Säuberung der Säule von noch haftenden Störsubstanzen. In diesem System betrug die gerade noch messbare Adenosin-Konzentration

3,3 nmol/L. Somit ist der Aufwand zur Analyse von Adenosin im menschlichen Koronarsinus zur Beurteilung einer myokardialen Ischämie mittels HPLC mit einem insgesamt guten Ergebniss (Recovery von 49%) vertretbar und klinisch anwendbar.

4.3. Myokardischämie

4.3.1. Laktat als Marker einer akuten Myokardischämie

In klinischen Studien wurde bislang die myokardiale Freisetzung von Laktat als Marker für die quantitative Beurteilung einer starken Myokardischämie herangezogen. Sie zeigt die anaerobe Stoffwechsellage des Myokards bei negativer Sauerstoffbilanz (Sauerstoffangebot < Sauerstoffverbrauch) an. In einigen wenigen Studien konnte auch der Zusammenhang zwischen einer myokardialen Laktat-Produktion und der Auslösung einer ischämisch getriggerten ventrikulären Arrhythmie während programmierter Schrittmacherstimulation bei Patienten mit schwerer koronarer Herzerkrankung eruiert werden⁹⁹⁻¹⁰².

In der vorliegenden Studie wurden 11 Patienten mit einer schweren koronaren Herzerkrankung und stattgehabtem spontanen Ereignis einer malignen ventrikulären Tachykardie (VT/VF) einer Laktat-EPU (elektrophysiologische Untersuchung mit arteriokoronarvenöser Laktatmessung) mit vergleichbarem Protokoll und vergleichbarer Methodik unterzogen. Ein Umschlag von myokardialer Laktat-Extraktion zu einer Laktat-Produktion (Laktat-positiv bzw. Laktatumkehr) wurde als Zeichen einer akuten Myokardischämie

gedeutet. Ohne Berücksichtigung der Auslösbarkeit kam es während der Stimulation bei der Betrachtung des Gesamtkollektivs (n=11) zu einer Abnahme der Laktat-Extraktion (von 0,16 mmol/L auf 0,01 mmol/L). Die arteriokoronarvenöse Sauerstoffdifferenz blieb unter Stimulationsbedingungen weitgehend konstant (9,3 ml O₂/100 mL in Ruhe und unter Stimulation). Im Einzelnen wiesen vier der Untersuchten – alle mit deutlich erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität eine Laktat-Umkehr auf, ohne signifikante Änderungen der arteriokoronarvenösen Sauerstoffdifferenz. Aufgrund fehlender Bestimmung des koronaren Blutflusses kann anhand des arteriovenösen Sauerstoffgehaltes allein kein Rückschluss auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch gezogen werden.

4.3.2. Adenosin als Ischämiemarker im Vergleich zu Laktat

Untersuchungen zur Bedeutung des Adenosins als klinischer Marker für eine akute Myokardischämie bei Menschen waren bislang unterschiedlich. Nur bei systemischer Applikation von Dipyridamol vor dem Stimulationsvorgang konnten Fox et al ^{103,104} einen Anstieg der koronarvenösen Adenosin-Konzentration mittels RIA messen.

In der eigenen Studie konnte mittels HPLC eine myokardiale Adenosin-Produktion unter Stimulation ohne die systemische Anwendung von Dipyridamol nachgewiesen werden.

Ungeachtet der Arrhythmieauslösbarkeit stieg in unserer Studie bei der Betrachtung des Gesamtkollektivs die Netto-Adenosin-Produktion von 4,3 nmol/L auf 31,1 nmol/L (Faktor 7,2) tendentiell an (statistisch nicht signifikant).

Im Einzelnen kam es bei acht der Patienten zu einem Anstieg der Adenosin-Produktion um den Faktor 7,8. Bei den anderen drei jedoch wurde eine Zunahme der Adenosin-Extraktion um den Faktor 2,9

beobachtet. Vier der acht „Adenosin-positiven“ wiesen gleichzeitig eine Laktat-Umkehr auf (bzw. alle „Laktat-positiven“ waren auch „Adenosin-positiv“). Alle „Adenosin-negativen“ zeigten ebenso wenig eine Laktat-Umkehr. Anhand der unten angeführten Vierfeldertafel sind die Zusammenhänge veranschaulicht:

Laktat-Umkehr		Adenosin-Anstieg	
		+	-
	+	4	0
	-	4	3

Im Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich bei der Betrachtung des Gesamtkollektivs zusammenfassen, dass Adenosin im Vergleich zu Laktat als Marker für eine akute myokardiale Ischämie nicht besser geeignet ist (Änderungen der Konzentrationen bei beiden nicht signifikant).

4.4. Ventrikuläre Vulnerabilität

4.4.1. Zusammenhang mit Laktat

Um den Zusammenhang zwischen Myokardischämie und Auslösbarkeit einer ventrikulären Tachyarrhythmie zu untersuchen, wurde in einigen Studien die arteriokoronarvenöse Laktatdifferenz während programmierter Ventrikelstimulation bei Patienten mit hochgradiger koronarer Herzerkrankung und anamnestisch stattgehabten spontan anhaltenden und nicht anhaltenden VT/VF-Ereignissen simultan gemessen ⁹⁹⁻¹⁰². Vor der Auslösung einer anhaltenden VT während programmierter Stimulation war es bei den Patienten zu einer pathologischen Laktatproduktion (Laktat-positiv) des Myokards gekommen, die einen ausgeprägten Koronargefäßbefall im Hinblick auf Anzahl und Graduierung der Stenosen hatten. Diese wiesen zu dem noch ein signifikant höheres Maß szintigraphisch erfassbarer, belastungsinduzierter Myokardischämien auf. Im Ruhe-Myokardszintigramm unterschied sich die globale linksventrikuläre Pumpfunktion bei Laktat-positiven jedoch nicht signifikant von den Laktat-negativen Patienten, die aber mehr dyskinetische Myokardareale (Narbe, Aneurysma) aufwiesen. In zwei vergleichbaren Studien von Morady ¹⁰² und Vester ⁹⁹ betrug der Anteil Laktat-positiver Patienten vor der Auslösung einer VT/VF 53% bzw. 60%. Die Auslösbarkeit einer ventrikulären Tachyarrhythmie war nach Beseitigung der Myokardischämie durch operative (ACVB-Operation) oder interventionelle Revaskularisation (PTCA, perkutane transluminale koronare Angioplastie) elektrophysiologisch nachuntersucht worden. Anders als Morady ¹⁰² hatte Vester ⁹⁹ auch postinterventionell die arteriokoronarvenöse Laktat-Differenz des gesamten Patientenkollektivs simultan gemessen, um die prädiktive Bedeutung des spezifischen myokardialen Laktatmetabolismus eines Patienten für die

Induzierbarkeit von VT/VF nach Myokard-Revaskularisation zu beurteilen. Die Sensitivität eines Laktat-positiven Ergebnisses für die Nichtauslösbarkeit nach Revaskularisation betrug 89%, die Spezifität 75% und der positiv prädiktive Wert 94%. Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass bei 50% der Patienten mit VT/VF auf dem Boden einer schweren ischämischen Herzerkrankung die Myokardischämie einen bedeutsamen Kofaktor für die Triggerung der Tachyarrhythmie darstellt.

In der eigenen Studie war bei fünf von elf Patienten eine anhaltende VT nur schwer (Gruppe A, normale bis leicht erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität), bei sechs jedoch leicht auslösbar (Gruppe B deutlich erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität). In Gruppe A war ein Patient Laktat-positiv, d.h. hier war eine myokardiale Laktatproduktion als Zeichen einer akuten Myokardischämie während programmierter Ventrikelstimulation erfolgt. Ein anderer zeigte erst nach der Stimulationspause eine deutliche Laktatumkehr (-0,2 mmol/L). Insgesamt jedoch zeigte sich in Gruppe A eine Zunahme der myokardialen Laktat-Extraktion (von 0,04 auf 0,14 mmol/L). In Gruppe B mit leicht auslösbarer VT waren drei von sechs Patienten als Zeichen einer akuten Myokardischämie Laktat-positiv. Insgesamt war in dieser Gruppe die myokardiale Laktat-Extraktion signifikant ($p < 0,05$) gesunken (von 0,21 auf 0,02 mmol/L). Bei einem Patienten war jedoch eine Zunahme der Laktatextraktion unter Stimulation zu verzeichnen. In der folgenden Vierfeldertafel sind die Einzelergebnisse in den beiden Gruppen veranschaulicht.

Laktat	Gruppe A	Gruppe B
-	4	3
+	1	3

Unter der Annahme, dass eine akute Myokardischämie als wesentlicher Kofaktor für die erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität mit Auslösung einer ventrikulären Tachykardie fungiert, betrug die Sensitivität eines Laktat-positiven Ereignisses für die Auslösbarkeit 50%, die Spezifität 60%.

4.4.2. Zusammenhang mit Adenosin

Der Zusammenhang zwischen myokardialer Adenosin-Produktion als Zeichen einer Myokardischämie und Arrhythmieauslösung ist bislang in keiner vergleichbaren Studie beschrieben worden. In der vorliegenden Studie zeigte sich in Gruppe A mit normaler bis leicht erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität insgesamt bereits in Ruhe eine myokardiale Netto-Adenosin-Produktion, die unter Stimulation tendentiell abnahm (von 27,6 nmol/L auf 17,6 nmol/L). Eine Umkehr von Adenosin-Extraktion zu Netto-Adenosin-Produktion unter Stimulation und eine deutliche Zunahme der myokardialen Adenosin-Freisetzung in den Koronarsinus wurde als Zeichen einer akuten Myokardischämie gedeutet (Adenosin-positiv). Im einzelnen wiesen in Gruppe A drei von fünf eine Zunahme der Adenosin-Produktion unter Stimulation auf, die absoluten Konzentrationen (von 0,4 – 5,4

nmol/L auf 2,8 – 17,7 nmol/L) lagen jedoch eher im niedrigen Bereich. Zwei von diesen wiesen bis zum Ende des Stimulationsprogrammes keine ventrikuläre Tachykardie auf. Kammerflattern konnte jedoch bei dem Patienten ausgelöst werden, der die höchste Adenosin-Produktion von 17,7 nmol/L in dieser Gruppe aufwies. In Gruppe B mit deutlich erhöhter ventrikulärer Vulnerabilität war als Zeichen der akuten Ischämie ein signifikanter Umschlag von Adenosin-Extraktion in Ruhe zu Adenosin-Produktion unter Stimulation (von 15,1 nmol/L Extraktion zu 32,5 nmol/L Produktion, $p < 0,05$) zu verzeichnen. Im einzelnen zeigten fünf der sechs Patienten eine deutliche Zunahme der myokardialen Adenosin-Produktion während Stimulation (Faktor 8,2). Die Absolutwerte lagen zwischen 14 nmol/L – 87,6 nmol/L. Einer von sechs zeigte eine Abnahme der Adenosin-Produktion (von 31,1 nmol/L auf 9,4 nmol/L, Faktor 3,3). In der folgenden Vierfeldertafel sind die Einzelergebnisse in den beiden Gruppen veranschaulicht.

Adenosin	Gruppe A	Gruppe B
-	2	1
+	3	5

Unter der Annahme, dass eine akute Myokardischämie als wesentlicher Kofaktor für die erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität mit Auslösung einer ventrikulären Tachykardie fungiert, betrug die Sensitivität eines Adenosin-positiven Ereignisses für die Auslösbarkeit 83%, die Spezifität 80%.

Verglichen mit Laktat zeigt Adenosin unter dem oben genannten Aspekt folglich eine höhere Sensitivität und Spezifität.

5. Klinische Bedeutung und Ausblick

Adenosin ist an einer Reihe von Regulationsmechanismen insbesondere im Herzen beteiligt. Bislang galt die myokardiale Laktat-Produktion als der Goldstandard für die quantitative Erfassung einer akuten Myokardischämie. Die Stellung von Adenosin als Ischämiemarker wurde ebenfalls in einigen Studien unter Anwendung verschiedener Messmethoden untersucht. Einige Messmethoden waren jedoch nicht ausreichend sensitiv oder zu kompliziert in ihrer Handhabung. Und nicht bei allen konnte ein signifikanter Anstieg der Adenosin-Produktion während akuter Myokardischämie nachgewiesen werden. In einigen wenigen Studien⁹⁹⁻¹⁰² konnte auch der Zusammenhang zwischen einer myokardialen Laktat-Produktion und der Auslösung einer ischämisch getriggerten ventrikulären Arrhythmie während programmierter Schrittmacherstimulation bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eruiert werden. Studien im Zusammenhang mit ventrikulärer Arrhythmie und Adenosin mit gleicher Fragestellung wurden bislang jedoch nicht veröffentlicht.

Wir konnten im Rahmen dieser Studie Adenosin ausreichend sensitiv messen. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass in Relation zur ventrikulären Vulnerabilität im Hinblick auf die Arrhythmieauslösbarkeit (Myokardischämie als Kofaktor für eine erhöhte ventrikuläre Vulnerabilität) Adenosin im Vergleich zu Laktat eine höhere Sensitivität und Spezifität aufweist (Sensitivität 83% und Spezifität 80% versus Sensitivität 50% und Spezifität 60%).

Die Relevanz dieser Untersuchung für den klinischen Alltag ergibt sich aus der Bedeutung eines spezifischen Ischämiemarkers für Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Eine Myokardischämie ist als ein möglicher Risikofaktor für klinisch relevante ventrikuläre Herzrhythmusstörungen unumstritten. Bei der Frage nach der Ursache und der Therapie einer gerade stattgehabten ventrikulären Tachykardie kann die Bestimmung der koronarvenösen Adenosin –

Konzentration im Rahmen einer elektiven elektrophysiologischen Untersuchung für das weitere therapeutische Vorgehen wegweisend sein. Zum Beispiel könnte eine erhöhte Adenosin-Netto-Produktion in Zweifelsfällen als zusätzliche Indikation zu einer (erneuten) Revaskularisierung (ACVB bzw. perkutane Koronarangioplastie/ Stent-Implantation), zur Implantation eines Defibrillators (ICD bei Ausschöpfung revaskularisierender Möglichkeiten) oder zur Erweiterung der medikamentösen antiarrhythmischen Therapie dienen.

Es sind jedoch weitere Untersuchungen zur Korelation von Adenosin-Produktion und ventrikulärer Vulnerabilität zum besseren Verständnis notwendig. Außerdem müssten die Ergebnisse unserer Studie an größeren Patientenkollektiven geprüft werden.

Durch die Anwendung der HPLC-Analyse und durch die Peakshift-Methode könnten weitere Einblicke in den Adenosin-Haushalt bei Menschen gewonnen werden.

6. Limitationen

Die Hauptbedeutung der Studie liegt in der Darlegung der Zusammenhänge zwischen induzierbarer Ischämie, Adenosin- und Laktat-Produktion und Auslösung ventrikulärer Tachyarrhythmien.

In der Praxis sind beide Bestimmungsmethoden relativ kompliziert und aufwendig in der Handhabung, so dass ihre Bedeutung für die klinische Routine-Diagnostik von KHK-Patienten mit ventrikulären Tachykardien begrenzt sein dürfte.

7. Literaturverzeichnis

- 1) Schrader J. Adenosine: A homeostatic metabolite in cardiac energy metabolism, *Circulation* 1990;81;389-391
- 2) Schrader J, Decking U. Regulation of coronary circulation by adenosine. *Z Kardiol.* 1996;85 Suppl 6:153-9.
- 3) Hori M and Kitakaze M. Adenosine, the heart, and coronary circulation. *Hypertension*, 1991;Vol 18, 565-574
- 4) Huda E. Tawfik, Bunyen Teng, R. Ray Morrison, J. Schnermann, and S. Jamal Mustafa. Role of A₁ adenosine receptor in the regulation of coronary flow, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H467-H472, 2006
- 5) Tawfik HE, Schnermann J, Oldenburg PJ, Mustafa SJ. Role of A₁ adenosine receptors in regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Mar;288(3):H1411-6
- 6) Bache RJ, Dai XZ, Schwartz JS and Homans DC. Role of adenosine in coronary vasodilation during exercise. *Circulation Research*, Vol 62, 846-853
- 7) Duncker Dirk J. and Merkus Daphne. Exercise hyperaemia in the heart: the search for the dilator mechanism. *J Physiol* 583.3 (2007) pp 847–854
- 8) Olsson RA, Bunge R & Spaan JA (1992). Coronary Circulation In *The Heart and Cardiovascular System*, ed. Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM & Morgan HE, pp. 1393–1426
- 9) Merkus D, Haitsma DB, Fung TY, Assen YJ, Verdouw PD & Duncker DJ. Coronary blood flow regulation in exercising swine involves parallel rather than redundant vasodilator pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285, H424–H433. (2003)
- 10) Edlund A, Sollevi A & Wennmalm A. The role of adenosine and prostacyclin in coronary flow regulation in healthy man. *Acta Physiol Scand* 135, 39–46. (1989)
- 11) Duncker DJ, van Zon NS, Pavek TJ, Herrlinger SK & Bache RJ. Endogenous adenosine mediates coronary vasodilation during exercise after K_{ATP} channel blockade. *J Clin Invest* 95, 285–295. (1995)

- 12)Frøbert Ole , Haink Gesine, Simonsen Ulf, Gravholt Claus H., Levin Max and Deussen Andreas . Adenosine concentration in the porcine coronary artery wall and A_{2A} receptor involvement in hypoxia-induced vasodilatation. J Physiol 570.2 (2006) pp 375–384
- 13)Eltzschig Holger K, Faigle Marion. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: Role of surface adenosine deaminase and CD26. Blood, 1 September 2006, Vol. 108, No. 5, pp. 1602-1610.
- 14)Schulz Rainer, Heusch Gerd. Extracellular Adenosine Attenuates Left Ventricular Hypertrophy Through Its Impact on the Protein Kinase and Phosphatase Interaction. Hypertension. 2008;51;1474 –1475
- 15)Berne RM: Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. Am J Physiol 1963;204:317-322
- 16)Bardenheuer H, Schrader J. Supply-to-demand ratio for oxygen determines formation of adenosine by the heart. Am J Physiol 1986;250:H173-H180
- 17)Mc Kenzie JE, McCoy FP, Bockman EL. Myocardial adenosine and coronary resistance during increased cardiac performance. Am J Physiol 1980;239:H509-H515
- 18)Watkinson WP, Foley DH, Rubio R, Berne RM. Myocardial adenosine formation with increased cardiac performance in the dog. Am J Physiol 1979;296:H13-H23
- 19)Babbitt DG, Virmani R and Forman MB. Intracoronary adenosine administered after reperfusion limits vascular injury after prolonged ischemia in the canine model. Circulation, Vol 80, 1388-1399
- 20)Dirksen M.T., Laarman G.J., Simoons M.L., and Duncker D.J.G.M
Reperfusion injury in humans: A review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. Cardiovasc Res, June 1, 2007; 74(3): 343 – 355
- 21)Xu Z., Park S.-S., Mueller R. A., Bagnell R. C., Patterson C., and Boysen P. G.
Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes. Cardiovasc Res, March 1, 2005; 65(4): 803 – 812

- 22) Ross A. M., Gibbons R. J., Stone G. W., Kloner R. A., Alexander R. W., and for the AMISTAD-II Investigators. A Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Multicenter Trial of Adenosine as an Adjunct to Reperfusion in the Treatment of Acute Myocardial Infarction (AMISTAD-II). *J. Am. Coll. Cardiol.*, June 7, 2005; 45(11): 1775 – 1780
- 23) Hochhauser E., Leshem D., Kaminski O., Cheporko Y., Vidne B. A., and Shainberg A. The protective effect of prior ischemia reperfusion adenosine A₁ or A₃ receptor activation in the normal and hypertrophied heart *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*, June 1, 2007; 6(3): 363 - 368.
- 24) Kin Hajime, Zatta Amanda J.. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovascular Research* 2005 67(1):124-133
- 25) Rork Tyler H., Wallace Kori L.. Adenosine A_{2A} receptor activation reduces infarct size in the isolated, perfused mouse heart by inhibiting resident cardiac mast cell degranulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1825-H1833, 2008
- 26) Smits G. J., McVey M.. Cardioprotective Effects of the Novel Adenosine A₁/A₂ Receptor Agonist AMP 579 in a Porcine Model of Myocardial Infarction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, August 1, 1998; 286(2): 611 – 618.
- 27) Simonis Gregor, Wiedemann Stephan. Stimulation of adenosine A_{2b} receptors blocks apoptosis in the non-infarcted myocardium even when administered after the onset of infarction. *Mol Cell Biochem* DOI 10.1007/s11010-009-0081-x.2009
- 28) Yang Zequan, Linden Joel. Timing of adenosine 2A receptor stimulation relative to reperfusion has differential effects on infarct size and cardiac function as assessed in mice by MRI. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H2328-H2335, 2008
- 29) Bakhos L., Holly T.A.. Evaluation of ischemic myocardial stunning following adenosine vasodilator stress using cardiac magnetic resonance imaging. *Journal of Nuclear Cardiology* Volume 15, Issue 4, July-August 2008, Pages S10-S11
- 30) Glover K David, Ruiz Mirta. Cardioprotection by adenosine A_{2A} agonists in a canine model of myocardial stunning produced by multiple episodes of transient ischemia. *Am J*

- 31) Donato M, Gelpi RJ. Adenosine and cardioprotection during reperfusion--an overview. *Mol Cell Biochem* (2003) 251: 153-9.
- 32) David K. Glover, Mirta Ruiz. Cardioprotection by Adenosine A_{2A} Agonists in a Canine Model of Myocardial Stunning Produced by Multiple Episodes of Transient Ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (February 16, 2007)
- 33) Auchampach J.A, Gross G.J. Adenosine A₁ receptors, K_{ATP} channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol* (1993) 264:H1327-1336.
- 34) Van Winkle D.M, Chien G.L, Wolff R.A, et al. Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the K_{ATP} channel. *Am J Physiol* (1994) 266:H829-839.
- 35) Schulz R, Rose J, Post H, et al. Involvement of endogenous adenosine in ischaemic preconditioning in swine. *Pflügers Arch* (1995) 430:273-282.
- 36) Lasley R D, Zhou Z. Adenosine attenuates in vivo myocardial stunning with minimal effects on cardiac energetics. *Basic Research in Cardiology* 1998; 93(4):303-312
- 37) West GA, Belardinelli L. Correlation of sinus slowing and hyperpolarization caused by adenosine in sinus node. *Pflugers Arch*. 1985;403:75-81
- 38) Zaza Antonio, Rocchetti Marcella. Modulation of the Hyperpolarization-Activated Current (I_f) by Adenosine in Rabbit Sinoatrial Myocytes. *Circulation*. 1996;94:734-741
- 39) Berne RM, DiMarco JP and Belardinelli L. Dromotropic effects of adenosine and adenosine antagonists in the treatment of cardiac arrhythmias involving the atrioventricular node. *Circulation* 1984;69:1195-1197
- 40) diMarco JP, Sellers TD. Diagnostic and therapeutic use of adenosine in patients with supraventricular tachyarrhythmias. *J Am Coll Cardiol*, 1985; 6:417-425

- 41)JP DiMarco, TD Sellers, RM Berne Adenosine: electrophysiologic effects and therapeutic use for terminating paroxysmal supraventricular tachycardia. *Circulation*, Vol 68, 1254-1263
- 42)Favale S, Di Biase M, Rizzo U, Belardinelli L, Rizzon P: Effects of adenosine and adenosine 5'-triphosphate of atrioventricular condition in patients. *J Am Coll Cardiol* 1985;5:1212-1219
- 43)Belardinelli L, Shryock J, West GA, Clemo HF, DiMarco JP, Berne RM: Effects of adenosine and adenine nucleotides on the atrioventricular node of isolated guinea pig hearts. *Circulation* 1984;70:1083-1091
- 44) Schrader Jürgen, Baumann Gert and Gerlach Eckehart. Adenosine as inhibitor of myocardial effects of catecholamines. *Pfluegers Arch* 372, 29-35 (1977)
- 45)Dobson Jr .Mechanism of adenosine inhibition of catecholamine-induced responses in heart. *Circ. Res.* 1983;52;151-160...(1977)
- 46)Auchampach J. A. and Bolli R.. Adenosine receptor subtypes in the heart: therapeutic opportunities and challenges *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, March 1, 1999; 276(3): H1113 - H1116
- 47)London C, Wolff J,: Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5482-5486
- 48)Olsson RA, Davis CJ, Khouri EM, Patterson RE: Evidence for an adenosine receptor on the surface of dog coronary myocytes. *Circ Res* 1976;39:93-98
- 49)London C, Cooper DMF, Schlegel W, Rodbell M: Adenosine analogs inhibit adipocyte adenylate cyclase by a GTP-dependent process: Basis for actions of adenosine and methylxanthines on cyclic AMP production and lipolysis. *Proc Natl Acad U S A* 1978;75:5362-5366
- 50)Deussen A, Borst M, Schrader J: Formation S-adenosylhomocysteine in the heart: I. An index of free intracellular adenosine. *Circ Res* 1988;63:240-249
- 51) Kitakaze M. , Minamino T., Node K. , Komamura K. and Hori M. Activation of Ecto-5'-nucleotidase and cardioprotection by ischemic preconditioning.*Basic Res Cardiol* 91: 23-26

- 52) Schrader J, Schütz W, and Bardenheuer H. Role of S-adenosylhomocysteine hydrolase in adenosine metabolism in mammalian heart. *Biochem J.* 1981 April 15; 196(1): 65–70.
- 53) Schrader WP and West CA. Localization of adenosine deaminase and adenosine deaminase complexing protein in rabbit heart. Implications for adenosine metabolism. *Circulation Research*, Vol 66, 754-762
- 54) Schrader J. Metabolism of adenosine and sites of production in the heart. In: R.M. Berne, T.W. Rall, R. Rubio (eds.): *Regulatory functions of adenosine*. Martimis Nighoff, p. 133-156, 1983
- 55) Görlach Agnes. Control of Adenosine Transport by Hypoxia. *Circulation Research*. 2005;97:1
- 56) Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, Hansen KR, Thompson LF, Colgan SP. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest.* 2002; 110: 993–1002
- 57) Holger K. Eltzschig, Marion Faigle, Simone Knapp. Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood*. 2006 September 1; 108(5): 1602–1610
- 58) Kroll K, Decking UK, Dreikorn K and Schrader J. Rapid turnover of the AMP-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circulation Research*, Vol 73, 846-856
- 59) Pragnacharyulu Palle V. P., Lu Pei-Jung and Abushanab Elie. Adenosine deaminase inhibitors. Synthesis and biological evaluation of chain modified analogs of (+)-EHNA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry letters*, Volume 6, Issue 20, 22 October 1996, Pages 2417-2420
- 60) Newby A C. How does dipyridamole elevate extracellular adenosine concentration? Predictions from a three-compartment model of adenosine formation and inactivation. *Biochem J.* 1986 August 1; 237(3): 845–851
- 61) Hiroshi Sato, Masaharu Nishimura. Plasma Concentration of Adenosine during Normoxia and Moderate Hypoxia in Humans. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, Volume 159, Number 3, March 1999, 1014-1018

- 62) Ontyd J., Schrader J. Measurement of adenosine, inosine and hypoxanthine in human plasma. *J Chromatogr* (1984) 307:404–409
- 63) Sylvé Christer. Mechanisms of pain in angina pectoris—A critical review of the adenosine hypothesis. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, Vol. 7, No. 5. (1 November 1993), pp. 745-759.
- 64) Ely SW and Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation*, Vol 85, 893-904
- 65) Shalaby Ahmed, Rinne Timo, Järvinen Otso. Initial results of a clinical study: adenosine enhanced cardioprotection and its effect on cardiomyocytes apoptosis during coronary artery bypass grafting. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;33:639-644
- 66) Funakoshi Hajime, Zacharia Lefteris C. A₁ Adenosine Receptor Upregulation Accompanies Decreasing Myocardial Adenosine Levels in Mice With Left Ventricular Dysfunction. *Circulation*. 2007;115:2307-2315
- 67) Lankford Amy R., Yang Jiang-Ning, Meyer. Roselyn Rose. Effect of modulating cardiac A₁ adenosine receptor expression on protection with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1469-H1473, 2006.
- 68) Hubert J Bardenheuer, Andrea Fabry. Adenosine: a sensitive marker of myocardial ischaemia in man. *Cardiovascular Research* 1994 28(5):656-662
- 69) Kitakaze M, Minamino T, Node K, Takashima S, Funaya H, Kuzuya T, Hori M. Adenosine and cardioprotection in the diseased heart. *Jpn Circ J* 1999; 63: 231-43..
- 70) Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic – reperfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: 1797-818
- 71) Lasley Robert D., Mentzer Robert M. Jr. Myocardial protection: The adenosine story. *Drug Development Res* Volume 39 Issue 3-4, Pages 314 – 318
- 72) Werner Gerald S., Fritzenwanger Michael. Determinants of Coronary Steal in Chronic Total Coronary Occlusions: Donor Artery, Collateral, and Microvascular Resistance. *JACC*, Volume 48, Issue 1, Pages 51-58, 2006

- 73) Seiler C., Kaufmann U. and Meier B. Intracoronary demonstration of adenosine-induced coronary collateral steal. *Heart* 1997;77:78-81
- 74) Gorlin R. Assessment of Hypoxia in the Human Heart. *Cardiology* 1972;57:24-34
- 75) Krasnow N, Gorlin R: Myocardial lactate metabolism in coronary insufficiency. *Ann Intern Med* 1963;59:781
- 76) Haneda T, Ichihara K, Abiko Y, Onodera S: Release of adenosine and lactate from human hearts during atrial pacing in patients with ischemic heart disease. *Clin Cardiol* 1989;12:76-82
- 77) Morady F, DiCarlo LA, Krol RB, Annesley TM et al: Effects of programmed ventricular stimulation on myocardial lactate extraction in patients with and without coronary artery disease. *Am Heart J* 1986;111:252-257
- 78) Moser G. H., Schrader J. and Deussen A.. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol Cell Physiol* 256: C799-C806, 1989
- 79) Hamm CW, Kupper W. Quantitation of coronary venous adenosine in patients: limitations evaluated by radioimmunoassay. *Cardiovasc Res.* 1988 Apr;22(4):236-43
- 80) Wojcik W.J., Neff N.H. Adenosine Measurement by a Rapid HPLC-Fluorometric Method: Induced Changes of Adenosine Content in Regions of Rat Brain. *Journal of Neurochemistry* Volume 39 Issue 1, Pages 280 – 282
- 81) Kumar Akula Kiran, Manninder Kaur. Development and validation of an RP-HPLC method for the estimation of adenosine and related purines in brain tissues of rats. *Journal of separation science* 2008;31(18):3139-47
- 82) Pfadenhauer EH, Tong SD: Determination of inosine and adenosine in human plasma using high-performance liquid chromatography and a boronate affinity gel. *J Chromatogr* 1979;162:585-590
- 83) Hartwick RA, Assenza SP, Brown PR: Identification and quantitation of nucleosides, bases and other UV-absorbing compounds in serum, using reversed-phase- high-performance liquid chromatography. I. Chromatographic methodology *J of Chromatogr* 1979;186:647-658

- 84)Deussen Andreas, Stappert Margit, Schäfer Stefan, Kelm Malte. Quantification of Extracellular and Intracellular Adenosine Production Understanding the Transmembranous Concentration Gradient. *Circulation*. 1999;99:2041-2047
- 85)Vallon V., Muhlbauer B., Osswald and H. Adenosine and kidney function. *Physiol Rev*, July 1, 2006; 86(3): 901 - 940.
- 86)Kloor Doris, Yao Kozo, Delabar Ursula and Osswald Hartmut .Simple and Sensitive Binding Assay for Measurement of Adenosine Using Reduced S-Adenosylhomocysteine Hydrolase. *Clinical Chemistry*. 2000;46:537-542
- 87)Bunag RD, Douglas CR, Imai S, Berne RM: Influence of a pyrimidopyrimidine derivative on deamination of adenosine by blood. *Circ Res* 1964;15:83-88
- 88)Capogrossi MC, Holdiness MR, Israili ZH: Determination of adenosine in normal human plasma and serum by high-performance liquid chromatographie *J Chromatogr* 1982;227:168-173
- 89)Sovelli A, Östergren J, Fagrell B, Hjemdahl P: Theophylline antagonizes cardiovascular response to dipyridamole in man without affecting increases in plasma adenosine. *Acta Physiol Scand* 1984a;121:165-171
- 90)Shryock JC, Boykin MT, Hill JA, Belardinelli L: A new method of sampling blood of measurement of plasma adenosine. *Am J Physiol* 1990;258:H1232-H1239
- 91)Feldman M, Ayers CR, Lehman MR, Taylor HE, Gordon VL, Sabia PJ, Ras D, Skalac TC, Linden J: Improved detection of ischemia-induced increases in coronary sinus adenosine in patients with coronary artery disease. *Clin Chem* 1992;38/2:256-262
- 92)Edlund A, Sidén A, Sollevi AEvidence for an anti-aggregatory effect of adenosine at physiological concentrations and for its role in the action of dipyridamole. *Thromb Res*. 1987 Jan 15;45(2):183-90
- 93)Belle H. Van. New colorimetric method for automatic determination of adenosine at the micromolar level.*Analytical Biochemistry* Volume 32, Issue 2, November 1969, Pages 238-250

- 94)Gresele P, Zoja C, Dekmyn H, Arnout J, Vermeylen J, Verstraete M: Dipyridamole inhibits platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 1983;50:852-856
- 95)Salla S. , Redbreake C., Frantza A. Employment of bioluminescence for the quantification of adenosine phosphates in the human cornea. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* . 1996, vol. 234, n°8, pp. 521-526 (40 ref.)
- 96)Zhang Y., Geiger J. D. and. Lauth W. Improved high-pressure liquid chromatographic-fluorometric assay for measurement of adenosine in plasma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 260: G658-G664, 1991
- 97)Donald G. Gardiner. A rapid and sensitive fluorimetric assay for adenosine, inosine, and hypoxanthine. *Analytical Biochemistry* Volume 95, Issue 2, June 1979, Pages 377-382
- 98)Schrader J, Nees S, Gerlach E *Pfluegers Arch* 1978;378:1967
- 99)Vester EG: Myokardischämie und ventrikuläre Arrhythmien. *Z Kardiol* 1998;87/2:49-60
- 100)Opie LH, Owen P, Thomas M, Samson M: Coronary sinus lactate measurements in assessment of myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1973;32:295-305
- 101)Markham RV, Winniford MD, Firth BG, Hillis LD et al: Symptomatic, electrocardiographic, metabolic and hemodynamic alteration during pacing-induced myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1983;51:1589-1594
- 102)Morady F, DiCarlo L, Winston S, Davis JC, Scheinman MM: Clinical features and prognosis of patients with out of hospital cardiac arrest and a normal electrophysical study. *J Am Coll Cardiol* 1984;4/1:39-4
- 103)Fox AC, Reed GE, Glassman E, Kaltman AJ, Silk BB: Release of adenosine from human hearts during angina induced by rapid atrial pacing. *J Clin Invest* 1974;53:1447-1457
- 104)Fox AC, Reed GE, Meilman H, Silk BB: Release of nucleosides from canine and human hearts as an index of prior ischemia. *Am J Cardiol* 1979;43:52
- 105)Parker JO, Chiong MA, West RO, Case RB: Sequential alterations in myocardial metabolism, s-t segments and left

ventricular function during angina induced by atrial pacing.
Circulation 1969;40:113

- 106) Hummel JD, Strickberger SA, Daoud E et al.: Results and efficacy of programmed ventricular stimulation with four extrastimuli compared with one, two, and three extrastimuli. Circulation 90: 2827–2832. (1994)
- 107) Hennersdorf M, Perings CH, Dobran I, Vester EG, Strauer B: Correlation between ischemia related ventricular tachyarrhythmias and the dynamics of ventricular late potentials. Herzschr. Therapie und Elektrophysiologie. Volume 10, No 3. September 1999
- 108) Helmut Roskamm: Herzkrankheiten: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. Kapitel 9.1.4. 2004

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank allen Mitarbeitern der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Prof. Dr. med. Ernst Günter Vester, sowie den Mitarbeitern des Kardiologischen Labors der Heinrich – Heine – Universität ausdrücken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit fertigzustellen.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Professor Dr. med. Ernst Vester für die umfangreiche Betreuung im gesamten klinischen Bereich der Arbeit

Frau BTA Claudia Ferfers danke ich für die durchgehende Unterstützung bei den Arbeiten im kardiologischen Labor

Herrn Dr. Stefan Schäfer für die Betreuung, stetige Diskussionsbereitschaft, sowie seiner wertvollen Ratschläge

Herrn Privat Dozent Dr. Tienush Rassaf Haghighat für seine Motivation und für sein kritisches Korrekturlesen

Ganz besonders bin ich meinen lieben Eltern und Geschwistern, Tienush und insbesondere meinem Sohn Cyrus zu Dank verpflichtet. Ihr Glaube an mich und der familiäre Rückhalt helfen mir in allen Lebenslagen.

Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bita Gholamalizadeh
Geburtsdatum: 21.03.1973
Geburtsort: Teheran / Iran
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1979 – 1984 Grundschule in Teheran (fünfstufig)
1984 – 1993 Dietrich – Bonhoeffer – Gymnasium in Ratingen
1993 Abitur

Hochschulausbildung:

Oktober 1993 Beginn des humanmedizinischen Studiums an
der Heinrich – Heine – Universität
August 1995 Ärztliche Vorprüfung
August 1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1999 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Mai 2000 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Juli 2000- Tätigkeit als Ärztin im Praktikum in der
Dez. 2001 Kardiologischen Abteilung des Evangelischen
Krankenhauses Düsseldorf

Jan. 2002- Tätigkeit als Assistenzärztin in der
Dez. 2003 Kardiologischen Abteilung des Evangelischen
Krankenhauses Düsseldorf

Jan. 2004- Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin in
Dez. 2005 der Elektrophysiologischen Abteilung des
Virchow Klinikums Charité Berlin
mit Schwerpunkt Kardiologie

21.01.2006 Geburt meines Sohnes Cyrus

Dez. 2005- Mutterschutz und Elternzeit
Dez. 2006

Jan 2007- Tätigkeit als Assistenzärztin in der
Juni 2009 Anästhesiologischen Abteilung des
Stadtkrankenhauses Cuxhaven (Rhön AG)

Juli 2009 Beginn der Tätigkeit als Assistenzärztin in der
Anästhesiologischen Abteilung Klinikum
Duisburg Wedau

10. Zusammenfassung

Adenosin als Marker für eine akute Myokardischämie bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung – Relation zur ventrikulären Vulnerabilität.

Vorgelegt von Bitā Gholamalizadeh

Während Myokardischämie kommt es zur extra- und intrazellulären Akkumulation von Adenosin, welches wiederum über eine Vielzahl von Mechanismen einen kardioprotektiven Summeneffekt ausübt. Die Bedeutung des Adenosins als sensibler Marker für eine myokardiale Ischämie ist sowohl tierexperimentell als auch am Menschen im Rahmen klinischer Studien gesichert worden. In vielen klinischen Studien wurde jedoch die sogenannte Laktat-Umkehr als Index einer Hypoxie des Myokards verwendet. In einigen wenigen Studien konnte auch der Zusammenhang zwischen einer myokardialen Laktat-Produktion und der Auslösung einer ischämisch getriggerten ventrikulären Arrhythmie während programmierter Schrittmacherstimulation bei Patienten mit schwerer koronarer Herzerkrankung eruiert werden. Der Zusammenhang zwischen Myokardischämie, Adenosin-Produktion und Arrhythmogenese ist jedoch bislang nicht hinreichend untersucht. In dieser Studie ist erstmals die Wertigkeit von Adenosin im Hinblick auf die Arrhythmogenese im Vergleich zu Laktat untersucht worden.

Für die Bestimmung der Laktat-Konzentration im menschlichen Blut stehen einfache und standardisierte Messmethoden zur Verfügung. Die Laktat-Umkehr wird bei Patienten mit chronisch ischämischer Herzerkrankung meist nur bei starker Ischämie beobachtet. Es erscheint daher sinnvoll, einen sensibleren Marker wie zum Beispiel Adenosin einzuführen. Für die Quantifizierung von Adenosin sind verschiedene Messmethoden (z.B. HPLC, RIA) beschrieben worden. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit im Blut von wenigen Sekunden müssen bei der Bestimmung von Adenosin im Blut bereits während der Entnahme Verluste in Kauf genommen werden. Die HPLC ist dennoch eine geeignete und einfache Methode die Adenosin-Konzentration nach der Anwendung der Peakshift-Methode zu messen.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. In dieser Studie wurde die HPLC- und Peakshiftmethode verfeinert und Adenosin im nanomolaren Bereich sensitiv gemessen.
2. Es konnte gezeigt werden, dass unter Stimulationsbedingungen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine myokardiale Adenosin-Netto-Produktion stattfindet. Adenosin zeigt sich hierbei als Ischämie marker im Vergleich zu Laktat weder über- noch unterlegen.
3. Adenosin bietet in Relation zur ventrikulären Vulnerabilität im Hinblick auf die Arrhythmieauslösbarkeit im Vergleich zu Laktat eine höhere Sensitivität und Spezifität (Sensitivität 83% vs. 50%, Spezifität 80% vs. 60%).

Beurteilung: Adenosin kann in vergleichbarer Weise wie Laktat zur quantitativen Bestimmung einer Myokardialen Ischämie verwendet werden. Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Adenosin-Produktion und Induktion ventrikulärer Arrhythmien, wobei eine höhere Sensitivität und Spezifität gegenüber Laktat zu bestehen scheint. Es sind jedoch weitere Untersuchungen zur Korrelation von Adenosin-Produktion und ventrikulärer Vulnerabilität notwendig. Darüberhinaus müssen die Ergebnisse unserer Studie an größeren Patientenkollektiven überprüft werden.

genehmigt:

(Prof. Dr. med. E.G. Vester)