

Perioperative L-Carnitin-Supplementierung bei kardiochirurgischen Eingriffen angeborener Herzfehler im Säuglingsalter

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Humanmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Isabel Katrin Kipp, geborene Kluwe

aus

Stuttgart

Gießen 2002

Aus dem Medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin

Abteilung Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie

Leiter: Prof. Dr. L. Gortner

und

Abteilung Kinderkardiologie

Leiter: Prof. Dr. D. Schranz

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Kreuder

Gutachter: Prof. Dr. Geyer

Tag der Disputation: 21. Mai 2003

*Meinem Ehemann Christian, unserer Tochter Sophie sowie meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet*

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Einführung in den Carnitinstoffwechsel	1
1.1.1	Carnitinbiosynthese und -transport	1
1.1.2	Stoffwechselfunktionen des Carnitins	4
1.1.2.1	Fettsäureoxidation	5
1.1.2.2	Modulation der intrazellulären Konzentrationen von freiem CoA und Acyl-CoA	8
1.1.3	Überblick über Carnitinstoffwechselstörungen	9
1.1.4	Besonderheiten der Carnitin-Stoffwechselsituation im Säuglingsalter	12
1.2	Grundzüge und Besonderheiten des Myokardstoffwechsels	14
1.2.1	Grundlagen des myokardialen Energiestoffwechsels	14
1.2.2	Carnitinstoffwechsel des Myokards	18
1.2.3	Auswirkungen kardiochirurgischer Eingriffe auf den Myokardstoffwechsel	20
2.	FRAGESTELLUNG	22
3.	MATERIALIEN UND METHODEN	23
3.1	Studiendesign und Patientengut	23
3.2	Probengewinnung	26
3.3	Perioperative Carnitinsupplementierung	27
3.4	Perioperative Variablen und Verlaufsparemeter	28
3.4.1	Intraoperative Verlaufsparemeter	28
3.4.2	Postoperative Verlaufsparemeter	29
3.5	Biochemische Methoden	30
3.5.1	Herstellung eines Muskelhomogenats aus Myokardproben	30
3.5.2	Carnitinbestimmung	32

3.5.2.1	Grundlagen der Carnitinbestimmung	32
3.5.2.2	Bestimmung von Carnitin im Muskelgewebe - Präparation und Hydrolyse	34
3.5.2.3	Bestimmung von Carnitin im Plasma - Präparation und Hydrolyse	38
3.5.2.4	Interne Standards	39
3.5.2.5	Bestimmung von Carnitin - radioenzymatischer Assay	40
3.5.3	Bestimmung von ATP und Kreatinphosphat (CP) im Muskelgewebe	42
3.5.3.1	ATP - Messung	42
3.5.3.2	CP - Messung	45
3.5.4	Non-Collagen-Protein-Bestimmung (NCP) im Herzmuskelgewebe	48
3.5.5	Bestimmung der freien Fettsäuren (FFS) im Plasma	49
3.5.6	Bestimmung von β -Hydroxybutyrat (β -OH-B) im Plasma	50
3.5.7	Bestimmung weiterer Stoffwechselfparameter	50
3.5.8	Materialien und Geräte	51
3.5.8.1	Kommerzielle Reagenzien und Hersteller	51
3.5.8.2	Eigenständig hergestellte Reagenzien	52
3.5.8.3	Geräte	54
3.6	Statistische Auswertung	56
4.	ERGEBNISSE	57
4.1	Klinische Grundlagen	57
4.2	Systemischer Carnitinstatus	58
4.2.1	Präoperativer systemischer Carnitinstatus	58
4.2.1.1	Beurteilung des präoperativen systemischen Carnitinstatus	61
4.2.2	Perioperativer systemischer Carnitinstatus	65
4.3	Myokardialer Carnitinstatus	71
4.3.1	Präischämischer myokardialer Carnitinstatus	71

4.3.2	Postischämischer myokardialer Carnitinstatus	74
4.4	Verlauf der Intermediärmetabolite	78
4.5	Postoperativer klinischer Verlauf	83
4.5.1	Postoperativer Bedarf an positiv inotropen Medikamenten	83
4.5.2	Beatmungsdauer	86
5.	DISKUSSION	87
5.1	Methodische Aspekte	87
5.1.1	Carnitinbestimmung	87
5.1.2	ATP - und CP - Bestimmung	88
5.1.3	Metabolite des Intermediär-Stoffwechsels	89
5.1.4	Patientenkollektiv	89
5.1.5	Medikamentöse Substitution	89
5.2	Carnitinstoffwechsel bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern	90
5.2.1	Präoperativer systemischer Carnitinstatus	90
5.2.2	Myokardialer Carnitinstatus	93
5.2.3	Carnitinmetabolismus während kardiochirurgischer Eingriffe	96
5.3	Carnitinsupplementierung bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern	98
5.3.1	Tier- und humanexperimentelle Grundlagen	98
5.3.2	Perioperativer Carnitinstatus unter Supplementierung	100
5.3.2.1	Systemischer Carnitinstatus	100
5.3.2.2	Myokardialer Carnitinstatus	101
5.3.2.3	Energiereiche Phosphate	101
5.3.2.4	Intermediärmetabolite	102
5.3.3	Klinischer Verlauf	103
6.	ZUSAMMENFASSUNG	105

7.	LITERATURVERZEICHNIS	107
8.	ANHANG	131
9.	DANKSAGUNG	132
	LEBENS LAUF	134

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variance)
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
ATP	Adenosintriphosphat
Ba(OH) ₂	Bariumhydroxid
BE	Blutentnahme
β-OH-B	Beta-Hydroxybutyrat
CAT	Carnitin-Acetyltransferase
Ci	Curie
CK	Kreatinkinase
CKMB	herzmuskelspezifische Kreatinkinase
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Co-Enzym A
CoA-SH	freies Coenzym A
CP	Kreatinphosphat
CPM	Counts pro Minute
CPT I	Carnitin-Palmitoyl-Transferase I
CPT II	Carnitin-Palmitoyl-Transferase II
CuSO ₄	Kupfersulfat
d	Tag
ED	Einzeldosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFT	elektronentransferierendes Flavoprotein
EKZ	Extrakorporale Zirkulation
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinucleotid-Hydril
FC	Freies Carnitin
FFA/FFS	Freie Fettsäuren
g	Erdbeschleunigung (g = 9,81 m/s ²)
h	Stunde
HCL	Salzsäure

HClO ₄	Perchlorsäure
HEPES	2-Hydroxyethylenpiperazin-2-Ethansulfonsäure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
i.v.	intravenös
KG/kg	Körpergewicht (Kilogramm)
KOH	Kaliumhydroxid
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
kU	Kilo-Units
LCAC	Langkettige Acyl-Carnitine (long-chain acylcarnitines)
LCAD	Langkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase
LCHAD	Langkettige 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
M	Molarität
MCAD	Mittelkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase
ME	Myokardentnahme
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minuten
ml	Milliliter
n	Anzahl
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NCP	Nicht-Kollagen-Protein
O ₂	Sauerstoff
OCTN ₂	Organischer Kationentransporter
OP	Operation
po	per os
RPM	Umdrehung pro Minute
SCAC	Kurzkettiges Acyl-Carnitin (short-chain acylcarnitine)
SCAD	Kurzkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase

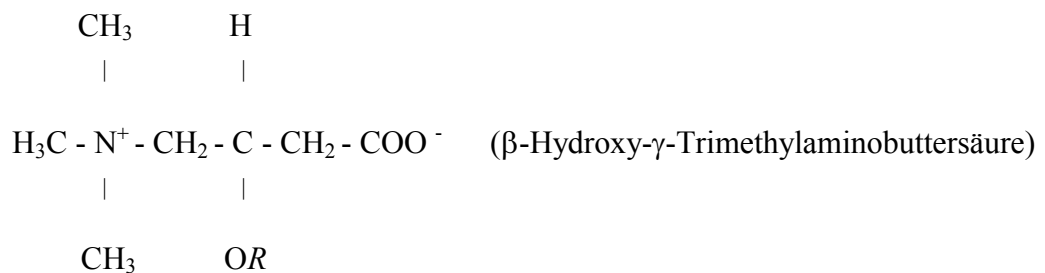
SCHAD	Kurzkettige 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase
SDS	Standard-Deviation-Score
SE	Standardfehler
TASC	Fraktion des gesamten säurelöslichen Acyl-Carnitins (total acid-soluble carnitine)
TC	Gesamt-Carnitin (total carnitine)
TCA	Zitratzyklus
TRIS	2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propanediol
U	Units
VLCAD	sehr langkettige Acyl-CoA-Dehydrogenase
VLDL	Lipoproteine sehr niedriger Dichte (very low density lipoproteins)
V_{\max}	maximale Geschwindigkeit einer enzymatischen Reaktion
VSD	Ventrikelseptumdefekt
W	Arbeit
ZnSO ₄	Zinksulfat
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

1. EINLEITUNG

1.1 Einführung in den Carnitinstoffwechsel

Carnitin, ein quarternäres Amin mit dem chemischen Namen β -Hydroxy- γ -Trimethylaminobuttersäure, kommt im Gewebe und im Plasma als freies Carnitin und als Acylcarnitin vor. Es existieren die Isomere D- und L-Carnitin, da das C-Atom mit der Hydroxylgruppe vier verschiedene Liganden besitzt und somit optisch aktiv ist. Im Organismus ist ausschließlich das L-Dimer biologisch aktiv.

Abbildung 1.1: Strukturformel des Carnitins



$R = \text{H}$: freies Carnitin

$R = \text{org. Säure}$: Acyl-Carnitin

1.1.1 Carnitinbiosynthese und -transport

Im Kindesalter wird der Carnitingehalt im menschlichen Körper ungefähr zu 75 % durch exogene Zufuhr sichergestellt, wobei die höchsten Konzentrationen in Rind-, Schweine- und Lammfleisch sowie in Milchprodukten vorkommen. Zu etwa 25 % wird der Bedarf durch Eigenproduktion gedeckt. Bei Frühgeborenen, Säuglingen und Kleinkindern kann der Anteil der Eigensynthese unter 10 % liegen. Ausgangsprodukte

für die Carnitinbiosynthese sind die essentiellen Aminosäuren Lysin und Methionin, weiterhin sind als Cofaktoren zweiwertiges Eisen, Ascorbinsäure, Sauerstoff und α -Ketoglutarat notwendig. Bis zum vorletzten Produkt, dem γ -Butyrobetain, ist die Biosynthese sowohl in der Leber als auch in Niere, Gehirn, Skelett- und Herzmuskel möglich. Hingegen ist das Enzym γ -Butyrobetain-Hydroxylase, welches den letzten Schritt zur Bildung von Carnitin katalysiert, nur in Leber, Gehirn und Niere vorhanden. Somit sind der Skelettmuskel und insbesondere auch der Herzmuskel auf eine Carnitinzufuhr über das Blut angewiesen. Außerdem ist die Aktivität des Enzyms altersabhängig. So entspricht sie beim Neugeborenen nur 12 % der Aktivität von Erwachsenen (5, 14, 30, 63, 100, 101, 111, 112).

Über 90 % des körpereigenen Carnitins ist im Herz- und Skelettmuskel gespeichert, der Rest befindet sich in der Leber, den Nieren und zu geringfügigem Anteil in den anderen Geweben (107). Diese Verteilung spiegelt den starken Anteil der Fettsäureoxidation an der Energiegewinnung in den genannten Geweben wieder.

Die Carnitinkonzentration im Plasma liegt 20-50 mal unter der in den Geweben (126), folglich muss die Carnitinaufnahme in die Gewebe aktiv gegen einen hohen Konzentrationsgradienten erfolgen. Dabei ist die Carnitingewebekonzentration nicht nur von der zirkulierenden Menge im Blut abhängig, sondern auch von der Fähigkeit der Zelle, Carnitin aufzunehmen. Zellrezeptoren mit einer hohen Affinität für Carnitin wurden im Muskel, im Herz und in Fibroblasten gefunden (5, 30).

Die Carnitinaufnahme wird durch eine Reihe unterschiedlichster Transportsysteme sichergestellt, die für alle Gewebe, in denen Carnitin eine physiologische Rolle spielt, beschrieben sind.

Sie stellen den entsprechenden Carnitingehalt in den einzelnen Geweben sicher und übernehmen die angemessene Verteilung in die jeweiligen Zellkompartimente. Die Transportsysteme sind notwendig, da Carnitin als quarternäres Amin nicht durch die Lipidmembranen der Zellen diffundieren kann. Freies Carnitin wird über einen sättigbaren Transportmechanismus in die Zelle aufgenommen (13).

Auch wenn Carnitin, wie oben dargelegt, im menschlichen Körper synthetisiert werden kann, stellt exogenes Carnitin, gerade auch bei Säuglingen, eine wichtige zusätzliche Quelle dar (37, 84).

Carnitin wird im Dünndarm über einen aktiven, sättigbaren, natriumabhängigen Prozess aufgenommen. Ebenfalls findet eine passive Diffusion statt, die unter physiologischen Bedingungen klein ist, jedoch bei therapeutischer Gabe von Carnitin an Bedeutung gewinnen kann. Dennoch besitzt zu therapeutischen Zwecken oral verabreichtes Carnitin nur eine sehr geringe Bioverfügbarkeit von 5-20 %, trotz der meist unphysiologisch hohen verabreichten Dosen. Dies legt die Vermutung nahe, dass eine unbeschränkte intestinale Carnitinabsorption aufgrund einer Sättigungskinetik nicht möglich ist (46, 47, 51, 118, 126).

Auch für die Leber wurde ein aktiver, natriumabhängiger Transport gezeigt sowohl für Carnitin als auch für die Vorstufe γ -Butyrobetain. Beide Substanzen werden mittels desselben Carriers transportiert und konkurrieren miteinander, wobei für γ -Butyrobetain eine höhere Affinität besteht. So wird unter physiologischen Bedingungen zunächst Butyrobetain von der Leber aufgenommen und dann in Carnitin umgewandelt; der Transport von Carnitin in die Leber scheint nur eine untergeordnete Bedeutung zu haben.

Die Leber an sich spielt im Carnitinhaushalt eine herausragende Rolle. So ist sie zum einen das Hauptorgan der Carnitinbiosynthese, zum anderen gelangt oral aufgenommenes und absorbiertes Carnitin über das Pfortadersystem in die Leber zur weiteren Verteilung (13, 26).

Carnitin wird als wasserlösliches, nicht-proteingebundenes Molekül glomerulär filtriert. Ein sättigbares, natriumabhängiges Transportsystem im renalen Tubulus verhindert überschüssigen Carnitinverlust über die Nieren. Die renale Reabsorptionsrate für freies Carnitin liegt $> 85 \%$, die Rückresorptionsrate von Acylcarnitin liegt etwas niedriger. Je nach exogener Zufuhr und aktuellem Intermediärstoffwechsel differiert die ausgeschiedene Menge von freiem Carnitin und Acylcarnitin im Urin. So haben Säuglinge z.B. öfters höhere Werte an freiem Carnitin als an Acylcarnitin im Urin bei anaboler Stoffwechsellage. Bei kataboler Stoffwechsellage dominiert die Ausscheidung von Acylcarnitin. So hat die Niere einen entscheidenden Anteil an der Regulation des körpereigenen Carnitinpools (102, 126).

Für das Herz ist die zelluläre Verfügbarkeit von Carnitin entscheidend für die normale Herzfunktion, weil der Herzmuskel auf die β -Oxidation von Fettsäuren als Energiequelle angewiesen ist (13). *Böhmer et al.* wiesen bei menschlichen Herzzellen in der Kultur für Carnitin einen selektiven, sättigbaren, temperaturabhängigen Transport

nach (12). *Bahl et al.* fanden in Herzzellen von Ratten eine Carnitinaufnahme gegen einen Konzentrationsgradienten, die durch die D-Isoform des Carnitins kompetitiv gehemmt wurde (6). 1982 zeigten *Vary und Neely* bei Rattenherzen ebenfalls einen aktiven Transport für Carnitin als auch eine - zu einem geringeren Anteil von ca. 20 % - passive Diffusion. Diese tritt bei Sättigung des aktiven Transportsystems ein (ab einer extrazellulären Carnitinkonzentration von $>100 \mu\text{mol/l}$) und nimmt linear zum extrazellulären Carnitingehalt zu. Das aktive Transportsystem zeigt eine hohe Affinität und Sättigungskinetik für die L-Isoform des Carnitins. Sauerstoffmangel führte nicht zu einer verminderten Carnitinaufnahme in die Zellen, was auf einen ATP-unabhängigen Transport schließen lässt. Die aktive Aufnahme erfolgt mittels eines Na^+ -Kotransports, der vom elektrochemischen Na^+ -Gradienten abhängig ist (139, 140).

Tamai et al. gelang die molekulare Charakterisierung des hypothetischen Carnitintransporters, der zur Gruppe der organischen Kationentransporter gehört. Der organische Kationentransporter OCTN2 mit starker Expression in Niere, Skelettmuskel, Plazenta und Herz weist eine hohe Übereinstimmung mit der Verteilung der Carnitintransporteraktivität auf. Es findet sich eine natriumabhängig verstärkte Carnitinaufnahme, die auf die wichtige physiologische Funktion des OCTN2 als Na^+ -abhängigen Carnitin Kotransporter hinweist (133).

Die Carnitin-Versorgung des Myokards wird somit durch viele Faktoren beeinflusst, von denen spezifische Transportsysteme, die Integrität der Membranen und die Carnitinzufuhr über die Koronarperfusion die größte Rolle spielen.

Das äußerst wichtige intrazelluläre Carnitin-Transportsystem wird unter 1.1.2 näher beschrieben.

1.1.2 Stoffwechselfunktionen des Carnitins

Die drei Schlüsselfunktionen des Carnitins im Intermediärstoffwechsel sind:

- Carrierfunktion bei der Fettsäureoxidation
- Modulierung des Verhältnisses von Acyl/Acetyl-CoA/CoA-SH
- Elimination toxischer Acyl-Gruppen aus dem Mitochondrium

1.1.2.1 Fettsäureoxidation

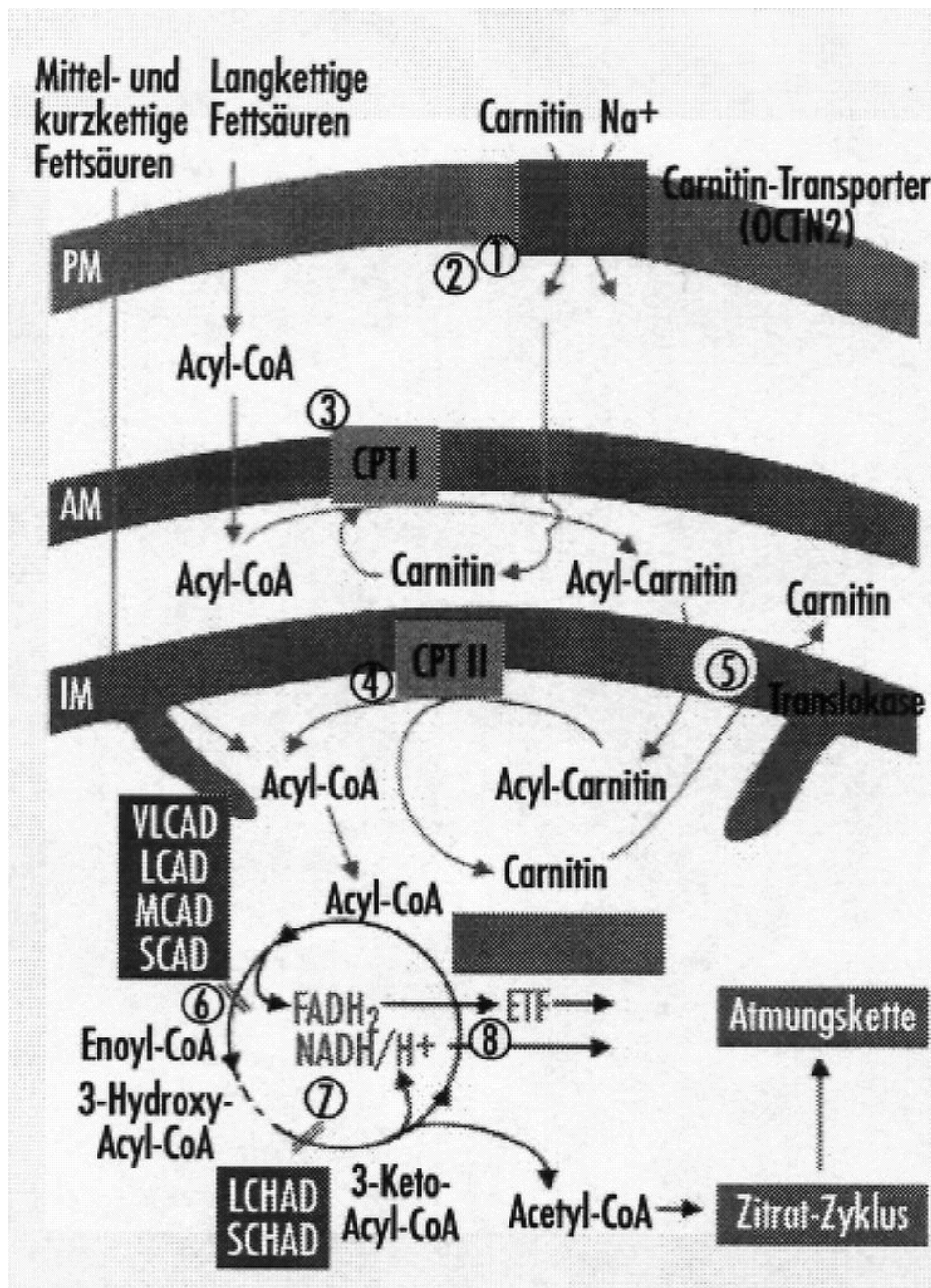
Die β -Oxidation langkettiger Fettsäuren ist in der Matrix des Mitochondriums lokalisiert (siehe auch Abbildung 1.1.2.1).

Langkettige Fettsäuren aus der Spaltung von Triglyceriden werden nach dem Durchtritt durch die Plasmamembran mittels der Acyl-CoA-Synthetase zu Acyl-CoA-Estern aktiviert. Dieses Enzym ist nur an der äußeren Seite der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert, die Mitochondrienmembran selbst ist für die aktivierten Fettsäuren undurchlässig. So ist ein intrazelluläres Transportsystem unter Verwendung von freiem Carnitin als Carrier notwendig, um die Acyl-CoA-Ester in die mitochondriale Matrix zu transportieren. Dieses kann nur funktionieren, wenn über den natriumabhängigen Carnitintransporter in der Plasmamembran (OCTN2) ① ausreichend freies Carnitin für diesen Prozess zur Verfügung gestellt wird. Die Acyl-CoA-Ester werden von der an der inneren Seite der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Carnitin-Palmitoyl-Transferase I (CPT I) ③ in Acyl-Carnitin umgewandelt. Dies ist der regulierende Schritt in der β -Oxidation. Die CPT I ist die spezifische Carnitintransferase für langkettige Fettsäuren ab einer Kettenlänge von ≥ 16 C-Atomen. Die Carnitin/Acyl-Carnitin-Translokase (T) ⑤ transportiert das Acyl-Carnitin im Austausch gegen äquimolare Mengen freien Carnitins über die innere Mitochondrienmembran. Die Aktivität der Translokase kann durch hohe intramitochondriale Carnitinkonzentrationen gesteigert werden. An der Matrixseite der inneren Mitochondrienmembran erfolgt unter Vermittlung der Carnitin-Palmitoyl-Transferase II (CPT II) ④ die Spaltung des Acyl-Carnitins in freies Carnitin und in Acylgruppen, die wiederum auf Coenzym A übertragen werden. Das Acyl-CoA wird in der β -Oxidation durch längenspezifische Dehydrogenasen ⑥⑦ schrittweise durch Abspaltung von C_2 -Einheiten verkürzt, bis als Endprodukt Acetyl-CoA übrig bleibt, welches in den Citratzyklus eingeschleust oder zur Ketonkörperproduktion in der Leber herangezogen wird. Die im Verlauf der β -Oxidation und des Citratzyklus` entstehenden Reduktionsäquivalente $FADH_2$ und $NADH_2$ werden in der innerhalb der mitochondrialen Matrix lokalisierten Atmungskette zur Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung in Form von energiereichen Phosphaten (ATP) herangezogen. Dabei hängt die Menge der entstehenden ATP-Moleküle von der Länge der eingesetzten Fettsäure ab. Der Transport von ATP im

Austausch gegen ADP aus der mitochondrialen Matrix ins Zytosol als Ort der kontraktilen Funktion wird durch die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) reguliert. Ist die Kapazität des Fettsäureabbaus erschöpft, wird langkettiges Acyl-CoA als Acyl-Carnitin über die geschilderten Wege der CPT II und der Translokase aus dem Mitochondrium in das Zytosol transportiert. Ebenso wird Acetyl-CoA bei unzureichender Utilisation im Citratzyklus aus dem Mitochondrium entfernt: durch Bildung von Acetyl-Carnitin, über die Carnitin-Acetyl-Transferase und vermutlich auch über die bereits genannte Translokase (5, 9, 45, 50, 67, 111, 138, 142).

Es existieren noch zwei weitere spezifische Carnitin-Acyl-Transferasen für kurzkettige (Kettenlänge 2-6 C-Atome) und mittelkettige Fettsäuren (Kettenlänge 6-16 C-Atome): die Carnitin-Acetyl-Transferase (CAT), lokalisiert in Mitochondrien, Peroxisomen und Mikrosomen bzw. die Carnitin-Octanoyl-Transferase (COT), welche nur in Peroxisomen und Mikrosomen vorhanden ist. Sie spielen eine Rolle im Rahmen der peroxisomalen Fettsäureoxidation. Die mittel- und kurzkettigen Fettsäuren können entweder ohne Aktivierung durch Coenzym A carnitinunabhängig oder nach Aktivierung carnitinabhängig in die mitochondriale Matrix gelangen (10, 50).

Abbildung 1.1.2.1: Fettsäure-Transport und β -Oxidation (45)



PM: Plasmamembran

AM: äußere Mitochondrienmembran

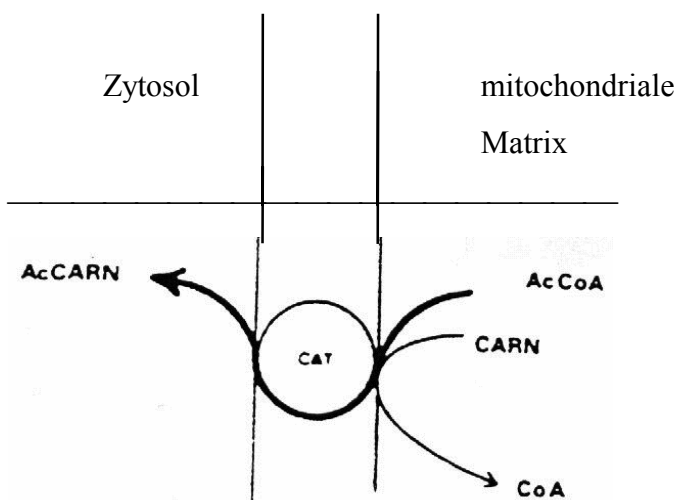
IM: innere Mitochondrienmembran

1.1.2.2 Modulation der intrazellulären Konzentrationen von freiem CoA und Acyl-CoA

Freies CoA wird im Mitochondrium für eine Reihe von Stoffwechselfunktionen benötigt, u.a. für die Aktivierung freier Fettsäuren zu Acyl-CoA-Ester, im Citratzyklus und als Cofaktor für die Pyruvatdehydrogenase. So hat generell ein Mangel an freiem CoA eine verminderte mitochondriale Energieproduktion zur Folge. Speziell die Pyruvatdehydrogenase als Schlüsselenzym für die Verstoffwechselung von Pyruvat bei der Glukose-Oxidation wird durch hohe Konzentrationen von Acetyl-CoA (und von einem erhöhten Verhältnis von Acetyl-CoA/CoA) gehemmt, was zu verminderter Glukose-Oxidation und zu vermehrter Produktion von Laktat führen kann (22). Außerdem ist Acetyl-CoA auch Produkt der Pyruvatdehydrogenase.

Die Rate der Fettsäureoxidation wird zusätzlich durch Malonyl-CoA reguliert, welches die Carnitin-Palmitoyl-Transferase I hemmt. Malonyl-CoA wird im Zytosol aus Acetyl-CoA unter Vermittlung der Acetyl-CoA-Carboxylase gebildet. So beeinflussen sich die beiden Schlüsselenzyme Pyruvatdehydrogenase-Komplex und Carnitin-Palmitoyl-Transferase I gegenseitig, indem die erhöhte Aktivität eines Stoffwechselweges zu Endprodukten führt, die den anderen hemmen und umgekehrt (129, 138).

Abbildung 1.1.2.2: Carnitin-Acetyl-Transferase (CAT)



Die Carnitin-Acetyl-Transferase (CAT) überträgt Acetyl-CoA, kurz- und mittelkettige Acyl-Gruppen (AcCoA) auf intramitochondriales Carnitin (CARN); die so gebildeten Carnitiner (AcCARN) werden aus dem Mitochondrium ins Zytosol transportiert, und dadurch frei gewordenes freies CoA steht dem intermediären Stoffwechsel wieder zur Verfügung. Durch diesen Mechanismus ist Carnitin in der Lage, die intrazellulären Konzentrationen von freiem CoA zu verestertem CoA durch reversible Bildung von Acetylcarnitin zu modulieren und kann so einer Störung des Zellstoffwechsels in Situationen geringer Verfügbarkeit von freiem CoA oder Anhäufung von Acyl-Gruppen vorbeugen und das Gewebe durch Pufferung schützen (5, 9, 15, 31, 67, 99, 141).

Darüber hinaus kann Carnitin auf diese Weise intramitochondrial akkumulierte toxische Acyl-Gruppen durch Bildung von Carnitin-Ester aus der Zelle entfernen. Die Carnitin-Ester werden dann renal eliminiert. Solange freies Carnitin ausreichend zur Verfügung steht, spiegelt das Verhältnis Acylcarnitin/Carnitin dasjenige von Acyl-CoA/CoA wieder (50).

1.1.3 Überblick über Carnitinstoffwechselstörungen

Bei den Störungen im Carnitinstoffwechsel unterscheidet man primäre und sekundäre Carnitinmangelzustände.

Zum *primären Carnitinmangel* wird der myopathische und systemische Carnitinmangel gezählt. Hier findet man u.a. einen intrazellulären Carnitinmangel und erniedrigte Plasmakonzentrationen an Carnitin. Ursachen sind z.B. Defekte im zellulären Carnitin-Transportsystem, d. h. OCTN2-Defekte (⊕ in Abbildung 1.1.2.1) und renale Funktionsstörungen.

Mögliche Ursachen eines *sekundären Carnitinmangels* sind in der nachfolgenden Übersicht zusammengestellt:

1. Angeborene Störungen des Intermediärstoffwechsels:

Störungen im Abbau von Fettsäuren (β -Oxidations-Zyklus):

Acyl-CoA Dehydrogenase-Mangel für

(über-) langkettige Fettsäuren ((V)LCAD)

mittelkettige Fettsäuren (MCAD)
kurzkettige Fettsäuren (SCAD)
langkettige Hydroxy-Fettsäuren (LCHAD)
kurzkettige Hydroxy-Fettsäuren (SCHAD)
Multipler Acyl-CoA Dehydrogenase-Mangel (Glutarazidurie II)
2,4-Dienoyl-CoA Reduktase-Mangel

Organische Azidurien:

Propionazidämie
Methylmalonazidämie
Isovalerianazidurie
Glutarazidurie I
Isolierter 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase-Mangel
3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA Lyase-Mangel
3-Methylglutaconyl-CoA Hydratase-Mangel
Malonyl-CoA-Carboxylase-Mangel

Defekte der Atmungskette:

Isolierte Defekte einzelner Komplexe der Atmungskette (I-V)
Defekte mehrerer Komplexe (Deletionen mitochondrialer DNA)

Defekte des Harnstoffzyklus:

Ornithin Transcarbamylase-Mangel
Carbamylphosphat Synthetase-Mangel
Lysinurische Proteinintoleranz

Defekte der Remethylierung:

Methyltetrahydrofolat Reduktase-Mangel

2. Renale Erkrankungen:

Fanconi-Syndrom (primär/sekundär)
Chronische Niereninsuffizienz

3. Hepatische Erkrankungen:

- Chronische Leberinsuffizienz
- Leberzirrhose

4. Unzureichende alimentäre Zufuhr:

- Parenterale Ernährung
- Frühgeborene
- Vegetarische Diät
- Mangel-/Unterernährung

5. Medikamente:

- Valproinsäure
- Ifosfamid
- Cisplatin

Als gemeinsame Symptome und Laborveränderungen finden sich hierbei z.B. Muskelschwäche, Kardiomyopathien, wiederholte Episoden von hypoketotischen, hypoglykämischen Komata, metabolische Azidose und weitere, der Reye-Krankheit ähnliche Symptome; außerdem Akkumulation von Lipiden im Gewebe und erniedrigte Plasma- und Gewebespiegel an freiem Carnitin, sowie erhöhte Konzentrationen an Acylcarnitin (8, 15, 45, 113, 135, 136).

Neben den Störungen des myokardialen Stoffwechsels bei primärer oder sekundärer Carnitindefizienz (wie z. B. der Kardiomyopathie wie oben beschrieben) treten Veränderungen im myokardialen Carnitin-Metabolismus aber auch bei primär kardialen Erkrankungen auf. So wurden z.B. im Tierexperiment bei Volumen- und Drucküberlastung des Herzens ein reduzierter Carnitingehalt des Myokards sowie eine verminderte Fettsäure-Oxidation beobachtet. Als Ursachen werden u.a. ein durch die chronische Überlastung des Herzens hervorgerufener Defekt der CPT I und eine zunehmende Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran durch akkumulierte freie Fettsäuren diskutiert (33, 34, 106).

Bei Patienten mit chronischer Myokardinsuffizienz als Folge einer dilatativen Kardiomyopathie oder chronisch-ischämischen Herzerkrankung wurden ebenfalls erniedrigte Carnitinwerte des Myokards beschrieben (95, 104, 131).

1.1.4 Besonderheiten der Carnitin-Stoffwechselsituation im Säuglingsalter

Unter 1.1 wurde schon erwähnt, dass exogenes Carnitin gerade bei Säuglingen einen wichtigen Nahrungsbestandteil darstellt und dass die Aktivität der γ -Butyrobetain-Hydroxylase altersabhängig ist. Dies legt nahe, dass Carnitin im Stoffwechsel sehr kleiner Kinder eine besondere Rolle spielt.

Während der Fetus intrauterin über die Plazenta mit freiem und verestertem Carnitin versorgt wird, kommt es postpartal zu einschneidenden metabolischen Veränderungen. In fetalen Geweben erfolgt die Energiegewinnung hauptsächlich durch die Verstoffwechslung von Kohlenhydraten. Die Geburt führt plötzlich zu einem erhöhten Energiebedarf, der anfangs noch nicht ausreichend über die Nahrung gedeckt werden kann, so dass das Neugeborene zunächst einmal von seinen fetalen Carnitindepots und von der endogenen Carnitinbiosynthese abhängig ist und die gespeicherten Energien in Anspruch nehmen muss. Als erste Quelle fungieren die Glycogenspeicher, die jedoch innerhalb von Stunden aufgebraucht sind. Danach bedient sich das Neugeborene der Fettreserven und adaptiert sich an die β -Oxidation langkettiger Fettsäuren als Hauptenergiequelle. Über ca. 3 Wochen postpartal besteht jedoch eine verminderte Fähigkeit, Fettsäuren zu oxidieren, was an eingeschränktem Transport oder einer verminderten mitochondrialen Kapazität zur Fettsäureoxidation liegen könnte (138). Postpartal bestehen eine vorübergehende relative Hypoglykämie, erhöhte Glucagon- sowie Katecholaminspiegel und verminderte Insulinspiegel, die die Lipolyse in Gang setzen. Als Ausdruck der gesteigerten Lipolyse kommt es innerhalb von Stunden zu einem Anstieg der Konzentration an freien Fettsäuren im Blut. Gleichzeitig steigen die Aktivität der Carnitin-Palmitoyl-Transferase und der Carnitingehalt in weißen und braunen Fettzellen Neugeborener. Eine ausreichende Menge von Carnitin ist Voraussetzung dafür, dass in der Neonatalperiode der Energiebedarf durch β -Oxidation langkettiger Fettsäuren gedeckt werden kann (5, 24, 69, 77, 83, 112, 116).

Weiterhin zeigten *Penn et al.*, dass bei ausschließlich parenteral ernährten Frühgeborenen die Carnitinkonzentrationen im Plasma nach nur 5 Tagen um 50 % sanken, obwohl die intravenösen Lösungen ausreichend Lysin und Methionin als Vorstufen enthielten. Untersuchungen an Autopsien zeigten auch einen verminderten Carnitingehalt in der Leber bei parenteral ernährten Neugeborenen. So könnte die ausschließliche parenterale Ernährung die normale Entwicklung der Carnitinreserven in den verschiedenen Geweben beeinträchtigen (81, 91, 92).

Säuglinge und vor allem Frühgeborene mit unreifen Nieren scheiden außerdem vermehrt Acylcarnitine und freies Carnitin im Urin aus (111, 115, 137). Diese höhere Ausscheidungsrate von Carnitinen und freiem Carnitin könnte mit ein Grund sein für niedrigere Carnitinspiegel bei Säuglingen. Als weiterer Grund wird v.a. auch die verminderte Kapazität zur endogenen Carnitinsynthese bei Früh- und Neugeborenen diskutiert (91, 111). Somit sind Frühgeborene besonders gefährdet, einen sekundären systemischen Carnitinmangel zu entwickeln (5). Weitere Risikofaktoren sind neben der totalen parenteralen Ernährung und der unzureichenden exogenen Zufuhr u.a. die Malabsorption und chronische Krankheiten (111).

Vergleichsstudien bei Säuglingen, die Formelnahrungen auf Sojabasis (ohne Carnitin) oder herkömmliche Säuglingsmilchnahrungen bzw. Muttermilch erhielten, zeigten, dass die Carnitinkonzentrationen im Plasma hauptsächlich durch die Carnitinzufuhr über die Nahrung erreicht werden (84). *Campoy et al.* favorisieren sogar eine Carnitinsupplementierung der Milchnahrungen zur Prophylaxe eines exogenen Carnitinmangels nicht nur für Frühgeborene, sondern auch für Reifgeborene in Anlehnung an den optimalen Carnitingehalt der Muttermilch, der in Milchnahrungen nicht erreicht wird (23).

Demzufolge könnte man Carnitin als einen essentiellen Nahrungsbestandteil bei Säuglingen und als einen zwingend essentiellen bei Frühgeborenen ansehen (91, 114).

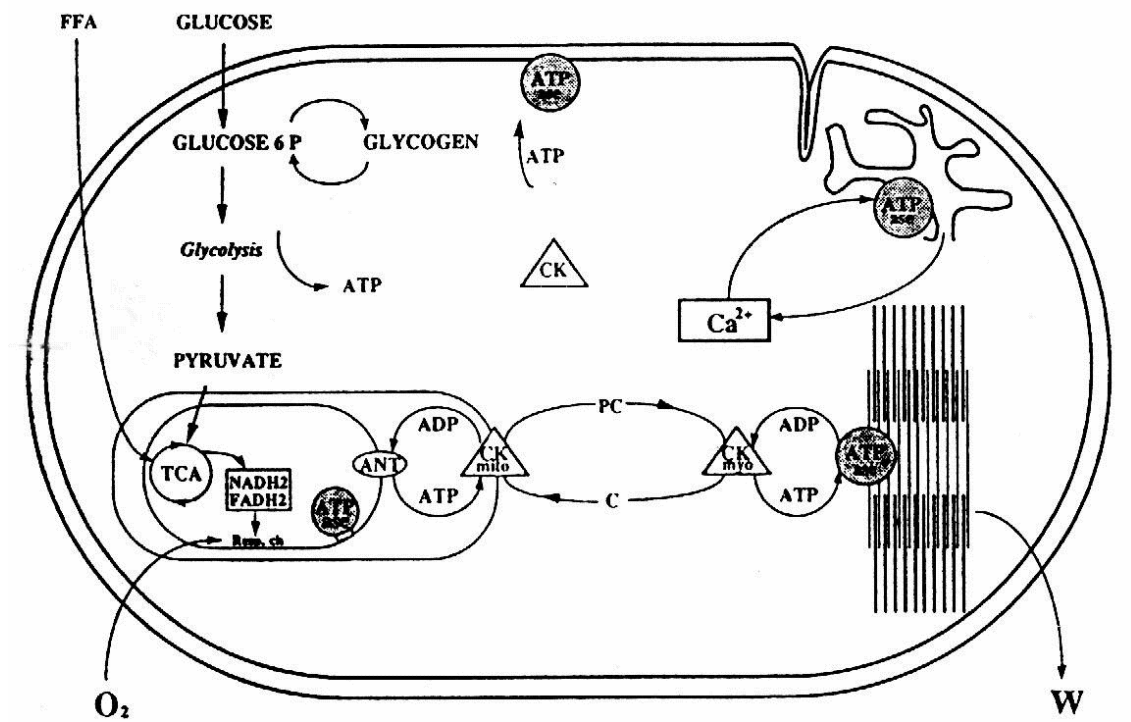
Mit ca. 6 Monaten erreichen bei adäquat ernährten Reifgeborenen die Carnitinkonzentrationen im Plasma diejenigen Erwachsener (111, 117).

1.2 Grundzüge und Besonderheiten des Myokardstoffwechsels

1.2.1 Grundlagen des myokardialen Energiestoffwechsels

Ein intakter Energiestoffwechsel ist Voraussetzung für die normale Funktion der Herzmuskelzelle.

Abbildung 1.2.1: Energiestoffwechsel der Herzmuskelzelle (108)



Unter physiologischen Bedingungen wird ca. 90 % der vom Myokard benötigten Energie in Form von ATP während der Atmungskettenphosphorylierung (Resp. ch.) in den Mitochondrien gewonnen (141). Unter ausreichender Sauerstoffzufuhr (O₂) erfolgt unter Vermittlung der ATP-Synthase (ATPase) die Rephosphorylierung von ADP zu ATP. Die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) reguliert den Austausch von ATP und ADP zwischen der mitochondrialen Matrix und dem Zytosol. Mehrere Kreatinkinasen (CK) vermitteln den Energietransfer zwischen ATP und Kreatinphosphat (PC). Mit

Hilfe der Kreatinkinase (CK) wird ADP durch Kreatinphosphat (PC) zu ATP reversibel phosphoryliert.

Kreatin (C) kann seinerseits zu Kreatinphosphat regeneriert werden, wenn ausreichend ATP zur Verfügung steht. Das Gleichgewicht der Kreatin-Kinasereaktion liegt auf der Seite der ATP-Bildung. Spezifische Kreatinkinasen im Mitochondrium (CK mito) und in den Myofibrillen (CK myo) sorgen für einen gerichteten Energietransport vom Mitochondrium zu den Myofibrillen, dem Ort der Muskelkontraktion. Die Dephosphorylierung von ATP mittels der myofibrillären ATPase dient der Energiebereitstellung für den kontraktile Prozess (21, 108). Die Kraftentwicklung der Myofibrillen und die Geschwindigkeit der Faserverkürzung sind eng mit der Höhe der myofibrillären ATPase-Aktivität korreliert (7).

60-70% des ATPs wird für die Muskelkontraktion aufgewendet, der Rest dient u.a. der Energielieferung energieverbrauchender Ionenflüsse an Membranen (z.B. Na^+/K^+ -ATPase) und der Initialphase mancher energieliefernder Prozesse wie z.B. der Glykolyse (87).

Unter physiologischen Bedingungen wird eine konstante ATP-Konzentration im Myokard aufrechterhalten und dem Bedarf angepasst, sogar während langsamer und schneller Änderungen der mechanischen Aktivität (108).

Unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. einer Volumenbelastung, wiederholter Katecholaminexposition oder Hypertrophie, kann es jedoch zu einer Änderung der myofibrillären ATPase Aktivität kommen; Volumenbelastung z. B. führt zu einer Abnahme der Aktivität. Zusätzlich können Veränderungen anderer ATPasen die mechanische Herzaktivität deutlich beeinflussen (108).

Insgesamt wird die mitochondriale ATP-Produktion durch den Bestand von ADP, Reduktionsäquivalenten, Ca^{2+} , Sauerstoff und Substraten reguliert (21, 87, 141).

Als Substrate fungieren Glukose, Pyruvat, Laktat und freie Fettsäuren.

Ob das Herz Kohlenhydrate oder Fettsäuren als Hauptkomponenten zur Gesamtenergieproduktion heranzieht, hängt auch von der Höhe der einzelnen Substratzufuhr ab. Unter normalen Arbeitsbedingungen wird die Aufnahme von Glukose hormonell durch Insulin reguliert. Wenn die Bereitstellung von Fettsäuren ausreicht, um den physiologischen ATP-Spiegel aufrecht zu erhalten, wird die

Glykolyse gehemmt. Die bevorzugte Verstoffwechslung von Fettsäuren führt zu erhöhten Spiegeln an Zitrat, NADH und Acetyl-CoA, die wiederum die Pyruvatdehydrogenase hemmen und damit die Verstoffwechslung von Glukose in Gegenwart überschüssiger Fettsäuren (138).

Im Falle erhöhter Plasma-Laktat Spiegel hemmt Laktat kompetitiv die Oxidation von Fettsäuren durch Stimulation der Acetyl-CoA-Carboxylase, was zu erhöhten Spiegeln an Malonyl-CoA führt. Dasselbe gilt für Pyruvat (138).

Die Hauptenergiequelle stellt somit die mitochondriale β -Oxidation von langkettigen Fettsäuren dar, die bis zu 70 % des Energiebedarfes sicherstellt. Die Fettsäuren gelangen entweder an Albumin gebunden oder als Fettsäureester in Chylomikronen und Lipoproteinen sehr niedriger Dichte (VLDL) carriervermittelt in die Herzmuskelzelle. Als Carrier dient ein Herzmuskel-spezifisches Bindungs-Protein (FABP = fatty acid binding protein), welches die freien Fettsäuren bindet, die dann mittels der Synthetase zu Acyl-CoA-Ester aktiviert werden (67, 138).

Der Großteil der freien Fettsäuren wird in den Mitochondrien zur Energiegewinnung oxidiert. Nur ein Teil wird zeitweise in veresterter Form in myokardialen Triacylglycerid- und Phospholipid-pools gespeichert und kann in Situationen verminderter exogener Fettsäurezufuhr als Reservequelle zur Fettsäureoxidation herangezogen werden (138). So ist unter normalen Bedingungen die Konzentration an freien Fettsäuren im Myokard sehr niedrig (138).

Das Ausmaß der Utilisation von Fettsäuren oder Glukose wird durch die Art der aktuellen Substratzufuhr, die Verfügbarkeit notwendiger Stoffwechselprozesse, die enzymatische Ausstattung der Herzmuskelzelle und durch die Art der mechanischen Belastung bestimmt (138).

Eine Zunahme der Herzarbeit fördert die Aufnahme und Verstoffwechslung der Fettsäuren, um durch eine erhöhte ATP-Produktion der vermehrten Nachfrage gerecht zu werden (138). Als Folge fallen die Konzentrationen von Acetyl-CoA, Acyl-CoA und Acetylcarnitin, während diejenigen von freiem CoA, Carnitin und Acylcarnitin ansteigen (22, 138).

Die Energiebilanz bei der Oxidation von Glukose und Fettsäuren wird auch davon beeinflusst, ob sie unter aeroben oder anaeroben Bedingungen stattfindet.

Während verringerter Sauerstoff- und Substratzufuhr (wie z.B. bei einer Ischämie) unterliegt der Fettsäurehaushalt in den Herzmuskelzellen durchgreifenden

Veränderungen: Sauerstoffmangel führt zu verminderter Fettsäureoxidation sowie zu verringerter Aktivität des Citratzyklus und der Atmungskette und folglich zur Akkumulation von Fettsäuren und Stoffwechselmetaboliten wie β -Hydroxy-Fettsäuren, langkettigem Acyl-CoA, Acetylcarnitin und langkettiger Acylcarnitine. Letztere akkumulieren schnell, d.h. schon innerhalb von 5 Minuten nach Ischämiebeginn. Die Anhäufung von Fettsäuren im Gewebe dagegen tritt erst nach 20-45 Minuten ein. Zusätzlich tragen die endogenen Lipidpools zu dem Anstieg der Fettsäuren im Myokard bei. Gleichzeitig kommt es zu einem Verlust von freiem Carnitin, Acetyl-CoA, freiem CoA, ATP und CP. Bei schwerer Ischämie tritt sogar ein myokardialer Carnitingewebeverlust auf (22, 119, 138).

Reperfusion nach einer Ischämie führt nicht automatisch zur sofortigen Normalisierung des kardialen Fettsäurehaushaltes, obwohl die Fettsäuren das bevorzugte Substrat im reperfundierten ischämischen Myokard bleiben (70, 138). Die Rückkehr zur normalen Fettsäureoxidation hängt hierbei entscheidend von der Länge der Ischämiezeit ab. Die Fettsäuregewebespiegel bleiben erhöht, die mitochondriale β -Oxidation beeinträchtigt, und die Energie wird zunächst aus der Oxidation von Kohlenhydraten gewonnen (22, 138).

Hohe Konzentrationen an Fettsäuren können auch die Oxidation von Glukose behindern und zwar durch die vermehrte Entstehung von Acetyl-CoA, welches die Pyruvatdehydrogenase hemmt und über die anaerobe Glykolyse zu vermehrter Produktion von H^+ -Ionen führt, welche während der Reperfusion die funktionelle Erholung und die kardiale Kontraktilität beeinträchtigen (70, 96). Langkettige Acyl-CoA-Gruppen aktivieren außerdem spannungsabhängige Calcium-Kanäle, was zu einer intramitochondrialen und zytosolischen Ca^{2+} -Überladung des Myocards führen kann und dadurch zu einer verminderten Kapazität der oxidativen Phosphorylierung (96).

Zusammengefasst ist das Herz auf Fettsäuren als Energielieferant und folglich auch auf Carnitin als Schlüsselmolekül im mitochondrialen Transportsystem angewiesen.

1.2.2 Carnitinstoffwechsel des Myokards

Die drei Schlüsselfunktionen des Carnitins (Fettsäuretransport in die mitochondriale Matrix, Modulation von Ac(et)yl-CoA/CoA, Elimination toxischer Acylgruppen aus dem Mitochondrium) sind im Myokard sehr gut nachvollziehbar.

Carnitin spielt ebenfalls indirekt eine bedeutende Rolle in der Energiebereitstellung im Zytosol: Langkettiges Acyl-CoA inhibiert die Adenin-Nukleotid-Translokase. Einer der bedeutsamsten Effekte von Carnitin ist die Reduktion von langkettigem Acyl-CoA in Herzmuskelzellen, was wiederum zu einer vermehrten Aktivität der Adenin-Nukleotid-Translokase führt und somit zu einer erhöhten Verfügbarkeit von ATP im Zytosol.

Arenas et al. zeigten, dass Carnitin eine zentrale Rolle im oxidativen Abbau von Glukose wie auch in der Regulation der Atmungskette spielt. So stimulierte eine Carnitingabe bei Ausdauerathleten signifikant den Pyruvatdehydrogenase-Komplex und erleichterte damit die Oxidation von Pyruvat. Außerdem führte Carnitin zu vermehrter Aktivität der Atmungsketten-Enzyme I, III und IV im Muskel der Athleten (3, 4, 29, 53).

Zusätzlich zu seiner essentiellen intrazellulären Transportfunktion ist Carnitin in der Lage, den Kohlenhydratmetabolismus im Myokard positiv zu beeinflussen: Durch Erhöhung der Konzentrationen von freiem CoA zu verestertem CoA steigt die Aktivität der Pyruvatdehydrogenase. So können unter pathologischen Bedingungen, wie z.B. einer Myokardischämie, wenn der Stoffwechsel überwiegend anaerob ist, vermehrt Pyruvat und Glukose zur Energiegewinnung herangezogen werden. Auf diese Weise ist es möglich, einer vermehrten Laktatproduktion sowie Azidose vorzubeugen (18, 20).

Ausreichende Mengen an Carnitin sind ebenfalls wichtig, um überschüssiges, toxisches langkettiges Acyl-CoA zu binden, welches bei Myokardischämie akkumuliert und zu Herzrhythmusstörungen, Änderungen der myokardialen Kontraktilität sowie Membrandefekten im Sinne einer Destabilisierung führen kann. Diese toxischen Effekte würden unter Carnitinsupplementierung vermindert auftreten (70, 120). In mit überschüssigen freien Fettsäuren reperfundierten Rattenherzen zeigten *Subramanian et al.*, dass der Myokardschaden noch potenziert wurde und dass die mit Carnitin behandelten Herzen eine bessere Erholung zeigten (128).

Die freien Fettsäuren bilden das Substrat für die hauptsächlich in der Reperfusion entstehenden toxischen Lipidperoxide. Carnitin wirkt der Bildung von Lipidperoxiden

entgegen und spielt eine Rolle als Antioxidans bei deren Detoxifikation und hilft somit bei der Aufrechterhaltung der Integrität der Membranphospholipide (2, 128).

Die Arrhythmogenität primär von Acyl-CoA und sekundär auch von Acyl-Carnitinen wird durch Beeinträchtigung der Elektrophysiologie der myokardialen Membranen erklärt. Sie hemmen konzentrationsabhängig Ionenpumpen wie die Ca^{2+} -ATPase, die Na^+/K^+ -ATPase und den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch. Außerdem kommt es zu Interaktionen mit spezifischen Ionenkanälen für Na^+ und Ca^{2+} . Dadurch verlieren die myokardialen Membranen ihre Funktion als Permeabilitätsbarriere für diese Ionen, und es kann zu vermehrter Automatizität und Nachdepolarisationen kommen (44, 64, 130, 146, 147).

Im normalen, gesunden Herz finden sich ausreichend hohe Konzentrationen an Carnitin. Im geschädigten und ischämischen Myokard dagegen ist die Konzentration an freiem Carnitin verringert, was dafür sprechen könnte, Myokardischämie und Herzversagen als Situationen relativen Carnitinmangels zu bezeichnen (19, 40, 67, 135 142).

Carnitin spielt demnach eine wichtige zentrale Komponente im Myokardstoffwechsel, und so wird einer Carnitinsupplementation eine protektive Funktion zugesprochen durch vor allem

- erhöhte myokardiale Extraktion freier Fettsäuren
- verbesserten mitochondrialen Transport langkettiger Acyl-CoA-Ester und
- Wiederauffüllung zellulärer Carnitinspeicher.

In mehreren Studien an Tieren mit Myokardischämie konnte der protektive Effekt von Carnitin bestätigt werden. So fanden die Autoren, dass eine präischämische Carnitingabe dem Verlust freien und zellulären Carnitins und der Zunahme kurz- und langkettiger Acylcarnitine sowie langkettiger Fettsäuren entgegenwirken konnte. Weiterhin wurden die Hemmung der Adenin-Nukleotid-Translokase reduziert, die ATP- und CP-Produktion und Glukose-Oxidation verbessert, die Laktatproduktion verringert, Zellschäden vermindert, die postischämische mechanische myokardiale Funktion verbessert und Herzrhythmusstörungen vorgebeugt (19, 42, 65, 90, 119, 130).

1.2.3 Auswirkungen kardiochirurgischer Eingriffe auf den Myokardstoffwechsel

Jeder chirurgische Korrekturingriff angeborener Herzfehler mit kardiopulmonalem Bypass und damit verbundener Myokardischämie und anschließender Reperfusion ist trotz verschiedener protektiver Ansätze neben der allgemeinen metabolischen und endokrinologischen Streßreaktion des Körpers mit einem gewissen Maß an Myokardschädigung und damit mit einer Entzündungsreaktion und Stoffwechselalteration verbunden (24, 25, 29, 58).

Folgende Veränderungen sind beschrieben, die zum Teil ursächlich an einer postischämisch gestörten Myokardfunktion mitbeteiligt sein können:

1. Hormonell-metabolische Umstellung (welche als solche aber nicht das Myokard schädigt):

- a) Anstieg der Glykolyse und der Gluconeogenese in der Leber mit konsekutiver Erhöhung der Blutglukose (25)
- b) Trotz erhöhter Blutglukose zunächst verringerte Insulinspiegel und zeitweise periphere Insulinresistenz (25, 78).
- c) Anstieg der Hormone Wachstumshormon, Cortison und Adrenalin, die wiederum den Kohlenhydratmetabolismus fördern (25).
- d) Vermehrter Proteinkatabolismus und damit u.a. erhöhte Substratzufuhr von Aminosäuren für die Gluconeogenese (25).

2. Schädigungsmechanismen des Myokards:

- a) Reduktion der Konzentration an energiereichen Phosphaten in der Myokardzelle durch verminderte ATP-Produktion (96, 97, 119).
- b) Intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung durch Inhibierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Antiport-Systems und veränderte Penetrationseigenschaften der Myozytenmembran für Ca^{2+} durch langkettige Fettsäuren und Carnitinerster (24, 28, 52, 96, 97).
- c) Verminderte β -Oxidation, dadurch verringerte Verfügbarkeit von freiem CoA und Acetyl-CoA sowie Akkumulation von langkettigen Acyl-CoA. Letztere inhibieren die Aktivität der Adenin-Nukleotid-Translokase und führen damit zur verringerten ATP-Verfügbarkeit im Zytosol (29, 90, 96, 97, 119).

- d) Verlust freien Carnitins, Carnitinverlust im Myokard, Anstieg von Acetyl-Carnitin und langkettiger Acylcarnitine mit der Folge von Störungen der myokardialen Elektrophysiologie und Gefahr von Herzrhythmusstörungen und Detergentieneigenschaften auf zelluläre Membranen (29, 90, 119).
- e) Anstieg der freien und aktivierten Fettsäuren, der Ketonkörper und der Laktatkonzentration (78, 96, 119).
- f) Vermehrte Bildung von freien Sauerstoffradikalen, die zellmembranschädigend wirken (24, 25, 28, 97).

2. FRAGESTELLUNG

Die in der Einleitung beschriebenen Sachverhalte lassen die Annahme zu, dass intra- und postoperativ auftretende Änderungen des myokardialen Carnitinstoffwechsels von Bedeutung für die postoperative Dysfunktion des Myokards sind und dass insbesondere Säuglinge von einer Carnitinsupplementierung hinsichtlich Myokardstoffwechselprotektion und -regeneration profitieren könnten.

Folgende Aspekte wurden im einzelnen untersucht:

- Gehalt an Carnitin und energiereichen Phosphaten im Myokard vor und nach operativer Ischämie mit und ohne Carnitin-Supplementierung bei Säuglingen;
- Parameter des systemischen Intermediärstoffwechsels mit und ohne Carnitin-Supplementierung bei Säuglingen;
- klinische Bedeutung einer perioperativen Carnitin-Supplementierung bei Säuglingen.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Studiendesign und Patientengut

Die klinischen und laborchemischen Veränderungen im Carnitinstoffwechsel bei perioperativer Supplementierung mit L-Carnitin wurden im Rahmen einer prospektiven, randomisierten, placebo-kontrollierten Doppelblindstudie im Zeitraum 2/95-2/96 erfasst, die durch die Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt wurde. Diese wurde in Kooperation mit dem Zentrum für Kinderheilkunde, der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie und der Abteilung für Anästhesiologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Beide Elternteile der an der Studie beteiligten Kinder mussten in Form einer schriftlichen Einwilligung zustimmen. Aufgenommen wurden Kinder bis zum vollendeten 16. Lebensjahr mit angeborenen Herzfehlern, die einem kardiochirurgischen Eingriff unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine (und damit erfolgter Myokardischämie und extrakorporaler Zirkulation) unterzogen wurden.

Eine vorhergehende Studie an 65 Kindern untersuchte intra- und postoperative Änderungen des Carnitin-Gehalts im Myokard und Plasma (62). Als ein Ergebnis konnte gezeigt werden, dass der Carnitin-Verlust bei Säuglingen signifikant höher ist als bei älteren Kindern (60,1 % vs. 26,8 %), so dass in der darauffolgenden Supplementierungs-Studie eine Stratifizierung in Kinder < 1 Jahr (Anzahl von 30) und > 1 Jahr (Anzahl von 50) vorgenommen wurde.

Die vorliegende Arbeit befasst sich nun mit der ersten Gruppe der reifen eutrophen Neugeborenen und Säuglinge - ohne Trennung des Geschlechts, da eine Geschlechtsabhängigkeit der Plasma-Carnitin-Konzentration nicht beschrieben ist (117).

Nicht mit aufgenommen wurden die Patienten bei Vorliegen folgender Faktoren:

- Anämie
- tubulärer und / oder glomerulärer Nierenfunktionsstörung
- Carnitinmangelsyndrome / Vorliegen einer Stoffwechselstörung im weitesten Sinne
- fehlende schriftliche Einwilligung der Eltern.

Die klinischen Angaben sowie intraoperativen Parameter zu den Patienten in der Placebo- und Verumgruppe und die Art und Häufigkeit der einzelnen Herzfehler sind in den Tabellen 3.1 und 3.1a dargestellt.

Zur Beurteilung der hämodynamischen Situation wurden die Ergebnisse der präoperativen Herzkatheteruntersuchung herangezogen.

Tabelle 3.1a: Verteilung der einzelnen Herzfehler

Atrioventrikulärer Septumdefekt	9
Ventrikelseptumdefekt	8
Transposition der großen Arterien	5
Aortenisthmusstenose und VSD	3
Fallot`sche Tetralogie	3
Double outlet right ventricle	1
Truncus arteriosus communis	1
<hr/>	
Gesamt:	30

Tabelle 3.1: Klinische Daten sowie intraoperative Parameter zu den Patienten

(angegeben in Mittelwert \pm SE und Bereich - in Klammern -)

	Verum	Placebo	p-Wert
Anzahl	15	15	
Alter bei OP (Monate)	4,8 \pm 0,86 (0,167-10)	6,2 \pm 0,79 (0,3-10)	0,26
Gewicht bei OP (kg)	4,9 \pm 0,28 (3,2-6,9)	5,4 \pm 0,29 (3,75-6,97)	0,19
O ₂ -Sättigung präoperativ (%)	82,5 \pm 2,77 (53-95)	88,5 \pm 1,59 (76-98)	0,07
Rechtsatrialer Mitteldruck (mmHg)	3,5 \pm 0,31 (2-5)	3,5 \pm 0,48 (1-7)	1,00
Rechtsventrikulärer systolischer Druck (mmHg)	68,2 \pm 4,87 (36-93)	65 \pm 5,9 (6-83)	0,69
Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (mmHg)	7,7 \pm 0,75 (5-12)	7,7 \pm 0,77 (4-13)	0,98
Qp/Qs	1,72 \pm 0,3 (1-2,89)	1,98 \pm 0,2 (0,62-2,89)	0,46

Gesamtdauer der extra- korporalen Zirkulation (min)	158,8 ± 13,2 (76-248)	151,2 ± 11,4 (85-243)	0,67
Zeit des totalen kardio- pulmonalen Bypass (min)	120,27 ± 13,9 (49-210)	109 ± 10,1 (54-170)	0,52
Gesamtschämiedauer (min)	91,9 ± 7,9 (36-150)	91,9 ± 7,1 (54-148)	1,0
Minimale systemische Temp (°C)	28,9 ± 1,2 (17,1-33,1)	28,1 ± 1,2 (17,2-32,7)	0,69

Qp/Qs = Fluss-Verhältnis pulmonal vs systemisch

3.2 Probengewinnung

Die Blutentnahmen erfolgten zu folgenden Zeitpunkten (siehe auch Kapitel 8 Anhang 3.2):

- 24-48 h präoperativ (venöse Blutentnahme im Rahmen der üblichen präoperativen Diagnostik) (→ Zeitpunkt A);
- intraoperativ aus liegender Arterienkanüle nach erfolgter oraler Substitution und vor (→ Zeitpunkt B) sowie nach (→ Zeitpunkt C) der Carnitininfusion;
- am Ende der Ischämie (→ Zeitpunkt D);
- je 4 h, 8 h, 12 h, 24 h und 48 h postoperativ aus liegender Arterienkanüle.

Die Blutproben wurden sofort nach der Entnahme auf Eis gelegt und baldmöglichst abzentrifugiert. Das Plasma wurde bei - 20 °C bis zur Bearbeitung eingefroren.

Urinproben wurden zeitgleich prä- und postoperativ entweder als Spontan- oder Sammelurin gewonnen und ohne Bearbeitung umgehend ebenfalls bei - 20 °C eingefroren.

Die Myokardproben (in der Regel 10-20 mg) wurden im Rahmen der üblichen chirurgischen Schnittführung beim Eröffnen des rechten Vorhofes unmittelbar nach Beginn der Aortenabklemmung aus dem rechten Vorhof entnommen. Die postischämische Probenentnahme erfolgte einige Minuten nach Entfernen der Aortenklemme beim Verschluss des rechten Vorhofes aus dem Vorhofmyokard nach Abschluß der Reperfusion.

Die Myokardproben wurden steril behandelt, zur Vermeidung von Blutkontamination kurz mit kalter physiologischer NaCl-Lösung abgespült und unverzüglich in Nalgene Cryoware[®] Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei - 70°C aufbewahrt.

3.3 Perioperative Carnitinsupplementierung

Zur Studienmedikation (siehe auch Kapitel 8 Anhang 3.2) wurden zwei als Arzneimittel zugelassene Carnitinlösungen verwendet, die in der Kinderheilkunde routinemäßig bei primärem oder sekundärem Carnitin-Mangel eingesetzt werden (15) und über die somit ausreichende pharmakodynamische und pharmakokinetische Erfahrungen vorliegen:

→ Biocarn-Sirup[®], 300 mg/ml zur oralen Gabe

→ Nefrocarnit-Lösung[®], 200 mg/ml zur intravenösen Gabe.

Als parenterales Placebo diente physiologische Kochsalzlösung; das orale Placebo enthielt die Hilfsstoffe des handelsüblichen Carnitin-Sirups.

Carnitin wie Placebo wurden in identischem Design und gleicher Darreichungsform von der Firma Medice, Iserlohn, gestellt.

Die Substitution erfolgte nach folgendem Schema:

1. 24 h präoperativ 100 mg/kg/d p.o. in 3 Einzeldosen
2. intraoperativ vor Beginn der extrakorporalen Zirkulation 20 mg/kg i.v. über 2 Minuten als Bolus, nachfolgend 80 mg/kg über 45 Minuten als intravenöse Infusion
3. postoperativ 50 mg/kg/d über 48 Stunden als intravenöse Dauerinfusion.

3.4 Perioperative Variablen und Verlaufsparemeter

3.4.1 Intraoperative Verlaufsparemeter

Sämtliche kardiochirurgische Eingriffe erfolgten unter extrakorporaler Zirkulation und Myokardprotektion mittels Hypothermie und Fettsäure-freier, kristalloider, kalter Kardioplegie (Custodiol[®] Bretschneider-HTK-Lösung) (16) und partieller Blut-Reperfusion.

Zur Beurteilung einer möglichen intraoperativen Myokardalteration wurden folgende Parameter herangezogen (siehe auch Tabelle 3.1 in Kapitel 3.1):

- Gesamtzeit der extrakorporalen Zirkulation
- Zeit des totalen kardiopulmonalen Bypass
- Ischämie-Zeit (Zeit vom Setzen bis zur Entfernung der Aortenklemme)
- minimale systemische Körpertemperatur.
- CKMB 8h nach Ischämie-Ende als Hinweis für die globale, ischämiebedingte Myokardschädigung. Für CKMB wurde ein Zusammenhang als Marker für die postoperative Myokardfunktion aufgezeigt (58).

3.4.2 Postoperative Verlaufparameter

Die Beurteilung der postoperativen mechanischen Funktion des Myokards erfolgte anhand nachfolgender Kriterien:

- Laktatspiegel
- Gesamtbeatmungsdauer
- Auftreten supraventrikulärer oder ventrikulärer Rhythmusstörungen.

Die Beurteilung erfolgte nach folgendem Score:

Stufe 1: Dauer > 10 min

Stufe 2: Hämodynamische Instabilität und / oder Interventionsbedürftigkeit.

- Postoperativer Bedarf an positiv inotropen Medikamenten zu den Zeitpunkten:
4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h.

Dieser wurde mittels eines Scores ermittelt:

Stufe 0: Keine Katecholamingabe

Stufe 0,5: Gabe von Dobutamin $\leq 2,5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ oder
Dopamin $\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$

Stufe 1: Gabe von Dobutamin $\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$

Stufe 2: Gabe von Dobutamin $> 5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ oder Adrenalingabe oder
Gabe eines Phosphodiesterase-Inhibitors wie Enoximone

Stufe 3: Adrenalin und Dobutamin $\geq 5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ oder Enoximone und
Dobutamin $\geq 5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$

Stufe 4: Adrenalin und Enoximone (+/- Dobutamin $\geq 5 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$)

Stufe 5: Adrenalin und Enoximone und Noradrenalin.

Der Score wurde zur Beurteilung der postoperativen myokardialen Pumpfunktion herangezogen; eine gute Korrelation ist bereits beim adulten Patienten aufgezeigt worden (27).

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Herstellung eines Muskelhomogenats aus Myokardproben

Die tiefgefrorenen Myokardproben wurden zunächst auf Eis von makroskopisch sichtbaren Gefäßen, Bindegewebe, Faszien und Fett freipräpariert. Die eisgekühlten Proben wurden in Portionen zu 5 - 25 mg abgewogen und diese dann auf einem eisgekühlten Objektträger mit einem Skalpell möglichst fein zerkleinert.

Dem zerkleinerten Gewebe wurde 500 µl eisgekühltes Aqua dest. zugesetzt und die Mischung 1 Minute bei einer Umdrehung von 1100 U/min auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde 2 Minuten bei 4°C und einer Umdrehung von 21000g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und auf Eis gelegt. Das Pellet wurde nochmals mit dem gleichen Volumen Aqua dest. homogenisiert, zum Überstand dazugegeben, mit Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt und vermischt.

Hieraus wurden 25 µl für die Bestimmung des kollagenfreien Proteins in ein Eppendorfhütchen abpipettiert.

Die Restmenge wurde erneut 2 Minuten zentrifugiert und vom Überstand 600 µl für die Carnitinbestimmung abgenommen, die zurückgebliebene Menge wurde für die ATP-Bestimmung verwertet.

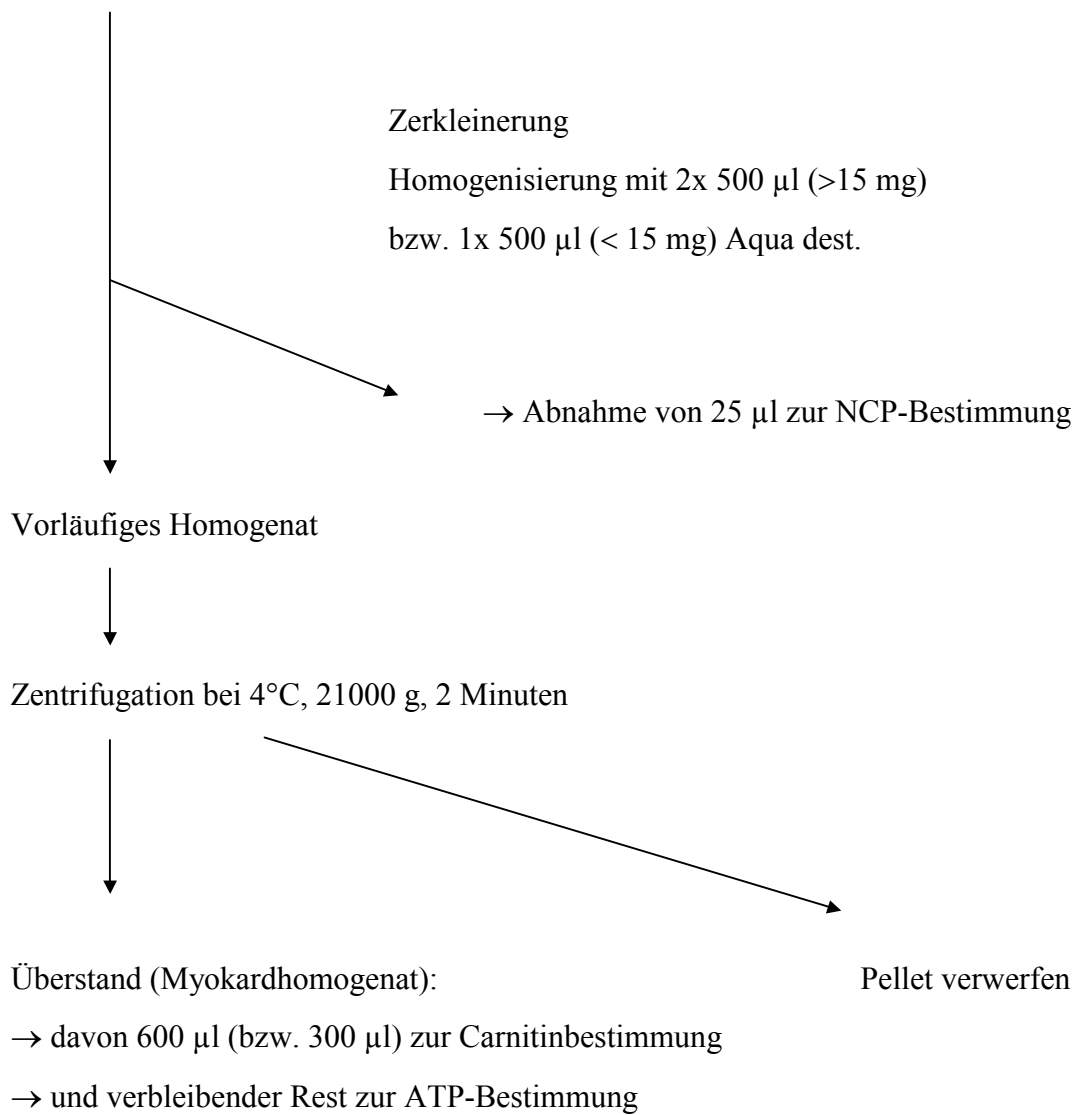
Alle drei Eppendorfhütchen wurden sofort bis zur Analyse bei - 20°C tiefgefroren.

Das Pellet wurde verworfen.

Bei Gewebeproben ≤ 15 mg erfolgte nur ein Homogenisierungsschritt mit nur 500 µl Aqua dest; zur Analyse stand dann nur die Hälfte der Menge zur Verfügung.

Abbildung 3.5.1: Prinzip der Homogenisierung

Myokardprobe

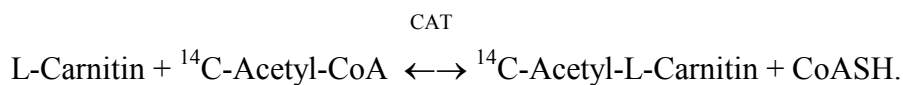


3.5.2 Carnitinbestimmung

3.5.2.1 Grundlagen der Carnitinbestimmung

Die Bestimmung der Carnitinfraktionen im Plasma und Myokard erfolgte mittels der radioenzymatischen Methode von *McGarry and Foster*, die leicht modifiziert wurde (74, 117).

Grundlage ist nachfolgendes Reaktionsschema:



Die Carnitin-Acetyl-Transferase (CAT) überträgt die Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf freies Carnitin. Bei bekannter Radioaktivität von ${}^{14}\text{C-Acetyl-CoA}$ entspricht die Menge des gebildeten ${}^{14}\text{C-Acetyl-Carnitins}$ der Carnitinkonzentration im zu messenden Reagenz.

Das nicht an L-Carnitin gebundene ${}^{14}\text{C-Acetyl-CoA}$ wird mittels Ionenaustauscher gebunden und so aus der Probe entfernt; die Radioaktivität in einem β -Counter gemessen.

Das Problem der Umkehrbarkeit der Gleichgewichtsreaktion lösten *McGarry and Foster* durch die Zugabe von Tetrathionat, welches CoASH oxidiert und damit die freien SH-Gruppen bindet und somit das Reaktionsgleichgewicht noch stärker nach rechts verschiebt. Außerdem inhibiert Tetrathionat im Gegensatz zu anderen SH-bindenden Agenzien nicht die Carnitin-Acetyl-Transferase.

Durch diese Modifikation konnte eine noch höhere Sensitivität erreicht werden.

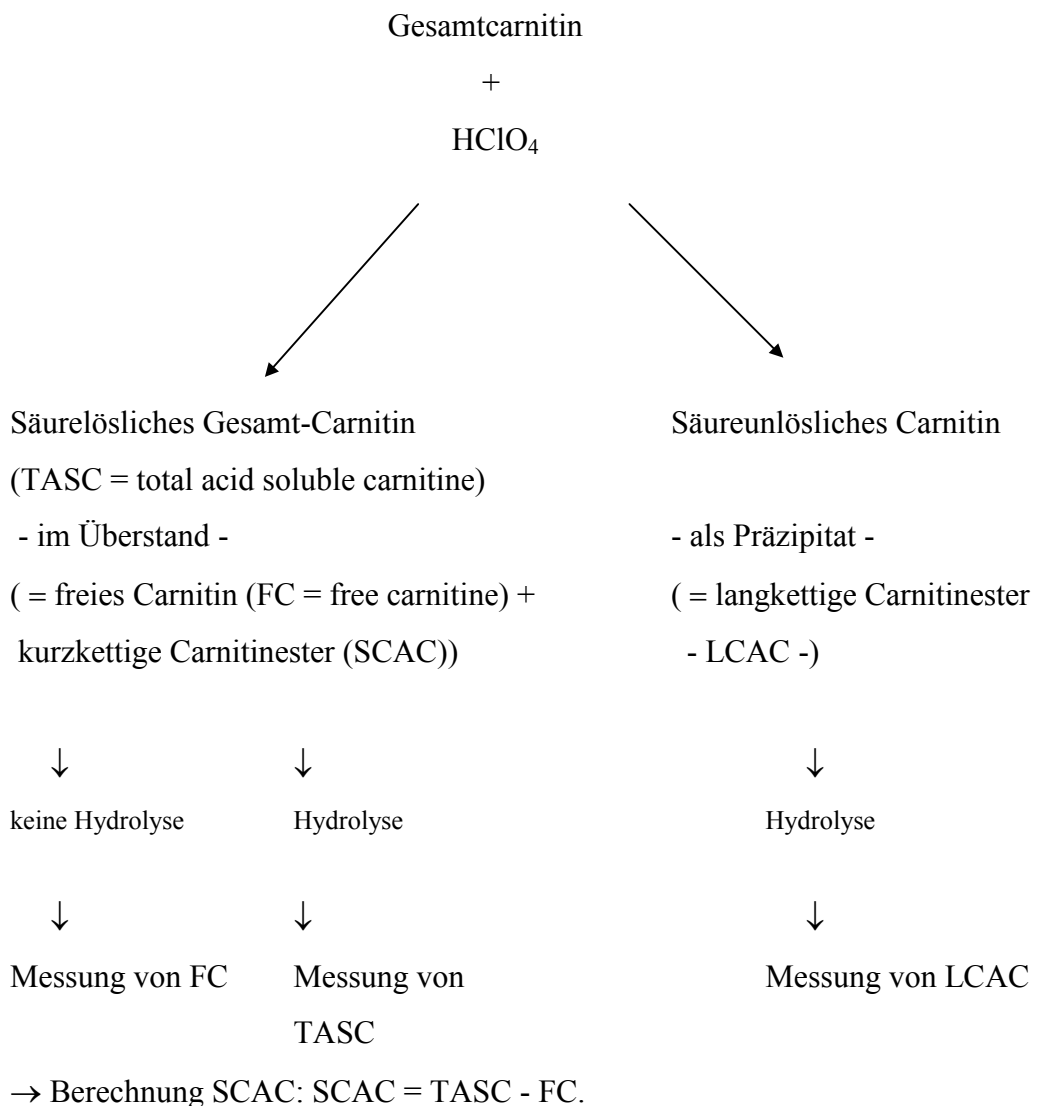
Ein Nachteil der Original-Methode lag in der hohen Radioaktivität der Leerwerte, wofür der verwendete Tris-Puffer verantwortlich gemacht wurde. Deshalb wurde dieser durch HEPES-Puffer ersetzt (117).

Die Separation der Carnitinfraktionen erfolgt erstens durch Zugabe von Perchlorsäure, welches das säurelösliche vom säureunlöslichen Carnitin trennt und zweitens durch Hydrolyse, wodurch die Acyl-Reste vom Carnitin abgespalten werden (32).

Die Carnitinerester werden aufgeteilt in

- kurzkettige Acylcarnitine (SCAC = short-chain acylcarnitines) mit einer Kettenlänge $C_2 - C_4$
- mittelkettige Acylcarnitine mit einer Kettenlänge $C_6 - C_{12}$ und
- langkettige Acylcarnitine (LCAC = long-chain acylcarnitines) mit einer Kettenlänge $\geq C_{14}$.

Die Perchlorsäure-Extraktion macht sich die Säurelöslichkeit der Carnitinerester zunutze, die bis zu einer Kettenlänge von C_{10} gut ist. Somit enthält der säurelösliche Überstand freies Carnitin sowie kurz- und mittelkettige Acylcarnitine. Letztere sind aber physiologischerweise relativ selten, so dass zur Vereinfachung und durch den geringen Anteil der mittelkettigen Acylcarnitine in dieser Fraktion auf eine gesonderte Bestimmung verzichtet werden konnte.



Von erheblicher Wichtigkeit ist die gründliche Perchlorsäure-Extraktion, ansonsten kommt es zu einer unzureichenden Trennung der säurelöslichen von der säureunlöslichen Fraktion und zu einer Überschätzung der Menge an LCAC. Hier hat sich ein zweifaches Waschen mit HClO_4 bewährt (41).

Außerdem müssen die Proben nach Perchlorsäureextraktion und/oder Hydrolyse vor der Carnitinbestimmung neutralisiert werden (32). Hierzu eignet sich am besten HEPES-Puffer (75, 117).

3.5.2.2 Bestimmung von Carnitin im Muskelgewebe - Präparation und Hydrolyse

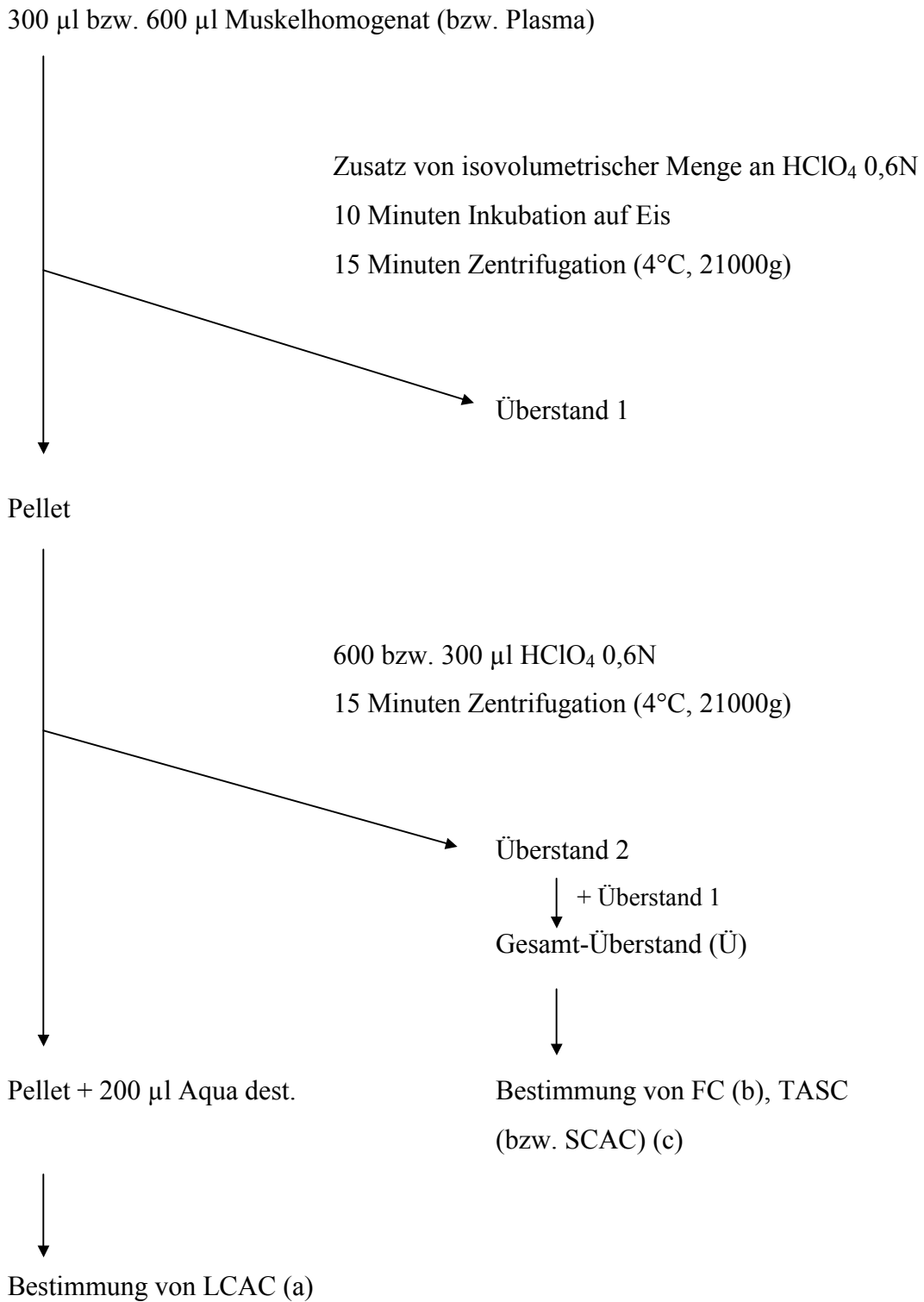
600 μl bzw. 300 μl Muskelhomogenat (siehe unter 3.5.1) wurde mit der gleichen Menge 0,6N Perchlorsäure versetzt, vermischt und 10 Minuten auf Eis gelagert.

Danach erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 21000g und zweimaliges Waschen des säureunlöslichen Pellets mit je 600 μl bzw.

300 μl (bei Gewebeproben $< 15 \text{ mg}$) 0,6N HClO_4 . Daraufhin wurde erneut abzentrifugiert, und die Überstände wurden zur Bestimmung von FC, TASC und SCAC kombiniert.

Das Pellet wurde mit 200 μl kaltem Aqua dest. resuspendiert zur Bestimmung der LCAC.

Abbildung 3.5.2.2a: Auftrennung der Carnitinfractionen im Homogenat (bzw. Plasma)



(a): Der LCAC-Suspension wurden 50 µl 10M KOH (Raumtemperatur und pH > 13) zugesetzt. Anschließend erfolgte die alkalische Hydrolyse (2 h bei 65°C im Wasserbad). Danach Zusatz von 250 µl HEPES-Puffer „nach Hydrolyse“ (siehe Tabelle 3.5.2 unter 3.5.8.2). Neutralisation der Proben mit 25% HCl (entspricht 0,7M) und 2,25% HCl (entspricht 0,07M) mittels pH-Meter auf pH 7,38-7,42 und Auffüllen mit Aqua dest. auf 700 µl. Hinterher wurden die Proben zur Elimination der entstandenen Salze mind. 2 h bei -20°C eingefroren, danach 5 Minuten im Eisbad aufgetaut und 2 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Kalium-Chlorid-Präzipitat wurde verworfen, aus dem Überstand 300 µl zur Carnitinmessung verwendet.

(b): Aus den kombinierten Überständen (Ü) wurde zur Bestimmung von FC 500 µl abpipettiert, mit 250 µl HEPES-Puffer „nach Hydrolyse“ versetzt und mit 5M und 1M KOH auf pH 7,38-7,42 neutralisiert; anschließend Auffüllen der Proben mit Aqua dest. auf 1000 µl.

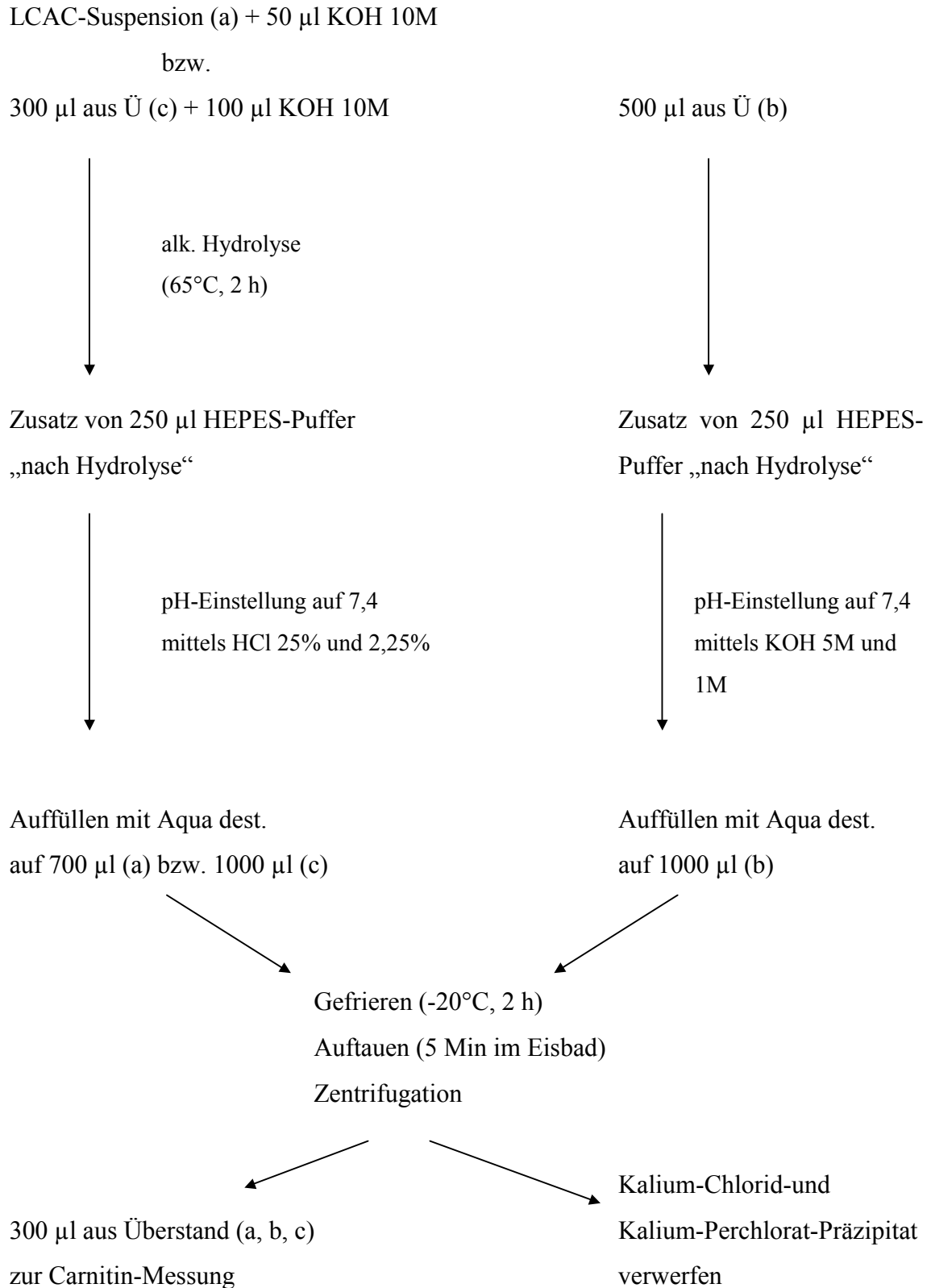
Da bei der Reaktion von HClO_4 mit KOH vermehrt die CAT-Reaktion inhibierende Salze anfallen, wurden die neutralisierten und mit Aqua dest. aufgefüllten Proben erneut für mindestens 2 h bei -20°C eingefroren und nach dem Auftauen in der Kühlzentrifuge 2 Minuten abzentrifugiert. Das entstandene Kalium-Perchlorat-Präzipitat wurde verworfen, 300 µl vom Überstand zur Carnitinmessung verwendet.

(c): TASC wurde ebenfalls aus den kombinierten Überständen (Ü) bestimmt, hierbei wurde wie oben unter (a) beschrieben vorgegangen, es wurden nur andere Mengen verwendet:

300 µl Überstand wurde mit 100 µl 10M KOH versetzt, nachfolgend alkalische Hydrolyse, Neutralisation, Auffüllen mit Aqua dest. auf 1000 µl, Einfrieren der Proben, Abzentrifugieren und Entnahme von 300 µl zur Carnitinmessung.

Aus der Differenz von gesamtem säurelöslichen Carnitin und freiem Carnitin wurde der Gehalt an kurzkettigen Acyl-Carnitinen berechnet.

Abbildung 3.5.2.2b: Prinzip des Messverfahrens zur Carnitinbestimmung im Muskelhomogenat (bzw. Plasma)



3.5.2.3 Bestimmung von Carnitin im Plasma - Präparation und Hydrolyse

Die Messung erfolgte analog der Bestimmung der Carnitinfraktionen im Muskel, nur die *verwendeten Mengen differierten teilweise* (siehe auch Abb. 3.5.2.2b):

300 μl Plasma wurden mit 300 μl 0,6M HClO_4 versetzt und 2x gut mit HClO_4 gewaschen. Nach Zentrifugation wurde aus dem Pellet wiederum LCAC (a), aus dem Überstand FC (b) und TASC (c) bestimmt (siehe auch Abb 3.5.2.2a).

(a): Das Pellet wurde mit 200 μl kaltem Aqua dest. resuspendiert. Nach Zugabe von 50 μl 10M KOH wurde die Hydrolyse gestartet. Die Reaktion endete durch Zugabe von 200 μl HEPES-Puffer „nach Hydrolyse“. Mittels konzentrierter und verdünnter HCl erfolgte die pH-Wert-Einstellung auf 7,38-7,42. Anschließend Volumenauffüllung auf 1000 μl mit Aqua dest., Gefrieren, Zentrifugieren und Abnahme von 300 μl aus dem Überstand zur Carnitinbestimmung.

(b): Zur Messung des FC wurden 200 μl vom Überstand verwendet, die mit 50 μl Aqua dest. gemischt wurden. Im Anschluss Zugabe von 200 μl HEPES-Puffer „nach Hydrolyse“ und Neutralisation mittels konzentrierter und verdünnter KOH. Danach Volumenergänzung auf 1000 μl mit Aqua dest., Gefrieren, Zentrifugieren und Abnahme von 300 μl aus dem Überstand zur Carnitinbestimmung.

(c): Die Hydrolyse des TASC erfolgte mit 200 μl Überstand, 100 μl Aqua dest. und 50 μl 10M KOH. Der Reaktionsstop erfolgte durch Zugabe von 200 μl HEPES-Puffer „nach Hydrolyse“.

Auch hier schloss sich eine pH-Wert-Einstellung auf 7,4 durch Titration von 25%iger und 2,25%iger HCl an. Danach Auffüllen mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 1000 μl , Gefrieren und Zentrifugieren.

Es wurden ebenfalls 300 μl aus dem Überstand zur Carnitinmessung verwendet.

3.5.2.4 Interne Standards

- Carnitin der Konzentrationen 0; 3,1375; 6,275; 12,5; 25; 50 und 100 $\mu\text{mol/l}$ (aus Carnitin-Stammlösung 100 $\mu\text{mol/l}$) zur Erstellung einer Standard-Eichkurve für alle Carnitin-Messungen.

- mit Palmitoylcarnitin angereicherte Standardproben der Konzentrationen 5; 10 und 25 $\mu\text{mol/l}$ (aus Palmitoylcarnitin-Stammlösung 100 $\mu\text{mol/l}$) zur Überprüfung der Hydrolyse-Effizienz bei Bestimmung der LCAC.

Die Standards wurden wie folgt hergestellt:

Myokard

LCAC-Bestimmung:

→ je 50 μl Standard und 100 μl Aqua dest., 50 μl 0,6M HClO_4 und 50 μl 10M KOH.

FC-Bestimmung:

→ je 50 μl Standard und 50 μl Aqua dest. und 100 μl 0,6M HClO_4

TASC-Bestimmung:

→ je 50 μl Standard und 150 μl 10M KOH und 100 μl 0,6M HClO_4

Plasma

LCAC-Bestimmung:

→ je 50 μl Standard und 100 μl Aqua dest., 50 μl 0,6M HClO_4 und 50 μl KOH
10 M

FC-Bestimmung:

→ je 50 μl Standard und 50 μl Aqua dest. und 100 μl 0,6M HClO_4

TASC-Bestimmung:

→ je 50 μl Standard und 50 μl Aqua dest., 100 μl 0,6M HClO_4 und 50 μl 10M KOH.

Ab dem Reaktionsschritt „Hydrolyse“ (siehe auch Abbildung 3.5.2.2b) wurden die Standards analog den Plasma- bzw. Myokardproben behandelt.

3.5.2.5 Bestimmung von Carnitin - radioenzymatischer Assay

Zur Bestimmung des Carnitingehalts in den vollständig prozessierten Proben und Standards - stets als Doppelbestimmung - wurden diese mit 200 µl Carnitin-Cocktail, welcher Na-Tetrathionat, markiertes und unmarkiertes Acetyl-CoA enthält (siehe Tabelle 3.5.2 unter 3.5.8.2), und 10 µl verdünnter Carnitin-Acetyltransferase (1,6 IE/10µl) versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die CAT-Reaktion wurde durch Einbringen der Proben für mindestens 5 Minuten ins Eisbad beendet.

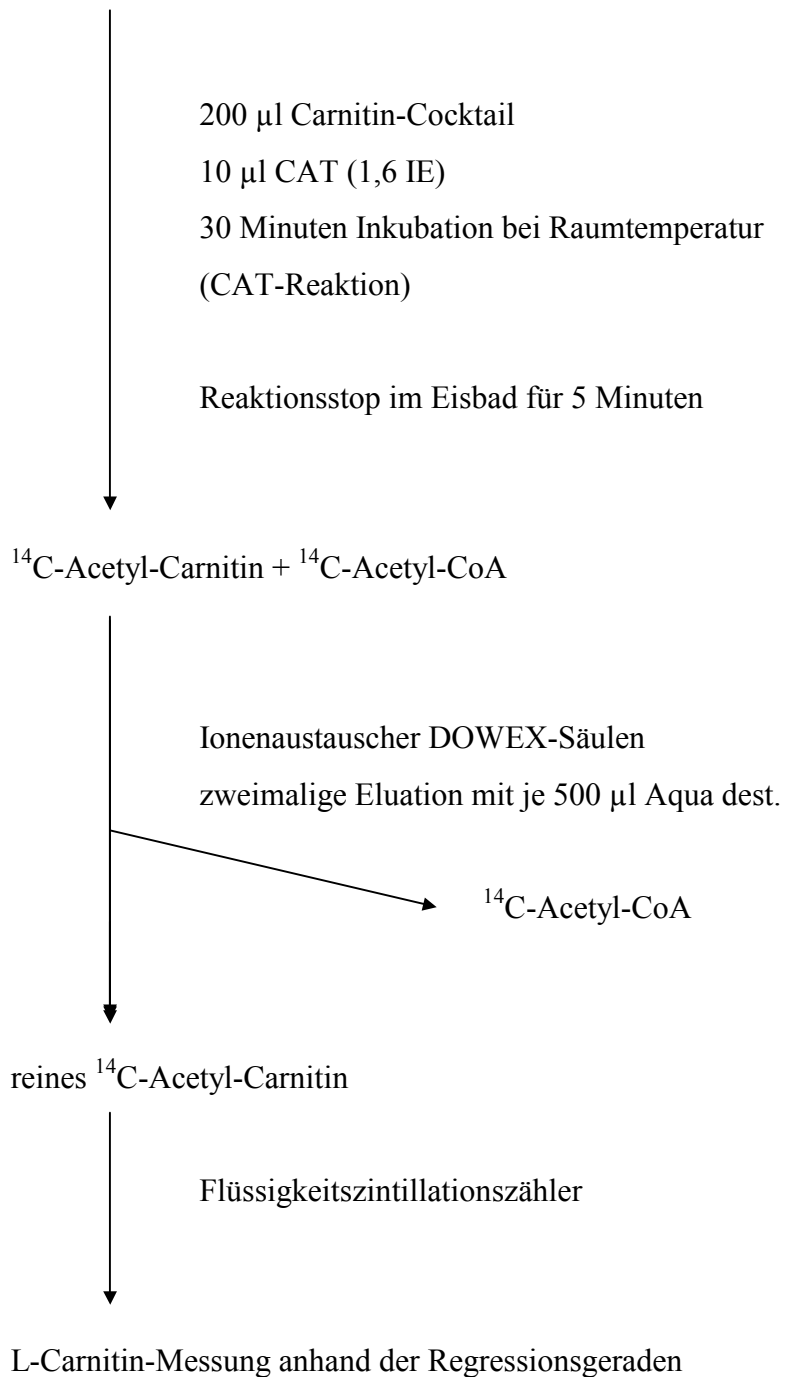
Danach wurden die Proben auf die vorbereiteten DOWEX-Säulen (siehe Tabelle 3.5.2 unter 3.5.8.2) pipettiert und zweimalig mit Aqua dest. gewaschen, um das markierte Acetyl-Carnitin gut wieder von der Säule zu entfernen. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die Radioaktivität in einem Flüssigkeitszintillationszähler gemessen.

Die Berechnung der Carnitinwerte erfolgte anhand der mit den Standardkonzentrationen erstellten Regressionsgeraden.

Abbildung 3.5.2.5: Die radioenzymatische Carnitinbestimmung

Vollständig prozessierte

Proben und Standards (enthaltenes Carnitin)

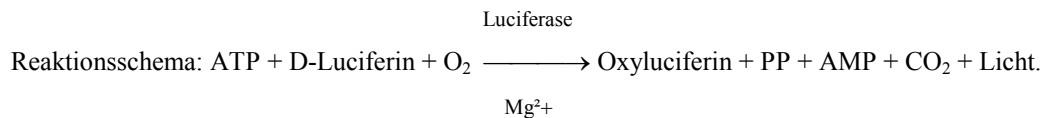


3.5.3 Bestimmung von ATP und Kreatinphosphat (CP) im Muskelgewebe

3.5.3.1 ATP-Messung

Die Messung der ATP- und CP-Konzentrationen im rechtsatrialen Myokard prä- und postischämisch erfolgte mit einem kommerziellen Biolumineszenz-Assay.

Das Testprinzip besteht darin, dass das Enzym Luciferase die Umwandlung von ATP zu AMP unter Emission von Licht katalysiert; die Wellenlänge des freiwerdenden Lichtes mit einem Maximum von 562nm wird im Luminometer gemessen. Die Zahl der emittierten Photonen ist im Bereich von $2,5 \times 10^{-11}$ bis 1×10^{-6} Mol ATP je Liter direkt proportional der ATP-Konzentration im zu bestimmenden Reagenz.



Der hier benutzte Assay ist eine Fortentwicklung des früher verwendeten ATP-Biolumineszenz CLS Assays (ebenfalls von Boehringer, Mannheim), bei dem nur eine mit Aqua dest. verdünnte wässrige Probe zur Messung verwendet wurde. Dieser war jedoch störanfälliger bei pH-Schwankungen in der Probe, beim Vorhandensein von Substanzen in der Probe, deren Absorptionsspektrum sich mit dem der Luciferase-Reaktion überlagern und durch Inhibierung der Luciferase durch Neutralsalze. Dem wurde hier durch die Verwendung einer abgepufferten und neutralisierten Probe Rechnung getragen.

Grundsätzlich müssen alle zur Messung verwendeten Lösungen und Proben im Eisbad aufbewahrt werden mit Ausnahme des Luciferase-Reagenz, welches sein Temperaturoptimum bei Raumtemperatur hat. Zur Minimierung des Leerwertes wurden HPLC-Wasser und sterile Gefäße und Pipetten verwendet.

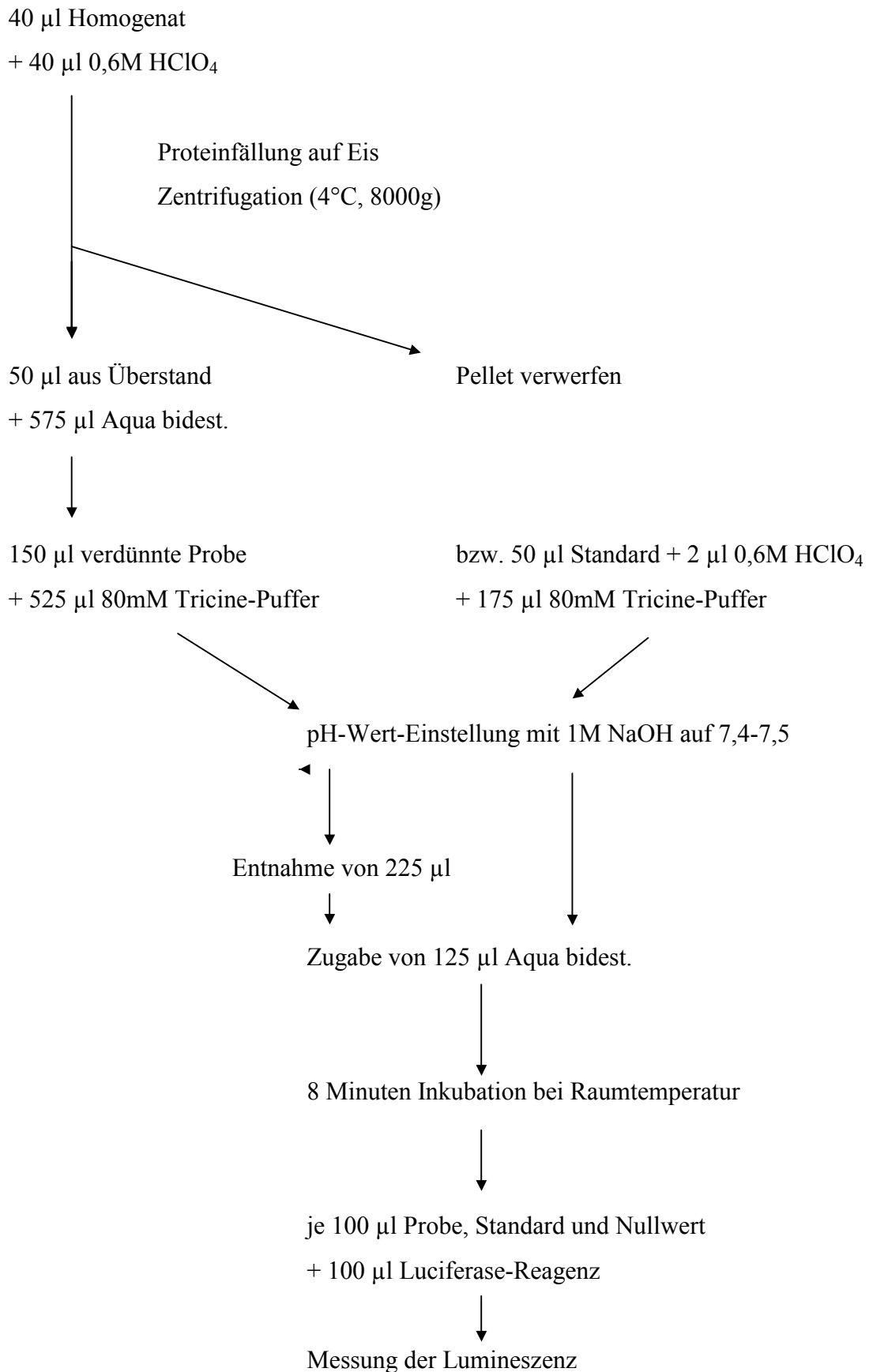
Zur Erstellung der ATP-Eichkurve wurde zunächst eine Konzentrationsstandardreihe von 10^{-6} bis 10^{-9} mol/l erstellt (aus 1mM ATP-Stammlösung). 50 µl des Standards wurde mit 2 µl 0,6M HClO₄-Lösung und 175 µl 80mM Tricine-Puffer versetzt und mit 1M NaOH-Lösung mittels pH-Meter auf pH 7,4-7,5 neutralisiert. Nach Zugabe von

125 µl Aqua bidest. wurden die Proben für 8 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Zur Bestimmung der ATP-Konzentration in der Herzmuskelprobe wurden 40 µl Homogenat mit der gleichen Menge 0,6M HClO₄-Lösung versetzt, zur Proteinfällung 10 Minuten auf Eis gelegt und anschließend 5 Minuten zentrifugiert (8000g, 4°C). Aus dem ATP-enhaltenden Überstand wurden 50 µl abpipettiert, mit Aqua bidest. 1:12,5 verdünnt und das Pellet verworfen. 150 µl der verdünnten Probe wurden zur Anionenpufferung mit 525 µl 80mM Tricine-Puffer versetzt und mit 1M NaOH-Lösung mittels pH-Meter auf pH 7,4-7,5 neutralisiert, welches dem pH-Optimum der Luciferase-Reaktion entspricht. 125 µl Aqua bidest. wurden zu 225 µl der nun abgepufferten und neutralisierten Probe gegeben und 8 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

Anschließend wurden zur Doppelbestimmung je 2x 100 µl des Standards, der Probe und des Nullwertes (50 µl Aqua bidest., 2 µl 0,6M HClO₄, 175 µl 80 mM Tricine-Puffer) mit 100 µl Luciferase-Reagenz versetzt und die Lumineszenz im AutoLumat gemessen. Der Nullwert repräsentiert die unspezifische Photonenemission, er wurde vom Messwert der Proben und Standards subtrahiert.

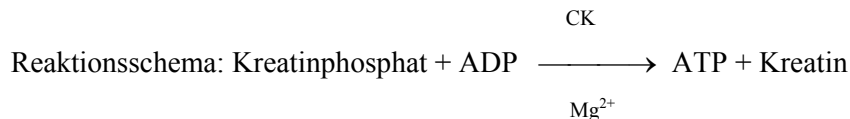
Die ATP-Konzentration wurde dann mit diesen bereinigten Messwerten anhand der Eichkurve ermittelt.

Abbildung 3.5.3.1: Prinzip der ATP-Messung



3.5.3.2 CP-Messung

Analog dazu erfolgte die Messung des myokardialen Gehalts an Kreatinphosphat durch äquimolare Umwandlung von Kreatinphosphat (CP) durch Kreatinphosphokinase (CK) (bei Vorhandensein von ADP und MgCl) in Kreatin und ATP, welches wiederum per Luminometer gemessen wurde:



Aus dem entstandenen ATP konnte direkt auf den Kreatinphosphatgehalt der Probe geschlossen werden.

Zur Erstellung der CP-Eichkurve wurde eine Konzentrationsstandardreihe von 10^{-4} bis 5×10^{-8} mol/l erstellt (1mM CP-Stammlösung). 50 µl des Standards wurden mit 2 µl 0,6M HClO₄-Lösung und 175 µl 80mM Tricine-Puffer versetzt und mit 1M NaOH-Lösung mittels pH-Meter auf pH 7,4-7,5 neutralisiert. Nach Zugabe von 50 µl 0,6mM ADP, 25 µl 12mM MgCl und 50 µl CK (66kU/l) wurden die Ansätze für 8 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

Zur Bestimmung der CP-Konzentration in der Herzmuskelprobe wurden 225 µl der abgepufferten und neutralisierten Probe (wie oben beschrieben bei ATP-Messung) mit 50 µl 0,6mM ADP, 25 µl 12mM MgCl und 50 µl CK (66kU/l) versetzt und 8 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert.

Zur Doppelbestimmung wurden je 2x 100 µl des Standards, der Probe und des Nullwerts (50 µl Aqua bidest., 2 µl 0,6M HClO₄, 175 µl 80 mM Tricine-Puffer, 50 µl 0,6mM ADP, 25 µl 12mM MgCl, 50 µl CK (66kU/l)) mit 100 µl Luciferase-Reagenz versetzt und die Intensität der Photonen-Emission im AutoLumat gemessen.

Abbildung 3.5.3.2: Prinzip der CP-Messung

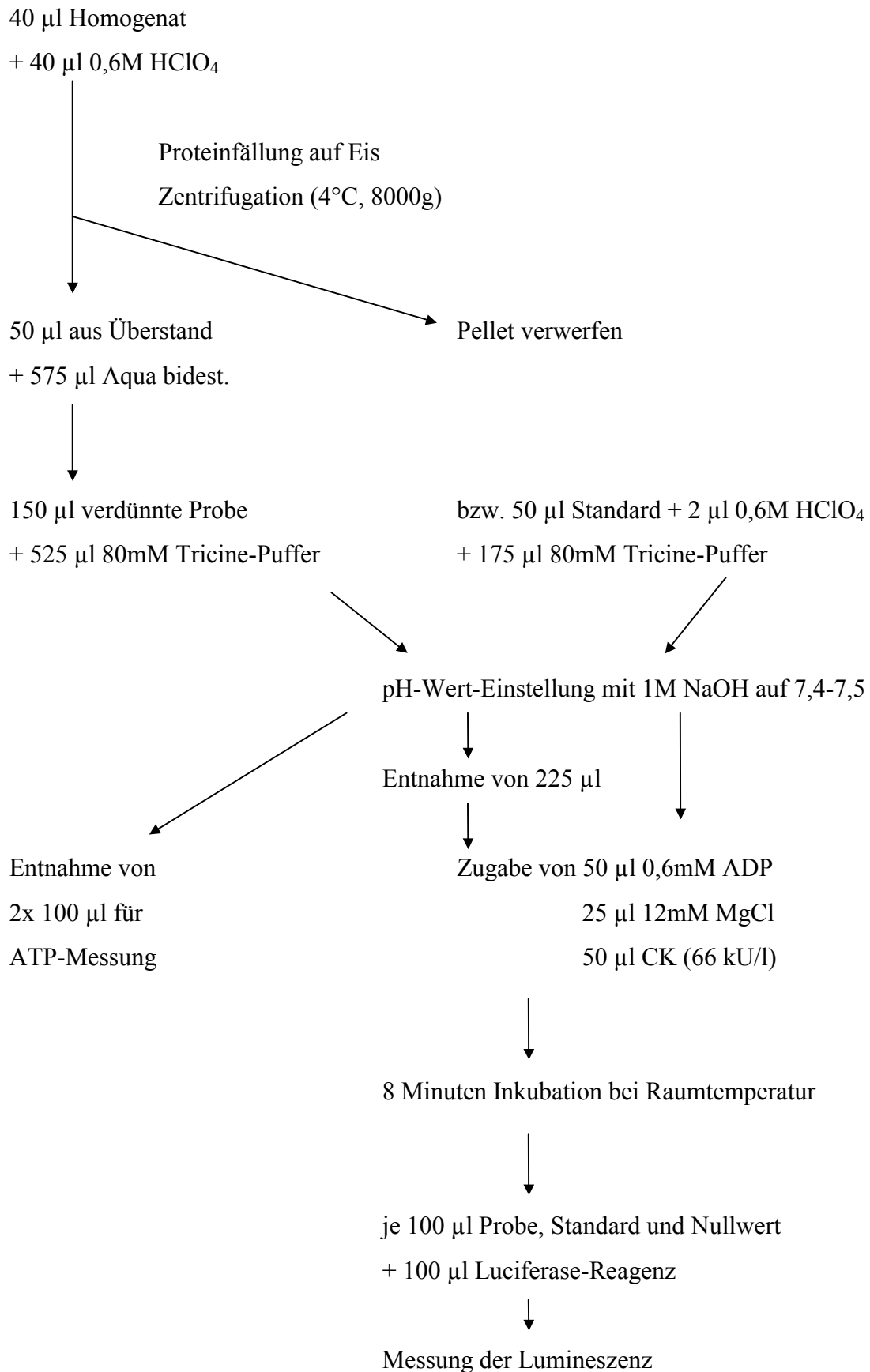
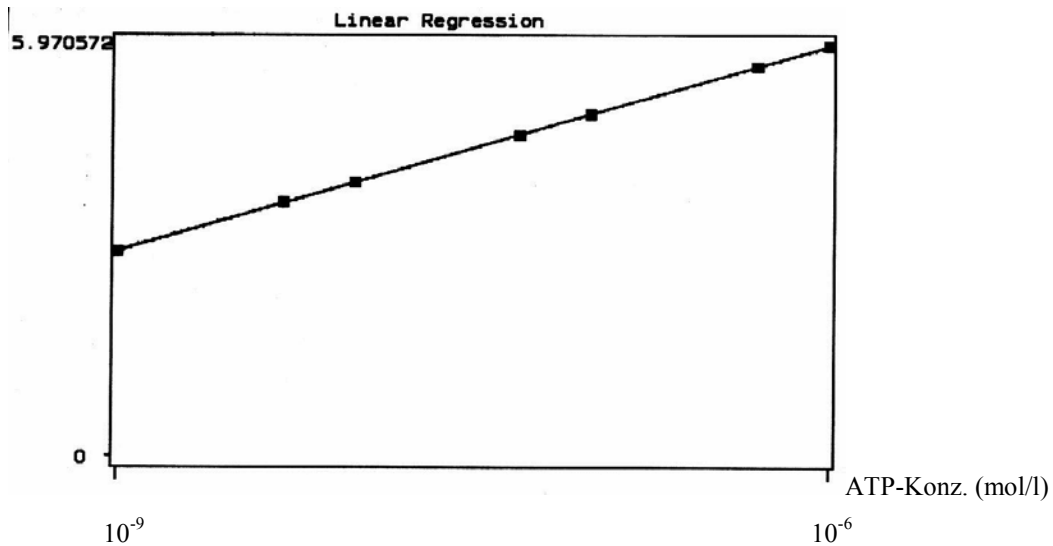


Abbildung 3.5.3: Beispiel einer ATP (1) - und CP (2) -Standardkurve

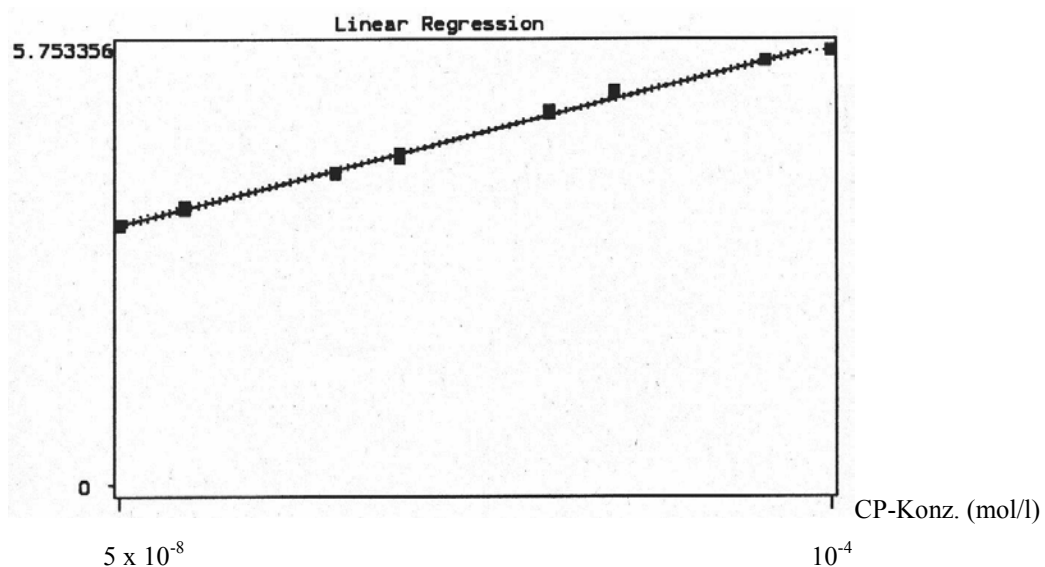
Die im AutoLumat gezählten Counts pro Minute (CPM) - Ordinate - sind proportional der ATP- bzw. CP-Konzentrationen (in mol/l) - Abszisse - in doppeltlogarithmischer Auftragung.

Die Quadrate geben die CPM der Verdünnungsreihe des ATP bzw. CP-Standards an. Anhand dieser Standardverdünnungen wurde mittels linearer Regression die ATP- bzw. CP-Konzentration berechnet. Die Standardkurven zeigen für den gesamten Messbereich eine signifikant lineare Korrelation ($r: 0,998 - 1$) zwischen der Intensität des Lumineszenzsignals und der ATP- bzw. CP-Konzentration.

(1)



(2)



3.5.4 Non-Collagen-Protein-Bestimmung (NCP) im Herzmuskelgewebe

Pathologisch verändertes Muskelgewebe, - z. B. eines Herzmuskels durch Ischämie -, enthält nicht nur Muskelzellen, sondern auch Bindegewebe.

Bei der von *Lilienthal et al.* (66) entwickelten Methode werden die laugeunlöslichen Bestandteile (z.B. Kollagen) durch alkalische Hydrolyse vom reinen Zellprotein getrennt. Dieses kollagenfreie Protein (NCP) wurde in der vorliegenden Arbeit als Referenzsystem verwendet; Sämtliche ermittelten Konzentrationen wurden darauf bezogen.

1951 entwickelten *Lowry et al.* (73) eine spezifische Methode zur Eiweißbestimmung. Nach Zugabe eines Kupfer-Reagenz bildet sich ein Eiweiß-Kupfer-Komplex, der nach Zugabe von Folin's Reagenz durch Farbänderung sichtbar wird. Dieser Farbumschlag wird spectrophotometrisch gemessen.

Nach diesen beiden Methoden wurde die Bestimmung des kollagenfreien Proteins vorgenommen:

25 µl Muskelhomogenat mit 25 µl zugesetztem Aqua dest. sowie 100 µl fortlaufend 1:1 verdünntem Rinderserum-Albumin-Standard der Konzentrationen 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625 g/l (aus Stammlösung: 2,5 g/l) wurden mit 500 µl 0,05N NaOH 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinlösung wurde 2 Minuten bei 12000 g zentrifugiert und das Pellet mit Aqua dest. auf 1000 µl aufgefüllt.

Für die Doppelbestimmung wurden je 2x 100 µl der Probe, der Standardlösung und des Null-Wertes (nur Aqua dest.) mit 1000 µl Lösung 3 versetzt (siehe Tabelle 3.5.4 unter 3.5.8.2) und für 10 Minuten geschüttelt. Nach Zugabe von 100 µl Lösung 4 (siehe Tabelle 3.5.4 unter 3.5.8.2) wurde die Mischung nochmals 30 Minuten geschüttelt. Danach erfolgte die Messung der Extinktion in Halbmikro-Küvetten bei 578nm am Beckman Spectralphotometer und die Berechnung der Konzentration beim Vergleich mit der Standardkurve.

3.5.5 Bestimmung der freien Fettsäuren (FFS) im Plasma

Die Bestimmung der FFS erfolgte nach der kolorimetrischen Micro-Methode von *Novak* (85):

Je 100 μl der Probe (Li-Heparin-Plasma, vorher 1 Minute bei 12000 g zentrifugiert) und der fortlaufend 1:1 verdünnten Standard-Lösung der Konzentrationen 1; 0,5; 0,25; 0,125 mmol/l (aus Stammlösung: Heptadecansäure 2 $\mu\text{mol/l}$) wurden in Glasröhrchen pipettiert, mit Stickstoff abgeblasen und der entstandene Niederschlag mit 100 μl Aqua dest. gelöst.

Für die Doppelbestimmung wurden je 2x 100 μl der Probe, der Standardlösung und des Null-Wertes (nur Aqua dest.) mit 500 μl Dole`s Reagenz (siehe Tabelle 3.5.5 unter 3.5.8.2) versetzt, gemischt und 10 Minuten im Eisbad gekühlt.

Nach Zugabe von je 500 μl Hexan und 1000 μl Aqua dest. wurde die Probe 10 Minuten bei 4 °C in einer Kühlzentrifuge bei einer Umdrehung von 2500g zentrifugiert.

Von den nun getrennten Phasen wurde die obere, flüssige, abpipettiert und das verbliebene Pellet mit Stickstoff getrocknet. Nach Zusatz von 1000 μl Chloroform/Heptan 1:1 und 500 μl Kobalt-Reagenzlösung (siehe Tabelle 3.5.5 unter 3.5.8.2) wurde 3 Minuten vorsichtig gemischt und erneut 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abpipettiert und verworfen.

Das Pellet wurde mit 1000 μl Indikator versetzt, gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Bestimmung erfolgte durch Messung der Extinktion bei 500 nm am Beckman Spektralphotometer.

3.5.6 Bestimmung von β -Hydroxybutyrat (β -OH-B) im Plasma

Die Bestimmung von β -OH-B erfolgte mit Hilfe einer enzymatisch-fluorimetrischen Mikro-Methode (93):

Je 2x 100 μ l der Probe (Li-Heparin-Plasma, eisgekühlt) sowie der fortlaufend 1:1 verdünnten Standard-Lösung der Konzentrationen 10; 5; 2,5; 1,25; 0,675 mmol/l (aus Stammlösung: DL- β -Hydroxybuttersäure Na-Salz 10mmol/l) und des Null-Wertes (nur Aqua dest.) wurden zur Doppelbestimmung verwendet und mit 500 μ l ZnSO₄ und 500 μ l Ba(OH)₂ versetzt und gemischt. Nach Zugabe von 200 μ l Aqua dest. wurde die Mischung 2 Minuten zentrifugiert (12000 g). Vom Überstand wurden 500 μ l in Plastikröhrchen abpipettiert, mit 200 μ l Reaktionsmix (siehe Tabelle 3.5.6 unter 3.5.8.2) versetzt und 100 Minuten bei 22°C im Wasserbad inkubiert.

Nach Zugabe von 1000 μ l NaOH/EDTA-Puffer erfolgte die sofortige Messung am Fluorimeter in Quarzküvetten.

3.5.7 Bestimmung weiterer Stoffwechselfparameter

Alle übrigen Stoffwechselfparameter wie Laktat, Glukose und Kreatinin wurden vom Zentrallabor des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen mit konventionellen Routine-Methoden bestimmt.

3.5.8 Materialien und Geräte

3.5.8.1 Kommerzielle Reagenzien und Hersteller

<i>Boehringer, Mannheim, Deutschland:</i>	Acetyl-Coenzym A (101907) ATP-Bioluminescence Assay Kit CLS II (1699695) β -Hydroxy-Butyrat-Dehydrogenase (127833) Carnitin-Acetyltransferase (103241) NAD (127302)
<i>Fluka, Buchs, Schweiz:</i>	Na-Tetrathionat (72030)
<i>Kalensee, Gießen:</i>	Pasteurpipetten 150mm
<i>Merck, Darmstadt:</i>	α -Nitroso-Betanaphtol (2755), Ba(OH) ₂ (1737), Chloroform (2432), CuSO ₄ , EDTA (944), Ethanol, Folin-Ciocalteus, HCl, HClO ₄ 70-72%, Heptan (4366), Hexan (4367), Isopropanol (984), Kobalt (2536), KOH, K ₂ SO ₄ (5151), NaOH-Plätzchen (314), Na ₂ SO ₄ (6649), Natriumcarbonat, Natrium-Tartrat, Rinderserum-Albumin, Schwefelsäure 1N, Triäthanolamin (8379), Tris-Puffer (8382), ZnSO ₄ (8883), HPLC-Wasser
<i>New England Nuclear, Boston, USA:</i>	¹⁴ C-Acetyl-Coenzym A
<i>Sigma, St. Louis, USA:</i>	Adenosin 5`diphosphat (A 6521), Äthanol (32205), DL- β -Hydroxy-Butyrat-Standard (9526)

Dowex 2X 4-800, HEPES-Puffer,
Heptadecansäure (3500), Kreatinphosphat (6502),
Kreatinphosphokinase 3500 units (3755),
L-Carnitin (C 7518), MgCl (8622),
Octanyl-Carnitin, Palmitoyl-Carnitin,
Tricine-Puffer (9784)

Zinsser, Frankfurt, Deutschland: Szintillationsgefäße
Quicksafe A Szintillationsflüssigkeit (1008000)

3.5.8.2 Eigenständig hergestellte Reagenzien

Tabelle 3.5.2: Zusammensetzung der Lösungen für die Carnitin-Bestimmung:

HEPES-Puffer „nach Hydrolyse“:	35,74 g HEPES 1,5M 4,6 g EDTA 0,25M auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen und mit NaOH auf pH von 7,4 neutralisieren
HEPES-Puffer „Cocktail“:	17 g HEPES 0,75M 2,34 g EDTA 0,125M auf 100 ml mit Aqua dest. auffüllen und mit NaOH auf pH von 7,4 neutralisieren
Carnitin-Cocktail:	24,5 mg Na-Tetrathionat 0,8 mg Acetyl-CoA 6 ml Aqua dest. 2 ml HEPES-Puffer „Cocktail“ 1 μCi ^{14}C -Acetyl-CoA

Ionenaustauscher:	1000 g DOWEX 2X 4-800, über Nacht in 2000 ml Aqua dest. quellen lassen. Wässrigen Überstand mit Wasserstrahlpumpe absaugen. Ionenaustauscher mit 40 g 0,5N NaOH/2000 ml Aqua dest. mischen, Überstand absaugen, mit Aqua dest. mischen. Ionenaustauscher mit 580 ml 25% HCl/2000 ml Aqua dest. mischen. Ionenaustauscher in einen Porzellanrundfilter füllen, solange Aqua dest. durchlaufen lassen, bis $H_2O > pH$ 4,0 anzeigt.
Säulen:	Pasteurpipetten mit Glasschneider abschneiden; mit Glaswatte füllen. Ionenaustauscher bis ca. 3,5 cm Höhe einpipettieren.

Tabelle 3.5.4: Zusammensetzung der Lösungen für die NCP-Bestimmung:

Lösung 1:	2% Na_2CO_3 in 0,1N NaOH
Lösung 2:	0,5% $CuSO_4 \times 5 H_2O$ 1% Na-tartrat in 100 ml Aqua dest. 5 ml 5% KOH
Lösung 3 (Kupfer-Reagenz):	50 ml Lösung 1 und 1 ml Lösung 2
Lösung 4:	1 ml Folin`s Phenol-Reagenz und 1,8 ml Aqua dest.

Tabelle 3.5.5: Zusammensetzung der Lösungen für die FFS-Bestimmung:

Dole`s Reagenz:	40 vol. Isopropanol 10 vol. Hexan 1 vol. H ₂ SO ₄
Kobalt-Reagenzlösung:	Kobalt 0,6 g Na ₂ SO ₄ gesättigte Lösung (30 °C) 10 ml Triäthanolamin 1,35 ml K ₂ SO ₄ gesättigte Lösung (30 °C) 7 ml
Indikator:	0,05% Alpha-Nitroso Betanaphtol in absolutem Äthanol

Tabelle 3.5.6: Zusammensetzung der Lösungen für die β-OH-B Bestimmung:

Reaktionsmix:	1 ml Tris-Puffer (0,5M pH 8,8) 2,7 mg NAD 50 µl β-OH-Dehydrogenase
NaOH/EDTA:	NaOH 30mM 1,2g EDTA 0,3mM 87,68 mg in 1000 ml Aqua dest. lösen

3.5.8.3 Geräte

<i>Allgemein:</i>	Eppendorfgefäße 2 ml Eppendorf-Rotationsmischer 3300 pH-Meter CG 840 (Schott, Mainz) Vortexer Wasserbad Zentrifuge EBA 12 (Hettich, Tuttlingen)
-------------------	--

Bestimmung Carnitin:

Flüssigkeitszintillationszähler (Wallace 1409,
Berthold, Bad Wildbad)
Homogenisierungsröhrchen S 345 2 ml
(B. Braun, Melsungen)
Kühlzentrifuge Micro 24-48R (Hettich, Tuttlingen)
Mettler H 542 Präzisionswaage
Potter-Elvehjem-Homogenisator (B. Braun,
Melsungen)

Bestimmung ATP:

Aqua bidest. (HPLC-Wasser)
AutoLumat LB 953 (Berthold, Bad Wildbad)
Chirurgische Pinzette
Eis und Eiselemente
Meßröhrchen 5 ml 75x12mm (Sarstedt 55476)
Objektträger
Skalpell mit Klinge Nr. 21
Sterilisierte Eppendorffgefäße und Pipettenspitzen

Bestimmung NCP/FFS:

Filter 578nm (NCP)
Filter 500nm (FFS)
Spectralphotometer Beckman

Bestimmung β -OH:

Fluorimeter Perkin Elmer (Überlingen)
Emission 460nm
Quarzküvetten

3.6 Statistische Auswertung

Die numerischen Daten wurden, sofern nicht anders beschrieben, als Mittelwert \pm Standardfehler (SE) angegeben. Zur Analyse kontinuierlicher numerischer Variablen diente im Falle einer Normalverteilung der t-Test für verbundene und nichtverbundene Stichproben.

Als nichtparametrische Tests wurden der Wilcoxon-Test für verbundene und der Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben eingesetzt.

Für wiederholte Messungen von Plasmaproben wurde die Varianzanalyse (ANOVA) mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfachvergleiche durchgeführt. Der statistische Zusammenhang zweier Variablen wurde mit Hilfe der einfachen linearen Regression untersucht.

Es wurden nur zweiseitige Tests verwendet; p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistikprogramme Statgraphics[®] (Manugistics inc., Rockville, MD, USA), Prism 2[®] (GraphPad, San Diego, CA, USA) (79, 109) und Systat[®] (Version 9.0, SPSS, 1999).

4. ERGEBNISSE

4.1 Klinische Grundlagen

In Tabelle 3.1 (Kapitel 3) sind die klinischen Daten sowie die intraoperativen Parameter dargestellt, die den Carnitinstoffwechsel beeinflussen können.

Besonders zu beachten sind die Ischämie-Zeit, die Bypasszeit, die Gesamtdauer der extrakorporalen Zirkulation und die präoperative Sauerstoffsättigung, die sich in einer vorangehenden Untersuchung als Risikofaktoren für einen erhöhten myokardialen Carnitinverlust erwiesen haben (61).

Verum- und Placebogruppe unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich demographischer und klinischer Basisdaten sowie hämodynamischer Ausgangssituation, so dass ein homogener Stichprobenumfang vorliegt.

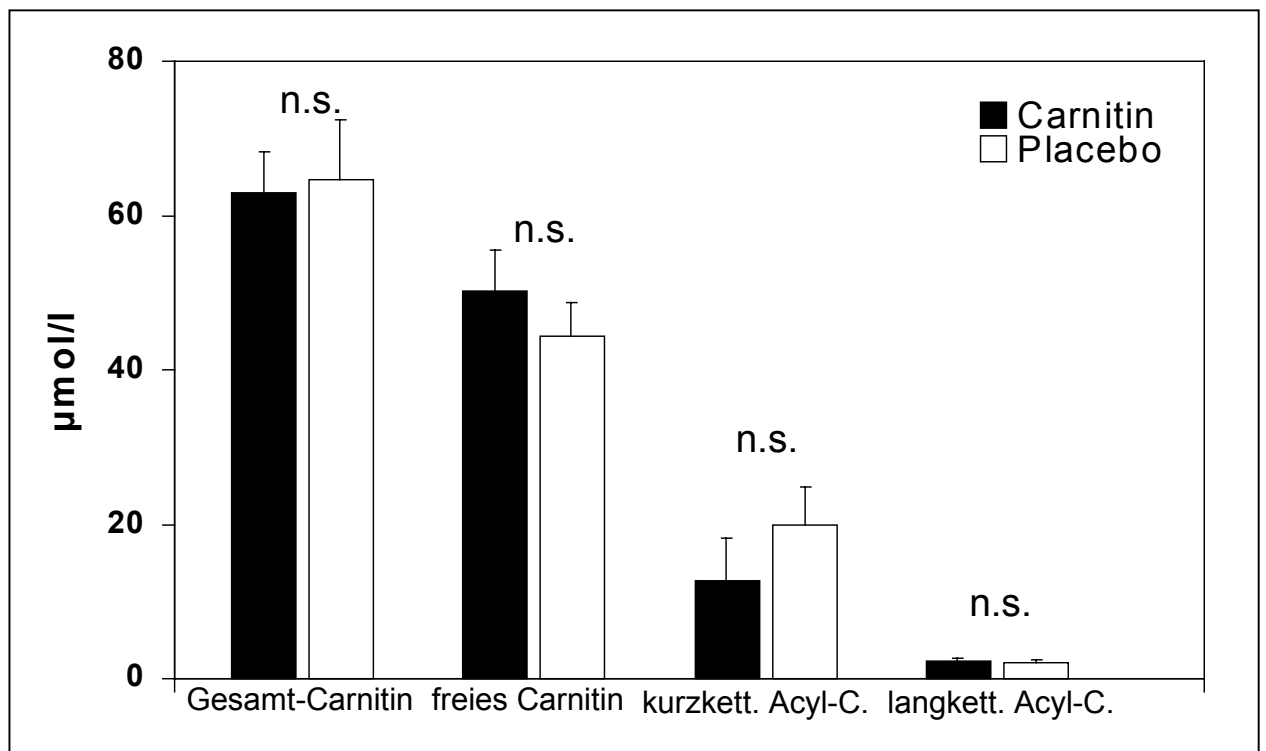
4.2 Systemischer Carnitinstatus

4.2.1 Präoperativer systemischer Carnitinstatus

Die Ausgangswerte für Gesamtcarnitin, freies Carnitin sowie kurz- und langkettige Acylcarnitine im Plasma vor Beginn der Substitution sind in der Abbildung 4.2.1a dargestellt.

Die Verum- und Placebogruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich ihrer Carnitinkonzentrationen.

Abbildung 4.2.1a: Carnitin-Plasmakonzentrationen vor Beginn der Substitution
(Zeitpunkt A)



Dargestellt sind Mittelwert \pm SE.

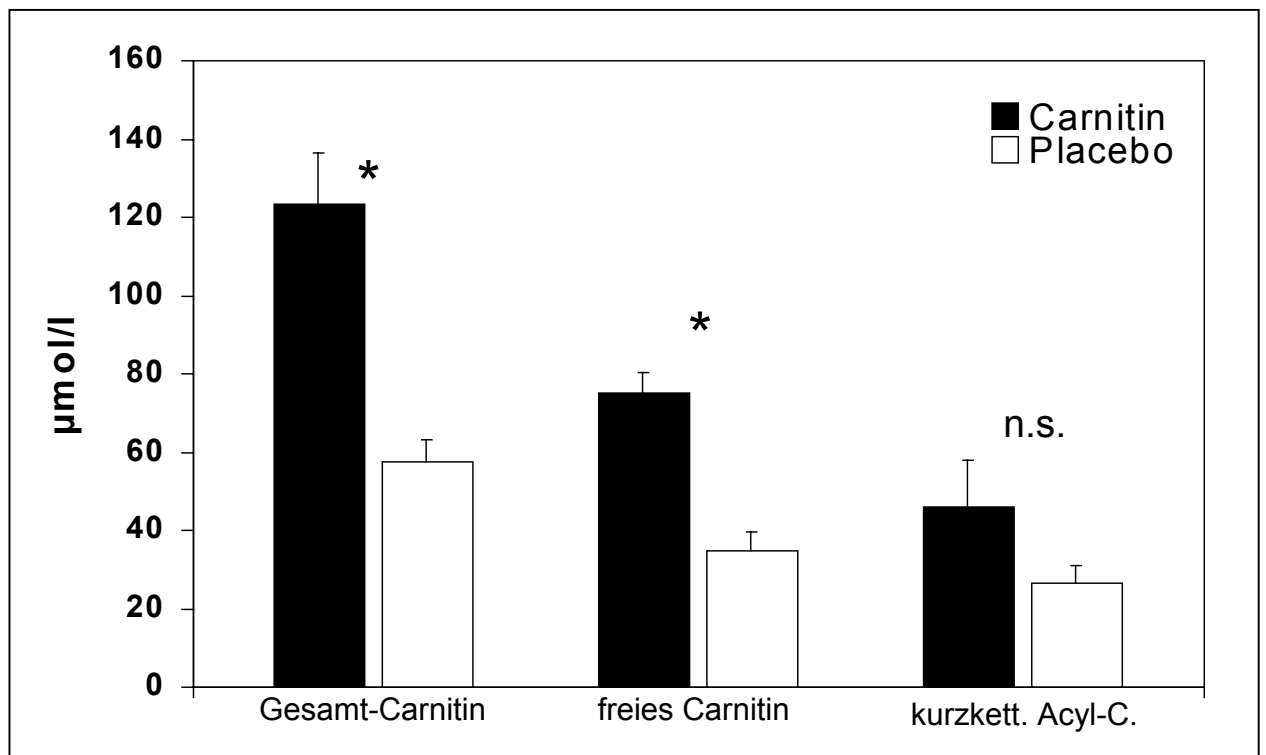
n.s.: nicht signifikant

Der statistische Gruppenvergleich erfolgte mittels t-Test.

Die orale Gabe von L-Carnitin führte schon zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) der Plasmaspiegel an Gesamt-Carnitin, freiem Carnitin und kurzkettigen Acylcarnitinen (siehe Tabelle 4.2.1).

Im Gruppenvergleich Verum versus Placebo konnten signifikante Unterschiede in den Plasmakonzentrationen an Gesamt-Carnitin und freiem Carnitin festgestellt werden (siehe Abbildung 4.2.1b).

Abbildung 4.2.1b: Carnitin-Plasmakonzentrationen nach oraler Substitution
(Zeitpunkt B)



Dargestellt sind Mittelwert \pm SE.

n.s.: nicht signifikant

*Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (t-Test) sind mit einem * ($p < 0,05$) markiert.*

Tabelle 4.2.1: Vergleich der Carnitinfraktionen im Plasma in der Verum- und Placebo-Gruppe vor und nach oraler Substitution
(Angabe des Mittelwertes \pm SE in $\mu\text{mol/l}$)

	Verum	Placebo
TC vor oraler Gabe	62,88 \pm 5,35	64,7 \pm 7,65
TC nach oraler Gabe	123,55 \pm 12,72	57,5 \pm 5,62
FC vor oraler Gabe	50,17 \pm 5,32	44,3 \pm 4,94
FC nach oraler Gabe	75,24 \pm 5,22	34,89 \pm 4,73
SCAC vor oraler Gabe	12,7 \pm 5,5	19,9 \pm 4,87
SCAC nach oraler Gabe	46,03 \pm 11,89	26,65 \pm 4,37
LCAC vor oraler Gabe	2,28 \pm 0,33	2,14 \pm 0,32

*TC: Gesamt-Carnitin; FC: freies Carnitin; SCAC: kurzkettige Acylcarnitine;
LCAC: langkettige Acylcarnitine*

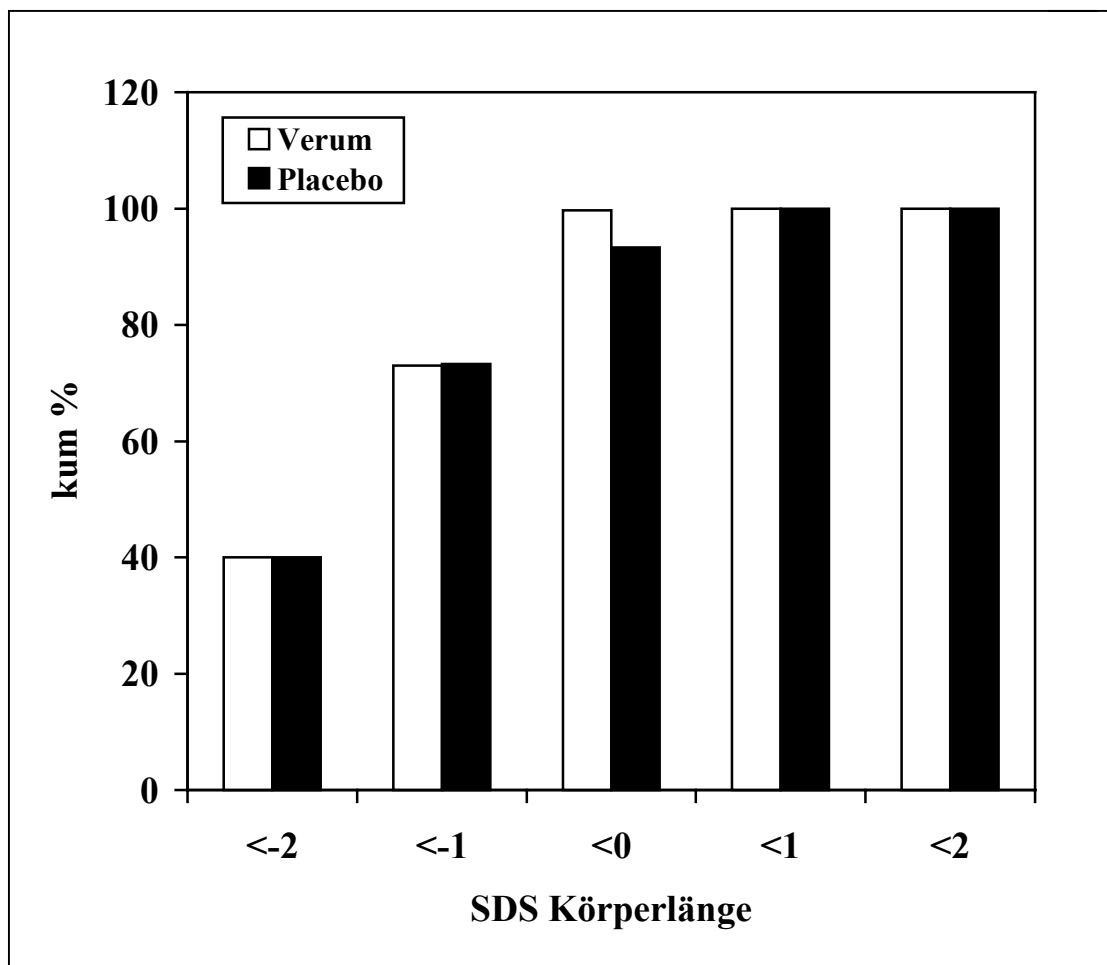
<i>Normwerte (in $\mu\text{mol/l}$):</i>	<i>Alter</i>	<i>TC</i>	<i>FC</i>
<i>(MW \pm 1 SD)</i>			
<i>(Ref 117)</i>	1.Tag	36,4 \pm 10,8	20,1 \pm 6,7
	2 - 7 Tage	25,2 \pm 4,1	14,9 \pm 3,0
	8 - 28 Tage	36,7 \pm 10,5	27,6 \pm 9,7
	29 Tage - 1 Jahr	47,6 \pm 7,7	35,5 \pm 6,5
<i>(Ref 127)</i>	<i>altersunabhängig</i>	<i>LCAC</i>	<i>SCAC</i>
		< 5	5 - 10

4.2.1.1 Beurteilung des präoperativen systemischen Carnitinstatus

Mit Hilfe der Standardabweichungsscores der Körperlänge (Längen-SDS) und des Körpergewichts (Gewichts-SDS) erfolgte die Beurteilung des körperlichen Entwicklungsstatus der Kinder (98).

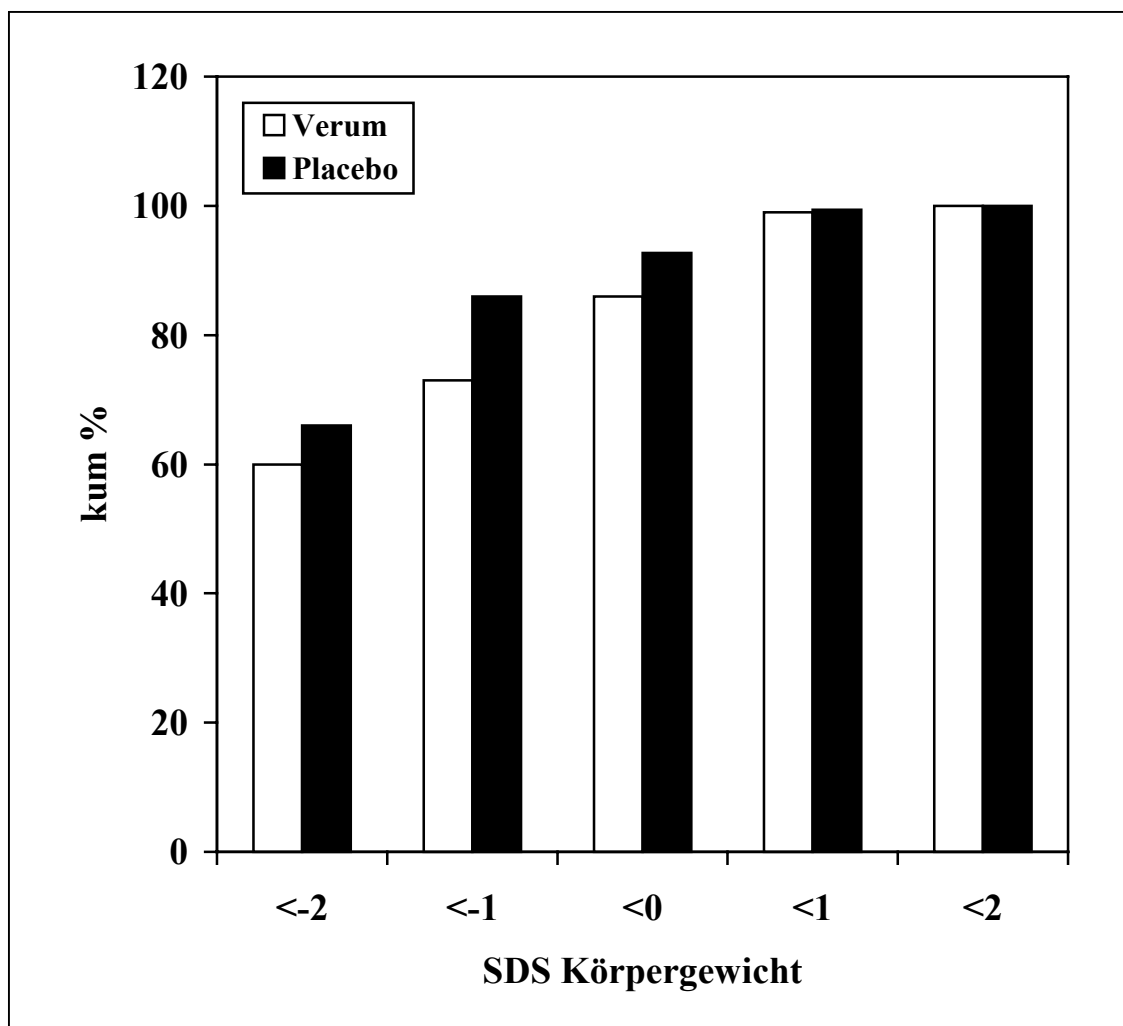
Die Abbildungen 4.2.1.1a und 4.2.1.1b zeigen die kumulative Häufigkeitsverteilung für die untersuchten Kinder.

Abbildung 4.2.1.1a: Kumulative Prozentwerte der Standardabweichungsscores der Körperlänge in der Verum- und Placebogruppe



Beim Längen-SDS zeigten in der Verumgruppe 40 % der Kinder einen Wert < -2 , welches einem Unterschreiten der 3. Perzentile entspricht. Bei 99,7 % der Patienten fand sich ein Längen-SDS < 0 , was einem Wert unterhalb der 50. Perzentile entspricht. Bei den Kindern der Placebogruppe zeigte sich ebenfalls in 40 % ein Wert < -2 , ein Längen-SDS < 0 fand sich in 93,3 %; somit kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen.

Abbildung 4.2.1.1b: Kumulative Prozentwerte der Standardabweichungsscores des Körpergewichtes in der Verum- und Placebogruppe



Beim Gewichts-SDS zeigten in der Verumgruppe 60 % der Kinder einen Wert < -2 , welches einem Unterschreiten der 3. Perzentile entspricht. Bei 86 % der Patienten fand sich ein Gewichts-SDS < 0 .

Die Kinder in der Placebogruppe zeigten in 66 % einen Wert < -2 , ein Gewichts-SDS < 0 fand sich in 92,7 %; somit war auch hier ein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen nicht nachweisbar.

Auch die Ausgangswerte (zum Zeitpunkt A) für gesamtes und freies Carnitin wurden anhand der Standardabweichungsscores beurteilt, weil die Normwerte für Carnitin altersabhängig sind. Dies ist in den folgenden Abbildungen 4.2.1.1c und 4.2.1.1d dargestellt; auch hier konnte kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen festgestellt werden.

Abbildung 4.2.1.1c: Standardabweichungsscore des Gesamtcarnitins im Plasma

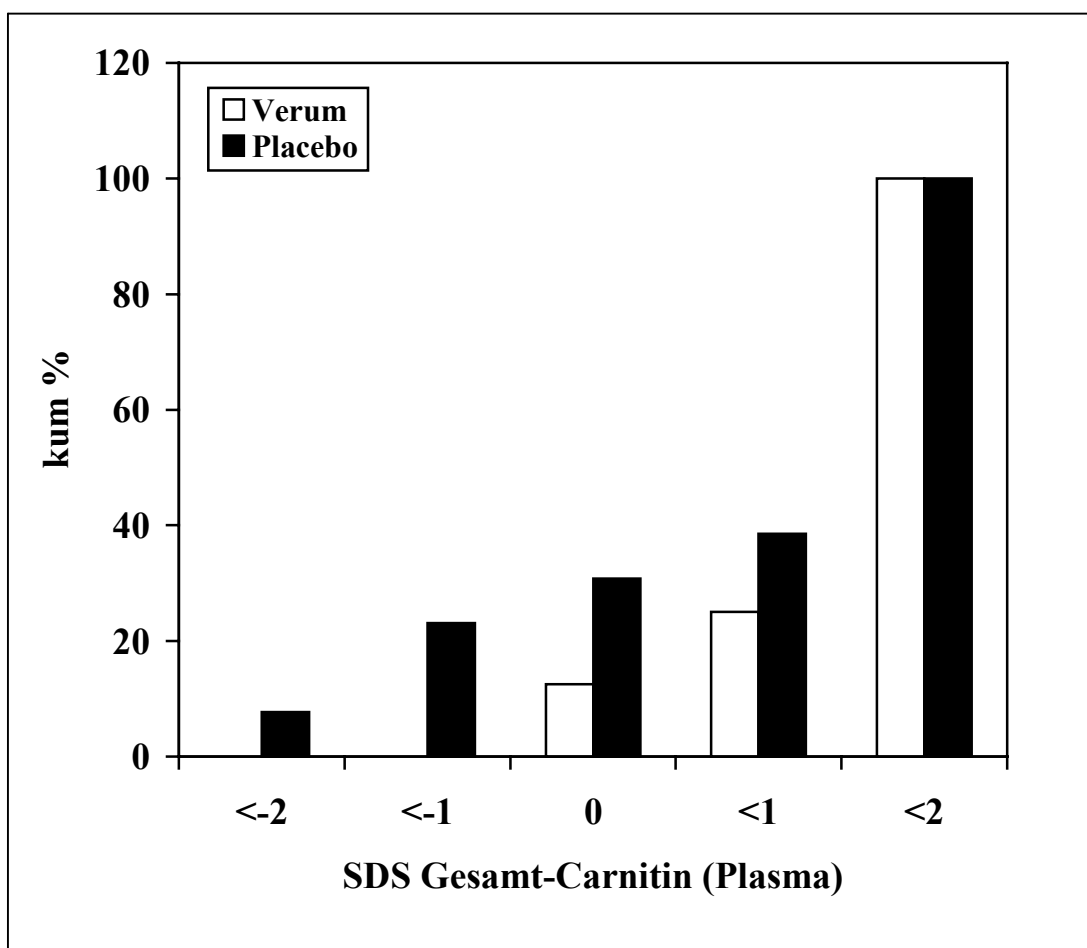
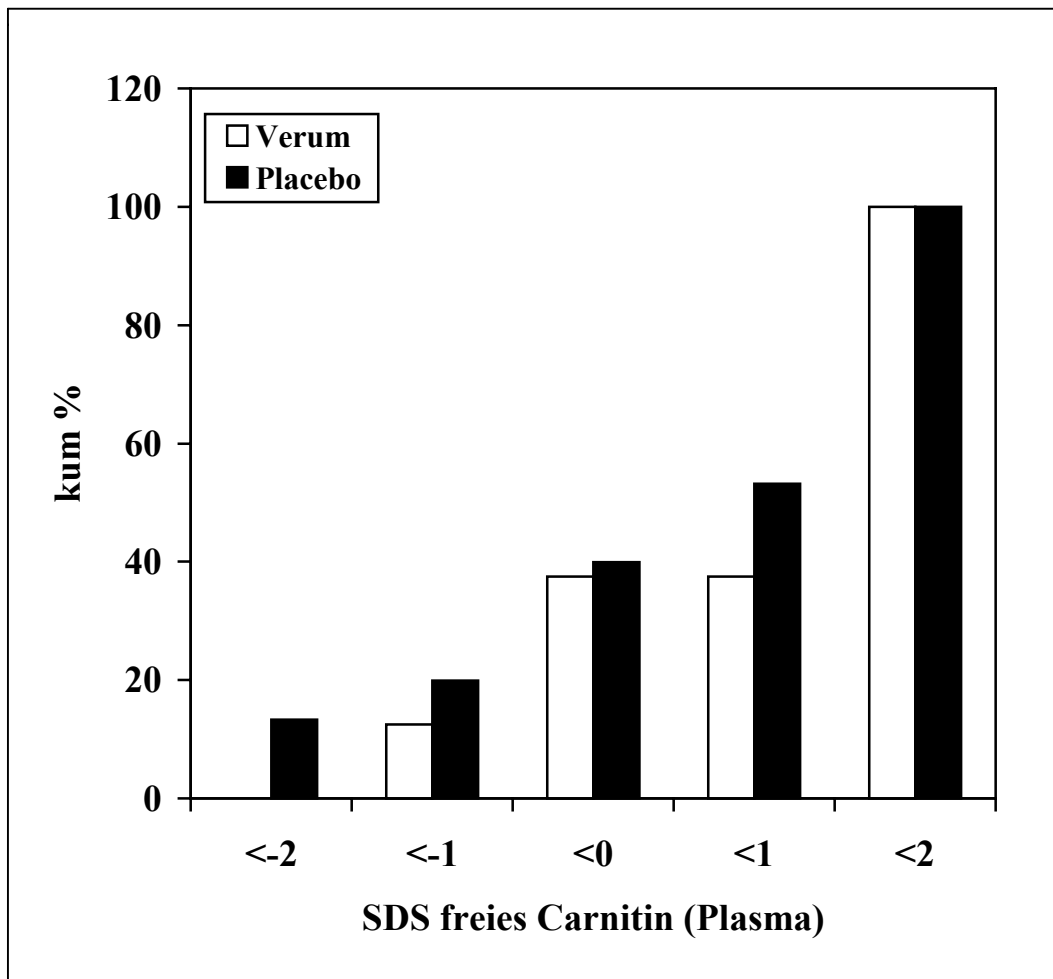


Abbildung 4.2.1.1d: Standardabweichungsscore des freien Carnitins im Plasma



In der Verumgruppe zeigten 12,5 % der Kinder einen SDS-Wert für Gesamtcarnitin im Plasma < 0.

Bei den Kindern der Placebogruppe fand sich in 30,8 % ein Wert < 0.

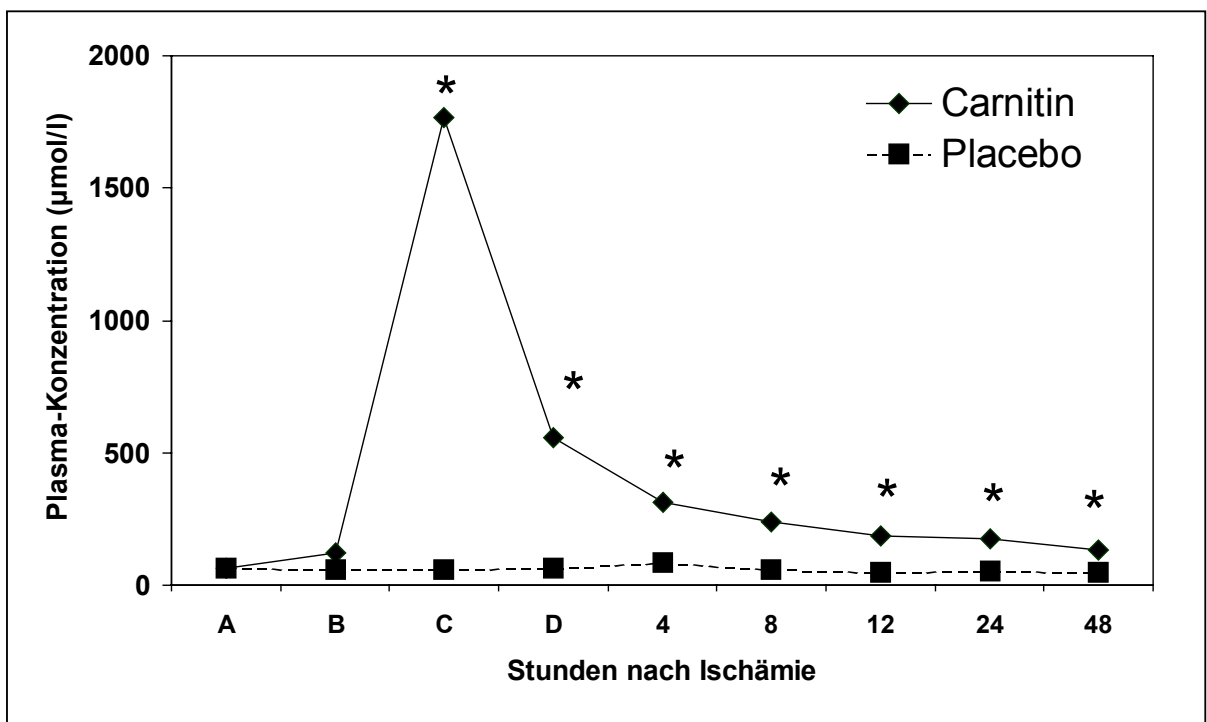
Für das freie Carnitin waren ähnliche Ergebnisse zu beobachten mit 37,5 % < 0 in der Verumgruppe und 39,9 % < 0 in der Placebogruppe.

Die Verteilungskurven zeigten eine Verschiebung zu höheren Werten hin.

4.2.2 Perioperativer systemischer Carnitinstatus

Die intravenöse Supplementierung von L-Carnitin führte zu einem signifikanten Anstieg aller Carnitinfractionen in der Verumgruppe im Vergleich zum Ausgangswert vor Substitution und im Vergleich zu den einzelnen Zeitpunkten der Placebogruppe. Die erhöhten Werte blieben auch postoperativ durchgehend bestehen.

Abbildung 4.2.2a: Gesamtcarnitin im Plasma mit bzw. ohne perioperative Carnitinsubstitution



Dargestellt sind zur besseren Übersichtlichkeit nur die Mittelwerte.

*Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Messpunkten sind mit einem * ($p < 0,05$) markiert.*

Der statistische Gruppen-Vergleich erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfach-Vergleiche.

A: vor Beginn der Substitution

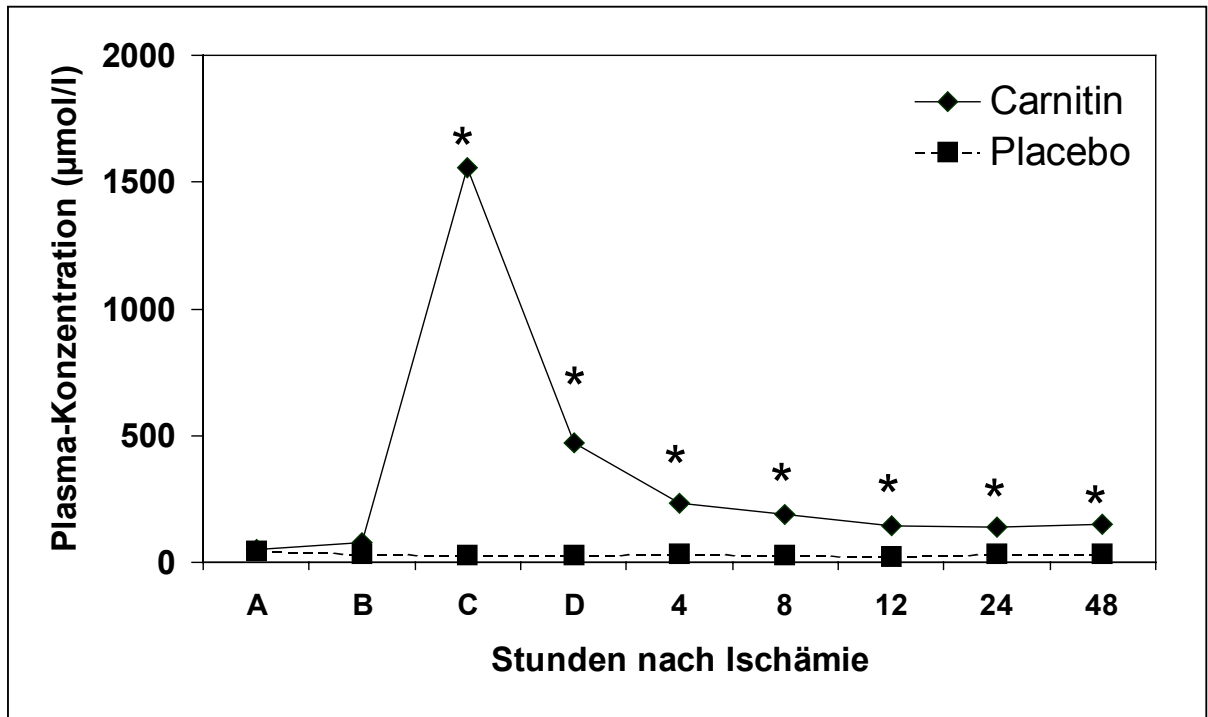
B: nach oraler Substitution

C: nach intraoperativer iv-Gabe

D: am Ende der Ischämie

4, 8, 12, 24, 48: Zeitpunkt in Stunden nach Ischämie

Abbildung 4.2.2b: Freies Carnitin im Plasma mit bzw. ohne perioperative Carnitinsubstitution



Dargestellt sind zur besseren Übersichtlichkeit nur die Mittelwerte.

Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Messpunkten sind mit einem * ($p < 0,05$) markiert.

Der statistische Gruppen-Vergleich erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfach-Vergleiche.

A: vor Beginn der Substitution

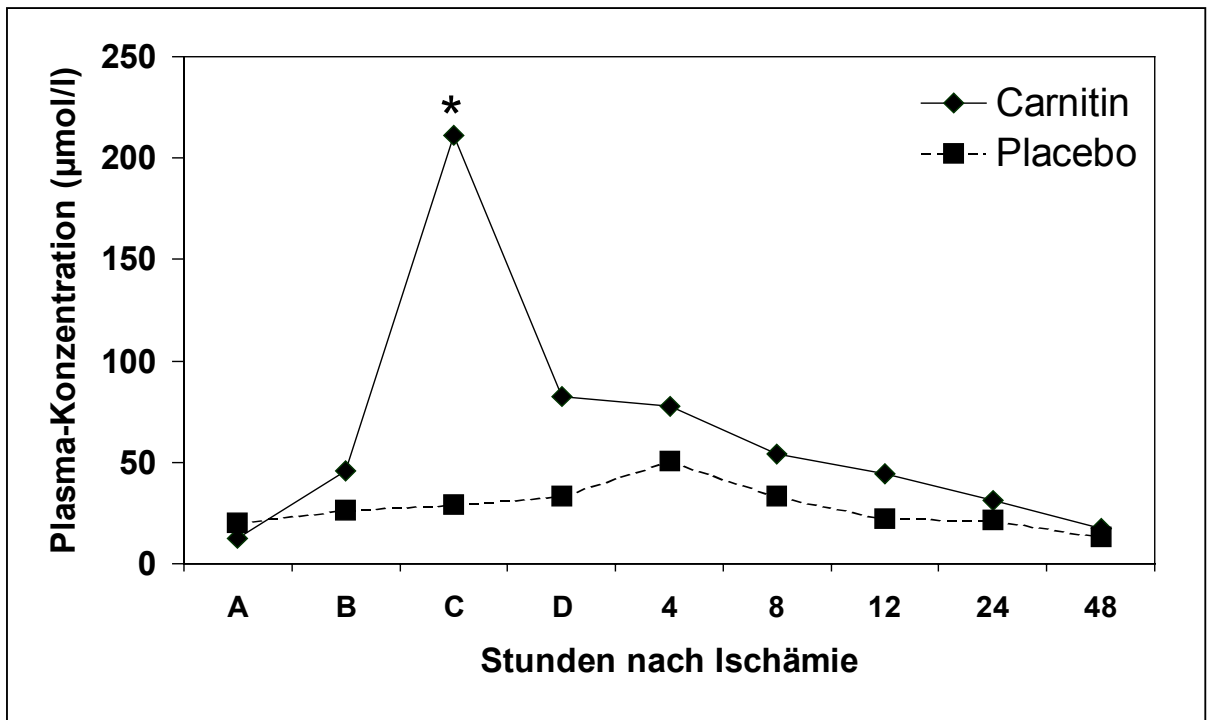
B: nach oraler Substitution

C: nach intraoperativer iv-Gabe

D: am Ende der Ischämie

4, 8, 12, 24, 48: Zeitpunkt in Stunden nach Ischämie

Abbildung 4.2.2c: Kurzkettige Acylcarnitine im Plasma mit bzw. ohne perioperative Carnitinsubstitution



Dargestellt sind zur besseren Übersichtlichkeit nur die Mittelwerte.

*Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Messpunkten sind mit einem * ($p < 0,05$) markiert.*

Der statistische Gruppen-Vergleich erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfach-Vergleiche.

A: vor Beginn der Substitution

B: nach oraler Substitution

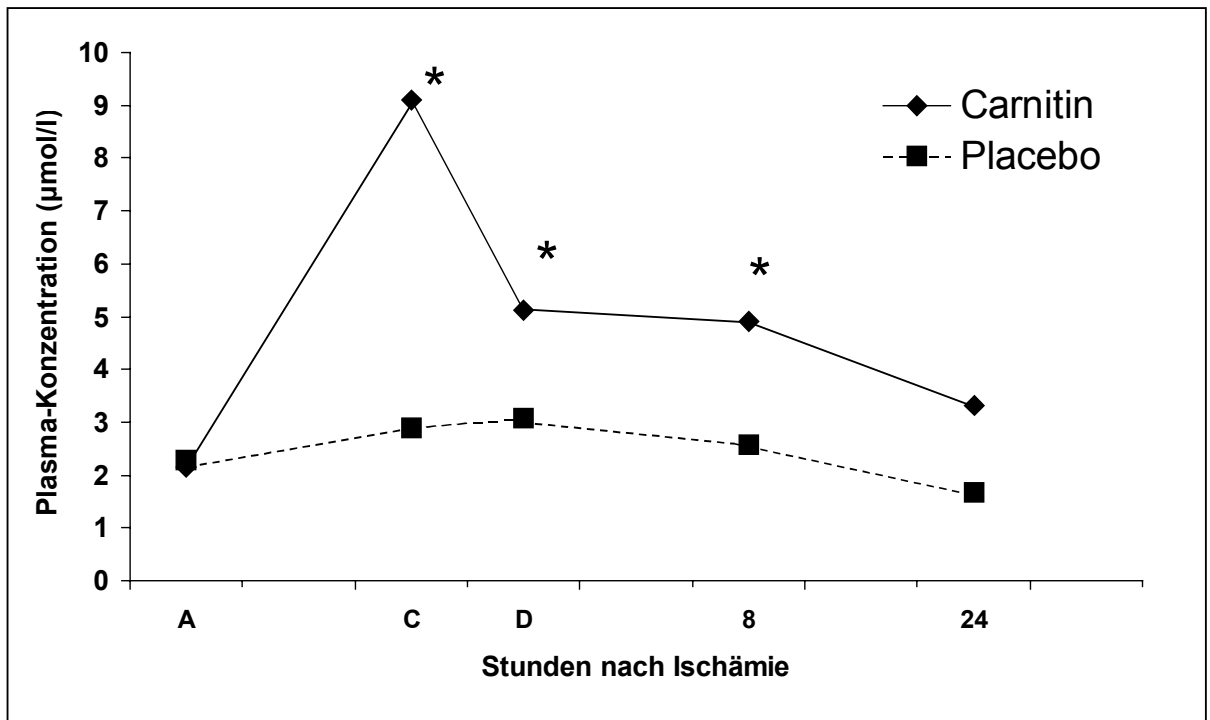
C: nach intraoperativer iv-Gabe

D: am Ende der Ischämie

4, 8, 12, 24, 48: Zeitpunkt in Stunden nach Ischämie

Bei den kurzkettigen Acylcarnitinen konnten zu den Zeitpunkten am Ende der Ischämie bis 48 Stunden nach Ischämie keine signifikanten Unterschiede der Plasmaspiegel im Gruppenvergleich gefunden werden.

Abbildung 4.2.2d: Langkettige Acylcarnitine im Plasma mit bzw. ohne perioperative Carnitinsubstitution



Dargestellt sind zur besseren Übersichtlichkeit nur die Mittelwerte.

*Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu den einzelnen Messpunkten sind mit einem * ($p < 0,05$) markiert.*

Der statistische Gruppen-Vergleich erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfach-Vergleiche.

A: vor Beginn der Substitution

C: nach intraoperativer iv-Gabe

D: am Ende der Ischämie

8, 24: Zeitpunkt in Stunden nach Ischämie

Tabelle 4.2.2: Vergleich von TC und FC im Plasma in der Verum- und Placebo-Gruppe während der intravenösen Substitution
(Angabe des Mittelwertes \pm SE in $\mu\text{mol/l}$)

	Verum	Placebo
TC nach intraop iv-Gabe	1768,23 \pm 194,74*	59,04 \pm 5,71
TC am Ende der Ischämie	555,63 \pm 51,07*	61,72 \pm 5,96
TC 4 h nach Ischämie	311,84 \pm 21,95*	84,21 \pm 7,57
TC 8 h nach Ischämie	241,01 \pm 32,59*	60,36 \pm 6,8
TC 12 h nach Ischämie	185,33 \pm 26,94*	46,48 \pm 5,99
TC 24 h nach Ischämie	172,57 \pm 21,89*	55,23 \pm 5,24
TC 48 h nach Ischämie	133,62 \pm 19,86*	45,81 \pm 6,78
FC nach intraop iv-Gabe	1556,95 \pm 205,12*	30,29 \pm 2,46
FC am Ende der Ischämie	473,03 \pm 41,17*	28,58 \pm 3,012
FC 4 h nach Ischämie	233,98 \pm 22,43*	33,82 \pm 3,58
FC 8 h nach Ischämie	186,85 \pm 22,6*	27,35 \pm 2,32
FC 12 h nach Ischämie	141,31 \pm 20,17*	24,32 \pm 2,66
FC 24 h nach Ischämie	141,24 \pm 20,94*	33,91 \pm 3,24
FC 48 h nach Ischämie	115,18 \pm 17,62*	32,66 \pm 5,51

Die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind mit einem

** ($p < 0,05$) markiert.*

Tabelle 4.2.2: Vergleich von SCAC und LCAC im Plasma in der Verum- und Placebo-Gruppe während der intravenösen Substitution
(Angabe des Mittelwertes \pm SE in $\mu\text{mol/l}$)

	Verum	Placebo
SCAC nach iv-Bolus	211,27 \pm 75,65*	28,76 \pm 4,57
SCAC am Ende der Ischämie	82,6 \pm 28,8	33,15 \pm 5,2
SCAC 4 h nach Ischämie	77,85 \pm 16,45	50,39 \pm 7,75
SCAC 8 h nach Ischämie	54,17 \pm 15,16	33,01 \pm 5,98
SCAC 12 h nach Ischämie	44,02 \pm 9,62	22,16 \pm 4,82
SCAC 24 h nach Ischämie	31,33 \pm 5,86	21,33 \pm 3,65
SCAC 48 h nach Ischämie	17,11 \pm 4,55	13,15 \pm 2,79
LCAC nach iv-Bolus	9,09 \pm 1,37*	2,9 \pm 0,71
LCAC am Ende der Ischämie	5,31 \pm 0,54*	3,08 \pm 0,56
LCAC 4 h nach Ischämie	n.a.	n.a.
LCAC 8 h nach Ischämie	4,92 \pm 0,57*	2,56 \pm 0,54
LCAC 12 h nach Ischämie	n.a.	n.a.
LCAC 24 h nach Ischämie	3,32 \pm 0,28	1,68 \pm 0,36
LCAC 48 h nach Ischämie	n.a.	n.a.

(Anmerkung: n.a.: nicht ausgewertet; aufgrund eines technischen Fehlers in der Analytik konnten diese Werte nicht in die Auswertung miteinbezogen werden).

Die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind mit einem

** ($p < 0,05$) markiert.*

4.3 Myokardialer Carnitinstatus

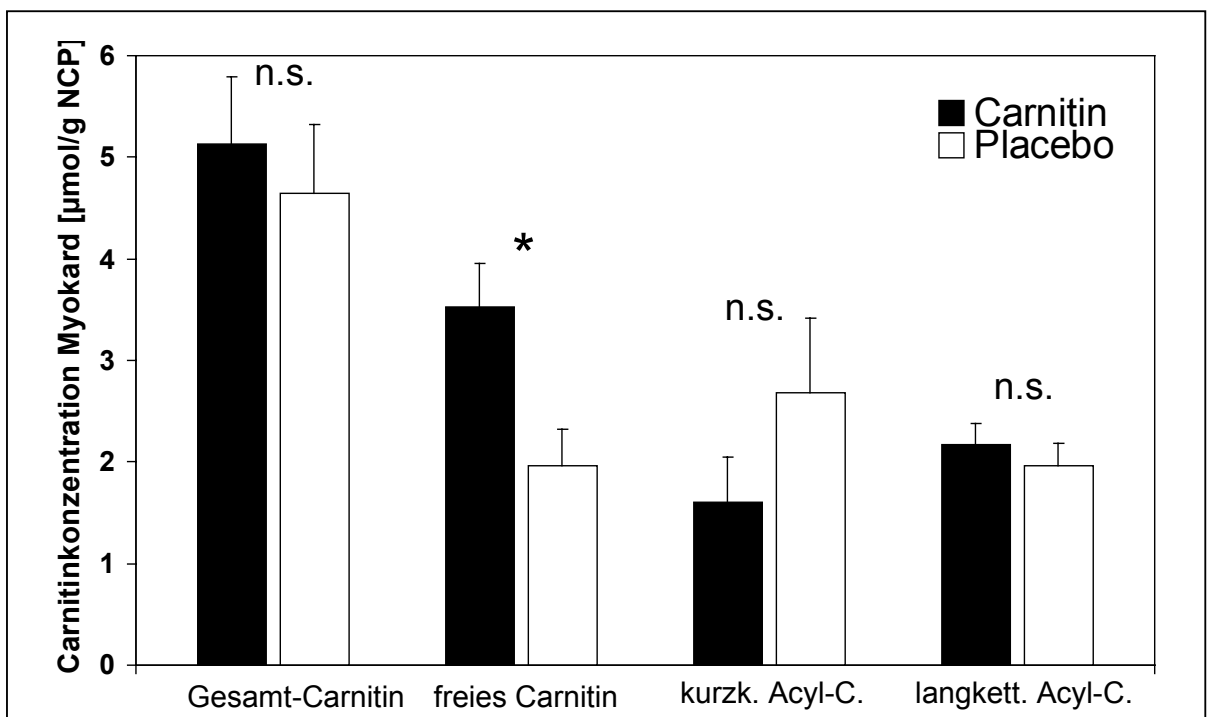
4.3.1 Präischämischer myokardialer Carnitinstatus

Der Einfluss der präischämischen L-Carnitin-Gabe auf den Gehalt an Carnitin und energiereichen Phosphaten im rechtsatrialen Myokard vor intraoperativer Ischämie ist in den Abbildungen 4.3.1a und 4.3.1b dargestellt.

Vor Ischämie überwiegen in der Placebogruppe kurzkettige Acylcarnitine, demgegenüber besteht in der Verum-Gruppe ein Verhältnis zugunsten des freien Carnitins. Es findet sich ein signifikanter Unterschied der Konzentration an freiem Carnitin in der supplementierten im Vergleich zur nicht-supplementierten Gruppe.

Bei den energiereichen Phosphaten liegen in der Verumgruppe die Konzentrationen für ATP und CP deutlich über denen der Placebogruppe; hierfür ist ein statistischer Trend ($p < 0,1$) zu erkennen.

Abbildung 4.3.1a: Vergleich von Gesamt-Carnitin, freiem Carnitin, kurz- und langkettigen Acylcarnitinen in der Placebo- bzw. Verumgruppe vor Ischämie

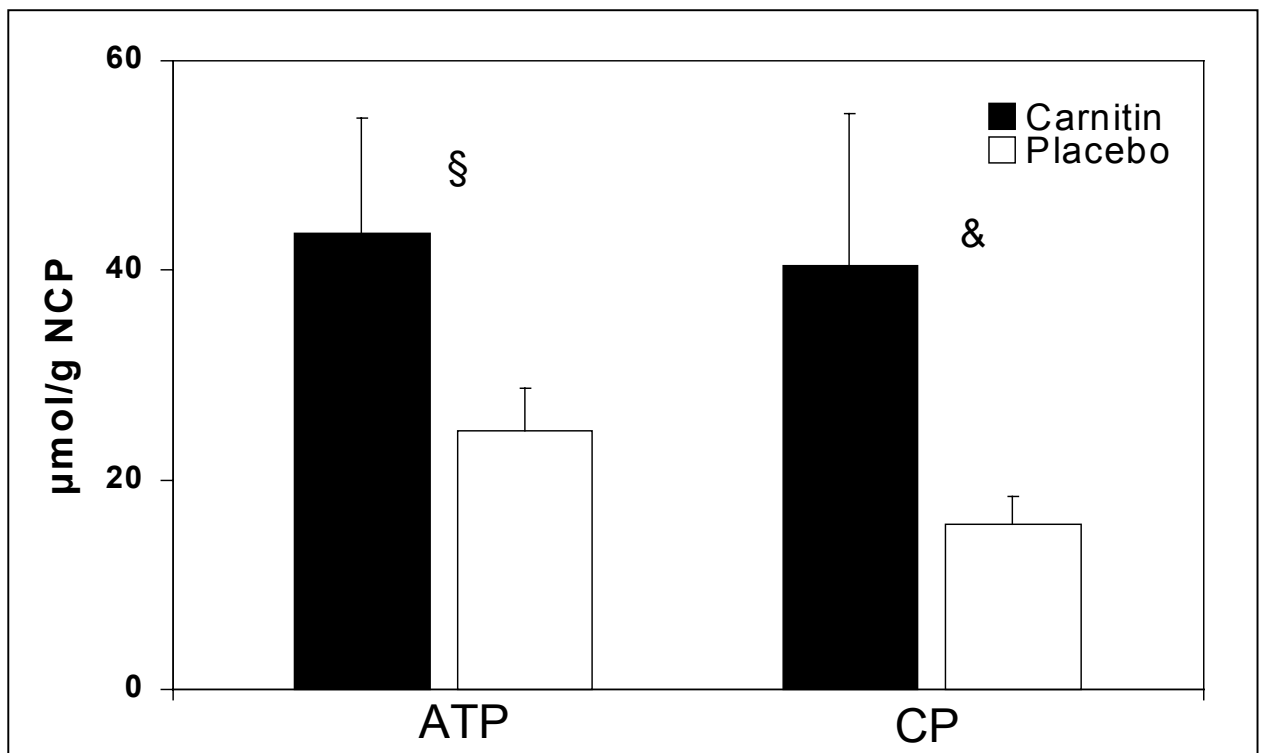


Dargestellt sind Mittelwert \pm SE.

n.s.: nicht signifikant

Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (t-Test) sind mit einem * ($p < 0,05$) markiert.

Abbildung 4.3.1b: Vergleich von ATP und Kreatinphosphat (CP) in der Placebo- bzw. Verumgruppe vor Ischämie



Dargestellt sind Mittelwert \pm SE.

Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgte mittels t-Test.

§: $p < 0,08$

&: $p < 0,06$

Tabelle 4.3.1: Vergleich von TC, FC, SCAC, LCAC, ATP und CP im Myokard in der Verum- und Placebo-Gruppe vor Ischämie
(Angabe des Mittelwertes \pm SE in $\mu\text{mol/g NCP}$)

	Verum	Placebo
TC	5,13 \pm 0,66	4,64 \pm 0,68
FC	3,52 \pm 0,44*	1,96 \pm 0,36
SCAC	1,61 \pm 0,43	2,68 \pm 0,73
LCAC	2,17 \pm 0,21	1,96 \pm 0,22
ATP	43,38 \pm 10,93	24,66 \pm 4,08
CP	40,49 \pm 14,48	15,75 \pm 2,72

Die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind mit einem

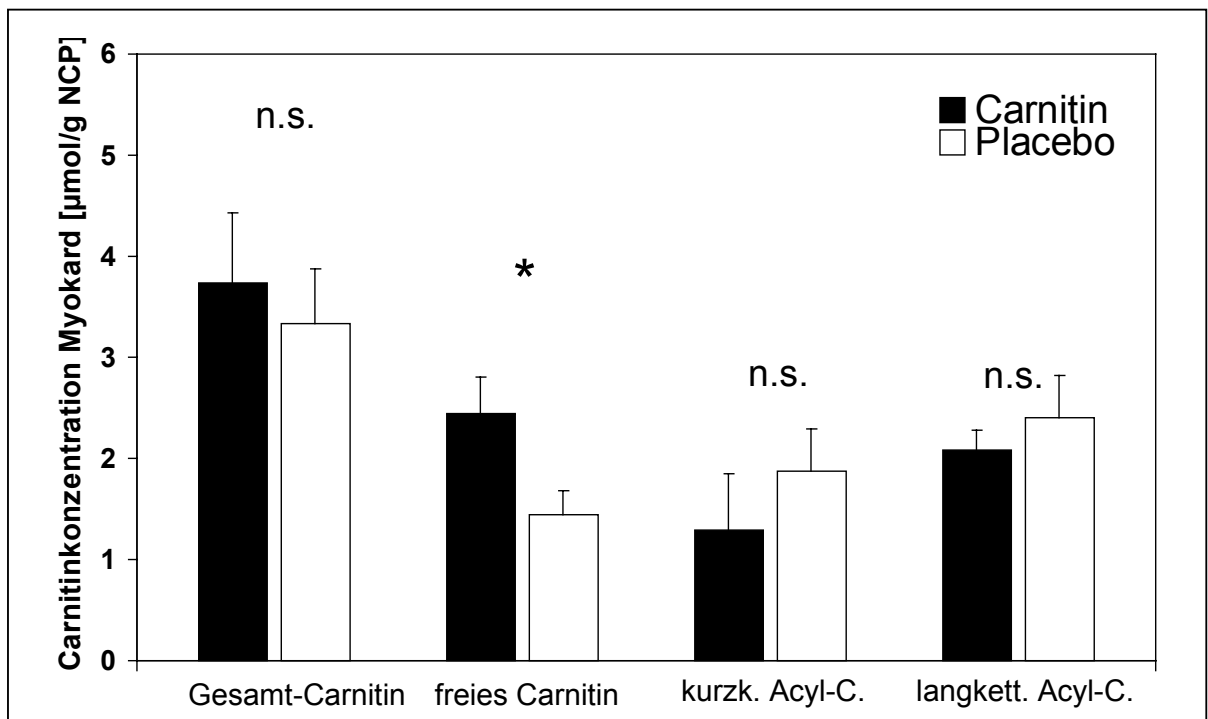
** ($p < 0,05$) markiert.*

4.3.2 Postischämischer myokardialer Carnitinstatus

Nach intraoperativer Ischämie fanden sich signifikante Unterschiede im myokardialen Carnitin-Gehalt zwischen beiden Gruppen.

Die bereits vor Ischämie erhöhten Werte an freiem Carnitin in der substituierten Gruppe blieben auch nach Ischämie signifikant erhöht bestehen.

Abbildung 4.3.2a: Vergleich von Gesamt-Carnitin, freiem Carnitin, kurz- und langkettigen Acylcarnitinen in der Placebo- bzw. Verumgruppe nach Ischämie



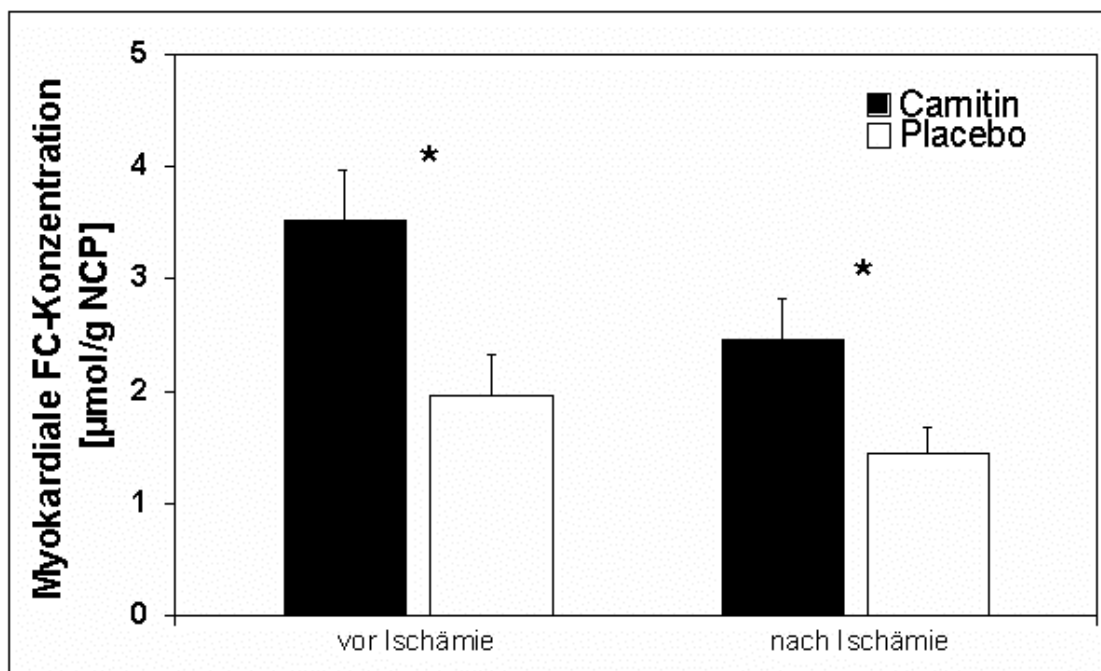
Dargestellt sind Mittelwert \pm SE.

n.s.: nicht signifikant

*Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (t-Test) sind mit einem * ($p < 0,05$) markiert.*

Nach Ischämie fielen zwar auch in der Verum-Gruppe die myokardialen Spiegel an freiem Carnitin ab, blieben jedoch sogar oberhalb der präischämischen Spiegel nicht-supplementierter Patienten.

Abbildung 4.3.2b: Myokardiale Konzentrationen an freiem Carnitin prä- und postischämisch in der Verum- und Placebogruppe



Dargestellt sind Mittelwert \pm SE.

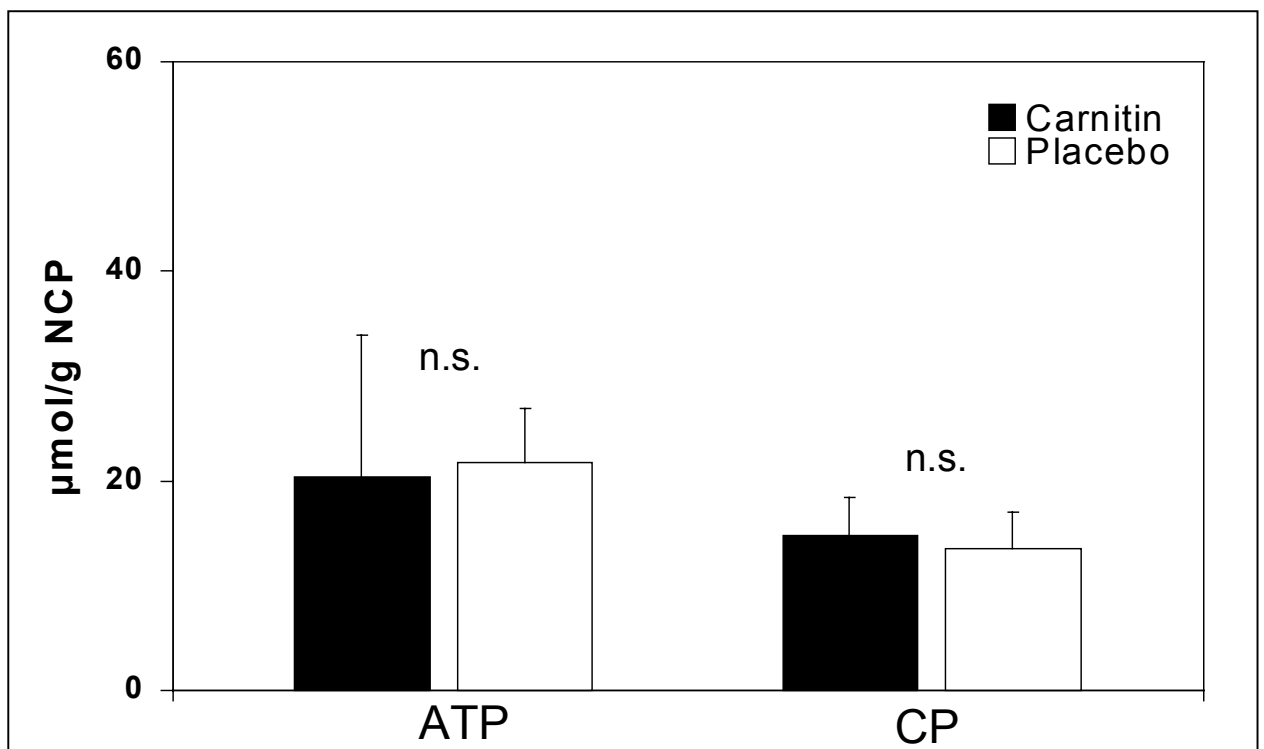
*Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen (t-Test) sind mit einem * ($p < 0,05$) markiert.*

Die Konzentrationen der kurzkettigen Acylcarnitine zeigten nach Ischämie keine signifikanten Unterschiede, wenn auch die Spiegel in der substituierten Gruppe niedriger lagen.

Der Gehalt an langkettigen Acylcarnitinen nahm in der Verumgruppe nur geringfügig ab, während in der Placebogruppe eine nicht signifikante Zunahme zu verzeichnen war. In der supplementierten Gruppe fand sich eine deutlich höhere FC/LCAC-Ratio von 1,17 im Vergleich zu 0,60 in der Placebogruppe.

In der Verumgruppe fielen die Spiegel der energiereichen Phosphate ATP und CP auf unter die Hälfte des Ausgangsniveaus vor Ischämie ab und erreichten damit diejenigen der nicht-substituierten Patienten. Die ATP- und CP-Konzentrationen der Placebogruppe zeigten keine Unterschiede im Vergleich vor und nach Ischämie.

Abbildung 4.3.2c: Vergleich von ATP und Kreatinphosphat (CP) in der Placebo- bzw. Verumgruppe nach Ischämie



Dargestellt sind Mittelwert \pm SE.

n.s.: nicht signifikant

Der statistische Vergleich der Gruppen erfolgte mittels t-Test.

Tabelle 4.3.2: Vergleich von TC, FC, SCAC, LCAC, ATP und CP im Myokard in der Verum- und Placebo-Gruppe nach Ischämie
(Angabe des Mittelwertes \pm SE in $\mu\text{mol/g NCP}$)

	Verum	Placebo
TC	3,74 \pm 0,69	3,33 \pm 0,55
FC	2,45 \pm 0,36*	1,45 \pm 0,23
SCAC	1,29 \pm 0,56	1,88 \pm 0,41
LCAC	2,09 \pm 0,19	2,4 \pm 0,42
ATP	20,31 \pm 4,75	21,70 \pm 5,25
CP	14,83 \pm 3,53	13,63 \pm 3,43

Die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind mit einem

* ($p < 0,05$) markiert.

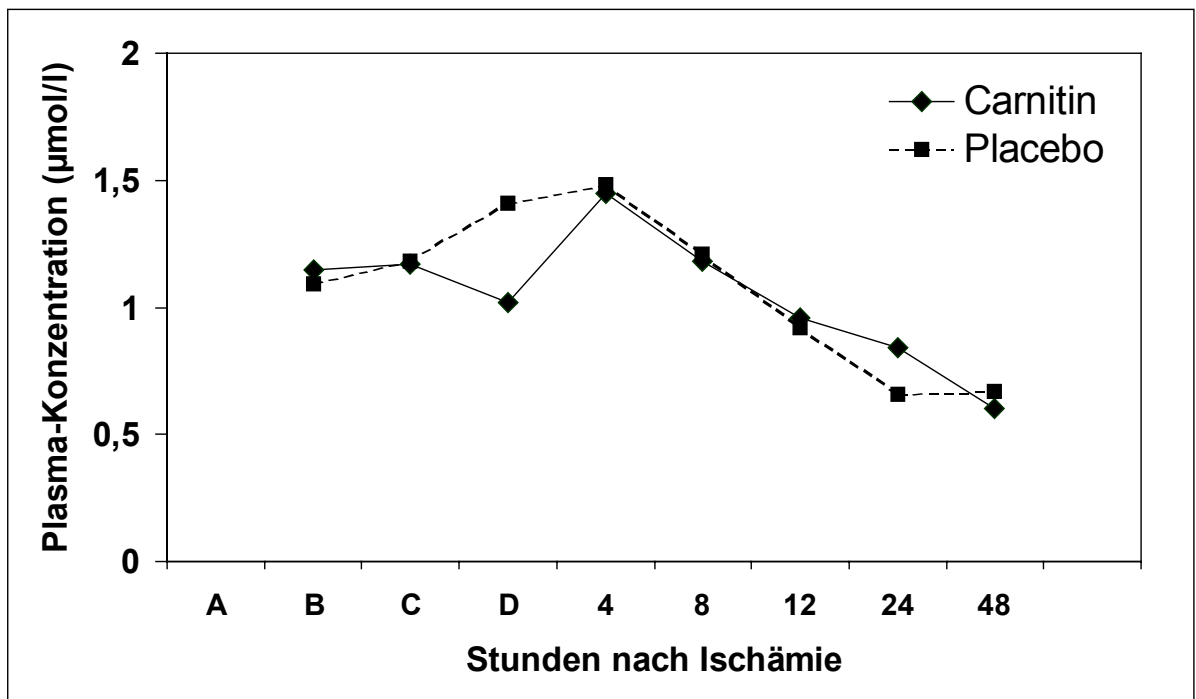
4.4 Verlauf der Intermediärmetabolite

Die Konzentrationen der freien Fettsäuren zeigten signifikante Änderungen im Verlauf der perioperativen Phase sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe, wenn man die Gruppen einzeln betrachtet. Zunächst kam es zu einem signifikanten Anstieg bis zum Zeitpunkt 4 Stunden nach Ischämie als Ausdruck der verminderten β -Oxidation, danach folgte ein signifikanter Abfall der freien Fettsäuren zum Zeitpunkt 48 Stunden bis unter das Ausgangsniveau hinaus (ANOVA, $p < 0,05$).

Kein signifikanter Unterschied konnte zu den genannten einzelnen Zeitpunkten gefunden werden, wenn man die Konzentrationen der freien Fettsäuren beider Gruppen miteinander vergleicht.

Gleichwohl finden sich in der substituierten Gruppe meist niedrigere Spiegel an freien Fettsäuren; vor allem am Ende der Ischämie ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen.

Abbildung 4.4a: Freie Fettsäuren im Plasma mit bzw. ohne perioperative Carnitin-Supplementierung



Dargestellt sind zur besseren Übersichtlichkeit nur die Mittelwerte.

Der statistische Gruppen-Vergleich erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfach-Vergleiche.

A: vor Beginn der Substitution

B: nach oraler Substitution

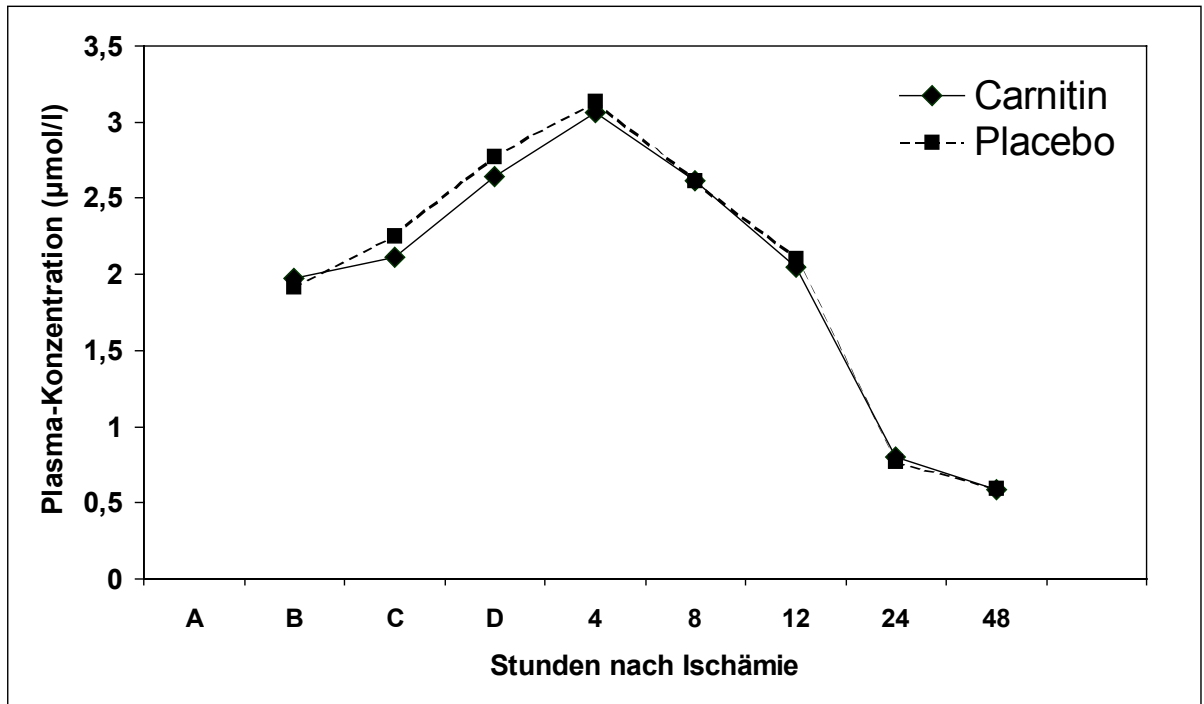
C: nach intraoperativer iv-Gabe

D: am Ende der Ischämie

4, 8, 12, 24, 48: Zeitpunkt in Stunden nach Ischämie

Auch die Konzentrationen an β -Hydroxybutyrat zeigten signifikante, gleichsinnige Änderungen im Verlauf der perioperativen Phase, sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe einzeln betrachtet. Auch hier kam es zu einem signifikanten Anstieg bis zu 4 Stunden nach Ischämie als Ausdruck einer gesteigerten Ketogenese und danach zu einem steilen Abfall bis unter das Ausgangsniveau hinaus ($p < 0,05$). Es konnte wiederum kein signifikanter Unterschied zu den einzelnen Zeitpunkten gefunden werden, wenn man die Konzentrationen der beiden Gruppen miteinander vergleicht.

Abbildung 4.4b: β -Hydroxybutyrat im Plasma mit bzw. ohne perioperative Carnitin-Supplementierung



Dargestellt sind zur besseren Übersichtlichkeit nur die Mittelwerte.

Der statistische Gruppen-Vergleich erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfach-Vergleiche.

A: vor Beginn der Substitution

B: nach oraler Substitution

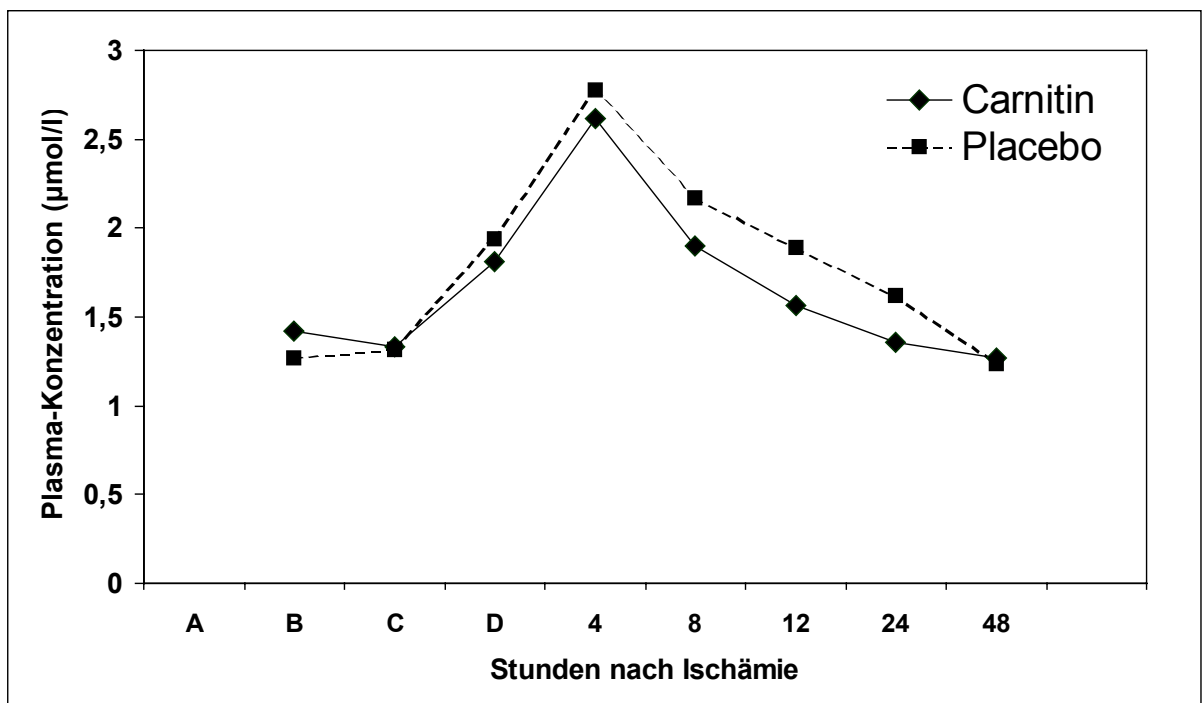
C: nach intraoperativer iv-Gabe

D: am Ende der Ischämie

4, 8, 12, 24, 48: Zeitpunkt in Stunden nach Ischämie

Dieselben Verhältnisse zeigten sich im Verlauf der perioperativen Phase bei den Konzentrationsänderungen von Laktat mit einem Anstieg in der intraoperativen und frühen postoperativen Phase als Zeichen einer Steigerung der anaeroben Glykolyse.

Abbildung 4.4c: Laktat im Plasma mit bzw. ohne perioperative Carnitin-Supplementierung



Dargestellt sind zur besseren Übersichtlichkeit nur die Mittelwerte.

Der statistische Gruppen-Vergleich erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfach-Vergleiche.

Die Zeitpunkte entsprechen denjenigen der vorangehenden Abbildungen.

Tabelle 4.4: Vergleich der Intermediärmetabolite im Plasma in den beiden Gruppen über die perioperative Phase (Angabe des Mittelwertes \pm SE in $\mu\text{mol/l}$)

	Verum	Placebo
FFS nach oraler Gabe	1,15 \pm 0,17	1,09 \pm 0,15
FFS nach intraop iv-Gabe	1,17 \pm 0,2	1,18 \pm 0,16
FFS am Ende der Ischämie	1,02 \pm 0,14	1,41 \pm 0,19
FFS 4 h nach Ischämie	1,45 \pm 0,2	1,48 \pm 0,18
FFS 8 h nach Ischämie	1,18 \pm 0,16	1,21 \pm 0,11
FFS 12 h nach Ischämie	0,96 \pm 0,11	0,92 \pm 0,13
FFS 24 h nach Ischämie	0,84 \pm 0,2	0,66 \pm 0,08
FFS 48 h nach Ischämie	0,6 \pm 0,08	0,67 \pm 0,08
β -OH nach oraler Gabe	1,97 \pm 0,6	1,92 \pm 0,54
β -OH nach intraop iv-Gabe	2,11 \pm 0,4	2,25 \pm 0,43
β -OH am Ende der Ischämie	2,64 \pm 0,56	2,77 \pm 0,42
β -OH 4 h nach Ischämie	3,06 \pm 0,7	3,14 \pm 0,81
β -OH 8 h nach Ischämie	2,62 \pm 0,72	2,62 \pm 0,66
β -OH 12 h nach Ischämie	2,05 \pm 0,51	2,1 \pm 0,56
β -OH 24 h nach Ischämie	0,8 \pm 0,23	0,77 \pm 0,2
β -OH 48 h nach Ischämie	0,59 \pm 0,18	0,6 \pm 0,16
Laktat nach oraler Gabe	1,42 \pm 0,19	1,27 \pm 0,16
Laktat nach intraop iv-Gabe	1,33 \pm 0,15	1,32 \pm 0,18
Laktat am Ende der Ischämie	1,81 \pm 0,18	1,94 \pm 0,23
Laktat 4 h nach Ischämie	2,62 \pm 0,47	2,78 \pm 0,43
Laktat 8 h nach Ischämie	1,9 \pm 0,29	2,17 \pm 0,3
Laktat 12 h nach Ischämie	1,56 \pm 0,15	1,89 \pm 0,22
Laktat 24 h nach Ischämie	1,36 \pm 0,17	1,62 \pm 0,16
Laktat 48 h nach Ischämie	1,27 \pm 0,19	1,24 \pm 0,13

4.5 Postoperativer klinischer Verlauf

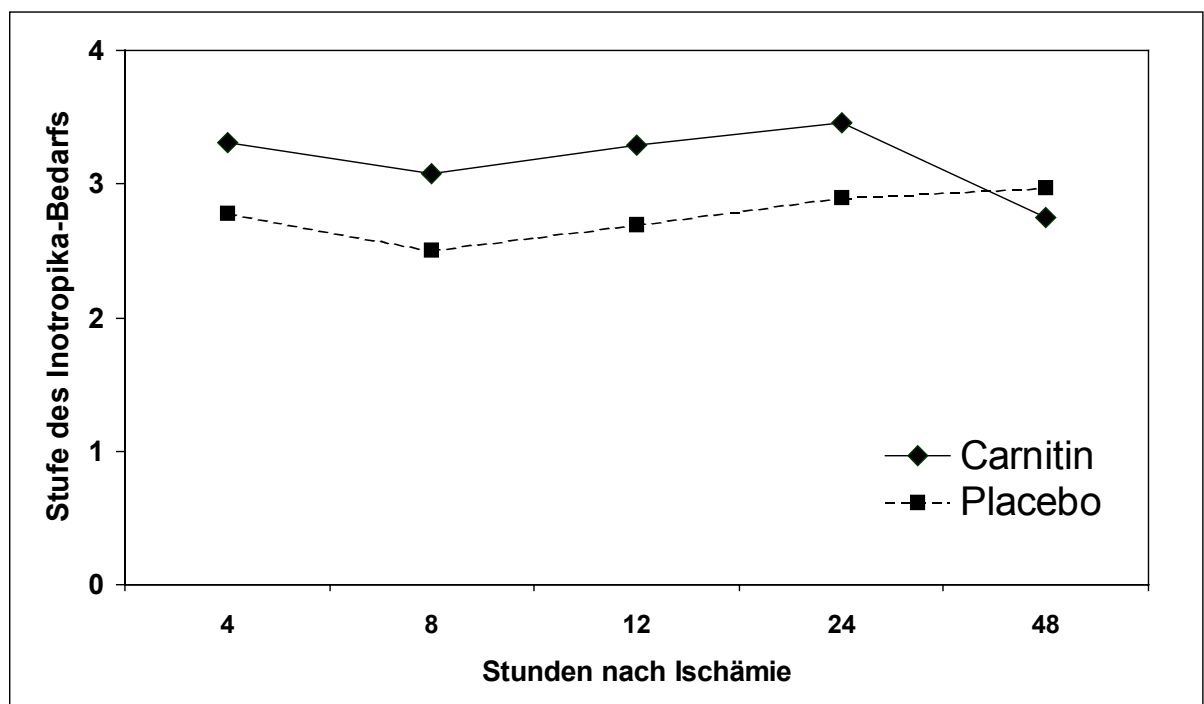
4.5.1 Postoperativer Bedarf an positiv inotropen Medikamenten

Der postoperative Bedarf an positiv inotropen Medikamenten wurde als Parameter gewählt, um einen Einfluss der Carnitinsubstitution auf den klinischen Verlauf zu ermitteln.

Dieser Bedarf wurde mittels eines Scores objektiviert (siehe unter Kap. 3.4.2).

Es wurden keine signifikanten Unterschiede im Bedarf an positiv inotropen Medikamenten zu den einzelnen Zeitpunkten in den beiden Gruppen festgestellt.

Abbildung 4.5.1a: Postoperativer Bedarf an positiv inotropen Medikamenten in dem supplementierten sowie dem nicht-supplementierten Kollektiv



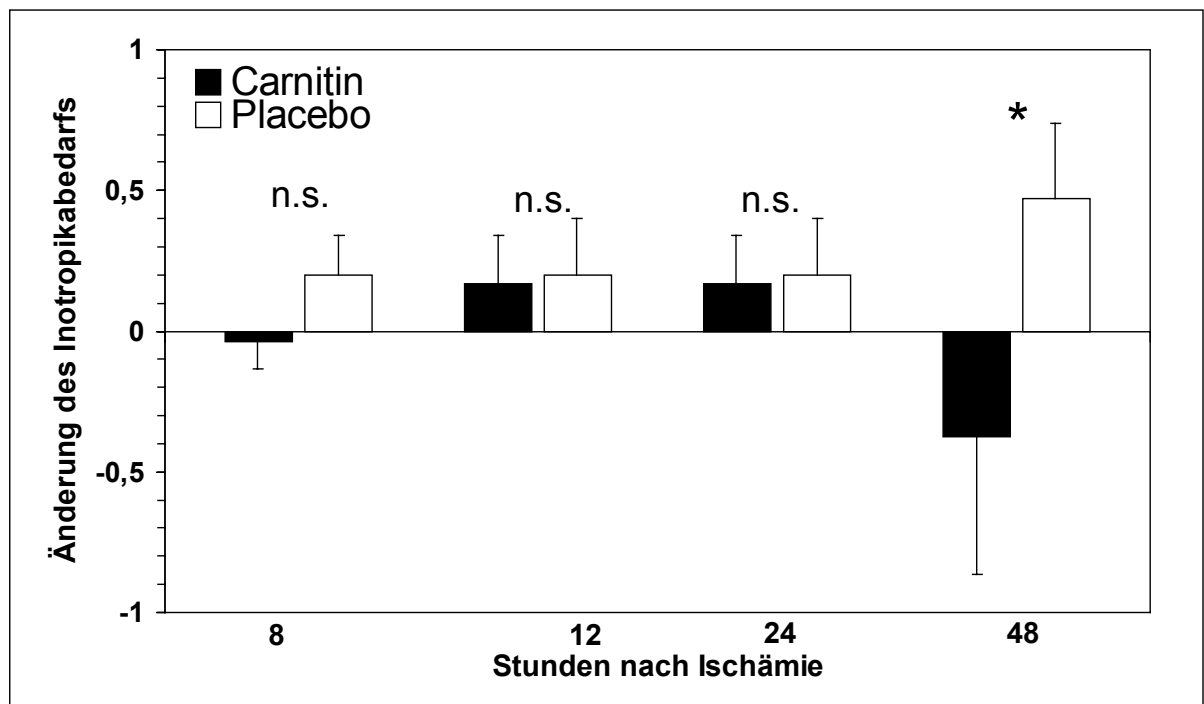
Dargestellt sind zur besseren Übersichtlichkeit nur die Mittelwerte.

Der statistische Gruppen-Vergleich erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfach-Vergleiche.

4, 8, 12, 24, 48: Zeitpunkt in Stunden nach Ischämie

Bezogen auf den Ausgangsbedarf an positiv inotropen Medikamenten vier Stunden nach Ende der Ischämie ergab sich zu dem Zeitpunkt 48 h nach Ende der Ischämie in der Verumgruppe eine signifikante Reduktion des Inotropika-Bedarfes als Zeichen einer schnelleren Rückbildung der Katecholaminpflichtigkeit und damit einer schnelleren Erholung des Myokards.

Abbildung 4.5.1b: Änderung des postoperativen Inotropika-Bedarfes 8 - 48 Stunden nach Ende der Myokard-Ischämie in der Verum- und Placebogruppe



Dargestellt sind Mittelwert ± SE.

n.s.: nicht signifikant

8, 12, 24, 48: Zeitpunkt in Stunden nach Ischämie

*Der statistische Vergleich erfolgte mittels ANOVA mit nachfolgendem Student-Newman-Keuls-Test für Mehrfach-Vergleiche; * : $p < 0,05$.*

Tabelle 4.5.1a: Bedarf an positiv inotropen Medikamenten 4 - 48 h postoperativ in der Verum- und Placebogruppe
(Angabe des Katecholamin-Scores als Mittelwert \pm SE)

	Verum	Placebo
Score-Wert 4 h postoperativ	3,31 \pm 0,43	2,5 \pm 0,38
Score-Wert 8 h postoperativ	3,08 \pm 0,47	2,7 \pm 0,38
Score-Wert 12 h postoperativ	3,29 \pm 0,41	2,7 \pm 0,36
Score-Wert 24 h postoperativ	3,46 \pm 0,45	2,9 \pm 0,35
Score-Wert 48 h postoperativ	2,75 \pm 0,51	2,97 \pm 0,35

Tabelle 4.5.1b: Reduktion des Katecholaminbedarfes 8 - 48 h nach Ende der Ischämie im Vergleich zum Ausgangswert 4 h nach Ende der Ischämie in der Verum- und Placebogruppe

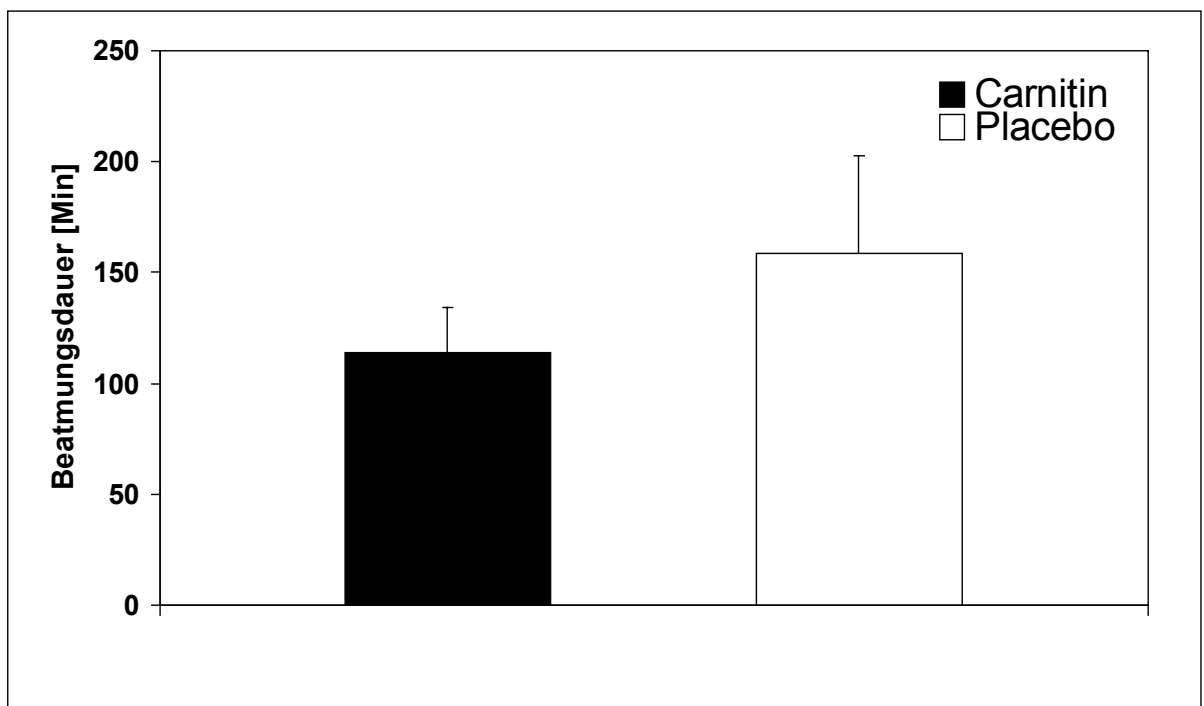
	Verum	Placebo
8 h nach Ischämie-Ende	- 0,04 \pm 0,09	0,2 \pm 0,15
12 h nach Ischämie-Ende	0,17 \pm 0,17	0,2 \pm 0,2
24 h nach Ischämie-Ende	0,17 \pm 0,17	0,2 \pm 0,2
48 h nach Ischämie-Ende	- 0,38 \pm 0,49*	0,47 \pm 0,27

*Die signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen sind mit einem * ($p < 0,05$) markiert.*

4.5.2 Beatmungsdauer

Die Beatmungsdauer war in der Gruppe der nicht-substituierten Patienten höher als in der Verumgruppe, wenn auch nicht signifikant.

Abbildung 4.5.2: Beatmungsdauer in der Verum- und Placebogruppe



Dargestellt sind Mittelwert \pm SE.

Tabelle 4.5.2: Beatmungsdauer in der Verum- und Placebogruppe

(Angabe des Mittelwertes \pm SE in Minuten)

	Verum	Placebo
Beatmungsdauer	113,77 \pm 20,63	158,33 \pm 44,33

5. DISKUSSION

5.1 Methodische Aspekte

5.1.1 Carnitinbestimmung

Die Messung der einzelnen Carnitinfraktionen erfolgte mittels einer radioenzymatischen Methode, modifiziert nach *McGarry and Foster (74)* und *Schmidt-Sommerfeld et al. (117)*.

Diese stellt das Standard-Verfahren zur Bestimmung von freiem Carnitin und Gesamt-Carnitin dar (32, 41). Mit der Tandem-Massenspektrometrie (TMS) zur Differenzierung der verschiedenen Carnitin-Ester steht neuerdings ein schnelles Verfahren zur Verfügung, bei dem nur geringe Mengen an Serum (ca. 50 µl) benötigt werden, welches jedoch auch sehr kostspielig ist und weiterer Erfahrung in der Etablierung der Methode in der Zukunft bedarf (45, 55, 82).

Bei der in vorliegender Arbeit dargestellten Methode erfolgte die Differenzierung durch Perchlorsäurefällung und Hydrolyse in freies Carnitin, kurzkettige (Carnitinester mit ≤ 4 C-Atome) und langkettige Acyl-Carnitine (Carnitinester mit ≥ 14 C-Atome).

Bei ersterer ist es wichtig, eine ausreichende Zahl an Waschschritten mit Perchlorsäure durchzuführen, um die Separation der einzelnen Carnitinfraktionen zu optimieren. Ansonsten kann es zu einer Überschätzung des Pools an langkettigen Acylcarnitinen kommen; hierin ist eine Ursache für die differierenden Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen zu sehen.

Eine optimale Separation konnte mit zwei Waschschritten erreicht werden (32, 41, 49).

Bei der Hydrolyse ist zu beachten, dass Ineffizienz zu falsch niedrigen Werten an Gesamt-Carnitin führt, weil sich noch verestertes Carnitin der Methode entzieht. Bei einer Inkubation von 2 Stunden bei 65° im Wasserbad konnte die beste Wiederfindungsrate für Palmitoyl-Carnitin erreicht werden (49).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die ermittelten Muskelgewebe-Konzentrationen auf Gramm Nicht-Kollagen-Protein als Referenzsystem bezogen. Bei Verwendung des

Feuchtgewichtes als Bezugsgröße wurde eine größere Variabilität der Carnitin-Konzentrationen beschrieben (104).

Als Nachteil ist zu bewerten, dass die gemessenen Carnitinspiegel im Gewebe einen Durchschnittswert des Muskelhomogenats reflektieren und nicht wie im Tierexperiment die als bedeutsam beschriebenen Verschiebungen zwischen den verschiedenen intrazellulären Kompartimenten aufzeigen. Dies gilt sowohl für die Umverteilung zwischen Mitochondrium und Zytosol als auch für die subsarcolemmale Akkumulation von langkettigen Acylcarnitinen (9, 43, 67, 76, 104, 148).

5.1.2 ATP - und CP-Bestimmung

Die Bestimmung von ATP und CP (Kreatinphosphat) mittels eines kommerziellen Biolumineszenz-Assays ist ein etabliertes und aussagekräftiges Verfahren (35, 143).

Die hier angewandte Methode stützt sich auf Untersuchungen von *Walther* zur Verbesserung der Analyse (143). Zu bedenken ist, dass die ATP-Bestimmung aus einem Homogenat der gesamten Myokardzellen vorgenommen wurde und somit keine Rückschlüsse auf den ATP-Gehalt der unterschiedlichen Zellkompartimente gezogen werden können. Außerdem beschreibt der ATP-Gehalt eine statische Momentaufnahme des Myozyten ohne Berücksichtigung des ATP-Umsatzes der Muskelzelle.

Als alternative Methoden stehen die HPLC (high pressure liquid chromatographie) bzw. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und als nichtinvasives Verfahren die indirekte Bestimmung mittels NMR-in vivo-Spektroskopie zur Verfügung (71).

Die Kreatinphosphat-Bestimmung mittels Biolumineszenz ist im Vergleich zu anderen etablierten Verfahren gleicher Sensitivität, wie z.B. der HPLC und der NMR-in vivo-Spektroskopie, als arbeitsintensiv und relativ unpraktikabel zu bewerten und für einen hohen Probendurchsatz nicht geeignet (71, 143).

5.1.3 Metabolite des Intermediär-Stoffwechsels

Ohne wesentliche Veränderungen wurden bewährte, in der klinisch-chemischen Routine-Diagnostik angewandte, kolorimetrische bzw. enzymatisch-fluorimetrische Mikro-Methoden zur Bestimmung von freien Fettsäuren, β -Hydroxybutyrat und Laktat eingesetzt.

5.1.4 Patientenkollektiv

Wie aus Tabelle 3.1 in Kapitel 3 ersichtlich, zeigen die Placebo- und Verumgruppe im Vergleich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der hämodynamischen Ausgangssituation, der klinischen Daten und der intraoperativen Parameter.

Es liegen demnach vergleichbar homogene Stichproben in beiden Gruppen vor.

5.1.5 Medikamentöse Substitution

Die Dosisfindung zur Carnitinsubstitution bei kardiochirurgischen Eingriffen muss unter besonderer Berücksichtigung des Myokardstoffwechsels erfolgen.

Tierexperimentelle Studien demonstrieren eine langsame Carnitinaufnahme des Myokards (Halbwertszeit des gesamten myokardialen Umsatzes: 60 Stunden), so dass der zeitliche Abstand zwischen Carnitin-Gabe und intraoperativer Ischämie eine besondere Rolle spielt. Ebenfalls bedeutsam für die Anhebung der Carnitinspiegel ist die tubuläre Reabsorptionsrate.

Bei oraler Administration muss auch die niedrige Bioverfügbarkeit und die Sättigbarkeit der intestinalen Resorption beachtet werden.

Tierexperimentell erwies sich eine Carnitin-Perfusion (10mM) über 60 Minuten gegenüber 15 Minuten präischämisch als effektiv. Da die carnitinspezifischen Transportsysteme der Zellmembran bei physiologischen Carnitinkonzentrationen fast vollständig gesättigt sind, erfolgt die weitere Carnitinaufnahme durch konzentrationsabhängige freie Diffusion. Bei extrazellulären Konzentrationen zwischen 100 $\mu\text{mol/l}$ und 1000 $\mu\text{mol/l}$ kann die freie Diffusion von Carnitin signifikant zur

Erhöhung des zellulären Carnitinpools beitragen. Diese kinetischen Eigenschaften erklären die relative Resistenz einer myokardialen Carnitindefizienz gegenüber einer oralen Carnitingabe und erklären die Notwendigkeit stark erhöhter Plasmacarnitinspiegel zur Anhebung des myokardialen Carnitingehalts bei Störungen des spezifischen sarkolemnen Transportprozesses (1, 13, 135).

Die präoperative orale Dosierung von 100 mg/kg KG orientiert sich an den üblichen Therapierichtlinien bei primärem Carnitinmangel. Die Aufteilung in 3 Einzeldosen 24 h präoperativ berücksichtigt den Zeitfaktor, hat sich außerdem als praktikabel erwiesen und führte zu einer Anhebung der präoperativen Konzentrationen an Gesamtcarnitin und freiem Carnitin im Plasma um 100 bzw. 50 % (siehe Tabelle 4.2.1).

Die perioperative intravenöse Substitution orientiert sich an den im Tierexperiment als effektiv gefundenen Dosen. Auch hier konnte unter der eingesetzten Dosierung ein signifikanter Anstieg von Gesamt-Carnitin und freiem Carnitin im Plasma gefunden werden (siehe Kap. 4.2.2).

5.2 Carnitinstoffwechsel bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern

5.2.1 Präoperativer systemischer Carnitinstatus

Veröffentlichungen zum Carnitin-Stoffwechsel bei Kindern allgemein und mit angeborenen Herzfehlern im besonderen sind selten, insbesondere, wenn man unterschiedliche Altersgruppen betrachten will. Die bisher umfangreichsten Arbeiten stammen von *Kreuder* (60, 62) und *Schmidt-Sommerfeld et al.* (91, 92, 112, 114, 115, 116, 117); letzterer Arbeit sind auch die hier zugrunde gelegten Normwerte für die Carnitinfraktionen im Plasma entnommen. Sie decken sich größtenteils mit den in Tabelle 5.2.1 aufgelisteten Plasma-Carnitin-Werten verschiedener Arbeitsgruppen. Die in der hier vorliegenden Arbeit erhobenen Werte für Gesamt-Carnitin und freies Carnitin in der Altersgruppe bis 1 Jahr vor Beginn der Substitution liegen im Vergleich jedoch um 20-30 % höher (siehe Abb. 4.2.1.1c und 4.2.1.1d). Da Säuglinge mit angeborenen Herzfehlern, die im ersten Lebensjahr operiert werden müssen, in aller Regel hämodynamisch stärker kompromittiert sind als ältere Kinder mit angeborenen Herzfehlern und späterer Korrekturoperation, könnte hierbei eine verminderte renale

Filtration bei schlechter Herzfunktion eine Rolle spielen. Auch sollte man von einem einzelnen Plasma-Carnitin-Wert nicht Rückschlüsse auf den Carnitingehalt im Myokard ziehen, der trotzdem erniedrigt sein kann.

Aufgrund der besonderen physiologischen Gegebenheiten im Säuglingsalter wären eher erniedrigte Carnitinspiegel zu erwarten gewesen, wie auch *Kreuder* in seiner Arbeit zum Carnitinstoffwechsel bei Kindern zeigen konnte (60).

Seine Untersuchungsergebnisse an Kindern mit angeborenen Herzfehlern zeigten sogar in ca. 25 % der Fälle eine systemische Carnitin-Defizienz, wobei die Altersgruppen nicht getrennt verglichen wurden.

Als Hauptursache wurde eine unzureichende alimentäre Zufuhr oder ungenügende enterale Resorption diskutiert, wie sie bei chronisch kranken Kindern häufig vorkommt und gleichzeitig mit einer Wachstumsretardierung und Unterernährung einhergeht.

Die Kriterien einer Wachstumsretardierung bzw. Unterernährung erfüllten in dem hier vorliegenden Patientenkollektiv ungefähr 50 % (siehe Kap. 4.2.1.1). Als Ursachen werden eine unzureichende orale Nahrungsaufnahme, eine intestinale Malabsorption, ein gesteigerter Energieverbrauch und gehäufte Infektionen bei der zugrunde liegenden chronischen Erkrankung angesehen (123, 150).

Es konnte auch keine deutliche Verschiebung der Verteilungskurve der Carnitinkonzentrationen im Plasma zu erniedrigten Werten beobachtet werden. Nur ca. 10 % der untersuchten Säuglinge erfüllte die Kriterien einer systemischen Carnitindefizienz ($SDS < -2$).

Dennoch sollte das erhöhte Risiko der Entwicklung einer systemischen Carnitindefizienz bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern Beachtung finden.

Dies unterstreicht vor allem auch bei Säuglingen, die ja in besonderem Maße auf die exogene Zufuhr von Carnitin angewiesen sind, die klinische Bedeutung einer adäquaten körperlichen Entwicklung.

Tabelle 5.2.1: Publierte Daten zum Carnitingehalt im Plasma im Kindesalter

TC	FC	SCAC	LCAC	Einheit	Methodik	Alter	Status	Referenz
64,7±7,7	44,3±4,9	19,9±4,9	2,1±0,3	µmol/l	REA	0-1 Jahre	herzkrank	hier (Placebo)
47,6±7,7	35,5±6,5			µmol/l	REA	0-1 Jahre	gesund	117 (Normwerte)
		5 - 10	< 5	µmol/l	REA	0-16 Jahre	gesund	127 (Normwerte)
	31	11	3	µmol/l	REA	0-16 Jahre	herzkrank	60
	20,2±0,3			µmol/l	(1)	Ø 6 J	herzkrank	36
	39±0,8			µmol/l	(1)	Ø 6 J	gesund	36
51,1±9,1	40,2±6,1			µmol/l	(2)	7 d - 1 Jahr	gesund	145

Angabe : Mittelwert ± SD; REA: Radioenzymatischer Assay; (1): Enzymatische Methode; (2): Radiometrische Methode von *Parvin and Pande* (145)

5.2.2 Myokardialer Carnitinstatus

Kreuder beschrieb erstmalig Konzentrationen einzelner Carnitin-Fractionen im Myokard bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern, ihre funktionelle Bedeutung und mögliche Einflussfaktoren. Die hier vorgelegten Untersuchungsergebnisse beziehen sich nur auf die Altersgruppe der Säuglinge. Untersuchungen zum myokardialen Carnitingehalt speziell in dieser Altersgruppe liegen bisher nur im Rahmen autopsisch gewonnener Proben für Früh- und Neugeborene vor (91). Studien über den Carnitingehalt bei gesunden und herzkranken Erwachsenen sind im größeren Umfang vorhanden; aufgrund mehrerer methodischer Unterschiede (wie Probengewinnung, Carnitinmessung, Art des Referenzsystems) jedoch schwer vergleichbar (95, 103, 104, 125, 131).

Die Tabelle 5.2.2 stellt einen ausgewählten Teil der bisher publizierten Ergebnisse den hier gewonnenen Daten gegenüber. Im Rahmen der vorgelegten Studie wurde aus ethischen Überlegungen darauf verzichtet, eine Kontrollgruppe in Form von Myokard-Biopsien aus Spender-Herzen bei Herztransplantationen im Säuglingsalter zu etablieren. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten myokardialen Carnitinkonzentrationen in der nicht-substituierten Gruppe vor Beginn der Myokardischämie liegen unterhalb der von den anderen Arbeitsgruppen angegebenen Werte. Die Konzentrationen für gesamtes und freies Carnitin in der Verumgruppe präischämisch liegen höher und sind mit den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen vergleichbar. So könnte zumindest für einen Teil der Säuglinge mit angeborenen Herzfehlern trotz erhöhter Plasma-Carnitinkonzentrationen von einer Carnitinefizienz des Myokards ausgegangen werden.

Um die intraoperative Belastung möglichst gering zu halten, wurde auch im Einvernehmen mit den Herzchirurgen abgesprochen, eine Myokardprobe entsprechend der chirurgischen Schnittführung aus dem rechten Vorhof zu entnehmen, obschon vorangehende Untersuchungen Unterschiede im rechtsatrialen und rechtsventrikulären Myokard hinsichtlich möglicher Einflussfaktoren auf den Carnitingehalt zeigten (60, 95, 104).

Während hämodynamische Faktoren keinen Einfluss auf den rechtsatrialen Carnitingehalt hatten, erwiesen sie sich als entscheidende Faktoren der rechtsventrikulären Carnitin-Konzentration. So ist die mechanische Leistungsfähigkeit des rechten Ventrikels mit höheren metabolischen Anforderungen in Form einer suffizienten Oxidation von Glukose und Fettsäuren verbunden. Darum finden sich im rechtsventrikulären gegenüber dem rechtsatrialen Myokard auch zum Teil höhere Carnitin-Konzentrationen.

Der Carnitin-Gehalt des atrialen Myokards folgt eher passiv den korrespondierenden Carnitin-Spiegeln im Plasma, erweist sich aber als ausreichend repräsentativ hinsichtlich des globalen myokardialen Carnitin-Status.

Es wäre interessant, in zukünftigen Studien den Carnitingehalt bei Säuglingen in verschiedenen Bezirken des Myokards und insbesondere im rechten Ventrikel weiter zu untersuchen.

Bei Betrachtung der funktionellen Unterschiede von freiem Carnitin und kurzkettigen Carnitin-Estern werden die Zusammenhänge zwischen einzelnen Carnitinfraktionen und mechanischer Herzfunktion deutlich: Während kurzkettige Acylcarnitine (überwiegend Acetyl-Carnitin) durch die enge Kopplung von Carnitin-Pool und CoA-SH/Acyl-CoA-Pool die intramitochondriale Acetyl-CoA-Konzentration widerspiegeln, reflektiert freies Carnitin die intrazelluläre Verfügbarkeit von Carnitin. Die angesprochene Acetyl-CoA-Konzentration wird durch die Produktion von Acetyl-CoA durch Fettsäure- und Glukose-Oxidation aber auch der Utilisation von Acetyl-CoA im Citratzyklus entscheidend bestimmt. Eine Erhöhung des mitochondrialen Acetyl-CoA-Spiegels kann also sowohl durch forcierte Fettsäure-Utilisation als auch durch eine Hemmung von Atmungskette und Citratzyklus bedingt sein. Hypoxämie führt zu verminderter Utilisation von Acetyl-CoA im Citratzyklus und der Atmungskette und nachfolgend zur Erhöhung von Acetyl-CoA und Acetyl-Carnitin (54, 89, 119, 122, 144).

In der vorliegenden Arbeit fanden sich im myokardialen Ausgangsstatus in der Verumgruppe signifikant erhöhte Konzentrationen an freiem Carnitin und nicht signifikant erniedrigte Spiegel kurzkettiger Acylcarnitine. Die Carnitinsubstitution führte somit zu erhöhten myokardialen Spiegeln an freiem Carnitin und zu einem verminderten Anfall von Acetyl-CoA und damit später auch von Acetyl-Carnitin.

Tabelle 5.2.2: Publierte Daten zum Carnitingehalt im Myokard im Kindes- und Erwachsenenalter

TC	FC	SCAC	LCAC	Einheit	Ort	Präparation	Alter	Referenz
4,64±0,7	1,96±0,4*	2,68±0,7	1,96±0,2	µmol/g NCP	RA	intraoperativ	0 - 1 Jahre	hier, P.
5,13±0,7	3,52±0,4*	1,61±0,4	2,17±0,2	µmol/g NCP	RA	intraoperativ	0 - 1 Jahre	hier, V.
5,31±0,3	2,4±0,2	2,4±0,2	0,45±0,1	µmol/g NCP	RA	intraoperativ	0 - 16 Jahre	60
5,47±0,95				µmol/g NCP	ges. Herz	Autopsie	10 - 28 Tage	91
4,2±1,1	2,1±0,8			µmol/g NCP	RA	HTx, Explantat	0,5 - 64 Jahre	95
4,8				µmol/g NCP	RA	HTx, Explantat	Erwachsene	103
9,9±0,8	9,7±0,7			µmol/g NCP	RV	EMB (gesund)	Erwachsene	104
6,1±0,5	4,6±0,4			µmol/g NCP	RV	EMB (Hi)	Erwachsene	104

Angabe: Mittelwert ± SD; RA: rechter Vorhof; RV: rechter Ventrikel; HTx: Herztransplantation; EMB: Endomyokard-Biopsie; Hi: Herzinsuffizienz; P: Placebo; V: Verum (jeweils vor Ischämie); *: p < 0,05

5.2.3 Carnitinmetabolismus während kardiochirurgischer Eingriffe

Mögliche Auswirkungen kardiochirurgischer Eingriffe auf den Myokardstoffwechsel sind in Kapitel 1.2.3 einleitend beschrieben.

Die Änderungen des myokardialen Carnitinstoffwechsels sind Teil der komplexen metabolischen Antwort des Myokards auf Ischämie und Reperfusion, die bei kardiochirurgischen Eingriffen zusätzlich durch Hypothermie und Kardioplegie modifiziert werden.

Es konnten signifikante Verluste von freiem Carnitin sowie von kurzkettigen Acylcarnitinen nach Applikation von kristalloider, fettsäure-freier Kardioplegie, nach Ischämie und partieller Blut-Reperfusion verzeichnet werden (80).

Perioperative Veränderungen des systemischen Carnitinstatus sind durch eine passagere Reduktion von freiem Carnitin aufgrund einer verminderten tubulären Rückresorption als Ausdruck der renalen Dysfunktion nach extrakorporaler Zirkulation zu deuten (58, 86, 149).

Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten signifikante Änderungen des intramyokardialen Carnitin-Metabolismus bei Ischämie, deren Ausprägung wesentlich von der Art der Ischämie (kein Fluss oder niedriger Fluss), dem Substrat der Organperfusion (Blut, Glukose, Fettsäuren) und der Tierspezies bestimmt wird. Eine akute Ischämie führte aufgrund der Hemmung der Atmungskette zu einer Reduktion von freiem Carnitin und einer Akkumulation von kurz- und langkettigen Acylcarnitinen im Myokard (54, 90, 119, 122, 144).

In Vorstudien durchgeführte Untersuchungen am Myokardgewebe herzoperierter Kinder ergaben eine signifikante Reduktion des Carnitingehaltes nach Ischämie, der mit einem erhöhten postoperativen Bedarf an positiv inotropen Medikamenten einherging (60). Vor allem die Assoziation zwischen postoperativer kontraktile Myokard-Funktion und Verlust von freiem Carnitin aus dem ischämischen Myokard war ein wesentliches Ergebnis. Niedrige präoperative Sauerstoffsättigungen und eine längere Gesamtischämiezeit waren mit einem erhöhten myokardialen Verlust von freiem Carnitin assoziiert.

Die quantitativen Auswirkungen einer verminderten intrazellulären Verfügbarkeit von freiem Carnitin auf die Fettsäure-Oxidation werden kontrovers diskutiert (17, 144).

Indessen ist zu bedenken, dass Carnitin aufgrund seines modulierenden Einflusses auf die intramitochondriale Verfügbarkeit von freiem CoA noch in enger Beziehung zur Glukose-Oxidation und zum Citratzyklus steht. Einer Störung der Glukose-Oxidation und Depletion von Intermediär-Metaboliten des Citratzyklus` wird eine wesentliche Rolle in der Genese der myokardialen Schädigung nach Ischämie und Reperfusion und der funktionellen Erholung nach globaler Schädigung des Myokards zugesprochen (19, 67, 132).

In der hier vorgelegten Untersuchung konnte diese Beobachtung bestätigt werden:

Eine Reduktion des gesamten und des freien Carnitins sowie der kurzkettigen Acylcarnitine nach Myokardischämie sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe um ca. 30 % waren die wesentlichen metabolischen Konsequenzen im Myokard nach fettsäure-freier kristalloider Kardioplegie, Ischämie und partieller Blut-Reperfusion (siehe auch Kapitel 4.3.1).

Unabhängig von einer gestörten Fettsäureoxidation kommt einer globalen Schädigung der Herzmuskelzellmembran, deren Integrität entscheidend den myozytären Carnitingehalt beeinflusst, eine kausale Bedeutung zu, erkennbar an der Assoziation des Verlustes von freiem Carnitin zum postischämischen CK-MB-Wert (13, 124, 139, 140).

Ein Zusammenhang zwischen biochemischen und funktionellen Parametern im Myokard konnte bei den energiereichen Phosphaten ATP und Kreatinphosphat nicht beobachtet werden (60). Diese Beobachtung könnte darauf schließen, dass Änderungen des myokardialen Carnitin-Stoffwechsels eine größere Bedeutung für die postoperative Pumpfunktion des Herzens besitzen als globale Änderungen der energiereichen Phosphate.

5.3 Carnitinsupplementierung bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern

5.3.1 Tier- und humanexperimentelle Grundlagen

a) bei kardialer Volumen- und Druckbelastung:

Kantor et al. konnten in einer tierexperimentellen Studie an Herzen neugeborener Schweine zeigen, dass eine frühe linksventrikuläre Volumenbelastung mit konsekutiver Hypertrophie zu einer verzögerten Reifung der Enzyme der Fettsäureoxidation im neugeborenen Herzen führt (57).

An Truthähnen mit Kardiomyopathie fanden *Pierpont et al.* signifikant erhöhte Werte an freiem Carnitin, kurz- und langkettigen Carnitiner in Plasma sowie erhöhte Konzentrationen von freiem Carnitin und kurzkettigen Carnitiner in der Leber. Die erhöhten Carnitinkonzentrationen könnten nach Ansicht der Autoren ihre Ursache in einer verstärkten Biosynthese bei arterieller Hypotonie und zunehmender kardialer Dysfunktion bei Kardiomyopathie haben, um die Fettsäureoxidation als kardiale Hauptenergiequelle zu fördern (94).

Erhöhte Plasma-Carnitinwerte (freies Carnitin und Acylcarnitin) werden auch bei verminderter renaler Perfusion beschrieben, die z. B. auch bei kardialer Funktionsstörung vorliegt (105).

In aufgrund einer Stenose in der aortalen Ausflussbahn hypertrophierten Rattenherzen wurden erniedrigte Carnitinwerte gefunden - als Folge einer reduzierten carriervermittelten Carnitinaufnahme bei gleichbleibender Carnitinaufnahme per diffusionem im Myokard (106).

b) bei kardialer Ischämie:

Wie schon eingangs im Kapitel Einleitung unter 1.2.2 näher beschrieben, werden dem Carnitin protektive Effekte auf das ischämische Myokard zugesprochen.

Versuche an isolierten wie auch an in-situ-Herzen haben gezeigt, dass eine präischämische Gabe von Carnitin der ischämiebedingten Schädigung des Myokards entgegenwirken kann. Diese positive Wirkung ließ sich an einer Verbesserung der postischämischen myokardialen Pumpfunktion, einer Verminderung der ischämisch bedingten Depletion energiereicher Phosphate und einer verminderten Häufigkeit postischämischer Arrhythmien erkennen (19, 20, 42, 65, 72, 90, 121, 130).

Vary et al. beschrieben, dass eine Reduktion der Koronardurchblutung innerhalb von Minuten zu um 80-90% erniedrigten Werten an Kreatinphosphat, gefolgt von einer langsameren Abnahme an ATP und Herzmuskelkontraktilität, führt (141).

Eine weitere tierexperimentelle Studie untersuchte den Einfluss von exogen zugeführtem Carnitin im Perfusat auf die Carnitinaufnahme an isolierten Rattenherzen. Es kam zu einem signifikanten Anstieg der myokardialen Konzentrationen an ATP und der einzelnen Carnitinfraktionen am Ende der Reperfusion (80).

Tatlican et al. zeigten an einer Studie mit Schweineherzen auf, dass der protektive Effekt von L-Carnitin während normothermischer Ischämie dosisabhängig ist und dass die Gabe von Carnitin vor Beginn der Ischämie erfolgen muss (134).

Eine Studie an isolierten Rattenherzen fand während Ischämie erniedrigte Signalintensitäten von Kreatinphosphat und ATP in der Magnetresonanztomographie. Durch Gabe von Carnitin in der Reperfusion kam es zu einem verbesserten Wiederanstieg der Konzentrationen an energiereichen Phosphaten (71).

In humanexperimentellen Untersuchungen wurde ein anti-ischämischer Effekt einer Carnitin-Supplementierung bisher vor allem an Erwachsenen mit einer koronaren Herzerkrankung untersucht. Dieser protektive, nicht unumstrittene Effekt äußerte sich in einer verbesserten linksventrikulären Pumpfunktion, einer gesteigerten Laktatverwertung bei körperlicher Belastung sowie einer verminderten Rate an Rhythmusstörungen und EKG-Veränderungen (38, 39, 56, 59).

Drei Studien mit ähnlichem Studienaufbau im Vergleich zu der hier vorgelegten Arbeit untersuchten den Effekt einer perioperativen Carnitin-Substitution bei aorto-coronarer Bypass-Operation bzw. Mitralklappenersatz erwachsener Patienten:

Demeyere et al. fanden keinen positiven Einfluss einer präoperativen Carnitingabe auf die postoperative hämodynamische Myokardfunktion und den Gehalt an energiereichen Phosphaten im linksventrikulären Gewebe (29).

Demgegenüber fanden *Böhles et al.* in der supplementierten Gruppe signifikant höhere Konzentrationen an ATP und freiem Carnitin sowie signifikant niedrigere Werte von langkettigen Acylcarnitinen im rechten Vorhofmyokard. Die Patienten benötigten weniger inotrope Medikamente (11).

In der Untersuchung von *Pastoris et al.* hatten die supplementierten Patienten signifikant erhöhte Serumkonzentrationen an Carnitin vor Ischämie; ein

Konzentrationsunterschied von Carnitin im Myokard des rechten Vorhofes direkt vor Ende der Ischämie konnte jedoch nicht ausgemacht werden. Bei den carnitinsupplementierten Patienten mit Mitralklappenersatz wurden signifikant höhere Konzentrationen an Pyruvat, ATP und Kreatinphosphat im Herzmuskel gefunden (88).

Kreuder et al. untersuchten 1994 den myokardialen Carnitin-Stoffwechsel bei kardiochirurgischen Eingriffen im Kindes- und Jugendalter. Sie fanden postischämisch einen signifikanten Abfall der Carnitin-Konzentration und des ATP-Gehaltes im rechten Vorhof, wobei der Carnitin-Verlust bei Kindern unter 1 Jahr größer war. Weiterhin wurde am ersten postoperativen Tag ein signifikanter Anstieg der Plasma-Werte für Acylcarnitin, Fettsäuren und β -Hydroxybutyrat beobachtet (62).

Sawa et al. konnten aufzeigen, dass während kardiochirurgischer Korrekturingriffe bei Neugeborenen mehr mitochondriale Strukturen zerstört wurden als bei älteren Kindern (110).

Studien zur perioperativen Carnitinsupplementierung bei kardiochirurgischen Eingriffen angeborener Herzfehler im Säuglingsalter liegen bisher nicht vor.

5.3.2 Perioperativer Carnitinstatus unter Supplementierung

5.3.2.1 Systemischer Carnitinstatus

Die vorgelegten Ergebnisse zur perioperativen Carnitinsubstitution zeigten in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe signifikant erhöhte Plasmaspiegel an freiem Carnitin und Gesamtcarnitin schon nach oraler Substitution, die über den gesamten intra- und postoperativen Zeitraum fortbestanden.

Das supplementierte Kollektiv zeigte nach parenteraler Substitution signifikant erhöhte Konzentrationen an kurzkettigen Acylcarnitinen.

Erhöhte Plasmaspiegel an langkettigen Acylcarnitinen wurden in der Verumgruppe zu den Zeitpunkten C, D und 8 h nach Ischämie-Ende gefunden (siehe auch Kapitel 4.2.1 und 4.2.2).

5.3.2.2 Myokardialer Carnitinstatus

Intraoperative Ischämie, kalte kristalloide Kardioplegie und partielle Blut-Reperfusion führten sowohl in der Verum- als auch in der Placebogruppe zu einem ähnlichen Verlust an myokardialem freiem Carnitin von 30 % bzw. 25%. Jedoch zeigten Patienten mit Carnitin-Supplementierung weiterhin signifikant höhere myokardiale Konzentrationen an freiem Carnitin als die Placebo-Gruppe (siehe auch Kapitel 4.3). Dies ist insofern bedeutsam, als freies Carnitin die intrazelluläre Verfügbarkeit von Carnitin widerspiegelt, welche eine protektive Rolle im ischämiebedrohten Myokardstoffwechsel spielt. Die relative Carnitinanreicherung des Myokards nach Carnitinsupplementierung bestand demzufolge im postischämischen Myokard fort und belegt die Verbesserung des myokardialen Carnitinmetabolismus (siehe auch Kapitel 4.3.2).

Der Gehalt an langkettigen Acylcarnitinen im Myokard nahm in der Verumgruppe postoperativ nur geringfügig ab, während in der Placebogruppe eine (nicht signifikante) Zunahme zu verzeichnen war. Die Carnitin-supplementierte Gruppe zeigte jedoch eine deutlich höhere Ratio von FC/LCAC als die Placebo-Gruppe (siehe auch Kapitel 4.3.2). Insofern könnte man der Carnitin-Supplementierung eine Schutzwirkung vor einer Erhöhung der potentiell toxisch-arrhythmogen wirkenden langkettigen Acylcarnitinen zuschreiben.

5.3.2.3 Energiereiche Phosphate

Der schon in mehreren der erwähnten Studien ermittelte Effekt von erhöhten myokardialen ATP-Gewebespiegeln im ischämischen Myokard bei Carnitinsubstitution - aufgrund einer verringerten Inhibierung der Adenin-Nukleotid-Translokase - konnte auch in der hier vorliegenden Studie bestätigt werden.

Es fand sich ein deutlicher, fast signifikanter Anstieg der energiereichen Phosphate ATP ($p < 0,08$) und Kreatinphosphat ($p < 0,06$) im präischämischen Myokard im Gruppenvergleich Carnitin versus Placebo. Dass das notwendige Signifikanzniveau nicht erreicht wurde, liegt wahrscheinlich an der zu geringen Fallzahl (siehe auch Kapitel 4.3.1).

Postoperativ kam es zu einer ca. 50 %-igen Reduktion der Konzentrationen von ATP und CP im supplementierten Kollektiv (siehe auch Kapitel 4.3.2). Die myokardialen Gewebespiegel der energiereichen Phosphate unterschieden sich somit in der Verumgruppe nicht mehr von denjenigen der Placebogruppe. Es muss gefolgert werden, dass sämtliches, „zusätzlich“ gespeichertes ATP und CP während der Ischämie wieder verlorengegangen ist.

So kann in dieser Studie Carnitin kein ATP-stabilisierender Effekt zugeschrieben werden. Jedoch muss bedacht werden, dass ausbleibende positive Änderungen im myokardialen Gewebepool von ATP und CP die Abnahme der Inhibierung der Adenin-Nukleotid-Translokase durch Carnitin weder beweisen noch widerlegen. Dazu müsste die genaue Verteilung der energiereichen Phosphate und deren Änderung bzw. Verschiebung in den unterschiedlichen Zellkompartimenten untersucht werden (11, 29).

5.3.2.4 Intermediärmetabolite

Erhöhte Plasma-Konzentrationen von freien Fettsäuren werden aufgrund ihres inhibierenden Effektes auf die Glukose-Oxidation und Membran-Stabilität als mögliche Ursache einer gestörten Myokard-Funktion nach herzchirurgischen Eingriffen erwogen (13, 68). Auch in der vorgelegten Arbeit kam es zu einem signifikanten Plasmaanstieg an freien Fettsäuren bis 4 Stunden nach Ischämie als Ausdruck der verminderten β -Oxidation; ein direkter Einfluß auf die kontraktile Myokard-Funktion oder den Herzrhythmus war jedoch nicht zu eruieren.

Auch konnte die Carnitinsupplementierung nicht zu erniedrigten Spiegeln an freien Fettsäuren in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe führen; nur am Ende der Ischämie war dieser Effekt (jedoch nicht signifikant) zu sehen und könnte als positiver Effekt der Carnitinsupplementierung gedeutet werden.

Im Verlauf der weiteren Intermediärmetabolite war gruppenunabhängig ein Anstieg von β -Hydroxybutyrat und Laktat im Plasma während der intraoperativen und frühen postoperativen Phase zu beobachten, die Konzentrationen fielen im Verlauf auf knapp unter das Ausgangsniveau wieder ab. Dies ist als Zeichen der vermehrten Ketogenese und anaeroben Glykolyse als Auswirkung des akuten Sauerstoffmangels zu werten.

5.3.3 Klinischer Verlauf

Der klinische Nutzen der Carnitinsupplementierung ist durch eine moderate Beschleunigung in der postoperativen Erholung der mechanischen Funktion des postischämischen Myokards gekennzeichnet - erkennbar an einer signifikant schnelleren Rückbildung des Bedarfs positiv-inotroper Medikamente zum Zeitpunkt 48 Stunden nach Ende der Myokardischämie als Ausdruck eines anti-ischämischen Effektes. Auch zeigten die Kinder mit Carnitin-Supplementierung eine, wenn auch nicht signifikante, Verkürzung der Beatmungsdauer.

Hierbei ist jedoch auch anzumerken, dass der Beurteilungsmaßstab „Katecholaminscore“ (siehe auch unter Kapitel 3.4.2) eine gewisse willkürliche Komponente enthalten kann. Vorteile sind jedoch, dass dieses System auf jeden Patienten anwendbar ist, es nicht invasiv, nicht durch postoperativ bedingte anatomische Besonderheiten eingeschränkt und somit besonders als Bewertungsmaßstab für Kinder geeignet ist.

In Übereinstimmung mit tier- und humanexperimentellen Untersuchungen wurden in dem supplementierten Kollektiv unter der hier angewendeten Dosierung mit L-Carnitin keine Nebenwirkungen in Form von gastrointestinaler Symptomatik, einer verstärkten kontraktile Dysfunktion oder vermehrter Dysrhythmie-Frequenzen beobachtet (11, 90). Lediglich *Hearse et al.* beschrieben einen dosisabhängig steigenden schädigenden Einfluss einer Carnitin-angereicherten Kardioplegielösung mit Aufhebung des protektiven Effektes der Kardioplegie und gesteigerter Arrhythmie neigung (48).

Die von *Hearse et al.* verwendeten Carnitin-Konzentrationen (500 bis 2500 $\mu\text{mol/l}$) in der verabreichten Kardioplegielösung können unter Berücksichtigung der hier erzielten Plasmaspiegel bei dem vorliegenden Dosierungs-Schema jedoch gar nicht erreicht werden.

Die funktionelle Bedeutung sowie klinische Relevanz und Notwendigkeit einer perioperativen Carnitinsubstitution bei kardiochirurgischen Eingriffen im Säuglingsalter ist nicht abschließend beurteilbar.

Dennoch erscheint eine Vorgabe angehobener Plasma-Carnitin-Spiegel im Hinblick auf die ischämisch bedingte Alteration zellulärer Membranen als sinnvoll, da die

myokardiale Carnitin-Konzentration besonders von der Funktion des spezifischen Carriersystems, der Integrität des Sarkolemm und den extrazellulären Carnitinspiegeln abhängt.

Auch könnte der transiente renale Verlust von freiem Carnitin postoperativ als zusätzliches Argument für eine perioperative Carnitin-Supplementierung gewertet werden. Unter der hier gewählten Dosierung der postoperativen Substitution wurde diesem renotubulären Verlust effektiv begegnet.

Unter zusätzlicher Berücksichtigung der besonderen Stoffwechselsituation im Säuglingsalter könnte insbesondere bei schweren Herzfehlern - wie zum Beispiel einer Transposition der großen Arterien -, die eine sofortige chirurgische Intervention erforderlich machen und einen längeren Krankenhausaufenthalt mit längerer parenteraler Ernährung nach sich ziehen, die perioperative Gabe von Carnitin eine Bereicherung der Therapie bedeuten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ein intakter zellulärer Energiestoffwechsel ist essentielle Voraussetzung der strukturellen und funktionellen Integrität des Myokards. Durch mitochondriale Oxidation von Fettsäuren und Glukose sowie Glykolyse und Glykogenolyse deckt die Herzmuskelzelle ihren zellulären Energiebedarf.

L-Carnitin als Carrier für den mitochondrialen Transport aktivierter Fettsäuren und Carnitin-abhängige Acyl-Transferasen und Translokasen sind unabdingbare Bestandteile der Fettsäureoxidation und modulieren zusätzlich die oxidative Glukose-Utilisation.

Grundlage der vorliegenden Arbeit war eine vorausgegangene Studie, die erniedrigte Plasmaspiegel für Gesamt-Carnitin und freies Carnitin fand und einen signifikanten Verlust von freiem Carnitin, kurzkettigen Acylcarnitinen und energiereichen Phosphaten um 28 - 56 % im Myokardstoffwechsel bei kardiochirurgischen Eingriffen im Kindesalter beschrieb, wobei der Carnitinverlust bei Kindern unter 1 Jahr größer war.

Der Wert einer perioperativen Carnitinsupplementierung bei kardiochirurgischen Eingriffen angeborener Herzfehler im Säuglingsalter wurde in der vorliegenden Studie evaluiert.

Bei gleichen Ausgangswerten für alle Carnitinfraktionen *im Plasma* zeigte sich bereits nach oraler Supplementierung mit L-Carnitin ein Anstieg für Gesamtcarnitin im Mittel um 100 % auf 123,55 $\mu\text{mol/l}$, für freies Carnitin um 50 % auf 75,24 $\mu\text{mol/l}$ und für kurzkettige Acylcarnitine um 250 % auf 46,03 $\mu\text{mol/l}$ (Angabe jeweils und im folgenden als Mittelwert).

Nach intravenöser Applikation präischämisch stiegen die Werte für Gesamtcarnitin um das 28fache auf 1768,23 $\mu\text{mol/l}$, für freies Carnitin um das 31fache auf 1556,95 $\mu\text{mol/l}$, für kurzkettige Acylcarnitine um das 17fache auf 211,27 $\mu\text{mol/l}$ und für langkettige Acylcarnitine um das 4fache auf 9,09 $\mu\text{mol/l}$.

Diese Erhöhung blieb auch über die gesamte postoperative Phase im Gruppenvergleich bestehen. Die Werte für das supplementierte Kollektiv lagen im Vergleich zum Placebokollektiv im gesamten Beobachtungszeitraum um das mindestens 3fache höher

bei Gesamtcarnitin, um mindestens 3,5 mal höher bei freiem Carnitin, knapp oberhalb bei den kurzkettigen Acylcarnitinen und um das mindestens 1,9fache höher bei den langkettigen Acylcarnitinen.

Die perioperative Supplementierung mit L-Carnitin führte *im präischämischen Myokard* zu signifikant erhöhten Spiegeln an freiem Carnitin (um 80 % auf 3,52 $\mu\text{mol/g}$ NCP) und zu deutlich erhöhten Konzentrationen von ATP (um 80 % auf 43,38 $\mu\text{mol/g}$ NCP) und CP (um 150 % auf 40,49 $\mu\text{mol/g}$ NCP) in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe.

Auch *postischämisch* blieb in der supplementierten Gruppe die signifikante Erhöhung der Gewebespiegel an freiem Carnitin bestehen.

Der Myokard-Stoffwechsel während intraoperativer Ischämie, Kardioplegie und Reperfusion war zwar durch einen signifikanten Verlust an freiem Carnitin (Placebogruppe: 25 %, Verumgruppe: 25 %) sowie durch einen deutlichen Verlust an ATP (um 50 %) und CP (um 60 %) in der Verumgruppe gekennzeichnet, wodurch sich der Endgehalt an Kreatinphosphat und ATP postischämisch in beiden Gruppen nicht signifikant unterschied. Trotzdem waren nach Ischämie unter Carnitinsupplementierung noch signifikant höhere myokardiale Konzentrationen an freiem Carnitin zu verzeichnen (2,45 $\mu\text{mol/g}$ NCP versus 1,45 $\mu\text{mol/g}$ NCP).

Klinisch fand sich in der Verumgruppe ein signifikant reduzierter Bedarf positiver inotroper Medikamente 48 Stunden nach Ischämie sowie eine niedrigere Beatmungsdauer als Ausdruck einer rascheren Erholung des Myokards.

Die erhobenen Befunde weisen auf einen protektiven Effekt von Carnitin im Myokardstoffwechsel bei kardiochirurgischen Eingriffen im Säuglingsalter hin, erkennbar an signifikant höheren Gewebespiegeln von freiem Carnitin im Myokard, verbunden mit einer rascheren myokardialen postoperativen Erholung.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ANGELINI, C.; MARTINUZZI, A.; VERGANI, L.:
Treatment with L-carnitine of the infantile and adult form of primary carnitine deficiency.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 139-155 (1992)

- 2 ARDUINO, A.; DOTTORI, S.; MOLAJONI, F.; KIRK, R.; ARRIGONI-MARTELLI, E.:
Is the carnitine system part of the heart antioxidant network ?
IN: DE JONG, J.W.; FERRARI, R.:
The carnitine system - a new therapeutical approach to cardiovascular diseases.
Kluwer Academic Publishers 162: 169-182 (1995)

- 3 ARENAS, J.; HUERTAS, R.; CAMPOS, Y.; DIAZ, A.E.; VILLALON, J.M.; VILAS, E.:
Effects of L-carnitine on the pyruvate dehydrogenase complex and carnitine palmitoyltransferase activities in muscle of endurance athletes.
FEBS Lett 341: 91-93 (1994)

- 4 ARENAS, J.; RICOY, J.R.; ENCINAS, A.R.; POLA, P.; D'IDDIO, S.; ZEVIANI, M.; DIDONATO, S.; CORSI, M.:
Carnitine in muscle, serum and urine of nonprofessional athletes:
Effects of physical exercise, training and L-carnitine administration.
Muscle Nerve 14: 598-604 (1991)

- 5 ARENAS, J.; RUBIO, J.C.; MARTIN, M.A.; CAMPOS, Y.:
Biological roles of L-carnitine in perinatal metabolism.
Early Hum. Dev. 53: 43-50 (1998)

- 6 BAHL, J.; NAVIN, T.; MANIAN, A.A.; BRESSLER, R:
Carnitine transport in isolated adult rat heart myocytes and the effect of 7,8-diOH chlorpromazine.
Circ. Res. 48:3: 378-385 (1981)
- 7 BARANY, M.:
ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening.
J. Gen. Physiol., Vol. 50, No. 6: 197-218 (1967)
- 8 BENNETT, M.J.; HALE, D.E.:
Defects of mitochondrial β -oxidation enzymes.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 187-209 (1992)
- 9 BIEBER, L.L.:
Carnitine.
Ann. Rev. Biochem. 57: 261-283 (1988)
- 10 BIEBER, L.L.; EMAUS, R.; VALKNER, K.; FARRELL, S.:
Possible functions of short-chain and medium-chain carnitine acyltransferases.
Fed. Proc. 41:12: 2858-2862 (1982)
- 11 BÖHLES, H.; NOPPENY, T.; AKCETIN, Z.; REIN, J.; VON DER EMDE, J.:
The effect of preoperative L-carnitine supplementation on myocardial metabolism during aorto-coronary-bypass surgery.
Curr. Ther. Res. 39: 429-435 (1986)
- 12 BÖHMER, T.; EIKLID, K.; JONSEN, J.:
Carnitine uptake into human heart cells in culture.
Biochim. Biophys. Acta 465:3: 627-633 (1977)

- 13 BRASS, E.P.:
Carnitine transport.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 21-36 (1992)
- 14 BREMER, J.:
Carnitine - metabolism and functions.
Physiol. Rev. 63:4: 1421-1466 (1983)
- 15 BRENINGSTALL, G.N.:
Carnitine deficiency syndromes.
Pediatr. Neurol. 6: 75-81 (1990)
- 16 BRETSCHEIDER, H.J.:
Myocardial protection.
Thorac. Cardiovasc. Surg. 28: 295-302 (1980)
- 17 BRODERICK, T.L.; CHRISTOS, S.C.; WOLF, B.A.; DIDOMENICO, D.;
SHUG, A.L.; PAULSON, D.J.:
Fatty acid oxidation and cardiac function in the sodium pivalate model of
secondary carnitine deficiency.
Metabolism 44: 499-505 (1995)
- 18 BRODERICK, T.L.; PANAGAKIS, G.; DIDOMENICO, D.; GAMBLE, J.;
LOPASCHUK, G.D.; SHUG, A.L.; PAULSON, D.J.:
L-carnitine improvement of cardiac function is associated with stimulation in
Glucose but not fatty acid metabolism in carnitine-deficient hearts.
Cardiovasc. Res. 30: 815-820 (1995)

- 19 BRODERICK, T.L.; QUINNEY, H.A.; BARKER, C.C.; LOPASCHUK, G.D.:
Beneficial effect of carnitine on mechanical recovery of rat hearts reperfused
after a transient period of global ischemia is accompanied by a stimulation of
Glukose oxidation.
Circulation 87: 972-981 (1993)
- 20 BRODERICK, T.L.; QUINNEY, H.A.; LOPASCHUK, G.D.:
L-carnitine increases Glukose metabolism and mechanical function following
ischemia in diabetic rat heart.
Cardiovasc. Res. 29: 373-378 (1995)
- 21 BUDDECKE, E.:
Muskelgewebe.
In: Grundriß der Biochemie.
De Gruyter, 8. Ed.: 510-521 (1989)
- 22 CALVANI, M.; REDA, E.; ARRIGONI-MARTELLI, E.:
Regulation by carnitine of myocardial fatty acid and carbohydrate metabolism
under normal and pathological conditions.
Basic Res. Cardiol. 95 (2): 75-83 (2000)
- 23 CAMPOY, C.; BAYES, R.; PEINADO, J.M.; RIVERO, M.; LOPEZ, C.;
MOLINA FONT, J.A.:
Evaluation of carnitine nutritional status in full-term newborn infants.
Early Hum. Dev., 53: 149-164 (1998)
- 24 CASTANEDA, A.R.; JONAS, R.A.; MAYER, J.E.; HANLEY, F.L.:
Myokardial preservation in the immature heart.
In: Cardiac surgery of the neonate and infant.
W.B. Saunders Company Kap.3: 41-53 (1994)

- 25 CASTANEDA, A.R.; JONAS, R.A.; MAYER, J.E.; HANLEY, F.L.:
Cardiopulmonary bypass, hypothermia and circulatory arrest.
In: Cardiac surgery of the neonate and infant.
W.B. Saunders Company Kap.2: 23-39 (1994)
- 26 CHRISTIANSEN, R.Z.; BREMER, J.:
Active transport of butyrobetaine and carnitine into isolated liver cells.
Biochim. Biophys. Acta 448:4: 562-577 (1976)
- 27 COLEMAN, G.M.; GRADINAC, S.; TAEGTMEYER, H.; SWEENEY, M.;
FRAZIER, H.:
Efficacy of metabolic support with Glukose-insulin-potassium for left ventricu-
lar pump failure after aortocoronary bypass surgery.
Circulation 80: I 91-I 96 (1989)
- 28 CORR, P.B.; GROSS, R.W.; SOBEL, B.E.:
Amphipathic metabolites and membrane dysfunction in ischemic myocardium.
Circ. Res. 55: 135-154 (1984)
- 29 DEMEYERE, R.; LORMANS, P.; WEIDLER, B.; MINTEN, J.;
VAN AKEN, H.; FLAMENG, W.:
Cardioprotective effects of carnitine in extensive aortocoronary bypass grafting:
a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial.
Anesth. Analg. 71: 520-528 (1990)
- 30 DIDONATO, S.:
Disorders of lipid metabolism affecting skeletal muscle:
Carnitine deficiency syndromes, defects in the catabolic pathway and Chanarin
disease.
IN: ENGEL, A.G., FRANZINI-ARMSTRONG, C.:
Myology, 2nd ed., N.Y.: McGraw Hill: 1587-1609 (1994)

- 31 DIDONATO, S.; GARAVAGLIA, B.; RIMOLDI, M.; CARRARA, F.:
Clinical and biomedical phenotypes of carnitine deficiencies.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 81-103 (1992)
- 32 DI LISA, F.; BIEBER, L.L.; KERNER, J.; MENABO, R.; BARBATO, R.;
SILIPRANDI, N.:
Methods for carnitine assay.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 37-62 (1992)
- 33 EL ALAOUI-TALIBI Z.; LANDORMY, S.; LOIREAU, A.; MORAVEC, J.:
Fatty acid oxidation and mechanical performance of volume-overloaded rat
hearts.
Am. J. Physiol. 262: H 1068-H 1074 (1992)
- 34 EL ALAOUI-TALIBI, Z.; MORAVEC, J.:
Carnitine transport and exogenous palmitate oxidation in chronically volume-
overloaded rat hearts.
Biochim. Biophys. Acta 1003: 109-114 (1989)
- 35 ELLIS, R.J.; GARDNER, C.:
Determination of myocardial high-energy phosphates using bioluminescence.
Anal. Biochem. 105: 354-360 (1980)
- 36 ERGÜR, A.T.; TANZER, F.; CETINKAYA, Ö.:
Serum-free carnitine levels in children with heart failure.
J. Trop. Ped. 45:3: 168-169 (1999)

- 37 FELLER, A.G.; RUDMAN, D.:
Role of carnitine in human nutrition.
J. Nutr. 118:5: 541-547 (1988)
- 38 FERRARI, R.; CUCCHINI, F.; DILISA, F.; RADDINO, R.:
The effects of L-carnitine on myocardial metabolism of patients with coronary artery disease.
Clin. Trials J. 21: 40-59 (1984)
- 39 FERRARI, R.; CUCCHINI, F.; VISIOLI, O.:
The metabolic effects of L-carnitine in angina pectoris.
Int. J. Cardiol. 5: 213-216 (1984)
- 40 FERRARI, R.; VISIOLI, O.:
Effects of L-carnitine in coronary artery disease patients.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 265-283 (1992)
- 41 FISHLOCK, R.C.; BIEBER, L.L.; SNOWSWELL, A.M.:
Sources of error in determinations of carnitine and acylcarnitine in plasma.
Clin. Chem. 30/2: 316-318 (1984)
- 42 FOLTS, J.D.; SHUG, A.L.; KOKE, J.R.; BITTAR, N.:
Protection of the ischemic dog myocardium with carnitine.
Am. J. Cardiol. 41: 1209-1214 (1978)
- 43 FORD, D.A.; HAN, X.; HORNER, C.C.; GROSS, R.W.:
Accumulation of unsaturated acylcarnitine molecular species during acute myocardial ischemia: metabolic compartmentalization of products of fatty acyl chain elongation in the acylcarnitine pool.
Biochem. 35: 7903-7909 (1996)

- 44 FRITZ, I.B.; ARRIGONI-MARTELLI, E.:
Sites of action of carnitine and its derivatives on the cardiovascular system:
interactions with membranes.
Trends Pharmacol. Sci. 141: 355-360 (1993)
- 45 GEMPEL, K.; BAUER, M.F.; GERBITZ, K.-D.:
Mitochondriale Erkrankungen.
Deutsches Ärzteblatt, Heft 47: C-2201-C-2207 (1999)
- 46 GUDJONSSON, H.; LI, B.U.K.; SHUG, A.L.; OLSEN, W.A.:
In vivo studies of intestinal carnitine absorption in rats.
Gastroenterology 88:6: 1880-1887 (1985)
- 47 HAMILTON, J.W.; LI, B.U.K.; SHUG, A.L.; OLSEN, W.A.:
Carnitine transport in human intestinal biopsy specimens. Demonstration of an
active transport system.
Gastroenterology 91:1: 10-16 (1986)
- 48 HEARSE, D.J.; SHATTOCK, M.J.; MANNING, A.S.; BRAIMBRIDGE, M.V.:
Protection of the myocardium during ischemic arrest: possible toxicity of
carnitine in cardioplegic solutions.
Thorac. Cardiovasc. Surg. 28: 253-258 (1980)
- 49 HOLTKAMP-ENDEMANN, F.:
Carnitin-Ester und freies Carnitin im Myokard und Plasma bei Kindern mit
angeborenem Herzfehler.
Inauguraldissertation, Gießen 1999
- 50 HOPPEL, C.:
The physiological role of carnitine.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 5-21 (1992)

- 51 HOPPEL, C.; FLOYD, R.; ALBERS, L.; TURKALY, J.:
Pharmacokinetics and bioavailability of L-carnitine in normal humans.
Clin. Res. 38: 833 A (1990)
- 52 HUANG, J.M.C.; XIAN, H.; BACANER, M.:
Long-chain fatty acids activate calcium channels in ventricular myocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6452-6456 (1992)
- 53 HUERTAS, R.; CAMPOS, Y.; DIAZ, E.; ESTEBAN, J.; VECHIETTI, L.;
MONTANARI, G.; DIDDIO, S.; CORSI, M.; ARENAS, J.:
Respiratory chain enzymes in muscle of endurance athletes: Effect of
L-carnitine.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 188: 102-107 (1992)
- 54 IDELL-WENGER, J.A.; GROTYOHANN, L.W.; NEELY, J.R.:
Coenzyme A and carnitine distribution in normal and ischemic hearts.
J. Biol. Chem. 253: 4310-4318 (1978)
- 55 INOUE, F.; TERADA, N.; NAKAJIMA, H.; OKOCHI, M.; KODO, N.;
KIZAKI, Z.; KINUGASA, A.; SAWADA, T.:
Effect of sports activity on carnitine metabolism.
Measurement of free carnitine, gamma-butyrobetaine and acylcarnitines by
tandem mass spectrometry.
J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. 731:1: 83-88 (1999)
- 56 KAMIKAWA, Y.; SUZUKI, Y.; KOBAYASHI, A.:
Effects of L-carnitine on exercise tolerance in patients with stable angina
pectoris.
Jpn. Circ. J. 25: 587-597 (1984)

- 57 KANTOR, P.F.; ROBERTSON, M.A.; COE, J.Y.; LOPASCHUK, G.D.:
Volume overload hypertrophy of the newborn heart slows the maturation of
enzymes involved in the regulation of fatty acid metabolism.
J. Am. Coll. Cardiol. 33:6: 1724-1734 (1999)
- 58 KIRKLIN, J.W.; BARRATT-BOYES, B.G.:
Cardiac surgery.
2nd Ed., New York, Churchill Livingstone 129-166 (1993)
- 59 KOSOLCHAROEN, P.; NAPPI, J.; PEDUZZI, P.:
Improved exercise tolerance after administration of carnitine.
Curr. Thr. Res. 30: 753-764 (1981)
- 60 KREUDER, J.:
Angeborene und erworbene Störungen sowie adaptative Prozesse des
Energistoffwechsels im Herz und Skelettmuskel.
Habilitation, Gießen 1996
- 61 KREUDER, J.; BAUER, J.; BORKHARDT, A.; REPP, R.; DAPPER, F.;
HAGEL, K.J.; LAMPERT, F.:
Myocardial carnitine status in children with congenital heart defects undergoing
cardiac surgery.
Eur. Heart J. 16 suppl I: 109 (1995)
- 62 KREUDER, J.; BAUER, J.; KOLOSSA, I.; WALTHER, T.; RASCHER, W.;
DAPPER, F.; ZICKMANN, B.; PAUL, T.; ZIEMER, G.; LAMPERT, P.:
Myokardialer Carnitin-Stoffwechsel bei kardiochirurgischen Eingriffen im
Kindesalter.
Monatsschrift Kinderheilkunde 142 (suppl 1): S61 (1994)

- 63 LABADIE, J.; DUNN, W.A.; ARONSON, N.N.:
Hepatic synthesis of carnitine from protein-bound trimethyl-lysine.
Lysosomal digestion of methyl-lysine-labelled asialo-fetuin.
Biochem. J. 160:1 85-95 (1976)
- 64 LAMERS, J.M.J.; STINIS, J.T.; MONTFOORT, A.; HÜLSMANN, W.C.:
The effect of lipid intermediates on Ca^{2+} and Na^+ permeability and Na^+/K^+ -
ATPase of cardiac sarcolemma. A possible role in myocardial ischemia.
Biochim. Biophys. Acta 774: 127-137 (1984)
- 65 LIEDTKE, A.J.; NELLIS, S.H.:
Effects of carnitine in ischemic and fatty acid supplemented swine hearts.
J. Clin. Invest. 64: 440-448 (1979)
- 66 LILIENTHAL, J.L.; ZIERLER, K.L.; FOLK, B.P.; BUKA, R.; RILEY, M.J.:
A reference base and system for analysis of muscle constituents.
J. Biol. Chem. 183: 501-508 (1950)
- 67 LOPASCHUK, G.; BELKE, D.; GAMBLE, J.; ITOI, T.; SCHÖNEKESS, B.O.:
Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease.
Biochim. Biophys. Acta 1213: 263-276 (1994)
- 68 LOPASCHUK, G.D.; COLLINS-NAKAI, R.; OLLEY, P.M.;
MONTAGUE, T.J.; MCNEIL, G.; GAYLE, M.; PENKOSKE, P.;
FINEGAN, B.A.:
Plasma fatty acids in infants and adults after myocardial ischemia.
Am. Heart J. 128: 61-67 (1994)
- 69 LOPASCHUK, G.D.; SPAFFORD, M.A.:
Energy substrate utilization by isolated working hearts from newborn rabbits.
Am. J. Physiol. 258: H1274-H1280 (1990)

- 70 LOPASCHUK, G.D.; SPAFFORD, M.A.; DAVIES, N.J.; WALL, S.R.:
Glukose and palmitate oxidation in isolated working rat hearts reperfused after a period of transient global ischemia.
Circ. Res. 66: 546-553 (1990)
- 71 LOSTER, H.; KELLER, T.; GROMMISCH, J.; GRUNDER, W.:
Effects of L-carnitine and its acetyl and propionyl esters on ATP and PCr levels of isolated rat hearts perfused without fatty acids and investigated by means of ³¹P-NMR spectroscopy.
Mol. Cell. Biochem. 200 (1-2): 93-102 (1999)
- 72 LOSTER, H.; PUNZEL, M.:
Effects of L-carnitine on mechanical recovery of isolated rat hearts in relation to the perfusion with Glukose and palmitate.
Mol. Cell. Biochem. 185 (1-2): 65-75 (1998)
- 73 LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J.:
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
- 74 MCGARRY, J.D.; FOSTER, D.W.:
An improved and simplified radioisotopic assay for the determination of free and esterified carnitine.
J. Lip. Res. 17: 277-281 (1976)
- 75 MCGARRY, J.D.; FOSTER, D.W.:
Methods of enzymatic analysis.
In: Bergmeyer HU (ed.).
Weinheim, VCH Verlags-Gesellschaft, vol. 8.: 474-481 (1985)

- 76 MCHOWAT, J.; YAMADA, K.A.; SAFFITZ, J.E., CORR, P.B.:
Subcellular distribution of endogenous long chain acylcarnitines during hypoxia
in adult canine myocytes.
Cardiovasc. Res. 27: 1237-1243 (1993)
- 77 MCMILLIN-WOOD, J.:
Carnitine palmitoyltransferase in neonatal and adult heart and liver mitochondria.
J. Biol. Chem. 250:8: 3062-3066 (1975)
- 78 MOFFITT, E.A.; ROSEVEAR, J.W.; MCGOON, D.C.:
Myocardial metabolism in children having open-heart surgery.
JAMA, Vol 211, 9: 1518-1524 (1970)
- 79 MOTULSKY, H.:
Intuitive Biostatistics.
1. Ed, New York, Oxford University Press (1995)
- 80 NAKAGAWA, T.; SUNAMORI, M.; SUZUKI, A.:
The effect of L-carnitine on myocardial protection in cold cardioplegia followed
by reperfusion.
Thorac. Cardiovasc. Surgeon 42: 85-89 (1994)
- 81 NAKANO, C.; TAKASHIMA, S.; TAKESHITA, K.:
Carnitine concentration during the development of human tissues.
Early Hum. Dev. 19:1: 21-27 (1989)
- 82 NAYLOR, E.W., CHACE D.H.:
Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders
in fatty acid, organic acid, and amino acid metabolism.
J. Child. Neurol 14 (Suppl 1): S4-8 (1999)

- 83 NOVAK, M.:
Carnitine in perinatal metabolism of lipids.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 103-117 (1992)
- 84 NOVAK, M.:
Carnitine supplementation in soy-based formula-fed infants.
Biol. Neonate 58 (suppl 1): 89-92 (1990)
- 85 NOVAK, M.:
Colorimetric ultramicromethod for the determination of free fatty acids.
J. Lip. Res. 6: 431-434 (1965)
- 86 OLSON, A.L.; REBOUCHE, C.J.:
Renal conservation of carnitine by infants and adults:
no evidence of developmental regulation.
Early Hum. Dev. 19: 29-38 (1989)
- 87 OPIE, L.H.:
The heart. Physiology and metabolism.
Raven Press, New York, 2nd Ed (1991)
- 88 PASTORIS, O.; DOSSENA, M.; FOPPA, P.; CATAPANO, M.;
ARBUSTINI, E.; BELLINI, O.; DAL BELLO, B.; MINZIONO, G.;
CERIANA, P.; BARZAGHI, N.:
Effect of L-carnitine on myocardial metabolism: results of a balanced, placebo-
controlled, double-blind study in patients undergoing open heart surgery.
Pharmacol. Res. 37 (2): 115-122 (1998)

- 89 PAULSON, D.J.; SCHMIDT, M.J.; ROMENS, J.; SHUG, A.L.:
Metabolic and physiological differences between zero-flow and low-flow myocardial ischemia: effects of L-acetylcarnitine.
Basic Res. Cardiol. 79: 551-561 (1984)
- 90 PAULSON, D.J.; SHUG, A.L.:
Experimental evidence of the anti-ischemic effect of L-carnitine.
IN: DE JONG, J.W.; FERRARI, R.:
The carnitine system - a new therapeutical approach to cardiovascular diseases.
Kluwer Academic Publishers 162: 183-199 (1995)
- 91 PENN, D.; LUDWIGS, B.; SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; PASCU, F.:
Effect of nutrition on tissue carnitine concentrations in infants of different gestational ages.
Biol. Neonate 47: 130-135 (1985)
- 92 PENN, D.; SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; WOLF, H.:
Carnitine deficiency in premature infants receiving total parenteral nutrition.
Early Hum. Dev. 4:1: 23-34 (1980)
- 93 PERSSON, B.:
Determination of plasma acetoacetate and D-b-Hydroxybutyrate in newborn infants by an enzymatic fluorimetric micro-method.
Scand. J. Clin. Lab. Invest 25: 9-14 (1969)
- 94 PIERPONT, M.E.; JUDD, D.; BORGWARDT, B.; NOREN, G.;
STALEY, N.A.; EINZIG, S.:
Carnitine alterations in spontaneous and drug-induced turkey congestive cardiomyopathy.
Pediatr. Res. 19:5: 415-420 (1985)

- 95 PIERPONT, M.E.; JUDD, D.; GOLDENBERG, I.F.; RING, W.S.;
OLIVARI, M.T.; PIERPONT, G.L.:
Myocardial carnitine in end-stage congestive heart failure.
Am. J. Cardiol. 64: 56-60 (1989)
- 96 PIPER, H.M.; NOLL, T.; SIEGMUND, B.:
Mitochondrial function in the oxygen depleted and reoxygenated myocardial
cell.
Cardiovasc. Res. 28: 1-15 (1994)
- 97 PIPER, H.M.; NOLL, T.; SIEGMUND, B.:
Mitochondrial injury in the ischemic-reoxygenated cardiomyocyte: the role of
lipids and other pathogenic factors.
IN: DE JONG, J.W.; FERRARI, R.:
The carnitine system - a new therapeutical approach to cardiovascular diseases.
Kluwer Academic Publishers 162: 101-122 (1995)
- 98 PRADER, A.; LARGO, R.H.; MOLINARI, L.; ISSLER, C.:
Physical growth of Swiss children from birth to twenty years of age.
Helvet. Peadiatr. Acta 43 (suppl 52): 1-125 (1989)
- 99 RAMSAY, R.R.; ARDUINI, A.:
Perspectives in biochemistry and biophysics:
The carnitine acyltransferases and their role in modulating acyl-CoA pools.
Arch. Biochem. Biophys., Vol. 302, 2: 307-314 (1993)
- 100 REBOUCHE, C.J.; ENGEL, A.G.:
Carnitine metabolism and deficiency syndromes.
Mayo Clin. Proc. 58:8: 533-540 (1983)
- 101 REBOUCHE, C.J.; ENGEL, A.G.:
Tissue distribution of carnitine biosynthetic enzymes in man.
Biochim. Biophys. Acta 630:1: 22-29 (1980)

- 102 REBOUCHE, C.J.; MACK, D.L.:
Sodium gradient-stimulated transport of L-carnitine into renal brush border membrane vesicles: kinetics, specificity and regulation by dietary carnitine.
Arch. Biochem. Biophys. 235:2: 393-402 (1984)
- 103 REGITZ, V.; BOSSALLER, C.; STRASSER, R.; MÜLLER, M.; SHUG, A.; FLECK, E.:
Metabolic alterations in end-stage and less severe heart failure-myocardial carnitine decrease.
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 28: 611-617 (1990)
- 104 REGITZ, V.; SHUG, A.L.; FLECK, E.:
Defective myocardial carnitine metabolism in congestive heart failure secondary to dilated cardiomyopathy and to coronary, hypertensive and valvular heart diseases.
Am. J. Cardiol. 65: 755-760 (1990)
- 105 REGITZ, V.; FLECK, E.:
Role of carnitine in heart failure.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 295-325 (1992)
- 106 REIBEL, D.K.; OROURKE, B.; FOSTER, K.A.:
Mechanisms for altered carnitine content in hypertrophied rat hearts.
Am. J. Physiol. 252:3, Pt2: 561-565 (1987)
- 107 RIZZA, V.; LOREFICE, R.; RIZZA, N.; CALABRESE, V.:
Pharmacokinetics of L-Carnitine in human subjects.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 63-77 (1992)

- 108 ROSSI, A.; LORTET, S.:
Energy metabolism patterns in mammalian myocardium adapted to chronic
physiopathological conditions.
Cardiovascular Research 31: 163-171 (1996)
- 109 SACHS, L.:
Angewandte Statistik.
7. Ed., Berlin, Springer (1992)
- 110 SAWA, Y.; MATSUDA, H.; SHIMAZAKI, Y.; HIROSE, H.; KADOKA, K.;
TAKAMI, H.; NAKADA, T.; KAWASHIMA, Y.:
Ultrastructural assessment of the infant myocardium receiving crystalloid
cardioplegia.
Circ. 76:5 Pt 2: V 141-145(1987)
- 111 SCAGLIA, F.; LONGO, N.:
Primary and secondary alterations of neonatal carnitine metabolism.
Seminars in Perinatology, 23: 152-161 (1999)
- 112 SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; NOVAK, M.; PENN, D.; WIESER, P.B.,
BUCH, M.; HAHN, P.:
Carnitine and development of newborn adipose tissue.
Pediatr. Res. 12:5: 660-664 (1978)
- 113 SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; PENN, D.:
Carnitinmangel.
Monatsschr. Kinderheilkd. 134: 224-231 (1986)
- 114 SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; PENN, D.:
Role of carnitine in children receiving total parenteral nutrition.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 117-136 (1992)

- 115 SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; PENN, D.; BIEBER, L.L.; KERNER, J.;
ROSSI, T.M.; LEBENTHAL, E.:
Carnitine ester excretion in pediatric patients receiving parenteral nutrition.
Pediatr. Res. 28:2: 158-165 (1990)
- 116 SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; PENN, D.; WOLF, H.:
The influence of maternal fat metabolism on fetal carnitine levels.
Early Hum. Dev. 5:3: 233-242 (1981)
- 117 SCHMIDT-SOMMERFELD, E.; WERNER, D.; PENN, D.:
Carnitine plasma concentrations in 353 metabolically healthy children.
Eur. J. Paed. 147: 356-360 (1988)
- 118 SHAW, R.D.; LI, B.U.K.; HAMILTON, J.W.; SHUG, A.L.; OLSEN, W.A.:
Carnitine transport in rat small intestine.
Am. J. Physiol. 245:3: G376-381 (1983)
- 119 SHUG, A.L.; THOMSEN, J.H.; FOLTS, J.D.; BITTAR, N.; KLEIN, M.I.;
KOKE, J.R.; HUTH, P.J.:
Changes in tissue levels of carnitine and other metabolites during myocardial
ischemia and anoxia.
Arch. Biochem. Biophys. 187: 25-33 (1978)
- 120 SILIPRANDI, N.; DILISA, F.; PIVETTA, A.; MIOTTO, G.; SILIPRANDI, D.:
Transport and function of L-carnitine and L-propionylcarnitine:
relevance to some cardiomyopathies and cardiac ischemia.
Z. Kardiol. 5: 34-40 (1987)
- 121 SILVERMAN, N.A.; SCHMITT, G.; VISHWANATH, M.; FEINBERG, S.;
LEVITSKY, S.:
Effect of carnitine on myocardial function and metabolism following global
ischemia.
Ann. Thoracic Surg. 40: 20-24 (1985)

- 122 SIMKHOVICH, B.Z.; HALE, S.L.; KLONER, R.A.:
Effect of ischemic preconditioning on carnitine-linked metabolism in the rabbit heart.
Cor. Art. Dis. 3: 141-147 (1992)
- 123 SINDEN, A.A.; SUTPHEN, J.:
Growth and nutrition.
IN: EMMANOULIDES, G.C.; RIEMENSCHNEIDER, T.A.; ALLEN, H.D.:
Heart disease in infants, children and adolescents.
5th Ed. Baltimore: Williams & Wilkins: 367-373 (1995)
- 124 SINGH, R.B.; NIAZ, M.A.; AGARWAL, P; BEEGUM, R.; RASTOGI, S.S.;
SACHAN, D.S.:
A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of L-carnitine in suspected acute myocardial infarction.
Postgrad. Med. J. 72: 45-50 (1996)
- 125 SPAGNOLI, L.G.; CORSI, M.; VILLASCHI, S.; PALMIERI, G.;
MACCARI, F.:
Myocardial carnitine deficiency in acute myocardial infarction.
Lancet : 1419-1420 (1982)
- 126 STANLEY, C.A.:
Plasma and mitochondrial membrane carnitine transport defects.
New developments in fatty acid oxidation.
Wiley-Liss, Inc.: 289-300 (1992)
- 127 STANLEY, C.A.; HALE, D.E.; BERRY, G.T.; DELEEUW, S.; BOXER, J.;
BONNEFONT, J.P.:
A deficiency of carnitine-acylcarnitine Translokase in the inner mitochondrial membrane.
N. Engl. J. Med. 327: 19-23 (1992)

- 128 SUBRAMANIAN, R.; PLEHN, S.; NOONAN, J.; SCHMIDT, M.; SHUG, A.L.:
Free radical-mediated damage during myocardial ischemia and reperfusion and
protection by carnitine esters.
Z. Kardiol. 76 (Suppl 5): 41-45 (1987)
- 129 SUGDEN, M.C.; HOLNESS, M.J.:
Interactive regulation of the pyruvate dehydrogenase complex and the carnitine
palmitoyltransferase system.
FASEB J. 8: 54-61 (1994)
- 130 SUZUKI, Y.; KAMIKAWA, T.; KOBAYASHI, A.; MASUMURA, Y.;
YAMAZAKI, N.:
Effects of L-carnitine on tissue levels of acyl carnitine, acyl coenzyme A and
high energy phosphate in ischemic dog hearts.
Jpn. Circ. J. 45: 687-694 (1981)
- 131 SUZUKI, Y.; MASUMURA, Y.; KOBAYASHI, A.; YAMAZAKI, N.;
HARADA, Y.; OSAWA, M.:
Myocardial carnitine deficiency in chronic heart failure.
Lancet 1 (8263): 116 (1982)
- 132 TAEGTMEYER, H.:
Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications.
Lancet 345: 1552-1555 (1995)
- 133 TAMAI, I.; OHASHI, R.; NEZU, J.; YABUUCHI, H.; OKU, A.;
SHIMANE, M.; SAI, Y.; TSUJI, A.:
Molecular and functional identification of sodium ion-dependent, high affinity
human carnitine transporter OCTN2.
J. Biol. Chem. 273:32: 20378-20382 (1998)

- 134 TATLICAN, O.; KALAYCIOGLU, S.; GOKGOZ, L.; OKTAR, L.; OZ, E.; SONCU, L.H.; SINCI, V.; TURKOZKAN, N.; YENER, A.; ERSOZ, A.:
The dose-dependent effects of L-carnitine in myocardial protection in normothermic ischemia.
Cardiovasc. Surg. 6 (2): 145-148 (1998)
- 135 TEIN, I.; DIMAURO, S.:
Primary systemic carnitine deficiency manifested by carnitine-responsive-cardiomyopathy.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 155-187 (1992)
- 136 TREEM, W.R.; STANLEY, C.A.; FINEGOLD, D.N.; HALE, D.E.; COATES, P.M.:
Primary carnitine deficiency due to a failure of carnitine transport in kidney, muscle and fibroblasts.
N. Engl. J. Med. 319: 1331-1336 (1988)
- 137 VALKNER, K.J.; BIEBER, L.L.:
Short-chain acylcarnitines of human blood and urine.
Biochem. Med. 28:2: 197-203 (1982)
- 138 VAN DER VUSSE, G.J.; GLATZ, J.F.C.; STAM, H.C.G.; RENEMAN, R.S.:
Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart.
Physiol. Rev. 72: 881-940 (1992)
- 139 VARY, T.C.; NEELY, J.R.:
Characterization of carnitine transport in isolated perfused adult rat hearts.
Am. J. Physiol. 242: H 585-H 592 (1982)

- 140 VARY, T.C.; NEELY, J.R.:
Sodium dependence of carnitine transport in isolated perfused adult rat hearts.
Am. J. Physiol. 244: H 247-H 252 (1983)
- 141 VARY, T.C.; REIBEL, D.K.; NEELY, J.R.:
Control of energy metabolism of heart muscle.
Ann. Rev. Physiol. 43: 419-430 (1981)
- 142 VISIOLI, O.; PASINI, E.; DEGIULI, F.; FERRARI, R.:
Molecular mechanism of action of L-carnitine in treatment of myocardial disorders at the experimental level.
IN: FERRARI, R.; DIMAURO, S.; SHERWOOD, G.:
L-Carnitine and its role in medicine: from function to therapy.
London, Academic Press: 237-265 (1992)
- 143 WALTHER, T.:
Adenosintriphosphat, Kreatinphosphat und Carnitin im Myokard bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern.
Inauguraldissertation, Gießen 1999
- 144 WHITMER, J.T.; IDELL-WENGER, J.A.; ROVETTO, M.J.; NEELY, J.R.:
Control of fatty acid metabolism in ischemic and hypoxic hearts.
J. Biol. Chem. 253: 4305-4309 (1978)
- 145 WINTER, S.C.; LINN, L.S.; HELTON, E.:
Plasma carnitine concentrations in pregnancy, cord blood, and neonates and children.
Clin. Chim. Acta 243: 87-93 (1995)
- 146 WU, J.; CORR, P.B.:
Influence of long-chain acylcarnitines on voltage-dependent calcium current in adult ventricular myocytes.
Am. J. Physiol. 263: H 410-H 417 (1992)

- 147 WU, J.; CORR, P.B.:
Palmitoylcarnitine increases $[Na^+]_i$ and initiates transient inward current in adult ventricular myocytes.
Am. J. Physiol. 268: H 2405-2417 (1995)
- 148 WU, J.; MCHOWAT, J.; SAFFITZ, J.E.; YAMADA, K.A.; CORR, P.B.:
Inhibition of gap junctional conductance by long-chain acylcarnitines and their preferential accumulation in junctional sarcolemma during hypoxia.
Circ. Res. 72: 879-889 (1993)
- 149 ZAMORA, S.; BENADOR, N.; LACOURT, G.; GIRARDIN, E.:
Renal handling of carnitine in ill preterm and term neonates.
J. Pediatr. 127: 975-978 (1995)
- 150 ZUCKERBERG, A.L.; DEUTSCHMAN, C.S.; CABALLERO, B.:
Nutrition and metabolism in the critically ill child with heart disease.
IN: NICHOLS, D.G.; CAMERON, D.E.; GREELY, W.J.; LAPPE, D.G.;
UNGERLEIDER, R.M.; WETZEL, R.C.:
Critical heart disease in infants and children.
St. Louis: Mosby: 415-436 (1995)

9. DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Joachim Kreuder für seine außerordentlich gute fachliche *und* menschliche Betreuung während des gesamten Prozesses der Erstellung dieser Arbeit.

Ebenso danken möchte ich Frau M. Lützen für ihre herzliche, freundschaftliche Zusammenarbeit und ihre immerwährende Bereitschaft, auftauchende Fragen zu beantworten und Schwierigkeiten bei der Durchführung der Methodik zu bewältigen.

Herrn Prof. Dr. Dapper, Herrn Dr. Kroll und den Anästhesisten Herrn Dr. Zickmann, Herrn Dr. Knothe, Herrn Dr. Osmer und Herrn Dr. Zeiler danke ich für die Entnahme der Myokardproben sowie die Organisation und Zusammenarbeit im Operationssaal.

Ein herzliches Dankeschön auch den Ärzten und dem Pflegepersonal der Stationen Bessau und Czerny der Universitätskinderklinik Gießen für ihre Hilfe bei der Entnahme der Blutproben.

Auch den Eltern der Patienten gilt mein Dank, dass sie sich dazu bereit erklärten, ihre Kinder an der Studie teilnehmen zu lassen. Ohne die fruchtbare Zusammenarbeit mit den Patienten wäre ein Weiterkommen in der Wissenschaft nicht möglich.

Herzlichen Dank auch an Herrn Dipl.-Psych. Thomas Kubiak von der Diabetes-Klinik Bad Mergentheim für seine Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meiner Schwester Dr. phil. Sandra Kluwe für ihre unentbehrliche Hilfe bei der Besorgung von Literatur und beim Korrekturlesen sowie bei meinen Eltern, ohne deren langjährige liebevolle und fürsorgliche Unterstützung eine Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein letzter und innigster Dank gilt meiner lieben kleinen Tochter, deren unkompliziertes Wesen mir den notwendigen Freiraum ließ, sowie meinem Ehemann für seine unentwegte Ermutigung, die kritischen und fachlichen Diskussionen und nicht zuletzt das Korrekturlesen.

LEBENS LAUF

Name: Isabel Katrin Kipp, geb. Kluwe

geboren: 29.07.1971 in Stuttgart/Bad Cannstatt

Eltern: Prof. Ekkehard Kluwe; Studiendirektor
Ingeborg Kluwe, geb. Gerdes; Oberstudienrätin

Familie: Ehemann Dr. med. Christian Georg Kipp
Tochter Sophie Kristin Kipp, geb.: 21.09.1999

1977-1981 Grundschule Besigheim

1981-1990 Christoph-Schrempf-Gymnasium Besigheim

Mai 1990 Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

WS 90/91 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin
an der Justus-Liebig-Universität Gießen

September 1992 Ärztliche Vorprüfung

März 1994 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

September 1996 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/96-10/97 Praktisches Jahr am akademischen Lehrkrankenhaus der
Universität Gießen, Bad Hersfeld, Wahlfach Pädiatrie

Oktober 1997 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

12/97-06/99 Ärztin im Praktikum, Kinderklinik St. Anastift, Ludwigshafen

Juni 1999 Approbation als Ärztin

04/00-04/01	Ärztliche Aushilfstätigkeit in der Kinderklinik des Caritas-Krankenhauses Bad Mergentheim
07/00-05/01	Weiterbildungsassistentin in der Kinderarztpraxis Fritz Reuter, Weikersheim.
Seit 01.05.2001	Assistenzärztin in der Kinderklinik des Caritas-Krankenhauses Bad Mergentheim