Aus dem Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Professor Dr. med. J. Schrader

Räumliche Heterogenität von Durchblutung und Energieumsatz des Herzens

Untersuchungen am Hundeherzen in situ

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stefan Skwirba

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A. Dekan Referent: Priv.-Doz. Dr. Decking Korreferentin: Prof. Dr. Soboll Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

- Decking U.K.M., S. Skwirba, M.F. Zimmermann, B. Preckel, R. Loncar, V. Thämer, A. Deussen, and J. Schrader. Does local coronary flow control metabolic flux rates? A ¹³C-NMR study. MAGMA 6: 133-134, 1998.
- Decking, U.K.M., S. Skwirba, M. Zimmermann, B. Preckel, V. Thämer, A. Deussen, and J. Schrader. Spatial heterogeneity of energy turnover in the heart. Pflügers Archiv, 441: 663-673, 2001.

Meinen Eltern und Großeltern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Heterogenität des kardialen Blutflusses	2
1.2.1	Räumliche Durchblutungsheterogenität	2
1.2.1.1	Ventrikel und Vorhöfe	2
1.2.1.2	Transmuraler Flussgradient	3
1.2.1.3	Mikroheterogenität	3
1.2.2	Zeitliche Durchblutungsheterogenität	7
1.2.3	Aufbau des koronaren Gefäßsystems	9
1.2.4	Regulation der Koronardurchblutung	. 10
1.3	Heterogenität des kardialen Stoffwechsels	. 12
1.3.1	Grundzüge des kardialen Energiestoffwechsels	. 12
1.3.2	Direkte Sauerstoffmessungen	. 14
1.3.3	Steady-State Metabolite	. 16
1.3.4	Enzyme	. 17
1.3.5	Aufnahme- und Transportraten	. 18
1.4	Fragestellung	. 19
1.5	Theoretischer Ansatz	. 20
1.5.1	Verstoffwechselung von [3- ¹³ C]Pyruvat im Zitronensäurezyklus	. 21
1.5.2	Modellgrundlagen	. 22
1.5.3	Modellvorhersagen	. 23

2	Material und Methoden	27
2.1	Versuchsprotokoll	27
2.2	Aufbereitung und Berechnung des lokalen Blutflusses	29
2.3	Extraktion	32
2.4	NMR-Technik und Auswertung	32
2.5	Isotopomeranalyse	33
2.6	Biochemische Analyse	34
2.7	Fraktionelle Anreicherung	38
2.8	Statistische Auswertung	39

Ergebnisse	. 40
Vitalparameter	. 40
Myokardiale Durchblutung	. 40
Heterogenität der myokardialen Durchblutung	. 40
Stabilität der myokardialen Durchblutung	. 43
¹³ C-NMR-Spektroskopie	. 47
Übersichtsspektrum	. 47
Spektrum eines Hoch- und Niedrigflussareals	. 47
Glutamat [4- ¹³ C]/[3- ¹³ C]-Verhältnis	. 49
Glutamat [4- ¹³ C]/[3- ¹³ C]-Verhältnis und lokaler Blutfluss	. 49
Glutamat [4- ¹³ C]/[3- ¹³ C]-Verhältnis in Niedrig-, Mittel- und	
Hochflussarealen	. 51
Metabolite	. 53
Fraktionelle Anreicherung	. 55
	Ergebnisse Vitalparameter Myokardiale Durchblutung Heterogenität der myokardialen Durchblutung Stabilität der myokardialen Durchblutung Stabilität der myokardialen Durchblutung ¹³ C-NMR-Spektroskopie Übersichtsspektrum Spektrum eines Hoch- und Niedrigflussareals. Glutamat [4- ¹³ C]/[3- ¹³ C]-Verhältnis Glutamat [4- ¹³ C]/[3- ¹³ C]-Verhältnis und lokaler Blutfluss Glutamat [4- ¹³ C]/[3- ¹³ C]-Verhältnis in Niedrig-, Mittel- und Hochflussarealen Metabolite Fraktionelle Anreicherung

3.7	Anaplerose	57
3.8	Lokaler J _{TCA} und Sauerstoffverbrauch	59

4	Diskussion	61
4.1	Einführung	61
4.2	Heterogenität des kardialen Stoffwechsels	61
4.2.1	Metabolite	61
4.2.2	Enzyme	63
4.2.3	Transport- und Aufnahmeraten	65
4.2.4	O ₂ -Verbrauch	66
4.3	Validität der Daten	67
4.3.1	Endpunktanalyse	69
4.3.2	Substratangebot und Substratwahl	69
4.3.3	Metabolitkonzentrationen	70
4.3.4	Austauschreaktionen	72
4.3.5	Vergleich mit konventioneller O ₂ -Messung und anderen	
	experimentellen Ansätzen	75
4.4	Ursachen der Heterogenität des Sauerstoffverbrauches	77
4.4.1	Heterogener Blutfluss	77
4.4.2	Heterogener Sauerstoffbedarf	79
4.5	Implikationen der Heterogenität von O2-Verbrauch und Energieumsatz.	80
4.5.1	Heterogenität der kontraktilen Funktion	81
4.5.2	Koronarreserve und inotrope Reserve	82
4.5.3	Koronare Gefäßstenosen	83
4.6	Ausblick	84
5	Literaturverzeichnis	85
6	Appendix	96
7	Zusammenfassung	98
8	Danksagung	99

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die wesentliche Aufgabe des Herzens besteht darin, durch aufeinander abgestimmte rhythmische Kontraktionen arterielles Blut in die Körperperipherie zu befördern. Hierdurch werden die Organe einerseits mit ausreichend Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, andererseits werden freigesetzte Stoffwechselprodukte mit dem venösen Blutstrom abtransportiert, um über die Lungen, Nieren oder die Leber ausgeschieden zu werden.

Zur Aufrechterhaltung der kontraktilen Funktion muss das Herz auch seinen eigenen Sauerstoff- und Nährstoffbedarf jederzeit decken. Dieser wird vor allem durch die mechanische Herzarbeit bestimmt, denn etwa 75% des kontinuierlich neu gebildeten ATPs werden durch die Myosin-ATPase gespalten, die den Gleitzyklus der kontraktilen Filamente ermöglicht. Die verbleibenden energiereichen Phosphate dienen der Aufrechterhaltung des Ionengradienten und der Struktur der Herzmuskelzelle (Schramm 1994).

Da die ATP-Bildung zu über 90% durch oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien erfolgt und nur zu einem geringen Teil durch anaerobe Glykolyse, ist ein ausreichendes Sauerstoffangebot somit Voraussetzung für den Funktions- und Strukturerhalt des Herzens (Schrader 1994).

Unter Ruhebedingungen beträgt die myokardiale Durchblutung etwa 0.8 ml min⁻¹g⁻¹, somit lediglich 5% des Herzzeitvolumens. Bei einem durchschnittlichen arteriellen O_2 -Gehalt von ca. 0.2 ml O_2 / ml Blut und einem myokardialen Sauerstoffverbrauch von etwa 0.1 ml O_2 min⁻¹g⁻¹ resultiert daraus bereits in Ruhe eine Sauerstoffextraktion von über 60%. Die im Vergleich zu anderen Organen sehr hohe O_2 -Ausschöpfung ist auch bei einem Anstieg des Sauerstoffverbrauches infolge vermehrter Herzarbeit kaum zu steigern. Diesem kann daher nur durch eine Zunahme der myokardialen Durchblutung entsprochen werden, die auf das 4-fache des Ausgangswertes ansteigen kann (Feigl 1983). Kontraktile Funktion, Sauerstoffverbrauch und Durchblutung des Herzens stehen somit in einer engen wechselseitigen Abhängigkeit, die angesichts der Bedeutung des Herzens für den Organismus einer genauen Abstimmung bedarf.

1.2 Heterogenität des kardialen Blutflusses

Die nähere Untersuchung der myokardialen Durchblutung auf lokalem Niveau, zum Beispiel mit radioaktiven Mikrosphären, die sich proportional zum lokalen Blutfluss ablagern, ergab, dass entgegen der scheinbar einheitlichen Funktion des Herzens der myokardiale Blutfluss eine deutliche Heterogenität aufweist (Bassingthwaighte 1989, Austin 1990). Unterscheiden sich bei einmaliger Messung einzelne Regionen des Herzens in ihrem lokalen Blutfluss, zeigt sich die räumliche Natur der Durchblutungsheterogenität. Wie wiederholte Messungen des Blutflusses in denselben Regionen zeigen, kann die lokale Durchblutung des Herzens jedoch auch über die Zeit variieren. Hierin manifestiert sich die zeitliche Dimension der Durchblutungsheterogenität.

1.2.1 Räumliche Durchblutungsheterogenität

Die räumliche Heterogenität der myokardialen Durchblutung findet sich auf allen strukturellen Ebenen des Herzens. Sie ist nicht allein auf die bereits makroskopisch erkennbare Untergliederung des Organs beschränkt, sondern erstreckt sich bis auf ein mikroskopisches Niveau, auf dem sich keine strukturellen Unterschiede mehr finden.

1.2.1.1 Ventrikel und Vorhöfe

Eine erste Ebene der Durchblutungsheterogenität des Herzens liegt zwischen den beiden Herzkammern. Die Durchblutung des linken Myokards mit 0.8 - 1 ml min⁻¹g⁻¹ entspricht in etwa der durchschnittlichen Durchblutung des Gesamtorgans, was sich durch den hohen Massenanteil des linken Herzmuskels erklärt. Dagegen wird die rechte Herzwand lediglich mit 50 - 67 % des linksmyokardialen Blutflusses versorgt (Hoffmann 1995). Da der rechte Ventrikel wegen des niedrigen Blutdruckes im Lungenkreislauf aber nur ca. 1/5 der Druck-Volumenarbeit des linken Herzens leistet, scheint er damit vergleichsweise stark perfundiert. Die geringe Wanddicke des rechten Myokards von etwa 3 mm führt jedoch im Vergleich zum herrschenden Druck

bereits bei gleichem Ventrikeldurchmesser zu einer höheren Wandspannung, der wesentlichen Determinante des myokardialen Sauerstoffverbrauches. Somit ist der Blutfluss auf der Ebene der Herzkammern vielmehr dem jeweiligen Sauerstoffbedarf angepasst (Hoffmann 1995). Dies scheint gleichfalls für die Vorhofmuskulatur zuzutreffen, deren Durchblutung ca. 30% des durchschnittlichen myokardialen Ruheblutflusses ausmacht. Tendenziell findet sich auch auf dieser Ebene eine höhere Durchblutung der linken Herzhälfte (Bauman 1993).

1.2.1.2 Transmuraler Flussgradient

Zusätzlich zu den Durchblutungsunterschieden auf dem Niveau der Herzkammern und Vorhöfe besteht auch innerhalb der Wand des linken Ventrikels ein Durchblutungsgefälle von subendo- nach subepikardial: Im inneren Drittel des linken Herzmuskels ist der durchschnittliche Blutfluss um 5 - 25 % höher als in den äußeren Bereichen (z.B. Austin 1990, Bussemaker 1994, Holtz 1977, Sonntag 1996, Zhang 1994). Dieses transmurale Gefälle der Durchblutung zugunsten der inneren Herzmuskelschicht steht zwar in Widerspruch zu den dort herrschenden höheren intramuralen Drücken (Stein 1980), doch werden eine vermehrte diastolische Vasodilatation (Klocke 1976) oder ein durch die Mikroarchitektur bedingter geringerer vaskulärer Widerstand (Chilian 1991) für die höhere Durchblutung des Subendokards verantwortlich gemacht. Andere erklären den Durchblutungsgradienten durch die vermehrte Entfaltung systolisch stärker komprimierter Gefäße im Subendokard, die sich in subepikardialen Schichten aufgrund der niedrigeren Wanddrücke nur in geringerem Ausmaß findet (Goto 1991).

Insgesamt zeigt sich, dass einzelne Schichten innerhalb der freien Wand des linken Ventrikels unterschiedlich stark durchblutet werden, wobei Bezirke mit einer hohen Wandbelastung einen vermehrten Blutfluss aufweisen.

1.2.1.3 Mikroheterogenität

Das transmurale Perfusionsgefälle stellt jedoch nicht die letzte Stufe der Durchblutungsheterogenität des Herzmuskels dar. Bereits 1968 schlossen Bassingthwaighte et al. aus dem trägen Auswaschverhalten von diffusiblen Indikatorsubstanzen am Herzen auf eine heterogene Durchblutung innerhalb der Herzwand (Bassingthwaighte 1968). Der direkte experimentelle Nachweis der Durchblutungsheterogenität gelang jedoch erst 1973 am isolierten Hundeherzen. Hier zeigte der Vergleich mit dem Verhalten löslicher Markierungssubstanzen, dass die heterogene Ablagerung von radioaktiven Mikrosphären im Herzgewebe tatsächlich dem lokalen Blutfluss entspricht (Yipintsoi 1973).

Eine Fülle weiterer mit Hilfe der Mikrosphärentechnik durchgeführter Untersuchungen belegt, dass sich auch kleinste Areale innerhalb der einzelnen Schichten des Herzmuskels in ihrer lokalen Durchblutung klar unterscheiden (z.B. Markus 1977, Bassingthwaighte 1989, Sonntag 1996, Bauer 2001). Die Variationskoeffizienten der lokalen Durchblutung, die die Streuung der lokalen Blutflüsse um den mittleren Blutfluss widerspiegeln, liegen in den angeführten Studien je nach Größe der untersuchten Herzareale zwischen 0.21 und 0.35 (Deussen 1998). Beispielsweise fand sich in ca. 80 mm³ großen Arealen der linken Wand des Hundeherzens *in situ* ein Spektrum der lokalen Durchblutung, das vom 0.1- bis zum 2.5-fachen des mittleren koronaren Blutflüsses reichte. Zwar lagen 95% der ermittelten Blutflüsse zwischen dem 0.5- und 1.5-fachen des mittleren Blutflusses, doch wiesen immerhin 5% aller untersuchten Proben einen mehr als 3-fachen Unterschied in der lokalen Durchblutung auf (Sonntag 1996).

Unabhängig von der Herzgröße ließ sich eine derart heterogene Durchblutung des linken Herzmuskels für verschiedene Spezies zeigen. Sie findet sich im Herzen von Ratten (Bauer 2001), Hamstern (Stapelton 1995), Kaninchen (Matsumoto 2000), Hunden (Loncar 1998), Schweinen (Bussemaker 1997) und Schafen (Bassingthwaigthe 1990) sowie im Affen- (Ghaleh 1996) und Menschenherzen (Camici 1997).

Die Abhängigkeit der beobachteten Durchblutungsheterogenität von der Größe des untersuchten Probenvolumens lässt sich mathematisch am besten durch fraktale Gleichungen beschreiben. Die wiederholte Messung des lokalen myokardialen Blutflusses zunächst in kleinsten Einzelproben und anschließend in nach ihrer ursprünglichen Lokalisation zusammengefügten größeren Arealen ergab, dass Probengröße und Varianz der lokalen Durchblutung auf logarithmischen Skalen gegeneinander aufgetragen eine hohe Linearität aufweisen (Bassingthwaighte 1989, van Beek 1989, Matsumoto 1999). Die Analyse dieses engen Zusammenhangs erlaubt, anhand der fraktalen Dimension D_S die einzelnen lokalen Blutflüsse als

voneinander abhängig oder zufällig verteilt zu charakterisieren (van Beek 1989). Da die fraktale Dimension D_S für die beobachtete Durchblutungsheterogenität zwischen 1.2 und 1.3 liegt, stellt die heterogene Durchblutung des Herzens kein inkohärentes Nebeneinander von hoch- und niedrigperfundierten Arealen dar (Deussen 1998). Vielmehr sind die Blutflüsse auf lokaler Ebene miteinander korreliert, ein Befund, der auch durch Autokorrelationsanalysen gestützt wird. Hier ließ sich mit zunehmendem Abstand der untersuchten Areale ein Anstieg der Varianz des lokalen Blutflüsse eng benachbarter Areale mehr als die weit auseinanderliegender.

Das lokale Durchblutungsmuster des Herzens ist somit nicht zufällig, sondern scheint das Resultat einer auf kleinster Ebene stattfindenden Regulation der Durchblutung zu sein, die sich in untereinander in funktionellem Verbund stehenden Einheiten vollzieht.

Die kleinste denkbare Einheit, die die lokale Durchblutung des Herzens reguliert, wird als "microvascular unit" bezeichnet. Sie entspricht möglicherweise dem von einer einzigen Widerstandsarteriole abhängigen Versorgungsgebiet, das je nach Größe der Arteriole ein Volumen zwischen 0.001 und 0.3 mm³ umfassen kann (Kassab 1993). Untersuchungen, in denen die Größe der mikrovaskulären Einheit aus lokalen Durchblutungsmessungen abgeleitet wurde, kamen zu ähnlich weit streuenden Ergebnissen: Während ältere Studien das Probenvolumen, ab welchem keine weitere Zunahme der Durchblutungsheterogenität zu verzeichnen ist, mit 0.2 - 1 mm³ (Bassingthwaighte 1989) bzw. 0.02 mm³ (van Bavel 1992) angeben, verweisen jüngere Studien auf ein fast zelluläres Niveau von ca. 0.001 mm³ (Matsumoto 1999). Somit findet die mikrovaskuläre Einheit möglicherweise erst in einer kleinen nur wenige Kapillaren speisenden Arteriole ihre strukturelle Entsprechung.

Die Durchblutungsheterogenität innerhalb des Herzmuskels lässt sich mit verschiedenen Messverfahren nachweisen. Goldstandard zur Erfassung der myokardialen Durchblutung ist die Verwendung von Mikrosphären, die radioaktiv markiert oder mit fluoreszierenden Farbstoffen versehen sind. Aufgrund ihres Durchmessers von 15 µm werden sie proportional zum lokalen Blutfluss im Kapillarbett zurückgehalten. Das von Erythrozyten abweichende spezifische Gewicht sowie die Unverformbarkeit bleiben ohne wesentlichen Einfluss auf die Erfassung

5

des lokalen Blutflusses, was sich in Vergleichsmessungen mit der molekularen Tracersubstanz lododesmethylimipramin für bis zu 50 mm³ große Herzareale nachweisen ließ (Bassingthwaighte 1987; 1989; 1990).

Die durch die Mikrosphärentechnik bedingte Streuung einzelner Messwerte um einen Mittelwert folgt idealerweise der Form der Gauss'schen Normalverteilung. Hierdurch lässt sich eine Varianz der Messergebnisse von 0.06 - 0.1 erklären (Deussen 1998). Da die Streuung der lokalen Blutflüsse des Herzens mit Variationskoeffizienten zwischen 0.21 und 0.34 jedoch deutlich stärker ausgeprägt ist, kann nur ein geringer Teil der beobachteten Heterogenität der Durchblutung auf den methodisch bedingten Fehler zurückgeführt werden.

Neben der Standardmethode, der Mikrosphärentechnik, lässt sich die Durchblutungsheterogenität des Herzens auch durch Indikatordilutionsverfahren belegen, die am Anfang der Untersuchungen zur lokalen myokardialen Durchblutung standen (Bassingthwaighte 1968). Wenngleich die Indikatordilutionstechnik keine topische Zuordnung der ermittelten Blutflüsse erlaubt, konnte zum Beispiel durch Analyse der Freisetzungskinetik von inhalierten Inertgasen wie Helium, Argon oder Xenon die heterogene Durchblutung in bis zu 1 mm³ großen Herzarealen nachgewiesen werden (Wolpers 1985).

Mit Hilfe von zum Teil sehr aufwendigen Methoden lässt sich die lokale Durchblutung des Herzens in immer kleinere Bezirke verfolgen: An Mikrosphären gekoppelte zuvor in Linearbeschleunigern angeregte schwere Elemente zeigten eine lokal heterogene Durchblutung in bis zu 2.5 mm³ kleinen Herzarealen (Mori 1995). Bauer et al. wiesen kürzlich mit einer neu entwickelten NMR-Methode in 0.03 mm³ kleinen Arealen isolierter Rattenherzen eine Streuung der lokalen Durchblutung von bis zu 34% nach (Bauer 2001). Durch digitale Autoradiographie und ³H-Iododesmethylimipramin ließ sich am Hamsterherzen die Durchblutungsheterogenität sogar bis auf eine fast zelluläre Ebene von 100 x 100 μ m² Pixel-Fläche verfolgen (Matsumoto 1999).

Abgesehen von den im Tierexperiment verwendeten Methoden der lokalen Durchblutungsmessung konnte mit Hilfe der ¹⁵O-Positronenemissionstomographie auch der Nachweis einer heterogenen Durchblutung des menschlichen Herzens erbracht werden: Bei einer Auflösung von ca. 7 x 7 mm² erstreckt sich der lokale myokardiale Blutfluss in der Epikard-nahen Schicht des linken Herzmuskels schätzungsweise über einen Bereich von 0.2 bis 2.0 ml min⁻¹g⁻¹ (Camici 1997).

Allen aufgeführten Verfahren ist gemeinsam, dass sie in kleinsten Arealen des Herzmuskels ein breites Spektrum der lokalen Durchblutung belegen: Niedrigster und höchster lokaler Blutfluss unterscheiden sich mindestens um den Faktor 3, und regelhaft wurden in einzelnen Proben bis zu 10-fache Unterschiede gefunden.

1.2.2 Zeitliche Durchblutungsheterogenität

Die lokale Durchblutung des Herzens steht auch unter dem Einfluss zeitlicher Änderungen des koronaren Blutflusses. Denn die myokardiale Perfusion erfolgt im Gegensatz zu anderen Organen, die dank der Windkesselfunktion der großen elastischen Gefäße weniger einem pulsatilen als einem kontinuierlichen Blutstrom ausgesetzt sind, größtenteils in der Diastole. Die hohen intramuralen Drucke sowie die direkte Verlegung der Koronararterien an ihrem aortalen Abgang führen zu einer deutlichen Reduktion des systolischen Koronarflusses, der sich in der linken Koronararterie sogar umkehren kann (Feigl 1983).

Kurzfristige, spontane Änderungen des lokalen Blutflusses wie das "twinkling of capillary flows" (Yipintsoi 1973) stehen eventuell in Zusammenhang mit der phasischen Koronardurchblutung. Sie sind jedoch nur von untergeordneter Bedeutung für die Stabilität des lokalen Durchblutungsmusters des Herzens (King 1985). Zudem wird zunehmend in Frage gestellt, ob Durchblutungsänderungen innerhalb derart kurzer Zeiträume mit Hilfe der Mikrosphärentechnik überhaupt erfassbar sind, da durch die einmalige Gabe von Mikrosphären vielmehr ein wenige Minuten umfassender, durchschnittlicher lokaler Blutfluss gemessen wird (Deussen 1998). Daher sind auch die von Sestier et al. erhobenen Befunde einer periodisch im Intervall von 45 - 90 Sekunden schwankenden lokalen Durchblutung des Herzens (Sestier 1978) in Zweifel zu ziehen.

Durch die wiederholte Injektion radioaktiver Mikrosphären zu unterschiedlichen Zeitpunkten lässt sich eine beachtliche Stabilität des lokalen Durchblutungsmusters des Herzens belegen: Für Zeiträume von bis zu 120 Minuten ist die Korrelation sukzessiv gemessener lokaler Blutflüsse untereinander genauso hoch wie bei simultaner Verabreichung der Mikrosphären. Die Korrelationskoeffizienten liegen in beiden Fällen zwischen 0.98 und 0.85 (Deussen 1998). Neueste Untersuchungen belegen, dass sich die lokale Durchblutungsheterogenität des Herzens nahezu unverändert auch über weitaus größere Zeiträume von bis zu 13 Tagen erstrecken kann (Janosi 2001).

Voraussetzung für die Stabilität des lokalen Durchblutungsmusters des Herzens sind jedoch ähnliche Herz-Kreislaufverhältnisse zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Hämodynamische Schwankungen in Form von adrenerger Stimulation oder metabolischer Vasodilatation führen zu einer Zunahme der lokalen Durchblutung, die primär niedrigperfundierte Arealen relativ stärker betrifft als zuvor bereits hochperfundierte. Nach Abklingen der Stimulation kehren die lokalen Blutflüsse wieder in den Bereich ihrer Ausgangswerte zurück (Deussen 1996, Groeneveld 1992).

Im Gegensatz dazu bewirkt eine Koronargefäßstenosierung eine Änderung der lokalen Durchblutung, die eine völlige Umverteilung von hoch- und niedrigperfundierten Arealen zur Folge hat (Bussemaker 1997). Interessanterweise erwies sich in wiederholten Messungen unter Stenosebedingungen eine einmal induzierte Änderung des lokalen Durchblutungsmusters als stabil, so dass der Einfluss des Faktors Zeit auf die Durchblutung des Herzmuskels auch unter dauerhaft geänderten Bedingungen gering scheint (Loncar 1998).

Zeitliche Änderungen des lokalen Blutflusses erklären somit ebenso wie der durch die Mikrosphärentechnik hervorgerufene Messfehler nur einen kleinen Teil der beobachteten Durchblutungsheterogenität des Herzens. Auf beide Faktoren zusammen lässt sich eine Streuung der lokalen Blutflüsse von 0.1 - 0.14 zurückführen (King 1985, Deussen 1998). Die tatsächlich beobachteten lokalen Blutflüsse des Herzens weisen jedoch Variationskoeffizienten zwischen 0.21 und 0.35 auf. Die beobachtete Heterogenität der myokardialen Durchblutung ist somit vielmehr räumlicher Natur, also möglicherweise durch den Aufbau und/oder Tonus des koronaren Gefäßsystems bedingt.

1.2.3 Aufbau des koronaren Gefäßsystems

Die überwiegend räumliche Natur der Durchblutungsheterogenität des Herzens erfordert eine nähere Betrachtung der an der myokardialen Durchblutung beteiligten anatomischen Strukturen.

Das Herz wird über die beiden direkt aus der Aorta entspringenden Koronararterien mit Blut versorgt. Noch im epikardialen Fettgewebe teilt sich die linke Koronararterie in zwei große Hauptstämme, den Ramus interventricularis anterior und Ramus circumflexus, die sich in der Herzmuskelwand in einen bis an das Endokard heranreichenden Gefäßbaum verzweigen. Dieser mündet auf kapillärer Ebene in einem dichten Gefäßnetz, das die Herzmuskelzellen derart umgibt, dass jede einzelne von vier Kapillaren begleitet ist. Auf diese Weise werden die Herzmuskelzellen im Strom- und Gegenstromprinzip von Blut umflossen, das sich zudem in multiplen interkapillären Verbindungen durchmischt (Kassab 1993, 1994).

Das Verzweigungsmuster des koronaren Gefäßsystems hat zu der Überlegung geführt, die Heterogenität der lokalen Durchblutung des Herzens auf die dichotome Teilung der Gefäße zurückzuführen. In Modellberechnungen lässt sich unter Berücksichtigung von jeweils diskreten Abweichungen im Teilungswinkel und Querschnitt der Gefäße ein lokales Durchblutungsspektrum konstruieren, das sowohl der beobachteten Heterogenität der myokardialen Durchblutung wie auch ihrem fraktalen Charakter gerecht werden kann (Bassingthwaighte 1989, Van Beek 1989, Van Bavel 1992, Tanaka 1999).

Ob der dichotome Aufbau des koronaren Gefäßsystems jedoch Ursache oder Folge des lokalen Durchblutungsmusters des Herzens ist, lässt sich anhand der oben genannten Modellberechnungen nicht beurteilen. Sicherlich ist aber die beobachtete Durchblutungsheterogenität des Herzens kein statisches Phänomen, denn bis auf eine mikroskopische Ebene von ca. 0.03 mm³ zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit des lokalen Blutflusses vom koronaren Gefäßtonus (Bauer 2001). Daher sind neben anatomisch-strukturellen Ursachen vor allem funktionelle Mechanismen für die lokal heterogene Durchblutung des Herzens verantwortlich.

1.2.4 Regulation der Koronardurchblutung

Der koronare Gefäßtonus wird über Endothel- und glatte Muskelzellen in der Gefäßwand reguliert, die wiederum unter dem Einfluss zahlreicher, zum Teil direkt von den Herzmuskelzellen gebildeter Faktoren stehen. Durch noch nicht erschöpfend geklärte Mechanismen werden in diesem vielfach kontrollierten System Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Herzens eng aufeinander abgestimmt.

Die Beeinflussbarkeit des myokardialen Blutflusses durch lokal gebildete metabolische Faktoren stellt den bedeutsamsten Mechanismus für die Regulation der lokalen Durchblung des Herzens dar. Dieser wirkt vor allem an den dem Kapillarbett unmittelbar vorgeschalteten Arteriolen, die wenigstens 60% des gesamten koronaren Gefäßwiderstandes ausmachen (DeFily 1995). Änderungen des lokalen Sauerstoffoder Kohlendioxidpartialdrucks, Schwankungen im pH-Wert und der Elektrolytzusammensetzung oder durch die Herzmuskelzellen freigesetztes Laktat können den Tonus der Arteriolen direkt beeinflussen. Diese Faktoren allein erklären jedoch nicht hinreichend, dass der koronare Ruheblutfluss bei erhöhter Herzarbeit auf das 4- bis 5-fache des Ausgangswertes ansteigen kann (Olsson 1992).

Lange Zeit wurde vermutet, dass ADP und Adenosin, beides Abbauprodukte der ATP-Hydrolyse, die entscheidenden Faktoren seien, die den lokalen Blutfluss dem jeweiligen O₂-Bedarf anpassten. Neuere Untersuchungen am Hundeherzen zeigten jedoch, dass selbst eine 4-fache Steigerung des Sauerstoffverbrauches sowie eine zusätzliche Blockade der Adenosinrezeptoren zu keiner wesentlichen Zunahme der Adenosinkonzentration führen (Kroll 1994, Tune 2000). Somit ist die physiologische Rolle des Adenosins in der Regulation des koronaren Gefäßtonus in Frage gestellt.

Das Gefäßendothel kann durch die Synthese einer Vielzahl von vasoaktiven Mediatoren in die Regulation des koronaren Blutflusses eingreifen. Endothelin und Angiotensin führen beispielsweise zu einer Vasokonstriktion, wie auch die Arachidonsäurederivate Thromboxan und Prostaglandin-H₂. Prostazyklin hingegen wirkt vasodilatierend, ebenso der "endothelium derived hyperpolarising factor", EDHF, und Stickstoffmonoxid (Ganz 1997). Das tatsächliche Gewicht dieser vasoaktiven Substanzen in der Regulation des koronaren Blutflusses ist jedoch noch

nicht hinreichend geklärt, obwohl für eine Vielzahl der Mediatoren die zu ihrer Synthese führenden Mechanismen bereits bekannt sind.

Die direkte Gefäßdilatation bei Zunahme des koronaren Blutflusses wird beispielsweise durch das Endothel vermittelt. Die erhöhte Scherspannung an der Endotheloberfläche führt hierbei zu einer vermehrten Freisetzung von Stickstoffmonoxid, was über eine Verminderung des koronaren Gefäßwiderstandes eine weitere Zunahme des koronaren Blutflusses bewirkt (Kuo 1990). Steigt hingegen der koronare Perfusionsdruck an, steht das Vermögen der glatten Gefäßmuskelzellen im Vordergrund, eine vermehrte Dehnung direkt mit einer Kontraktion zu beantworten. Durch den höheren Druckabfall in kontrahierten Widerstandsgefäßen wird auf diese Weise bis zu aortalen Mitteldrücken von 130 mmHg eine gleichbleibende Durchblutung des nachgeschalteten Kapillarbettes ermöglicht (Olsson 1992, DeFily 1995). Diese autoregulatorischen Mechanismen wirken vor allem im Bereich kleiner Arterien, die etwa 40% des koronaren Gefäßwiderstandes ausmachen (Chilian 1995).

Der direkte Einfluss des vegetativen Nervensystems auf den koronaren Gefäßtonus ist für die Regulation der myokardialen Durchblutung insgesamt von untergeordneter Bedeutung. Zwar ist für Acetylcholin eine direkte, von der Integrität des Endothels abhängige Wirkung an Gefäßen belegt (Furchgott 1980), doch ist die physiologische Relevanz dieses vagalen Einflusses auf die Koronargefäße nicht klar (Feigl 1983). Das sympathische Nervensystem kann über α - und β -Rezeptoren vor allem den Tonus epikardialer Leitungs- und kleinerer Widerstandsgefäße beeinflussen. Diese direkte Rezeptor-vermittelte Gefäßregulation wird jedoch von lokal-metabolischen Faktoren übertroffen, die aus der Sympathikus-induzierten Steigerung des Stoffwechsels resultieren (Miyashiro 1993).

Humorale Faktoren wie beispielsweise Vasopressin, das atriale natriuretische Peptid und Angiotension II können ebenfalls Einfluss auf den koronaren Gefäßtonus nehmen. Jedoch sind sehr hohe Plasmaspiegel erforderlich, um direkte Effekte an den Koronargefäßen beobachten zu können, so dass die physiologische Relevanz humoraler Faktoren für die Regulation der Koronardurchblutung eher gering ist (Olsson 1992).

11

Die Durchblutung des Herzens steht somit unter dem Einfluss vieler Faktoren, deren physiologische Bedeutung in den einzelnen Abschnitten des koronaren Gefäßbaumes zum Teil erheblich variieren kann, zum Teil aber auch noch nicht hinreichend geklärt ist. Da die Durchblutungsheterogenität sich auf einer Ebene findet, auf der von den Herzmuskelzellen freigesetzte Stoffwechselprodukte den größten Einfluss auf den Blutfluss haben, spiegelt die lokal heterogene Durchblutung möglicherweise einen heterogenen Stoffwechsel des Herzens wider.

1.3 Heterogenität des kardialen Stoffwechsels

Der Stoffwechsel des Herzens ist stark vom Sauerstoffangebot abhängig, da die Herzmuskelzelle mehr als 90% des ATP durch oxidative Phosphorylierung gewinnt. Angesichts der hohen durchschnittlichen Sauerstoffextraktion von über 60% kann ein vermindertes Sauerstoffangebot nicht durch eine weitere Erhöhung der O_{2} -Ausschöpfung ausgeglichen werden (Feigl 1983).

Vor diesem Hintergrund überrascht das Ausmaß der beobachteten Durchblutungsheterogenität, die einen wenigstens 3-fachen Unterschied im lokalen Sauerstoffangebot bewirkt. Denn morphologische Untersuchungen in ca. 80 mm³ großen Herzarealen mit einer mehr als 3-fachen Differenz im lokalen Blutfluss ergaben, dass hoch- und niedrigperfundierte Gebiete sich weder in der Myofibrillendichte noch in der Anzahl an Mitochondrien unterscheiden (Sonntag 1996).

Es gibt somit keinen strukturellen Anhalt, der auf eine dauerhafte Heterogenität im lokalen Sauerstoffbedarf des Herzens schließen lässt, obgleich die beobachtete Durchblutungsheterogenität über wenigstens einige Stunden bis hin zu mehreren Tagen stabil ist (King 1985, Janosi 2001). Deshalb ist eine nähere Betrachtung der Auswirkungen der Durchblutungsheterogenität auf den kardialen Zell- und Energiestoffwechsel unumgänglich.

1.3.1 Grundzüge des kardialen Energiestoffwechsels

Die Aufrechterhaltung einer energetischen Homöostase erfordert am Herzen eine enge Abstimmung zwischen ATP-Bildung und -Verbrauch. Da der myokardiale ATP-Verbrauch unter Ruhebedingungen mit ca. 30 µmol min⁻¹g⁻¹ ein Vielfaches über der

zellulären ATP-Konzentration von lediglich 4 µmol/g liegt, sind bei fehlender Neusynthese die ATP-Reserven bereits innerhalb weniger Sekunden erschöpft. Auch Kreatinphosphat, das als "Energie-Shuttle" eine unmittelbare Rephosphorylierung des verbrauchten ATP ermöglicht, verzögert dies nur unwesentlich, obwohl es mit 8 µmol/g der 2-fachen ATP-Konzentration entspricht (Heinemann 1990).

Angesichts der Schnelle, mit der die ATP-Bildung einem gesteigerten ATP-Verbrauch nachkommen muss, ist die Einbindung der aus der ATP-Hydrolyse hervorgehenden Adeninnukleotide in die Regulation der oxidativen Phosphorylierung naheliegend. Als unmittelbares Abbauprodukt des ATP vermag ADP im Sinne einer positiven Rück-kopplung die oxidative Phosphorylierung zu beschleunigen, sofern das O₂-Angebot parallel zur ADP-Konzentration erhöht ist (Chance 1955). Auf diese Weise könnte frühzeitig einem ATP-Verlust entgegengewirkt werden.

Eine Zunahme der Herzarbeit ist jedoch nicht zwangsläufig auch von einem Anstieg der ADP-Konzentration gefolgt (Olsson 1990). Dies trifft auch für Adenosin, das Endprodukt der ATP-Hydrolyse, zu. Über seine gefäßerweiternde Wirkung könnte es bei gesteigertem ATP-Verbrauch den zur ATP-Neusynthese erforderlichen Sauerstoff bereitstellen. Doch auch bei dauerhaft gesteigerter Herzarbeit ließ sich kein Anstieg der Adenosinkonzentration nachweisen (Kroll 1994). Somit ist die Anpassung der oxidativen Phosphorylierung an einen gesteigerten ATP-Verbrauch nicht ausschließlich auf ADP- und Adenosin-vermittelte Rückkopplungsmechanismen zurückzuführen.

War hingegen infolge Sauerstoffmangels die Phosphorylierungskapazität der Herzmuskelzellen kritisch herabgesetzt, ließ sich sehrwohl eine Zunahme der Adenosinkonzentration beobachten (Schrader 1977). Diese war sogar stärker ausgeprägt, als es sich allein aus dem Anstieg der AMP-Konzentration ableiten ließ, so dass die Herzmuskelzelle über einen Mechanismus verfügt, eine bereits geringe Beeinträchtigung des Energiestatus in eine deutliche Zunahme der Adenosinkonzentration zu übersetzen (Decking 1997). Durch seine vasodilatierende und antiadrenerge Wirkung kann Adenosin somit frühzeitig verhelfen, das Gleichgewicht zwischen ATP-Synthese und -Verbrauch wiederherzustellen (Schrader 1990).

13

Obwohl die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien die wichtigste ATP-Quelle darstellt, kann die Herzmuskelzelle einen gesteigerten ATP-Verbrauch auch ohne Sauerstoff, beispielsweise durch anaerobe Glykolyse, ausgleichen. Wegen der geringen Energieausbeute ist diese jedoch im Vergleich zur aeroben Glykolyse die deutlich unökonomischere Form der Energiegewinnung. Zudem bewirkt die Laktatanhäufung eine Abnahme des Redox-Potentials, was zu einer Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels und der Zellstruktur führen kann (Opie 1991). Eine weitere Form der anaeroben ATP-Gewinnung ist noch über den Abbau von Glutamat möglich, das als α -Ketoglutarat in den Zitronensäurezyklus eingeschleust jedoch die unökonomischste Variante der ATP-Bildung und deshalb nur die allerletzte Option darstellt (Wiesner 1988).

Trotz dieser Möglichkeiten der anaeroben Energiegewinnung bleibt die oxidative Phosphorylierung die wesentliche ATP-Quelle der Herzmuskelzelle. Daher hat das O₂-Angebot einen limitierenden Einfluss auf die ATP-Bildung. Im Gegensatz hierzu ist das Substratangebot nur von untergeordneter Bedeutung, denn zum einen extrahiert das Myokard lediglich einen Bruchteil der im Blut vorhandenen Substrate, zum anderen passt es ihre Verwertung flexibel dem Angebot an: Unter Ruhebedingungen werden zu ca. 65% freie Fettsäuren oxidiert, während Glukose mit ca. 30% einen deutlich geringeren Beitrag leistet. Bei starker körperlicher Belastung wird hingegen aus der Skelettmuskulatur vermehrt freigesetztes Laktat zu über 60% verstoffwechselt, der Anteil von freien Fettsäuren und Glukose nimmt hingegen ab (Van der Vusse 1992).

Aufgrund des reichen Substratangebotes und der flexiblen Substratverwertung führt somit selbst eine extreme Steigerung der Herzarbeit nicht zu einer Beeinträchtigung des kardialen Energiestatus, solange das Sauerstoffangebot den Sauerstoffbedarf deckt (van Bilsen 1998).

1.3.2 Direkte Sauerstoffmessungen

Die Güte des Sauerstoffangebotes auf lokaler Ebene des Herzens wurde bereits zu einem Zeitpunkt untersucht, als die Durchblutungsheterogenität in ihrem vollen Ausmaß noch nicht bekannt war. Dazu wurde entweder die Sauerstoffsättigung des Blutes in kleinsten Gefäßen gemessen oder der Sauerstoffpartialdruck in Kapillaren des Herzmuskels bestimmt.

Am isolierten Hundeherzen schwankt die durch mikroskopische Oximetrie ermittelte Sauerstoffsättigung in kleinen subendokardnahen Venen (SvO_2) zwischen 0 und 68 %, wobei fast ein Drittel aller Werte eine SvO_2 unter 10% aufweist (Monroe 1975). Ähnlich niedrige venöse Sauerstoffsättigungen mit Werten unter 20% in einem Fünftel aller Messungen wurden bereits zuvor beschrieben (Gamble 1974) und stimmen zudem gut mit kapillären Sauerstoffpartialdrucken überein, die mit Clark-Sonden am Hundeherzen in situ gemessen wurden: In über 60% der Fälle liegt hierbei der kapilläre PO₂ unter 18.8 mmHg, wobei die niedrigsten O₂-Partialdrucke nur 0 bis 5 mmHg betragen (Lösse 1974). Derart niedrige, stark streuende venöse O₂-Stättigungen und kapilläre O₂-Partialdrucke deuten an, dass lokaler Sauerstoffverbrauch und Blutfluss des Herzens möglicherweise nicht gut aufeinander abgestimmt sind. In einzelnen Bereichen des Herzens scheint das Sauerstoffangebot den Sauerstoffbedarf deutlich zu unterschreiten.

Im Gegensatz hierzu finden sich im Hundeherzen in situ weder auf arterieller noch auf venöser Seite Unterschiede in der Sauerstoffsättigung zwischen kleinen Gefäßen der rechten und linken Herzwand sowie des Septums (Weiss 1977). Erst auf einem kapillären Niveau zeigt sich, verglichen mit der Herzaußenwand, eine niedrigere Sauerstoffsättigung in der inneren Herzmuskelschicht (41 bzw. 53 %, Holtz 1977). Das Verhältnis von O₂-Angebot und -Verbrauch scheint somit in epikardnahen Arealen günstiger zu sein als in subendokardialen Bereichen des Herzens. Da letztere jedoch trotz der niedrigeren venösen Sauerstoffsättigungen vermehrt durchblutet werden, folgt das lokale O₂-Angebot scheinbar dennoch einem vermutlich gesteigerten O₂-Verbrauch im Subendokard. Angesichts der Durchblutungsunterschiede zwischen der freien Herzwand und dem Septum sprechen auch hier die einander ähnelnden venösen O₂-Sättigungen für eine gute lokale Abstimmung von O₂-Angebot und -Verbrauch.

Zu einem ähnlichen Schluss kommen auch die Autoren einer neueren Untersuchung, in der in ca. 0.3 mm³ großen Arealen des Schweineherzens über die O₂-abhängige Phosphoreszenz von Pd-Porphyrin auf nicht-invasive Weise ein mikrovaskulärer O₂- Partialdruck von 16.8 \pm 4.2 mmHg gemessen wurde (Zuurbier 1999). Dieser bestätigt zwar den bereits von Lösse et al. gemessenen durchschnittlichen kapillären PO₂-Wert von 18.8 mmHg, doch ließen sich die extrem niedrigen Sauerstoffpartialdrücke von 0 bis 5 mmHg, die zu der Annahme eines von der lokalen Durchblutung losgelösten Sauerstoffverbrauches führten (Lösse 1974), nicht mehr nachweisen. Da im Gegenteil die Streuung der Sauerstoffpartialdrücke geringer ist als die der lokalen Blutflüsse, schlossen Zuurbier et al. auf eine enge Kopplung zwischen Durchblutung und lokalem O₂-Verbrauch des Herzens (Zuurbier 1999).

Die direkten Sauerstoffmessungen am Herzen führen somit insgesamt zu widersprüchlichen Ergebnissen hinsichtlich der Güte des lokalen Sauerstoffangebotes. Möglicherweise ist dies der nachhaltigen Beeinflussung der kardialen Durchblutung und des Stoffwechsels durch die in den älteren Untersuchungen angewandte invasive Oximetrie zuzuschreiben.

1.3.3 Steady-State Metabolite

Um die Auswirkungen der wenigstens 3-fachen Differenz im lokalen Blutfluss auf den Zellstoffwechsel des Herzens zu untersuchen, wurden in hoch- und niedrigperfundierten Arealen die Gehalte eng mit dem Energiestoffwechsel verknüpfter Metabolite bestimmt. Doch auch hier finden sich teils widersprüchliche Ergebnisse.

Im blutperfundierten Kaninchenherzen findet sich beispielsweise keine Korrelation des ATP- und Phosphokreatingehaltes mit dem lokalen Blutfluss (Kleinert 1981). Hingegen ließ sich in ca. 2 g großen Proben des Hundeherzens *in situ* neben einer schwach positiven Korrelation zwischen ATP-Gehalt und lokalem Blutfluss auch ein leichter Anstieg des Glykogengehaltes mit zunehmendem Blutfluss verzeichnen (Franzen 1988). Obwohl weder der ATP- noch der Glykogengehalt sensitive Parameter zur Erfassung des Energiestatus der Herzmuskelzelle sind, könnte eine verminderte Konzentration in Niedrigflussarealen auf eine Imbalance zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf hinweisen.

Da ein den Sauerstoffbedarf der Zelle unterschreitendes Sauerstoffangebot eine vermehrte Adenosinbildung zur Folge hat (Schrader 1977), wurden hoch- und niedrigperfundierte Areale des Herzens zusätzlich auf Unterschiede hinsichtlich der

Adenosinkonzentration überprüft. Der Adenosingehalt der Niedrigflussareale ist im Vergleich zu Hochflussarealen jedoch nicht erhöht (Sonntag 1996). In Übereinstimmung mit diesem Befund steht, dass niedrigperfundierte Areale des Herzens keine erhöhten Laktatgehalte aufweisen und somit ATP nicht vermehrt aus dem anaeroben Abbau von Glukose gewinnen (Loncar 1998). Über diese sensitiven Marker lässt sich ein O₂-Mangel in Niedrigflussarealen deshalb nahezu ausschließen.

1.3.4 Enzyme

Da die Befunde zu den aus dem Energiestoffwechsel des Herzens hervorgehenden Metaboliten keinen Anhalt für ein unzureichendes Sauerstoffangebot in Niedrigflussarealen liefern, wurde in einem weiteren Ansatz untersucht, ob es eine der Durchblutungsheterogenität entsprechende Heterogenität in der enzymatischen Ausstattung der Herzmuskelzelle gibt. Doch auch hier sind die Daten zum Teil in sich widersprüchlich.

Im Hundeherzen findet sich eine schwach positive Korrelationen der Enzymaktivitäten der zytosolischen Kreatinkinase und Laktatdehydrogenase mit dem lokalen Blutfluss (Franzen 1988). Ebenso ist die Aktivität der mitochondrialen Succinatdehydrogenase des Schweineherzens (Bussemaker 1994) sowie der Adenylatzyklase (Rodriguez 1993) in Hochflussarealen gesteigert. Da die Kreatinkinase über Kreatinphosphat die schnelle Form der ATP-Regeneration vermittelt, die Succinatdehydrogenase als Schlüsselenzym des Citratzyklus die Generierung von Reduktionsäquivalenten beeinflusst sowie die Adenylatzyklase den second messenger des sympatho-adrenergen Systems cAMP bildet, haben Hochflussareale scheinbar eine größere Kapazität, energiereiche Phosphate bereitzustellen und zu verbrauchen.

Im Gegensatz hierzu stehen Befunde zur Citratsynthetase, ebenfalls enzymatischer Bestandteil des Zitronensäurezyklus, und zur Cytochrom-C-Oxidase, einem Schlüsselenzym der Atmungskette. Für beide Enzyme ließ sich in Hoch- und Niedrigflussarealen keine unterschiedliche Aktivität nachweisen (Sonntag 1996). Gleiches trifft auch für zwei Schlüsselenzyme der Glykolyse zu. Weder die Aktivität

17

der Phosphoglyceratkinase noch die der Hexokinase weisen eine Korrelation mit dem lokalen Blutfluss auf (Sonntag 1996).

Anhand der Analyse von Enzymaktivitäten entscheidender Stoffwechselkreisläufe lässt sich somit insgesamt keine eindeutige Tendenz zu einer größeren Syntheseleistung und einem höherem Verbrauch von energiereichen Phosphaten in Hochflussarealen feststellen. Zudem vermag die Aktivität einzelner an Schlüsselpositionen lokalisierter Enzyme zwar die Kapazität der Herzmuskelzelle zur Substratverwertung widerzuspiegeln, Aussagen über den tatsächlichen Umsatz sind jedoch nicht möglich. Hierzu müssten anstelle der maximalen Umsatzraten *in vitro* vielmehr die aktuellen Umsatzraten *in vivo* ermittelt werden (van der Vusse 1989).

1.3.5 Aufnahme- und Transportraten

Angesichts des ausstehenden 40ses eines lokal heterogenen Stoffwechsels wurden in einem weiteren Ansatz Hoch- und Niedrigflussareale des Herzens hinsichtlich der Aufnahme und Metabolisierung von Fettsäuren und Glukose, den zwei wichtigsten Substraten der Herzmuskelzelle, untersucht.

Für das Hundeherz ließ sich belegen, dass freie Fettsäuren in Hochflussarealen vermehrt über die Kapillarmembran transportiert, von den Zellen aufgenommen und auch stärker metabolisiert werden als in Niedrigflussarealen (Groeneveld 1993, Caldwell 1994). Dies trifft in ähnlicher Weise auch auf Glukose zu, deren vermehrte Aufnahme in Hochflussarealen sich in Modellberechnungen am besten mit einer parallel gesteigerten Glukose-Phosphorylierung (Hexokinase-Reaktion) vereinbaren lässt (Sonntag 1996, Deussen 1997).

Zwar deuten die Befunde einer vermehrten Aufnahme und Metabolisierung von Fettsäuren und Glukose auf einen insgesamt gesteigerten Stoffwechsel in Hochflussarealen hin, doch liefern sie nicht den endgültigen Beweis eines heterogenen Energieumsatzes und Sauerstoffverbrauches des Herzens. Hierzu müsste zusätzlich gezeigt werden, dass bei verminderter Fettsäure- oder Glukoseverstoffwechselung in Niedrigflussarealen keine alternativen Substrate an deren Stelle oxidiert werden (Deussen 1998). In Anbetracht der flexiblen Substratwahl des Herzmuskels ist dieser Nachweis praktisch jedoch schwer zu erbringen.

18

1.4 Fragestellung

Vor diesesm Hintergrund bleibt die Frage, ob der Durchblutungsheterogenität des Herzens, die einen wenigstens 3-fachen Unterschied im lokalen Sauerstoffangebot bedingt, tatsächlich auch ein Unterschied im lokalen Sauerstoffverbrauch und Energieumsatz entspricht, immer noch unbeantwortet.

Wäre der lokale Sauerstoffverbrauch in hoch- und niedrigperfundierten Arealen des Herzens gleich, so würde bei einer durchschnittlichen O₂-Extraktion von über 60% das im Vergleich zu Mittelflussarealen auf weniger als 50% reduzierte Sauerstoffangebot in Niedrigflussarealen zu einer unzureichenden Deckung des O₂-Bedarfs führen. Niedrigflussareale, immerhin ca. 1/10 des gesamten Herzmuskels, wären demnach bereits unter physiologischen Bedingungen O₂-unterversorgt. Käme es dann infolge einer koronaren Gefäßstenose noch zu einer weiteren Abnahme des Sauerstoffangebotes, wären Niedrigflussareale wegen der fehlenden Sauerstoffreserve in größter Gefahr, einen möglicherweise irreversiblen Zellschaden zu erleiden. Hochflussareale hingegen wären deutlich weniger gefährdet. Denn sie würden, ein einheitlicher Sauerstoffverbrauch vorausgesetzt, unter physiologischen Bedingungen von einer weit über ihrem O₂-Bedarf liegenden Durchblutung profitieren. Distal einer koronaren Gefäßstenose wäre dann die "Luxusperfusion" möglicherweise lediglich auf ein dem O₂-Verbrauch angemessenes Maß reduziert, wodurch weder Zellfunktion noch -struktur beeinträchtigt würden.

Wäre hingegen der Sauerstoffverbrauch parallel zum lokalen Blutfluss in stärker durchbluteten Arealen des Herzens gesteigert, in niedrigperfundierten hingegen reduziert, würde sich eine Reduktion des Sauerstoffangebotes möglicherweise auf Hoch- und Niedrigflussareale in gleichem Maße auswirken. Denn ein ausgewogenes Verhältnis zwischen lokalem Sauerstoffangebot und -verbrauch könnte einen lokal heterogenen Energiebedarf des Herzens widerspiegeln. Hochflussareale wären demnach stärker durchblutet, weil sie möglicherweise einen größeren Teil der Herzarbeit verrichten als Niedrigflussareale. Unter dieser Annahme wären letztere bei einer weiteren Abnahme des Sauerstoffangebotes keiner größeren Gefahr ausgesetzt als Hochflussareale, da ihr O₂-Bedarf parallel zum Blutfluss vermindert ist. Angesichts der Stabilität des lokalen Blutflusses unter Ruhebedingungen müssten Hochflussarealen somit strukturelle oder molekulare Unterschiede zu

Niedrigflussarealen aufweisen, die einen dauerhaft erhöhten O₂-Bedarf begründen können. Aufgrund der Fähigkeit zur kurzfristigen Änderung des lokalen Blutflusses könnten aber auch funktionelle Mechanismen die Grundlage eines möglicherweise heterogenen Energiebedarfs des Herzens bilden.

Zur Klärung der Frage, ob der Sauerstoffverbrauch des Herzens eine der Durchblutung entsprechende lokale Heterogenität aufweist, können direkte O₂-Verbrauchsmessungen, wie sie beispielsweise mit Hilfe der Positronenemissionstomographie und ¹⁵O-Sauerstoff möglich sind, bislang nicht herangezogen werden. Denn sie erreichen zum einen nicht die nötige räumliche Auflösung, in der sich die Durchblutungsheterogenität manifestiert, zum anderen messen sie lediglich relative Unterschiede im O₂-Verbrauch, ohne gleichzeitig den Blutfluss zu erfassen (Li 1996). Der indirekte, auf dem Fick'schen-Prinzip beruhende Ansatz, den O₂-Verbrauch aus lokalem Blutfluss und arterio-venöser Sauerstoffdifferenz zu berechnen, scheitert zum einen an der Ungenauigkeit der Oximetrie, in kleinsten Arteriolen und Venolen die Sauerstoffsättigung valide zu erfassen (siehe Punkt 3.2), sowie an der technischen Schwierigkeit, deren Versorgungsgebiet klar abzugrenzen.

Das Ziel vorliegenden Arbeit bestand daher darin, lokalen der den Sauerstoffverbrauch in ca. 200 mm³ großen Arealen des Hundeherzens in situ indirekt aus der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus abzuleiten. Aus dem Vergleich Blutfluss die mit dem lokalen kann SO Hypothese einer der Durchblutungsheterogenität entsprechenden Heterogenität des Sauerstoffverbrauches und Energieumsatzes überprüft werden.

1.5 Theoretischer Ansatz

Die Verstoffwechselung von ¹³C-markiertem, den Herzmuskelzellen als Substrat angebotenem Pyruvat im Zitronensäurezyklus lässt sich mit Hilfe der Magnetresonanzspektroskopie verfolgen. Dabei kann aus der Geschwindigkeit, mit der die Kohlenstoffatome an den Positionen 4 und 3 des zytosolischen Glutamats durch ¹³C-Atome ersetzt werden, die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus abgeleitet werden.

1.5.1 Verstoffwechselung von [3-¹³C]Pyruvat im Zitronensäurezyklus

Dem Herzen angebotenes $[3^{-13}C]$ Pyruvat gelangt über das Zytosol ins Mitochondrium und wird dort durch die Pyruvatdehydrogenase zu $[2^{-13}C]$ Acetyl-CoA dekarboxyliert. Im Zitronensäurezyklus reagiert $[2^{-13}C]$ Acetyl-CoA mit Oxalazetat zu $[4^{-13}C]$ Citrat. Aconitase und Isocitratdehydrogenase liefern $[4^{-13}C]\alpha$ -Ketoglutarat, das über den Malat-Aspartat-Shuttle in raschem Austausch mit dem Zytosol steht. $[4^{-13}C]\alpha$ -Ketoglutarat wird durch die Glutamatdehydrogenase zu $[4^{-13}C]$ Glutamat umgewandelt. Der mitochondrial verbliebene Teil des $[4^{-13}C]\alpha$ -Ketoglutarats durchläuft weiter den Citratzyklus: Durch die α -Ketoglutaratdehydrogenase entsteht Succinat. Da es sich hierbei um ein chirales Molekül handelt, findet sich mit gleicher Wahrscheinlichkeit $[3^{-13}C]$ - oder $[2^{-13}C]$ Succinat. An diesen Positionen verharrt die Markierung, bis es auf der Stufe des Oxalazetats zu einer erneuten Reaktion mit Acetyl-CoA kommt (Abbildung 1).



Abb. 1: Verstoffwechselung von [3-¹³C]Pyruvat im Zitronensäurezyklus. Der einmalige Durchsatz liefert [4-¹³C]Glutamat, bevor nach erneutem Durchlaufen die Isotopomeren [3-¹³C]- respektive [2-¹³C]Glutamat entstehen. Auf dem Niveau des Succinats finden sich aufgrund der Chiralität des Moleküls entweder [3-¹³C]- oder [2-¹³C]-Stereoformen.

Entstammt das Acetyl-CoA beim zweiten Durchsatz dem dargebotenen [3-¹³C]Pyruvat, entsteht zweifach markiertes [2,4-¹³C]- bzw. [3,4-¹³C]Citrat und im weiteren Verlauf entsprechendes Glutamat. Trifft das [2-¹³C] bzw. [3-¹³C]Oxalazetat jedoch auf nicht ¹³C-markiertes Acetyl-CoA, entsteht einfach markiertes [2-¹³C] respektive [3-¹³C]Citrat. Auch dieses wird im Zytosol in die entsprechenden Glutamatformen umgewandelt.

Das der Herzmuskelzelle als Substrat angebotene [3-¹³C]Pyruvat wird somit im Zitronensäurezyklus so verstoffwechselt, dass zunächst [4-¹³C]Glutamat entsteht und erst im zweiten Durchsatz [3-¹³C]-, [2-¹³C]-, [4,3-¹³C]- oder [4,2-¹³C]Glutamat folgen. [3,2-¹³C]- oder [4,3,2-¹³C]Glutamat hingegen sind erst nach der dritten Passage zu verzeichnen. Die sukzessive ¹³C-Markierung des Gutamats an unterschiedlichen Positionen bietet folglich die Möglichkeit, die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus abzuschätzen (Chance 1983, Chatham 1995).

1.5.2 Modellgrundlagen

Die Verstoffwechselung des [3-¹³C]Pyruvats im Zitronensäurezyklus lässt sich auch in einem mathematischen Modell beschreiben. Dieses ist einem Rechenmodell zur [2-¹³C]Azetat-Kompartimentierung angelehnt (Yu 1995), umfasst jedoch neben den Metaboliten des Citratzyklus zusätzlich Teile des Laktat-, Alanin- und Glutamat-stoffwechsels sowie mit dem Zitronensäurezyklus in engem Austausch stehende Stoffwechselwege (Abbildung 2). Unter Berücksichtigung der einzelnen Modell-parameter kann so die Umsatzrate des Citratzyklus anhand der Abfolge der verschiedenen Glutamatisotopomeren quantifiziert werden.



Abb. 2: Vereinfachtes Schema des $[3-^{13}C]$ Pyruvatmetabolismus im Zitronensäurezyklus. Pyr-C3, $[3-^{13}C]$ Pyruvat; Ac-CoA, Acetyl-CoA; Cit, Citrat; α -KG, α -Ketoglutarat; Glu, Glutamat; Mal, Malat; Oaa, Oxalazetat.

 $[4-^{13}C]\alpha$ -KG wird zu $[3-^{13}C]$ Succinat, Malat und Oxalazetat umgewandelt. Die ^{13}C -Markierung findet sich jedoch mit gleicher Wahrscheinlichkeit auch an Position 2 des Succinats und der nachfolgenden Metabolite (nicht aufgeführt).

° bedeutet Zweitmarkierung innerhalb des Zitronensäurezyklus.

 $J_{TCA} \text{ entspricht der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus. } F_1-F_4 \text{ bezeichnen Austausch-reaktionen (}F_1: mitochondriales α-Ketoglutarat \lefta- zytosolisches Glutamat; } F_2: mitochondriales Oxalazetat \lefta- zytosolisches Aspartat; } F_3: Laktatdehydrogenase; } F_4: Alaninaminotransferase), F_5 die Umwandlung von Glutamat in Glutamin über die Glutaminsynthetase.$

y * J_{TCA} steht für den Austausch der Metaboliten des Zitronensäurezyklus mit ¹³C-markierten oder unmarkierten Metaboliten über externe Stoffwechselwege (Anaplerose).

1.5.3 Modellvorhersagen

Aufgrund des hohen zytosolischen Glutamatgehaltes werden in der Magnetresonanzspektroskopie die ¹³C-Glutamatisotopomere trotz kleinster Probevolumina und niedriger Markierungsgrade erfasst. Die Intensität der Signale hängt sowohl von der Größe als auch von dem ¹³C-Anreicherungsgrad des zellulären Glutamatpools ab, welcher entscheidend von der Applikationsdauer des [3-¹³C]Pyruvats und der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus (J_{TCA}) bestimmt wird. Anhand von Modellberechnungen lässt sich veranschaulichen, dass nach 12 Minuten [3-¹³C]Pyruvatinfusion die fraktionelle Anreicherung im [4-¹³C]Glutamat bereits fast ihr Maximum erreicht hat, während sich im [3-¹³C]Glutamat niedriger und hoher J_{TCA} noch deutlich unterscheiden (Abbildung 3).



Abb. 3: [4-¹³C]- und [3-¹³C]Glutamatanreicherung unter [3-¹³C]Pyruvatinfusion. Je größer die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus und je länger die Infusionsdauer desto schneller erfolgt die Anreicherung im [4-¹³C]- und [3-¹³C]Glutamat.

Da [4-¹³C]Glutamat im zeitlichen Verlauf vor [3-¹³C]Glutamat gebildet wird, kann der Quotient aus beiden z.B. nach 12 Minuten Infusionsdauer als Maß für die Umsatzrate des Citratzyklus (J_{TCA}) angesehen werden: Das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis nähert sich umso schneller einem Verhältnis von 1:1, je größer der Umsatz im Zitronensäurezyklus ist (Abbildung 4).



Abb. 4: Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis bei verschiedenen Umsatzraten des Citratzyklus. Nach 12 minütiger Infusion von [3-¹³C]Pyruvat trennt das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis klar zwischen hohem und niedrigem Umsatz im Zitronensäurezyklus.

Eine Infusionsdauer von 60 Minuten jedoch bewirkt eine Sättigung des zellulären Glutamatpools mit ¹³C-Kohlenstoff, so dass bei maximaler Anreicherung im $[4-^{13}C]$ - und $[3-^{13}C]$ Glutamat hoher und niedriger J_{TCA} zu demselben Glutamat $[4-^{13}C]/[3-^{13}C]$ - Verhältnis führen (Abbildung 5).



Abb. 5: Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis nach 60 Minuten [3-¹³C]Pyruvatinfusion. Hoher und niedriger Umsatz im Zitronensäurezyklus lassen sich durch das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis nicht mehr unterscheiden.

Somit lässt sich die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus anhand des Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnisses nur dann bestimmen, wenn die Dauer der [3-¹³C]Pyruvatgabe so bemessen wird, dass einerseits eine ausreichende Signalqualität in der NMR-Spektroskopie gewährleistet ist, andererseits hohe und niedrige Umsatzraten des Zitronensäurezyklus noch klar durch das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis getrennt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsprotokoll

Die Versuche wurden an sieben Beagle-Hunden mit einem Körpergewicht zwischen 12 und 19 kg durchgeführt, die der hauseigenen Tierversuchsanlage enstammten (Eigenzucht der Tierversuchsanlage, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Mit Piritramid (3 mg/kg (Bolus), 0.6 mg kg⁻¹h⁻¹ iv.), Midazolam (2 mg/kg (Bolus), 0.6 mg kg⁻¹h⁻¹ i.v.) und Vecuronium (0.2 mg/kg (Bolus), 0.12 mg kg⁻¹h⁻¹ i.v.) erfolgte die Narkotisierung der Tiere, die für den Zeitraum des Experimentes mit sauerstoffangereicherter Luft (FiO₂ = 0.3) und positiv endexspiratorischem Druck (PEEP = 2 cm H₂0) maschinell beatmet wurden (Modell 874 052, Braun Melsungen). Über einen in die Arteria femoralis dextra eingebrachten F-9-Katheter ließen sich arterielle Blutproben zur Blutgasanalyse entnehmen (Acid-Base Laboratory 30, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) sowie der periphere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz kontinuierlich aufzeichnen (Gould Statham Instruments, Oxnard, Calif., USA). Die Überwachung der Vitalfunktionen wurde zusätzlich durch ein 3-Kanal-EKG ergänzt. Ein in die Vena femoralis dextra eingebrachter F-10-Katheter diente der Flüssigkeitssubstitution mit Tyrodelösung (ca. 10 ml kg⁻¹h⁻¹).

Unter stabilen Herzkreislaufverhältnissen und in Normothermie (Thermistor: Modell BAT 8, Bailey Instruments, Saddle Brook, N.J./ USA) erfolgte die Thorakotomie im 3. - 5. Interkostalraum. Nach Resektion der Rippen und Freilegung des Perikards wurde dieses eröffnet und der Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie freipräpariert. Ein mit Kontaktgel beschichteter Flussmesskopf (Transonic, Ithaka, New York, USA) wurde zur Messung des koronaren Blutflusses auf das Gefäß plaziert. Über einen via Vena jugularis interna in den Sinus coronarius vorgeschobenen Katheter konnte koronarvenöses Blut gewonnen werden, so dass sich aus dem koronaren Blutfluss und der arterio-koronarvenösen Sauerstoffdifferenz der myokardiale Sauerstoffverbrauch berechnen ließ.

Um einen umschriebenen Teil des Herzventrikels selektiv, jedoch möglichst physiologisch perfundieren zu können, wurde ein Bypass zwischen dem freigelegten Ramus interventricularis anterior der linken Herzkranzarterie und der rechten A. carotis communis angelegt. Nach systemischer Antikoagulation mit 5000 IE Heparin

(Liquemin[®], i.v.) und Thrombozytenaggregationshemmung mit 200 mg Azetylsalizylsäure (Aspisol[®], i.v.) erfolgte zunächst die Kanülierung der A. carotis communis mit einem großlumigen Katheter, dessen freies Ende mit einer dem Durchmesser der Koronarie entsprechenden Kunststoffkanüle versehen war. Nach Füllung des Systems mit arteriellem Blut wurde der RIVA bei schlagendem Herzen distal und proximal der geplanten Anastomosierungsstelle ligiert, inzidiert und mit der Kunststoffkanüle kanüliert. Unmittelbar nach deren Fixierung wurde die nun aus der A. carotis communis über das Schlauchsystem erfolgende Koronarperfusion freigegeben. Die Ischämiezeiten zwischen Ligatur und Start der Bypassperfusion lagen je nach Operationssitus zwischen 20 und 100 Sekunden. Blutdruck und Blutflussgeschwindigkeit des Bypasssystems normalisierten sich schnell, so dass nach 20 - 30 Minuten mit dem Versuchsablauf fortgefahren wurde.

Durch sukzessive Verwendung radioaktiver Mikrosphären mit voneinander abgrenzbaren Energiespektren ließ sich der lokale Blutfluss des Herzens zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Experimentes erfassen. Die verwendete Menge an Mikrosphären war so berechnet, dass mehr als 200 Mikrosphären pro untersuchtem Herzareal garantiert waren. Die in 10% Dextran und 0.1% Tween suspendierten Mikrosphären hatten einen Durchmesser von 15.2 \pm 0.1 µm und wurden für 10 - 20 Minuten Ultraschall ausgesetzt, bevor sie mit 1.5 ml Blut vermischt über 1 Minute zügig als Bolus verabreicht wurden. Innerhalb des Bypasssystems diente eine der Koronararterie vorgeschaltete Durchmischungskammer der gleichmäßigen Verteilung der Mikrosphären im Blutstrom.

Über einen in das linke Herzohr vorgeschobenen Katheter wurden zuerst ⁴⁶Scandium-Mikrosphären (⁴⁶Sc, 1 ml entsprechend 3.7 x 10⁶ Bq) verabreicht, wodurch sich die myokardiale Durchblutung unmittelbar nach Perikardiotomie bestimmen ließ. ½ Minute vor bis 2 Minuten nach der Injektion wurde arterielles Blut mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min über eine Perfusorspritzenpumpe (Perfusor: B. Braun Melsungen AG) aus dem in der A. femoralis liegenden Katheter aspiriert. Die hierin gefundene Radioaktivität bildete als arterielles Referenzorgan die Grundlage der Berechnung des lokalen Blutflusses.

Um das ausschließlich durch den koronaren Bypass versorgte Herzareal zu demarkieren, wurde ein auf 37° C temperiertes Reservoir, das über ein T-Stück im Nebenschluss des Bypasssystems stand, mit arteriellem Blut aus dem Karotis-

katheter gefüllt. Über eine Rollpumpe erfolgte hieraus für ca. 2.5 Minuten eine vom großen Kreislauf unabhängige Koronarperfusion in der zuvor beobachteten Blutflussgeschwindigkeit, während über den im linken Vorhof liegenden Katheter erneut Mikrosphären in den Systemkreislauf injiziert wurden (⁸⁵Strontium, ⁸⁵Sr, 1 ml entsprechend 3.7 x 10⁶ Bq). Nach der vollständigen Extraktion der Mikrosphären aus dem Blut wurde die vorübergehend aus dem Reservoir stammende Bypassperfusion wieder von der A. carotis communis übernommen. Auf diese Weise erfolgte eine ⁸⁵Sr-Markierung aller Areale, die nicht ausschließlich vom Bypass durchblutet wurden.

Bei stabilem koronaren Blutfluss wurde daraufhin eine [3-¹³C]Pyruvatlösung (200 mM [3-¹³C]Pyruvat in Tyrodelösung) mit einer Perfusorspritzenpumpe in einer Endkonzentration von 2 mM in den Bypass appliziert. Dies geschah über einen Zeitraum von 12 Minuten (Hunde 1 - 5) oder 60 Minuten (Hunde 6 - 7). Vor (Hunde 1 - 5) bzw. 10 Minuten nach Beginn der [3-¹³C]Pyruvatinfusion (Hunde 6 - 7) wurden als weitere Mikrosphären zunächst ¹⁵³Gadolinium (¹⁵³Gd, 0.3 ml entsprechend 11.1 x 10⁵ Bq) in den Bypass injiziert. Unter laufender Pyruvatinfusion folgte dann unmittelbar vor Exzision die Gabe von ¹¹³Zinn (¹¹³Sn 0.3 ml entsprechend 11.1 x 10⁵ Bq).

Daraufhin wurde derjenige Teil des linken Ventrikels en bloc exzidiert, der ungefähr dem Versorgungsbereich des koronaren Bypasses entsprach. Das entnommene Myokard wurde für 2 Sekunden in eisgekühlte Tyrodelösung getaucht, um Blutreste zu entfernen, bevor es zwischen zwei Kupferblöcken in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Die weitere Lagerung erfolgte bei - 70° C.

2.2 Aufbereitung und Berechnung des lokalen Blutflusses

Zur Aufbereitung wurde das tiefgefrorene Herzareal zunächst über 48 Stunden lyophyllisiert (LYOVAC GT 2, Finnaqua, Köln) und anschließend unter luftdichtem Abschluss bei - 70° C verwahrt. Nach Bestimmung des Gesamtgewichtes (elektronische Analysen- und Mikrowaage, Mettler AE 240) wurde das lyophyllisierte Herz zunächst parallel, dann quer zur Herzachse in je 8 Teile geschnitten. Die resultierenden Gewebeblöcke wurden daraufhin in endoepikardialer Richtung wiederum in 4 Teile zerlegt, so dass pro Herz ca. 256 Einzelproben mit einem Trockengewicht von 40 - 50 mg anfielen. Die Messung der Radioaktivität der Herzproben (counts per minute [cpm]) erfolgte über jeweils 5 Minuten in einem Gamma-Counter (Wizard 1480, Wallac, Turku, Finnland). Da die Energiespektren der Mikrosphären zum Teil einander überlappten, wurde die Trennschärfe einerseits durch enge Aufnahmefenster erhöht (Tabelle 1), andererseits wurden Überschneidungen der Energiespektren durch Normalisierung mit Standards und Leerwerten herausgemittelt (corrected counts per minute [ccpm], MultiCalc software 1.84, Wallac).

Mikrosphären	Aktivität Aufnahmefenster	Injektionsort	Zweck
⁴⁶ Scandium	26 dpm/MS 850-1000 keV	linkes Atrium	lokaler Blutfluss nach Perikardio- tomie (gesamtes Myokard)
⁸⁵ Strontium	28 dpm/MS 490-530 keV	linkes Atrium (Perfusion des Bypassareals aus Reservoir)	Markierung aller nicht ausschließlich durch den Bypass versorgten Areale
¹⁵³ Gadolinium	39 dpm/MS 84-104 keV	koronarer Bypass	lokaler Blutfluss vor (Exp. 1-5) bzw. kurz nach Start der Pyruvatgabe (Exp. 6-7)
¹¹³ Zinn	32 dpm/MS 430-470 keV	koronarer Bypass	lokaler Blutfluss während der Pyruvatinfusion

Tab. 1: Physikalische Eigenschaften, Aufnahmefenster, Injektionsort und Funktion der Mikrosphären. Pro Experiment wurden ca. 8 Millionen ⁴⁶Sc- und ⁸⁵Sr-Mikrosphären sowie ca. 2 Millionen ¹⁵³Gd- und ¹¹³Sn-Mikrosphären verwendet, so dass sich in jeder Herzprobe des Bypass- und Kontrollareals mehr als 200 Mikrosphären fanden.

Während der Gabe von ⁴⁶Scandium-Mikrosphären flossen 10 ml Blut / min in ein arterielles Referenzorgan, so dass die Radioaktivität dieses Blutes (⁴⁶Sc-
ccpm_[Referenz]) zur Quantifizierung des lokalen Blutflusses der einzelnen Herzproben (⁴⁶Sc-Blutfluss_[Probe]) herangezogen werden konnte.

• ⁴⁶Sc-Blutfluss_[Probe] = (⁴⁶Sc-ccpm_[Probe] / ⁴⁶Sc-ccpm_[Referenz]) x 10 ml/min

Während der ¹⁵³Gadolinium-Applikation ließ sich aus technischen Gründen dem Bypass keine arterielle Referenz entnehmen. Da der Blutfluss des Bypasssystems jedoch kontinuierlich gemessen wurde und die mittlere myokardiale Perfusion unter ⁴⁶Scandium-Gabe (⁴⁶Sc-Blutfluss_[Mittel]) bekannt war, ließ sich mit Hilfe der durchschnittlichen ¹⁵³Gadolinium-Aktivität (¹⁵³Gd-ccpm_[Mittel]) auch hier eine Referenz-aktivität berechnen.

Auf die gleiche Weise wurde auch die ¹¹³Sn-Referenzaktivität berechnet, so dass sich durch Umwandlung der erstgenannten Formel der lokale Blutfluss des Herzens zum Zeitpunkt jeder weiteren Mikrosphärengabe bestimmen ließ.

Nach der Berechnung des lokalen Blutflusses wurden die ca. 256 Proben jedes Hundeherzens in unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Als Bypassareale wurden Areale bezeichnet, deren Perfusion ausschließlich über den koronaren Bypass erfolgte. Hierzu zählten im Durchschnitt ca. 30% aller Proben, die mit ¹⁵³Gadolinium und ¹¹³Zinn markiert waren, ohne eine ⁸⁵Strontium-Aktivität aufzuweisen. Zu Kontrollarealen wurden Proben gerechnet, die ⁸⁵Strontium markiert waren, jedoch weder eine ¹⁵³Gadolinium- noch eine ¹¹³Zinn-Aktivität zeigten. Ihre Durchblutung war somit vom Bypass unabhängig.

Zusätzlich wurden die Proben in Hoch-, Mittel- und Niedrigflussareale gruppiert. Proben, deren lokaler Blutfluss \geq 140% des koronaren Mittelflusses betrug, stellten Hochflussareale dar. Lag die Durchblutung hingegen bei \leq 60% des koronaren Mittelflusses, so fielen sie der Klasse der Niedrigflussareale zu. Als Mittelflussgebiete wurden Herzareale mit einem Blutfluss von 100 \pm 5 % des mittleren Koronarflusses bezeichnet.

2.3 Extraktion

Nach der Bestimmung des lokalen Blutflusses wurden aus den Bypass- und Kontrollarealen der Hundeherzen alle Hoch- (n = 56) und Niedrigflussgebiete (n = 55) sowie eine ähnliche Anzahl von Mittelflussarealen (n = 52) weiter verarbeitet. Zunächst erfolgte die Homogenisierung der Herzproben (Ultra-Turrax, IKA Labortechnik, Stauffen, BRD) in 3 ml 0.5 molarer eisgekühlter Perchlorsäure (HCIO₄). Die nicht gelösten Bestandteile wurden mit 16000 g bei 4° C über 20 Minuten abzentrifugiert (Sorvall[®] RC-5B, Refrigerated Superspeed Centrifuge, DuPont Instruments, Bad Homburg) und der radioaktiven Entsorgung zugeführt. Die Titration der von Radioaktivität nahezu freien Extrakte auf einen pH-Wert von 5.5 - 6.5 erfolgte mit 2 molarer Kaliumlauge (KOH). Das dabei ausfallende Kaliumchlorid wurde durch Zentrifugation mit 4000 g bei 4° C entfernt, die Überstände in Rundkolben überführt, bei - 80° C tiefgefroren und daraufhin über 24 Stunden Iyophyllisiert (LYOVAC GT 2, Finnaqua, Köln). Bis zur weiteren Analyse lagerten die Lyophyllisate unter Luftabschluss bei - 80° C.

2.4 NMR-Technik und Auswertung

Zur magnetresonanzspektroskopischen Messung wurden die Lyophyllisate in 2.25 ml D_2O gelöst und ihnen 20 µl einer 100 mM [2-¹³C]Azetatlösung als Standard hinzugesetzt, was eine exakte Kalibrierung der NMR-Spektren ermöglichte.

Die NMR-Spektren wurden in einem Bruker AMX-400-WB NMR-Spektrometer mit einem Cryomagneten BZH 400/89 und einer magnetischen Feldstärke von 9.4 Tesla generiert. Verwendet wurde ein 10 mm Breitbandprobenkopf (Helmholtz Spulentyp). Bei einer Resonanzfrequenz von 100.6 MHz wurden die Messungen mit einer Zweiphasen-(19dB/26dB)-Waltz16-Protonenentkopplung gefahren. Das Aufnahmefenster umfasste 121 ppm mit 8000 Datenpunkten in der zeitlichen Domäne. Die gewählte Pulsdauer von 18.6 µs entsprach einem 70° Puls und ermöglichte eine Repetitionszeit von ca. 1.5 sec/Puls (Verzögerungszeit = 1.15 sec, Aufnahmezeit = 0.33 sec). Pro Probe wurden 24.000 Scans aufgezeichnet, was einer Gesamtmesszeit von 10.5 Stunden entsprach. Die Temperatur während der Messungen lag konstant bei 295 K. Die Rohdaten wurden nach exponentieller Multiplikation mit einer Linien-Verbreiterung von 1 Hz einer Fourier-Transformation unterzogen. Nach Phasierung und Basislinienkorrektur der Spektren erfolgte die Integration der Flächen unter den Peaks (UXNMR, Bruker analytische Messtechnik). Da sich Unterschiede in der Signalintensität zum Beispiel aufgrund von Signalsättigung bei kurzer Repetitionszeit oder Nuclear Overhauser Effekte nicht direkt auf unterschiedliche ¹³C-Gehalte zurückführen lassen, erfolgte die Umrechnung über eine unter gleichen Aufnahmebedingungen gemessene Standardlösung. Diese enthielt 100 mM Glutamat, Laktat und Alanin in D₂O gelöst und ermöglichte unter Berücksichtigung des natürlichen Vorkommens von ¹³C-Metaboliten von 1.1% die exakte Quantifizierung der ¹³C-Metabolite anhand der NMR-Spektren.

2.5 Isotopomeranalyse

Die Glutamatisotopomeren stellen sich in der NMR-Spektroskopie je nach der Position des ¹³C-Kohlenstoffatoms unterschiedlich dar. Eine Einfachmarkierung des [4-¹³C]Glutamats resultiert in einem Singulett bei 34 ppm, ebenso eine Doppelmarkierung, sofern nicht die Positionen C3 und C5 betroffen sind (z.B. [4,2-¹³C]Glutamat). Ist jedoch wie beim [4,3-¹³C]Glutamat eines dieser benachbarten Kohlenstoffatome ¹³C-markiert, so wird das Signal aufgrund von Spin-Interaktionen der benachbarten Kerne in zwei Teile gleicher Intensität gespalten. Es resultiert ein Duplett, das bei gleichzeitigem Vorliegen von einfach markiertem [4-¹³C]Glutamat um dessen singulären Peak zentriert ist.

Das $[3-^{13}C]$ Glutamat resoniert ebenfalls in Form eines Singuletts, jedoch bei 28 ppm. Es wird von einem einzigen Duplett umgeben, das aufgrund identischer Kopplungskonstanten (J₂₃ = J₃₄) sowohl der Doppelmarkierung des [2,3-¹³C]- als auch des [4,3-¹³C]Glutamats entspricht. Die Übereinstimmung der Kopplungskonstanten bedingt auch, dass die Dreifachmarkierung des [4,3,2-¹³C]Glutamats lediglich in einem Triplett resultiert. Bei 28 ppm sind somit maximal fünf Peaks zu beobachten, wovon die dem [4,3,2-¹³C]Glutamat entsprechenden jedoch kaum auszumachen sind (Abbildung 6).



Abb.6: Isotopomeranalyse. Glutamatspektrum einer Myokardprobe nach 60 Minuten [3-¹³C]Pyruvat. Das Trockengewicht betrug 61 mg. Die einzelnen Peaks sind den jeweiligen Glutamatisotopomeren zugeordnet.

2.6 Biochemische Analyse

Die Quantifizierung der Metabolite des Zitronensäurezyklus und mit ihm in Interaktion stehender Stoffwechselwege erfolgte spektrophotometrisch (Perkin-Elmer UV/VIS Spektrometer mit Printer, Modell 557, Bodenseewerk Perkin-Elmer&Co GmbH, Überlingen) in Halbmikro-Kunststoffküvetten der Schichtdicke d = 1 cm (Sarstedt, GmbH&Co, Nümbrecht).

Die zellulären Gehalte an Glutamat, Citrat, Alanin, Laktat und Aspartat wurden in jeder Einzelprobe gemessen, wohingegen niedriger konzentrierte Metabolite wie α -Ketoglutarat, Malat und Oxalazetat in Pools aus Gewebeproben gleicher Flussklassen mit einem Trockengewicht von 120 - 200 mg ermittelt wurden. Die Konzentration des Glutamats wie auch der Metabolite der Kontrollareale wurde unmittelbar nach Aufnahme der Lyophyllisate in 2.25 ml D₂O gemessen. Alle anderen Stoffwechselprodukte wurden erst nach der NMR-Messung aus entsprechenden Aliquots bestimmt. Die enzymatische Analyse folgte mit geringen Modifizierungen den in Bergmeyer, Methods of enzymatic analysis, 1984, vorgeschlagenen Grundzügen. Modifizierungen der Tests lassen sich ebenso wie Testprinzipien und verwendete Wellenlängen der folgenden Zusammenstellung entnehmen.

<u>Glutamat</u>

Prinzip:



Testansatz:

1. Triethanolamin - Phosphatpuffer (0.08 M TRA, 0.02 M KPO ₄)	:	1000 µl
2. 6.7 mM β-NAD ⁺	:	80 µl
3. Jodnitrotetrazoliumchlorid (INT, 1.19 mM)	:	80 µl
4. Diaphorase (1mg Protein/ml)	:	20 µl
5. Glutamatdehydrogenase (Boehringer)	:	20 µl

Es wurden 20 µl des Extraktes mit 180 µl H₂O verdünnt und den Lösungen 1 - 4 zugesetzt. Bei λ = 492 nm wurde die Extinktion (E₁) bestimmt. Durch Zugabe der Glutamatdehydrogenase wurde die Reaktion gestartet und nach 15 Minuten die Zunahme der Formazanbildung (E₂) ermittelt. Der Glutamatgehalt der Einzelproben ergab sich aus der Differenz (E₂ – E₁).

<u>Citrat</u>

Prinzip:

- 1. Citrat
- 2. Oxalazetat + NADH + H⁺
- 3. Oxalazetat



4. Pyruvat + NADH + H^+

Die Aerobacter aerogenes entstammende Citratlyase ist kontaminiert mit Oxalazetatdecarboxylase. Um das hierdurch entstehende Pyruvat (Reaktion 3) ebenso zu erfassen wie das durch die Citratlyase produzierte Oxalazetat (Reaktion 1), bedient man sich zweier Indikatorenzyme (Laktatdehydrogenase und Malatdehydrogenase) und verfolgt die Abnahme des NADH-Gehaltes.

Testansatz:

1. Glycylglycin/Zinkchloridpuffer (Gly-Gly 0.5 mM, Zn ²⁺ 0.6 mM)	:	300 µl
2. β - NADH (10 mM)	:	30 µl
3. Malatdehydrogenase (0.1 ml)/Laktatdehydrogenase (1.0 ml)	:	20 µl
4. Citratlyase (40 IU/ml)	:	10 µl

Die Lösungen 1 - 3 wurden zusammen mit 200 μ l des Extraktes vermischt und nach 5 Minuten bei λ = 365 nm die Extinktion (E₁) ermittelt. Zugabe der Citratlyase startete die Reaktion. Nach 15 Minuten wurde E₂ bestimmt. Die Differenz (E₂ – E₁) entsprach dem Citratgehalt.

<u>Alanin</u>

Prinzip:

1. L-Alanin + NAD⁺ + H₂O \longrightarrow Pvru

Pyruvat + NADH + NH₄⁺

Testansatz:

1. Hydrazin/TRIS/EDTA Puffer (TRIS 40 mM, Hydrazin 1 M,		
EDTA 1.4 mM, pH = 9.0)	:	650 µl
2. β-NAD ⁺ (24 mM)	:	30 µl
3. L-Alanin-Dehydrogenase (150 IU/ml)	:	10 µl

Nach Zusammenführen der Lösungen 1 - 2 mit 100 μ l Probe wurde bei einer Wellenlänge von 365 nm die Extinktion (E₁) bestimmt. 40 Minuten nach Zufügen der L-Alanin-Dehydrogenase wurde die NADH-Zunahme ermittelt (E₂) und aus der Differenz (E₂ – E₁) der Alaningehalt errechnet.

<u>Laktat</u>

Prinzip:

1. L - Laktat + NAD⁺

 \leftarrow Pyruvat + NADH + H⁺

Durch Abfangen des entstehenden Pyruvats mit Hydrazin wird das Gleichgewicht der Reaktion stark auf die Seite des Pyruvats verschoben.

Laktatdehydrogenase

Testansatz:

1. Glyzin/Hydrazin-Puffer	(1 M Glyzin, 0.4 M Hydrazin, 6 mM EDTA,		
	3.2 mM NAD^+ bei pH 9.5)	:	1 ml
2. Laktatdehydrogenase	(LDH)	:	10 µl

Kurz nach Zugabe der Probe (200 μ I) wurde E₁ bestimmt. 40 Minuten nach Start der Reaktion 1 durch die Laktatdehydrogenase wurde die Zunahme des NADH (E₂) bei einer Wellenlänge von 365 nm ermittelt. Die Differenz (E₂ – E₁) entsprach dem Laktatgehalt.

<u>Aspartat</u>

Prinzip:

	Aspartatamino- transferase		
1. L-Aspartat + α -Ketoglutarat	\longrightarrow	Oxalazeta	t + L-Glutamat
2. Oxalazetat + NADH + H⁺	Malatdehydrogenase	L-Malat +	NAD⁺
Testansatz:			
1. Phosphatpuffer (67 mM, pH = 7.2)		:	450 µl
2. β-NADH (12 mM)		:	15 µl
3. α-Ketoglutarat (0.1 M)		:	20 µl
4. Malatdehydrogenase (MDH)		:	2 µl
5. Aspartataminotransferase (AST)		:	10 µl

Durch Zusammenfügen der Lösungen 1 - 4 mit 150 ml der Probe erhielt man E_1 bei λ = 365 nm. Nach Zugabe der Aspartataminotransferase wurde 20 Minuten gewartet und E_2 ermittelt. Über die Differenz ($E_2 - E_1$) ließ sich der Aspartatgehalt errechnen.

<u>α-Ketoglutarat</u>

Prinzip:

1. α-Ketoglutarat + NADH	Glutamat + NAD ⁺
Testansatz:	

1. Triethanolamin (133 mM) / EDTA (13 mM) Puffer	:	250 µl
2. Adenosindiphosphat (33.5 mM)	:	100 µl
3. NADH (1 mM)	:	25 µl
4. Glutamatdehydrogenase	:	10 µl

Die Lösungen 1 - 3 wurden mit jeweils 500 μ l der Extrakte der Gewebepools vermischt, dann E₁ bei einer Wellenlänge von 365 nm bestimmt. 10 Minuten nach Zuführen der Glutamatdehydrogenase wurde E₂ ermittelt. Die Differenz (E₂ – E₁) ergab den Gehalt an α -Ketoglutarat.

<u>Malat</u>

Die Quantifizierung des Malats erfolgte mit dem Testansatz, der schon bei der Laktatbestimmung verwendet wurde, jedoch wurde anstatt der Laktatdehydrogenase 10 μ l Malatdehydrogenase eingesetzt. Das Probenvolumen betrug 200 μ l. E₂ wurde nach 10 Minuten Reaktionszeit bei λ = 365 nm ermittelt.

Prinzip:

Oxalazetat + NADH

Testansatz:

1. Triethanolamin (133 mM) / EDTA (13 mM) Puffer	:	250 µl
2. NADH (1 mM)	:	25 µl
3. Malatdehydrogenase	:	10 µl

Malatdehydrogenase

Malat + NAD⁺

Anhand des nach Enzymzugabe entstehenden NADH wurde durch Zunahme der Extinktion bei λ = 365 nm der Gehalt an Oxalazetat ermittelt.

2.7 Fraktionelle Anreicherung

Die fraktionelle Anreicherung der Gewebemetaboliten mit ¹³C-Kohlenstoff spiegelt den Grad der Aufnahme und Metabolisierung des dargebotenen [3-¹³C]Pyruvats wider. Sie entspricht dem Quotienten aus der magnetresonanzspektroskopisch ermittelten Konzentration und dem enzymatisch bestimmten Metabolitgehalt.

• FE = [Metabolit]_{NMR} [Metabolit]_{enzymatisch} Da die zelluläre Konzentration des Acetyl-CoA zu gering ist, um über klassische enzymatische Analysen in Einzelproben ermittelt zu werden, wurde die fraktionelle Anreicherung stattdessen aus dem Singulett-Duplett-Verhältnis des [4-¹³C]Glutamats unter Berücksichtigung des Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnisses berechnet (Jeffrey 1991).

• $F_{CAcetyl-CoA} = C4D34 \times [3^{-13}C]Glutamat$ [3-¹³C]Glutamat

Hierbei entspricht C4D34 dem relativen Anteil des [4,3-¹³C]Dupletts am gesamten [4-¹³C]Glutamatsignal.

2.8 Statistische Auswertung

Zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen lokaler Durchblutung und Stoffwechsel des Herzens wurden als Zusammenhangsmaße der Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s) und die Produkt-Moment-Korrelation nach Pearson (r) herangezogen.

Der statistische Nachweis von Unterschieden in Stoffwechselaktivität und Metabolitgehalten zwischen den Gruppen der Hoch-, Mittel- und Niedrigflussareale konnte aufgrund des zugrundeliegenden Intervallskalenniveaus mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) erbracht werden. Die Auswirkung der insgesamt 3-fach gestuften unabhängigen Variable (= Blutfluss) auf die abhängige Variable (= Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis, Metabolitgehalt) ließ sich in der ANOVA überprüfen, indem jede einzelne Abstufung der unabhängigen Variable mit jeder der beiden anderen verglichen wurde (hoch vs. niedrig, hoch vs. mittel und niedrig vs. mittel). Prinzipiell entsprach dies der Durchführung eines t-Tests, der denjenigen Varianzanteil einer abhängigen Variable aufdeckt, der sich durch ein 2-fach gestuftes unabhängiges Merkmal erklären lässt.

3 Ergebnisse

3.1 Vitalparameter

Zur Überwachung der Herz- und Kreislauffunktion wurden die hämodynamischen Kontrollparameter und der koronare Blutfluss fortlaufend dokumentiert. Arterielle und koronarvenöse Blutgasanalysen erfolgten in regelmäßigen Abständen (Tabelle 2).

	vor Bypass	Bypass	[3- ¹³ C]Pyruvat
HFQ [min ⁻¹]	93 ± 11	91 ± 9	86 ± 12
RR sys [mmHg]	135 ± 6	149 ± 14	152 ± 13
рН	7.31 ± 0.06	7.29 ± 0.05	7.27 ± 0.06
PO₂ art [mmHg]	108 ± 14	124 ± 50	120 ± 33
PO₂ cv [mmHg]	28 ± 4	32 ± 3	34 ± 3
PCO₂art [mmHg]	37 ± 5	38 ± 9	38 ± 9
PCO ₂ cv [mmHg]	48 ± 9	48 ± 9	50 ± 13
RIVA-Blutfluss [ml/min]	24 ± 8	26 ± 14	25 ± 12

Tab.2: Vitalparameter (n = 7). Die Narkosetiefe wurde anhand von Herzfrequenz und Blutdruck gesteuert, die Ventilation gemäß den Ergebnissen der Blutgasanalyse individuell angepasst.

Herzfrequenz, Blutdruck und die Daten der Blutgasanalyse wurden weder durch die Kanülierung der Koronararterie noch durch die Infusion von 2 mM [3-¹³C]Pyruvat signifikant beeinflusst.

Der aus der arteriokoronarvenösen Sauerstoffdifferenz und dem koronaren Blutfluss ermittelte basale myokardiale Sauerstoffverbrauch betrug $5.2 \pm 1.4 \ \mu mol \ min^{-1}g^{-1}$.

3.2 Myokardiale Durchblutung

3.2.1 Heterogenität der myokardialen Durchblutung

Der lokale Blutfluss des Hundeherzens wies eine beachtliche Heterogenität auf. Es fand sich eine fleckförmige Verteilung von stark und schwach perfundierten ca. 200 mm³ großen Herzarealen, die darin gipfelte, dass Hochflussgebiete zum Teil direkt neben Niedrigflussgebieten zu liegen kamen (Abbildung 7).



Abb. 7: Verteilung der lokalen Durchblutung in einem en bloc exzidierten Teil des Hundeherzens. Die lokale Durchblutung ist als prozentualer Anteil am mittleren koronaren Blutfluss dargestellt. Niedrigflussareale ($\leq 60\%$) sind weiß, stärker perfundierte Hochflussareale ($\geq 140\%$) schwarz markiert. Gebiete mit einer mittleren Durchblutung (60% < x < 140%) werden durch entsprechende Grauabstufungen repräsentiert. Das durchschnittliche Probenfeuchtgewicht betrug ca. 165 mg, der mittlerer Blutfluss 0.74 ml min⁻¹g⁻¹.

Der Vergleich der Durchblutung subendokardialer mit subepikardialen Arealen ergab zudem ein transmurales Perfusionsgefälle von ca. 40% zugunsten der inneren Schicht des Herzmuskels.

Jedes der untersuchten Hundeherzen wies eine derartige räumliche Durchblutungsheterogenität auf, die sich durch die Berechnung der Variationskoeffizienten des lokalen Blutflusses (CV) objektivieren ließ (Tabelle 3).

Versuch	Feuchtgewicht [mg]	lokaler Blutfluss [ml min ⁻¹ g ⁻¹]	Variationskoeffizient der Durchblutung
1	165 ± 65	0.74 ± 0.29	0.39
2	250 ± 85	1.37 ± 0.49	0.36
3	255 ± 70	0.86 ± 0.21	0.24

Versuch	Feuchtgewicht [mg]	lokaler Blutfluss [ml min ⁻¹ g ⁻¹]	Variationskoeffizient der Durchblutung
4	215 ± 55	1.27 ± 0.30	0.24
5	180 ± 50	1.10 ± 0.29	0.26
6	240 ± 70	0.75 ± 0.27	0.36
7	205 ± 65	2.08 ± 0.68	0.33

Tab. 3: Lokale Durchblutungsheterogenität des Herzens. Die Variationskoeffizienten der lokalen Durchblutung des Herzens lagen zwischen 0.24 und 0.39. Das durchschnittliche Probenfeuchtgewicht betrug ca. 210 mg.

Die Normalisierung des lokalen Blutflusses der einzelnen Herzprobe auf den durchschnittlichen myokardialen Blutfluss des jeweiligen Hundes ermöglichte die zusammenfassende Betrachtung aller untersuchten Herzareale (Abbildung 8).



Abb. 8: Relative Häufigkeit von Hoch- und Niedrigflussarealen innerhalb der freien Wand des Hundeherzens (n = 7, 1547 Einzelproben). Hochflussareale (\geq 140%), Mittel-(100 ± 5 %) und Niedrigflussareale (\leq 60% des koronaren Mittelflusses). Die Probengröße entsprach einem mittleren Feuchtgewicht von 209 ± 73 mg.

Bei einer räumlichen Auflösung von ca. $6x6x6 \text{ mm}^3$ wiesen ca. 10% der untersuchten Herzareale einen lokalen Blutfluss $\leq 60\%$ des koronaren Mittelflusses auf. Diesen Niedrigflussarealen standen Hochflussareale gegenüber, die $\geq 140\%$ des mittleren myokardialen Blutflusses erhielten und weitere 10% der untersuchten Proben umfassten. Die lokale Durchblutung variierte in einem Bereich von 0.01 bis 5.71 ml min⁻¹g⁻¹, und selbst zwischen der 10. und 90. Perzentile lag noch ein 2.3-facher Perfusionsunterschied. Die Variationskoeffizienten der Durchblutung, die das Ausmaß der Streuung der lokalen Blutflüsse beschreiben, lagen zwischen 0.24 und 0.39.

Ca. 40% der hier dargestellten Areale wurden unter [3-¹³C]Pyruvatinfusion ausschließlich vom koronaren Bypass versorgt und der weiteren Analytik zugeführt. Innerhalb dieser als Bypassareale bezeichneten Proben lagen die Variations-koeffizienten der myokardialen Durchblutung zwischen 0.28 und 0.40.

3.2.2 Stabilität der myokardialen Durchblutung

Im Verlauf der Experimente änderte sich der koronare Blutfluss nur geringfügig. Zwar führte die Kanülierung der Koronararterie zum Teil zu deutlichen Abweichungen vom Ausgangsfluss, doch hatte die Infusion von 2 mM [3-¹³C]Pyruvat nach Anlage des Bypasses nahezu keinen Einfluss auf die Koronardurchblutung (Abbildung 9).



Abb. 9: Mittlerer koronarer Blutfluss während der Experimente (n = 7). Zunächst wurde die Koronardurchblutung durch einen nicht kanülierenden, nach Anlage des koronararteriellen Bypasses und während der $[3-^{13}C]$ Pyruvatinfusion über einen

kanülierenden Ultraschallmesskopf bestimmt. Als Referenz diente der jeweilige mittlere koronare Blutfluss unter Bypassbedingungen (= 100%).

Auf myokardialer Ebene fanden sich ähnliche Verhältnisse. Das lokale Durchblutungsmuster des Herzens wurde durch die Punktion der Koronararterie zum Teil erheblich verändert, zum Teil fanden sich jedoch auch hohe Korrelationen zwischen dem Blutfluss vor und nach Anlage des Bypasses, so dass insgesamt eine Korrelation von r = 0.49 resultierte (Abbildung 10).



Abb. 10: Lokaler myokardialer Blutfluss vor und nach Punktion der Koronararterie (n = 7). ⁴⁶Scandium wurde vor, ¹¹³ Zinn nach Anlage des Bypasses gegeben. In Experiment 3 fand sich beispielsweise keine Korrelation (r = 0.04), in Experiment 5 hingegen eine sehr hohe Korrelation zwischen dem lokalen Blutfluss vor und nach Punktion der Koronararterie (r = 0.84).

Im Gegensatz zur Änderung der lokalen Durchblutung des Herzens durch Manipulation am koronaren Gefäßsystem ließ sich unter Bypassbedingungen und laufender [3-¹³C]Pyruvatinfusion eine große Stabilität der lokalen Durchblutungsheterogenität des Herzens verzeichnen (Abbildung 11).



Abb.11: Konstanz der Durchblutungsheterogenität unter [3-¹³C]Pyruvatinfusion.¹⁵³Gadolinium wurde vor, ¹¹³Zinn nach der 2 mM [3-¹³C]Pyruvatgabe appliziert. Der durchschnittliche Zeitraum zwischen der Gabe der Mikrosphären betrug 20 Minuten.

In den Versuchen 3 und 4 kam es unter [3-¹³C]Pyruvatinfusion zwar zu einer relativen Perfusionszunahme in Hochflussarealen, jedoch nicht zu einer Umver-

teilung der lokalen Durchblutung, so dass sich an der primären Zuordnung der Herzproben zu Hoch- oder Niedrigflussarealen nichts änderte.

Selbst in den Experimenten, in denen 2 mM [3-¹³C]Pyruvat über 60 Minuten verabreicht wurde, blieb die myokardiale Durchblutung fast unbeeinflusst (Abbildung 12).



Abb.12: Stabilität der Durchblutungsheterogenität unter [3-¹³C]Pyruvat. ¹⁵³Gd wurde 10 Minuten nach Beginn der [3-¹³C]Pyruvatgabe appliziert, ¹¹³Sn unmittelbar vor Exzision des Herzens. Auch nach 50 Minuten 2 mM [3-¹³C]Pyruvat hat sich die Verteilung der lokalen Durchblutung kaum verändert.

Insgesamt ließ sich somit eine hohe Stabilität der lokalen Durchblutung des Herzens für den Zeitraum der [3-¹³C]Pyruvatgabe belegen (Abbildung 13).



Abb. 13: Stabilität der lokalen Durchblutung des Herzens unter $[3-^{13}C]$ Pyruvat (n = 7). Die Gabe von $[3-^{13}C]$ Pyruvat hatte nur einen geringen Einfluss auf die myokardiale Durchblutung.

3.3 ¹³C-NMR-Spektroskopie

3.3.1 Übersichtsspektrum

Die Extrakte der vom koronararteriellen Bypass mit 2 mM $[3-^{13}C]$ Pyruvat perfundierten Hoch- (n = 56), Mittel- (n = 52) und Niedrigflussareale (n = 55) wurden der NMR-Spektroskopie zugeführt. In dem beobachteten Spektralbereich zwischen 10 und 60 ppm fanden sich folgende Zellmetabolite wieder (Abbildung 14).



Abb.14: NMR-Spektrum einer Herzprobe nach 12 Minuten 2 mM [3-¹³C]Pyruvat. Mittelflussprobe (1.65 ml min⁻¹g⁻¹), Feuchtgewicht 280 mg. NMR-Messung: 10 mm Probenkopf, 24000 Scans, Pulslänge 18.6 µs, Verzögerungszeit 1.15s, Aufnahmezeit 0.33s. Zur Kalibrierung wurde ein 20 mM [2-¹³C]Azetat Standard hinzugefügt. Glu, Glutamat; Gln, Glutamin; Asp, Aspartat; Az, Azetat; Lak, Laktat; Ala, Alanin.

3.3.2 Spektrum eines Hoch- und Niedrigflussareals

Die Spektren der Hochflussgebiete unterschieden sich insbesondere im Resonanzbereich des [4-¹³C]- und [3-¹³C]Glutamats wesentlich von jenen niedrigperfundierter Areale. Hochflussareale wiesen insgesamt eine höhere Signalintensität auf als Niedrigflussareale, was sich einerseits auf einen größeren Glutamatgehalt in Hochflussarealen zurückführen lässt. Vor allem spiegelt sich hierin jedoch eine vermehrte Aufnahme und Metabolisierung des angebotenen [3-¹³C]Pyruvats in stärker perfundierten Arealen des Herzens wider. Denn die Zunahme an Signalintensität im Spektrum der Hochflussprobe war zudem unterschiedlich auf die beiden Glutamatisotopomeren verteilt. Relativ zum [4-¹³C]Glutamat erfuhr das [3-¹³C]-Glutamat im Hochflussgebiet einen stärkeren Zuwachs als im Niedrigflussgebiet (Abbildung 15), was einem höheren Umsatz im Zitronensäurezyklus entspricht (siehe Einleitung).

Hochflussprobe Niedrigflussprobe [4-13C]Glu [4-¹³C]Glu [4-13C]Gln [3-13C]Glu [3-¹³C]Glu [3-¹³C]GIn [4-13C]GIn [3-13C]GIn 32 30 32 30 28 36 34 28 26 36 34 26 (ppm) (ppm)

Abb. 15: [4-¹³C]- und [3-¹³C]Glutamatmultiplett in Hoch- und Niedrigflussproben des Herzens. Das Probenfeuchtgewicht des Hoch- und Niedrigflussareals betrug 235 mg resp. 315 mg, der lokale Blutfluss 2.22 ml min⁻¹g⁻¹ und 0.44 ml min⁻¹g⁻¹. Aufnahmeparameter: 10 mm Probenkopf, 24000 Scans, Pulslänge 18.6 μs, Verzögerungszeit 1.15 s, Aufnahmezeit 0.33 s.

Unter Berücksichtigung des Glutamatgesamtgehaltes beider Proben ergab sich für das [4-¹³C]Glutamat ein Anreicherungsgrad von 0.35 im Hochfluss- und 0.29 im Niedrigflussareal, für das [3-¹³C]Glutamat hingegen eine fraktionelle Anreicherung von 0.24 resp. 0.11. Damit betrug das Verhältnis von [4-¹³C]Glutamat zu [3-¹³C]Glutamat im Niedrigflussgebiet 2.7, aber nur 1.5 im Hochflussgebiet.

Die höhere [3-¹³C]Glutamatkonzentration im Hochflussareal lässt sich auch an der Struktur des [4-¹³C]Glutamatmultipletts erkennen. Die Dupletts, die der ¹³C-Zweifachmarkierung des [4,3-¹³C]Glutamats entsprechen, sind relativ zum Singulett im Spektrum der Hochflussprobe deutlich größer. Hier machen sie ca. 45% des gesamten Signals aus, im Spektrum der Niedrigflussprobe jedoch nur ca. 30%. Beide Befunde belegen, dass im Spektrum der Hochflussprobe neben dem absoluten Zuwachs an Signalintensität ein im Vergleich zum Niedrigflussareal noch stärkerer relativer Zuwachs im [3-¹³C]Glutamat zu verzeichnen ist. Da [3-¹³C]Glutamat erst beim zweiten Durchlauf des Zitronensäurezyklus gebildet wird (s. Einleitung), war die Metabolisierung des angebotenen [3-¹³C]Pyruvats in Hochflussarealen des Herzens somit gesteigert.

3.4 Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis

3.4.1 Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis und lokaler Blutfluss

Der Quotient aus [4-¹³C]-und [3-¹³C]Glutamat kann als Maß für die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus herangezogen werden und wurde daher direkt mit dem lokalen myokardialen Blutfluss korreliert. Hierbei wies das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis eine statistisch signifikante umgekehrt proportionale Korrelation zum lokalen Blutfluss des Herzens auf (Abbildung 16).



Abb.16: Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis und lokaler Blutfluss (Hund 3). Das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis korrelierte invers mit dem lokalen Blutfluss. r: Korrelations-

koeffizient nach Pearson, $r_{\rm s}$: Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, P: ANOVA, Bonferoni-Korrektur.

In Hochflussarealen fand sich ein kleineres Glutamat [4^{-13} C]/[3^{-13} C]-Verhältnis als in Niedrigflussarealen (1.32 ± 0.14 vs 1.86 ± 0.21). Dieses lässt sich theoretisch durch eine Abnahme des [4^{-13} C]- oder eine Zunahme des [3^{-13} C]Glutamats in Hochfluss-gebieten erklären. Da die fraktionelle Anreicherung des [4^{-13} C]Glutamats in Hochflussarealen de facto jedoch nicht abfiel, sondern im Gegenteil von 36 ± 12 % in Niedrigflussarealen auf 56 ± 4 % anstieg, unterstreichen die Befunde vielmehr den in den Beispielspektren bereits exemplarisch dargestellten stärkeren Zuwachs an [3^{-13} C]Glutamat. Dieses stieg von 19 ± 5 % in Niedrigflussgebieten auf 43 ± 5 % in Hochflussarealen, worin sich die vermehrte Verstoffwechselung von [3^{-13} C]Pyruvat in Hochflussarealen widerspiegelt.

Die inverse Korrelation zwischen dem Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis und dem lokalen myokardialen Blutfluss fand sich nach 12-minütiger 2 mM [3-¹³C]Pyruvatgabe in allen untersuchten Hundeherzen (Abbildung 17).



Abb.17: Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis und lokaler myokardialer Blutfluss (Herzen 1 - 5). In allen Experimenten korrelierte das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis invers mit dem lokalen Blutfluss. r: Korrelationskoeffizient nach Pearson, r_s : Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, P: ANOVA, Bonferoni-Korrektur.

Der Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient und Rangkorrelationskoeffizient betrugen für alle Bypassproben zusammen r = -0.59 und r_s = -0.58, in den einzelnen Experimenten lagen sie bei $-0.78 \le r \le -0.49$ und $-0.77 \le r_s \le -0.45$.

3.4.2 Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis in Niedrig-, Mittel- und Hochflussarealen

Die Gruppierung der Proben nach der Höhe des lokalen Blutflusses in drei Klassen führte in jedem einzelnen Experiment zu einem signifikant kleineren Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis in Hochfluss- als in Niedrigflussarealen des Herzens. Zum Teil war der Unterschied im Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis selbst zwischen Hochbzw. Niedrigflussarealen und Mittelflussproben signifikant (Abbildung 18).



Abb. 18: Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis in Niedrig-, Mittel- und Hochflussarealen. In jedem der untersuchten Hundeherzen fand sich ein statistisch signifikanter Unterschied im Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen, zum Teil auch zwischen Mittel- und Hoch-, resp. Mittel- und Niedrigflussarealen. ** P < 0.005 (t-Test), * P < 0.05 (t-Test), * P < 0.05 (ANOVA).

Auch die zusammenfassende Betrachtung aller ermittelten Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnisse (n = 5 Hundeherzen) mündete mit 1.64 ± 0.49 versus 2.21 ± 0.75 in einen signifikanten Unterschied zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen (P < 0.01, ANOVA). Letztere unterschieden sich auch von Mittelflussproben, in denen das Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis 1.98 ± 0.48 betrug (P < 0.05 (ANOVA), Abbildung 19).



Abb.19: Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis in Niedrig-, Mittel- und Hochflussarealen des Hundeherzens nach 12 Minuten 2 mM [3-¹³C]Pyruvat (n = 5). Die Unterschiede im Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen sind hoch signifikant. Die Anzahl der untersuchten Herzareale der fünf untersuchten Hundeherzen ist in Klammern angeführt. ^{ovo} P < 0.01 (ANOVA), ^o P < 0.05 (ANOVA).

Das signifikant kleinere Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis in Hochflussarealen des Herzens spiegelt eine im Vergleich zu Niedrigflussarealen gesteigerte Verstoffwechselung von [3-¹³C]Pyruvat im Zitronensäurezyklus wider. Lokaler Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch des Herzens weisen somit eine ähnliche Heterogenität auf wie die myokardiale Durchblutung.

3.5 Metabolite

Um Hoch- und Niedrigflussgebiete des Hundeherzens hinsichtlich weiterer biochemischer Unterschiede zu untersuchen, wurden zusätzlich die Gewebekonzentrationen der Intermediärmetabolite des Zitronensäurezyklus und mit ihm in engem Austausch stehender Stoffwechselwege mittels klassischer enzymatischer Analysen bestimmt (Abbildung 20).





Niedrig-, Mittel-, Hochflussareale

Abb. 20: Glutamat-, Citrat- und Laktatgehalt in Niedrig-, Mittel- und Hochflussproben des Hundeherzens. Den Bypassproben sind Kontrollproben gegenübergestellt, die nicht unter dem Einfluss der [3-¹³C]Pyruvatinfusion standen.

Signifikante Unterschiede innerhalb der Bypass- respektive Kontrollgruppe (___ °), zwischen Bypass- und Kontrollarealen gleicher Flussklassen (*). In Klammern angeführt ist die Anzahl der untersuchten Areale. °, * P < 0.05 (ANOVA).

Innerhalb der Bypassareale korrelierten die myokardialen Glutamat-, Citrat- und insbesondere auch Laktatgehalte positiv mit dem lokalen Blutfluss. In Hochflussarealen waren sie deutlich größer als in Niedrigflussarealen. Die Kontrollareale wiesen zwar ebenfalls tendenziell einen größeren Gehalt an Citrat und Laktat mit zunehmendem lokalen Blutfluss auf, doch konnte nur für Glutamat eine signifikant höhere Konzentration in Hochflussarealen gefunden werden. Im Glutamatgehalt zeigten sich zudem noch signifikante Unterschiede beim Vergleich von Herzproben gleicher Flussklassen aus Bypass- und Kontrollarealen (Abbildung 20).

Der Alanin- und Aspartatgehalt war unabhängig von der lokalen Durchblutung in Niedrig-, Mittel- und Hochflussproben ähnlich (Tabelle 4).

	Niedrigflussareale	Mittelflussareale	Hochflussareale
	[µmol/g feucht]	[µmol/g feucht]	[µmol/g feucht]
Glutamat	1.62 ± 0.48 (42)	2.05 ± 0.53 (30)	2.37 ± 0.43 (37) °
	2.39 ± 0.82 (23) [#]	2.68 ± 0.69 (28) ^{#+}	3.33 ± 1.13 (24) [#] °
Citrat	0.39 ± 0.15 (35)	0.43 ± 0.14 (25)	0.55 ± 0.25 (33) °
	0.37 ± 0.16 (23)	0.38 ± 0.19 (28)	0.47 ± 0.22 (24)
Laktat	2.13 ± 1.96 (35)	4.65 ± 3.34 (24)*	3.80 ± 1.91 (32) °
	2.05 ± 1.48 (23)	2.33 ± 1.30 (28)	2.69 ± 1.46 (23)
Alanin	1.60 ± 1.13 (31)	2.10 ± 1.04 (16)	2.19 ± 0.81 (25)
	1.12 ± 0.48 (17)	1.24 ± 0.66 (28) [#]	1.57 ± 0.76 (17)
Aspartat	0.43 ± 0.12 (20)	0.43 ± 0.10 (17)	0.48 ± 0.20 (13)
	0.37 ± 0.11 (13)	0.36 ± 0.10 (16)	0.41 ± 0.09 (13)
Oxalazetat		0.06 ± 0.03 (6)	
Malat		0.16 ± 0.05 (9)	
α -Ketoglutarat		0.05 ± 0.01 (6)	

Tab. 4: Metabolite des Zitronensäurezyklus und Intermediärstoffwechsels des Herzens. Bypassareale (nach 2 mM [3-¹³C]Pyruvat), *Kontrollareale* (kein Pyruvat). Die Anzahl der untersuchten Proben ist in Klammern angefügt. Unterschiede innerhalb der Bypass- oder Kontrollareale: ° hoch vs niedrig, * mittel vs niedrig, * mittel vs hoch, P < 0.05 (ANOVA). Unterschiede zwischen Bypass- und Kontrollarealen gleicher Flussklassen: # P < 0.05 (ANOVA).

Wegen ihrer geringen Konzentration wurden Oxalazetat, Malat und α -Ketoglutarat nur in aus mehreren Mittelflussarealen bestehenden, von [3-¹³C]Pyruvat nicht unmittelbar beeinflussten Proben bestimmt (Tabelle 4).

3.6 Fraktionelle Anreicherung

Anhand der fraktionellen ¹³C-Anreicherung im Acetyl-CoA lässt sich der Anteil des angebotenen [3-¹³C]Pyruvats an der Substratoxidation in Hoch- und Niedrigflussarealen des Herzens bewerten. Im Gegensatz zum Glutamat, bei dem sich der Anreicherungsgrad durch Division des in der NMR detektierten ¹³C-Anteils durch den enzymatisch ermittelten Gesamtgehalt ergibt, konnte die fraktionelle Anreicherung im Acetyl-CoA aufgrund der niedrigen zellulären Konzentration nur über die Analyse der Multiplettstruktur des [4-¹³C]Glutamats berechnet werden (Abbildung 21).



Abb. 21: Fraktionelle Anreicherung im [2-¹³C]Acetyl-CoA und [4-¹³C]Glutamat nach 2 mM [3-¹³C]Pyruvatinfusion. Die fraktionelle Anreicherung im Acetyl-CoA war in Hoch- und Niedrigflussarealen ähnlich, obwohl in Niedrigflussarealen signifikant weniger [4-¹³C]Glutamat gefunden wurde. $^{\circ}$ P < 0.05 (ANOVA).

In Niedrigflussarealen glich der ¹³C-Anreicherungsgrad des Acetyl-CoA dem von Hochflussarealen. Relativ zum jeweiligen Gesamtumsatz trug [3-¹³C]Pyruvat somit in Hoch- und Niedrigflussarealen zu gleichen Teilen zur Substratoxidation bei, und ein unzureichendes [3-¹³C]Pyruvatangebot ließ sich trotz des geringeren Blutflusses in Niedrigflussgebieten aussschließen.

Nichtsdestotrotz zeigte sich in Niedrigflussarealen eine signifikant geringere ¹³C-Anreicherung an der Position C4 des Glutamats, was auf eine im Vergleich zu Hochflussarealen verminderte Verstoffwechselung von [2-¹³C]Acetyl-CoA in Niedrigflussarealen hindeutet.

3.7 Anaplerose

Unterschiede im Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis können jedoch auch unabhängig von der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus durch den Zufluss von nicht ¹³Cmarkierten Metaboliten in den Citratzyklus, beispielsweise auf Höhe des Malats oder Oxalazetats bedingt sein. Dieser Zustrom kann eine Verdünnung innerhalb der ¹³Cmarkierten Metabolit-Pools bewirken, die trotz gleichen Umsatzes im Zitronensäurezyklus und trotz gleicher fraktioneller Anreicherung im Acetyl-CoA dennoch zu Abweichungen im Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis führen kann (Abbildung 2). Um zu überprüfen, ob dieser Influx in Hoch- und Niedrigflussarealen voneinander abweicht, wurden zwei weitere Versuche durchgeführt, in denen 2 mM [3-¹³C]Pvruvat nicht über 12 sondern über 60 Minuten verabreicht wurde. Durch die lange Infusionsdauer sollten alle Kohlenstoffatome des Glutamats durch ¹³C-Atome ausgetauscht und so steady-state-Bedingungen bezüglich der Kinetik der ¹³C-Markierung erreicht werden. Der Gehalt an [4-¹³C]Glutamat müsste dem an [3-¹³C]Glutamat entsprechen und das Glutamat [4-13C]/[3-13C]-Verhältnis 1 betragen, sofern es zu keiner relevanten Verdünnung des Glutamatpools durch Zufluss unmarkierter Substrate aus benachbarten Stoffwechselwegen kommt. Abbildung 22 zeigt die experimentellen Befunde.



Abb. 22: Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis nach 60 Minuten 2 mM [3-¹³C]Pyruvat (Versuche 6 und 7). Hoch- und Niedrigflussareale wiesen gleiche Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnisse auf. Es fand sich keine Korrelation mehr zwischen dem lokalen Blutfluss und dem Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis.

Wie durch die Modellberechnungen vorhergesagt (Abbildung 5), fand sich nach 60-minütiger 2 mM [3^{-13} C]Pyruvatinfusion keine Korrelation mehr zwischen dem Glutamat [4^{-13} C]/[3^{-13} C]-Verhältnis und dem lokalen myokardialen Blutfluss. In Hoch-, Mittel- und Niedrigflussarealen war es nahezu identisch, jedoch betrug der Mittelwert des Glutamat [4^{-13} C]/[3^{-13} C]-Verhältnisses 1.24 ± 0.14 (Abbildung 23). Damit wich das Glutamat [4^{-13} C]/[3^{-13} C]-Verhältnis trotz der unter steady-state Bedingungen geforderten Übereinstimmung der [4^{-13} C]- und [3^{-13} C]Glutamatkonzentration deutlich von 1 ab, was auf einen Einstrom unmarkierter Metabolite in den Zitronensäurezyklus schließen lässt.



Abb. 23: Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis in Niedrig-, Mittel- und Hochflussarealen des Hundeherzens nach 60 Minuten 2 mM $[3^{-13}C]$ Pyruvat (n = 2). Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen nachweisen. In Klammern angeführt ist die Anzahl der untersuchten Herzareale.

Da sich der Anteil des anaplerotischen Zuflusses in Hoch- und Niedrigflussarealen jedoch nicht unterscheidet, entspricht der Unterschied im Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]- Verhältnis nach 12 Minuten [3-¹³C]Pyruvat (Abbildung 19) somit einer abweichenden Oxidationsrate von [3-¹³C]Pyruvat in Hoch- und Niedrigflussarealen des Herzens.

3.8 Lokaler J_{TCA} und Sauerstoffverbrauch

Durch Einschluss aller gewonnenen Daten in das in der Einleitung beschriebene Modell ließ sich für jeden einzelnen Hund anhand des Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnisses die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus in Hoch-, Mittel- und Niedrigflussarealen berechnen (Abbildung 24).



Abb. 24: Lokaler J_{TCA} und koronarer Blutfluss. Die berechnete Umsatzrate des Zitronensäurezyklus (J_{TCA}) in Hoch- und Niedrigflussarealen wies noch deutlichere Unterschiede auf als das Glutamat [4^{-13} C]/[3^{-13} C]-Verhältnis. Die Berechnung des J_{TCA} erfolgte mit dem in der Einleitung beschriebenen Modell anhand der experimentell ermittelten Glutamat [4^{-13} C]/[3^{-13} C]-Verhältnisse und zellulären Metabolitgehalten. Angenommen wurde ein anaplerotischer Influx von 30%.

Die negative Korrelation zwischen dem Glutamat $[4-{}^{13}C]/[3-{}^{13}C]$ -Verhältnis und dem lokalen myokardialen Blutfluss (Abbildung 17) entsprach einer deutlichen Zunahme des J_{TCA} mit ansteigender lokaler Durchblutung. Die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus nahm sowohl in jedem einzelnen Herzen (offene Symbole) als auch in allen zusammengenommen (geschlossene Symbole) monoton mit dem myokardialen Blutfluss zu. Sie betrug 0.89 ± 0.37 µmol min⁻¹g⁻¹ in Niedrigfluss-, 1.38 ± 0.52 in Mittelfluss- und 3.06 ± 1.84 µmol min⁻¹g⁻¹ in Hochflussarealen. Damit entsprach die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus in Hochflussarealen der 3.4-fachen Umsatzrate in Niedrigflussarealen.

Unter der Annahme, dass Acetyl-CoA zu 100% dem angebotenen Pyruvat entstammt, entspricht ein J_{TCA} von 1 µmol min⁻¹g⁻¹ einem Sauerstoffverbrauch von 2.5 µmol min⁻¹g⁻¹. Daraus ergab sich für Mittelflussareale ein mittlerer Sauerstoffverbrauch von 3.45 µmol min⁻¹g⁻¹, der leicht unter dem über das Ficksche Prinzip bestimmten MVO₂ von 5.2 ± 1.4 µmol min⁻¹g⁻¹ liegt (Abbildung 25).



Abb. 25: Lokaler Blutfluss und Sauerstoffverbrauch des Hundeherzens. Der Heterogenität der lokalen Durchblutung entspricht eine Heterogenität des lokalen Sauerstoffverbrauches. Zugrunde liegen der mittlere koronare Blutfluss in Hoch- Mittel- und Niedrigflussarealen sowie die J_{TCA} -Berechnungen anhand der gemessenen Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnisse aus 5 untersuchten Hundeherzen.

Zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen des Hundeherzens existiert somit ein wenigstens 3-facher Unterschied im lokalen myokardialen Blutfluss, dem ein 3.4-facher Unterschied im lokalen Sauerstoffverbrauch entspricht.

4 Diskussion

4.1 Einführung

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Befund, dass einem nahezu 3-fachen Unterschied in der lokalen Durchblutung von Hoch- und Niedrigflussarealen des Herzens ein 3.4-facher Unterschied im lokalen Sauerstoffverbrauch entspricht. Dieser wurde aus der Umsatzrate des Citratzyklus abgeleitet, die nach Gabe von ¹³C-markiertem Pyruvat in Einzelproben des Hundeherzens aus dem Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis bestimmt wurde. In Hochflussarealen ist dieses signifikant kleiner als in Niedrigflussarealen, entsprechend einem höheren Umsatz des Citratzyklus in Hochflussarealen. Darüber hinaus weisen auch einzelne Metabolite des Energiestoffwechsels (Glutamat, Citrat, Laktat) eine räumliche Heterogenität hinsichtlich ihrer Konzentrationen auf.

4.2 Heterogenität des kardialen Stoffwechsels

Da bislang eine adäquate Methode zur Messung des Sauerstoffverbrauches in kleinen Herzregionen eines Volumens von ca. 200 mm³ fehlte, erfolgten in der Vergangenheit Untersuchungen zur Heterogenität des kardialen Stoffwechsels vor allem über die Messung von eng mit dem Energiestoffwechsel verbundenen Metaboliten und Enzymaktivitäten oder über die Bestimmung von Aufnahme- und Transportraten wichtiger Substrate der Herzmuskelzelle. Die Aussagekraft dieser Befunde in Hinblick auf den lokalen Sauerstoffverbrauch ist jedoch begrenzt, da zum einen lediglich einzelne Bestandteile ganzer Stoffwechselkreisläufe betrachtet werden, zum anderen die Ergebnisse in sich teils widersprüchlich sind. Der in der vorliegenden Arbeit erbrachte Nachweis eines lokal heterogenen Sauerstoffverbrauches des Herzens ermöglicht hingegen eine neue Einordnung einiger bereits beschriebener Befunde.

4.2.1 Metabolite

Da der lokale Sauerstoffverbrauch des Herzens parallel zur Durchblutung in Hochflussarealen ca. um den Faktor 2 erhöht, in Niedrigflussarealen hingegen auf etwa die Hälfte des durchschnittlichen O₂-Verbrauches reduziert ist (Abbildung 25), erklärt sich, dass Niedrigflussareale keine höheren Laktatgehalte als Hochflussareale aufweisen. Denn erst wenn das Sauerstoffangebot den O₂-Bedarf unterschreitet, erfolgt die ATP-Bildung vermehrt über die anaerobe Verstoffwechselung von Glukose, die im Gegensatz zum aeroben Abbau mit einer geringeren Energieausbeute verbunden ist (Opie 1973, Wiesner 1989).

In Hochflussarealen hingegen ließ sich nicht nur nach Manipulation am Koronarsystem und nach Gabe von 2 mM [3-¹³C]Pyruvat ein im Vergleich zu Niedrigflussarealen höherer Laktatgehalt nachweisen, sondern auch am intakten Hundeherzen in situ, dessen Substratwahl unbeeinflusst blieb (Loncar 1998). Entgegen der intuitiven Erwartung ist daher möglicherweise gerade in Hochflussarealen das Verhältnis von Sauerstoffangebot und -bedarf ungünstiger als in Niedrigflussarealen. Dies könnte sich bereits in dem 3.4-fachen Unterschied im Sauerstoffverbrauch zwischen Hochund Niedrigflussarealen andeuten, der von einem nur 3-fachen Unterschied im lokalen Blutfluss begleitet ist (Abbildung 25). Möglicherweise weist der höhere Laktatgehalt somit auf eine auch unter physiologischen Bedingungen zu einem größeren Teil ohne Sauerstoff erfolgende Glykolyse in Hochflussarealen hin.

Fluorimetrische Untersuchungen, in denen sich ein für die oxidative Substratverwertung unzureichendes Sauerstoffangebot in einer vermehrten mitochondrialen NADH-Fluoreszenz widerspiegelt, zeigen jedoch erst nach experimenteller Verminderung des Sauerstoffangebotes eine heterogen über das Herz verteilte normoxischen Verhältnissen Gewebefluoreszenz. Unter hingegen ist das Fluoreszenzmuster homogen (Steenbergen 1977, Vetterlein 1995). Dies macht vor allem angesichts der geringeren Energieausbeute eine gesteigerte nicht-oxidative Verstoffwechselung von Glukose in Hochflussarealen unter physiologischen Bedingungen unwahrscheinlich. Möglicherweise ist der abweichende Laktatgehalt in Hoch- und Niedrigflussarealen deshalb vielmehr auf Unterschiede im Laktat- oder Pyruvatstoffwechsel der Zellen zurückzuführen, die unabhängig vom O2-Angebot sind, wie beispielsweise Abweichungen im Substratangebot, in einzelnen Stoffwechselflüssen oder in der Größe einzelner Metabolitpools.

Für eine ausgewogene Abstimmung zwischen O₂-Angebot und -Verbrauch sowohl in Niedrig- wie auch in Hochflussarealen des Herzens sprechen zudem auch weitere Befunde, die eine Beurteilung des energetischen Gleichgewichtes der Herzmuskel-

62

zellen erlauben. Hierzu zählen vor allem Adenosin, aber auch das Hitze-Schock-Protein HSP-70. Letzteres wird in Reaktion auf eine vorübergehende O₂-Minderversorgung gebildet und war weder in Hoch- noch in Niedrigflussarealen vermehrt nachweisbar (Loncar 1998). Obwohl Adenosin ähnlich wie Laktat tendenziell eine höhere Konzentration in Hochflussarealen des Herzens aufweist (Sonntag 1996), spricht dies angesichts der höheren Stoffwechselrate in Hochflussarealen nicht zwangsläufig gegen ein ausgewogenes Verhältnis von O₂-Angebot und O₂-Bedarf. Denn neben dem Abbau von ATP stellt noch die Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein eine weitere Adenosin-Quelle dar, der vor allem unter normoxischen Bedingungen ein wesentlicher Teil des Adenosins entstammt (Schrader 1991). Bei einem insgesamt gesteigerten Stoffwechsel könnte auch dieser Stoffwechselfluss in Hochflussarealen an Bedeutung gewinnen und für den tendenziell höheren Adenosingehalt verantwortlich sein.

Da Adenosin als sehr sensitiver Indikator eines beeinträchtigten kardialen Energiestatus weder in Hoch- noch in Niedrigflussarealen Konzentrationen erreicht, die einen akuten Sauerstoffmangel signalisieren (Sonntag 1996), lässt sich auch der geringere Gehalt an Glutamat in Niedrigflussarealen nicht auf dessen vermehrten Abbau zur anaeroben Energiegewinnung zurückführen. Denn lediglich bei schwerer Ischämie kann die Herzmuskelzelle aus Glutamat α -Ketoglutarat gewinnen, das durch Oxidation zu Succinat zur ATP-Bildung unter anaeroben Bedingungen beiträgt (Wiesner 1988). Da die Aminogruppe des Glutamats hierbei auf Pyruvat übertragen wird, müsste parallel zum verminderten Glutamat- ein erhöhter Alaningehalt in Niedrigflussarealen vorliegen, was sich jedoch ebenfalls nicht bestätigt hat (Tabelle 4). Deshalb ist die höhere Glutamatkonzentration in Hochflussarealen, die auch in anderen Studien beschrieben ist (Van Beek 1999), möglicherweise eher in unterschiedlich großen Metabolitpools in Hoch- und Niedrigflussarealen begründet.

4.2.2 Enzyme

Der Substratfluss in einem Stoffwechselkreislauf hängt neben den Metabolitkonzentrationen vor allem von den Enzymen ab, die seine Richtung mitbestimmen sowie seine Umsatzrate begrenzen. Die in vitro ermittelte maximale Enzymaktivität entspricht jedoch nicht der tatsächlichen Umsatzrate in vivo, so dass sie allein keinen direkten Rückschluss auf den tatsächlichen Substratfluss zulässt (van der Vusse 1989).

Die nahezu parallel zum lokalen Blutfluss in Hochflussarealen gesteigerte Umsatzrate des Zitronensäurezyklus (J_{TCA}, Abbildung 24), erbringt daher erstmals Beweis, dass die vermehrte Aktivität der Succinatdehydrogenase in den Hochflussarealen (Bussemaker 1994) tatsächlich auch von einem gesteigerten Durchsatz in vivo gefolgt ist. Da im Gegensatz hierzu ein weiteres Schlüsselenzym des Zitronensäurezyklus, die Citratsynthetase, in Hoch- und Niedrigflussarealen die gleiche maximale in-vitro-Aktivität aufweist (Sonntag 1996), könnte angesichts des Unterschiedes im tatsächlichen Substratfluss die Succinatdehydrogenase möglicherweise einen größeren regulatorischen Einfluss auf die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus haben.

Die Cytochrom-C-Oxidase, integraler Bestandteil der Atmungskette, weist in Hochund Niedrigflussarealen des Herzens in in-vitro-Analysen keinen Aktivitätsunterschied auf (Sonntag 1996). Dennoch ist der tatsächliche Umsatz in vivo, der sich am Sauerstoffverbrauch ablesen lässt, in Hochflussarealen auf das 3.4-fache gesteigert (Abbildung 25). Dies unterstützt die Annahme, dass der geringere O₂-Verbrauch in Niedrigflussarealen nicht einer verminderten oxidativen Kapazität der Herzmuskelzellen zuzuschreiben ist, sondern vielmehr auf einer funktionellen Regulierung der Atmungskette beruht.

Die Laktatdehydrogenase vermittelt in Abhängigkeit vom (NADH+H⁺)/NAD⁺-Verhältnis die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat, das als Acetyl-CoA zur weiteren Oxidierung in den Zitronensäurezyklus eingeschleust wird. Da Laktat bei einem vermehrten Angebot ein bevorzugtes Substrat der Herzmuskelzelle darstellt (van der Vusse 1990), entspricht die vermehrte Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) in Hochflussarealen (Franzen 1988) möglicherweise einem parallel zum Sauerstoffverbrauch gesteigerten Laktatmetabolismus. Dies könnte auch den erhöhten Laktatgehalt in Hochflussarealen erklären (Abbildung 20). Da jedoch der zytosolische Laktatpool ähnlich dem Glutamatpool in sich unterteilt ist (Chatham 1996), ist der absolute Gehalt an Laktat allein kein Maß für die an der Umsetzungsreaktion

64

tatsächlich beteiligte Menge, sondern spiegelt möglicherweise lediglich eine Substratreserve wider.

4.2.3 Transport- und Aufnahmeraten

Der gesteigerte Stoffwechselumsatz und Sauerstoffverbrauch in Hochflussarealen des Herzens erklärt auch die vermehrte Aufnahme und Phosphorylierung von ³H-Deoxyglukose mit zunehmendem lokalen Blutfluss. Da diese jedoch weder von einer höheren Hexokinase- noch Phosphoglyceratkinase-Aktivität begleitet ist (Sonntag 1996) und auch nicht weiter verstoffwechselt wird, lässt sich erst in komplexen Modellberechnungen belegen, dass die beobachtete Aufnahme von $^{3}H-$ Deoxyglukose zwar proportional zum lokalen Blutfluss ist, nicht jedoch von ihm abhängig (Deussen 1997). Der berechnete Glukoseabbau beträgt in Hochflussarealen 0.326 µmol Glukose min⁻¹g⁻¹ und entspricht dem ca. 2.7-fachen des Glukosestoffwechsels in Niedrigflussgebieten. Somit spiegelt sich auch in diesem Befund bereits die Stoffwechselheterogenität des Herzens wider. Da ein Glukosemolekül jedoch schon nach dem zweiten Durchlauf im Zitronensäurezyklus vollständig metabolisiert ist, wird angesichts der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus von 3.06 µmol min⁻¹g⁻¹ in Hochflussarealen (Abbildung 24) deutlich, dass der weit überwiegende Teil des Substratbedarfs der Herzmuskelzelle nicht durch Glukose gedeckt wird. Daher erlauben Untersuchungen zur Heterogenität des Glukosestoffwechsels allein keinen unmittelbaren Rückschluss auf den lokalen Energieumsatz des Herzens.

Neben Glukose oxidiert das Herz unter Ruhebedingungen vor allem Fettsäuren (van der Vusse 1992), deren Aufnahme in die Herzmuskelzelle eine ähnliche Parallelität zum lokalen Blutfluss aufweist, wie sie für ³H-Deoxyglukose beschrieben ist (Groeneveld 1993, Caldwell 1994). Obwohl ¹³¹J-markierte Fettsäuren im Gegensatz zu ³H-Deoxyglukose weiter verstoffwechselt werden, ließ sich die Oxidationsrate in den genannten Arbeiten nicht messen. Vielmehr wurde in umfangreichen Modellberechnungen aus der heterogenen Ablagerung der Fettsäuren im Herzen auf eine räumliche Heterogenität der Fettsäurepermeabilität geschlossen. Diese allein lässt zwar keine Aussage über den tatsächlichen lokalen Fettsäuremetabolismus des Herzens zu, doch ist die erhöhte Permeabilität in Hochflussarealen konsistent mit dem in der vorliegenden Arbeit erbrachten Nachweis eines heterogenen lokalen

Energieumsatzes. Somit werden die in Hochflussarealen vermehrt aufgenommenen Fettsäuren wahrscheinlich auch vermehrt oxidiert.

4.2.4 O₂-Verbrauch

Die direkte Abschätzung des lokalen Sauerstoffverbrauches des Herzens über die Sauerstoffsättigung in kleinsten Gefäßen oder den kapillären O₂-Partialdruck führte zwar zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen (siehe Einleitung), doch ließ sich mit kryospektrophotometrischen Messungen am Hundeherzen in *situ* ein transmurales Gefälle des Sauerstoffverbrauches belegen, das in guter Übereinstimmung mit den vorliegenden Befunden steht (Holtz 1977). Aus der intrakapillären Sauerstoffsättigung von 41 \pm 19 % im Subendo- und lediglich 53 \pm 13 % im Subepikard berechnete sich ein endo-epikardiales Sauerstoffsverbrauchsverhältnis von 1.57. Da dieses einem transmuralen Perfusionsgefälle von lediglich 1.27 folgt, erstreckt sich der lokale Sauerstoffverbrauch des Herzens auch in diesem Befund über einen weiteren Bereich als der lokale Blutfluss.

Die nichtinvasive Messung des mikrovaskulären O_2 -Partialdruckes (μPO_2) über die O_2 -abhängige Phosphoreszenz von Pd-Porphyrin ergab in 0.3 mm³ großen Arealen des Schweineherzens einen μPO_2 von 16.8 ± 4.2 mmHg, dessen Varianz mit 0.25 angesichts der räumlichen Auflösung deutlich unter der zu erwartenden Streuung der lokalen Blutflüsse liegt (Rumsey 1994). Dies zeigte sich erst recht bei einer räumlichen Auflösung von 40 - 80 mm³, die nur noch zu einer Varianz der lokalen Sauerstoffpartialdrücke von 0.11 - 0.12 führte (Iterson 1998). Zwar ist aufgrund der geringen Streuung der kapillären O_2 -Partialdrücke eine der lokalen Durchblutung entsprechende Heterogenität des Sauerstoffverbrauches naheliegend, doch wird diese Vermutung erst durch die Befunde der vorliegenden Arbeit bekräftigt. Denn ein lokal heterogener Sauerstoffverbrauch des Herzens, der in etwa die lokale Durchblutungsheterogenität widerspiegelt (Abbildung 25), könnte zur Folge haben, dass der kapilläre Sauerstoffpartialdruck als Maß für die Ausgewogenheit zwischen O_2 -Angebot und -Verbrauch eine geringere Streuung aufweist als der lokale Blutfluss.

Der lokale Sauerstoffverbrauch des Herzens lässt sich nicht nur indirekt über das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis nach Gabe von [3-¹³C]Pyruvat messen, sondern
ist am isolierten Herzen auch über die Produktion von H2¹⁸O-Oxidationswasser nach Perfusion mit ¹⁸O₂-haltiger Pufferlösung guantifizierbar. In einer neueren Studie am isolierten Kaninchenherzen wurde für ca. 100 mg große Areale bei einem 3.3-fachen Unterschied im lokalen Blutfluss ein heterogener Sauerstoffverbrauch nachgewiesen, der sogar um den Faktor 6.45 variiert (Schwanke 2000). Angesichts der hohen O₂-Extraktion am Gesamtorgan von > 60%, die kaum zu steigern ist, sind jedoch Zweifel an der Validität dieser indirekten O2-Verbrauchsmessung angebracht. Die hohe Permeabilität der Zellmembranen für Wasser, die in Hoch- und Niedrigflussarealen möglicherweise unterschiedlich stark ausgeprägt ist, kann zu hohen Diffusionsraten für das produzierte H_2^{18} O-Oxidationswasser führen. Daher ist die Quantifizierung des lokalen O2-Verbrauches in entscheidendem Maße von der Wasser-Permeabilität abhängig: Während eine identische H₂O-Permeabilität in Hoch- und Niedrigflussarealen lediglich zu einem 2.6-fachen Unterschied im lokalen Sauerstoffverbrauch führt, mündet eine heterogene Wasserpermeabilität in einen 6.45-fachen. Da die Wasserpermeabilität zudem nicht direkt gemessen, sondern aus dem H₂¹⁸O-Gehalt des Gewebes und des Effluates abgeschätzt wurde, scheinen die Zweifel an den Berechnungen des lokalen O₂-Verbrauches anhand der Produktion von H₂¹⁸O-Oxidationswasser begründet. Nichtsdestotrotz weist dieser Versuchsansatz am isolierten Kaninchenherzen eine Sauerstoffverbrauchsheterogenität nach, die gualitativ mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden übereinstimmt.

4.3 Validität der Daten

Da die Messung des Sauerstoffverbrauches in ca. 200 mm³ großen Arealen des Herzens, in denen der lokale Blutfluss teils weniger als die Hälfte, teils mehr als das 1.5-fache des mittleren Blutflusses beträgt, auf direkte Weise bislang nicht möglich ist, wurde der lokale Sauerstoffverbrauch in der vorliegenden Studie indirekt über die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus (J_{TCA}) ermittelt. Diese lässt sich nach Gabe von [3-¹³C]Pyruvat aus dem Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis berechnen, was jedoch auf einigen Annahmen beruht, die zum Teil in den Modellberechnungen berücksichtigt und zum Teil durch ergänzende Versuchsanordnungen validiert wurden (Abbildung 26).



Abb. 26: Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis zur Abschätzung des J_{TCA}. In den Modellberechnungen berücksichtigte Metabolitgehalte und Stoffwechselflüsse, die mit [3-¹³C]Pyruvat oder dem Zitronensäurezyklus interagieren und daher möglicherweise das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis und die Abschätzung des J_{TCA} beeinflussen, sind aufgeführt.

Das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis stellt der Form nach eine Endpunktanalyse dar, über die die Quantifizierung einer Umsatzrate, also eines kinetischen Prozesses erfolgt. Daher müssen neben den Metabolitgehalten zum Zeitpunkt der Probenentnahme auch die Substratein- und -ausflüsse während der 12-minütigen [3-¹³C]Pyruvatinfusion für die Berechnung der Umsatzrate berücksichtigt werden. Zudem bedarf der Einfluss des [3-¹³C]Pyruvatangebotes auf das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis der näheren Betrachtung, da hoch- und niedrigdurchblutete Areale ein unterschiedliches Substratangebot erhalten.

4.3.1 Endpunktanalyse

Der experimentelle Ansatz, aus dem zeitlichen Verlauf der ¹³C-Anreicherung in den jeweiligen Glutamat-C-Atomen die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus zu ermitteln, basiert auf Experimenten, die an isolierten Herzen von Nagetieren durchgeführt wurden (Chance 1995, Yu 1995, Weiss 1992). Während sich an isolierten Herzen

durch eine kontinuierliche Aufzeichnung der ¹³C-Anreicherung im Glutamat der Umsatz des ¹³C-markierten Substrates im Zitronensäurezyklus fortwährend verfolgen lässt, ist dies in ca. 200 mm³ großen Teilgebieten des Herzens *in situ* bislang nicht möglich. Daher wurde der Stoffwechselumsatz von Hoch- und Niedrigflussgebieten in Form einer Endpunktanalyse aus Gewebeextrakten des Herzens anhand des Verhältnisses von [4-¹³C]Glutamat zu [3-¹³C]Glutamat bestimmt.

VanBeek et al. konnten für ca. 1200 mm³ große Areale des isolierten Kaninchenherzens zeigen, dass die indirekte Messung des O2-Verbrauches durch die ¹³C-Anreicherung der Endpunktanalyse in den Glutamat-C-Atomen gut übereinstimmt mit der direkten Messung von arterio-venösen O2-Partialdruckdifferenzen, die mit Hilfe von Clark-Elektroden durchgeführt wurden (Van Beek 1999). Da sich am isolierten Kaninchenherzen eine fraktionelle ¹³C-Anreicherung im Acetyl-CoA von über 80% erzielen ließ und sequentiell [1-¹³C]- und [1,2-¹³C]Azetat verwendet wurden, konnte in diesen Versuchen der Stoffwechselumsatz durch die gezielte Analyse einzelner Glutamatmultipletts bestimmt werden. Am Hundeherzen in situ hingegen lag die fraktionelle ¹³C-Anreicherung im Glutamat aufgrund der Substratkonkurrenz unter 50% (Abbildung 21), und wegen seiner vasodilatierenden Wirkung (Yamada 1986) wurde anstelle des Azetats einfach markiertes [3-¹³C]Pyruvat als Substrat verwendet. Deshalb ließ sich der Stoffwechselumsatz in den vorliegenden Versuchen nicht durch die gezielte Analyse einzelner Glutamatmultipletts ermitteln, sondern wurde anhand des Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnisses bestimmt, was formell jedoch dem von VanBeek et al. angewandten Verfahren entspricht (VanBeek 1999).

4.3.2 Substratangebot und Substratwahl

Da die Aufnahme und Verstoffwechselung von [3-¹³C]Pyruvat durch die Herzmuskelzelle nicht allein von der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus abhängt, sondern zusätzlich vom Pyruvatangebot und von der Substratwahl beeinflusst wird, muss deren Bedeutung für den zeitlichen Verlauf der ¹³C-Markierung im Glutamat berücksichtigt werden.

Ein den Bedarf der Herzmuskelzelle unterschreitendes [3-¹³C]Pyruvatangebot führt ebenso zu einer geringeren fraktionellen ¹³C-Anreicherung im Acetyl-CoA wie die

vermehrte Oxidation von Fettsäuren, Laktat oder Aminosäuren anstelle des angebotenen markierten Substrates. Obwohl die geringere fraktionelle Anreicherung im Acetyl-CoA den absoluten Gehalt an ¹³C-Glutamat mindert, belegen Berechnungen unseres sowie anderer mathematischer Modelle zur Analyse der Glutamatmarkierungskinetik, dass das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis kaum von der fraktionellen ¹³C-Anreicherung im Acetyl-CoA beeinflusst wird (Chance 1983, Chatham 1995, Yu 1997). Daher ist das höhere Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis in Niedrigflussarealen nicht etwa Ausdruck eines unzureichenden Substratangebotes, sondern spiegelt die geringere Umsatzrate des Zitronensäurezyklus in niedrigperfundierten Gebieten des Herzens wider.

Nach einer $[3^{-13}C]$ Pyruvatinfusionsdauer von 60 Minuten fand sich zudem in Hochund Niedrigflussarealen eine nahezu identische fraktionelle Anreicherung im Acetyl-CoA (0.41 ± 0.1 versus 0.39 ± 0.06), was gegen eine Limitierung des Stoffwechselumsatzes in Niedrigflussarealen durch ein zu geringes Pyruvatangebot spricht. Auch nach 12 Minuten $[3^{-13}C]$ Pyruvat fehlten Unterschiede in der fraktionellen Anreicherung im Acetyl-CoA zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen (Abbildung 21). Die kurze Infusionsdauer reduzierte die Signalintensität jedoch erheblich, so dass die Glutamatmultiplett-Analyse, die der Ermittlung der fraktionellen ¹³C-Anreicherung im Acetyl-CoA zugrunde lag, mit einer hohen Messungenauigkeit behaftet ist.

Während der Stoffwechselumsatz somit unabhängig vom ¹³C-Pyruvatangebot in Niedrigflussarealen des Herzens reduziert ist, lässt sich aus der ähnlichen fraktionellen ¹³C-Anreicherung im Acetyl-CoA zudem ableiten, dass der Substratbedarf in Hoch- und Niedrigflussarealen zu gleichen Anteilen durch das angebotene Pyruvat gedeckt wird. Angesichts des höheren Umsatzes ist jedoch in Hochflussarealen der absolute Substratfluss im Vergleich zu Niedrigflussarealen gesteigert, obwohl es keine relativen Unterschiede in der Substratpräferenz zu geben scheint.

4.3.3 Metabolitkonzentrationen

Die Größe der zellulären Pools der Metabolite des Zitronensäurezyklus sowie der mit ihm verbundenen Stoffwechselwege nimmt insofern Einfluss auf das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis, als die fraktionelle ¹³C-Anreicherung im [4-¹³C]- und [3-

¹³C]Glutamat umso langsamer verläuft, je größer der zu markierende Pool ist, d.h. je größer die Anzahl der zu markierenden Moleküle. Beispielsweise führt die kurzzeitige Gabe von ¹³C-markiertem Azetat in Hochflussarealen zu einer geringeren fraktionellen ¹³C-Anreicherung im Glutamat, als die tatsächliche Stoffwechselaktivität erwarten lässt. Dies ist dem höheren Glutamatgehalt in Hochflussarealen des Kaninchenherzens zuzuschreiben (van Beek 1999). Für jedes untersuchte Areal des Hundeherzens wurde daher die Umsatzrate des Zitronensäurezyklus unter Berücksichtigung der jeweils gemessenen Metabolitkonzentrationen ermittelt.

Die zellulären Gehalte an Glutamat, Citrat und Laktat in Hochflussarealen übertreffen zum Teil um über 50% die Gehalte in Niedrigflussarealen (Abbildung 20, Tabelle 4), was sich auch durch das um 10% größere Intrazellularvolumen in Hochflussarealen nicht hinreichend erklären lässt (Gonzales 1990). Da zudem das Interzellularvolumen in Hoch- und Niedrigflussarealen nahezu identisch ist (Gonzales 1990), spiegeln die höheren Gehalte an Glutamat, Citrat und Laktat in Hochflussarealen vielmehr eine tatsächliche Heterogenität des lokalen Stoffwechsels des Herzens wider. Der Glutamatgehalt ist nicht nur in Hochflussarealen des Bypassareals signifikant erhöht, sondern auch in Kontrollarealen, die nicht unter dem unmittelbaren Einfluss der Pyruvatinfusion standen. Ein ähnlicher Befund fand sich auch im isolierten Kaninchenherzen nach Gabe von 1.5 mM Azetat (Van Beek 1999), so dass die positive Korrelation zwischen dem Glutamatgehalt und dem lokalen Blutfluss wahrscheinlich unabhängig von der Spezies und dem experimentellen Protokoll ist.

Andererseits werden der Laktat- und Citratstoffwechsel anscheinend zu einem gewissen Teil von der $[3-^{13}C]$ Pyruvatgabe beeinflusst, da signifikante Konzentrationsunterschiede lediglich in hoch- und niedrigperfundierten Arealen des vom Bypass versorgten Gebietes gefunden wurden (Tabelle 4). Unsere Modellanalysen zeigen jedoch, dass erst ein 16-facher Konzentrationsunterschied zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen Auswirkungen auf die Bestimmung der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus hat (Tabelle 5). Die gemessenen Unterschiede im Metabolitgehalt sind jedoch deutlich kleiner (Tabelle 4), so dass sie keinen wesentlichen Einfluss auf die Berechnung des O₂-Verbrauches nehmen. Da selbst nach 60-minütiger [3-¹³C]Pyruvatinfusion die fraktionelle ¹³C-Anreicherung im Acetyl-CoA mit ca. 40% noch deutlich über der im Glutamat (ca. 25%) liegt, ist der zytosolische Glutamatpool möglicherweise derart kompartimentiert, dass lediglich ein kleiner Teil in direktem Austausch mit dem ¹³C-markierten mitochondrialen α -Ketoglutarat steht. Der hieran beteiligte zytosolische Glutamatpool scheint in Hochflussarealen größer zu sein als in Niedrigflussgebieten, da trotz Unterschieden im Glutamatgehalt (Tabelle 4) die fraktionelle ¹³C-Anreicherung im Glutamat unter Steady-State-Bedingungen in Hoch- und Niedrigflussarealen gleich ist (25 ± 4 %) bzw. 23 ± 4 %). Eine derartige Kompartimentierung ist bislang lediglich für Laktat (Chatham 1996, Zhao 1992, Lewandowski 1992) und Azetat (Yu 1995) beschrieben.

Ein größerer sich mit ¹³C-markiertem α -Ketoglutarat austauschender Glutamatpool würde bei gleichem Stoffwechselumsatz zu einer trägeren ¹³C-Anreicherung im Glutamat und damit zu einem höheren Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis führen (Van Beek 1999). Da in unserer Studie jedoch im Gegenteil ein niedrigeres Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis in Hochflussarealen gemessen wurde, führen die unterschiedlich großen Metabolitgehalte und -pools zu einem noch deutlicheren Unterschied in der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen, als es anhand des Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnisses allein zu erkennen ist (Abbildungen 19 und 24).

4.3.4 Austauschreaktionen

Weitaus einflussreicher auf die Berechnung des Energieumsatzes anhand des Glutamat $[4-^{13}C]/[3-^{13}C]$ -Verhältnisses, methodisch jedoch schwerer fassbar als die bereits erwähnten Faktoren sind Interaktionen des Zitronensäurezyklus mit benachbarten Stoffwechselwegen im Sinne von Metabolitein- oder -ausfluss. Die hierfür erforderlichen Annahmen wurden teils aus der Literatur entnommen, teils in eigenen Versuchen ermittelt. Um die Auswirkung der jeweiligen Annahmen für die Austausch- und Umsatzreaktionen auf das Glutamat $[4-^{13}C]/[3-^{13}C]$ -Verhältnis abschätzen zu können, wurden für die einzelnen Parameter Modellberechnungen in einer Spanne von 25 – 400 % des Literatur- und/oder Messwertes durchgeführt (Tabelle 5).

Modellparameter			Sensitivitätsanalyse	
Standardwert			25%	400%
			(des	Standardwertes)
F1 =	1.9	µmol min⁻¹g⁻¹	- 1%	- 4%
F2 =	1.9	µmol min ⁻¹ g ⁻¹	0.4%	- 0.1%
F3 =	2	µmol min ⁻¹ g ⁻¹	- 2%	+ 0.2%
F4 =	1	µmol min ⁻¹ g ⁻¹	- 5%	+ 1%
F5 =	0.06	µmol min ⁻¹ g ⁻¹	- 9%	+ 23%
y =	25	% des J_{TCA}	- 20%	* + 40%
Fc =	30 – 50	%	0%	0%

Tab. 5: Modellparameter und ihr Einfluss auf die ¹³C-Anreicherung im [4-C]- und [3-C]Glutamat unter [3-¹³C]Pyruvatinfusion. Angegeben sind die Standardwerte der in den Modellberechnungen berücksichtigten Stoffwechselflüsse sowie die Auswirkung einer Änderung zwischen 25% und 400% des Standardwertes auf die Berechnung des J_{TCA} (Sensitivitätsanalyse). Folgende Annahmen wurden getroffen: Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis = 1.982, J_{TCA} = 1.1 µmol min⁻¹g⁻¹, durchschnittlicher Metabolitgehalt der Mittelflussareale (Tabelle 4) und Konstanz der jeweils nicht variierten Stoffwechselflüsse (Abbildung 2).

F1 (α -Ketoglutarat \leftrightarrow Glutamat) und F2 (Oxalazetat \leftrightarrow Aspartat) entstammen Studien an isolierten Kaninchenherzen (Yu 1995), F3 (Pyruvat \leftrightarrow Laktat) und F4 (Pyruvat \leftrightarrow Alanin) wurden anhand der ¹³C-Anreicherung im Laktat und Alanin bestimmt und stehen in guter Übereinstimmung mit kinetischen Analysen in isolierten Rattenherzen (Chance 1983). F5 (Glutamat \leftrightarrow Glutamin) wurde ebenfalls aus den vorliegenden Daten ermittelt. Fc bezeichnet die fraktionalle ¹³C-Anreicherung im Acetyl-CoA. Die den Modellberechnungen zugrundeliegenden Differentialgleichungen sind im Appendix angeführt.

*Für y (Anaplerose) wurde lediglich die Auswirkung einer Änderung zwischen 25% und 200% des Standardwertes untersucht.

So kann [3-¹³C]Pyruvat statt durch die Pyruvatdehydrogenase direkt zu [2-¹³C]Acetyl-CoA oxidiert zu werden, auch durch die Laktatdehydrogenase (LDH) zu [3-¹³C]Laktat reduziert oder durch Transaminierung zu [3-¹³C]Alanin umgewandelt werden. Zwar würden beide Reaktionen die ¹³C-Markierung des Glutamats hinauszögern, doch selbst 16-fache Unterschiede in der Transaminierungs- oder Reduktionsrate von Pyruvat zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen hätten kaum Einfluss auf das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis (Tabelle 5). Da das gemessene ¹³C-Glutamat im Zytosol, der Zitronensäurezyklus hingegen im Mitochondrium lokalisiert ist, muss zusätzlich der Einfluss von Transportraten zwischen dem Mitochondrium und dem Zytosol auf das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis berücksichtigt werden (O'Donnell 1998). Die Austauschreaktion zwischen mitochondrialem α -Ketoglutarat und zytosolischem Glutamat ist beispielsweise an einen Carrier gebunden, der den Durchsatz durch die Glutamatdehydrogenase beeinflusst (Yu 1995). Auf die Berechnung der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus mit Hilfe des in dieser Arbeit verwendeten Modells hat diese Austauschreaktion zwischen jedoch eine ebenso geringe Auswirkung wie die Austauschreaktion zwischen mitochondrialem Oxalazetat und zytosolischem Aspartat (Tabelle 5).

Stärkeren Einfluss auf das Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis nimmt die Umwandlung von Glutamat in Glutamin durch die Glutaminase, deren Aktivität anhand der Spektroskopiedaten abgeschätzt und ebenso wie die Gehalte an ¹³C-Glutamin in den Berechnungen der TCA-Umsatzraten berücksichtigt wurden. Das vermehrte Vorkommen von ¹³C-Glutamin in Hochflussarealen könnte prinzipiell zu einem höheren Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis führen, da einfach markiertes Glutamat dem direkten Austausch mit mitochondrialem α -Ketoglutarat und somit der weiteren Verstoffwechselung im Zitronensäurezyklus entzogen würde. Im Gegensatz zu dieser Annahme weist das tatsächliche Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis in Hochflussarealen jedoch geringere Werte auf als in Niedrigflussarealen (Abbildung 19), was erneut verdeutlicht, warum bereits geringe Unterschiede im Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis deutlich größeren Unterschieden in der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus entsprechen können.

Die größte Auswirkung auf die Bestimmung des Stoffwechselumsatzes anhand der Kinetik der ¹³C-Markierung im Glutamat hat die Anaplerose. Der Zufluss un- oder teilmarkierten Substrates zum Beispiel auf Höhe des Malats oder Aspartats führt zu einer Verringerung der Konzentration an [3-¹³C]- bzw. [2-¹³C]Malat- oder -Oxalazetat, so dass sich das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis bei gleicher Umsatzrate des Zitronensäurezyklus erhöhen kann. Variierte beispielsweise der anaplerotische Zufluss um den Faktor 8, schlüge sich dies in den ermittelten Umsatzraten mit Abweichungen von bis zu 60% nieder (Tabelle 5). In den Versuchen mit einer [3-¹³C]Pyruvatinfusionsdauer von 60 Minuten macht der Austausch mit benachbarten

Stoffwechselwegen ca. 25% des gesamten Umsatzes im Zitronensäurezyklus aus, denn das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis unter Steady-State Bedingungen reduzierte sich nicht auf 1, sondern lediglich auf 1.24 ± 0.14 (Abbildung 23). Dieser Wert liegt leicht über dem in isolierten Herzen gefundenen (Malloy 1988, Chatham 1995, Van Beek 1999), was sich eventuell auf die unterschiedliche Beeinflussung einzelner Stoffwechselflüsse bei Verwendung verschiedener Substrate zurückführen lässt. Da unter Steady-State-Bedingungen der relative Anteil der Anaplerose am Gesamtumsatz zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen keinen Unterschied aufweist (Abbildung 23), ist jedoch die Annahme erlaubt, dass sich auch nach 12-minütiger [3-¹³CIPvruvatinfusion Substratein- und -abfluss zwischen hoch- und niedrigperfundierten Arealen nicht unterscheiden. Somit spiegeln die Unterschiede im Glutamat [4-13C]/[3-13C]-Verhältnis unterschiedliche Umsatzraten des Zitronensäurezyklus wider und lassen sich nicht auf unterschiedliche anaplerotische Substratflüsse zurückführen. Da der Anteil der Anaplerose am Gesamtumsatz sich lediglich unter Steady-State-Bedingungen bestimmen lässt, die Umsatzrate jedoch nur unter Pre-Steady-State-Bedingungen aus dem Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis abzuleiten ist (Abbildungen 4 und 5), können beide Parameter allerdings nicht simultan erfasst werden.

4.3.5 Vergleich mit konventioneller O₂-Messung und anderen experimentellen Ansätzen

Der über das Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis berechnete durchschnittliche Umsatz des Zitronensäurezyklus von 1.38 µmol min⁻¹g⁻¹ entspricht einem Sauerstoffverbrauch des Herzens von 3.45 µmol min⁻¹g⁻¹. Dieser Wert ist um ca. 30% geringer als der direkt aus Blutfluss und arterio-koronarvenöser O₂-Differenz ermittelte O₂-Verbrauch von 5.2 µmol min⁻¹g⁻¹.

Die Diskrepanz der Ergebnisse erklärt sich zum einen durch die Annahme, die Acetyl-CoA-Bildung würde einzig über Pyruvat erfolgen. Die fraktionelle ¹³C-Anreicherung im Acetyl-CoA von < 70% (Abbildung 21) zeigt jedoch, dass trotz des hohen Pyruvatangebotes weiterhin andere Substrate zur Acetyl-CoA Bildung am Herzen beitragen. Da zur Oxidation freier Fettsäuren beispielsweise mehr Sauerstoff benötigt wird als zur Verstoffwechselung von Pyruvat, würde sich der berechnete

Sauerstoffverbrauch pro Mol oxidierter Fettsäuren um $\frac{1}{2}$ Mol O₂ erhöhen, was die Differenz zwischen indirekt und direkt gemessenen O₂-Verbrauch mindern würde.

Ein Teil des Sauerstoffs wird zudem in biochemischen Reaktionen verbraucht, die außerhalb der Mitochondrien stattfinden (Challoner 1968), und deshalb nicht durch das Glutamat [4^{-13} C]/[3^{-13} C]-Verhältnis erfasst. Beispielsweise ließ sich am isolierten Kaninchenherzen im KCI-Arrest trotz eines persistierenden O₂-Verbrauches von 2.4 µmol min⁻¹g⁻¹ über die ¹³C-Methode kein Sauerstoffverbrauch mehr nachweisen (Van Beek 1999). Ob dies jedoch ausschließlich den extramitochondrialen O₂-Verbrauch widerspiegelt oder aber zusätzlich ein Messproblem aufgrund der stark verminderten fraktionellen Anreicherung, bleibt angesichts der Höhe des Sauerstoffverbrauches in der vorliegenden Arbeit lässt sich jedoch vermutlich auch auf die extramitochondriale Oxidation zurückführen.

Zu berücksichtigen ist zudem, dass die direkte Messung des O₂-Verbrauches gemäß dem Fickschen Prinzip die Erfassung von Blutfluss und O₂-Extraktion aus dem gleichen Gewebeareal voraussetzt. Da der venöse Abfluss des Bypassareals in den vorliegenden Versuchen jedoch nicht klar abzugrenzen war, wurde der indirekt über das Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis gemessene O₂-Verbrauch innerhalb des Bypassareals mit der direkten O₂-Verbrauchsmessung für das gesamte Herz verglichen. Dieser lagen der venöse Sauerstoffgehalt des Blutes aus dem Sinus coronarius sowie die mittels Mikrosphären gemessene Durchblutung des entnommenen Myokards zugrunde, die beide zu einem früheren Zeitpunkt im experimentellen Protokoll vor Anlage des Bypass bestimmt wurden. Möglicherweise findet ein Teil der Abweichungen beider O₂-Verbrauchsmessungen auch hierin seine Erklärung.

Da die fraktionelle ¹³C-Anreicherung im Glutamat auch in Hochflussarealen des Herzens 50% nicht überschritt (Abbildung 21), ist die Signalqualität der NMR-Spektren vor allem in Niedrigflussarealen, die zudem noch einen verminderten [3-¹³C]Pyruvatmetabolismus aufweisen, nur ausreichend. Dies führt in Niedrigflussarealen zu einer stärkeren Streuung der Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnisse als in Hochflussgebieten (Abbildungen 18 und 19). Zudem gingen in die Berechnung des Umsatzes des Zitronensäurezyklus anhand des Glutamat $[4-^{13}C]/[3-^{13}C]$ -Verhältnisses die unter 3.3 und 3.4 diskutierten Metabolitkonzentrationen und Austauschraten ein, die ebenfalls mit Messfehlern behaftet sind und zum Teil auch der Literatur, bisweilen gar anderen Spezies entstammen (Tabelle 5). Somit birgt die indirekte Messung des lokalen O₂-Verbrauches mit der ¹³C-Methode einige Fehlerquellen.

Vor diesem Hintergrund ist eine Abweichung von ca. 30% in der Quantifizierzung des durchschnittlichen myokardialen Sauerstoffverbrauches durch beide Methoden vertretbar. Zudem bleibt der qualitative Nachweis der lokalen Sauerstoffverbrauchsheterogenität des Herzens, die das heterogene Durchblutungsmuster widerspiegelt, hiervon unberührt.

4.4 Ursachen der Heterogenität des Sauerstoffverbrauches

Die Herzmuskelzellen besitzen die Fähigkeit, durch Steuerung der kontraktilen Funktion ihren Energieumsatz und Sauerstoffverbrauch aktiv dem Sauerstoffangebot anzupassen. Erstmals wurde dieses Phänomen von Rahimtoola in chronisch minderperfundiertem Myokard beobachtet, dessen reduzierte Funktion er mit "hibernating myocardium", Myokard im Winterschlaf, umschrieb (Rahimtoola 1982). Somit könnte die Sauerstoffverbrauchsheterogenität des Herzens einerseits durch das lokale Sauerstoffangebot, also den heterogenen Blutfluss bedingt sein.

Aufgrund der starken Abhängigkeit der myokardialen Durchblutung von Metaboliten der Herzmuskelzellen könnte der lokale Blutfluss jedoch andererseits auch die Folge eines primär heterogenen Energieumsatzes und Sauerstoffverbrauches sein. Diesem liegt möglicherweise in Hoch- und Niedrigflussarealen des Herzens ein unterschiedlicher Energie- und Sauerstoffbedarf zugrunde.

4.4.1 Heterogener Blutfluss

Bei Verminderung des koronaren Blutflusses ist die aktive Anpassung des myokardialen Sauerstoffverbrauches an das reduzierte Sauerstoffangebot durch Abnahme der kontraktilen Funktion nicht etwa Folge eines anhaltenden Energiedefizites, sondern ein regulatorisches Phänomen, das ein solches verhindert (Heusch 1996). Eine Reduktion der myokardialen Durchblutung auf ca. 50% führt

zwar initial neben einer Abnahme des Kreatin-Phosphates und Zunahme des anorganischen Phosphates auch zu einem Abfall der freien Energie der ATP-Hydrolyse, doch kehren diese Parameter nach 60-90 Minuten trotz anhaltender Minderperfusion wieder in den Normbereich zurück (Martin 1998). Ähnliches trifft auch für Laktat zu, während die kontraktile Funktion des Herzens dauerhaft vermindert bleibt (Fedele 1988). Die fehlende Erhöhung der zytosolischen Laktatund Adenosinkonzentration in Niedrigflussarealen des Herzens allein widerlegt daher nicht die Annahme, dass niedrigperfundierte Areale des Herzens möglicherweise erst sekundär durch ein zu geringes O₂-Angebot in ihrer Stoffwechselaktivität eingeschränkt werden.

Im Gegensatz zur zytosolischen Laktat- und Adenosinkonzentration bleibt nach einer akuten Reduktion des myokardialen O₂-Angebotes die Konzentration des Hitze-Schock-Proteins (HSP70) für einige Stunden, möglicherweise auch Tage erhöht (Delcayre 1988). Da in Niedrigflussarealen des Herzens jedoch auch keine gesteigerte HSP70-Konzentration zu verzeichnen ist (Loncar 1998), scheint der Reduktion des Sauerstoffverbrauches in Niedrigflussarealen keine akute O₂-Minderversorgung vorauszugehen. Angesichts der Stabilität der lokalen Durchblutungsheterogenität des Herzens von bis zu 13 Tagen (Janosi 2001) ist jedoch auch das Ausbleiben einer vermehrten HSP70-Produktion kein definitiver Beweis, der gegen eine chronische Minderperfusion im Sinne des "Hibernating Myocardium" in Niedrigflussarealen des Herzens spricht.

Hibernierendes Myokard weist jedoch im Gegensatz zu Niedrigflussarealen des Herzens auch strukturelle Veränderungen auf. Zwar fehlen Zeichen der Myokardnekrose, wodurch sich der Erhalt einer inotropen Reserve sowie die Fähigkeit zur Wiedererlangung der ursprünglichen Funktion nach adäquater Reperfusion erklärt, doch finden sich in über längere Zeit minderperfundiertem Myokard eine Atrophie von Myofibrillen, fibrotische Veränderungen des interstitiellen Raumes sowie eine gesteigerte Apoptose von Kardiomyozyten (Heusch 1998). Da Niedrigflussareale des Herzens sich morphologisch jedoch nicht von Hochflussarealen unterscheiden (Sonntag 1996), scheinen sie nicht im Sinne des Konzepts der Hibernation chronisch minderperfundiert zu sein. Vor allem angesichts der hohen Stabilität des lokalen Durchblutungsmusters von bis zu 13 Tagen (Janosi 2001), wären andernfalls auch strukturelle Veränderungen in Niedrigflussarealen zu erwarten.

4.4.2 Heterogener Sauerstoffbedarf

Da unter physiologischen Bedingungen der lokale Sauerstoffverbrauch des Herzens somit nicht sekundär dem lokalen Blutfluss angelehnt zu sein scheint, sondern der Blutfluss vermutlich dem lokalen Sauerstoffverbrauch folgt, stellt sich die Frage nach den Faktoren, die den Sauerstoffverbrauch des Herzens auf einer lokalen Ebene längerfristig determinieren. In Abwesenheit von morphologischen Unterschieden kommt für einen heterogenen lokalen Sauerstoffbedarf des Myokards vor allem eine unterschiedliche Proteinausstattung der Herzmuskelzellen in Hoch- und Niedrigflussarealen in Betracht, da die längerfristige Regulation von Stoffwechselprozessen sich vorzugsweise auf dem Niveau der Genexpression vollzieht (Van Bilsen 1989).

Somit könnte beispielsweise die Verteilung der die Herzmuskelzellkontraktion vermittelnden Proteine eine Ursache für den heterogenen Sauerstoffbedarf des Herzens darstellen. Während die verschiedenen Aktin-Isoenzyme keine unterschiedliche biologische Aktivität haben, weisen Myosin-Isoenzyme mit einem $\alpha\alpha$ -Homodimer eine höher ATPase Aktivität auf als $\beta\beta$ -Myosin, sind jedoch mit einem niedrigeren Wirkungsgrad behaftet (van der Vusse 1989). Einigen Untersuchungen zufolge exprimieren subendokardiale Anteile des Herzens vermehrt $\beta\beta$ -Myosin, was aufgrund der geringeren Kontraktionsgeschwindigkeit und höheren Effizienz typisch für mechanisch stark belastete Wandabschnitte ist, während sich in subepikardialen Bereichen vor allem $\alpha\alpha$ -Myosin findet. Aufgrund der unterschiedlichen ATPase-Aktivität der Myosin-Isoenzyme könnte sich in ihrer Verteilung ein heterogener O₂-Bedarf des Herzens begründen (z.B. Gorza 1981, Kuro-o 1986). Die Untersuchungsergebnisse variieren jedoch je nach untersuchter Spezies und angewandter Methodik erheblich, so dass die Relevanz der Isomyosin-Verteilung für den O₂-Verbrauch der Herzmuskelzelle letztlich fraglich bleibt (van der Vusse 1989).

Da Kalzium neben einer Reihe von Enzymaktivitäten des oxidativen wie glykolytischen Stoffwechsels auch das Zusammenspiel von Aktin- und Myosinfilamenten bei der Herzmuskelzellkontraktion moduliert, wird der myokardiale Sauerstoffbedarf auch durch die zytosolische Kalziumkonzentration beeinflusst. Die

für die Kalzium-Wiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum verantwortliche Ca^{2+} -ATPase scheint in subendokardialen Bereichen des Herzens vermindert synthetisiert zu werden, denn die die SR-Ca²⁺-ATPase-Synthese steuernde mRNA ist im Subendokard niedriger konzentriert als im Subepikard (Igarashi-Saito 1999). Möglicherweise hat dies über eine dauerhafte Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumspiegel im Subendokard eine verminderte myokardiale Kontraktilität zur Folge, worüber der lokale O₂-Bedarf ebenfalls begrenzt würde (Heusch 1996).

Über die Expression von β-Adrenorezeptoren ist die Herzmuskelzelle in der Lage, den Einfluss von im Blut zirkulierenden Katecholaminen auf den O₂-Verbrauch zu steuern. Dass an der Oberfläche von Herzmuskelzellen aus Hochflussarealen eine höhere β-Adrenorezeptorendichte gefunden wurde als auf den Zelloberflächen aus Niedrigflussarealen (Upsher 1989), ist deshalb möglicherweise Ausdruck eines gesteigerten Sauerstoffbedarfs der Herzmuskelzellen in stärker durchbluteten Arealen. Auch die unterschiedlichen Aktivitäten wichtiger Enzyme des kardialen Energiestoffwechsels sowie die Transport- und Stoffwechselraten für Glukose und Fettsäuren (siehe 2.2, 2.3) sind möglicherweise nicht nur ein Hinweis auf einen heterogenen O₂-Verbrauch, sondern, falls sie auf quantitativen Unterschieden in der Proteinsynthese beruhen, auch Ausdruck eines längerfristigen lokal heterogenen O₂-Bedarfs des Herzens. Denn eine Steigerung der Enzymsynthese als Reaktion auf einen erhöhten Sauerstoffbedarf ist beispielsweise für den vermehrt beanspruchten Skelettmuskel seit langem beschrieben (Kendrick-Jones 1965, Gollnick 1961).

Insgesamt gibt es somit einige Befunde, die auf einen lokal heterogenen Sauerstoffbedarf des Herzens hindeuten. Jedoch kann keiner für sich die ausgeprägte Heterogenität im lokalen O₂-Verbrauch erschöpfend erklären, so dass noch nach weiteren Ursachen für den lokal heterogenen Sauerstoffbedarf des Herzens zu suchen ist.

4.5 Implikationen der Heterogenität von O₂-Verbrauch und Energieumsatz

Da Energie in Form von ATP im Herzen zum überwiegenden Teil für die Herzmuskelzellkontraktion verwendet wird, spiegelt sich die Sauerstoffverbrauchsheterogenität möglicherweise auch in der kontraktilen Funktion des Herzens wider. Die nähere Betrachtung der Auswirkungen einer Minderung des koronaren Blutflusses auf Hoch- und Niedrigflussareale des Herzens zeigt zudem weitere Implikationen der Heterogenität des Energieumsatzes auf wie auch seine klinische Relevanz.

4.5.1 Heterogenität der kontraktilen Funktion

Ein lokal heterogener O₂-Verbrauch impliziert angesichts des für das gesamte Herz bekannten Zusammenhangs zwischen Sauerstoffverbrauch und Herzarbeit auch eine lokale Heterogenität der kontraktilen Funktion. Die Quantifizierung der kontraktilen Funktion auf lokaler Ebene erfordert jedoch die Messung der Wandbelastung sowie des zeitlichen Verlaufs der 3-dimensionalen Verformung des Herzmuskels. Aufgrund der geringen Größe der Herzareale, in denen sich die lokale Sauerstoffverbrauchsheterogenität in vollem Ausmaß manifestiert, entzieht sich dies momentan noch den technischen Möglichkeiten der Analyse (Schulz 1998).

Für größere Herzareale sind jedoch bereits Unterschiede in der regionalen Wandbewegung beschrieben. Beispielsweise ist am Hundeherzen die Verkürzung der mittleren Wandabschnitte systolisch im Bereich der Herzspitze größer als in basisnahen Gebieten (LeWinter 1975), und die Verminderung des Wandumfanges in der Vorderwand des linken Ventrikels stärker ausgeprägt als in der Hinterwand (Lew 1986). Auch auf transmuraler Ebene ist im Subendokard eine stärkere Segment-verkürzung und Zunahme der Schichtdicke zu verzeichnen als in subepikardialen Anteilen (Gallagher 1985). Obwohl sich daraus keine Unterschiede in der kontraktilen Funktion ableiten lassen, da die Betrachtung der Bewegung der Herzmuskelwand eindimensional war und die lokale Wandbelastung unbeachtet blieb, nähren diese Befunde zumindest den Verdacht einer auch funktionellen Heterogenität des Herzens.

Dank der Magnetresonanztomographie scheint sich diese Vermutung auch auf lokaler Ebene des Herzens zu bestätigen: Die dreidimensionale Rekonstruktion der Wandbewegungen des linken Hundeherzens, das in 32 Würfel unterteiltet war, gefolgt von der post mortem Analyse des Muskelfaserzellverlaufes ermöglichte, auch auf diesem Niveau eine Heterogenität der Muskelbewegung nachzuweisen (Rademakers 1994). Die Quantifizierung dieser Bewegungsmuster im Sinne von

physikalischer Arbeit ist dennoch nicht möglich, da die lokale Wandbelastung in den untersuchten Arealen nicht erfasst wurde, sie sich jedoch ebenfalls heterogen über die Herzwand verteilt (DeAnda 1998).

Insgesamt bleibt die lokale Heterogenität der kontraktilen Funktion des Herzens somit ein auf indirekte Beobachtungen gestütztes Postulat, das durch den Befund der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Sauerstoffverbrauchsheterogenität jedoch erheblich an Bedeutung gewinnt.

4.5.2 Koronarreserve und inotrope Reserve

Da die Heterogenität von O₂-Angebot und -Verbrauch am Herzen in eine im Ansatz bereits erkennbare lokal heterogene kontraktile Funktion zu münden scheint, lassen fehlende Unterschiede in der Mitochondrien- und Kapillardichte zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen die Vermutung zu, die Herzarbeit niedrigdurchbluteter und stoffwechselinaktiver Areale sei durch Erhöhung des Blutflusses oder durch Steigerung des O₂-Bedarfs auf ein ähnliches Niveau anzuheben wie in Hochflussarealen.

Zwar bewirkt die Erhöhung des koronaren Blutflusses am isovolumetrisch kontrahierenden Herzen eine Zunahme der Kontraktilität (Gregg 1963), jedoch lässt sich dies am normal schlagenden Herzen in situ nicht mehr beobachten (Miller 1987). Auch auf einem regionalen Herzniveau fehlen bislang Hinweise auf eine derartige kontraktile Funktionssteigerung durch Zunahme des koronaren Blutflusses, solange das Gefäßsystem intakt und die Autoregulation erhalten bleiben (Schulz 1991, Canty 1988). Somit scheint durch Steigerung des koronaren Blutflusses allein keine Änderung der Stoffwechselaktivität des Herzens möglich, die in einer Zunahme der kontraktilen Funktion münden könnte.

Im Gegensatz hierzu führt die Steigerung der Herzarbeit infolge β -adrenerger Stimulation neben einer Erhöhung des koronaren Blutflusses auch zu einer Abnahme der lokalen Durchblutungsheterogenität (Matsumoto 1999). Die bei Ausschöpfung der Koronarreserve auftretende, bereits von Austin et al. beschriebene Homogenisierung des lokalen Blutflusses (Austin 1990) könnte angesichts der engen Beziehung zwischen O₂-Angebot und -Verbrauch am Herzen als indirekter Hinweis auf eine Angleichung der Stoffwechselaktivität in Hoch- und Niedrigflussarealen unter kardialer Stimulation gewertet werden. Niedrigflussareale würden demnach eine inotrope Reserve aufweisen, die in Situationen gesteigerter Herzarbeit rekrutiert werden könnte.

4.5.3 Koronare Gefäßstenosen

Während die Steigerung der Herzarbeit am gesunden Herzen zu einer Homogenisierung des lokalen Durchblutungsmusters führt, wird in dem von einem stenosierten Koronargefäß abhängigen Abschnitt der Herzwand der lokale Blutfluss durch kardiale Stimulation deutlich heterogener (Flynn 1989, Coggins 1990). Wenn die in der vorliegenden Arbeit belegte enge Abstimmung von lokalem O₂-Angebot und -Verbauch am Herzen auch unter derart pathologischen Bedingungen Bestand hätte, könnte eine Steigerung der Herzarbeit im poststenotischen Myokard somit eine Zunahme der lokal heterogenen kontraktilen Funktion bewirken. Da die lokale Wandspannung zwischen weniger homogen kontrahierenden Herzarealen ansteigt, könnte der relativ zur geleisteten Herzarbeit erhöhte O₂-Bedarf des chronisch minderperfundierten Myokards hierin seine Erklärung finden.

Der lokale Sauerstoffverbrauch des Herzens ist in der vorliegenden Untersuchung parallel zur Durchblutung gesteigert (Abbildung 25). Daher sind nahezu Hochflussareale des Herzens nicht über-, Niedrigflussareale hingegen auch nicht unterperfundiert. Vielmehr variiert das Sauerstoffangebot in Niedrig- und Hochflussarealen, weil diese einen unterschiedlichen Sauerstoffbedarf aufweisen (siehe Abschnitt 4.4.2). Die enge Anpassung zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf auf lokalem Niveau erklärt, dass in Bereichen der Herzwand, die nach akuter Stenosierung einer Koronararterie nur noch unzureichend mit Blut versorgt werden. weniger der absolute lokale Blutfluss über das Ausmaß der Ischämiereaktion entscheidet als vielmehr der relative Grad der Blutflussreduktion (Loncar 1997). Da zudem in dem von einer stenosierten Koronararterie abhängigen Abschnitt der Herzwand weder Hoch- noch Niedrigflussareale selektiv vor einer Abnahme der Durchblutung geschützt werden, ist die Wahrscheinlichkeit, bei einer akuten Minderung des Blutflusses einen O2-Mangel zu erfahren, in hoch- und niedrigperfundierten Arealen des Herzens gleich groß (Bussemaker 1997).

83

Im Falle eines totalen Gefäßverschlusses hingegen scheinen Hochflussareale stärker von der Anoxie betroffen zu sein als Niedrigflussareale. Denn nach 90-minütiger Gefäßokklusion und 5-tägiger Reperfusion wiesen primär stärker durchblutete Areale des Affenherzen einen höheren Anteil infarzierter Areale auf als Bereiche, die vor der Okklusion niedrigperfundierten Gebieten entsprachen (Ghaleh 1996). Dies spricht dafür, dass das abrupte Sistieren der Durchblutung zu einer frühen Ischämiereaktion in Arealen führt, die primär einen hohen O₂-Bedarf aufweisen, während die Minderung des Blutflusses bei einer koronaren Gefäßstenose noch eine gewisse Anpassung des lokalen O₂-Bedarfs in Hoch- und Niedrigflussarealen ermöglicht. Der umverteilte lokale Blutfluss distal einer koronaren Gefäßstenose spiegelt somit möglicherweise einen bereits sekundär an das reduzierte O₂-Angebot angepassten lokalen Sauerstoffbedarf des Herzens wider.

Die lokale Sauerstoffverbrauchsheterogenität des Herzens kann auch das Auftreten häufig letal endender Kammerarrhythmien bei vollständiger Koronarokklusion oder hochgradiger Koronarstenose erklären. Im minderperfundierten Rattenherzen nehmen diese ihren Ursprung vor allem im destabilisierten Membranpotential ischämischer Herzmuskelzellgruppen (Brasch 1999). Ein lokal heterogener O₂-Bedarf des Herzens könnte bei einem akuten Sauerstoffmangel über eine heterogene Verteilung von Ischämie und Nicht-Ischämie-Zonen zu inhomogenen Deund Repolarisationen führen und somit die Ursache der Arrhythmogenität begründen.

4.6 Ausblick

Die Bedeutung der Heterogenität des lokalen Sauerstoffverbrauches des Herzens für die kontraktile Funktion sowie die Auswirkungen von Imbalancen zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf könnten durch die simultane Messung von lokaler Durchblutung, Stoffwechel und kontraktiler Funktion des Herzens klarer beurteilt werden. Hierzu steht in Zukunft möglicherweise die Magnet-Resonanz-Imaging-Technik (MRI) zur Verfügung. Darüberhinaus vermag die weitere Untersuchung von Hoch- und Niedrigflussarealen hinsichtlich ihrer Ausstattung mit Struktur- und Funktionsproteinen möglicherweise Aufschluss über das molekulare Korrelat der kardialen Heterogenität von Sauerstoffverbrauch und Energieumsatz zu geben.

5 Literaturverzeichnis

- Austin R.E. Jr, G.S. Aldea, D.L. Coggins, A.E. Flynn and J.I.E. Hoffman. Profound spatial heterogeneity of coronary reserve: discordance between patterns of resting and maximal myocardial blood flow. Circ Res. 67: 319-331, 1990.
- **Bassinthwaighte J.B., T. Strandell and D.E. Donald.** Estimation of Coronary Blood Flow by Washout of Diffusible Indicators. Circ Res 23: 259-278,1968.
- Bassingthwaighte J.B., M.A. Mallone, T.C. Moffet, R.B. King, S.E. Little, J.M. Link and K.A. Krohn. Validity of microspheres deposition for regional myocardial flows. Am J Physiol 253: H184-H193, 1987.
- **Bassingthwaighte J.B., R.B. King, and S.A. Roger.** Fractal nature of regional myocardial flow heterogeneity. Circ Res 65: 578-590, 1989.
- Bassingthwaighte J.B., M.A. Mallone, T.C. Moffet, R.B. King, I.S. Chan, J.M. Link and K.A. Krohn. Molecular and particulate depositions for regional myocardial flows in sheep. Circ Res 66: 1328-1344, 1990.
- Bauman R.P., J.C. Remberg, J.C. Greenfield Jr. Regional blood flow in canine atria during exercise. Am J Physiol 265: H629-632, 1993.
- Bauer W.R., K.-H. Hiller, P. Galuppo, S. Neubauer, J. Köpke, A. Haase and G. Ertl. Fast high-resolution magnetic resonance imaging demonstrates fractility of myocardial perfusion in microscopic dimensions. Circ Res 88: 340-346, 2001.
- Brasch F., M. Neckel, R. Volkmann, G. Schmidt, G. Hellige, and F. Vetterlein. Mapping of capillary flow, cellular redox state, and resting membrane potential in hypoperfused rat myocardium. Am J Physiol 277: H2050-H2064, 1999.
- Bussemaker J., J.H. van Beek, A.B. Groeneveld, M. Hennekes, T. Terlink, L.G. Thijs, and N. Westerhof. Local mitochondrial enzyme activity correlates with myocardial blood flow at basal workloads. J Mol Cell Cardiology 26: 1017-1028, 1994.
- Bussemaker J., A.B.J. Groeneveld, T. Teerlink, M. Hennekes, N. Westerhof and J.H.G.M. Van Beek. Low- and high-blood flow regions in the normal pig heart are equally vulnerable to ischaemia during partial coronary stenosis. Pflügers Arch. 434: 785-794, 1997.

- **Caldwell J.H., G.V. Martin, G.M. Raymond, and J.B.Bassingthwaighte.** Regional myocardial blood flow and capillary permeability-surface area products are nearly proportional. Am J Physiol 267: H654-H666,1994.
- Camici P.G., W.C. Wijns, M. Borgers, R. de Silva, R. Ferrari, G. Heusch, J. Knuuti, A.A. Lammertsma, G. Paternostro, and S.F. Vatner. Pathophysiological mechanisms of chronic reversible left ventricular dysfunction due to coronary artery disease (hibernating myocardium). Circulation 96: 3205-3214, 1997.
- **Canty J.M.** Coronary pressure-function and steady-state pressure-flow relations during autoregulation in the unanesthetized dog. Circ Res 63: 821-836, 1988.
- **Chance, B., and G. Williams.** Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation I. Kinetics of oxygen utilization. J Biol Chem 81: 477-489, 1955.
- **Chance E.M., S.H. Seeholzer, K. Kobayashi, and J.R. Williamson.** Mathematical analysis of isotope labeling in the citric acid cycle with applications to ¹³C NMR studies in perfused rat hearts. J Biol Chem 258: 13785-13794, 1983.
- **Chatham J.C., J.R. Forder, J.D. Glickson, and E.M. Chance.** Calculation of absolute metabolic flux and the elucidation of the pathways of glutamate labeling in perfused rat hearts by ¹³C NMR spectroscopy and nonlinear least squares analysis. J Biol Chem 270: 7999-8008,1995.
- Chatham J.C., and J.R. Forder. Metabolic compartmentation of lactate in the glucose-perfused rat heart. Am J Physiol 270: H224-H229, 1996.
- Challoner D. E. Respiration in myocardium. Nature 217: 78-79, 1968.
- **Chilian W.M.** Microvascular pressure and resistances in the left ventricular subepicardium and subendocardium. Circ Res 69: 561-570, 1991.
- Coggins D.L., A.E. Flynn, R.E. Austin, G.S. Aldea, D. Muehrcke, M. Goto and J.I.E. Hoffman. Nonuniform loss of regional flow reserve during myocardial ischemia in dogs. Circ Res 67: 253-264, 1990.
- **Decking U.K.M., G. Schlieper, K. Kroll, and J. Schrader.** Hypoxia-induced inhibition of adenosine kinase potentiates cardiac adenosine release. Circ Res 81: 154-164, 1997.
- DeAndea A. Jr., M. Komeda, M.R. Moon, G. R. Green, A.F. Bolger, A.D. Nicolic, G.T Daughters II, and D.C. Miller. Estimation of regional wall stress in intact canine hearts. Am J Physiol 275: H1879-H1885, 1998.

- **DeFily D.V. and W.M. Chilian.** Coronary microcirculation: Autoregulation and Metabolic Control. Basic Res Cardiol 90: 112-118, 1995.
- Delcayre C., J.L. Samuel, F. Marotte, M. Best-Belpomme, J.J. Mercadier, and L. Rappaport. Synthesis of stress protein in rat cardiac myocytes 2–4 days after imposition of hemodynamic overload. J Clin Invest 82: 460-468, 1988.
- Deussen A., C.W. Flesche, T. Lauer, M. Sonntag, and J. Schrader. Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. II. Temporal stability in response to adrenergic stimulation. Pflügers Arch 432: 451-461, 1996.
- **Deussen A.** Local myocardial glucose uptake is proportional to, but not dependent on blood flow. Pflügers Arch 433: 488-496, 1997.
- **Deussen A.** Blood flow heterogeneity in the heart. Basic Res Cardiol 93: 430-438, 1998.
- Fedele F.A., H. Gewirtz, R.J. Capone, B. Sharaf and A.S. Most. Metabolic response to prolonged reduction of myocardial blood flow distal to a severe coronary artery stenosis. Circulation 78: 729-735, 1988.

Feigl E.O. Coronary physiology. Physiol Rev 63: 1-205, 1983.

- Flynn A.E., D.L. Coggins, R.E. Austin jr, D.D. Muehrcke, G.S. Aldea, M. Goto, J.W. Doucette, and J.I.E. Hoffman. Nonuniform blood flow in the canine left ventricle. J Surg Res 49: 379-384, 1990.
- Franzen D., R.S. Conway, H. Zhang, E.H. Sonnenblick, and C. Eng. Spatial heterogeneity of local blood flow and metabolite content in dog hearts. Am J Physiol. 254: H344-353, 1988.
- **Furchgott R.F., and J.V. Zawadzki.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288: 373-376, 1980.
- Gallagher K.P., G. Osakada, M. Matsuzaki, M. Miller, W.S. Kemper, and J. Ross Jr. Nonuniformity of inner and outer systolic wall thickening in conscious dogs. Am J Physiol 249: H241-H248, 1985.
- Gamble W.J., C.G. LaFarge, D.C. Fyler, J. Weisul and R.G. Monroe. Regional coronary venous oxygen saturation and myocardial oxygen tension following abrupt changes in ventricular pressure in the isolated dog heart. Circ Res 34: 672-681, 1974.
- **Ganz P., and E. Braunwald.** A Textbook of Cardiovascular Medecine, 5. Edition, Chapter 36: 1161-1184, 1997.

- **Ghaleh B., Y.-T. Shen and S.F. Vatner.** Spatial heterogeneity of myocardial blood flow presages salvage versus necrosis with coronary artery reperfusion in conscious baboons. Circulation 94: 2210-2215, 1996.
- **Gollnick P.D., and G.R. Hearn.** Lactic dehydrogenase activity of heart and skletal muscle of exercised rats. Am J Physiol 201: 694-696, 1961.
- **Gonzales F., and J.B. Bassingthwaighte.** Heterogeneities in regional volumes of distribution and flows in rabbit hearts. Am J Physiol 258: H1012-H1024, 1990.
- Gorza L., J.J. Mercadier, K. Schwartz, L.E. Thornell, S. Sartore, and S. Schiaffino. Myosin types in the human heart. An immunofluorescence study of normal and hypertrophied artrial and ventricular myocardium. Circ Res 54, 694-702, 1981.
- Goto M., A.E. Flynn, J.W. Doucette, C.M. Jansen, M.M. Stork, D.L. Coggins, D.D. Muehrcke, W.K. Husseini, and L.I.E. Hoffmann. Cardiac contraction affects deep myocardial vessels predominantly. Am J Physiol 261: H1417-H1429, 1991.
- **Gregg D.E.** Effect of coronary perfusion pressure or coronary flow on oxygen usage of the myocardium. Circ Res 13: 497-500, 1963.
- Groeneveld A.B.J., A.A. van Lambalgen, G.C.van de Bos, J.J.P. Nauta, and L.G. Thijs. Metabolic vasodilatation with glucose-insulin-potassium does not change the heterogeneous distribution of coronary blood flow in the dog. Cardiovasc Res 26: 757-764, 1992.
- **Groeneveld A.B.J., and F.C. Visser.** Correlation of heterogeneous blood flow and fatty acid uptake in the normal dog heart. Basic Res Cardiol 88: 223-232, 1993.
- Heineman F.W., and R.S. Balaban. Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo. Ann Rev Physiol 52: 523-542, 1990.
- Heusch G., and R. Schulz. Hibernating myocardium: A review. J Mol Cell Cardiol 28: 2359-2372, 1996.
- Heusch G. Hibernating Myocardium. Physiol Rev 78:1055-1085, 1998.
- Heusch G., J. Rose, A. Skyschally, H. Post, and R. Schulz. Calcium responsiveness in regional myocardial short-term hibernation and stunning in the in situ porcine heart: inotropic responses to postextrasystolic potentiation and intracoronary calcium. Circulation 93: 1556-1566, 1996.

- **Hoffman J.I.E.** Heterogeneity of myocardial blood flow. Basic Res Cardiol 90: 103-111, 1995.
- Holtz J., W.A. Grunewald, R. Manz, W. von Restorff, and E. Bassenge. Intracapillary Hemoglobin Oxygen Saturation and Oxygen Consumption in Different Layers of the Left Ventricular Myocardium. Pflügers Arch. 370: 253-258, 1977.
- Igarashi-Saito K., H. Tsutsui, M. Takahashi, S. Kinugawa, K. Egashira, and A. Takeshita. Endocardial versus epicardial differences of sarcoplasmatic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the canine failing myocardium. Bas Res Cardiol 94: 267-273, 1999.
- Janosi R.A., B. Preckel, W. Schlack, V. Thämer, J. Schrader, and U.K.M. Decking. Spatial heterogeneity of myocardial blood flow is stable for weeks. In press 2001.
- **Jeffrey F.M.H., A. Rajagopal, C.R. Malloy, and A.D. Sherry.** ¹³C-NMR: A simple yet comprehensive method for analysis of intermediary metabolism. TIBS 16: 5-10, 1991.
- Kassab G.S., C.A. Rider, N.J. Tang, and Y.C.B Fung. Morphometry of pig coronary arterial trees. Am J Physiol 265: H350-H365, 1993.
- **Kassab G.S., and Y.C.B. Fung.** Topology and dimensions of pig coronary capillary network. Am J Physiol 267: H319-H325,1994.
- **Kendrick-Jones J., and S.V. Perry.** Enzymatic adaptation to contractile activity in skeletal muscle. Nature Lond. 208: 1068-1070, 1965.
- King R.B., J.B. Bassingthwaighte, J.R.S. Hales, and L.B. Rowell. Stability of heterogeneity of myocardial blood flow in normal awake baboons. Circ Res 57: 285-295, 1985.
- **Kleinert H.D., and H.R. Weiss.** Blood flow and high-energy phosphates in microregions of the left ventricular subendocardium. Am J Physiol 240: H804-H810, 1981.
- Klocke F.J. Coronary blood flow in man. Prog Cardiovasc Dis 19:117, 1976.
- **Kroll K., and G.V. Martin.** Steady-State catecholamine stimulation does not increase cytosolic adenosine in canine hearts. Am J Physiol 265: H503-H510, 1994.
- Kuro-o M., H. Tsuchimochi, S. Ueda, F. Takaku, and Y. Yazaki. Distribution of cardiac myosin isozymes in human conduction system.

Immunohistohechmical study using monoclonal antibodies. J Clin Invest 77: 340-347, 1986.

- **Kuo L., M.I. Davis, and W.M. Chilian.** Endothelium-dependent, flow-induced dilation of isolated coronary arterioles. Am J Physiol 259: H1063-H1070,1990.
- Lew W.Y.W., and M.M. LeWinter. Regional comparison of midwall segment and area shortening in the canine left ventricle. Circ Res 58: 678-691, 1986.
- Lewandowski E.D. Metabolic heterogeneity of carbon substrate utilization in mammalian heart: NMR determination of mitochondrial versus cytosolic compartmentation. Biochem. 31: 8916-8923, 1992.
- **LeWinter M.M., R.S. Kent, J.M. Kroener, T.E. Carew, and J.W. Covell.** Regional differences in myocardial performance in the left ventricle of the dog. Circ Res 37:191-199, 1975.
- Li Z., T. Yipintsoi, J. H. Caldwell, C. J. Zuurbier, K. A. Krohn, J. M. Link, and J.
 B. Bassingthwaighte. In vivo measurement of regional myocardial oxygen utilization with inhaled ¹⁵O-Oxygen and positron emission tomography. Ann Biomed Eng 24: S-32, 1996.
- Loncar R., C.W. Flesche, and A. Deussen. Coronary reserve of high- and low-flow regions in the dog heart left ventricle. Circ Res 98: 262-270, 1998.
- Loncar R., C.W. Flesche, and A. Deussen. Regional myocardial heat-shock protein (HSP70) concentrations under different blood flow conditions. Plügers Arch 437: 98-102, 1998.
- Lösse B., S. Schuchhardt, and N. Niederle. The oxygen pressure histogram in the left ventricular myocardium of the dog. Plügers Arch 356: 121-132, 1974.
- Malloy C.R., A.D. Sherry, and F.M.H. Jeffrey. Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by ¹³C NMR spectroscopy. J Biol Chem 263: 6964-6971, 1988.
- Marcus M.L., R.E. Kerber, J.C. Erhardt, H.L. Falsetti, D.M. Davis, and F.M. Abboud. Spatial and temporal heterogeneity of left ventricular perfusion in awake dogs. Am Heart J 94: 748-754, 1977.
- Martin C., R. Schulz, J. Rose, and G. Heusch. Inorganic phosphate content and free energy change of ATP hydrolysis in regional short-term hibertnating myocardium. Cardiovasc Res 39: 318-326, 1998.

- Matsumoto T., J. Ebata, H. Tachibana, M. Goto, and F. Kajiya. Transmural microcirculatory blood flow distribution in right and left ventricular free walls of rabbits. Am J Physiol 277: H183-H191, 1999.
- Matsumoto T. H. Tachibana, Y. Ogasawara, and F. Kajiya. New double-tracer digital radiography for analysis of spatial and temporal myocardial flow heterogeneity. Am J Physiol 280: H465-474, 2001.
- Miller W.P., N. Shimamoto, S.H. Nellis, and A.J. Liedtke. Coronary hyperperfusion and myocardial metabolism in isolated and intact hearts. Am J Physiol 253: H1271-H1278, 1987.
- **Miyashiro J.K., and E.O. Feigl.** Feedforward Control of Coronary Blood Flow via Coronary B-Receptor Stimulation. Cir Res 73: 252-263,1993.
- Monroe R.G., W.J. Gamble, G.G. LaFarge, H. Benoualid and J. Weisul. Transmural coronary venous O₂ saturations in normal and isolated hearts. Am J Physiol 228: 318-324, 1975.
- Mori H., M. Chujo, S. Haruyama, H. Sakamoto, Y. Shinozaki, M. Uddin-Mohammed, A. lida, and H. Nakazawa. Local continuity of myocardial blood flow studied by monochromatic synchrotron radiation-excited X-ray fluorescence spectrometry. Circ Res 76: 1088-1100, 1995.
- O'Donnell J.M., C. Doumen, K.F. LaNoue, L.T. White, X. Yu, N.M. Alpert, and E.D. Lewandowski. Dehydrogenase regulation of metabolite oxidation and efflux from mitochondria in intact hearts. Am J Physiol 274: H467-H476, 1998.
- **Olsson R.A., and J.D. Pearson.** Cardiovascular Purinoceptors. Physiol Rev. 70: 761-845, 1990.
- Olsson R.A., R. Bünger, and J.A.E. Spaan. Coronary circulation. In *The heart and cardiovascular system*, edited by H.A. Fozzard, E. Haber, R.B. Jennings, A.M. Katz, and H.E. Morgan. New York: Raven Press, p. 1393-1425, 1992.
- **Opie L.H.** *The heart: Physiology and metabolism.* 2nd ed. New York: Raven Press, 1991.
- **Opie L.H., P. Owen, M. Thomas, and R. Samaon.** Coronary sinus lactate measurements in assessment of myocardial ischemia. Am J Cardiol 32: 295-305, 1973.
- Rademakers F.E., W.J. Rogers, W.H. Guier, G.M. Hutchins, C.O. Siu, M.L. Weisfeldt, J.L. Weiss, and E.P. Shapiro. Relation of regional cross-fiber

shortening to wall thickening in the intact heart. Three-dimensional strain analysis by NMR tagging. Circulation 89: 1174-1182, 1994.

- **Rahimtoola S.H.** Coronary bypass surgery for chronic angina-1981. Circulation 65: 225-241, 1982.
- **Rodriguez E., and H.R. Weiss.** Relationship between local myocardial adenylcyclase activity and local coronary blood flow in the dog heart. J Autonom Pharmacol 13: 95-103, 1993.
- Rumesy W.L., M. Pawlowski, N. Lejavardi, and D.F. Wilson. Oxygen pressure distribution in the heart in vivo and evalutation of the ischemic border. Am J Physiol 266: H1676-1680, 1994.
- Schrader J., F.J. Haddy, and E. Gerlach. Release of adenosine, inosine and hypoxanthine from the isolated guinea pig heart during hypoxia, flow-autoregulation and reactive hyperaemia. Pflügers Arch 369: 1-6, 1977.
- **Schrader J.** Adenosine a homeostatic metabolite in cardiac energy metabolism. Circulation 81: 389-391, 1990.
- **Schrader J.** Das Herz. In *Lehrbuch der Physiologie*, edited by R. Klinke and S. Silbernagel, Thieme Verlag: p. 99-130, 1994.
- **Schramm M., H.-G. Klieber, and J. Daut.** The energy expenditure of actomyosin-ATPase, Ca²⁺-ATPase and Na⁺, K⁺-ATPase in guinea-pig cardiac ventricular muscle. J Physiol (Lond) 481: 647-662, 1994.
- Schulz R., B.D. Guth, and G. Heusch. No effect of coronary perfusion on regional myocardial function within the autoregulatory range in pigs: Evidence against the Gregg phenomenon. Circulation 83: 1390-1403, 1991.
- Schulz R., and G. Heusch. The relationship between regional blood flow and contractile function in normal, ischemic, and reperfused myocardium. Bas Res Cardiol 93: 455-462, 1998.
- Schwanke U., A. Deussen, G. Heusch G, and J.D. Schipke. Heterogeneity of local myocardial flow and oxidative metabolism. Am J Physiol 279: H1029-H1035, 2000.
- Sestier F.J., R.R. Mildenberger, and G.A. Klassen. Role of autoregulation in spatial and temporal perfusion heterogeneity of canine myocardium. Am J Physiol 253: H64-H71, 1978.

- Sonntag M., A. Deussen, J. Schultz, R. Loncar, W. Hort, and J. Schrader. Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. I. Glucose uptake, free adenosine and oxidative/glycolytic enzyme activity. Pflügers Arch. 432: 439-450, 1996.
- Stapleton D.D., T.C. Moffett, D.G. Baskin, and J.B. Bassingthwaighte. Autoradiographic assessment of blood flow heterogeneity in the hamster heart. Microcirculation 2: 277-282, 1995.
- Steenbergen C., G. Deleeuw, C. Barlow, B. Chance, and J.R. Williamson. Heterogeneity of the hypoxic state in perfused rat heart. Circ Res 41: 606-615, 1977.
- **Stein P.D., M. Marzilli, H.N. Sabbah and T. Lee.** Systolic and diastolic pressure gradients within the left ventricular wall. Am J Physiol 238: H625-H630, 1980.
- Tanaka A., H. Mori, A. Tanaka, M.U. Mohammed, Y. Tanaka, T. Sekka, K. Ito, Y. Shinozaki, K. Hyodo, M. Ando, K. Umetani, K. Tanioka, M. Kubota, S. Abe, S. Handa, and H. Nakazawa. Branching patterns of intramural coronary vessels determined by microangiography using synchrotron radiation. Am J Physiol 276: H2262–H2267, 1999.
- Tune J.D., K.N. Richmond, M.W. Gorman, R.A. Olsson, and E.O. Feigl. Adenosine is not responsible for local metabolic control of coronary blood flow in dogs during exercise. Am J Physiol 278: 1174-1184, 2000.
- **Upsher M.E., and H.R. Weiss.** Relationship between β-adrenoceptors and coronary blood flow heterogeneity. Life-Science 44: 1173-1184, 1989.
- Van Bavel E., and J.A.E. Spaan. Branching patterns in the porcine coronary arterial tree: Estimation of flow heterogeneity. CircRes 71: 1200-1212, 1992.
- Van Beek J.H.G.M., S.A. Roger, and J.B. Bassingthwaighte. Regional myocardial flow heterogeneity explained with fractal networks. Am J Physiol 257: H1670-H1680, 1989.
- Van Beek J.H.G.M., H.J.G. van Mil, R.B. King, F.J.J. de Kanter, D.J.C. Alders, and J. Bussemaker. A ¹³C NMR double-labeling method to quantitate local myocardial O₂ consumption using frozen tissue samples. Am J Physiol 277: H1630-H1640, 1999.
- Van Bilsen M., G.J. van der Vusse, and R.S. Reneman. Transcriptional regulation of metabolic processes: Implications for cardiac metabolism. Plfügers Arch 437:2-14, 1998.

- Van der Vusse G.J., T. Arts, J.F.C. Glatz, and R.S. Reneman. Transmural differences in energy metabolism of the left ventricular myocardium: Fact or fiction. J Moll Cell Cardiol 22: 23-37, 1990.
- Van der Vusse G.J., J.F. Glatz and R.S. Reneman. Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. Physiol Rev 72: 881-940, 1992.
- Van Iterson M., M. Siegemund, J. Dries, A. Trouwborst, and C. Ince. Microvascular oxygenation of the heart and gut during haemorrhage in pigs. Int Care Med 24: 190, 1998.
- Vetterlein F., M. Prange, and D. Lubrich. Capillary perfusion pattern and microvascular geometry in heterogenous hypoxic areas of hypoperfused rat myocardium. Am J Physiol 268: H2183-2194, 1995.
- Weiss R.G., S.T. Gloth, R. Kalil-Filho, V.P. Chacko, M.D. Stern, and G. Gerstenblith. Indexing tricarboxylic acid cycle flux in intact hearts by carbon-13 nuclear magnetic resonance. Circ Res 70: 392-408, 1992.
- Weiss H.R., and A.K. Sinha. Regional oxygen saturation of small arteries and veins in the canine myocardium. Circ Res 42: 119-126, 1977.
- Wiesner R.J., A. Deussen, M. Borst, J. Schrader, and M.K. Grieshaber. Glutamate degradation in the ischemic dog heart: contribution to anaerobic energy production. J Mol Cell Cardiol 21: 49-59, 1989.
- Wolpers H.G. Passage von Inertgasen durch das Myokard: Zur Durchblutungsmessung mit der Fremdgas-Methodik (Habilitationsschrift). Göttingen, FRG: Universität Göttingen, 1985.
- Yamada N., R. Bünger, C.R. Steinhart, and R.A. Olsson. Coronary vasoactivity of acetate in dog and guinea-pig. Basic Res Cardiol 81: 342-349, 1986.
- Yipintsoi T., W.A. Dobbs Jr, P.D. Scanlon, T.J. Knopp and J.B. Bassingthwaighte. Regional distribution of diffusible tracers and carbonized microspheres in the left ventricle of isolated dog hearts. Circ Res 33: 573-587, 1973.
- Yu X., L. T. White, C. Doumen, L. A. Damico, K. F. LaNoue, N. M. Alpert, and E. D. Lewandowski. Kinetic analysis of dynamic ¹³C-NMR spectra: Metabolic flux, regulation, and compartimentation in hearts. Biophys J 69: 2090-2102, 1995.

- Yu X., N.M. Alpert, and E.D. Lewandowski. Modeling enrichment kinetics from dynamic ¹³C-NMR spectra: Theoretical analysis and practical considerations. Am J Physiol 272: C2037-C2048, 1997.
- Zhang J., L Shorr, M. Yoshiyama et al. Hyperperfusion and cardioplegia effect on myocardial high-energy phosphate distribution and energy expenditure. Am J Physiol 267: H894-H904, 1994.
- **Zhao P., A.D. Sherry, C.R. Malloy, and E.E. Babcock.** Direct observation of lactate and alanine by proton double quantum spectroscopy in rat hearts supplied with [3-¹³C]pyruvate. FEBS Lett 303: 247-250, 1992.
- Zuurbier C.J., M. van Iterson, and C. Ince. Functional heterogeneity of oxygen supply-consumption ratio in the heart. Cardiovasc Res 44: 488-497, 1999.

6 Appendix

Die Berechnung der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus anhand des Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnisses erfolgte in einem mathematischen Modell, das einem vereinfachten, aus mehreren Kompartimenten bestehenden Modell des Pyruvat-Stoffwechsels angelehnt war (Abbildung 2). Folgende Metabolite wurden hierin berücksichtigt: Alanin (Ala), Laktat (Lak), Citrat (Cit), α -Ketoglutarat (α -Kg), Malat (Mal), Oxalazetat (Oaa), Glutamat (Glu), Glutamin (Gln) und Aspartat (Asp).

Die ¹³C-Markierungen der Kohlenstoffatome an den Positionen C-2, C-3, und C-4 jedes einzelnen Metaboliten wurden als eigenständige Poolgrößen betrachtet. Aufgrund der Symmetrie des Succinats ließ sich die Zahl der Gleichungen, die die ¹³C-Anreicherung im Malat und Oxalazetat, sowie im 2. Durchlauf durch den Zyklus im Citrat, α -Ketoglutarat, Glutamat und Glutamin beschreiben, reduzieren. Berücksichtigt wurde nur die [2-¹³C]Markierung von Malat, Aspartat und Oxalazetat, die dann zu einer [3-¹³C]Markierung von Citrat, Glutamat und Glutamin führt.

Gemäß dem Prinizp des Massenerhaltes ließ sich die ¹³C-Markierungskinetik für die betrachteten Metabolite durch die folgenden 14 Differentialgleichungen beschreiben. Hierin wurden neben den einzelnen Metabolitpools und der Umsatzrate des Zitronensäurezyklus auch Austauschreaktionen zwischen den einzelnen Metabolitpools erfasst (Abbildung 2, Tabelle 5).

$$\frac{d(Pyr-C3)}{dt} = J_{tca} \cdot (F_c - Pyr-C3) + F_4 \cdot (Ala-C2 - Pyr-C3) + F_3 \cdot (Lak-C2 - Pyr-C3)$$

$$\frac{d(Ala-C2)}{dt} = F_4 \cdot \frac{(Pyr-C3 - Ala-C2)}{Ala}$$

$$\frac{d(Lac-C2)}{dt} = F_3 \cdot \frac{(Pyr-C3 - Lac-C2)}{Lac}$$

$$\frac{d(Cit-C4)}{dt} = J_{tca} \cdot \frac{(F_c - Cit-C4)}{Cit}$$

$$\frac{d(\alpha Kg-C4)}{dt} = \frac{J_{tca} \cdot Cit-C4 + F_1 \cdot Glu-C4 - (J_{tca} + F_1) \cdot \alpha Kg-C4}{\alpha Kg}$$

$$\frac{d(Glu-C4)}{dt} = \frac{F_1 \cdot \alpha Kg-C4 + F_5 \cdot Gln-C4 - (F_1 + F_5) \cdot Glu-C4}{Gln}$$

d(Gln-C4)	Glu-C4-Gln-C4
dt	Gln
<u>d(Mal-C2)</u>	$= I - \frac{(0.5 \cdot \alpha \text{ Kg- } C 2 + 0.5 \cdot \alpha \text{ Kg- } C 4 - (1 + y) \cdot \text{Mal- } C 2)}{(1 + y) \cdot \text{Mal- } C 2}$
dt	Mal
d(Oaa-C2)	$\underline{J_{tca} \cdot Mal \cdot C2 + F_2 \cdot Asp \cdot C2 - (J_{tca} + F_2) \cdot Oaa \cdot C2}$
dt	Oaa
$\frac{d(Asp-C2)}{d(Asp-C2)}$	$-E \cdot \frac{(Oaa - C2 - Asp - C2)}{(Oaa - C2 - Asp - C2)}$
dt –	Asp
$\frac{d(Cit-C3)}{d(Cit-C3)} =$	$J = \frac{(Oaa - C2 - Cit - C3)}{(Oaa - C2 - Cit - C3)}$
dt	Cit
d(αKg-C3)	$= \frac{J_{tca} \cdot Cit \cdot C3 + F_{l} \cdot Glu \cdot C3 - (J_{tca} + F_{l}) \cdot \alpha Kg \cdot C3}{Kg \cdot C3}$
dt	$ \alpha Kg$
d(Glu-C3)	$F_1 \cdot \alpha \operatorname{Kg-C3} + F_5 \cdot \operatorname{Gln-C3} - (F_1 + F_5) \cdot \operatorname{Glu-C3}$
dt –	Glu
d(Gln-C3)	$= \frac{(Glu-C3-Gln-C3)}{(Glu-C3-Gln-C3)}$
dt	Gln

Aaa-Cn entspricht der fraktionellen ¹³C-Anreicherung des Metaboliten *Aaa* im *n*-ten Kohlenstoffatom. Die Poolgrößen *Aaa* sind in μ mol/g Feuchtgewicht anzugeben, die Umsatzraten *F1-F5* in μ mol min⁻¹g⁻¹ (siehe Abbildung 2 und Tabelle 5).

7 Zusammenfassung

Am Herzen variiert die räumliche Verteilung der Durchblutung in erheblichem Maße, trotz der scheinbar homogenen Struktur z.B. der linksventrikulären Wand. Um die Beziehung zwischen dieser räumlichen Heterogenität der Durchblutung und dem lokalen Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch zu untersuchen, wurde am Hundeherzen *in situ* die myokardiale Durchblutung mit Hilfe von radioaktiven Mikrosphären gemessen und zugleich der lokale Sauerstoffverbrauch in ca. 200 mm³ großen Herzarealen über die Umsatzrate des Citratzyklus ermittelt. Dieser ließ sich nach Gabe von [3-¹³C]Pyruvat aus dem Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis berechnen, das in einzelnen Myokardproben mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie bestimmt wurde.

Jeweils 1/10 von insgesamt 1547 Proben aus 7 Herzen erhielt weniger als 60% (= Niedrigflussareale, NF) oder mehr als 140% des durchschnittlichen myokardialen Blutflusses (= Hochflussareale, HF). Nach 12-minütiger Gabe von $[3^{-13}C]$ Pyruvat fanden sich signifikante Unterschiede im Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis (1.64 ± 0.49 vs. 2.21 ± 0.75, HF vs. NF). Dies entsprach einem 3.4-fachen Unterschied im lokalen Sauerstoffverbrauch zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen (3.06 ± 1.84 bzw. 0.89 ± 0.37 µmol min⁻¹g⁻¹). Auch der Gehalt an Glutamat und Laktat war in Hochflussarealen signifikant erhöht. Die ¹³C-Isotopomer-Analyse nach 60 Minuten [3⁻¹³C]Pyruvat zeigte, dass sich relativ zum Umsatz des Citratzyklus die Aufnahme von [3⁻¹³C]Pyruvat und der Zufluss alternativer Substrate aus anaplerotischen Stoffwechselwegen in Hoch- und Niedrigflussarealen nicht unterschieden.

Trotz der scheinbar homogenen Struktur und Funktion weist das Herz somit auf lokalem Niveau eine deutliche Heterogenität im lokalen Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch auf. Verglichen mit Niedrigflussarealen zeigen Hochflussareale nicht nur eine 3-fach höhere Durchblutung, sondern auch einen auf das 3.4-fache gesteigerten Sauerstoffverbrauch. Dies lässt auf eine räumliche Heterogenität der lokalen ATP-Bildung und des Energieumsatzes schließen.

Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob der lokal heterogene Energieumsatz auch mit einer lokal heterogenen Herzarbeit verbunden ist und welche Unterschiede in der Gen- und Proteinexpression diesem zugrunde liegen.

8 Danksagung

Herrn Professor Dr. J. Schrader danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der notwendigen Mittel sowie für den Rat und die Anleitung, die für einen erfolgreichen Abschluss der Arbeit erforderlich waren.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. U.K.M. Decking für die umfassende Betreuung bei der Vorbereitung, Durchführung und Auswertung der Versuche sowie für die Vielzahl von Diskussionen und Anregungen. Seinem engagierten Einsatz und steter Hilfsbereitschaft, die weit über die experimentelle Phase hinausreichten, ist das Gelingen dieser Arbeit in entscheidendem Maße zu verdanken.

Frau Eva Bergschneider möchte ich danken für ihre Mitarbeit bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche sowie für ihre zahlreichen Hilfestellungen bei der Aufbereitung und biochemischen Analyse der Herzproben.

Bei Herrn Marc F. Zimmermann bedanke ich mich für die Entwicklung und Programmierung des mathematischen Modells sowie für die Assistenz bei der Durchführung und Auswertung einzelner Versuche.

Herrn Dr. B. Preckel, Herrn Prof. Dr. A. Deussen und Herrn Prof. Dr. V. Thämer möchte ich für die Präparation der Hundeherzen danken.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Herz- und Kreislaufphysiologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Stefan Skwirba
03.08.1972
Orsoy, jetzt Rheinberg
Reinhold und Margit Skwirba, geb. Streletz
Humboldtstraße 3, 47506 Neukirchen-Vluyn

Schulausbildung

1979 – 1983	Pestalozzi-Grundschule, Neukirchen-Vluyn	
1983 – 1989	Julius-Stursberg-Gymnasium, Neukirchen-Vluyn	
1989 – 1990	Lycée Fénelon, Lille, Frankreich	
	07/90: Baccalauréat	
1990 – 1992	Julius-Stursberg-Gymnasium, Neukirchen-Vluyn	
	06/92: Allgemeine Hochschulreife	

Zivildienst

07/92 – 09/93	St. Josef Krankenhaus,	Moers
---------------	------------------------	-------

Hochschulausbildung

10/93 – 03/94	Studium der Humanmedizin an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen	
04/94 – 11/99	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf	
	 09/95: Ärztliche Vorprüfung 09/96: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 10/96: United States Medical Licensing Examination, Step I 09/98: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 03/99: United States Medical Licensing Examination, Step II 11/99: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 	

Ärztliche Tätigkeit

seit 01.01.2000 Arzt in der Abteilung für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin des Klinikums der Universität zu Köln

Räumliche Heterogenität von Durchblutung und Energieumsatz des Herzens

Stefan Skwirba

Am Herzen variiert die räumliche Verteilung der Durchblutung in erheblichem Maße, trotz der scheinbar homogenen Struktur z.B. der linksventrikulären Wand. Um die Beziehung zwischen dieser räumlichen Heterogenität der Durchblutung und dem lokalen Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch zu untersuchen, wurde am Hundeherzen *in situ* die myokardiale Durchblutung mit Hilfe von radioaktiven Mikrosphären gemessen und zugleich der lokale Sauerstoffverbrauch in ca. 200 mm³ großen Herzarealen über die Umsatzrate des Citratzyklus ermittelt. Dieser ließ sich nach Gabe von [3-¹³C]Pyruvat aus dem Glutamat [4-¹³C]/[3-¹³C]-Verhältnis berechnen, das in einzelnen Myokardproben mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie bestimmt wurde.

Jeweils 1/10 von insgesamt 1547 Proben aus 7 Herzen erhielt weniger als 60% (= Niedrigflussareale, NF) oder mehr als 140% des durchschnittlichen myokardialen Blutflusses (= Hochflussareale, HF). Nach 12-minütiger Gabe von $[3^{-13}C]$ Pyruvat fanden sich signifikante Unterschiede im Glutamat $[4^{-13}C]/[3^{-13}C]$ -Verhältnis (1.64 ± 0.49 vs. 2.21 ± 0.75, HF vs. NF). Dies entsprach einem 3.4-fachen Unterschied im lokalen Sauerstoffverbrauch zwischen Hoch- und Niedrigflussarealen (3.06 ± 1.84 bzw. 0.89 ± 0.37 µmol/min/g). Auch der Gehalt an Glutamat und Laktat war in Hochflussarealen signifikant erhöht. Die ¹³C-Isotopomer-Analyse nach 60 Minuten [3⁻¹³C]Pyruvat zeigte, dass sich relativ zum Umsatz des Citratzyklus die Aufnahme von [3⁻¹³C]Pyruvat und der Zufluss alternativer Substrate aus anaplerotischen Stoffwechselwegen in Hoch- und Niedrigflussarealen nicht unterschieden.

Trotz der scheinbar homogenen Struktur und Funktion weist das Herz somit auf lokalem Niveau eine deutliche Heterogenität im lokalen Stoffwechsel und Sauerstoffverbrauch auf. Verglichen mit Niedrigflussarealen zeigen Hochflussareale nicht nur eine 3-fach höhere Durchblutung, sondern auch einen auf das 3.4-fache gesteigerten Sauerstoffverbrauch. Dies lässt auf eine räumliche Heterogenität der lokalen ATP-Bildung und des Energieumsatzes schließen.

Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob der lokal heterogene Energieumsatz auch mit einer lokal heterogenen Herzarbeit verbunden ist und welche Unterschiede in der Gen- und Proteinexpression diesem zugrunde liegen.

Li 5. 15. 11. 2001