

Einfluss des ACE-Hemmers Ramiprilat auf ventrikuläre Kardiomyozyten adulter Ratten

Jan Patrick Schuckenböhmer



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Einfluss des ACE-Hemmers Ramiprilat auf
ventrikuläre Kardiomyozyten adulter Ratten**

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jan Patrick Schuckenböhmer
aus Göppingen

Gießen 2014

Aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gf. Direktor: Prof. Dr. R. Schulz

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. S. Gattenlöhner

Betreuer: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. S. Schäfer

Prüfungsmitglied: Prof. Dr. M. Rickert

Tag der Disputation: 10.04.2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
1 Einleitung	4
1.1 Die Herzinsuffizienz	4
1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, das Kallikrein-Kinin- System, Angiotensin-Konversions-Enzym und dessen Hemmung.....	8
1.3 Bradykinin und Icatibant (HOE 140).....	12
1.4 Stickstoffmonoxid (NO) und L-Nitro-Arginin (L-NA)	14
1.5 Einflüsse von Ramiprilat, Bradykinin und NO auf Endothelzellen	15
1.6 Einflüsse von Ramiprilat, Bradykinin und NO auf Herzmuskelzellen	16
1.7 In-Vitro- vs. In-Vivo-Modell und das humane System.....	17
1.8 Zielsetzung	18
2 Material	20
2.1 Chemikalien.....	20
2.2 Medien.....	21
2.3 Puffer.....	22
2.4 Geräte und Laborbedarf.....	23
2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur	23
2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion.....	24
2.4.3 Sonstige Geräte	24
2.4.4 Verbrauchsmaterialien	24
2.4.5 Software-Einsatz	24
3 Methoden	25
3.1 Isolierung von Kardiomyozyten adulter Ratten.....	25
3.1.1 Auswahl der Versuchstiere.....	25
3.1.2 Präparation der Kardiomyozyten	25
3.1.3 Inkubation der isolierten Kardiomyozyten	26
3.2 Analysen zu den Veränderungen der Elektromobilität.....	27
3.3 Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	28
3.4 Messung der Kardiomyozyten-Kontraktionen im elektrischen Feld	28
3.4.1 Probenvorbereitung.....	28
3.4.2 Elektrische Stimulation und Steuerung der Kardiomyozyten-Kontraktionen..	29
3.4.3 Messung der Kontraktionsparameter.....	30
3.4.4 Messprotokoll.....	32
3.5 Statistische Aufbereitung der Messdaten	32

4	Ergebnisse	33
4.1	Einfluss von Ramiprilat auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen adulter Ratten	33
4.1.1	ACE-Expression in Kardiomyozyten	33
4.1.2	Einfluss von Ramiprilat auf die Zellkontraktilität.....	34
4.1.3	Einfluss von Ramiprilat auf die Kontraktionsgeschwindigkeit.....	35
4.1.4	Einfluss von Ramiprilat auf die Relaxationsgeschwindigkeit und die R50.....	38
4.2	Einfluss von Bradykinin (BK) auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen adulter Ratten	40
4.2.1	Einfluss von Bradykinin auf die Zellkontraktilität	40
4.2.2	Einfluss von Bradykinin auf die Kontraktions- und Relaxations- geschwindigkeit.....	42
4.3	Einfluss von BK auf Kardiomyozyten bei Anwendung des Bradykinin-Rezeptor- Antagonisten HOE140 und Hemmung der NO-Synthese durch L-NA	45
4.4	Einfluss von Ramiprilat auf Kardiomyozyten bei Anwendung des Bradykinin- Rezeptor-Antagonisten HOE140 und L-NA.....	50
4.5	Erkundung möglicher Einflüsse von Ramiprilat auf die AP-1-Aktivierung sowie auf die ACE-Expression an Kardiomyozyten.....	56
4.5.1	Nachweis für fehlende Ramiprilat-Einflüsse auf die AP-1-Aktivierung in Herzmuskelzellen	56
4.5.2	Nachweis für fehlende Ramiprilat-Einflüsse auf die ACE-Expression an Herzmuskelzellen	58
5	Diskussion.....	60
5.1	Ausgangsdaten für den wissenschaftlichen Diskurs.....	60
5.2	Einfluss von Ramiprilat auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten ..	61
5.3	Fehlender Einfluss des Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE140 und von L- NA auf Ramiprilat-Effekte an Kardiomyozyten	62
5.4	Erörterung einer möglichen direkten Einflussnahme von Ramiprilat auf Kardiomyozyten.....	63
5.5	Ramiprilat- und Bradykinin-Einflüsse auf die AP-1-Aktivierung sowie auf die ACE-Expression an Kardiomyozyten	65
5.6	Einflüsse von Bradykinin auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten sowie deren Hemmung durch HOE140 und L-NA.....	66
5.7	Abschließende Interpretation und Diskussion der Ergebnisse sowie Vergleich mit der aktuellen Datenlage	68
6	Zusammenfassung.....	72

Inhaltsverzeichnis

7	Abstract.....	73
9	Abbildungsverzeichnis.....	77
10	Tabellenverzeichnis	81
11	Literaturverzeichnis.....	83
	Erklärung zur Dissertation	90
	Danksagung	91
	Curriculum vitae	92

1 Einleitung

1.1 Die Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz oder *Insufficiencia cordis* ist ein klinisches Syndrom, das den Zustand des Herzens beschreibt, bei dem zwischen der vom Herzen geförderten Blutmenge und dem Blutbedarf der Körpergewebe, den diese zur Aufrechterhaltung ihrer metabolischen Prozesse benötigen, ein Missverhältnis entsteht. Dies zeigt sich darin, dass das Herz nicht mehr in der Lage ist, eine ausreichende Leistung zu vollbringen, aufgrund eines Vorwärtsversagens mit unzureichendem systolischen Auswurfvolumen oder eines Rückwärtsversagens mit ungenügender ventrikulärer Füllung, was somit eine Minderung des Herzzeitvolumens zur Folge hat.

Dies geht mit einer Abnahme der Kontraktilität und der zugehörigen Kontraktionsparameter des Herzens einher, da sich das Herzzeitvolumen aus dem Produkt der Herzfrequenz und des Schlagvolumens bestimmen lässt und sich dieses wiederum aus der Vorlast, der Nachlast und der Kontraktilität zusammensetzt.

Es kann den linken, den rechten oder beide Ventrikel betreffen; man spricht dann entsprechend von einer Links-, Rechts- oder Globalherzinsuffizienz. Des Weiteren unterscheidet man noch die systolische von der diastolischen Dysfunktion.

Zwischen 800.000 und 1.600.000 Personen leiden in der Bundesrepublik Deutschland an einer Herzinsuffizienz und diese Zahl wird in Zukunft weiter zunehmen [DEGAM-Leitlinie Nr. 9, AWMF-Leitlinien-Register Nr.053/014, 01.11.2006].

Bei Patienten ab dem 65. Lebensjahr ist Herzinsuffizienz die meist gestellte Diagnose. Sie war im Jahr 2011 mit 380 094 registrierten Fällen der häufigste Grund für einen krankheitsbedingten stationären Krankenhausaufenthalt [Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr. 95/2008 und Tabelle zu stationären Krankenhausaufenthalten 2011 vom 05.02.2013].

Im Jahr 2011 lag die Herzinsuffizienz an dritter Stelle der zehn häufigsten Todesursachen aller Sterbefälle in der Bundesrepublik Deutschland. Aufgeteilt nach Geschlechtern war sie bei den Männern die fünfthäufigste, bei den Frauen die zweithäufigste Todesursache [Statistisches Bundesamt, Tabellen zu Sterbefällen vom 06.12.2012].

Die Ursachen der Herzinsuffizienz lassen sich pathophysiologisch in drei Gruppen einteilen [nach Boecker, Pathologie, 2000]:

a) Druck- oder Volumenbelastung des Herzens, als systolische hämodynamische Störung, wie zum Beispiel die arterielle Hypertonie, die als eigenständiger Risikofaktor über eine kompensatorische Myokardhypertrophie die Entstehung einer Herzinsuffizienz begünstigt [Levy et al., 1990], oder die pulmonale Hypertonie.

b) Myokardiale Erkrankungen, wie zum Beispiel die koronare Herzerkrankung, die kardiale Fibrose oder der Zustand nach Myokardinfarkt, die die Kontraktilität des Herzens aufgrund einer Schädigung des Herzmuskels beeinträchtigen.

c) eine diastolische Behinderung der Ventrikelfüllung zum Beispiel durch Herzklappenvitien oder die restriktive Kardiomyopathie.

Wobei als weitere Ursache sicher noch die Herzrhythmusstörungen jeglicher Pathogenese zu nennen sind (siehe auch Nationale Versorgungsleitlinie chronische Herzinsuffizienz Langfassung vom März 2012/ S.21, Abb.3).

Verschiedene Kompensationsmechanismen des Körpers werden aktiviert und versuchen, der Progression entgegenzuwirken durch

- eine vermehrte Sympathikusaktivität,
- den Frank-Starling-Mechanismus,
- eine linksventrikuläre Myokardhypertrophie,
- eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems,
- eine volumeneliminierende und gefäßerweiternde Gegenregulation durch diuretische und vasoaktive Substanzen.

Die daraus resultierenden Folgeerscheinungen einer eingeschränkten Herzfunktion sind die periphere Ödembildung, Lungenstauung und Herzversagen (s. Abb. 1).

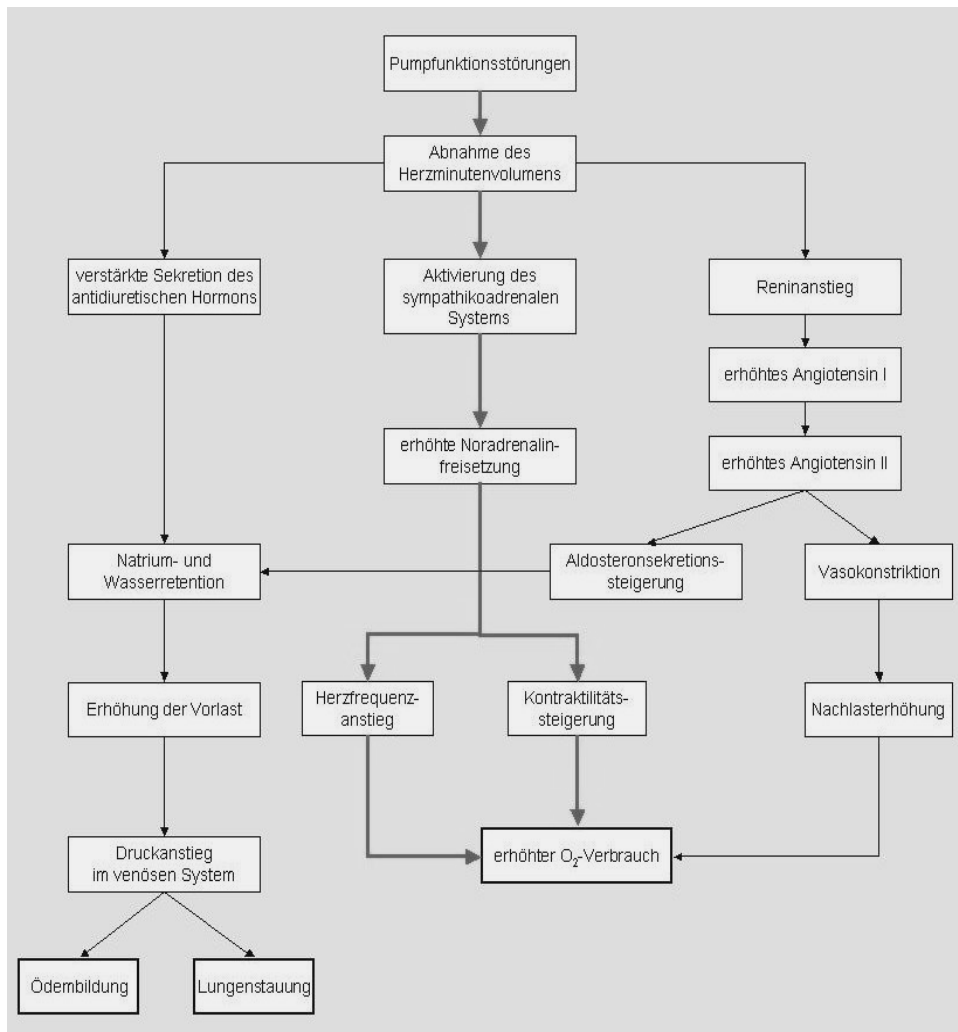


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Folgeerscheinungen einer gestörten Pumpfunktion mit der Folgewirkung einer Erhöhung der Vorlast sowie Nachlast und daraus folgender Flüssigkeitsretention und verschlechterter Energiebilanz des Myokards [aus Gerok, Die Innere Medizin, 2000].

Die Aktivierung dieser Mechanismen führt jedoch zu einem Circulus vitiosus, aus dem man durch die Gabe verschiedener Medikamente, die an unterschiedlichen Punkten angreifen, zu entkommen versucht (s. Abbildung 2).

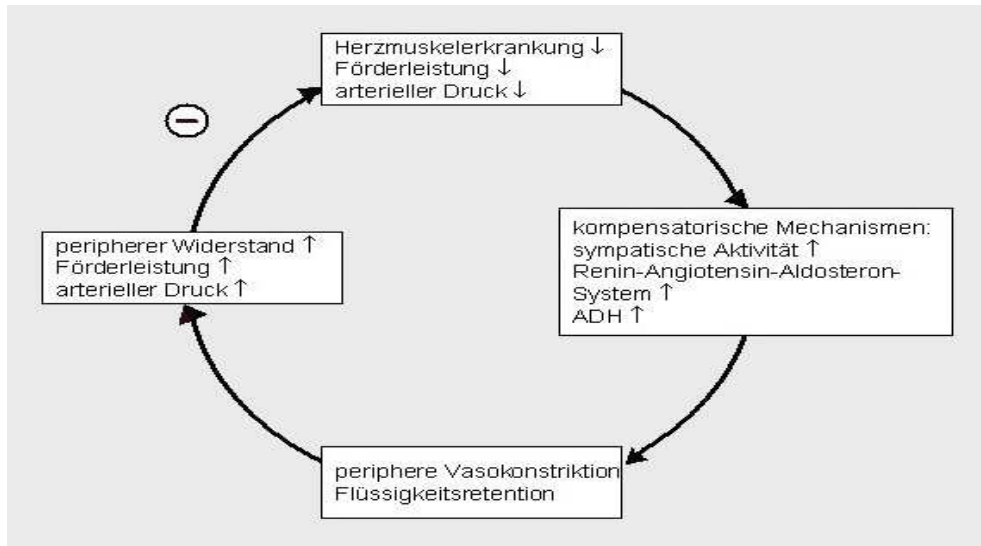


Abbildung 2: Circulus vitiosus [aus Gerok, Die Innere Medizin, 2000]

In der medikamentösen Therapie der Herzinsuffizienz werden verschiedene Präparate angewandt, unter anderem die Gruppe der ACE-Hemmer, die in das Renin-Angiotensin-Aldosteron- sowie in das Kallikrein-Kinin-System eingreifen und so den Circulus vitiosus an allen beschriebenen Punkten durchbrechen können. ACE-Hemmer sind in allen NYHA-Stadien der Herzinsuffizienz zur Therapie indiziert (Einteilung und Therapie siehe Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz vom März 2012). Ebenso in der Therapie der Hypertonie, der diabetischen Nephropathie und des Zustands nach Myokardinfarkt haben sie inzwischen ihren Platz gefestigt (siehe Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie der Deutschen Hochdruckliga vom 01.06.2008).

ACE-Hemmer, wie Ramiprilat, haben kardioprotektive Effekte nach kurzzeitiger Ischämie und Reperfusion durch Reduzierung von Arrhythmien sowie Verbesserung der zellulären Herzfunktion und des kardialen Metabolismus [Linz et al., 1986].

Lokale ACE-Hemmung vermittelt vermutlich die kardioprotektive Wirkung von Ramiprilat am Herzen [Schölkens et al., 1988]. Ramiprilat reduziert die linksventrikuläre Myokardhypertrophie nach Druckbelastung durch aortic-banding bei der Ratte [Linz et al., 1995].

Die genaue Wirkungsweise der ACE-Inhibitoren auf zellulärer Ebene an Kardiomyozyten ist auch weiterhin noch nicht ausreichend geklärt.

1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, das Kallikrein-Kinin-System, Angiotensin-Konversions-Enzym und dessen Hemmung

Nach der Entdeckung von Renin durch Tigerstedt und Bergman im Jahre 1898 und dem Verständnis um seine hypertensive Wirkung dauerte es 42 Jahre bis zu der Erkenntnis, dass Renin ein Enzym ist, das aus einem inaktiven Proteinsubstrat eine aktive Substanz produziert [Braun-Menendez et al., 1940]. Diese nannte man erst Hypertensin, dann Angiotonin und später Angiotensin; das Vorläufersubstrat war somit Angiotensinogen.

In der Zwischenzeit wurde der hypotensive Einfluss des Kallikrein-Kinin-Systems durch Abelous und Bardier 1909 festgestellt und C.A. Frey fand 1930 erstmalig hochmolekulares Kininogen im Urin. Im Jahre 1948 entdeckten daraufhin die brasilianischen Physiologen und Pharmakologen Dres. M. Rocha e Silva, W.T. Beraldo und G. Rosenfeld im Tierversuch nach Zugabe des Schlangengifts der brasilianischen Lanzenotter (*Bothrops jararaca*) das Nonapeptid Bradykinin [Rocha e Silva et al., 1949]. Die Wissenschaftler der medizinischen Fakultät von Ribeirão Preto der Universität in São Paulo stellten starke hypotensive Wirkungen nach Gabe des Giftes fest, woraufhin Dr. S.H. Ferreira das Bradykininpotenzierende Peptid (BPP_{5a}) daraus isolieren [Ferreira, 1965] und die Tripeptidsequenz Tryptophan-Alanin-Prolin als wirksame Komponente identifizieren konnte (s. Abbildung 4).

Weitere Erkenntnisse zur hormonellen Blutdruckregulation kamen in den fünfziger Jahren mit der Beschreibung der physiologischen Wirkung von Aldosteron durch Simpson et al. 1952, des Renin-Angiotensin-Systems und des Angiotensin-Konversions-Enzyms [Gross, 1958].

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist ein wichtiges und potentes Mittel zur Aufrechterhaltung einer suffizienten Herzfunktion durch Steuerung des Blutdrucks und des Salzhaushalts. Das RAAS kommt im menschlichen Körper als zu etwa 90% gewebeständiges lokales, welches für Langzeiteffekte zuständig sein soll, und zu etwa 10% als zirkulierendes RAAS, welches für kurzzeitige lokale Effekte verantwortlich sein soll, vor [Dzau, 1988]. Klassischerweise wird durch Stimulation der Barorezeptoren der Vasa afferentia, Abfall der glomerulären Filtrationsrate, einem Anstieg der Natrium- und Chlorid-Ionen-Konzentration an der Macula densa und noradrenerge Stimulation durch das sympathische Nervensystem über β -Rezeptoren die Aspartyl-Protease Renin aus spezialisierten Zellen des juxtaglomerulären Apparates der Niere freigesetzt. Diese spaltet aus dem der Leber abstammenden α 2-Globulin Angiotensi-

nogen das Dekapeptid Angiotensin I ab. Dieses biologisch inaktive Peptid wird wiederum durch das Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE), einer Dipeptidylkarboxypeptidase, in das biologisch aktive Angiotensin II mittels Abspaltung der zwei C-terminalen Aminosäuren überführt [Keeton und Campbell, 1980]. Angiotensin II wirkt vor allem über den AT₁- und in geringem, gegensätzlichem Ausmaß über den AT₂-Rezeptor. Hierüber beeinflusst Angiotensin II unter anderem die Aldosteron-Ausschüttung aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde.

Das Angiotensin-Konversions-Enzym ist eine transmembranäre Zinkmetallopeptidase, welche ortsständig auf Zelloberflächen, vor allem auf Endothelzellen der Lunge, der Nieren, an Mastzellen und auch am Myokard exprimiert wird [Studer et al., 1992]. Es kommt auch als im Plasma lösliches ACE (soluble ACE) und als ACE-2 Isoform vor, der aber nur eine geringe Rolle beigemessen wird. Yang et al. entdeckten 1970, dass die Kininase II identisch mit ACE ist und somit eine Brücke zwischen dem RAAS und dem Kallikrein-Kinin-System bildet [Yang et al., 1970]. Somit hemmen ACE-Inhibitoren nicht nur die Bildung des aktiven Angiotensin II, sondern auch die Inaktivierung des Bradykinin. Kallikrein bildet durch Spaltung von Kininogen im Plasma Bradykinin, welches im selben System über die Kininase II = ACE inaktiviert wird (s. Abbildung 3).

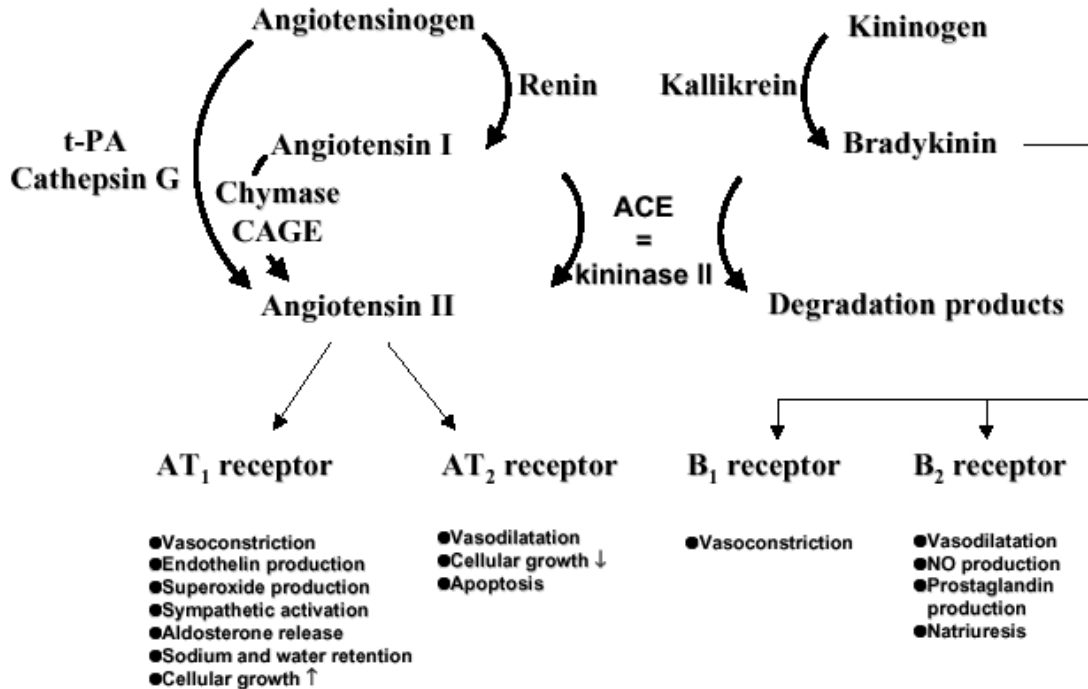


Abbildung 3: Wirkmechanismus des Angiotensin-Conversions-Enzyms (Kininase II), des Renin-Angiotensin-Aldosteron-, des Kallikrein-Kinin-Systems und der systemischen Wirkungen [Lassila, 2000]

Aus diesen Erkenntnissen heraus entwickelten sich dann als neue Generation Antihypertensiva die Inhibitoren des Angiotensin-Konversions-Enzyms (ACE), die so genannten ACE-Hemmer sowie die Angiotensin I-Blocker und Aldosteron-Antagonisten.

Bei den folgenden Untersuchungen wurde näher auf den ACE-Hemmer Ramiprilat eingegangen.

ACE-Hemmer wurden erstmals im Gift einiger Schlangenarten als Hemmer der Chymase II, welches die Bradykininwirkung verstärkte, entdeckt [Cheung u. Cushman, 1973; Ondetti, Rubin u. Cushman, 1977].

Alle bekannten ACE-Inhibitoren sind unter anderem Peptidanaloga des Angiotensin I. Der erste auf dem Markt erhältliche Hemmer wurde 1976 entwickelt und war Captopril [Cushman et al., 1977], ein Dipeptid-Analogon (s. Abbildung 4).

Darauf folgte Enalapril als erster ACE-Hemmer ohne Sulfhydrylgruppe [Cushman und Ondetti, 1991], alle weiteren wurden nur so entwickelt, da der Sulfhydrylgruppe einige Nebenwirkungen zugeschrieben wurden. Deshalb und aufgrund ihrer „prodrug“-Eigenschaft heißen diese seither ACE-Hemmer der zweiten Generation.

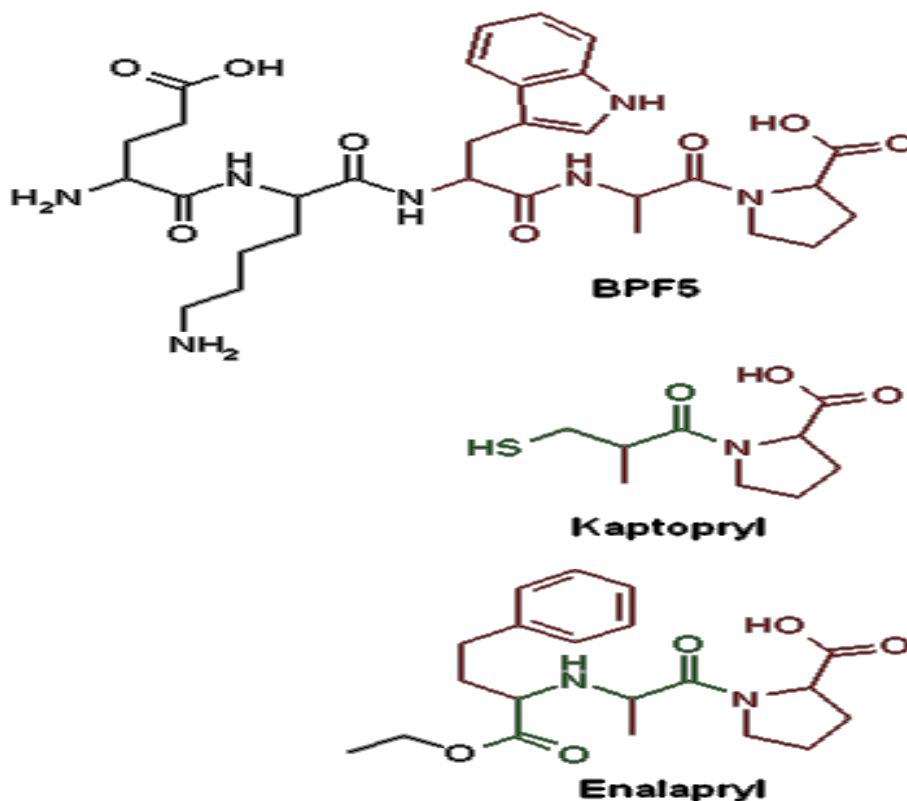


Abbildung 4: Strukturanalogie des Schlangengiftpeptids BPP_{5a} (BPF5) und der ACE-Hemmer Captopril (Kaptopryl) und Enalapril (Enalapryl). Die für die Wirkung verantwortliche Tripeptidsequenz von BPP_{5a} und die analogen Teilstrukturen von Captopril sind dargestellt [Jähnichen, 2004].

ACE-Hemmer lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: In Substanzen, die selbst bereits wirksame ACE-Inhibitoren sind, und in inaktive Vorstufen („prodrugs“), die erst in der Leber zu wirksamen Carbonsäuren hydrolysiert werden. Bis auf Captopril und Lisinopril sind alle Hemmer „prodrugs“. In den folgenden Untersuchungen wurde näher auf die experimentellen Einflüsse des ACE-Hemmers der zweiten Generation Ramipril (HOE498), bzw. des aktiven Metaboliten Ramiprilat (HOE498 diacid, s. Abbildung 5), auf Kardiomyozyten adulter Ratten eingegangen.

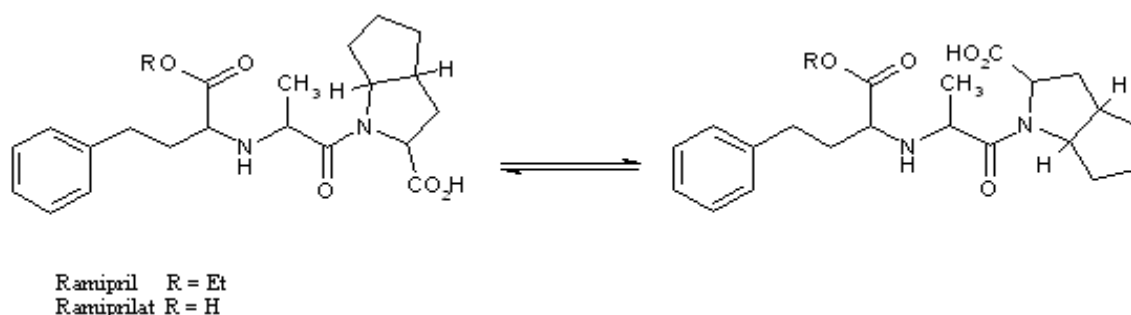


Abbildung 5: Molekularstruktur von Ramipril und Ramiprilat. Der ACE-Hemmer Ramipril (HOE 498) ist ein „prodrug“ und wird in der Leber durch Esterasen in das aktive Ramiprilat (HOE498 diacid) umgewandelt [Bankowski et al., 2009].

Experimentelle Versuche haben bereits gezeigt, dass ACE-Inhibitoren die Überlebensfähigkeit der Kardiomyozyten sowohl in Zellkulturen [Wall et al., 1993] als auch an isolierten Herzen [Schölkens et al., 1988] und am Tiermodell [Westlin et al., 1988] verbessern.

Am Tiermodell wurde ebenfalls nachgewiesen, dass Ramipril, das „prodrug“ von Ramiprilat, die linksventrikulären Volumen vermindert, die linksventrikuläre Ejektionsfraktion erhöht und den linksventrikulären enddiastolischen Druck erniedrigt [Liu et al., 2000].

ACE-Hemmer sind in allen Stufen der Herzinsuffizienz und unabhängig von der Ursache der Herzinsuffizienz wirksam (siehe Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz vom März 2012).

Die genauen zellulären Mechanismen, durch die ACE-Hemmer ihre kardioprotektiven Wirkungen entfalten, sind auch bisher noch nicht ausreichend geklärt.

Ursprünglich wurde die primäre Wirkung der ACE-Hemmer auf einen direkten Einfluss auf das ACE und dadurch auf die Verringerung der Plasmakonzentration des Angiotensin II zurückgeführt. Doch es wurde experimentell bereits nachgewiesen, dass der

kardioprotektive Effekt des ACE-Hemmers Ramiprilat unabhängig von der möglichen Hemmung der Angiotensin-II-Synthese ist [Hartman, 1995]. Die Kardioprotektion der ACE-Inhibitoren beruht wohl eher auf lokalen autokrinen und parakrinen Mechanismen, die das Kallikrein-Kinin-System mit einbeziehen, als allein auf dem Mechanismus der Blutdrucksenkung [Liu et al., 2000].

Hiermit sollte der Frage nachgegangen werden, ob Ramiprilat in vitro einen direkten Einfluss auf Kardiomyozyten der Ratte hat und wie dieser vermittelt werden könnte.

1.3 Bradykinin und Icatibant (HOE 140)

Das Nonapeptid Bradykinin (Abbildung 6) ist neben dem Dekapeptid Kallidin (Lys-Bradykinin) und dem des-Arg⁹-Bradykinin der wichtigste physiologisch aktive Vertreter der Kinine.

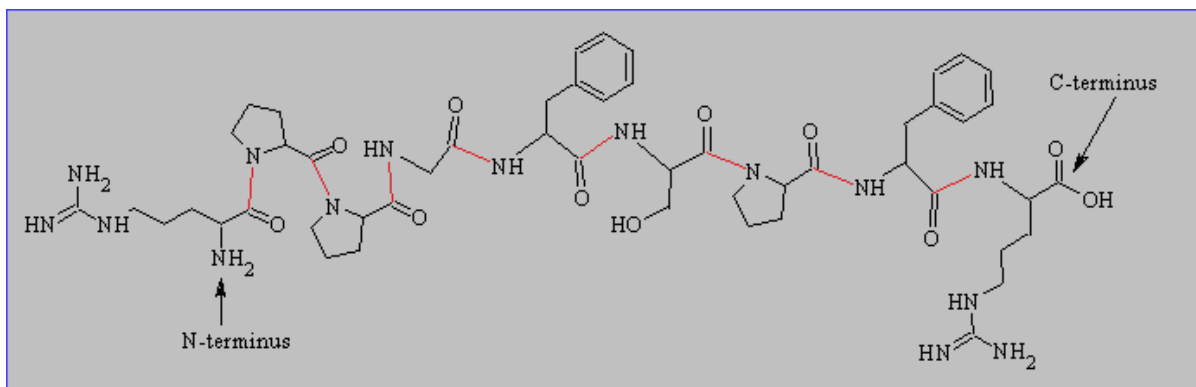


Abbildung 6: Molekularstruktur des Nonapeptids Bradykinin (H₂N-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-COOH).

Die Vorstufen der Kinine nennt man Kininogene. Verantwortlich für die Bildung des Bradykinin ist das im Plasma vorkommende Kallikrein. Seine Vorstufe wiederum, das Präkallikrein (Kallikreinogen), wird in der Leber gebildet und im Plasma durch den aktivierte Hagemann-Faktor (FXII) in Kallikrein umgewandelt. Kallikrein spaltet das Nonapeptid Bradykinin durch Angriff an zwei Stellen aus dem im Plasma vorhandenen Kininogen (HMW-Kininogen) ein α -Globulin höherer Molekülmasse heraus. Auch Trypsin und Schlangengifte sind in der Lage, eine Kininbildung im Plasma zu induzieren. Rocha e Silva et al. leiteten den Begriff Bradykinin von den Beobachtungen des sich langsam kontrahierenden Darms ab ($\beta\rho\alpha\delta\nu\varsigma$ = langsam, $\kappa\nu\epsilon\nu\iota$ = bewegen) [Rocha et al., 1949].

Einmal im Plasma gebildet, wird Bradykinin auch sehr schnell wieder in seine inaktiven Metabolite umgewandelt. Seine Halbwertszeit im Blut liegt bei unter 30 Sekunden.

Der Abbau der Kinine beim Menschen erfolgt durch Abspaltung C-terminaler Dipeptide mittels dreier Kininasen, hauptsächlich durch die Peptidyl-Dipeptidase Kininase II (ACE = Angiotensin converting enzyme), die Kininase I oder Carboxypeptidase N (CPN) und die Aminopeptidase P, welche an den Positionen 7-8, 8-9 bzw. 1-2 spalten [Dendorfer et al., 2001; Kuoppala et al., 2000] (s. Abb. 7).

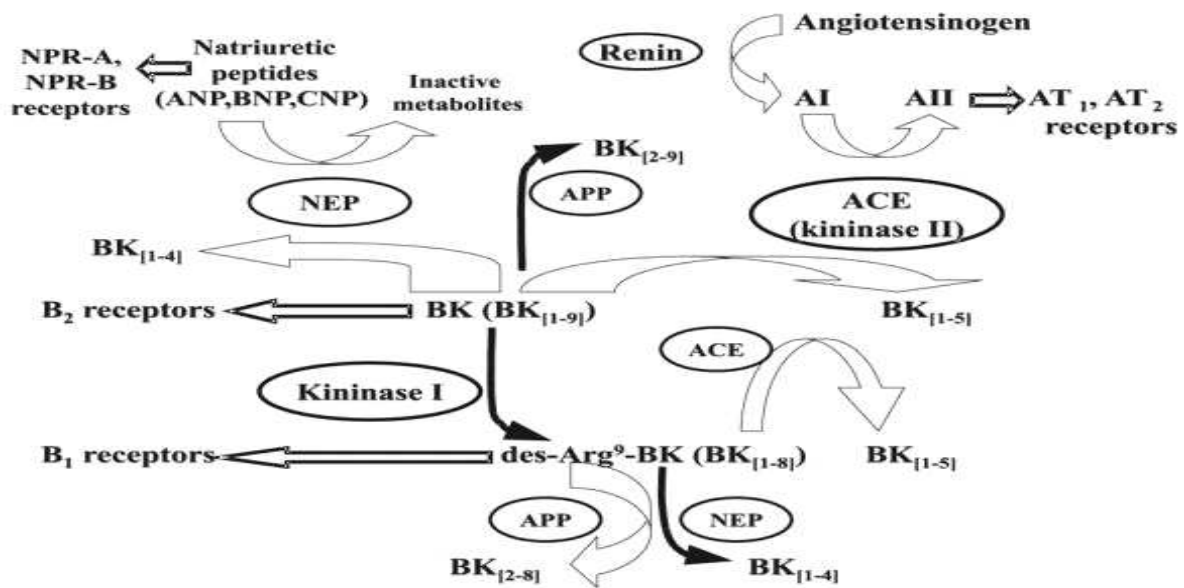


Abbildung 7: Bradykinin-Metabolismus [Perez et al., 2001].

Die Wirkungen des Bradykinin werden über die zwei Rezeptortypen B1 und B2 vermittelt und manifestieren sich im Wesentlichen in:

- Vasodilatation, durch Aktivierung des NO-Synthase-Systems [Bhoola et al., 1992],
- Erhöhung der Gefäßpermeabilität,
- Beteiligung an allergischen und anaphylaktischen Reaktionen,
- Entzündungsmediator mit chemotaktischer Wirkung auf Leukozyten,
- Kontraktion glatter, nicht vaskulärer Muskulatur (Lunge, Darm, Uterus),
- Hyperalgesie [Oberdisse et al., Pharmakologie und Toxikologie 2002],
- Kardioprotektion.

Die blutdrucksenkende Wirkung der ACE-Hemmer scheint durch eine Hemmung des Bradykinin-Abbaus zustande zu kommen [Wiemer et al., 1991]. ACE inaktiviert Bradykinin schneller, als es Angiotensin II produziert [Soubrier et al., 1993]. Bradykinin zeigte sich in seiner Wirkung als kardioprotektiver Stoff, der über Stickstoffmonoxid (NO)/cGMP abhängige Stoffwechselwege wirkt [Oldenburg et al., 2004]. Die kardioprotektive Wirkung von Bradykinin beruht offensichtlich auf dessen direktem Einfluss auf Herzmuskelzellen [Krieg et al., 2005].

Hieraus sollte der Frage nachgegangen werden, ob und wie Bradykinin Kardiomyozyten in vitro beeinflusst.

Im Jahre 1991 wurde ein nachweislich hochspezifischer, potenter und langzeitaktiver B2-Rezeptor-Antagonist, Icatibant oder HOE140, entwickelt [Wirth et al., 1991]. Seither konnte man nun die spezifischen Eigenschaften von Bradykinin untersuchen. Die Bradykinin-induzierte Vasodilatation am Endothel konnte erstmals spezifisch mittels HOE140 gehemmt werden [Cockroft et al., 1994]. In der Folgezeit wurden beide Antagonisten, das L-NA und das HOE140, zur Verifizierung etlicher zellspezifischer Untersuchungen zur NO-Synthese und zu den Bradykinin-Einflüssen herangezogen, wie dies auch hier der Fall ist.

1.4 Stickstoffmonoxid (NO) und L-Nitro-Arginin (L-NA)

Stickstoffmonoxid (NO) wurde bereits im Jahre 1879 in Form von Nitroglycerin durch William Murrell zur Behandlung der Angina pectoris angewendet. Doch erst als Ferid Murad 1977 herausfand, dass NO die Aktivität der Guanylylcyclase verstärkt und somit die glatte Muskulatur entspannt, wurde die Bedeutung von NO als Botenstoff erkannt, weitergehend untersucht und verstanden. 1980 entdeckte daraufhin Robert F. Furchgott den endothelium-derived-relaxing-factor (EDRF) an Endothelzellen, welchen er als vasodilatatorisch erkannte. Unabhängig voneinander und fast zeitgleich wurde R.F. Furchgott, Salvador Moncada und L.J. Ignaro 1987 bewusst, dass es sich bei EDRF um NO handeln muss und mit diesem identisch ist. Hierfür erhielten die Forscher im Jahre 1998 den Nobelpreis in Medizin [Wells et al., 2000].

Die nicht essenzielle Aminosäure Arginin spielt als Isoform L-Arginin eine wichtige Rolle in der NO-Synthese. Es bildet das Substrat der endothelialen NO-Synthase (eNOS) bei der NO-Synthese in Endothelzellen. Mittels L-Nitro-Arginin (L-NA) kann somit die NO-Synthese gehemmt werden.

1.5 Einflüsse von Ramiprilat, Bradykinin und NO auf Endothelzellen

Die Halbwertszeit von exogenem Bradykinin verlängerte sich signifikant bei gleichzeitiger Applikation von ACE-Hemmern an Endothelzellen [Grafe et al., 1993]. Durch Hemmung des Bradykininabbaus kommt es über den Anstieg der Bradykininkonzentration zur Aktivierung des B₂-Rezeptors auf der Endothelzelle. Dadurch wird dann die endotheliale NO- und Prostaglandin-Synthese induziert, was zu einer synergistischen Verstärkung der Wirksamkeit von ACE-Inhibitoren führt (s. Abbildung 8). In kultivierten Endothelzellen führte eine akute ACE-Hemmung zu einer vermehrten Produktion von intrazellulärem cGMP, was stark mit einer erhöhten NO-Produktion korrelierte [Wiemer et al., 1996].

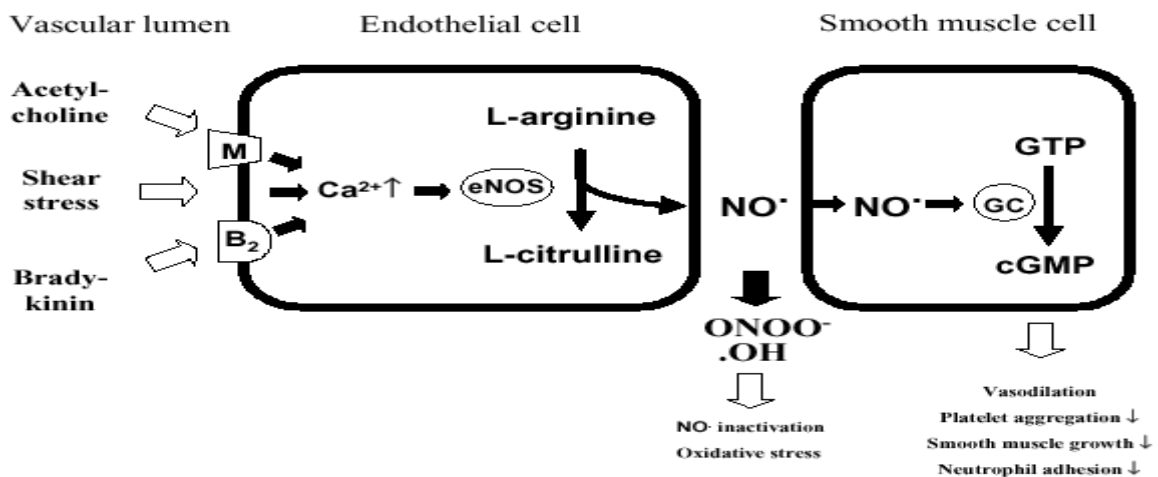


Abbildung 8: Induzierung der endothelialen NO-Synthese über B₂-Rezeptoren, L-Arginin-NO-System. B₂, bradykinin B₂ receptor; cGMP, cyclic guanosine 3',5'-monophosphate; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; GC, guanylate cyclase; GTP, guanosine 5'-triphosphate; M, muscarinic receptor; NO, nitric oxide; .OH, hydroxyl radical; ONOO⁻, peroxynitrite [Lassila, 2000].

Die ACE-Hemmung beim Menschen verbessert nachweislich die Endothelfunktion und die Fachmeinung bestätigt, dass die endogene Bradykinin-Anreicherung an den vaskulär protektiven Effekten der ACE-Hemmung beteiligt ist [Hornig et al., 1997].

Bei hypertensiven Ratten kann durch Langzeit-ACE-Hemmung die erhöhte NO-Verfügbarkeit dazu beitragen, das Endothelium zu schützen und dessen Dysfunktion durch Hemmung der O₂-Produktion, insbesondere durch non-cNOS-Quellen, zu verhindern [Wiemer et al., 1997].

Bradykinin, Kallikrein, Kininogen und Ramiprilat erhöhen am Koronarendothel des Kaninchens signifikant die NO-Produktion. Diese konnte unter gleichzeitiger Applikation von HOE140 und L-NA deutlich gehemmt werden. Es wurde daher vermutet, dass die durch Ramiprilat stimulierte NO-Synthese am Koronarendothel eher auf Bradykinineinflüssen und einer B2-Sensibilisierung beruhen, als auf einer direkten Interaktion zwischen dem ACE-Hemmer und dem B2-Kininrezeptor [Zhang et al., 1997].

Jedoch zeigte sich auch, dass zusätzlich zu den Auswirkungen der ACE-Hemmung auf die Angiotensin-II- und Bradykinin-Konzentration ACE-Hemmer direkten Einfluss auf die Zielzellen haben [Fleming et al., 2006] und, dass der ACE-Hemmer Ramiprilat direkte Outside-in-Signalwege in Endothelzellen induziert [Kohlstedt et al., 2004].

Die molekularen Mechanismen, über die ACE-Hemmer solche Signalwege auslösen, beinhalten die Aktivierung der ACE-assoziierten Kasein-Kinase-2, was zu einer Phosphorylierung von ACE an Ser1270 und zu einer Aktivierung der c-jun N-terminal-abhängigen Kinase (JNK) führt. Letzter Effekt führt zu einer Aktivierung von c-jun, einem Mitglied der Aktivator-Protein (AP)-1-Transkriptionsfaktor-Familie [Kohlstedt et al., 2004] und trägt zu einer vermehrten Expression von ACE an Endothelzellen bei.

1.6 Einflüsse von Ramiprilat, Bradykinin und NO auf Herzmuskelzellen

Es stellte sich somit die Frage, inwieweit diese Erkenntnisse über Endothelzellen auf Herzmuskelzellen übertragen werden konnten.

Es war bereits bewiesen, dass ein lokales Kallikrein-Kinin-System am Herzen existiert, welches es ihm ermöglicht, Kinine zu synthetisieren und freizusetzen. Nach Stimulation, wie z.B. durch einen Myokardinfarkt oder durch Ischämie, wird die Kininfreisetzung schnell erhöht [Nolly et al., 1994].

Es wurde am In-Vivo-Ischämie-Reperusionsmodell an der Ratte gezeigt, dass der ACE-Hemmer Ramiprilat in der Lage ist, die myokardiale Infarktrate und Arrhythmien unter Reperfusion zu verringern. Diese Effekte konnten durch HOE-140 und L-NA blockiert werden. Daraus wurde geschlossen, dass die Hemmung des Bradykinin-Abbaus und die daraus resultierende Stimulation der Prostaglandin- und NO-Synthese synergistisch kardioprotektiv zu wirken scheinen [Liu et al., 1996].

Langer et al. zeigten, dass der positive kontraktile Effekt von NO auf Herzmuskelzellen der Ratte in Bezug auf ein positives Kraft/Frequenz-Verhältnis durch die lösliche Guanylyl-Cyclase (sGC) vermittelt und verstärkt wird [Langer et al., 2003].

Man erkannte des Weiteren, dass Kinine keine Rolle bei der normalen Blutdruckregulation und der kardialen hämodynamischen Hämostase unter physiologischen Bedingungen

gen oder der Entstehung der chronischen Herzinsuffizienz zu spielen scheinen; sie könnten jedoch ein wichtiger Mediator der kardioprotektiven Einflüsse der ACE-Inhibitoren sein [Liu et al., 2000].

Dass NO-Spender kardioprotektiv zu sein scheinen, bestätigen auch Daten, die die Hypothese unterstützen, dass eine reduzierte eNOS-Aktivität in Kardiomyozyten die Entstehung einer Myokardhypertrophie und eine erhöhte Zytokinexpression, welche an der Entwicklung des Herzversagens beteiligt sind, begünstigt [Wenzel et al., 2007].

Für diese Untersuchung und das aktuelle Verständnis der Wirkungsweise von ACE-Hemmern ist es jedoch wesentlich zu wissen, ob ACE-Hemmer auch direkt auf die Herzmuskelzellen einwirken.

Wenn ACE-Hemmer AP-1 in Herzmuskelzellen aktivieren, bedeutet dies, dass diese direkt hypertrophie-bezogene Transkriptionsveränderungen, einschließlich der Induzierung von TGF- β und kardialen Apoptose, modifizieren [Taimor et al. 2001, Wenzel et al. 2001]. Dies führt also auch zu Veränderungen der kardialen Leistung. Kardial-spezifische Bradykinin-Rezeptoren, wie der B2-Rezeptor, werden im druckbelasteten Herzen herunterreguliert [Yayama et al., 2003].

Daher können Herzmuskelzellen von der erhöhten Bradykinin-Konzentration in Anwesenheit eines ACE-Hemmers nicht profitieren, entgegen den vorher durchgeführten Untersuchungen.

Es ist aber möglich, dass direkte, durch ACE-Hemmer ausgelöste Einflüsse existieren und den Verlust der Signalwegaktivierung über Bradykinin ersetzen können.

1.7 In-Vitro- vs. In-Vivo-Modell und das humane System

Um die Untersuchungsergebnisse möglichst mit der pathophysiologischen Situation zu vergleichen, wurden die Versuche an adulten Herzmuskelzellen der Ratte durchgeführt. Die Zellen wurden entsprechend präpariert, isoliert und dann mit den entsprechenden Reagenzien inkubiert und die Kontraktionsparameter gemessen [nach Piper et al., 1982 und Schlüter et al., 2005].

Vorausgegangene Arbeiten an diesem Modell zeigten bereits, dass der Zeitraum ausreichend ist, eine maximale Myokardhypertrophie zu induzieren, die sich weder quantitativ noch qualitativ von komplexeren Systemen unterscheidet und es zu keiner signifikanten Veränderung der basalen Proteinsyntheserate kommt. Als einzige quantifizierbare Änderung zeigte sich an unbehandelten Zellen eine Beeinflussung des Frequenz-Kontraktionsverhältnis in einer Abnahme der basalen Zellverkürzung bei Zunahme der

Frequenz. Dies ist formell mit der negativen Kraft-Frequenz-Beziehung des insuffizienten menschlichen Herzens vergleichbar.

Die Zellen der Ratte sind jedoch nicht direkt mit dem humanen System vergleichbar, da diese auch im Frequenzbereich von 0,5 bis 1 Hz basal eine negative Frequenz-Kontraktionsbeziehung zeigen.

Grundsätzlich gelten somit speziebedingte Vorbehalte in Bezug auf eine direkte Übertragbarkeit auf das humane System.

Dennoch ist das Zellsystem der Herzmuskelzellen der Ratte, im Gegensatz zu dem der Maus, das bestuntersuchte Tiermodell, das viele Parallelen zum humanen System zeigt, vor allem im Hinblick auf Signaltransduktion und Myokardhypertrophie.

Die Untersuchungen wurden an einzelnen isolierten Herzmuskelzellen durchgeführt, um eine detaillierte Analyse der maximalen Zellkontraktion und der Verkürzungsdynamik zu erhalten.

Um individuelle Unterschiede bei der Gewinnung der Zellen zu vermeiden, wurden die Zellen aus je zwei Herzen gemeinsam isoliert. Durch die anatomischen Gegebenheiten wurden somit jedoch mehr Zellen des linken als des rechten Ventrikels isoliert und verwendet. Die zufallsbedingte Variabilität in der Präparation der Zellen konnte durch Verwendung der Ergebnisse aus mindestens vier verschiedenen Präparationen weitgehend ausgeglichen werden.

In einem In-Vivo-Modell ist es schwierig, der Frage nachzugehen, ob Ramiprilat direkte Einflüsse hat, da ACE-Hemmer erhöhte Bradykininkonzentrationen und erniedrigte Blutdruckwerte hervorrufen. In dieser Untersuchung wurden deshalb diese Einflüsse des ACE-Hemmers Ramiprilat an isolierten adulten Rattenkardiomyozyten erkundet.

1.8 Zielsetzung

Es ist bekannt, dass ACE-Inhibitoren wie Ramiprilat an ACE binden, das auf Zelloberflächen von Endothelzellen exprimiert wird, und zellspezifische Signalwege induzieren einschließlich der Aktivierung des Aktivator-Proteins-1 (AP-1). In den aktuellen Untersuchungen sollte nunmehr geklärt werden, welche möglichen Effekte Ramiprilat auf das Kontraktionsverhalten adulter ventrikulärer Kardiomyozyten ausübt und worüber diese vermittelt werden könnten.

Es sollte weiterhin festgestellt werden, ob derartige Effekte auf der Wirkung von Bradykinin-Rezeptoren beruhen oder direkt durch ACE vermittelt werden.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Ramiprilat Herzmuskelzellen direkt beeinflussen kann.

Hierzu waren folgende Parameter im Einzelnen zu untersuchen:

- I. Die kardiale Expression von ACE als erforderliche Voraussetzung für mögliche direkt ACE-vermittelte Effekte des ACE-Hemmers Ramiprilat,
- II. die kontraktile Leistung der Herzmuskelzellen unter Einfluss von Ramiprilat und Bradykinin,
- III. die kardiale Induzierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch Ramiprilat,
- IV. der Einfluss von Bradykininrezeptoren und Bradykinin-abhängigem Signalantagonismus auf Ramiprilat-Effekte durch Zugabe von L-NA und HOE140.

Um geeignete Kontrollen zu haben, wurden manche Experimente mit Bradykinin anstelle von Ramiprilat und zusätzlich an isolierten Endothelzellen durchgeführt.

2 Material

Sämtliche dieser Arbeit zugrundeliegenden wissenschaftlichen Experimente wurden von mir in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. K.D. Schlüter im Rahmen unserer Arbeitsgruppe am Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Hierzu zählt vor allem die Durchführung der Versuchsreihen einschließlich der Vorbereitung der Kardiomyozyten, die Auswertung der Ergebnisse, sowie die Erstellung der Graphiken und Tabellen des Ergebnisteils und deren Veröffentlichung in der *Acta Physiologica* im Dezember 2007.

Das verwendete Material und die Methodik sind von verschiedenen im selben Labor von der gleichen Arbeitsgruppe durchgeführten Studien, mit gleichem oder verwandtem Versuchsaufbau, abgeleitet und angepasst worden [nach Piper et al., 1982 und Schlüter et al., 2005].

Frau Dr. Simone Helmig war als Biologin Mitglied unserer Arbeitsgruppe, Dr. Philipp Engel, Dr. Hakan Tastan und Dr. Ilhan Tastan waren mit mir zur selben Zeit als Doktoranden im Labor und in unserer Arbeitsgruppe tätig.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen wissenschaftlichen Experimente wurden in einem Zeitraum von Oktober 2004 bis Januar 2007 durchgeführt.

2.1 Chemikalien

Bradykinin	Calbiochem, Bad Soden
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
FCS	PAA Laboratories, Cölbe
Glucose	Sigma, Deisenhofen
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Böhringer, Mannheim
HOE 140	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kaliumzyanat	Sigma, Deisenhofen
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt

Material

Karnitin	Sigma, Deisenhofen
Kollagenase Typ CLSII (332U/mg)	Biochrom, Berlin
Kreatin	Sigma, Deisenhofen
L-NA	Eigenherstellung
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199 / Earl's Salt	GibcoBRL, Eggenstein
NaCl	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen BRL, Eggenstein
Phenylephrin	Sigma, Deisenhofen
Ramiprilat	Aventis Pharma Deutschland GmbH

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze) und Sigma (Deisenhofen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Medien

Kalzium-Stammlösung:

CaCl₂ 100 mMol/l

CCT- Kulturmedium:

M 199- HEPES gepuffert x ml

Kreatin 5 mMol/l

Karnitin 2 mMol/l

Taurin 5 mMol/l

Streptomycin 100µg/ml

Penicillin 100IU/ml

Cytosin-β-Arabinofuranosid 100µMol/l

M 199-HEPES gepuffert:

Medium 199 / Earl's Salts 9,8 g/l

HEPES 15mMol/l

pH 7,4

Material

Powell-Medium:

NaCl	110mMol/l
NaHCO ₃	25 mMol/l
KCl	2,6 mMol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mMol/l
MgSo ₄	1,2 mMol/l
Glucose	11 mMol/l

Vorinkubationsmedium:

M 199-HEPES gepuffert	x ml
FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100µg/ml

Cytosin-β-Arabinofuranosid wurde zur Hemmung der Proliferation verbliebener Nicht-Herzmuskelzellen zugesetzt. Alle Medien wurden sterilfiltriert, bei einer Temperatur von 4° C aufbewahrt und vor dem Gebrauch auf 37° C erwärmt.

2.3 Puffer

Kollagenasepuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	25mg
Kalzium-Stammlösung	12,5 µl

PBS-Puffer:

NaCl	150 mMol/l
KH ₂ PO ₄	5 mMol/l
Na ₂ HPO ₄	5 mMol/l
pH	7,4

Rezirkulationspuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	30 mg

Material

TBS-Puffer:

TRIS-HCL	10 mMol/l
NaCl	150 mMol/l
pH	7,4

Zellkontraktionspuffer-Stammlösung:

NaCl	125 mMol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mMol/l
KCl	2,6 mMol/l
MgSO ₄	1,2 mMol/l
CaCl ₂	1,0 mMol/l

Glucose	10 mMol/l
HEPES	10 mMol/l
pH	7,4

Zellkontraktionspuffer-Gebrauchslösung:

Zellkontraktions-Stammlösung	100 ml
Adenosin-Desaminase	20µl

2.4 Geräte und Laborbedarf

2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff- Apparatur	Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Institutes Düsseldorf
Gewebehacker	Tissue Chopper 1086, Bachofer, Reutlingen
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Zentrifuge	Digifuge GL, Heraeus-Christ, Osterode und Sigma 4K-1, Sigma, Osterode

2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion

Interface INT4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Monitor	Philips
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Stimulator	Physiologisches Labor des Physiologischen Institutes der J.-L.-Universität Gießen

2.4.3 Sonstige Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach
I-cycler	Biorad, Germany

2.4.4 Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen (Typ Falcon 3001)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturschalen (Typ Falcon 3004)	Becton Dickinson, Heidelberg
Mikrotiterplatten (Typ Falcon 3072)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Schleicher & Schuell, Dassel

2.4.5 Software-Einsatz

EXCEL	Microsoft
Image-Quant	Molekular-Dynamics, Krefeld
MUCEL	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
SPSS	SaS Software- Version 6.11

3 Methoden

3.1 Isolierung von Kardiomyozyten adulter Ratten

3.1.1 Auswahl der Versuchstiere

Die zu untersuchenden Kardiomyozyten wurden aus den Herzen von ca. 12 Wochen alten adulten männlichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von etwa 300-350 g isoliert und kultiviert (nach Piper et al., 1982 und Schlüter et al., 2005). Die Versuchstiere stammten aus dem Tierstall des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen, in dem sie bei frei zugänglicher Nahrung aufgezogen wurden.

3.1.2 Präparation der Kardiomyozyten

Bei der Isolierung der ventrikulären Kardiomyozyten war nach der publizierten Methode von Schlüter und Piper et al. (s.o.) wie folgt vorzugehen:

Die Versuchstiere wurden nach ca. einminütiger Narkose thorakotomiert, deren Herzen mit eiskalter 0,15 M NaCl- Lösung stillgelegt und oberhalb des Aortenbogens abgetrennt.

In dieser Kühllösung waren die Lunge sowie noch vorhandene Gewebereste zu entfernen und die Aorta freizupräparieren.

Die Herzen wurden mit der freipräparierten Aorta an die Langendorff-Apparatur gehängt und bei langsam laufender Perfusion durch den Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer (30 Tropfen/min) mit 40 ml pro Herz blutfrei perfundiert. Danach wurde für 30 Minuten mit einem Kollagenasepuffer (2-3 ml/min) rezirkulierend perfundiert.

Nach Beendigung der Perfusion wurden die Vorhöfe entfernt, das Ventrikelgewebe in einem Gewebehacker (Tissue Chopper 1086, Bachofer, Reutlingen) bei einer Schnittbreite von 0,7 mm mechanisch zerkleinert und im Kollagenasepuffer mit 1 % Albumin etwa 15 Minuten lang durch wiederholtes Ansaugen mit einer 10 ml Pipette weiter aufgetrennt.

Die gewonnene Zellsuspension war nun durch ein Nylonnetz mit 0,2mm Porengröße zu filtrieren, um störende Zelltrümmer und kleinere Zellen, wie beispielsweise Endothelzellen, von intakten Myozyten zu trennen. Zur weiteren Trennung wurde das Filtrat für drei Minuten bei 400 Upm zentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus-Christ, Oster-

de/Harz). Nach Resuspension des Sediments im KRB-Puffer + 0,2 mM CaCl₂ war dieser Vorgang zu wiederholen.

Intakte Kardiomyozyten konnten nun durch Sedimentation in einem Medium hoher Dichte aufkonzentriert werden. Hierzu wurde die Zellsuspension mit einer Pasteurpipette vorsichtig auf vier hohe Reagenzgläser aufgeteilt, die bis zur Hälfte mit KRB-Puffer + 4 % Albumin + 1 mM CaCl₂ gefüllt waren.

Um eine beschleunigte Sedimentation zu erreichen, wurden diese Reagenzgläser 30 Sekunden lang bei 300 Upm zentrifugiert (Sigma 4K-1; Sigma, Deisenhofen). Dabei setzte sich am Boden der Reagenzgläser ein lockeres Sediment aus etwa 80% intakten, stabförmigen Kardiomyozyten ab, das nun für eine Zellkultur in modifiziertem Kulturmedium 199 (CCT-Medium + 2% Penicillin/Streptomycin) resuspendiert wurde. Durch Zugabe der Antibiotika konnten bakterielle Verunreinigungen der Zellkulturen vermieden werden.

3.1.3 Inkubation der isolierten Kardiomyozyten

Die gewonnene Zellsuspension war in 35 mm Gewebekulturschalen (Falcon Nr. 3004, Becton und Dickinson, Heidelberg) auszuplattieren. Diese wurden bereits am Vorabend mit 1,5 – 2,0 ml modifiziertem Kulturmedium 199 (CCT + 4 % FCS + 2 % Penicillin/Streptomycin) beschichtet und für etwa 15-20 Stunden bei 37°C im Brutschrank (Cytoperm, Heraeus, Osterode/Harz) vorinkubiert. Durch diese Vorbehandlung der Kulturschalen konnte eine wirksame Anheftung der Zellen nach deren Präparation erreicht werden.

Das Vorinkubationsmedium war vor dem Ausplattieren aus den Kulturschalen abzusaugen.

Nun wurde pro Kulturschale 1 ml Zellsuspension ausplattiert und für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert. Diese Kurzzeitkultur bewirkte sowohl eine Erholung der Zellen nach deren Präparation als auch eine weitere Aufreinigung der Kardiomyozyten, von denen nur die intakten, stabförmigen Zellen sedimentierten und am Boden der Kulturschalen anhefteten. Nicht intakte Zellen schwebten frei im Medium und konnten abgetrennt werden. Dies erfolgte in einem zweistufigen Waschvorgang durch Absaugen und jeweiliges Auffüllen der Kulturschalen mit dem modifizierten Kulturmedium 199 (CCT + 2 % Penicillin/Streptomycin + 0,1 % Gentamycin).

Danach konnten die in den Kulturschalen angehefteten intakten Zellen, je nach Versuchsaufbau, als Langzeitkultur für weitere 24 Stunden mit den zu untersuchenden

Substanzen inkubiert oder als Kontrollen substanzfrei für die anstehenden Untersuchungen vorbereitet werden.

3.2 Analysen zu den Veränderungen der Elektromobilität

Um Extrakte aus dem Zellkern zu erhalten, wurden die Kardiomyozyten oder Endothelzellen mittels eines Swelling-Puffers homogenisiert (Taimor et al., 2004). Nach einer Inkubation auf Eis von einer Stunde wurden die Kerne durch Zentrifugation bei 900 upm für 10 min pelletiert. Diese wurden dann in 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,9, 300 mmol/l Saccharose, 1,5 mmol/l MgCl₂, 1mmol/l DTT und 0,3% Triton X-100 homogenisiert und erneut, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Die Pellets wurden daraufhin in einem Storage-Puffer aus den Stoffen 10 mmol/l HEPES, pH 7,5, 50 mmol/l KCl, 300 mmol/l NaCl, 1 mmol/l EDTA, 1 mmol/l DTT, 1 mmol/l PMSF und 20% Glycerol gelöst, für 30 min auf Eis inkubiert und bei 13000 upm bei 4°C fünf Minuten lang zentrifugiert.

Die neu entstandenen Extrakte wurden nun zu Retardation-Essays herangezogen: TPA-responsive-element (TRE) Oligonukleotide, die die Sequenz der AP-1 Bindungsdomäne (5'-CATCCGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3') enthalten, wurden hybridisiert. Zur Fluoreszenzmarkierung wurden die Oligonukleotide mit terminaler Transferase in der Gegenwart von Cy3-dCTP inkubiert. Nach der Trennung der freien Nukleotiden von den markierten Oligonukleotiden durch Gelfiltration wurden die Oligonukleotide mit 10 µl Kernextrakt in Gegenwart von 1 µg poly (dIdC) bei 30°C 30 Minuten lang inkubiert. Die Proben wurden dann auf 4% nativem Polyacrylamid-Gel elektrophoresiert und mittels Fluoreszenz-Imager dargestellt (Biorad, Deutschland).

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Gesamt-RNA von Herzmuskelzellen, Endothelzellen oder Geweben wurde mittels Trizol (Invitrogen) nach Herstellerangaben extrahiert. Echtzeit-Reaktionen wurden für 1 Stunde bei 37°C in einem Endvolumen von 10 µl unter Zugabe von 1 µg RNA, 100 ng Oligo(dT)₁₅, 1 mmol/l dNTPs, acht Einheiten von RNasin und 60 Einheiten von Moloney murine Leukämievirus reverse Transkriptase durchgeführt. Aliquote wurden zur RT-PCR mittels I-cycler (Biorad, Deutschland) und SYBR-green Fluoreszenz zur Quantifizierung verwendet. Hypoxanthin-phosphoribosyl-transferase (HPRT) wurde als Grundlage verwendet, um die Probeninhalte zu normalisieren. Die Determinations-Primer hatten die folgende Sequenz: ACE vorwärts: AAC ACG GCT CGT GCA GAA G, rückwärts: CCT GCT GTG GTT CCA GGT ACA; HPRT vorwärts: CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT, rückwärts: CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC.

Die Berechnungen der Ergebnisse wurden nach der $2^{-\Delta Ct}$ -Methodik durchgeführt, wie sie Livak & Schmittgen 2001 beschreiben.

Nach der Amplifikation wurden die Produkte überprüft, auf 2% Agarose Gel gebracht und aufgeteilt. Dann mittels SYBR gefärbt und unter UV-Beleuchtung fotografiert.

3.4 Messung der Kardiomyozyten-Kontraktionen im elektrischen Feld

3.4.1 Probenvorbereitung

Das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten im elektrischen Feld wurde an Langzeitkulturen von frisch isolierten Myokardzellen untersucht.

Hierzu war unmittelbar vor dem jeweiligen Experiment die zu messende Kulturschale aus dem 37°C warmen Inkubator zu nehmen, das CCT-Kulturmedium abzusaugen und mit 3ml einer auf 37°C erwärmten Zellkontraktionspuffer-Gebrauchslösung aufzufüllen. Je nach Versuchsaufbau konnte das erforderliche Medium zugesetzt und die Probe entsprechend unterschiedlich behandelt werden. Diese Experimente werden im Ergebnisteil in ihren Einzelheiten aufgeführt.

3.4.2 Elektrische Stimulation und Steuerung der Kardiomyozyten-Kontraktionen

Das Verfahren zur elektrischen Stimulation und Steuerung des Kontraktionsverhaltens von Myokardzellen ist bereits beschrieben worden [Schlüter et al., 2004 und 2005]. Danach war folgende Apparatur aufzubauen:

Die zu untersuchende Kulturschale wurde auf den Objektisch des in Punkt 3.4.3 eingesetzten Mikroskops gestellt, mit einem speziellen Deckel versehen, der an seiner Kontur in gleichen Abständen vier Bohrungen enthielt, durch die zwei doppelt gebogene Drähte auf einer Länge sowie in parallelem Abstand zueinander von jeweils ca. 20mm und mit einer Eintauchtiefe von etwa 5mm horizontal durch den Zellkontraktionspuffer geführt werden konnten.

Die beiden Drähte in der Kulturschale waren als Anode bzw. Kathode zu nutzen, zwischen denen sich durch Anschluss an den Stimulator ein elektrisches Feld aufbaute.

Wegen der geometrischen Ausformung der Drähte entstand ein nahezu homogenes Feld, das einen relativ gleichmäßigen Stromfluss zwischen beiden Drähten und somit auch durch die zwischen diesen angehefteten Myokardzellen verursachte.

Die vom Stromfluss erfassten Zellen wurden durch biphasische Stromstöße, die zwei 60Volt starke entgegengesetzte Rechteckspannungen für jeweils 5 ms auslösten, zur Kontraktion stimuliert. Dabei konnten zeitweilige Spontankontraktionen in unregelmäßiger Frequenz auftreten, die jedoch durch die vom Stimulator vorgegebene Stromstoßfrequenz vereinheitlicht wurden. Zellen, die eine vorgegebene Frequenz nicht annahmen, blieben bei den Messungen unberücksichtigt (siehe Abbildung 9). Die Kontraktionsfrequenz war durch unterschiedliche Stimulationsfrequenzen beliebig zu variieren.

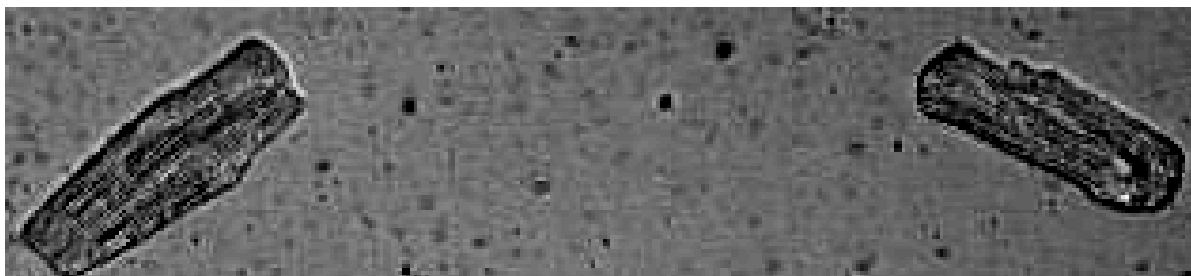


Abbildung 9: Isolierte Kardiomyozyten unter dem Mikroskop mittels der Videokamera fotografiert.

3.4.3 Messung der Kontraktionsparameter

Die Kontraktionsparameter wurden mit einer Gerätekonfiguration der Firma Scientific Instruments GmbH, Heidelberg, gemessen.

Zu deren Grundausstattung gehört das Mikroskop (Kap.3.4.2), auf dessen Objektstisch die Apparatur zur Stimulierung der Zellkontraktion aufgebaut wurde, die nun erfasst werden sollte.

An das Mikroskop waren zwei Kameras angeschlossen, und zwar eine Videokamera zur visuellen Beobachtung der Kontraktionen auf einem Monitor sowie eine Zeilenkamera, die durch das Erfassen von Hell-/Dunkeffekten die exakten Zellgrenzen erkennen konnte. Zur Beobachtung einer Zellkontraktion musste die Zeilenkamera so positioniert werden, dass beide Zellenden in der eindimensionalen Zeile lagen. Hierzu waren die Kulturschale und die Zeilenkamera jeweils so weit zu drehen, bis sich die untersuchende Zelle inmitten des Okularbildes und der Messmarkierung der Zeilenkamera befand.

Das Bild der Zeilenkamera wurde in elektrische Signale umgewandelt und über das Interface auf einen Oszillographen übertragen. Die Ablenkzeit war, horizontal verstärkt, fest auf 0,1 ms/cm, vertikal verstärkt auf 5 V/div eingestellt.

Die bildliche Darstellung wurde so gesteuert, dass ein stehendes Bild entstand. Die von der Zeilenkamera erfassten Helligkeitsunterschiede wurden vom Oszillographen als unterschiedlich starke Y-Auslenkungen dargestellt. Die jeweiligen Amplituden, die die Zellgrenzen markierten, waren an ihrer horizontalen Bewegung zu erkennen. Hierdurch konnte nun die Zellkontraktion auf dem Oszillographen beobachtet werden.

Dieser war als Zweikanaloszillograph zu betreiben, an dessen zweitem Kanal eine feste Spannung des Interface anlag. Wenn diese abgelesen wurde, stellte sie sich auf dem Bildschirm des Oszillographen als eine weitere Horizontale in bestimmter Höhe dar, wenn nicht, wurde eine Horizontale in der Höhe Null angezeigt.

Die zweite Spannung war extern über das Interface wie folgt zu triggern: Ein Triggermarker des Interface, der auf dem Oszillographen ebenfalls durch eine Amplitude gekennzeichnet war, wurde vor die Amplitude des Zellbildes gesetzt. Erreichte nun die ansteigende Spannung des Zellbildes und damit dessen ansteigende Amplitude den vom Triggermarker durch dessen Amplitude vorgegebenen Wert, so begann der Oszillograph, die Interfacespannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. Auf dem Bildschirm war an dieser Stelle im Bild des zweiten Kanals nun ein Sprung der Horizontalen aus der Nullposition nach oben zu erkennen. Wenn die Amplitude des Zellbildes bei Kontraktion ihre Position veränderte, so änderte sich damit sowohl die Position, an der der

Triggerwert erreicht wurde, als auch die Stelle, an der die Horizontale in die Höhe sprang.

Da in der bildlichen Darstellung zu erkennen war, wie sich die obere Horizontale entlang ihrer Kante vor und zurück bewegte, konnte anhand der Horizontalausschläge die jeweilige Zelllänge und Zellkontraktion an dieser Zellkante beobachtet werden. Mit der anderen Zellkante war analog zu verfahren.

Die Informationen zu den unterschiedlichen Interface-Spannungen wurden vom Oszillographen an einen Computer weitergeleitet und durch das Programm MUCCELL der Firma Scientific Instruments GmbH ausgewertet. Das Programm bestimmte die aktuelle Zelllänge zu verschiedenen Zeitpunkten und stellte die jeweilige Kontraktion der Zelle in einer Kurve dar. Es erkannte den Beginn der Kontraktion an der jeweils einsetzenden Längenverkürzung der Zelle.

Bei der Datenauswertung wurden fünf Zellkontraktionen erfasst, aus deren jeweiligen Einzelmessungen folgende Mittelwerte durch das Programm gebildet wurden:

- Die diastolische Zelllänge (maximale Zelllänge) in Mikrometern,
- die systolische Zelllänge (minimale Zelllänge) in Mikrometern,
- die „time to peak“ (TTP), also die Zeit von Beginn der Kontraktion bis zur maximalen Kontraktion in Millisekunden,
- die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit (con-vel) in Mikrometern pro Sekunde,
- die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (rel-vel) in Mikrometern pro Sekunde,
- die T50-to-peak, also die Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur maximalen Zellkontraktion in Millisekunden,
- der R50-Wert, also die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der gesamten Zellverkürzungsstrecke in Millisekunden.

Als weiterer Parameter wurde aus diesen gebildeten Werten errechnet:

- Die Zellkontraktilität $\Delta L/L$ als Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge (ΔL), angegeben in Prozent der Zellverkürzung, bezogen auf die diastolische Länge der Zelle.

3.4.4 Messprotokoll

Bei den zuvor beschriebenen Kontraktionsmessungen war wie folgt vorzugehen:

- Aus jeder Kulturschale wurden nur drei Zellen gemessen, um eine Ermüdung der Zellen durch allzu häufige Stimulierung zu vermeiden;
- die zu untersuchenden Zellen wurden bei drei verschiedenen Stimulationsfrequenzen gemessen, und zwar bei 1 Hz, 0,5 Hz und 2 Hz;
- die Zellen waren bei gleicher Frequenz jeweils viermal im Abstand von 15 Sekunden zu messen.

Der gesamte Messvorgang an einer Zelle bestand somit aus drei Messreihen mit jeweils vier Einzelmessungen pro Frequenz.

Die aus jeder Messreihe erhaltenen vier Mittelwerte der Kontraktionsparameter wurden zur Auswertung in das Programm EXCEL übertragen. Hieraus wurden dann aus den entsprechenden ersten Mittelwerten der Mittelwert, die Standardabweichung und der Median bestimmt.

3.5 Statistische Aufbereitung der Messdaten

Da die Kontraktionsmessungen an Zellen aus unterschiedlichen Präparationen durchgeführt wurden, war für deren Auswertung die Vergleichbarkeit erforderlich.

Hierzu waren die vorliegenden Messdaten statistisch wie folgt aufzubereiten:

- Bei der Auswertung von Messreihen wurden die in den Experimenten erhaltenen Werte zu einem Mittelwert zusammengefasst, anschließend aus dem Programm MUCCELL in das Programm EXCEL exportiert und abschließend durch das Programm SPSS ausgewertet und dargestellt in Form von Mittelwert, Standardabweichung und Median.
- Im Vergleich der Messergebnisse zweier Gruppen oder Telexperimente wurde mit dem gepaarten T-Test gearbeitet.
- Bei Vergleichen mehrerer Gruppen in einem Experiment untereinander war zunächst eine Varianzanalyse (ANOVA) durchzuführen. Danach war ein Student-Neumann-Keuls-Test als post-hoc-Test anzuwenden.

Daten mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant bezeichnet.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Ramiprilat auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen adulter Ratten

4.1.1 ACE-Expression in Kardiomyozyten

Wenn angenommen wird, dass Ramiprilat die ACE-Expression benötigt, um über das Einwirken auf Zelloberflächenstrukturen intrazelluläre Signalwege zu induzieren, war zunächst zu klären, ob adulte ventrikuläre Rattenkardiomyozyten überhaupt ACE exprimieren. Hierzu wurden RNA-Proben von isolierten und kultivierten mikrovaskulären Endothelzellen, von linken Ventrikeln sowie von isolierten und kultivierten Kardiomyozyten untersucht (s. Abbildung 10).

Das Ergebnis zeigt, dass an isolierten Kardiomyozyten ebenso wie an Endothel- und Ventrikelzellen ACE-Expression nachgewiesen werden kann, wie an der 78 bp Bande auf dem Agarose Gel zu erkennen ist.

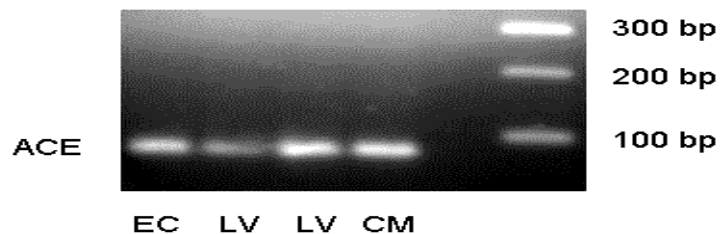


Abbildung 10: Repräsentative Agarose-Gel-Dokumentation der ACE-Expression an RNA-Proben von isolierten mikrovaskulären Endothelzellen (EC, Spalte 1), Zellen von linken Ventrikeln (LV, Spalte 2+3), isolierten Kardiomyozyten (CM, Spalte 4) und zur Kontrolle von einem Reaktionsmix ohne Kardiomyozyten-RNA (Spalte 5). Spalte 6 zeigt die Basenpaarmarker bei 100, 200 und 300 bp.

4.1.2 Einfluss von Ramiprilat auf die Zellkontraktilität

Eine starke kontraktile Reaktion ist die wichtigste Funktion von Herzmuskelzellen. Deshalb wurde zuerst untersucht, ob Ramiprilat die kontraktile Eigenschaften der Kardiomyozyten verändert.

Die isolierten Herzmuskelzellen wurden, wie im Kapitel 3.1 beschrieben, gewonnen. Circa zwei Drittel der Zellen wurden dann je zur Hälfte, wie in Kapitel 3.1.3 dargelegt, für weitere 24 Stunden in modifiziertem Kulturmedium mit den unterschiedlichen Ramiprilat-Konzentrationen von 100 nM und 1 μ M bei 37° Celsius im Brutschrank inkubiert. Das übrige Drittel wurde als Kontrolle für die gleiche Zeit mit modifiziertem Kulturmedium ohne weitere Zusätze inkubiert. Daraufhin wurden die verschiedenen Parameter der Zellkontraktion im elektrischen Feld, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, gemessen. Das Maß für die Kontraktilität wurde durch die Zellverkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge $\Delta L/L$ in Prozent (s. Abbildung 11 und Tabelle 1) bestimmt.

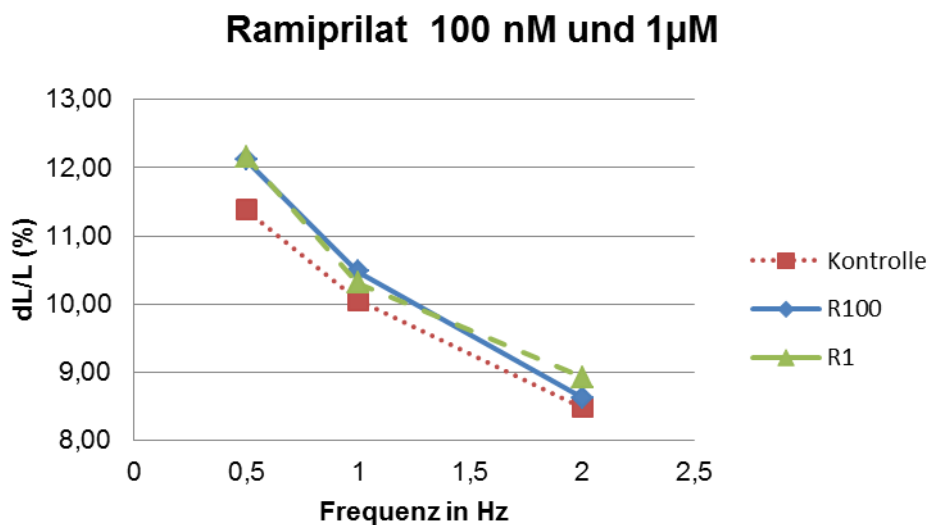


Abbildung 11: Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100nM (R100) und 1 μ M (R1) angegeben als Relation $\Delta L/L$ in Prozent (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=33$, \pm SD siehe Tab. 1, * $p<0,05$ vs. C).

Ergebnisse

dL/L (%)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=33				
Kontrolle	MW	11,38	10,06	8,49
	SD	1,50	1,27	1,17
Ramiprilat 100 nM	MW	12,11	10,48	8,62
	SD	1,19	1,24	1,28
p vs. Kontrolle		0,0955	0,2959	0,7227
Ramiprilat 1 µM	MW	12,16	10,31	8,93
	SD	1,65	1,26	1,63
p vs. Kontrolle		0,1136	0,5255	0,3297

Tabelle 1: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100nM und 1µM angegeben als Relation $\Delta L/L$ in Prozent. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.

Hier zeigte sich bei allen gemessenen Frequenzen zwar ein Trend in Richtung einer erhöhten Zellverkürzung bei den mit Ramiprilat vorbehandelten Zellen, es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

4.1.3 Einfluss von Ramiprilat auf die Kontraktionsgeschwindigkeit

Während die Messungen zur potenziellen Zellverkürzung keine signifikanten Ergebnisse erbrachten, zeigten sich bei den Messungen zur Kontraktionsgeschwindigkeit deutliche Signifikanzunterschiede.

Dargestellt werden hier, welche Änderungen bei den Kontraktionsgeschwindigkeiten der Zellen in dem Medium mit zugesetztem Ramiprilat in den Konzentrationen von 100 nM und 1 µM gegenüber den Zellen in dem Kontrollmedium auftraten. Ermittelt wurden dazu die Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel, s. Abbildung 12 und Tabelle 2) und die Time-to-Peak (TTP, s. Abbildung 13 und Tabelle 3).

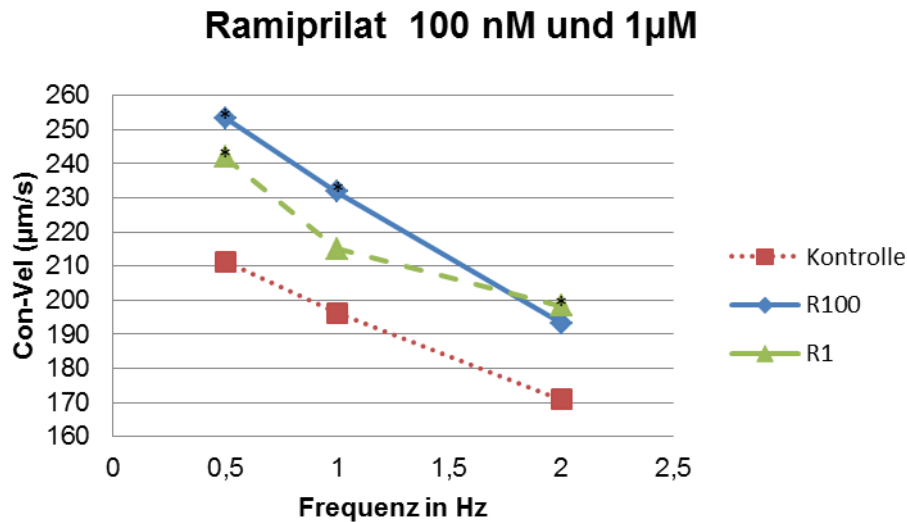


Abbildung 12: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in µm/s ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100nM (R100) und 1µM (R1) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=33, +/- SD siehe Tab. 2, *p<0,05 vs. C).

Con-Vel (µm/s)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=33				
Kontrolle	MW	211	196	171
	SD	39	34	35
Ramiprilat 100 nM	MW	*253	*232	193
	SD	52	50	45
p vs. Kontrolle		0,0034	0,0111	0,0683
Ramiprilat 1 µM	MW	*242	215	*198
	SD	33	31	34
p vs. Kontrolle		0,0085	0,0831	0,0139

Tabelle 2: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in µm/s ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen (R) 100nM und 1µM. *p<0,05 vs. Kontrolle, n=33.

Als Ergebnis zeigte sich, dass Zellen, die mit Ramiprilat inkubiert wurden, im Mittel leicht höhere Kontraktionsgeschwindigkeiten zur Kontrolle entwickelten. Hier ist eine deutliche und auch signifikante Verbesserung der Kontraktionsgeschwindigkeit zu erkennen, wenn auch nicht bei allen Frequenzen und Konzentrationen signifikant. Im Mittel hat die Kontraktionsgeschwindigkeit auf 15,8 +/- 3,5%, bei einer Ramiprilat-

Konzentration von 1 μM und einer Frequenz von 2,0 Hz, zugenommen (s. Abbildung 12 und Tabelle 2). Dies ging einher mit einer korrespondierenden signifikanten Reduktion der Time-to-Peak bei beiden Ramiprilat-Konzentrationen und allen Frequenzen (siehe Abbildung 13 und Tabelle 3).

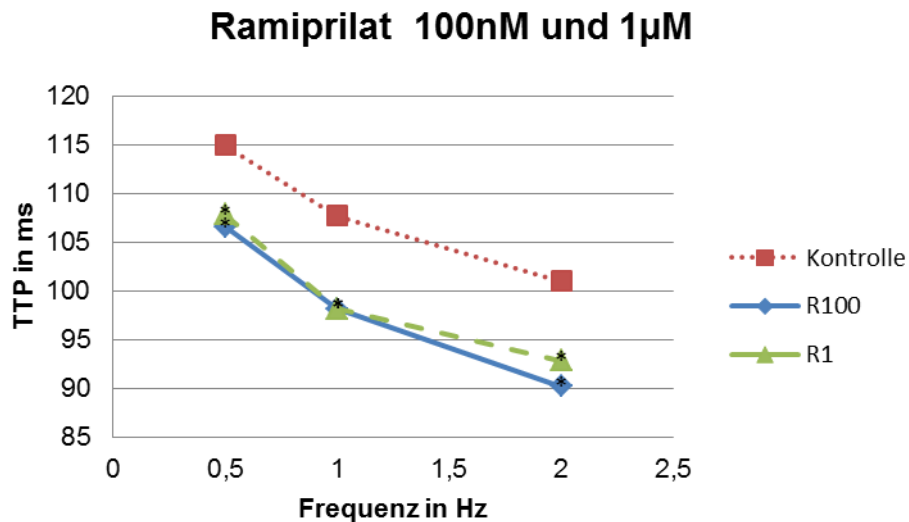


Abbildung 13: Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100nM (R100) und 1 μM (R1) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=33, +/- SD siehe Tab. 3, *p<0,05 vs. C).

TTP (ms)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=33				
Kontrolle	MW	115	108	101
	SD	10	9	9
Ramiprilat	MW	*107	*98	*90
100 nM	SD	12	12	10
p vs. Kontrolle		0,0119	0,0033	0,0003
Ramiprilat	MW	*108	*99	*93
1 μM	SD	11	11	12
p vs. Kontrolle		0,0266	0,0025	0,0098

Tabelle 3: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen (R) 100nM und 1 μM . *p<0,05 vs. Kontrolle, n=33.

4.1.4 Einfluss von Ramiprilat auf die Relaxationsgeschwindigkeit und die R50

Analog zu den untersuchten Veränderungen der Kontraktionsgeschwindigkeit wurden hier die Veränderungen der Relaxationsgeschwindigkeit untersucht.

Ermittelt wurden dazu die Relaxationsgeschwindigkeiten der Kardiomyozyten selbst in $\mu\text{m/s}$ (Rel-Vel, s. Abbildung 14 und Tabelle 4) sowie die R50 in Millisekunden, die Zeit bis zum Erreichen von 50% Relaxation (siehe Abbildung 15 und Tabelle 5). Als Ergebnis zeigte sich jedoch auch hier, dass Zellen, die mit Ramiprilat inkubiert wurden, nur tendenziell höhere Relaxationsgeschwindigkeiten entwickelten und keine ausreichend signifikante Veränderung erbrachten.

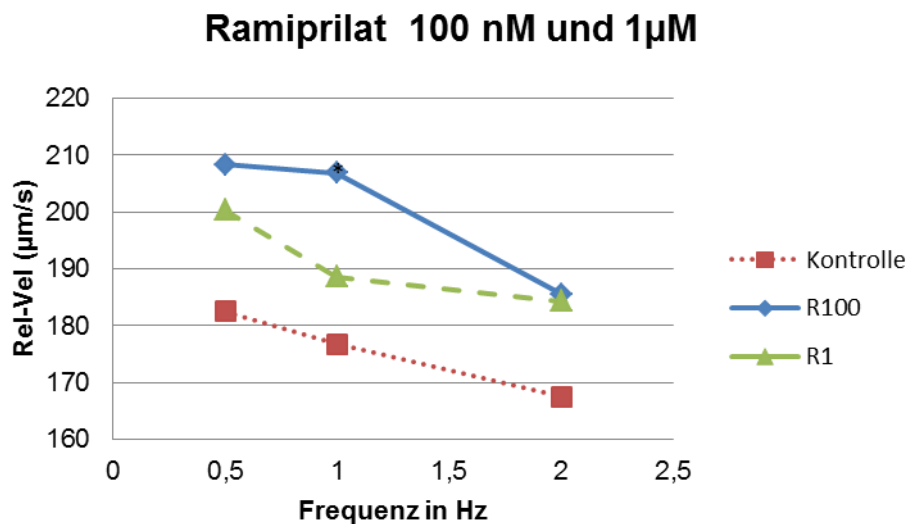


Abbildung 14: Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100 nM (R100) und 1 μM (R1) (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=33$, +/- SD siehe Tab. 4, * $p<0,05$ vs. C).

Rel-Vel ($\mu\text{m/s}$)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=33				
Kontrolle	MW	183	177	168
	SD	37	37	41
Ramiprilat	MW	208	*207	186
100 nM	SD	55	58	46
p vs. Kontrolle		0,0619	0,0362	0,1561
Ramiprilat	MW	200	189	184
1 μM	SD	62	44	44
p vs. Kontrolle		0,2067	0,3110	0,1747

Tabelle 4: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen (R) 100nM und 1 μM . * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.

Gleichzeitig reduzierte sich aber die R50% unter Ramiprilat-Anwendung, also die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der gesamten Zellverkürzungsstrecke, von 150 +/- 2 auf 138 +/- 3 ms ($n=33$, $P=0,0216$), bei einer Konzentration von 1 μM und einer Frequenz von 2 Hz. Es zeigte sich hier eine überwiegend signifikante Reduktion der R50 bei beiden Konzentrationen und allen Frequenzen (siehe Abbildung 15 und Tabelle 5).

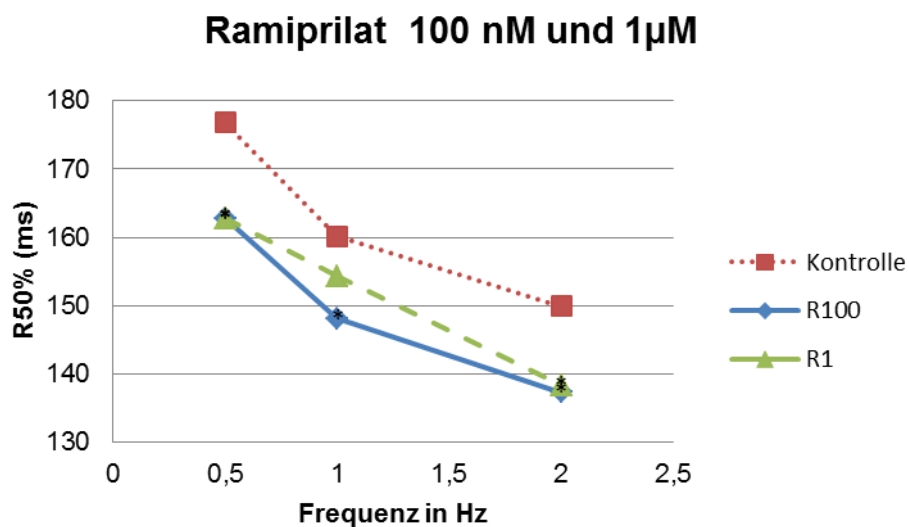


Abbildung 15: R50 (ms) ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100 nM (R100) und 1 μM (R1) (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=33$, +/- SD siehe Tab. 5, * $p < 0,05$ vs. C).

R50 (ms)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=33				
Kontrolle	MW	177	160	150
	SD	17	15	13
Ramiprilat	MW	*163	*148	*137
100 nM	SD	21	19	17
p vs. Kontrolle		0,0179	0,0204	0,0077
Ramiprilat	MW	*163	154	*138
1 μM	SD	19	30	19
p vs. Kontrolle		0,0115	0,3668	0,0216

Tabelle 5: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur R50 (ms) ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100 nM (R100) und 1µM (R1). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.

Zusammenfassend können diese Daten wie folgt interpretiert werden: Ramiprilat beeinflusst moderat und signifikant die Kontraktionsgeschwindigkeit, nahezu gar nicht die Relaxationsgeschwindigkeit, jedoch deutlich signifikant die Time-to-Peak sowie die R50. Dieser Effekt reichte allerdings nicht für eine signifikante Zunahme der lastfreien Zellverkürzung und somit eine Verbesserung der Kontraktilität aus.

4.2 Einfluss von Bradykinin (BK) auf das Kontraktionsverhalten isolierter Herzmuskelzellen adulter Ratten

4.2.1 Einfluss von Bradykinin auf die Zellkontraktilität

Zur Kontrolle wurden danach die gleichen Versuchsreihen zur Messung der Zellverkürzung mit Bradykinin in unterschiedlichen Konzentrationen (BK 10nM, 100nM, 1µM) durchgeführt. Die isolierten Herzmuskelzellen wurden, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, gewonnen. Circa drei Viertel der Zellen wurden dann, wie in Kapitel 3.1.3 erläutert, für 24 Stunden in modifiziertem Kulturmedium mit den Bradykinin-Konzentrationen von 10 nM, 100 nM und 1 µM bei 37°C inkubiert. Das übrige Viertel wurde als Kontrolle für die gleiche Zeit mit modifiziertem Kulturmedium ohne weitere Zusätze inkubiert. Daraufhin wurden die verschiedenen Parameter der Zellkontraktion im elektrischen Feld, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, gemessen. Dabei zeigte sich, dass Bradykinin eine konzentrationsabhängige Erhöhung aller Parameter verursacht. Der Einfluss von Bradykinin erreichte einen signifikanten Wert bei einer Konzentration von 100nM und verblieb erhöht bei einer Konzentration von 1µM (s. Abbildung 16 und Tabelle 6).

Bradykinin 10nM, 100nM und 1µM

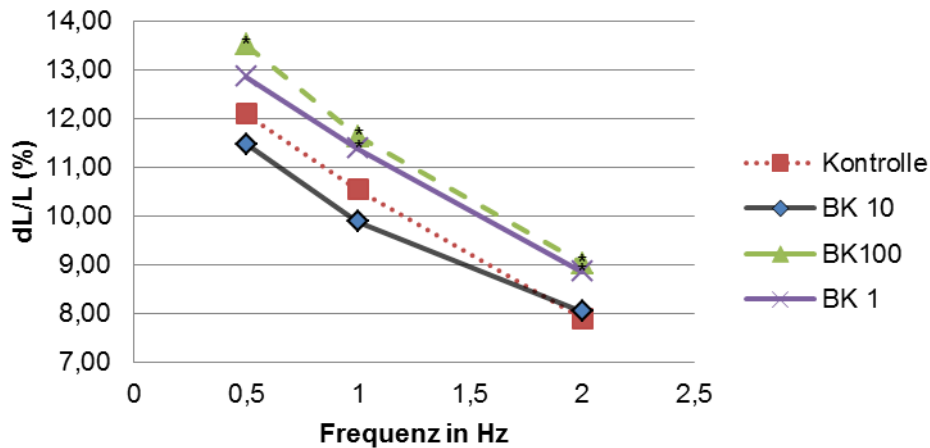


Abbildung 16: Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen 10 nM (BK10), 100 nM (BK100) und 1 µM (BK1) angegeben als Relation $\Delta L/L$ in Prozent (dargestellt sind die Mittelwerte für n=45, +/- SD siehe Tab. 6, *p<0,05 vs. C).

dL/L (%)		n=45		
		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
Kontrolle	MW	12,11	10,55	7,90
	SD	1,77	1,61	1,19
BK 10 nM	MW	11,49	9,90	8,05
	SD	1,55	1,13	0,90
	p-Value	0,15431	0,06655	0,58951
BK 100 nM	MW	*13,52	*11,64	*9,03
	SD	1,96	1,18	1,14
	p-Value	0,00403	0,00329	0,00049
BK 1 µM	MW	12,86	*11,39	*8,86
	SD	1,66	1,08	0,84
	p-Value	0,09791	0,01913	0,00101

Tabelle 6: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen 10 nM (BK10), 100 nM (BK100) und 1 µM (BK1) angegeben als Relation $\Delta L/L$ in Prozent. * p<0,05 vs. Kontrolle, n=45.

Im Mittel verursachte Bradykinin bei einer Konzentration von 100nM eine Steigerung der Zellverkürzung von 14,3 +/- 2,5%. Um der Frage nachzugehen, ob dieser Einfluss für den linken oder rechten Ventrikel spezifisch ist, wurden diese Experimente mit Kardiomyozyten aus beiden Ventrikeln wiederholt. Der Anstieg der Zellverkürzung durch Bradykinin in der Konzentration von 100nM betrug bei Zellen des linken Ventrikels 16,3 +/- 4,9% (n=36, p<0.05 vs. Kontrolle). Bei Zellen des rechten Ventrikels konnte dieser Einfluss nicht festgestellt werden (5,8 +/- 6,6%, n=36, p<0,05 vs. Kontrolle).

Bei dem positiven Effekt von Bradykinin auf die Zellverkürzung war zu beobachten, dass dieser bei höheren Frequenzen signifikanter war, und zwar bei 0,5 Hz: +8,4 +/- 3,6%; 2,0 Hz: +14,3 +/- 2,5% bei ventrikulären Kardiomyozyten und bei 0,5 Hz: +9,4 +/- 4,8%; 2,0 Hz: +16,3 +/- 4,9% bei linksventrikulären Kardiomyozyten.

4.2.2 Einfluss von Bradykinin auf die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit

Der Anstieg der Zellverkürzung bei ventrikulären Kardiomyozyten ging einher mit einer Zunahme der Kontraktionsgeschwindigkeit von 15,9 +/- 2,7% bei einer Bradykinin-Konzentration von 1 µM und einer Frequenz von 1 Hz (s. Abbildung 17 und Tabelle 7).

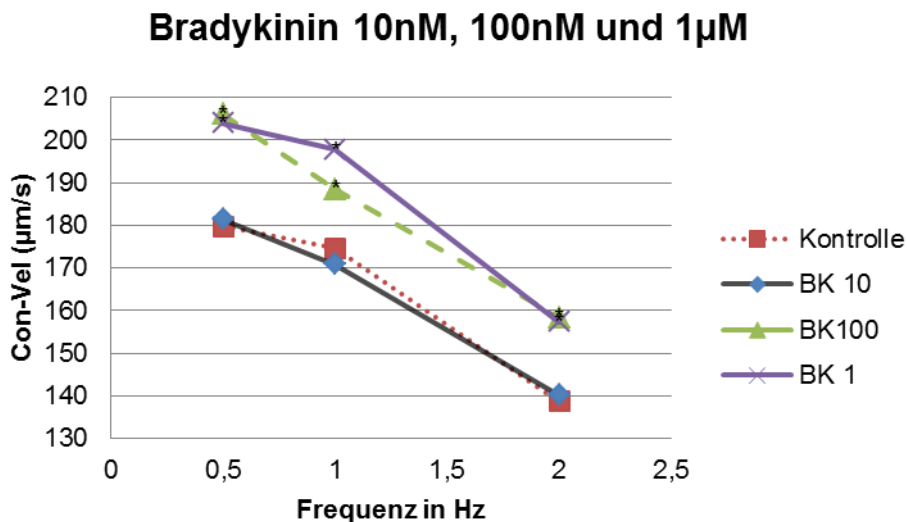


Abbildung 17: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) in µm/s ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen 10nM (BK10), 100nM (BK100) und 1µM (BK1) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=45, +/- SD siehe Tab. 7, *p<0,05 vs. C).

Ergebnisse

Auch bei diesen Untersuchungen zeigten sich konzentrationsabhängige durchweg positive Effekte von Bradykinin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit bei allen Frequenzen.

Con-Vel ($\mu\text{m/s}$)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=45				
Kontrolle	MW	180	151	139
	SD	38	41	25
BK	MW	181	136	140
10 nM	SD	30	26	20
	p-Value	0,85366	0,06058	0,81294
BK	MW	*206	*189	*158
100 nM	SD	44	27	29
	p-Value	0,01679	0,00500	0,00529
BK	MW	*204	*198	*157
1 μM	SD	42	33	36
	p-Value	0,02207	0,00205	0,01768

Tabelle 7: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen 10nM (BK10), 100nM (BK100) und 1 μM (BK1). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, n=45.

Ebenso war bei einer höheren Konzentration von 1 μM Bradykinin eine Zunahme der Relaxationsgeschwindigkeit von 16,8 +/- 3,6% bei 2 Hz zu erkennen (s. Abbildung 18 und Tabelle 8).

Bradykinin 10nM, 100nM und 1µM

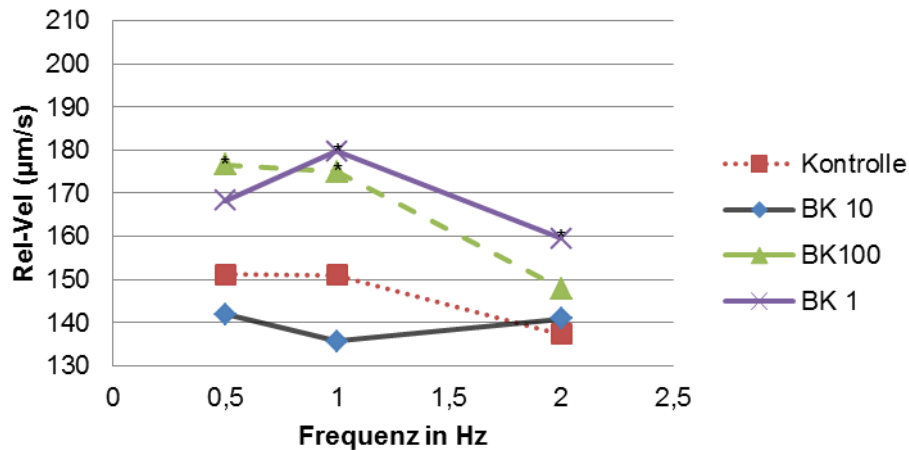


Abbildung 18: Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) in µm/s ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen 10nM (BK10), 100nM (BK100) und 1µM (BK1) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=45, +/- SD siehe Tab. 8, *p<0,05 vs. C).

Diese Ergebnisse zeigten, dass auch die Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten, abhängig von der Konzentration des Bradykinin, positiv beeinflusst wird.

Rel-Vel (µm/s)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=45				
Kontrolle	MW	151	151	137
	SD	46	41	26
BK 10 nM	MW	142	136	141
	SD	28	26	38
	p-Value	0,30732	0,06058	0,63492
BK 100 nM	MW	*177	*175	148
	SD	52	27	30
	p-Value	0,02273	0,00500	0,13636
BK 1 µM	MW	168	*180	*160
	SD	34	33	28
	p-Value	0,08117	0,00205	0,00214

Tabelle 8: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) in µm/s ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Bradykinin-

Konzentrationen 10nM (BK10), 100nM (BK100) und 1 μ M (BK1). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=45$.

Fazit: Diese Experimente mit Bradykinin wurden zur Positivkontrolle für die vorgenannten Experimente mit Ramiprilat durchgeführt. Sie ließen erkennen, dass es möglich gewesen wäre, einen potenziell stärkeren Einfluss von Ramiprilat festzustellen, wenn er vorhanden gewesen wäre.

Die konzentrationsabhängigen positiven Effekte von Bradykinin auf die Zellkontraktivität, die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten konnten bestätigt werden.

4.3 Einfluss von Bradykinin auf Kardiomyozyten bei Anwendung des Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE140 und Hemmung der NO-Synthese durch L-NA

Um die Frage zu klären, ob der geringfügige Einfluss von Ramiprilat auf die Zellverkürzung durch einen direkten oder einen Bradykinin-Rezeptor-abhängigen Effekt vermittelt wird, sind Versuchsreihen zur Zellverkürzung durchgeführt worden, in denen die Effekte durch den Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 antagonisiert wurden.

Wie sich in den vorhergehenden Experimenten zeigte, verbessert Bradykinin die Zellverkürzung. In dieser neuen Versuchsreihe verursachte Bradykinin in der Konzentration von 0,1 μ M eine Zunahme der Zellverkürzung um 11,0 \pm 2,4% bei einer Frequenz von 2 Hz (s. Abbildung 19 und Tabelle 9). Bradykinin in gleicher Konzentration und Frequenz unter Zugabe von HOE140 erbrachte nur eine Zunahme der Zellverkürzung um 1,3 \pm 0,4%.

Bradykinin 100nM und HOE140

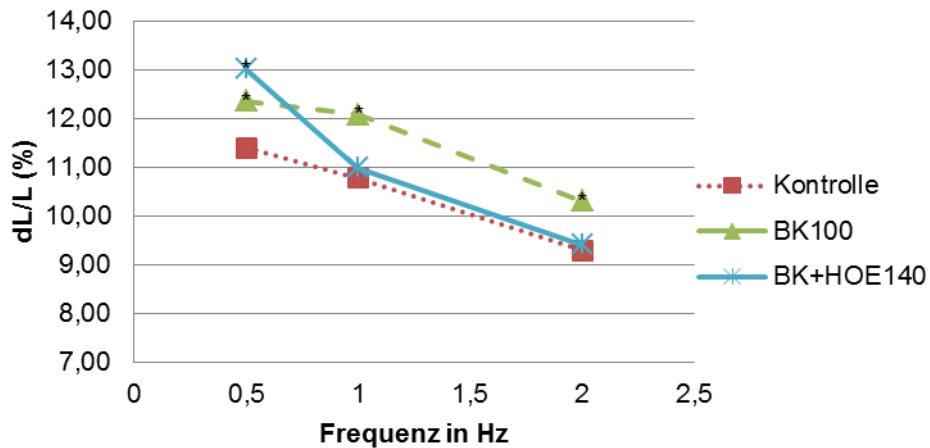


Abbildung 19: Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 100nM (BK100) und unter gleichzeitiger Zugabe von HOE140 (BK+HOE140) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=54, +/- SD siehe Tab. 9, *p<0,05 vs. C).

Diese Experimente zeigten, dass die positiven Effekte von Bradykinin 100 nM auf die Zellkontraktilität der Herzmuskelzellen in einer Frequenz von 1 und 2 Hz fast vollständig durch HOE140 (Icatibant) gehemmt werden konnten.

dL/L(%)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=54				
Kontrolle	MW	11,41	10,79	9,30
	SD	1,76	1,52	1,40
BK 100 nM	MW	*12,37	*12,09	*10,32
	SD	2,11	1,73	1,67
	p-Value	0,0290	0,0010	0,0081
BK+HOE	MW	*13,02	11,00	9,42
	SD	1,72	1,46	1,35
	p-Value	0,0001	0,5332	0,7060

Tabelle 9: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 100nM (BK100) und unter gleichzeitiger Zugabe von HOE140 (BK+HOE140). * p<0,05 vs. Kontrolle, n=54.

Als Ergebnis zeigt sich, dass bei Anwendung von HOE 140 keine Zunahme der Zellverkürzung durch Bradykinin bei 1 und 2 Hz mehr festzustellen war. Jedoch erbrachten die Messungen zur Kontraktionsgeschwindigkeit nicht zu erwartende Ergebnisse. HOE140 konnte wider Erwarten die Bradykinin-Einflüsse nicht nur nicht inhibieren, sondern es verstärkte diese sogar in geringem Ausmaß (s. Abbildung 20 und Tabelle 10).

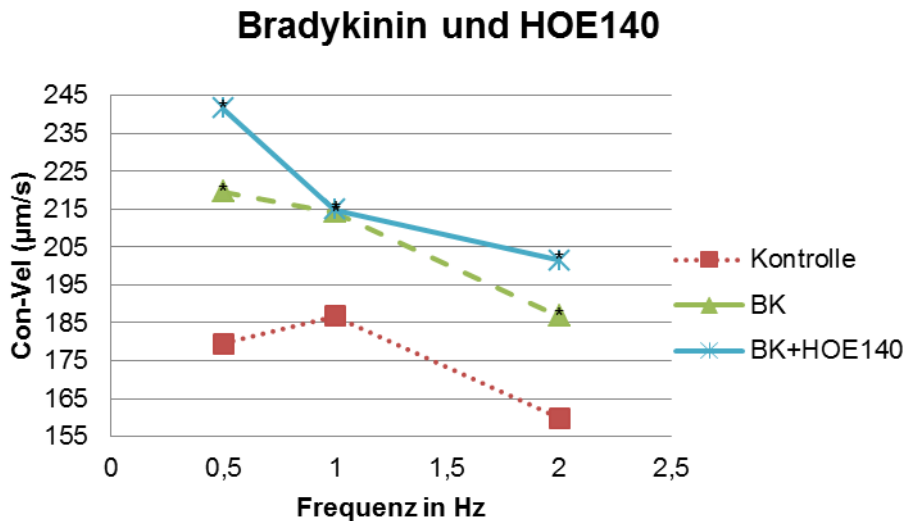


Abbildung 20: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-vel) ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 100nM (BK100) und unter gleichzeitiger Zugabe von HOE140 (BK+HOE140) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=54, +/- SD siehe Tab. 10, *p<0,05 vs. C).

Con-Vel (µm/s)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=54				
Kontrolle	MW	179	187	160
	SD	41	42	36
BK	MW	*220	*214	*187
	SD	38	36	32
	p-Value	0,0000	0,0030	0,0009
BK+HOE	MW	*242	*215	*202
	SD	40	31	27
	p-Value	0,0000	0,0017	0,0000

Tabelle 10: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 100nM (BK100) und unter gleichzeitiger Zugabe von HOE140 (BK+HOE140). * p<0,05 vs. Kontrolle, n=54.

In einem zweiten Ansatz sollte gezeigt werden, dass die Einflüsse von Ramiprilat Bradykinin-Rezeptor-unabhängig sind. Dabei wurden die mit Bradykinin oder Ramiprilat inkubierten Zellen zusätzlich mit L-NA in einer Konzentration von 1 μ M inkubiert, um die NO-Synthese zu hemmen. Es war festzustellen, dass Bradykinin mit L-NA inkubiert keinen weiteren Einfluss auf die Zellverkürzung verursachte (s. Abbildung 21 und Tabelle 11).

Bradykinin 1 μ M und L-NA

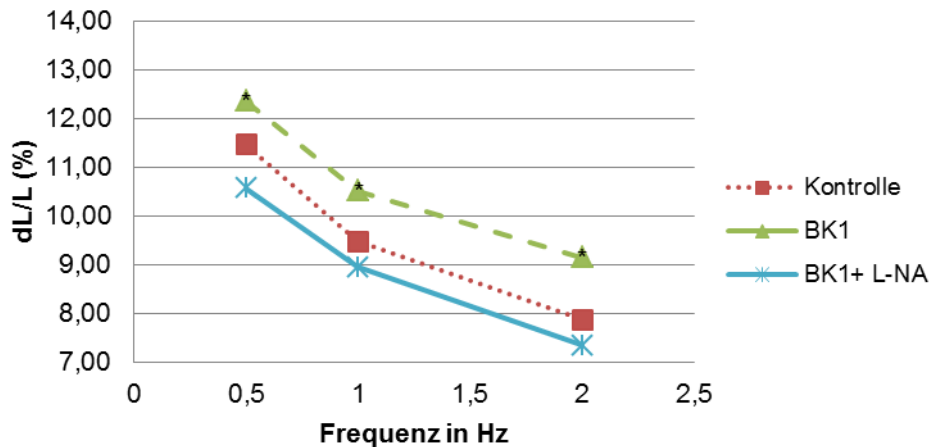


Abbildung 21: Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 1 μ M (BK1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (BK1+L-NA) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=48, +/- SD siehe Tab. 11, *p<0,05 vs. C).

Bradykinin zeigte auch hier durchweg signifikante Veränderungen der Zellkontraktilität, welche durch L-NA vollständig unterdrückt werden konnten.

dL/L (%)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=48				
Kontrolle	MW	11,47	9,48	7,88
	SD	1,35	1,24	1,32
BK	MW	*12,36	*10,52	*9,15
	SD	1,63	1,49	1,33
	p-Value vs C	0,0250	0,0036	0,0003
BK+L-NA	MW	10,58	8,96	7,35
	SD	2,18	2,20	1,88
	p-Value vs C	0,0570	0,2363	0,1895

Tabelle 11: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 1µM (BK1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (BK1+L-NA). * p<0,05 vs. Kontrolle, n=48.

Die mittlere Zunahme der Zellverkürzung, durch Bradykinin in einer Konzentration von 1µM verursacht, lag bei einer Frequenz von 2 Hz in dieser Versuchsreihe bei 16,1 +/- 2,4%. Bei gleichzeitiger Anwendung von L-NA trat jedoch keine Veränderung auf. Auch die positiven Effekte von Bradykinin auf die Kontraktionsgeschwindigkeit konnten unter Zugabe von L-NA vollständig unterdrückt werden (siehe Abbildung 22 und Tabelle 12).

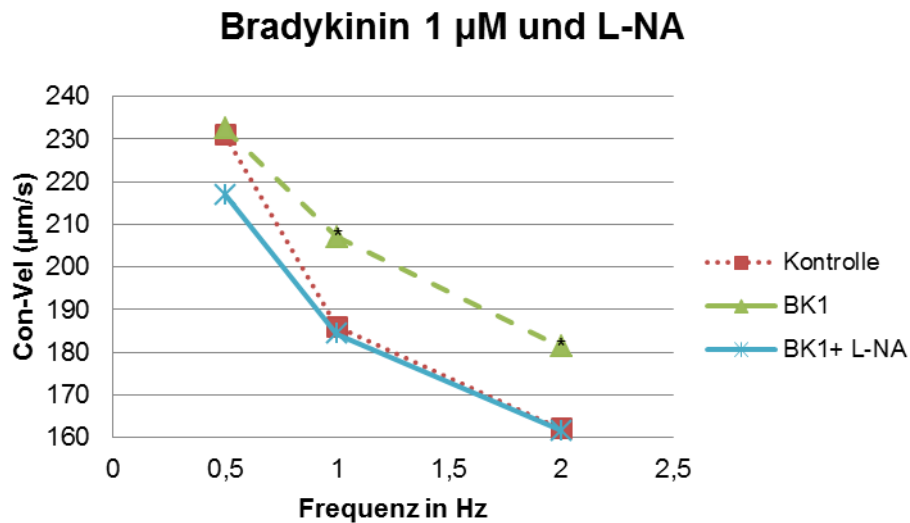


Abbildung 22: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in µm/s ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 1µM (BK1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (BK1+L-NA) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=48, +/- SD siehe Tab. 12, *p<0,05 vs. C).

Bradykinin 1 µM bewirkte bei 1 und 2 Hz erneut signifikante Steigerungen der Kontraktionsgeschwindigkeit, welche unter gleichzeitiger Anwendung von L-NA bei diesen Frequenzen ebenfalls vollständig gehemmt werden konnten.

Con-Vel (µm/s)		n=48		
		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
Kontrolle	MW	231	186	162
	SD	41	38	29
BK	MW	232	*207	*181
	SD	54	42	35

Ergebnisse

	p-Value vs C	0,8974	0,0406	0,0209
BK+L-NA	MW	217	184	162
	SD	46	40	33
	p-Value vs C	0,2023	0,8621	0,9655

Tabelle 12: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin $1\mu\text{M}$ (BK1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (BK1+L-NA). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=48$.

Zusammenfassend zeigte sich bei diesen Versuchsreihen, dass die bereits nachgewiesenen positiven Effekte von Bradykinin auf die kontraktile Ansprechbarkeit unter Zugabe von HOE140 und L-NA nahezu vollständig aufgehoben werden konnten, jedoch zeigten sich wohl auch agonistische Effekte des B2-Rezeptorantagonisten.

4.4 Einfluss von Ramiprilat auf Kardiomyozyten bei Anwendung des Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE140 und L-NA

Im Gegensatz zu dem Effekt von Bradykinin auf die Zellverkürzung waren die positiven Einflüsse von Ramiprilat in einer Konzentration von 100 nM auf die Kontraktionsgeschwindigkeit sowie auf die Time-to-Peak unter Hinzugabe von HOE 140 nicht vollständig zu antagonisieren.

Die Kontraktionsgeschwindigkeit konnte in diesen Experimenten durch Ramiprilat in einer Konzentration von 100 nM um $+13,1 \pm 2,8\%$ ($n=54$, $p=0,0085$) bei einer Frequenz von 2 Hz gesteigert werden (siehe Abbildung 23 und Tabelle 13).

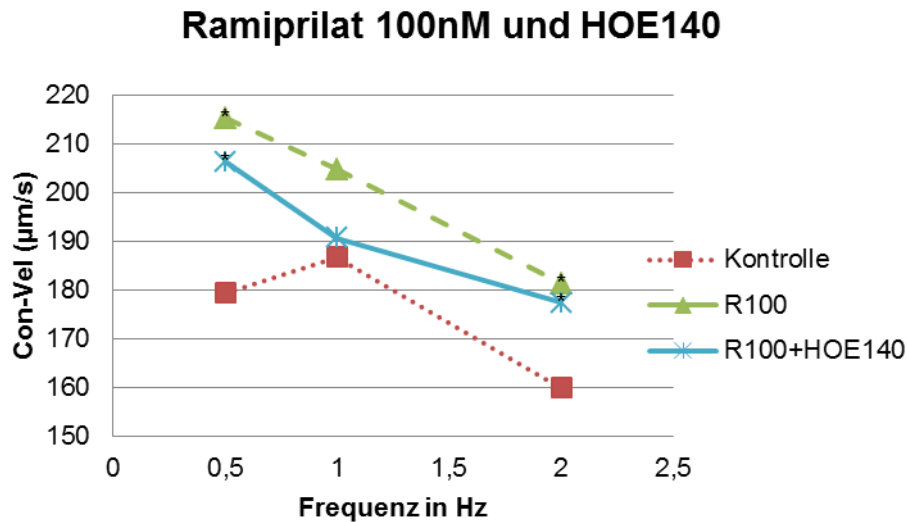


Abbildung 23: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von Icatibant (R100+HOE140) (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=54$, \pm SD siehe Tab. 13, $*p<0,05$ vs. C).

Trotz gleichzeitiger Anwendung mit HOE140 steigerte Ramiprilat die Kontraktionsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten um $+11,2 \pm 3,1\%$ ($n=54$, $p=0,0313$) bei 2 Hz.

Auch bei einer Frequenz von 0,5 Hz konnten die signifikanten Veränderungen der Kontraktionsgeschwindigkeit bei einer Ramiprilat-Konzentration von 100 nM durch Zugabe von HOE140 nicht unterdrückt werden.

Con-Vel ($\mu\text{m/s}$)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=54				
Kontrolle	MW	179	187	160
	SD	41	42	36
Rami	MW	*215	205	*181
	SD	41	39	33
	p-Value	0,0002	0,0518	0,0085
Rami+HOE	MW	*206	191	*178
	SD	40	36	35
	p-Value	0,0045	0,6571	0,0313

Tabelle 13: Mittelwerte und \pm Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramip-

rilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von Icatibant (R100+HOE140). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=54$.

Ramiprilat 100 nM verursachte in den nächsten Versuchsreihen bei allen Frequenzen eine signifikante Verkürzung der Time-to-Peak, welche ebenfalls unter gleichzeitiger Anwendung von HOE140 nicht gehemmt werden konnte (siehe Abbildung 24 und Tabelle 14).

Ramiprilat verkürzte hier die Time-to-Peak um $-7,9 \pm 1,3\%$ ($n=54$, $P=0,001$) bei der Frequenz von 2 Hz.

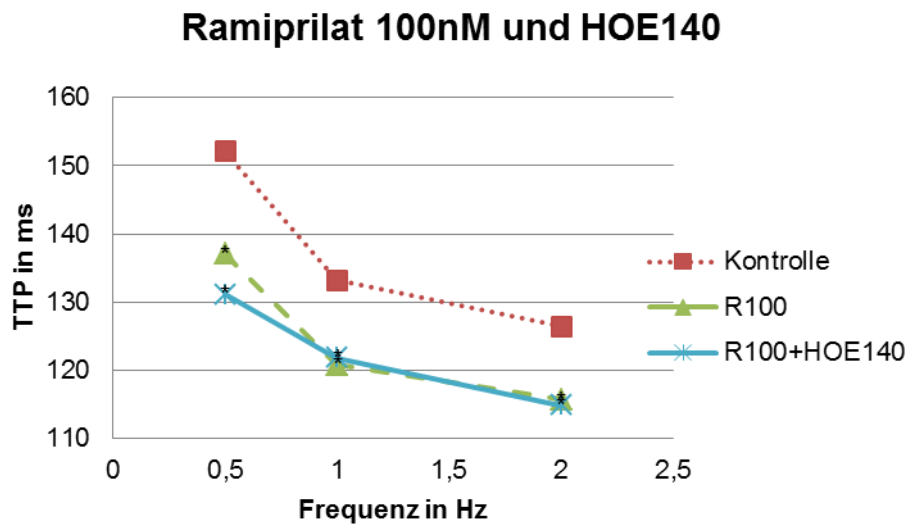


Abbildung 24: Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von Icatibant (R100+HOE140) (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=54$, \pm SD siehe Tab. 14, * $p < 0,05$ vs. C).

Die Time-to-Peak verkürzte sich auch unter gleichzeitiger Anwendung von HOE 140 um $-8,7 \pm 1,0\%$ ($n=54$, $P=0,00017$) bei der gleichen Frequenz und Ramiprilat-Konzentration.

TTP (ms)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=54				
Kontrolle	MW	152	133	126
	SD	47	11	9
Rami	MW	*137	*121	*116
	SD	15	14	12
	p-Value	0,0000	0,0001	0,0001

Ergebnisse

Rami+HOE	MW	*131	*122	*115
	SD	12	10	10
	p-Value	0,0000	0,0000	0,0000

Tabelle 14: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von Icatibant (R100+HOE140). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=54$.

Als Ergebnis zeigte sich hier, dass HOE140 die positiven Effekte von Ramiprilat 100 nM nicht vollständig unterdrücken konnte und Ramiprilat auch hierunter signifikante Veränderungen verursachte.

Im Gegensatz zur Anwendung bei Bradykinin konnte L-NA auch bei den folgenden Untersuchungen die Reaktion der Zellen auf Ramiprilat nicht vollständig hemmen und nur geringfügig beeinflussen (siehe Abbildung 25 und Tabelle 15). Der ACE-Hemmer erhöhte in dieser Versuchsreihe die Kontraktionsgeschwindigkeit um $15,8 \pm 3,5\%$ und in Gegenwart von L-NA um $11,1 \pm 3,6\%$ bei einer Frequenz von 2 Hz (beide $n=33$, $P < 0,05$ vs. Kontrolle, wobei sich beide nicht signifikant voneinander unterscheiden).

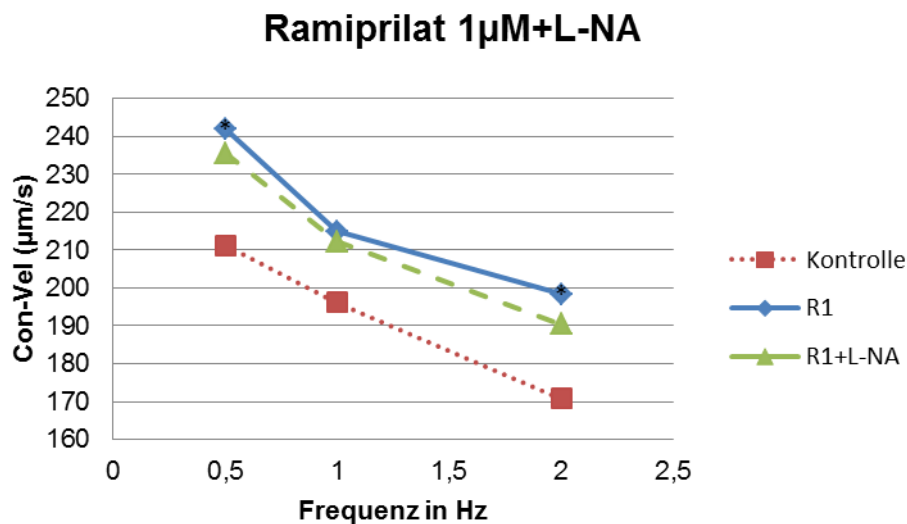


Abbildung 25: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 1 μM (R1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (R1+L-NA) (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=33$, +/- SD siehe Tab. 15, * $p < 0,05$ vs. C).

Auch in Gegenwart von L-NA erhöhte Ramiprilat die Kontraktionsgeschwindigkeiten, wenn auch nicht mehr signifikant messbar.

Con-Vel ($\mu\text{m/s}$)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=33				
Kontrolle	MW	211	196	171
	SD	39	34	35
Ramiprilat 1 μM	MW	*242	215	*198
	SD	33	31	34
p vs. Kontrolle		0,0085	0,0831	0,0139
Ramiprilat 1 μM L-NA	MW	236	212	190
	SD	39	33	35
p vs. Kontrolle		0,0544	0,1397	0,0743
p vs. Ram 1		0,5711	0,7828	0,4549

Tabelle 15: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 1 μM (R1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (R1+L-NA). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.

Vergleichbare Werte zeigten sich bei der entsprechenden Verkürzung der Time-to-Peak. Ramiprilat verkürzte die Time-to-Peak um 7,9 +/-2,1% ohne und um 7,9 +/-1,7% unter Zugabe von L-NA bei einer Frequenz von 2 Hz (siehe Abbildung 26 und Tabelle 16).

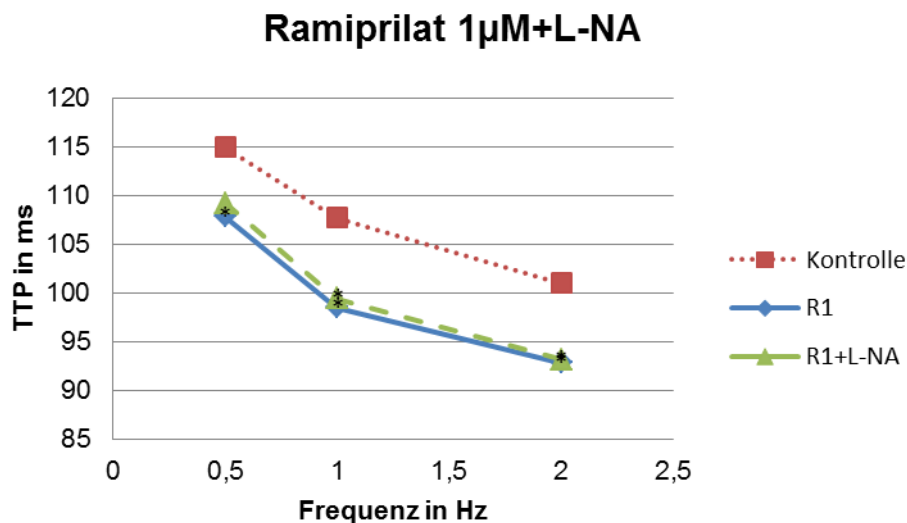


Abbildung 26: Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (R100+L-NA) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=54, +/- SD siehe Tab. 16, *p<0,05 vs. C).

Die Time-to-peak verkürzte sich bei den Frequenzen von 1 und 2 Hz auch unter Zugabe von L-NA signifikant.

TTP (ms)		0,5 Hz	1 Hz	2 Hz
n=33				
Kontrolle	MW	115	108	101
	SD	10	9	9
Ramiprilat	MW	*108	*99	*93
1 µM	SD	11	11	12
p vs. Kontrolle		0,0266	0,0025	0,0098
Ramiprilat	MW	109	*99	*93
1 µM	SD	12	12	10
L-NA				
p vs. Kontrolle		0,0934	0,0094	0,0059
p vs. Ram 1		0,7063	0,7696	0,9305

Tabelle 16: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (R100+L-NA). * p<0,05 vs. Kontrolle, n=54.

Fazit: Weder L-NA noch HOE140 konnten die durch Ramiprilat verursachten signifikanten Veränderungen auf die Kontraktionsgeschwindigkeit und die Time-to-Peak der Kardiomyozyten nicht vollständig hemmen. Dies steht im Gegensatz zu den Befunden für Bradykinin.

4.5 Erkundung möglicher Einflüsse von Ramiprilat auf die AP-1-Aktivierung sowie auf die ACE-Expression an Kardiomyozyten

4.5.1 Nachweis für fehlende Ramiprilat-Einflüsse auf die AP-1-Aktivierung in Herzmuskelzellen

Es ist bereits verifiziert worden, dass Kardiomyozyten ACE exprimieren und auf Ramiprilat reagieren. Als nächstes war zu prüfen, ob der ACE-Inhibitor Ramiprilat eine AP-1-Aktivierung in Kardiomyozyten induziert, wie dies bei Endothelzellen festgestellt wurde. Um diese Aktivierung nachzuweisen, wurden Versuche zur Elektromobilität durchgeführt. Die isolierten Herzmuskelzellen wurden, wie im Kapitel 3.1 beschrieben, gewonnen. Drei Viertel der Zellen wurden dann, wie in Kapitel 3.1.3 dargelegt, für 30 bzw. 60 Minuten in modifiziertem Kulturmedium mit Phenylephrin [10 μ M], Bradykinin [1 μ M] und Ramiprilat [100 nM] bei 37°C inkubiert. Das übrige Viertel wurde als Kontrolle für die gleiche Zeit mit modifiziertem Kulturmedium ohne weitere Zusätze inkubiert. Danach wurde die AP-1-Bindungsaktivität mittels Electromobility-Shift-Assays gemessen. Dabei zeigte sich, dass Ramiprilat in einer Konzentration von 0,1 μ M keine AP-1 Aktivierung in Kardiomyozyten induzierte (siehe Abbildung 27). Im Gegensatz dazu aktivierte Phenylephrin, ein α -Adrenozeptor-Agonist, der als AP-1-Aktivator bekannt ist, AP-1 innerhalb von 60 min um 54 +/-10% (n=7, *p<0,05 vs. C).

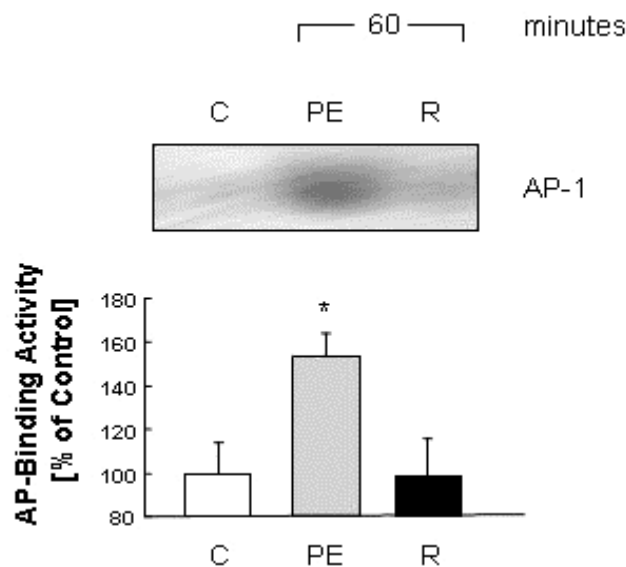


Abbildung 27: AP-1-Aktivierung in Kardiomyozyten, gemessen in Prozent des Kontrollmediums (C), bei Phenylephrin (PE, [10 μ M]) und Ramiprilat (R, [0,1 μ M]); die

Querbande zeigt eine repräsentative Retard-Gel-Bande (dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung für n=7, *p<0,05 vs. C).

Wie Phenylephrin, jedoch im Gegensatz zu Ramiprilat, verursachte das ebenfalls zur Kontrolle eingesetzte Bradykinin eine deutliche AP-1 Aktivierung in Herzmuskelzellen. Im Mittel erhöhte sich die AP-1 Bindungsaktivität um 55 +/-35% (siehe Abbildung 28). Somit war der Einfluss von Bradykinin vergleichbar mit dem von Phenylephrin, das die AP-1-Bindungsaktivität in dieser Versuchsreihe um 68 +/-23% (n=4, *p<0,05 vs. C) erhöhte (siehe Abbildung 28).

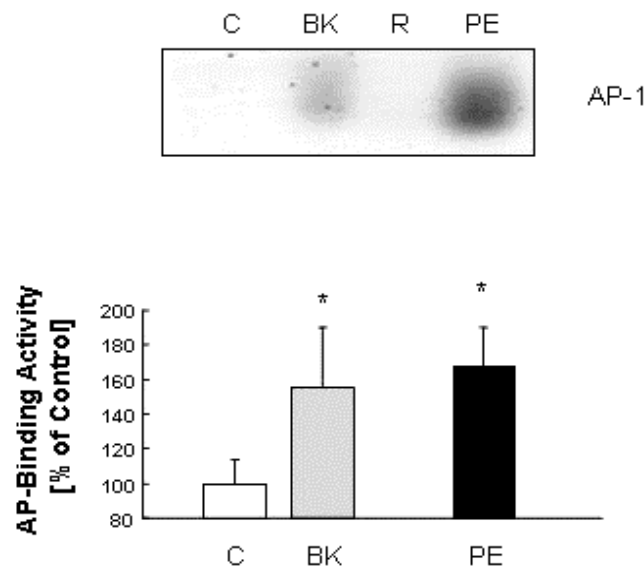


Abbildung 28: AP-1-Aktivierung in Kardiomyozyten, gemessen in Prozent des Kontrollmediums (C), bei Bradykinin (BK, [1 μ M]) und Phenylephrin (PE, [10 μ M]); die Querbande zeigt eine repräsentative Retard-Gel-Bande (dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung für n=4, *p<0,05 vs. C).

Um auszuschließen, dass etwa die Konzentration des Ramiprilats oder der zeitliche Ablauf der Experimente eine exakte Messung der AP-1-Aktivierung an Herzmuskelzellen verhindert hätten, wurden die Versuchsergebnisse mit denen der Experimente an mikrovaskulären Endothelzellen im Rahmen einer Positivkontrolle verglichen. Wie zu erwarten war, induzierte Ramiprilat die AP-1-Aktivierung zeitabhängig in den Endothelzellen (siehe Abbildung 29). Dabei erhöhte Ramiprilat die AP-1-Bindungsaktivität in mikrovaskulären Endothelzellen innerhalb von 60 Minuten um 47 +/-33% (n=6, *p<0,05 vs. C).

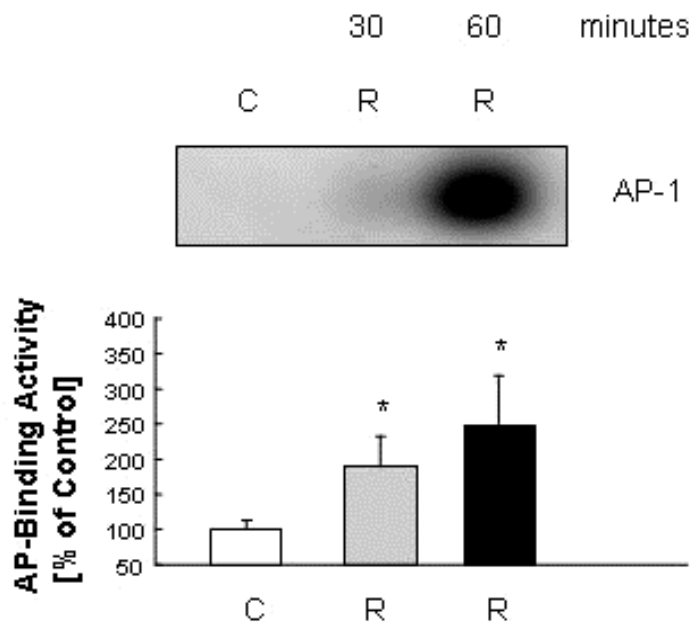


Abbildung 29: AP-1-Aktivierung in Endothelzellen durch Ramiprilat [R, 100 nM] nach 30 und 60 Minuten zur Positivkontrolle der Versuchsreihen an Kardiomyozyten; die Querbande zeigt eine repräsentative Retard-Gel-Bande (dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung für n=6, *p<0,05 vs. C).

4.5.2 Nachweis für fehlende Ramiprilat-Einflüsse auf die ACE-Expression an Herzmuskelzellen

Da Ramiprilat die endogene ACE Expression an Endothelzellen über die AP-1-Aktivierung erhöht, war zu untersuchen, ob Bradykinin oder Ramiprilat, jeweils in der Konzentration von 0,1µM, die ACE- Expression an Herzmuskelzellen verändern.

Entsprechend wurden Experimente mit beiden Stoffen 24 Stunden lang an Herzmuskelzellen durchgeführt. Die isolierten Kardiomyozyten wurden, wie im Kapitel 3.1 beschrieben, gewonnen. Zwei Drittel der Zellen wurden dann, wie in Kapitel 3.1.3 erläutert, für 24 Stunden in modifiziertem Kulturmedium mit Bradykinin [100 nM] und Ramiprilat [100 nM] bei 37°C inkubiert. Das übrige Drittel wurde als Kontrolle für die gleiche Zeit mit modifiziertem Kulturmedium ohne weitere Zusätze inkubiert. Danach wurde die RNA der Zellen isoliert, mittels RT-PCR vervielfältigt und die ACE-Expression gemessen.

Dabei zeigte sich, dass weder Bradykinin (+1,14 +/-0.36-fach, n=13, p<0,05 vs. Kontrolle) noch Ramiprilat (+1,11 +/-0,41-fach, n=13, p<0,05 vs. Kontrolle) die ACE-Expression signifikant verändern. Bradykinin aktiviert zwar AP-1 in Herzmuskelzellen, dies führt jedoch nicht zu einer ACE-Induktion in Kardiomyozyten, obwohl diese Zellen ACE exprimieren.

Als Ergebnis der Erkundung möglicher Ramiprilat-Einflüsse ist festzustellen, dass dieser ACE-Hemmer an Kardiomyozyten, im Gegensatz zu den Versuchen an Endothelzellen, weder AP-1 aktivierte noch die ACE-Expression über einen anderen Signalweg beeinflusste.

5 Diskussion

5.1 Ausgangsdaten für den wissenschaftlichen Diskurs

Die Arbeit verfolgte das Ziel, eine mögliche direkte Einflussnahme von Ramiprilat auf Herzmuskelzellen im Detail zu untersuchen und zu erkunden, ob diese, wie an Endothelzellen bereits beschrieben, über eine AP-1-Aktivierung vermittelt werden.

Bisher gab es hierzu in der Forschung noch keine eindeutigen Aussagen. Aus Ergebnissen etwaiger Vergleichsmodelle konnten wegen unterschiedlicher Rahmenbedingungen für die hier anstehenden Untersuchungen keine unmittelbaren Folgerungen abgeleitet werden. Die meisten Untersuchungen hierzu wurden an isolierten Rattenherzen in-vivo durchgeführt. Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten, wie den in dieser Arbeit erfolgten in-vitro-Experimenten, konnten keine zum Vergleich herangezogen werden.

In dieser Untersuchung galt es nicht nur zu klären, ob und in welcher Intensität Ramiprilat über dessen mögliche Bindung an ACE auf Herzmuskelzellen Einfluss nimmt, sondern auch, ob ein möglicher direkter Signalweg induziert wird oder die Effekte womöglich über einen anderen Signalweg vermittelt werden, der das Kontraktionsverhalten der Zellen verändert.

Obwohl bereits an Endothelzellen gezeigt wurde, dass Ramiprilat ein so genanntes ACE-abhängiges Outside-in-Signal hervorruft [Kohlstedt et al., 2004] und dessen direkter Einfluss auf die Zielzellen bereits nachgewiesen wurde [Fleming et al., 2006], gibt es nur wenige Untersuchungen, die der Frage nachgehen, ob ein vergleichbarer Signalweg bei Kardiomyozyten auftritt. So wurde bereits beschrieben, dass der ACE-Hemmer Perindoprilat den vorübergehenden Einwärtsstrom an Herzmuskelzellen von Meerschweinchen und Kaninchen vermindert [Enous et al. 1992, Enous&Opie 1994].

Prinzipiell könnte dieser Mechanismus die hier vorgestellten Ergebnisse der Experimente mit Ramiprilat zum Teil erklären. Jedoch ist auch eine Signalwegübertragung via Bradykinin und NO weiterhin möglich. Die vorgenannten Ergebnisse wurden eher als akute denn als dauerhafte Einflüsse erzielt.

Derzeit bleibt weiterhin unklar, über welchen Effekt die Einflüsse von Ramiprilat auf die Zellverkürzungsdynamik nach 24 Stunden erklärt werden könnten.

5.2 Einfluss von Ramiprilat auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten

Aufgrund der Hypothese, dass Ramiprilat Kardiomyozyten direkt beeinflussen kann, waren zunächst, wie in Kapitel 1.6 aufgeführt, die möglichen Einflussmechanismen dieses ACE-Hemmers zu erkunden. Ergänzend hierzu und zur Kontrolle wurden sowohl die Einflüsse als auch die Hemmung der Einflüsse von Bradykinin untersucht.

Die meisten der hier vorgestellten Ergebnisse wurden von Herzmuskelzellen beider Ventrikel abgeleitet. Dabei repräsentiert die Präparation der Herzmuskelzellen, wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, vorwiegend jene des linken Ventrikels.

Es wurden alle Frequenzen betrachtet, jedoch wurde das Hauptaugenmerk auf die der physiologischen Frequenz der Wistar-Ratte am nächsten kommende Frequenz gelegt. Physiologisch exakt gleiche Frequenzen lassen sich unter den apparenten Bedingungen schlecht standardisieren.

Da die kontraktile Aktivität die wichtigste Funktion von Herzmuskelzellen ist, sollte zuerst erkundet werden, ob Ramiprilat diese Eigenschaft der Kardiomyozyten in-vitro beeinflussen kann.

Die hierzu durchgeführten Versuchsreihen führten zu der Erkenntnis, dass zwar Ansätze für eine erhöhte Zellverkürzung, jedoch keine signifikante Veränderung der Zellkontraktilität festzustellen waren.

Im Gegensatz zur fehlenden Signifikanz der Kontraktilitätsmessungen zeigten die Messungen zu den anderen Parametern signifikante Ergebnisse.

Mit Ramiprilat inkubierte Zellen erhöhten ihre Kontraktionsgeschwindigkeit im Mittel um etwa 15,8 +/-3,5% bei einer Ramiprilat-Konzentration von 1 μ M und einer Frequenz von 2 Hz; nur bei gleicher Konzentration und einer Frequenz von 1 Hz sowie bei der Konzentration von 100 nM bei 2 Hz konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Tendenziell zeigte sich jedoch eine messbare Steigerung der Kontraktionsgeschwindigkeit. Man hätte aber eher eine konstant signifikante Änderung im physiologischeren Frequenzbereich der Ratte erwartet und nicht bei einer Frequenz von 0,5 Hz.

Korrespondierend hierzu zeigte sich eine signifikante Abnahme der Time-to-Peak bei allen Frequenzen und Ramiprilat-Konzentrationen.

An den ebenso behandelten Kardiomyozyten zeigten sich zwar tendenziell höhere Relaxationsgeschwindigkeiten, aber nur noch bei einer 100 nM-Konzentration und einer Frequenz von 1 Hz ein signifikantes Ergebnis.

Es zeigte sich weiterhin, dass weder eine 10-fach höhere Ramiprilat-Konzentration noch ein Absenken der 2 Hz-Frequenz auf 0,5 Hz die jeweilige Kontraktions- bzw. Relaxationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle wesentlich beeinflussen konnte, was sich noch eindeutiger bei der Time-to-Peak und der R50 signifikant belegen ließ.

Aus den gewonnenen Daten ließ sich somit ableiten, dass Ramiprilat vorrangig die Time-to-Peak und die R50 sowie nachrangig die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Herzmuskelzellen beeinflusst, während es deren Kontraktilität nicht signifikant verändern kann.

5.3 Fehlender Einfluss des Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE140 und von L-NA auf Ramiprilat-Effekte an Kardiomyozyten

Als wesentliche Grundlage für den Nachweis, ob Ramiprilat auf einem möglichen direktem Signalweg die Reaktion der Herzmuskelzellen beeinflussen kann, war zu klären, ob dieser durch den Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE 140, der spezifisch die Bradykinin-Einflüsse hemmen kann und somit genaue Untersuchungen ermöglicht [Wirth et al.,1991] oder durch die NO-Synthese-Hemmung von L-NA blockiert werden kann.

In den hierzu durchgeführten Experimenten zeigte sich, dass die Ramiprilat-Einflüsse auf das Kontraktionsverhalten der Zellen durch HOE140 nicht vollständig zu antagonisieren waren.

Trotz dessen Anwendung konnte Ramiprilat eine gleich bleibende signifikante Erhöhung der Kontraktionsgeschwindigkeit bei 0,5 und 2 Hz sowie eine entsprechende Reduzierung der Time-to-Peak, signifikant bei allen gemessenen Frequenzen und Konzentrationen, der Zellen verursachen. Somit konnte gezeigt werden, dass dies mögliche direkte und nicht Bradykinin-vermittelte Einflüsse sein könnten. An Endothelzellen wurde bereits festgestellt, dass die Einflüsse der ACE-Hemmer nicht allein nur auf der Hemmung des Enzyms und der lokalen Anreicherung von Bradykinin beruhen können [Benzing et al., 1999]; dies zeigten nun auch die hier durchgeführten Experimente an Kardiomyozyten.

Als weiterer Beleg für eine mögliche direkte Einflussnahme von Ramiprilat auf Kardiomyozyten sollte nachgewiesen werden, ob die Einflüsse des ACE-Hemmers auch un-

abhängig von der NO-Synthese sind, entgegen der Erkenntnis, dass Ramiprilat von allen ACE-Hemmern am stärksten für eine NO-Freisetzung am Endothel verantwortlich ist [Zhang et al., 1997].

Hierzu wurden die mit Ramiprilat inkubierten Zellen zusätzlich mit L-NA behandelt, um die NO-Synthese kompetitiv zu hemmen.

Dabei zeigte sich, dass L-NA die Reaktion der Zellen auf Ramiprilat, im Gegensatz zu deren Reaktion auf Bradykinin, nicht beeinflussen konnte.

Die oben bereits beschriebenen positiven Effekte auf die Time-to-Peak und die R50 sowie die mäßigen auf die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit der Kardiomyozyten blieben entsprechend unverändert.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe bestätigten, dass das Kontraktionsverhalten der mit Ramiprilat inkubierten sowie der zusätzlich mit L-NA behandelten Zellen weitgehend unverändert blieb.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die hier untersuchten Einflüsse von Ramiprilat auf Herzmuskelzellen weder durch den Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 noch durch L-NA vollständig gehemmt werden konnten.

5.4 Erörterung einer möglichen direkten Einflussnahme von Ramiprilat auf Kardiomyozyten

Im ersten Abschnitt der Untersuchungen war zu klären, ob Ramiprilat Einflüsse auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten ausübt und dabei durch HOE 140 oder durch L-NA gehemmt werden kann. In einem weiteren Ansatz war danach zu klären, ob diese Einflüsse des ACE-Hemmers durch einen möglichen direkten Einfluss auf das von Herzmuskelzellen abstammende ACE oder indirekt durch einen Bradykinin-abhängigen Effekt hervorgerufen wurden.

Dabei war zunächst abzuleiten, dass Ramiprilat die ACE-Expression an Kardiomyozyten benötigt, um hierüber durch einen, wie an Endothelzellen bereits beschriebenen, AP-1 vermittelten Signalweg intrazelluläre Vorgänge induzieren zu können. Wie in 4.1.1 beschrieben, wurde die ACE-Expression an diesen Zellen nachgewiesen.

Hartman et al. zeigten, dass Bradykinin eine wichtige Rolle für die kardioprotektiven Einflüsse des ACE-Hemmers Ramiprilat spielt und, dass diese unabhängig von der möglichen Angiotensin-II-Synthesehemmung sind [Hartman et al., 1995]. In jenem Fall war der Einfluss von Ramiprilat Bradykinin-abhängig, in diesem Fall handelt es sich eher um einen Bradykinin-unabhängigen Effekt.

In der jetzigen Untersuchung wurden direkt funktionale, durch Ramiprilat ausgelöste Einflüsse auf Kardiomyozyten adulter Ratten festgestellt.

Fleming et al. stellten 2005 fest, dass die kardioprotektiven Einflüsse der ACE-Hemmer eher auf eine Aktivierung der ACE-Signalkaskade zurückzuführen seien als auf die Veränderung der Bradykinin- und Angiotensin-II-Konzentrationen.

Die direkte Induzierung der ACE-Signalkaskade durch ACE-Hemmer, die auch zu einer vermehrten Expression von COX-2 und dadurch zu einer Anreicherung von Prostacyclin führt und somit einen langzeit-kardioprotektiven Einfluss ausübt, scheint B2-Rezeptor-unabhängig zu sein, wobei ACE-Hemmer der geeignetste Agonist für die ACE-Kaskade sind [Fleming et al., 2005].

An Endothelzellen wurde bereits festgestellt, dass durch die Bindung von Ramiprilat an ACE über eine C-terminale Dimerisation eine ACE-abhängige intrazelluläre Signalkaskade induzieren kann, welche über eine Phosphorylierung von SER1270 und eine Aktivierung von JNK vermittelt wird [Kohlstedt et al., 2006].

Die in unseren Experimenten festgestellten Ergebnisse scheinen ebenfalls einen B2-Rezeptor-unabhängigen Signalweg zu bestätigen, jedoch ist es weiter fraglich, ob die positiven Effekte von Ramiprilat auf Kardiomyozyten wirklich direkt über ACE vermittelt werden.

Lucero et al. zeigten inzwischen auf, dass es exogenem ACE sogar möglich ist, an Oberflächenrezeptoren von Zellen der glatten Muskulatur der Aorta hochaffin zu binden, dann über Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, wie SHP2 und PDGFR- β , intrazelluläre Signalwege zu induzieren, anschließend von der Zelle aufgenommen werden zu können und zumindest in Fragmenten in den Nukleus eingeschleust werden und hier die Translation beeinflussen zu können [Lucero et al., 2009].

Dies lässt erkennen, dass es auch weitere Wege geben muss über die Ramiprilat seine direkten oder indirekten Effekte vermitteln kann.

Die hier an Kardiomyozyten festgestellten Veränderungen scheinen weiterhin Bradykinin-Rezeptor-unabhängig zu sein.

Dessen Beteiligung ist dennoch nicht auszuschließen.

Diese Erkenntnis erschließt sich aus den Ergebnissen, dass die Bradykinin-Effekte nahezu vollständig durch HOE 140, einen Bradykinin-Rezeptor-Antagonist, oder durch L-NA, das die üblichen Signalwege der Bradykinin-induzierten Signalkaskaden blockiert, antagonisiert werden. Demgegenüber konnte keiner dieser beiden Stoffe die Ramiprilat-Effekte wesentlich abschwächen.

Abschließend ist festzustellen, dass Ramiprilat nachweislich Einflüsse auf Kardiomyozyten ausübt, die über eine mögliche direkte Bindung an herzmuskelzellenabstam-

mendes ACE vermittelt werden könnten, jedoch ist auch weiterhin ein anderweitig vermittelter Signalweg nicht auszuschließen.

5.5 Ramiprilat- und Bradykinin-Einflüsse auf die AP-1-Aktivierung sowie auf die ACE-Expression an Kardiomyozyten

In den vorangegangenen Versuchsreihen konnte dokumentiert werden, dass Kardiomyozyten sowohl ACE exprimieren als auch unmittelbar auf Ramiprilat reagieren.

In einer weiteren Untersuchung sollte erkundet werden, ob der ACE-Hemmer Ramiprilat eine AP-1 Aktivierung in Herzmuskelzellen induziert, wie dies bei vaskulären Endothelzellen bereits festgestellt wurde. Diese Aktivierung sollte durch Versuche zur Elektromobilität nachgewiesen werden. Als weiterer Stoff ist Phenylephrin bei diesen Messungen zur AP-1-Aktivierung in Herzmuskelzellen eingesetzt worden.

Die Experimente zeigten jedoch, dass Ramiprilat keine AP-1 Aktivierung in Herzmuskelzellen induzierte.

Im Gegensatz dazu verursachten die zur Kontrolle eingesetzten Stoffe Bradykinin und Phenylephrin jeweils eine deutliche AP-1-Aktivierung in Kardiomyozyten.

Um Fehler bei den Messungen der AP-1-Aktivierung durch Ramiprilat auszuschließen, wurden diese im Rahmen einer Positivkontrolle mit den Resultaten der vergleichbaren Experimente an Endothelzellen verglichen. Dabei zeigte sich, dass der ACE-Hemmer die AP-1-Aktivierung zeitabhängig in Endothelzellen induzierte.

Somit ließ sich bestätigen, dass Ramiprilat keinen Einfluss auf die AP-1-Aktivierung an Kardiomyozyten hat und somit auch kein direkter ACE-vermittelter Signalweg über eine AP-1-Aktivierung möglich ist. Es bleibt somit weiter unklar, worüber die gesicherten Ramiprilat-Effekte auf Kardiomyozyten induziert werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits nachgewiesen, dass Ramiprilat die endogene ACE-Expression an Endothelzellen durch die AP-1-Aktivierung erhöht.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte nun geklärt werden, ob Ramiprilat und als Kontrolle Bradykinin die ACE-Expression an Herzmuskelzellen verändern können. Hierzu wurden diese mit beiden Stoffen 24 Stunden behandelt, danach gesammelt, deren RNA wurde isoliert und mittels RT-PCR analysiert.

Dabei war festzustellen, dass weder Ramiprilat noch Bradykinin die ACE-Expression signifikant veränderten. Für Bradykinin war zu folgern, dass dieser Stoff zwar AP-1 in Herzmuskelzellen aktiviert, dass dies jedoch nicht zu einer ACE-Induktion in Kardiomyozyten führt, obwohl an deren Zelloberfläche ACE exprimiert wird.

Somit ist es Bradykinin nun nachweislich möglich, nicht nur über einen B2-Rezeptor-vermittelten Weg sondern auch über eine AP-1-Aktivierung Signalwege in Kardiomyozyten zu induzieren und weiterzuleiten, jedoch nicht Ramiprilat.

5.6 Einflüsse von Bradykinin auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten sowie deren Hemmung durch HOE140 und L-NA

Zur Ergänzung der Untersuchungen zu den Einflüssen des ACE-Inhibitors Ramiprilat auf Kardiomyozyten wurden die gleichen Versuchsreihen zur Messung der Bradykinin-Effekte auf diese Zellen durchgeführt.

Durch die Kontrollmessungen konnten folgende weitere Daten verifiziert werden:

- Die Bradykinin-Einflüsse auf das Kontraktionsverhalten von Herzmuskelzellen,
- die B2-rezeptorabhängige Einflussnahme von Bradykinin auf Kardiomyozyten,
- die Beteiligung von NO-vermittelten Bradykinin-Effekten,
- die Hemmung von Bradykinin-Effekten durch HOE 140 und L-NA,
- der Bradykinin-Einfluss auf die AP-1-Aktivierung und
- der fehlende Einfluss von Bradykinin auf die ACE-Expression.

Ergänzend zu den Experimenten mit Bradykinin wurden zur Positivkontrolle zusätzliche Versuchsreihen an mikrovaskulären Endothelzellen durchgeführt.

Die Resultate aus diesen ergänzenden Versuchen belegten nicht nur die bereits bekannten Einflüsse dieses Stoffes auf Herzmuskel- oder Endothelzellen, sondern stellten auch einen wichtigen Beitrag zur Verifizierung der Messergebnisse zu Ramiprilat dar und zeigten unter anderem eine direkte Einflussnahme von Bradykinin auf die Kontraktilität der Herzmuskelzellen über B2-Rezeptoren auf.

Bei den Experimenten mit Bradykinin war festzustellen, dass dieser Stoff, im Gegensatz zu Ramiprilat, eine deutliche signifikante Erhöhung aller untersuchten Kontraktionsparameter verursachte. Hierzu gehörte, dass Bradykinin im Vergleich zu dem ACE-Inhibitor Ramiprilat lastfrei die Zellverkürzung an Herzmuskelzellen innerhalb von 24 Stunden erhöhte.

Weiterhin zeigte sich, dass die Bradykinin-Effekte sowohl konzentrations- als auch frequenzabhängig waren. So bewirkte Bradykinin in der Konzentration von 100 nM sowie bei der Frequenz von 2,0 Hz die jeweils signifikanteste Zellverkürzung.

Im Gegensatz hierzu waren die von Ramiprilat verursachten Kontraktionseffekte frequenzunabhängig. Es erscheint daher eher unwahrscheinlich, dass die bei Ramiprilat

beobachteten Einflüsse auf das Kontraktionsverhalten der Zellen Bradykinin-abhängig sind. Wobei auch beschrieben wurde, dass nicht nur Bradykinin und Kallidin B2-Rezeptoren aktivieren können, sondern auch Kallikrein und andere Serinproteasen dazu in der Lage sind [Hecquet et al., 2000]. Die Messungen mit Bradykinin bestätigten nicht nur die Plausibilität der Messmethodik, sondern auch die abweichenden Ergebnisse der mit Ramiprilat durchgeführten Experimente.

Als Resultat ist festzuhalten, dass gegenüber den eher geringer ausgeprägten Ramiprilat-Effekten signifikant stärkere Bradykinin-Einflüsse auf das Kontraktionsverhalten der Herzmuskelzellen festzustellen waren.

In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich, dass Bradykinin auf Herzmuskelzellen einwirkt, wenn es akut appliziert wird. In den meisten Fällen waren die Effekte B2-Rezeptor- und NO-abhängig. In allen Fällen jedoch galten die Bradykinin-Effekte als nützlich. Auch die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten an einem dauerhaften Modell verbesserte Zellfunktionen. Zudem bestätigte sich, dass NO nicht nur vielfache und dauerhafte Einflüsse auf Herzmuskelzellen ausübt, sondern auch, dass in fast allen Untersuchungen die NO-abhängigen Bradykinin-Effekte nützlich waren. Die kardioprotektive Wirkung von Bradykinin beruht offensichtlich darauf, dass dieser Stoff mittels NO die Herzfunktion auf zellulärer Ebene verbessern und dass NO durch cGMP die NFAT-Ausschleusung aus dem Zellkern hemmen kann [Chow et al., 1997]. Es wurde bereits aufgezeigt, dass NFAT die SERCA2A-Expression erhöhen und unter vergleichbaren Bedingungen zu einer ähnlichen Verbesserung der Zellkontraktilität führen kann [Anwar et al., 2005].

Die durchgeführten Untersuchungen mit Bradykinin in Bezug auf das Kontraktionsverhalten zeigten eine deutliche Verbesserung der Kontraktilität, der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit sowie aller weiteren gemessenen Parameter.

Im Zusammenhang mit der für Herzmuskelzellen aufgezeigten nützlichen Wirkung von Bradykinin war zu untersuchen, ob diese Effekte dauerhaft oder durch Einwirkung anderer Stoffe zu beeinflussen waren. Da bereits festgestellt wurde, dass der Bradykinin-Einfluss B2-Rezeptor- und NO-abhängig vermittelt wird, sind weitere Versuchsreihen zur Kontraktilität durchgeführt worden, in denen diese Effekte zunächst durch den Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten HOE 140 antagonisiert werden sollten.

Dabei zeigte sich, dass bei Anwendung dieses Stoffes die Einflussnahme von Bradykinin auf die Zellkontraktilität bei 1 und 2 Hz vollständig abgeblockt wurde.

Nach dem Nachweis, dass die Ramiprilat-Einflüsse auf Herzmuskelzellen Bradykinin-Rezeptor-unabhängig sind, wurden zur Kontrolle die mit Bradykinin inkubierten Zellen

zusätzlich mit L-NA behandelt, um deren NO-Synthese zu hemmen. Auch hier konnte aufgezeigt werden, dass L-NA durch dessen NO-Synthese-Hemmung den Bradykinin-Einfluss auf die Zellkontraktilität vollständig bei allen Frequenzen und auf die Kontraktionsgeschwindigkeit bei den Frequenzen von 1 und 2 Hz blockieren kann.

Hieraus konnte geschlossen werden, dass Bradykinin zum einen über einen B2-Rezeptor-vermittelten und zum anderen über einen NO-vermittelten Signalweg in der Lage ist, auf die Zellkontraktion bei Kardiomyozyten Einfluss zu nehmen.

Auch über eine AP-1-Aktivierung ist eine Einflussnahme durch Bradykinin möglich.

Hieraus war zu folgern, dass die bereits bekannten und nachgewiesenen positiven Bradykinin-Effekte vermutlich über mehrere Wege vermittelt werden können.

5.7 Abschließende Interpretation und Diskussion der Ergebnisse sowie Vergleich mit der aktuellen Datenlage

In dieser Arbeit war die Frage zu klären, ob Ramiprilat über die Bindung an ACE auf Herzmuskelzellen Einfluss nimmt und ob es Signalwege induziert, wie an Endothelzellen bereits beschrieben, die die Kontraktilität dieser Zellen verändern. Aus den gewonnenen Daten dieser Studie ist abzuleiten, dass Ramiprilat solch einen Signal-Effekt bewirkt, wenn dieser auch, wie dokumentiert, bei der Erhöhung der Kontraktionsgeschwindigkeit sowie einer Reduktion der Time-to-Peak und R50 nur gering ausfällt.

Die meisten der hier vorgestellten Ergebnisse der Untersuchung wurden von Herzmuskelzellen beider Ventrikel abgeleitet. Jedoch repräsentiert die Präparation der Herzmuskelzellen vorwiegend Zellen des linken Ventrikels. Vergleichbare Ergebnisse traten auch nur bei Experimenten auf, die ausschließlich an Herzmuskelzellen des linken Ventrikels durchgeführt wurden, jedoch nicht an Zellen des rechten Ventrikels.

Obwohl bereits an Endothelzellen gezeigt wurde, dass Ramiprilat ein so genanntes ACE-abhängiges Outside-in-Signal hervorruft, gibt es nur wenige Untersuchungen, die der Frage nachgehen, ob ein vergleichbarer Signalweg bei Kardiomyozyten auftritt. So wurde bereits beschrieben, dass der ACE-Hemmer Perindoprilat den vorübergehenden Einwärtsstrom an Herzmuskelzellen von Meerschweinchen und Kaninchen vermindert [Enous et al. 1992, Enous & Opie 1994].

Es wurde ebenfalls schon aufgezeigt, dass Perindoprilat nützliche Effekte bei der kardialen Hypertrophie über eine Stimulierung eines Bradykinin-NO-Signalwegs verursacht [Ishigai et al., 1997].

An Endothelzellen wurde im weiteren Verlauf auch bereits nachgewiesen, dass Ramiprilat einen ACE-abhängigen Signalweg induzieren kann [Kohlstedt et al., 2006].

Kohlstedt et al. beschrieben inzwischen einen Ramiprilat-induzierten Effekt an Adipozyten, welcher über eine ACE-Signalkaskade vermittelt wird [Kohlstedt et al., 2009].

Prinzipiell könnten diese Mechanismen die hier vorgestellten Ergebnisse der Experimente mit Ramiprilat erklären. Es war jedoch kein spezielles Ziel dieser Untersuchung, die genauen Signalwege zu identifizieren, sie zeigte aber mögliche Signalwegübertragungen auf. Die genannten Ergebnisse wurden eher als akute denn als dauerhafte Einflüsse erzielt. Derzeit bleibt weiter unklar, ob über einen ACE-vermittelten Effekt die Einflüsse von Ramiprilat auf die Zellverkürzungsdynamik nach 24 Stunden erklärt werden können. Denn ob der Einfluss des ACE-Inhibitors ein direkter Effekt auf herzmuskelabstammendes ACE ist oder indirekt durch eine verstärkte Wirkung des herzmuskelabstammenden Bradykinin hervorgerufen wurde, ist hier nicht untersucht worden. Da die untersuchten Zellen jedoch vor ihrer Inkubation gereinigt wurden, erscheint es nicht sehr wahrscheinlich, dass der Einfluss von Ramiprilat indirekt über Bradykinin vermittelt wurde. Bei Herzmuskelzellen von Neugeborenen fand man eine erhöhte Zelllebensfähigkeit unter Hypoxie heraus, wenn Ramiprilat angewandt wurde [Hartmann, 1995]. In diesem Fall war der Einfluss von Ramiprilat ein Bradykinin-abhängiger Effekt. In der jetzigen Untersuchung konnte dies weiterhin nicht ganz ausgeschlossen werden; dennoch wurden funktionale, durch Ramiprilat ausgelöste messbare Einflüsse auf Kardiomyozyten adulter Ratten festgestellt.

Um diese Einflüsse zu demonstrieren, wurde eine 1000-fach kleinere Konzentration verwendet, als für den Bradykinin-abhängigen Effekt bei Herzmuskelzellen von Neugeborenen unter Hypoxie erforderlich war. Bei einer 10- bis 100-fach stärkeren Konzentration war keine wesentlich größere Zunahme der Zellreaktionen zu erkennen.

Zusätzlich verursachte Bradykinin einen frequenz- und konzentrationsabhängigen Effekt, während der Ramiprilat-Effekt weitgehend frequenz- und konzentrationsunabhängig war. Es erscheint daher weiter unwahrscheinlich, dass der bei Ramiprilat beobachtete Effekt auf die Kontraktionsgeschwindigkeit, die TTP und R50 Bradykinin-abhängig sein sollte.

Eine andere Folge des Einflusses von Ramiprilat auf Endothelzellen ist die Aktivierung von AP-1 und eine AP-1-abhängige Hochregulierung von ACE. Demgegenüber aktivierte Ramiprilat das AP-1 in Herzmuskelzellen nicht, obwohl sich solch ein Signalweg in Endothelzellen derselben Herzen bestätigen ließ. Dies zeigt auf, dass es möglich gewesen wäre, einen solchen Mechanismus in Herzmuskelzellen nachzuweisen, wenn er existierte. Darüber hinaus hat Ramiprilat nicht zu einer Erhöhung der ACE-

Expression an Herzmuskelzellen geführt, im Gegensatz zu der vorher beobachteten Wirkung an Endothelzellen.

Alles in allem lassen diese Daten darauf schließen, dass Ramiprilat keine Einflüsse auf die AP-1-abhängige Genregulierung hat.

Dies steht im Gegensatz zu Bradykinin, das über Bradykinin-Rezeptoren agiert und als Kontrolle bei diesen Untersuchungen verwendet wurde.

In diesem Modell aktivierte Bradykinin AP-1. Die hier aufgezeigten Bradykinin-Effekte waren NO-abhängig. Es wurde bereits nachgewiesen, dass AP-1 in diesem System ein Mediator der NO-abhängigen Apoptose ist [Taimor et al., 2001].

Da Bradykinin als Positivkontrolle bei diesen Versuchen herangezogen wurde, kann gefolgert werden, dass Bradykinin eher über die spezifischen Rezeptoren agiert als über eine ACE-Bindung an Herzmuskelzellen, wobei Bradykinin in der Lage ist, die ACE-Expression an Kardiomyozyten zu stimulieren.

Da HOE 140 in unseren Untersuchungen Bradykinin-Einflüsse nicht vollständig antagonisieren konnte, ist der in den Experimenten durch Bradykinin hervorgerufene Effekt sehr wahrscheinlich sowohl über eine B2-Rezeptor-Aktivierung als auch NO-vermittelt. Dies zeigten vor allem die Messungen zur Kontraktionsgeschwindigkeit, die kontroverse Ergebnisse zu den Messungen zur Zellkontraktilität unter Zugabe von HOE140 erbrachten.

Es zeigte sich auch bereits bei vorangegangenen Untersuchungen ein partiell agonistischer Effekt von HOE140, welcher jedoch bei Langzeitbehandlung in-vivo, wohl aufgrund der B2-Blockade zu einer reflektorischen Erhöhung der Bradykinin-Konzentration führte [Hahn, 2003].

Festzustellen ist in jedem Fall, dass Bradykinin, im Gegensatz zu Ramiprilat, bei allen Frequenzen lastfrei die Zellverkürzung innerhalb von 24 Stunden an Herzmuskelzellen verkürzte und hierbei auch alle anderen gemessenen Zellkontraktionsparameter veränderte, was durch Zugabe von HOE140 nicht vollständig gehemmt werden konnte.

In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich überzeugend, dass Bradykinin auf Herzmuskelzellen einwirkt, wenn es akut appliziert wird. In den meisten Fällen waren die Effekte B2-unabhängig und NO-abhängig. In allen Fällen jedoch waren die Bradykinin-Effekte nützlich. Auch die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten an einem dauerhaften Modell verbesserte Zellfunktionen. Die genauen Mechanismen, durch die Bradykinin diese Effekte hervorruft, bleiben weiter noch zu klären.

NO hat vielfache und dauerhafte Einflüsse auf Herzmuskelzellen, von denen nicht alle nützlich sind. So kann NO beispielsweise auch die Apoptose induzieren und die Zellfunktion reduzieren. Derzeit ist nicht klar, weshalb in fast allen Untersuchungen die

NO-abhängigen Bradykinin-Effekte auf Kardiomyozyten nützlich sind. Es zeigte sich, dass eine reduzierte eNOS-Aktivität die Entwicklung von Myokardhypertrophie und Herzversagen begünstigt [Wenzel et al., 2007]. Als mögliche Wirkungsweise, durch die Bradykinin via NO die Herzfunktion auf zellulärer Ebene in diesem Modell verbessern kann, ist zu erkennen, dass NO via cGMP die NFAT-Ausschleusung aus dem Zellkern hemmen kann [Chow et al. 1997]. Es wurde bereits gezeigt, dass NFAT die SERCA2A-Expression erhöhen kann und zu einer ähnlichen Verbesserung der Zellverkürzung unter gleichen Bedingungen führt [Anwar et al. 2005].

Inzwischen wurde an Experimenten mit der Ratte gezeigt, dass eine Kombinationstherapie aus Ataciguat, einem NO-unabhängigen Aktivator der löslichen Guanylatcyclase (sGC), und Ramipril positive Effekte in Bezug auf Hämodynamik und kardiales linksventrikuläres Remodelling nach Myokardinfarkt bewirkt [Motschenbacher, 2011]. Dieser Effekt könnte die in unseren Untersuchungen festgestellten, teils nicht signifikanten und abweichenden Ergebnisse erklären.

Über den genauen Mechanismus kann derzeit jedoch weiter nur spekuliert werden.

Mufti et al. konnten in einer Studie einen parakrinen Mechanismus des Angiotensin-II-abhängigen Verlustes von Herzfunktionen, der unabhängig von hämodynamischen Veränderungen abläuft, identifizieren [Mufti et al., 2008]. Der Angiotensin-II-abhängige Signalweg wurde in unseren Experimenten nicht untersucht; dies zeigt aber, dass Ramiprilat auch über diesen Mechanismus sicherlich indirekte positive kardioprotektive Effekte zu vermitteln mag.

Abschließend zeigen diese Untersuchungen, dass Ramiprilat direkte Einflüsse auf Kardiomyozyten ausüben kann, die eher nicht durch Kreuzreaktion mit Bradykinin-Rezeptoren vermittelt werden. Worüber diese Einflüsse letztendlich vermittelt werden, bleibt offen; jedoch ist eine B2-Rezeptor- und NO-vermittelte Signalübertragung weiterhin nicht ganz auszuschließen.

Sicher erscheint aber, dass sich die direkten und indirekten Ramiprilat-Effekte über eine Hemmung des Bradykinin-Abbaus und die damit verbundenen positiven Effekte ergänzen.

Diese Erkenntnis des positiven Einflusses der ACE-Hemmer auf Kardiomyozyten sollte zu den bereits bekannten etablierten Wirkungen hinzugefügt werden.

Inwieweit dieser Effekt durch Langzeitapplikation von ACE-Hemmern ergänzend zu den bisher bereits nachgewiesenen positiven Wirkungen beiträgt, bleibt noch weiter zu untersuchen.

6 Zusammenfassung

Hintergrund: Kardiomyozyten exprimieren Angiotensin-Konversions-Enzym (ACE) auf ihrer Zelloberfläche. ACE-Hemmer, wie Ramiprilat, binden an Endothelzellen an dieses ortsständige ACE und induzieren ein ACE-abhängiges outside-in-signalling, was eine Phosphorylierung und nukleäre Translokation beinhaltet. Ob entweder Ramiprilat oder Bradykinin ähnliche Effekte auf Kardiomyozyten ausüben und diese über eine AP-1-Aktivierung vermittelt werden, ist unbekannt. In der vorliegenden Arbeit stellten wir die Hypothese auf, dass ein Teil der kardioprotektiven Effekte von Ramiprilat auf eine ACE-abhängige Signalvermittlung zurückgeführt werden können.

Methoden: Isolierte adulte ventrikuläre Kardiomyozyten der Ratte (Wistar-Ratte) wurden herangezogen, um die basale ACE-Expression mittels RT-PCR, die Aktivierung von Aktivatorprotein-1 (AP-1) und die kontraktile Eigenschaften von Kardiomyozyten unter Ramiprilat- oder Bradykinin-Einfluss zu untersuchen. Die Bradykinin-Einflüsse wurden mittels HOE140 gehemmt. Bei manchen Experimenten wurden isolierte mikrovaskuläre Endothelzellen der Ratte zu Kontrolluntersuchungen herangezogen.

Ergebnisse: Kardiomyozyten exprimieren ACE dauerhaft auf ihrer Zelloberfläche. Dies reagiert mit Bradykinin über eine AP-1-Aktivierung, jedoch nicht mit Ramiprilat. Bradykinin induzierte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Zellverkürzung, welcher durch den Bradykininrezeptor-Antagonisten HOE140 und über eine Hemmung der NO-Synthese abgeschwächt werden konnte. Ramiprilat verursachte weniger ausgeprägte Veränderungen der Zellverkürzungsdynamik, welche sich vor allem in Bezug auf die Time-to-Peak, die R50 und auf die Kontraktionsgeschwindigkeit als signifikant darstellten. Diese Effekte konnten weder durch HOE140 noch durch eine Hemmung der NO-Synthese abgeschwächt werden.

Schlussfolgerungen: Bradykinin wirkt auf Kardiomyozyten in erster Linie über Bradykininrezeptoren ein, aktiviert AP-1 und steigert die Zellverkürzungsdynamik innerhalb 24 Stunden. Ramiprilat imitiert nicht die Bradykinin-Effekte und induziert geringere ausgeprägte Effekte auf die Zellverkürzungsdynamik. Die Ramiprilat-Effekte scheinen Bradykininrezeptor-unabhängig zu sein. Über diese akuten Effekte auf die Zellverkürzungsdynamik können ACE-Hemmer wie Ramiprilat direkte Einflüsse auf Kardiomyozyten ausüben, sicherlich jedoch weniger potent als auf Endothelzellen.

7 Abstract

Background: Cardiomyocytes express angiotensin converting enzyme (ACE). ACE inhibitors such as ramiprilat bind to ACE and induce an ACE-dependent outside-in signalling in endothelial cells including phosphorylation and nuclear translocation of c-jun. Whether either ramiprilat or bradykinin exerts a similar effect in cardiomyocytes and if this can be attributed to the activity of AP-1 is unknown. In the present study we hypothesized that part of the cardioprotective effects of ramiprilat can be attributed to an ACE-dependent effect on cardiomyocytes.

Methods: Isolated adult ventricular rat cardiomyocytes were used to investigate basal ACE expression via RT-PCR, activation of activator protein-1 (AP-1) and changes in contractile performance of cardiomyocytes challenged by either ramiprilat or bradykinin. Bradykinin receptors were blocked by addition of HOE140. In some of the experiments, isolated microvascular endothelial cells from rats were used as controls.

Results: Cardiomyocytes stably express ACE. They respond to bradykinin but not ramiprilat in respect to AP-1 activation. Bradykinin induced a concentration-dependent increase in cell shortening that could be attenuated by the bradykinin receptor antagonist HOE140 and by an inhibition of NO formation. Ramiprilat caused a minor effect on cell shortening that was significant only in respect to Time-to-Peak, R50 and contraction velocity. This effect was not attenuated by either HOE140 or inhibition of NO formation.

Conclusion: Bradykinin acts exclusively via bradykinin receptors in cardiomyocytes, activates AP-1 and increases cell shortening within 24 h. Ramiprilat does not mimic the effect of bradykinin and induces a small effect on cell shortening, but not on AP-1 activity. The effect of ramiprilat seems to be bradykinin-receptor independent. Via this acute effect on cell shortening, ACE inhibitors like ramiprilat exert direct effects on cardiomyocytes but less potent than on endothelial cells.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym ("Angiotensin converting enzyme")
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AT-1(-R)	Angiotensin-1(-Rezeptor)
AT-2(-R)	Angiotensin-2(-Rezeptor)
AP-1	Aktivatorprotein-1
Arg	Arginin
B, BK	Bradykinin
β	beta
BNP	"brain" (B-Typ) natriuretisches Peptid
bp	Basenpaar ("base pair")
BPP _{5a}	Bradykininpotenzierendes Peptid _{5a}
C	Kontrolle
°C	Grad Celsius
CAGE	Chymostatin-sensitives Angiotensin produzierendes Enzym, "chymostatin sensitive angiotensin generating enzyme"
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CM	Kardiomyozyten
CNP	"C"-Typ natriuretisches Peptid
Con-vel	Kontraktionsgeschwindigkeit
COX-2	Cyclooxygenase-2
CPN	Carboxypeptidase N
Cy3-dCTP®	"Cyanine-dye labeled nucleotide triphosphate"
δL/L	Zellkontraktilität
Dr.	Doktor
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzellen
EDRF, NO	Stickstoffmonoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	"et alii", und andere

Abkürzungsverzeichnis

eNOS	endotheliale NO-Synthase
FCS	foetales Kälberserum ("fetal calf serum")
g	Gramm
GC	Guanylylcyclase
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
HMW	"high molecular weight"
HOE140	Icatibant
HOE498	Ramipril
HPRT	Hypoxanthin-phosphoribosyl-transferase
Hz	Hertz
IU	International Unit
JNK	c-jun N-terminale-abhängige Kinase
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
L-NA	L-Nitro-Arginin
μ	mikro
min	Minute
mg	Milligramm (10^{-3} Gramm)
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
mm	Millimeter (10^{-3} Meter)
mmol	Millimol (10^{-3} Mol)
ms	Millisekunde (10^{-3} Sekunde)
μg	Mikrogramm (10^{-6} Gramm)
μl	Mikroliter (10^{-6} Liter)
μm	Mikrometer (10^{-6} Meter)
μmol	Mikromol (10^{-6} Mol)
Mol, M	Stoffmenge in Mol oder "muscarine receptor"
MW	Mittelwert
n	Gruppengröße, Anzahl der Testzellen; nano
nm	Nanomol (10^{-9} Mol)
NaCl	Natriumchlorid
NFAT	"nuclear factor of activated T-cell"
NO, EDRF	Stickstoffmonoxid, "Endothelium derived relaxing factor"
NPR-A/B	"natriuretic-peptide-receptor-A/B"

Abkürzungsverzeichnis

Nr.	Nummer
p	Signifikanzwert/ Irrtumswahrscheinlichkeit
PDGFR- β	“platelet-derived-growth-factor-receptor- β ”
PE	Phenylephrin
Phe	Phenylalanin
PMSF	Phenylmethylylsulfonylflourid
Pro	Prolin
Prof.	Professor
R	Ramiprilat
R50	der R50-Wert, also die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der gesamten Zellverkürzungsstrecke in Millisekunden.
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Rel-vel	Relaxationsgeschwindigkeit
RNA	Ribonukleinsäure (“ribonucleic acid“)
RT-PCR	Polymerasekettenreaktion (“reverse transcription polymerase chain reaction“)
S.	Seite
s	Sekunde
s., s.o.	siehe, siehe oben
SD	Standardabweichung (“standard deviation“)
SERCA2a	“sarcoendoplasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase“
sGC	“soluble“, lösliche Guanylylcyclase
SHP2	Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2
T50-to-peak	T50-to-peak, also die Zeit von der 50%-igen Zellkontraktion bis zur maximalen Zellkontraktion in Millisekunden
Tab.	Tabelle
TGF- β	“Transforming-growth-factor- β ”
t-PA	“tissue-plasminogene-acticator”
TTP	Time-to-Peak
u.	und
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
vs.	versus, gegen
z.B.	zum Beispiel

9 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der Folgeerscheinungen einer gestörten Pumpfunktion mit der Folgewirkung einer Erhöhung der Vorlast sowie Nachlast und daraus folgender Flüssigkeitsretention und verschlechterter Energiebilanz des Myokards [aus Gerok et al., Die Innere Medizin, 2000].
- Abbildung 2: Circulus vitiosus [aus Gerok et al., Die Innere Medizin, 2000].
- Abbildung 3: Wirkmechanismus des Angiotensin-Conversions-Enzyms (Kininase II), des Renin-Angiotensin-Aldosteron-, des Kallikrein Kinin-Systems und der systemischen Wirkungen [aus Perez M. et al. Journal of Clinical and Basic Cardiology 2001; 4(Issue 1): 39-46].
- Abbildung 4: Struktur analogie des Schlangengiftpeptids BPP_{5a} und des ACE-Hemmers Captopril. Die für die Wirkung verantwortliche Tripeptidsequenz von BPP_{5a} und die analogen Teilstrukturen von Captopril sind dargestellt. [Quelle: <http://de.wikipedia.org>, <http://zentrale-deutscher-kliniken.de>, Erstveröffentlichung S. Jähnichen, 2004]
- Abbildung 5: Molekularstruktur von Ramipril und Ramiprilat. Der ACE-Hemmer Ramipril (HOE 498) ist ein „prodrug“ und wird in der Leber durch Esterasen in das aktive Ramiprilat (HOE498 diacid) umgewandelt. [Bankowski et al., 2009]
- Abbildung 6: Molekularstruktur des Nonapeptids Bradykinin (H₂N-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-COOH). [Quelle: www.chemgapedia.de]
- Abbildung 7: Bradykinin-Metabolismus [aus Perez et al., 2001].
- Abbildung 8: Induzierung der endothelialen NO-Synthese über B2-Rezeptoren.
- Abbildung 9: Isolierte Kardiomyozyten unter dem Mikroskop mittels der Videokamera fotografiert.
- Abbildung 10: Repräsentative Agarose-Gel-Dokumentation der ACE-Expression an RNA-Proben von isolierten mikrovaskulären Endothelzellen (EC, Spalte 1), Zellen von linken Ventrikeln (LV, Spalte 2+3), isolierten Kardiomyozyten (CM, Spalte 4) und zur Kontrolle von einem Reaktionsmix ohne

Abbildungsverzeichnis

- Kardiomyozyten-RNA (Spalte 5). Spalte 6 zeigt die Basenpaarmarker bei 100, 200 und 300 bp.
- Abbildung 11: Zellkontraktilität ohne Einfluss (C) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen (R) 100nM und 1 μ M, bei einer Frequenz von 2Hz, angegeben als Relation $\Delta L/L$ in Prozent (dargestellt sind die Mittelwerte für n=33, +/- SD siehe Tab. 1, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 12: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in μ m/s bei einer Frequenz von 2 Hz, ohne Einfluss (C) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen (R) 100nM und 1 μ M (dargestellt sind die Mittelwerte für n=33, +/- SD siehe Tab. 2, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 13: Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100nM (R100) und 1 μ M (R1) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=33, +/- SD siehe Tab. 3, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 14: Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) in μ m/s bei einer Frequenz von 2 Hz, ohne Einfluss (C) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen (R) 100 nM und 1 μ M (dargestellt sind die Mittelwerte für n=33, +/- SD siehe Tab. 4, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 15: R50 (ms) ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100 nM (R100) und 1 μ M (R1) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=33, +/- SD siehe Tab. 5, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 16: Zellkontraktilität ohne Einfluss (C) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen (BK) 10 nM, 100 nM und 1 μ M bei einer Frequenz von 2 Hz, angegeben als Relation $\Delta L/L$ in Prozent (dargestellt sind die Mittelwerte für n=45, +/- SD siehe Tab. 6, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 17: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) in μ m/s bei einer Frequenz von 2 Hz, ohne Einfluss (C) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen (BK) 10nM, 100nM und 1 μ M (dargestellt sind die Mittelwerte für n=45, +/- SD siehe Tab. 7, *p<0,05 vs. C).

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 18: Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) in $\mu\text{m/s}$ bei einer Frequenz von 2 Hz, ohne Einfluss (C) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen (BK) 10nM, 100nM und 1 μM (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=45$, +/- SD siehe Tab. 8, * $p<0,05$ vs. C).
- Abbildung 19: Zellkontraktilität ohne Einfluss (C) sowie unter Einfluss von Bradykinin (BK) und unter gleichzeitiger Zugabe von HOE 140 (BK+HOE) (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=54$, +/- SD siehe Tab. 9, * $p<0,05$ vs. C).
- Abbildung 20: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-vel) ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 100nM (BK100) und unter gleichzeitiger Zugabe von HOE140 (BK+HOE140) (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=54$, +/- SD siehe Tab. 10, * $p<0,05$ vs. C).
- Abbildung 21: Zellkontraktilität ohne Einfluss (C) sowie unter Einfluss von Bradykinin (BK) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (BK+L-NA). (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=48$, +/- SD siehe Tab. 11, * $p<0,05$ vs. C).
- Abbildung 22: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 1 μM (BK1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (BK1+L-NA). (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=48$, +/- SD siehe Tab. 12, * $p<0,05$ vs. C).
- Abbildung 23: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von Icatibant (R100+HOE140) (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=54$, +/- SD siehe Tab. 13, * $p<0,05$ vs. C).
- Abbildung 24: Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von Icatibant (R100+HOE140). (dargestellt sind die Mittelwerte für $n=54$, +/- SD siehe Tab. 14, * $p<0,05$ vs. C).
- Abbildung 25: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 1 μM (R1) und unter gleichzeitiger Zugabe von

Abbildungsverzeichnis

- L-NA (R1+L-NA) (dargestellt sind die Mittelwerte für n=33, +/- SD siehe Tab. 15, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 26: Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (R100+L-NA) (darstellt sind die Mittelwerte für n=54, +/- SD siehe Tab. 16, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 27: AP-1-Aktivierung in Kardiomyozyten, gemessen in Prozent des Kontrollmediums (C), bei Phenylephrin (PE, [10µM]) und Ramiprilat (R, [0,1 µM]); das Querband zeigt eine repräsentative Retard-Gel-Bande (dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung für n=7, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 28: AP-1-Aktivierung in Kardiomyozyten, gemessen in Prozent des Kontrollmediums (C), bei Bradykinin (BK, [1µM]) und Phenylephrin (PE, [10 µM]); das Querband zeigt eine repräsentative Retard-Gel-Bande (dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung für n=4, *p<0,05 vs. C).
- Abbildung 29: AP-1-Aktivierung in Endothelzellen durch Ramiprilat (R, [100 nM]) zur Positivkontrolle der Versuchsreihen an Kardiomyozyten (dargestellt sind Mittelwert +/- Standardabweichung für n=6, *p<0,05 vs. C).

10 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100nM und 1µM angegeben als Relation $\Delta L/L$ in Prozent. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.
- Tabelle 2: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen (R) 100nM und 1µM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.
- Tabelle 3: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen (R) 100nM und 1µM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.
- Tabelle 4: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen (R) 100nM und 1µM. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.
- Tabelle 5: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur R50 (ms) ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentrationen 100 nM (R100) und 1µM (R1). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.
- Tabelle 6: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen 10 nM (BK10), 100 nM (BK100) und 1 µM (BK1) angegeben als Relation $\Delta L/L$ in Prozent. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=45$.
- Tabelle 7: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen 10nM (BK10), 100nM (BK100) und 1µM (BK1). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=45$.
- Tabelle 8: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Relaxationsgeschwindigkeit (Rel-Vel) in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Bradykinin-Konzentrationen 10nM (BK10), 100nM (BK100) und 1µM (BK1). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=45$.

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 9: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 100nM (BK100) und unter gleichzeitiger Zugabe von HOE140 (BK+HOE140). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=54$.
- Tabelle 10: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 100nM (BK100) und unter gleichzeitiger Zugabe von HOE140 (BK+HOE140). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=54$.
- Tabelle 11: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Zellkontraktilität ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 1 μ M (BK1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (BK1+L-NA). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=48$.
- Tabelle 12: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss von Bradykinin 1 μ M (BK1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (BK1+L-NA). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=48$.
- Tabelle 13: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von Icatibant (R100+HOE140). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=54$.
- Tabelle 14: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von Icatibant (R100+HOE140). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=54$.
- Tabelle 15: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel), dargestellt in $\mu\text{m/s}$ ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 1 μM (R1) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (R1+L-NA). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=33$.
- Tabelle 16: Mittelwerte und +/- Standardabweichung zur Time-to-Peak (TTP), dargestellt in ms ohne Einfluss (Kontrolle) sowie unter Einfluss der Ramiprilat-Konzentration 100nM (R100) und unter gleichzeitiger Zugabe von L-NA (R100+L-NA). * $p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=54$.

11 Literaturverzeichnis

- Anwar A., Taimor G., Korkususz H., Schreckenber R., Berndt T., Abdallah Y., Piper H.M., Schlüter K.D. PKD- independent signal transduction pathways increase SERCA2 expression in adult rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2005; 39: 911-919.
- AWMF-Leitlinien-Register Nr. 053/014, 2006.
- Bankowski K., Filip K., Indulska A., Kozminoki W. u. Misiak M. The study of rotamers in prils and prilates by HPLC and NMR methods. 2009; www.science24.com/paper/6452.
- Benzing T., Fleming I., Blaukat A., Müller-Esterl W., Busse R. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Ramiprilat interferes with the sequestration of the B2-Kinin-Receptor within the plasma membrane of native endothelial cells. *Circulation* 1999; 99: 2034-2040.
- Bhoola K.D., Figuera C.D., Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.* 1992; 44(1): 1-80.
- Boecker et al. *Pathologie*, 2. Auflage, Urban & Fischer, 2000.
- Braun-Menendez E., Fasciolo J.C., Leloir L.F., Munoz J.M. The substance causing renal hypertension. *J. Physiol.* 1940; 98(3): 283-98.
- Cheung H.S. u. Cushman D.W. Inhibition of homogeneous angiotensin-converting enzyme of rabbit lung by synthetic venom peptides of *Bothrops jararaca*. *Biochim. Biophys. Acta* 293: 451–463 (1973).
- Chow C.W., Rincon M., Cavanagh J., Dickens M. & Davis R.J. Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* 1997; 278: 1638-1641.
- Cockcroft JR, Chowienczyk PJ, Brett SE, Bender N, Ritter JM. Inhibition of bradykinin-induced vasodilatation in human forearm vasculature by icatibant, a potent B2-receptor antagonist. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* 1994; 38(4):317-321.
- Cushman D.W., Cheung H.S., Sabo E.F., u. Ondetti M.A. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptocaptoanoyl amino acids. *Biochemistry* 1977; 16: 5484-5491.
- Cushman D.W. u. Ondetti M.A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* 1991; 17: 589-592.

- Dendorfer A., Folkers V., Klinger M., Wolfrum S., Dominiak P. Inhibition of kinin breakdown prolongs retention and action of bradykinin in a myocardial B2 receptor compartment. *Brit. J. Pharmacol.* 2003 ; 138 : 310-316.
- Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis. *Circulation.* 1988; 77(6 Pt 2):14-13.
- Enous R. & Opie L.H. The angiotensin-converting enzyme inhibitor, Perindoprilat, and of angiotensin-II on the transient inward current of rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 1994; 8: 647-651.
- Enous R., Coetzee W.A. & Opie L.H. Effect of the ACE inhibitor perindoprilat and of angiotensin II on the transient inward current of guinea pig ventricular myocytes. *J.Cardiovasc. Pharmacol* 1992; 19: 17-23.
- Ferreira S.H. A bradykinin-potentiating factor (BPF) present in the venom of *bothrops jaraca*. *Brit.J.Pharmacol.* 1965; 24: 163-169.
- Fleming I., Kohlstedt K., Busse R. New faces to the renin-angiotensin-system. *Physiology* 2005; 20: 91-95.
- Fleming I. Signalling by the angiotensin-converting enzyme. *Circ. Res.* 2006; 98: 887-896.
- Gerok et al. *Die Innere Medizin*, 10.Auflage, Schattauer, 2000.
- Grafe M., Bossaler C., Graf K., Auch-Schwelk W., Baumgarten C.R., Hildebrandt A., Fleck E. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on bradykinin metabolism by vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: H1493-H1497.
- Gross F. Renin and hypertension, physiological or pathological agents? *Klin.Wochenschr.* 1958; 36(15): 693-706.
- Hahn A. Effekte einer chronischen Behandlung mit dem ACE-Inhibitor Ramipril, dem ACE-NEP-Inhibitor AVE 7688 sowie in Kombination mit dem B2- Rezeptor-Antagonisten HOE 140 in adulten diabetischen und nicht diabetischen Ratten." *Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover*, [Online] 26 Mai 2003, 1-175.
- Hartman J.C. The role of bradykinin and nitric oxide in the cardioprotective action of ACE inhibitors. *Ann. Thorac. Surg.* 1995; 60: 789-792.
- Hecquet C., Tan F., Marcic B.M., and Erdo's E.G. Human Bradykinin B2 Receptor Is Activated by Kallikrein and Other Serine Proteases. *Mol. Pharmacol.* 2000; 58: 828-836.

- Hornig B., Kohler C., Drexler H. Role of bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting-enzyme inhibitors in humans. *Circulation* 1997; 95: 1115-1118.
- Ishigai Y., Mori T., Ikeda T., Fukuzawa A., Shibano T. Role of bradykinin-NO pathway in prevention of cardiac hypertrophy by ACE inhibitor in rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 1997; 273 (Heart Circ. Physiol. 42): H2659- H2663.
- Keeton T.K. u. Campbell W.B. The pharmacological alteration of renin release. *Pharmacol. Rev.* 1980; 32, 81-227.
- Kohlstedt K., Brandes R.P., Müller-Esterl W., Busse R. & Fleming I. Angiotensin-converting-enzyme is involved in outside-in signaling in endothelial cells. *Circ. Res.* 2004; 94: 60-67.
- Kohlstedt K., Gershon C., Friedrich M., Müller-Esterl W., Alhene-Gelas F., Busse R., Fleming I. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Dimerization Is the Initial Step in the ACE Inhibitor-Induced ACE Signaling Cascade in Endothelial Cells. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69:1725-1732.
- Kohlstedt K., Gershon C., Trouvain C., Hofmann W.-K., Fichtlscherer S. u. Fleming I. Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitors Modulate Cellular Retinol-Binding Protein 1 and Adiponectin Expression in Adipocytes via the ACE-Dependent Signaling Cascade. *Mol. Pharmacol.* 2009; 75:685-692.
- Krieg T., Philipp S., Cui L., Dostmann W.E., Downey J.M. & Cohen M.V. Peptide blockers of PKG inhibit ROS generation by acetylcholine and bradykinin in cardiomyocytes but fail to block protection in the whole heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005; 288: H1976-H1981.
- Kuoppala A., Lindstedt K.A., Saarinen J., Kovanen P.T., Kokkonen J.O. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting-enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; 278(4): H1069-1074.
- Langer M., Lüttecke D. & Schlüter K.-D. Mechanism of the positive contractile effect of nitric oxide on rat ventricular cardiomyocytes with positive force/frequency relationship. *Pflugers Arch.* 2003; 447: 289-297.
- Lassila M. Cyclosporine A-induced hypertension and nephrotoxicity in spontaneously hypertensive rats on high-sodium diet. Academic dissertation, University of Helsinki, December 2000.
- Leitlinien zur Behandlung der arteriellen Hypertonie der Deutschen Hochdruckliga vom 01.06.2008

Literaturverzeichnis

- Levy M.J., Deviri E. Acute failure of fracture of artificial heart valves. *Harefuah* 1990; 118(10): 612-3.
- Linz W., Albus U., Wiemer G., Schoelkens B.A., König W. Atriopeptin III induces endothelium-independent relaxation and increases cGMP levels in rabbit aorta. *Klin. Wochenschr.* 1986; 64 Suppl. 6: 27-30.
- Linz W., Wiemer G., Schaper J., Zimmermann R., Nagasawa K., Gohlke P., Unger T., Schoelkens B.A. Angiotensin-converting-enzyme-inhibitors, left ventricular hypertrophy and fibrosis. *Moll.Cell.Biochem.* 1995; 147(1-2): 89-97.
- Liu Y.-H., Yang X.-P., Mehta D., Bulagannawar M., Scicli G., Carretero O.A. Role of kinins in chronic heart failure and in the therapeutic effect of ACE inhibitors in kininogen-deficient rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; 278: H507-H514.
- Liu Y.-H., Yang X.-P., Sharov V.G., Sigmon D.H., Sabbah H.N., Carretero O.A. Paracrine systems in the cardioprotective effect of Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitors on myocardial ischemia/reperfusion injury rats. *Hypertension* 1996; 27: 7-13.
- Livak K.J. & Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. *Methods* 2001; 25: 402-408.
- Lohr et al. *Innere Medizin*, 3. Auflage, Urban & Fischer, 2000.
- Lucero H.A., Kintsurashvili E., Marketou M.E. u. Gavras H. Cell Signaling, Internalization, and Nuclear Localization of the Angiotensin Converting Enzyme in Smooth Muscle and Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2010; vol. 285, No. 8: 5555-5568.
- Motschenbacher S. Einfluss einer Kombinationstherapie aus dem ACE-Hemmer Ramipril und dem Aktivator der löslichen Guanylatzyklase Ataciguat auf das kardiale Remodeling nach experimentellem Myokardinfarkt. Dissertation Online-Bibliothek Universität Würzburg, [Online] 17. Dezember 2012.
- Mufti S., Wenzel S., Euler G., Piper H.M., Schlüter K.-D. Angiotensin II dependent loss of cardiac function: mechanisms and pharmacological targets attenuating this effect. *J.Cell. Physiol.* 2008; 217(1): 242-249.
- Nationale Versorgungsleitlinie Chronische Herzinsuffizienz, Langfassung vom März 2012.

Literaturverzeichnis

- Noll T., Muhs A., Besselmann M., Watanabe H. & Piper H.M. Initiation of hyperpermeability in energydepleted coronary endothelial monolayers. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1995; 268: H1462-H1470.
- Nolly H., Carbini L.A., Scicli G., Carretero O.A., Scicli A.G. A local kallikrein-kinin system is present in rat hearts. *Hypertension* 1994; 23: 919-923.
- Oberdisse et al. *Pharmakologie und Toxikologie*, 3. Auflage, Springer, 2002.
- Oldenburg O., Quin Q., Krieg T. et al. 2004. Bradykinin induced mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 286: H468-H476.
- Ondetti M.A., Rubin B. u. Cushman D.W. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: new class of orally-active antihypertensive agents. *Science* 1977; 196: 441-444.
- Perez M., Adam A., Mollinaro G. Bradykinin, an important mediator of cardiovascular effects of metallopeptidase inhibitors: experimental and clinical evidences. *Journal of Clin. and Basic Cardiology* 2001; 4 (Issue 1): 39-46.
- Piper H.M., Probst I., Schwartz P., Hutter F.J. u. Spieckermann P.G. Culturing of Kalzium stable adult cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular biology* 1982; 14: 397-412.
- Piper H.M., Spahr R., Mertens S., Krüzfeld A. & Watanabe H. Microvascular endothelial cells from heart. In: H.M. Piper (ed.) *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research* 1990; pp. 158-177. Springer, Heidelberg.
- Rocha e Silva M., Beraldo W.T., Rosenfeld G. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 1949; 156(2): 261-273.
- Schlüter K.-D., Schreiber D. Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. *Methods Mol. Biol.* 2004; 290: 305-314.
- Schlüter K.-D., Piper H.M. Isolation and culture of adult ventricular cardiomyocytes. In: *Practical Methods in Cardiovascular Research*, ed. Stefan Dhein et al., Humana Press 2005; 557-567.
- Schlüter K.-D. Development of heart failure after aortic stenosis (Letter to the Editor). *Circulation* 2001; 101: e11.
- Schoelkens B.A., Linz W. Local inhibition of Angiotensin-II-Formation and bradykinin degradation in isolated hearts. *Clin. Exp. Hypertens.* 1988; 10(6): 1259-70.
- Sourbrier F., Hubert C., Testut P., Nadaud S., Alhenc-Gelas F. & Corvol P. Molecular biology of the angiotensin I converting enzyme I: biochemistry and structure of the gene. *J. Hypertension* 1993; 11: 471-476.

Literaturverzeichnis

- Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr. 95/2008 und 2009.
- Studer R., Müller B., Reinecke H., Just H., Holtz J., Drexler H. Quantified RNA polymerase chain reaction demonstrates augmented gene expression of angiotensin converting enzyme in ventricles of patients with heart failure (Abstr.). *Circulation* 1992; 86:1119.
- Taimor G., Rakow A. & Piper H.M. Transcription activator protein (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB. J.* 2001; 15: 2518-2520.
- Taimor G., Schlüter K.-D., Best P., Helmig S. & Piper H.M. Transcription activator protein 1 mediates α - but not β -adrenergic hypertrophic growth responses in adult cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2004; 286: H2369-H2375.
- Wall T.M., Hartman J.C., Hullinger T.G., Shebuski R.J. Reduction of myocardial infarct size in rabbit by ramiprilat: reversal by the bradykinin antagonist HOE140. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993; 21(6): 996-1003.
- Wells W., Bredt D., Furchgott R., Ignarro L, Marletta M., Murad F., Snyder S., Tanenbaum S., Vane J. Von Sprengstoffen zum Gas, das Heilt: Stickoxid in Biologie und Medizin. *Jenseits von Entdeckungen®: Der Weg von Forschung zum Nutzen für die Menschheit*, U.S. National Academy of Sciences, Mai 2000, <http://www7.nationalacademies.org/germanbeyonddiscovery/Stickoxid.html>.
- Wenzel S., Taimor G., Piper H.M. & Schlüter K.-D. Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II- induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF- β expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J* 2001; 15: 2291-2293.
- Wenzel S., Rohde C., Wingerning S., Roth J., Kojda G., Schlüter K.D. Lack of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide formation favors hypertrophy in adult ventricular cardiomyocytes. *Hypertension* 2007; 49: 193-200.
- Wenzel C., Müller C., Piper H.M., Schlüter K.-D. p38 MAP-kinase in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes: expression and involvement in the hypertrophic signalling. *Eur. J. Heart Failure* 2005; 7:453-460.
- Westlin W., Mullane K. Does captopril attenuate reperfusion-induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals? *Circulation* 1988; 77(6Pt2): 130-9.
- Wiemer G., Schoelkens B.A., Becker R.H.A & Busse R. Ramiprilat enhances endothelial-derived bradykinin. *Hypertension* 1991; 18: 558-563.
- Wiemer G., Linz W., Hatik S., Schoelkens B.A., Malinski T. Angiotensin-converting enzyme inhibition alters nitric oxide and superoxide release in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 1997; 30: 1183-1190.

Literaturverzeichnis

- Wiemer G., Pierchala B., Mesaros S., Schoelkens B.A., Malinski T. Direct measurement of nitric oxide release from cultured endothelial cells stimulated by bradykinin or ramipril. *Endothelium* 1996; 4: 119-125.
- Wirth K., Hock F.J., Albus U., Linz W., Alpermann H.G., Schoelkens B.A. et al. HOE140, a new potent and long-acting bradykinin antagonist: in vivo study. *Br. J. Pharmacol.* 1991; 102: 774-777.
- Yang HY, Erdös EG, Levin Y. A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin.. *Biochim. Biophys. Acta.* 1970 Aug 21;214(2):374-6.
- Yayama K., Matsuoka S., Nagaoka M. et al. Down regulation of bradykinin B2-receptor mRNA in the heart in pressure-overload cardiac hypertrophy in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 2003; 65: 1017-1025.
- Zhang X.P., Xie Y.W., Nasjletti A., Xu X., Wolin M.S., Hintze T.H. ACE inhibitors stimulate nitric oxide production to modulate myocardial oxygen consumption. *Circulation* 1997; 95: 176-182.
- Zhang X.P., Scicli G.A., Xu X., Masjletti A., Hintze T.H. Role of endothelial kinins in control of coronary nitric oxide production. *Hypertension* 1997; 30: 1105-1111.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde.

Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Klaus-Dieter Schlüter für die mir gestellte Aufgabe zur weiteren Erkundung möglicher kardioprotektiver Wirkstoffeffekte.

Ich habe zu danken für sein reges Interesse an dem Fortgang meiner Experimente, insbesondere für seine ständige Bereitschaft, die jeweiligen Arbeitsergebnisse eingehend zu erörtern.

Mein Dank gilt den forschenden Kollegen des Instituts für die stets gute Zusammenarbeit, vor allem danke ich Frau Dr. Simone Helmig für die Einbeziehung meiner Untersuchungsergebnisse in deren wissenschaftliche Veröffentlichung.

Weiterhin danke ich Frau Dagmar Felde, Frau Nadine Woitasky und Herrn Peter Volk für ihre fachliche Unterstützung und für vorbildliche Arbeitsbedingungen im Labor.

Ich bedanke mich bei Frau Daniela Schreiber und Herrn Sergej Kechter für die sorgfältige Präparation der Herzmuskelzellen.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, die mir vieles ermöglicht haben und mich stets, auch während der Entstehung dieser Arbeit, begleitet haben.

Ich danke von Herzen meiner Ehefrau Eva und meinen Söhnen Lucas, Maximilian, Noah und Jonas für ihre emotionale Unterstützung.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6147-0



9 783835 961470