

**EINFLUSS SUBCHRONISCHER RAUCH-
BELASTUNG AUF DIE ENTWICKLUNG
EINER MYOKARDHYPERTROPHIE**

SABINE RUF

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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 2007

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 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. R. Gerstberger
und
dem Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Einfluss subchronischer Rauchbelastung auf die Entwicklung einer Myokardhypertrophie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sabine Ruf

Tierärztin aus Ostfildern-Ruit

Gießen 2007

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. R. Gerstberger
Prof. Dr. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 06. Juli 2007

„Immer vorwärts, Schritt um Schritt...
es geht kein Weg zurück!
Und was jetzt ist, wird nie mehr ungeschehen.“

- Wolfsheim -

Meinen Eltern gewidmet

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Sabine Ruf

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
1.1 Pathophysiologie der Myokardhypertrophie	4
1.2 Phänotypische Veränderungen des hypertrophen Myokards	6
1.3 Einfluss von Rauchbelastung auf das Herz-Kreislauf-System	12
1.4 Aufgabenstellung	17
2. Material	18
2.1 Chemikalien	18
2.1.1 Antikörper	20
2.1.2 Primer	20
2.2 Geräte	21
2.2.1 Allgemein verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände.....	21
2.2.2 Spezielle Geräte und Gebrauchsgegenstände	21
2.2.3 Verbrauchsmaterialien	22
2.3 EDV	22
3. Methoden.....	23
3.1 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten	23
3.1.1 Versuchstiere	23
3.1.2 Gewinnung isolierter Kardiomyozyten.....	23
3.1.3 Zellkultur von Kardiomyozyten der Ratte	25
3.1.3.1 Vorplattieren der Kulturschalen.....	25
3.1.3.2 Ausplattieren der Kardiomyozyten	25
3.1.3.3 Kurzzeitkultivierung von Kardiomyozyten	26
3.2 Gewinnung isolierter mikrovaskulärer Endothelzellen aus adulten Rattenherzen	26
3.2.1 Passage von mikrovaskulären Endothelzellen.....	27
3.3 Zellinduktion.....	28
3.4 Zellernte	28

3.5	Berauchung der Ratten mit Zigarettenrauch	30
3.5.1	Versuchstiere und Versuchsgruppen	30
3.5.2	Durchführung der Berauchung.....	34
3.6	Real-time PCR im iCycler®	36
3.6.1	Präparative RNA-Isolierung aus adulten Rattenherzen	36
3.6.2	RNA-Isolierung aus Kardiomyozyten und Endothelzellen	37
3.6.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	37
3.6.4	cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	37
3.6.5	Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (real-time PCR)	38
3.6.5.1	Einführung in die Methode	38
3.6.5.2	Durchführung der Methode	39
3.7	DNA-Gelelektrophorese	43
3.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
3.8.1	Proteingewinnung aus adulten Rattenherzen	44
3.8.2	Aufbau der Kammer und Durchführung der Gelelektrophorese	45
3.8.3	Western-Blot-Verfahren	47
3.8.4	Immunologischer Nachweis von ANF	48
3.8.5	Immunologischer Nachweis von TGF- β_1	49
3.8.6	Immunologischer Nachweis von PTHrP	50
3.8.7	Auswertung	50
3.9	Statistik	50
4.	Ergebnisse	51
4.1	Einfluss subchronischer Rauchexposition auf die Progression der Myokardhypertrophie spontan hypertensiver Ratten.....	51
4.1.1	Entwicklung der Myokardhypertrophie	51
4.1.3	Korrespondierende Expressionsveränderung in der Aorta	62
4.2	Einfluss von transienter subchronischer Rauchexposition auf die Progression der Myokardhypertrophie spontan hypertensiver Ratten .	63
4.2.1	Entwicklung der Myokardhypertrophie	63
4.2.2	Phänotypische Veränderungen des hypertrophen Myokards	67
4.3	Einfluss subchronischer Rauchexposition auf die Progression der Myokardhypertrophie normotensiver Ratten	70
4.3.1	Entwicklung der Myokardhypertrophie	70

4.3.2	Phänotypische Veränderungen des hypertrophen Myokards	74
4.4	Einfluss von Nikotin auf die Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene <i>in vitro</i>	76
4.4.1	Einfluss von Nikotin auf isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen.....	76
4.4.2	Einfluss von Nikotin auf isolierte mikrovaskuläre Endothelzellen.....	77
5.	Diskussion	80
5.1	Rauchen und Herzhypertrophie	81
5.2	Rauchen und die Expression von TGF- β_1 und TGF- β_1 -abhängig regulierten Genen	84
5.3	Schlussfolgerung	91
6.	Zusammenfassung	93
7.	Summary	95
8.	Literaturverzeichnis.....	96

Abkürzungsverzeichnis

% (vol/vol)	Volumenprozent
% (wt/vol)	Gewichtsprozent
AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
ANF	Atrialer natriuretischer Faktor
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	Aqua bidestillata
AU	Arbitrary unit = willkürliche Einheit
BCIP	5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	copy DNA
CCT	Creatin-Carnitin-Taurin
CR	Koronarer Gefäßwiderstand
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
fw-Primer	forward primer
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethanol-sulfonsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HG/KG	Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht
IE	Internationale Einheiten

kDa	Kilo-Dalton
LVDP	Left ventricular developed pressure
M-MLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Tiere
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NCS	Neonatales Kälberserum
NR	Normotensive Ratte
ODC	Ornithin-Decarboxylase
oligo-dT	Oligo-Desoxy-Thymidin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
PTHrP	Parathyroid hormone related peptide
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
rev-Primer	reverse primer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SHR	Spontan hypertensive Ratte
TAE	Tris-Acetat/EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

TGF- β_1	Transforming growth factor- β_1
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
V	Volt
VR	Versuchsreihe
WKY	Ratte der Linie Wistar-Kyoto
x g	x-fache Erdbeschleunigung

1. Einleitung

1.1 Pathophysiologie der Myokardhypertrophie

Eine myokardiale Hypertrophie ist die adaptive Antwort des Herzmuskels auf eine chronisch erhöhte hämodynamische Arbeitsbelastung, mit dem Ziel, die Kontraktionskraft des Herzens zu erhalten. Die Auslöser dieser hypertrophen Antwort sind neben verschiedenen physiologischen Reizen - wie z.B. einer physischen Hochleistung („Sportlerherz“) oder der Blutdrucksteigerung im Körperkreislauf bei Neugeborenen – besonders auch pathologische Umstände - wie z.B. chronischer Bluthochdruck, Myokardinfarkt oder Herzklappenerkrankungen (Selvetella *et al.*, 2004). Dabei erhöht sich das enddiastolische Volumen im Herzen und fordert damit eine gesteigerte Arbeitsleistung des Myokards, welche die Zellen durch eine Hypertrophie zu kompensieren versuchen. In vielen Studien u.a. durch das *National Heart, Lung and Blood Institute in Framingham, USA*, wird die myokardiale Hypertrophie als wichtiger Risikofaktor und Vorstufe für die Entwicklung einer dekompensierten Herzinsuffizienz angesehen, welche trotz vielfältiger therapeutischer Fortschritte noch immer eine extrem hohe Mortalitätsrate aufweist (Casale *et al.*, 1986; Koren *et al.*, 1991; Kannel, 1999; Vakili *et al.*, 2001).

Im Zuge der gesteigerten Arbeitsleistung des Herzens verändern die Herzmuskelzellen ihre Form und ihr Volumen, sie vergrößern sich, um dem Anspruch einer erhöhten Kraftentwicklung gerecht zu werden (Russell *et al.*, 2000). Als Bestandteil eines terminal ausdifferenzierten Organs mit fehlender Fähigkeit zur Zellteilung besteht für die Herzzellen zur Verstärkung ihrer Muskelmasse fast nur die Möglichkeit eines so genannten myokardialen „remodeling“ (Sadoshima & Izumo, 1997). Dabei werden bestimmte Signalwege und Genexpressions-Muster in den Kardiomyozyten verändert, welche durch die pathologischen Umstände aktiviert werden und zur „Maladaptation“ der Signalwege in der Herzmuskelzelle führen (Schlüter & Wollert, 2004). Beim Fortschreiten einer Herzinsuffizienz ist also nicht die Hypertrophie *per se* (Zellvergrößerung) der Grund für die Dekompensation der Herzfunktion, sondern es sind eher die Veränderungen in der Herzmuskelzelle durch das myokardiale „remodeling“ (Kapitel 1.2). Die myokardiale Hypertrophie wird durch prohypertrophe Mediatoren, z.B. Wachstumsfaktoren oder mechanischen Stress,

sowie durch gehemmte inhibitorische Faktoren moduliert, indem die pro- und antihypertrophen Komponenten auf verschiedenen Ebenen miteinander interagieren (Schlüter & Wollert, 2004). Eine Hypertrophie entsteht also, wenn prohypertrophe Mediatoren dominieren und/oder die inhibitorischen Faktoren an Einfluss verlieren (Abb. 1.1). In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Faktoren identifiziert, die das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und –degradation in den Herzmuskelzellen regulieren. Kardiomyozyten kommen *in vivo* in ihrer direkten Umwelt mit vielen verschiedenen Faktoren in Kontakt, die in ihren Signalwegen miteinander interagieren und damit letztendlich die Ausprägung der Hypertrophie beeinflussen. Diese Interaktionen zwischen fördernden und inhibitorischen Effekten bezeichnet man als *cross-talk* oder *Netzwerk* der Signalwege (Schlüter & Wollert, 2004).

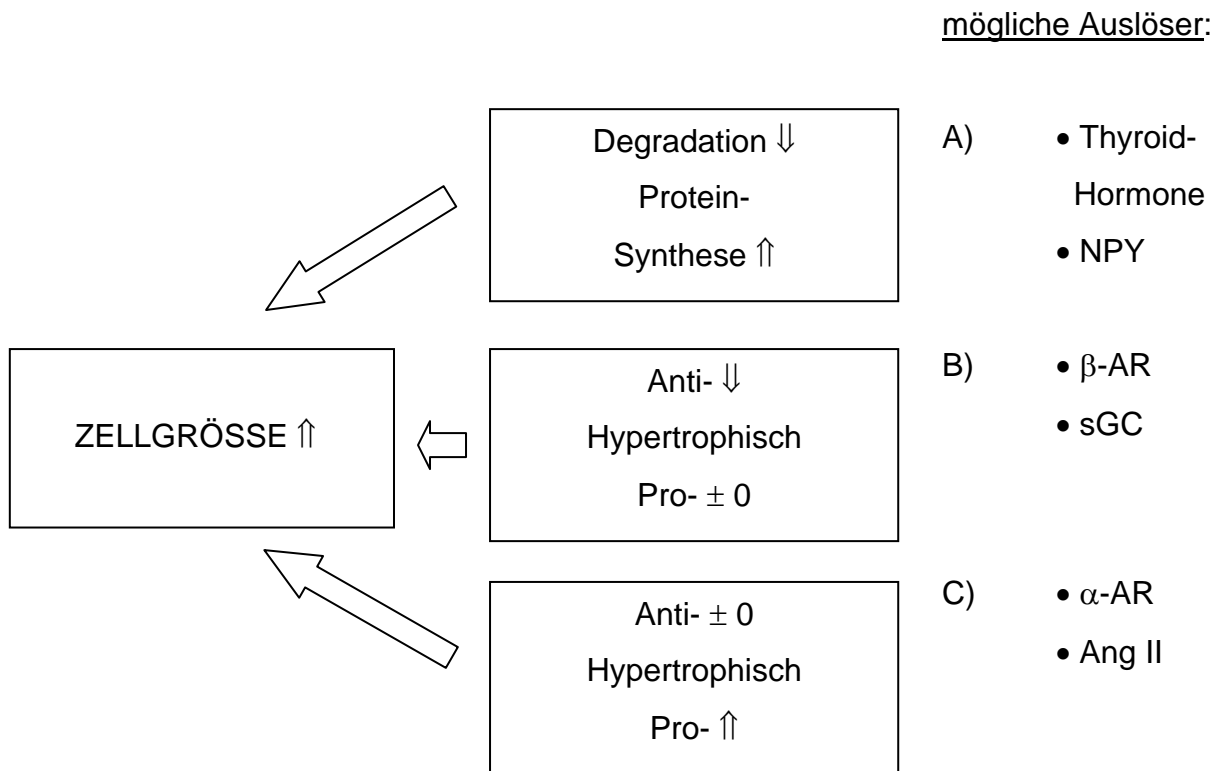


Abb. 1.1: Drei Ebenen der Induktion der myokardialen Hypertrophie

- A) Reduktion der Protein-Degradationsrate und erhöhte Proteinsynthese steigert Proteinmasse und Zellgröße (z.B. durch Thyroidhormone, Neuropeptid Y (NPY))
- B) Reduktion von anti-hypertrophen Faktoren führt zu einer Dominanz von prohypertrophen Faktoren (z.B. durch β-Adrenozeptor Stimulation (β-AR), lösliche Gyanylatcyclase (sGC))
- C) Förderung der prohypertrophen Faktoren (z.B. durch α-Adrenozeptor Stimulation (α-AR), Angiotensin II (Ang II))

(Abbildung modifiziert nach Schlüter & Wollert, 2004)

Durch dieses Netzwerk von fördernden und hemmenden Signalen wird ersichtlich, dass die myokardiale Hypertrophie nicht durch einzelne Stimuli entsteht, sondern sich durch die länger bestehende Interaktion verschiedener Faktoren langsam entwickelt, bis schließlich ein Stadium der Dekompensation erreicht ist und der Herzmuskel seiner Leistung nicht mehr gerecht werden kann. Die Herzmuskelhypertrophie ist somit ein wichtiges Zeichen einer beginnenden Herzinsuffizienz, welche im weiteren Verlauf vom kompensierten in den dekompensierten Zustand fortschreitet.

1.2 Phänotypische Veränderungen des hypertrophen Myokards

Im Zuge der Hypertrophie-Entwicklung verändert die Herzmuskelzelle ihr Aussehen und ihre innere Struktur, sie erfährt ein so genanntes „remodeling“. Durch die Modulation und Vernetzung verschiedener Signalwege kommt es zur Ausbildung des speziellen Phänotyps eines hypertrophen Kardiomyozyten.

Das Renin-Angiotensin-System (RAS), der Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) und das β -adrenerge System sind die Schlüsselmediatoren bei der Anpassung des Herzmuskels an eine hämodynamische Überlastung (Cohn *et al.*, 2000; Schnee & Hsueh, 2000). Hierbei reagiert das Herz auf die erhöhte Nachlast mit einem adaptiven Umbauprozess im Herzmuskel, der eine myokardiale Hypertrophie, Fibrose, Einlagerung von Extrazellulärmatrix und Veränderungen in der kardialen Genexpression zur Folge hat (Swynghedauw, 1999). Ein erhöhter Blutdruck führt zu einer vermehrten Katecholaminausschüttung, welche v.a. über α_1 -Adrenzeptoren (α_1 -AR) auf die Herzmuskelzellen wirken (Abb. 1.2). Der Myozyt reagiert auf die Stimulation der α_1 -Rezeptoren zum einen mit einer Aktivitätssteigerung der Proteinkinase C und der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), zum anderen mit einer gesteigerten Expression von Protoonkogenen. Dies führt zu einer vermehrten Proteinsynthese und zur verstärkten Expression von fetalen Genen, wie z.B. dem atrialen natriuretischen Faktor (ANF), deren eigentliche Aufgabe es ist, das Wachstum und die Entwicklung des fetalen Herzens zu fördern. Im gesunden Ventrikel werden diese Gene im Verlauf der postnatalen Entwicklung herunterreguliert (Schoenfeld *et al.*, 1998).

Diese Reaktivierung fetaler Gene ist ein typischer Befund bei der myokardialen Hypertrophie und erstreckt sich auf drei Kategorien von Proteinen:

- 1) Onkogene, wie z.B. c-myc, welche als Transkriptionsfaktoren wirken
- 2) Strukturproteine, wie z.B. β -myosin heavy chain
- 3) extrazelluläre Signalfaktoren, wie z.B. ANF

(Schlüter *et al.*, 1995)

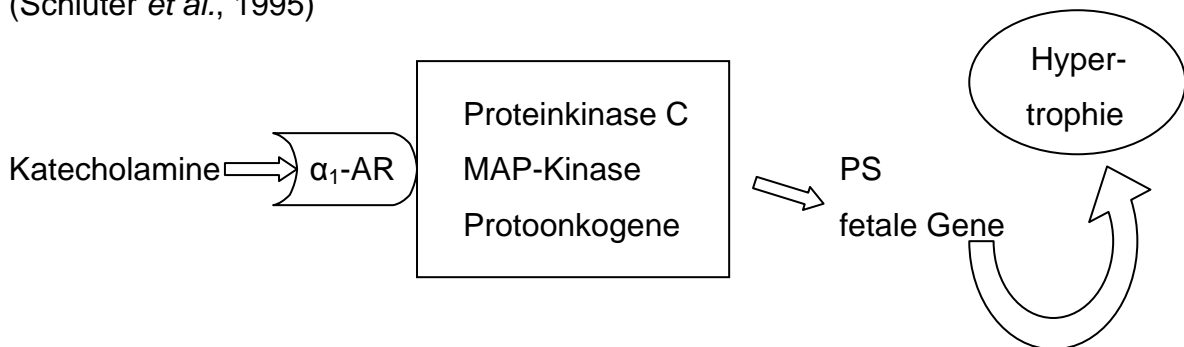


Abb. 1.2: Einfluss der α_1 -Adrenozeptor-Stimulation (α_1 -AR) auf die Herzmuskelzelle

Katecholamine steigern über den α_1 -Adrenozeptor die Aktivität von Proteinkinase C und Mitogen-aktivierter Protein-Kinase (MAP-Kinase) und induzieren die Expression von Protoonkogenen. Dies führt zu einer gesteigerten Proteinsynthese (PS) und zur vermehrten Expression fetaler Gene. Dadurch entsteht eine Hypertrophie der Herzmuskelzelle

(Abbildung modifiziert nach Schlüter *et al.*, 1995)

Bei fortschreitender hämodynamischer Überlastung des Herzens wird das Renin-Angiotensin-System (RAS) und damit sein Effektormolekül Angiotensin II (Ang II) aktiviert (Abb. 1.3). Ang II wirkt über den AT_1 -Rezeptor auf Fibroblasten und Myozyten und führt in beiden Zellen zu einer gesteigerten TGF- β_1 -Expression. TGF- β_1 wirkt dabei als para- und autokriner Signalfaktor und führt dadurch zusätzlich zu einer vermehrten Einlagerung von Extrazellulärmatrix (EZM) (Rosenkranz, 2004). Durch die Proliferation der Fibroblasten unter dem Einfluss des TGF- β_1 entsteht eine kardiale Fibrose. Die Myozyten reagieren auf TGF- β_1 mit einer erhöhten Ansprechbarkeit der β -Adrenozeptoren und einer gesteigerten ANF-Expression, welche eine Hypertrophie der Myozyten zur Folge haben. Diese drei Komponenten (EZM-Einlagerung, Fibrose und Myozytenhypertrophie) ergeben zusammen das Bild einer fortschreitenden kardialen Hypertrophie am Übergang zwischen Kompensation und klinisch manifester Herzinsuffizienz. Dieses ist vor allem durch die gesteigerte Expression von TGF- β_1 gekennzeichnet (Boluyt *et al.*, 1994).

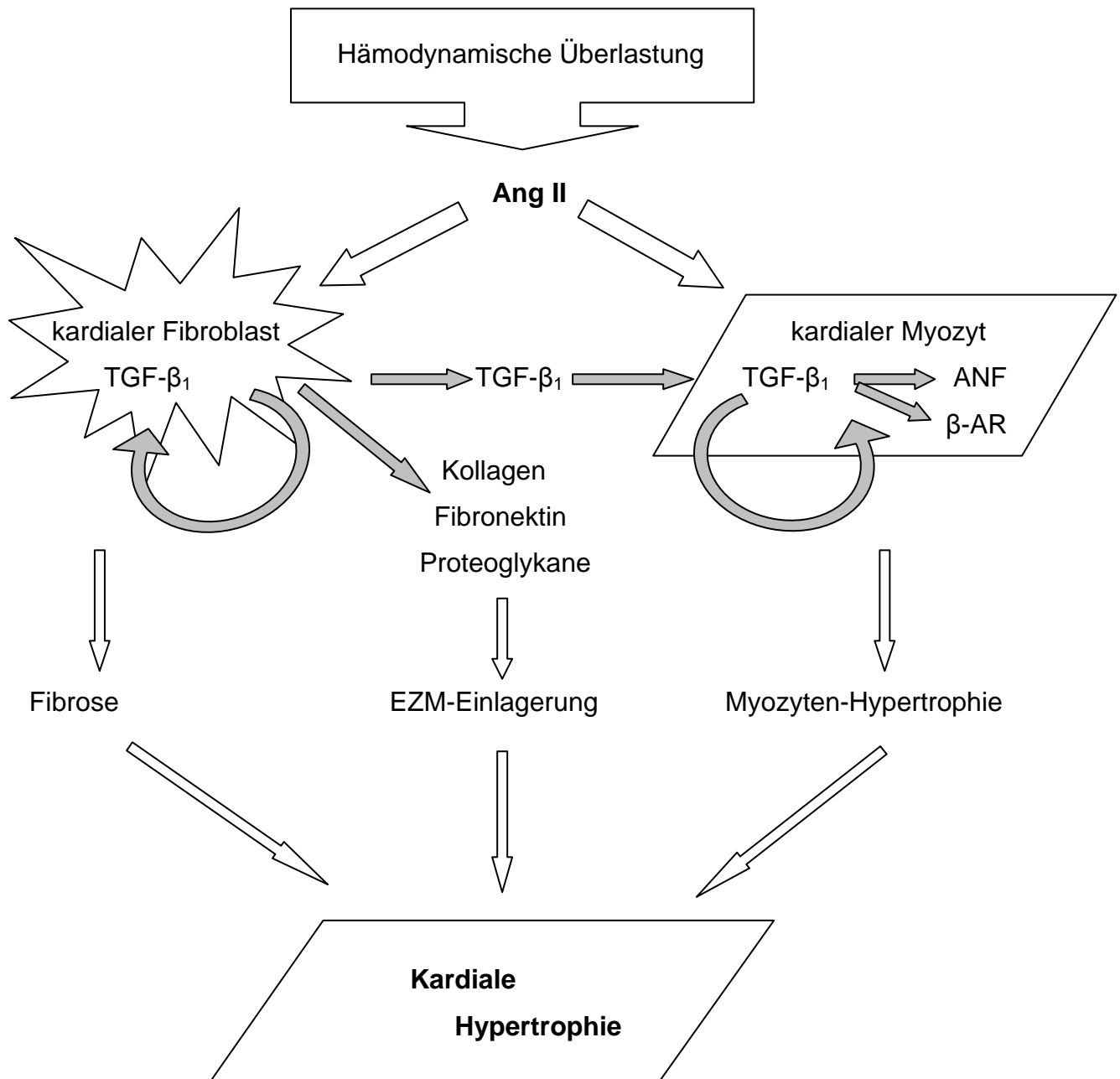


Abb. 1.3: Netzwerk zwischen dem Renin-Angiotensin-System, TGF- β_1 und dem β -adrenergen System (Abbildung modifiziert nach Rosenkranz, 2004)

Dargestellt ist das Netzwerk zwischen dem Renin-Angiotensin-System, TGF- β_1 und dem β -adrenergen System, ausgelöst durch eine hämodynamische Überlastung des Herzens. Das Renin-Angiotensin-System (RAS) aktiviert bei fortschreitender hämodynamischer Überlastung des Herzens Angiotensin II (Ang II), welches in Fibroblasten und Myozyten zu einer gesteigerten TGF- β_1 -Expression führt. TGF- β_1 wirkt dabei als para- und autokriner Signalfaktor und führt zusätzlich zu einer vermehrten Einlagerung von Extrazellulärmatrix (EZM). Durch Proliferation der Fibroblasten unter TGF- β_1 entsteht eine kardiale Fibrose. Die Myozyten reagieren auf TGF- β_1 mit einer erhöhten Ansprechbarkeit der β -Adrenozeptoren (β -AR) und einer gesteigerten ANF-Expression, dadurch entsteht eine Myozytenhypertrophie. Diese drei Komponenten (EZM-Einlagerung, Fibrose, Myozytenhypertrophie) ergeben zusammen das Bild einer fortschreitenden kardialen Hypertrophie.

TGF- β_1 steigert in Kardiomyozyten zum einen die ANF-Expression und zum anderen die Ansprechbarkeit der Zelle auf β -adrenerge Agonisten, indem es die Dichte der β -Adrenozeptoren auf den Myozyten erhöht und inhibitorische Proteine, wie z.B. $G_{i\alpha}$ herunterreguliert (Rosenkranz, 2004). Durch die erhöhte Ansprechbarkeit der Zelle auf β -adrenerge Agonisten wird das β -adrenerge System, welches vorher „nur“ an der Modulation der kardialen Leistung mittels Ino-, Chrono- und Dromotropie beteiligt war, an die Signalwege der Proteinbiosynthese gekoppelt (β -Adrenozeptor-coupling) und trägt somit zur Hypertrophie-Entwicklung bei (Abb. 1.4). Als Zeichen dieser Kopplung wird die gesteigerte Expression der Ornithin-Decarboxylase (ODC) angesehen (Schlüter *et al.*, 2000). Die ODC ist ein wichtiges Enzym im Polyamin-Stoffwechsel, welcher eine entscheidende Rolle bei der Proteinsynthese spielt, indem er die Translationsrate und damit den rRNA-Gehalt der Zelle steigert.

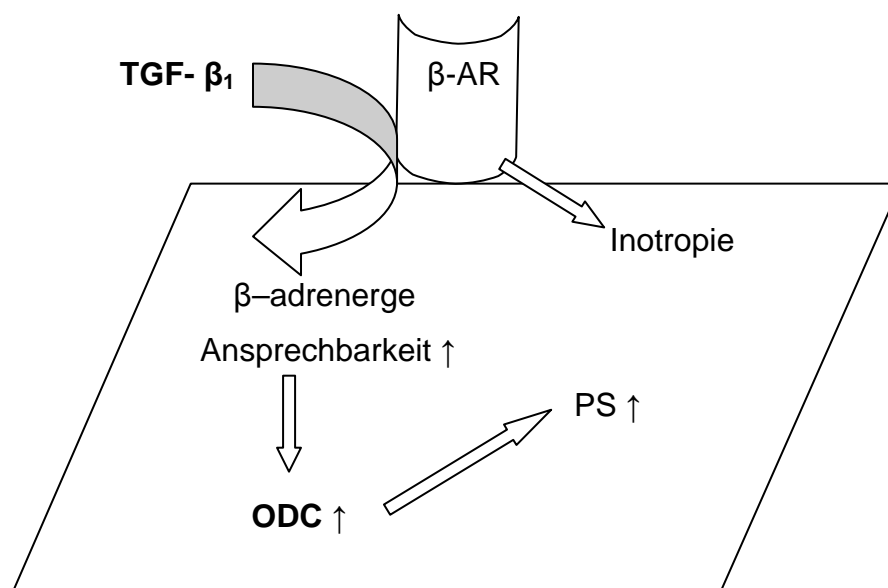


Abb. 1.4: TGF- β_1 -abhängige Erhöhung der ODC- Expression in der Herzmuskelzelle
Dargestellt ist der TGF- β_1 -abhängige Weg der Erhöhung der ODC-Expression in der Herzmuskelzelle. Durch die erhöhte Ansprechbarkeit der Zelle auf β -adrenerge Substanzen durch TGF- β_1 wird das β -adrenerge System, welches vorher „nur“ an der Inotropie des Herzens beteiligt war, an die Signalwege der Proteinbiosynthese (PS) über ODC gekoppelt (β -Adrenozeptor-coupling) und trägt damit zur Hypertrophie-Entwicklung bei.

Im vaskulären System des Herzens nimmt das Parathyroid hormone-related protein (PTHrP), ein mit dem Parathormon (PTH) strukturverwandtes Peptidhormon, eine wichtige Stellung im Hypertrophie-Geschehen ein. Es handelt sich dabei um ein Protein, das ebenso wie ODC in einem TGF- β_1 -abhängigen Signalweg reguliert wird, indem TGF- β_1 die PTHrP-Expression herunterreguliert (Wenzel *et al.*, 2001). PTHrP wird nahezu ubiquitär exprimiert, z.B. in der Haut, dem Knochenmark, dem Zentralen Nervensystem, dem kardiovaskulären System und in Organen mit einem großen Anteil glatter Muskulatur, wie Magen, Blase oder Uterus. Im Gegensatz dazu wird PTH nur in den Epithelkörperchen der Nebenschilddrüsen gebildet. Im kardiovaskulären System wird PTHrP als para-, auto- und intrakriner Faktor von verschiedenen zellulären Komponenten des Herzens sekretiert, z.B. von glatten Muskelzellen, Endothelzellen und atrialen Kardiomyozyten. Zielzellen von PTHrP sind hier u.a. glatte Muskelzellen, atriale und ventrikuläre Kardiomyozyten und Endothelzellen (Clemens *et al.*, 2001; Abdallah *et al.*, 2006). PTHrP besitzt durch seine Strukturverwandschaft mit PTH die gleiche Wirkung an dessen klassischen Zielzellen im Knochen und in den Nieren. Dort hat PTHrP die Aufgabe, ebenso wie PTH, den Kalziumstoffwechsel zu regulieren, indem es in der Niere die Kalziumrückresorption und die Phosphatexkretion steigert. Im Knochen trägt PTHrP wie PTH zur Entwicklung, Differenzierung und zum Wachstum der Knochenstruktur bei, indem es die enchondrale Ossifikation anregt.

Im kardiovaskulären System unterscheiden sich die Funktionen von PTHrP und PTH jedoch größtenteils. Beide spielen als Wachstumsfaktoren eine Rolle in der Hypertrophie adulter Kardiomyozyten indem sie die ihre Proteinsynthese, Proteinmasse und ihr Zellvolumen steigern. Während PTH nur indirekt, über einen gesteigerten Kalziumeinstrom in die Kardiomyozyten, positiv chronotrop wirkt, hat PTHrP unter ischämischen Bedingungen einen positiv chronotropen und inotropen Einfluss (Jansen *et al.*, 2003). Weiterhin haben beide eine gefäßrelaxierende Wirkung durch die Hemmung des L-Typ-Kalzium-Kanals der vaskulären glatten Muskelzellen (Abb. 1.5), wobei PTHrP um einiges potenter ist als PTH (Schlüter & Piper, 1998). Somit bewirkt PTHrP eine Vasodilatation im Kapillargebiet verschiedener Organe, einschließlich des Herzens (Nickols *et al.*, 1989). Durch einen gesteigerten pulsatilen Blutfluss in den Gefäßen werden die vaskulären Endothelzellen zyklisch gedehnt, was wiederum zu einem Anstieg der intrazellulären

Kalziumkonzentration führt. Dies geschieht zum einen durch einen erhöhten Kalziumeinstrom in die Zelle und zum anderen durch die Entleerung der zelleigenen Kalziumspeicher. Dieser erhöhte Kalziumgehalt in der Zelle führt zur vermehrten Freisetzung von PTHrP bei erhöhtem Blutdruck (Clemens *et al.*, 2001). Aufgrund der geringen Halbwertszeit und der niedrigen Plasmakonzentration von PTHrP reguliert es aber den Blutfluss eher auf lokaler als auf systemischer Ebene.

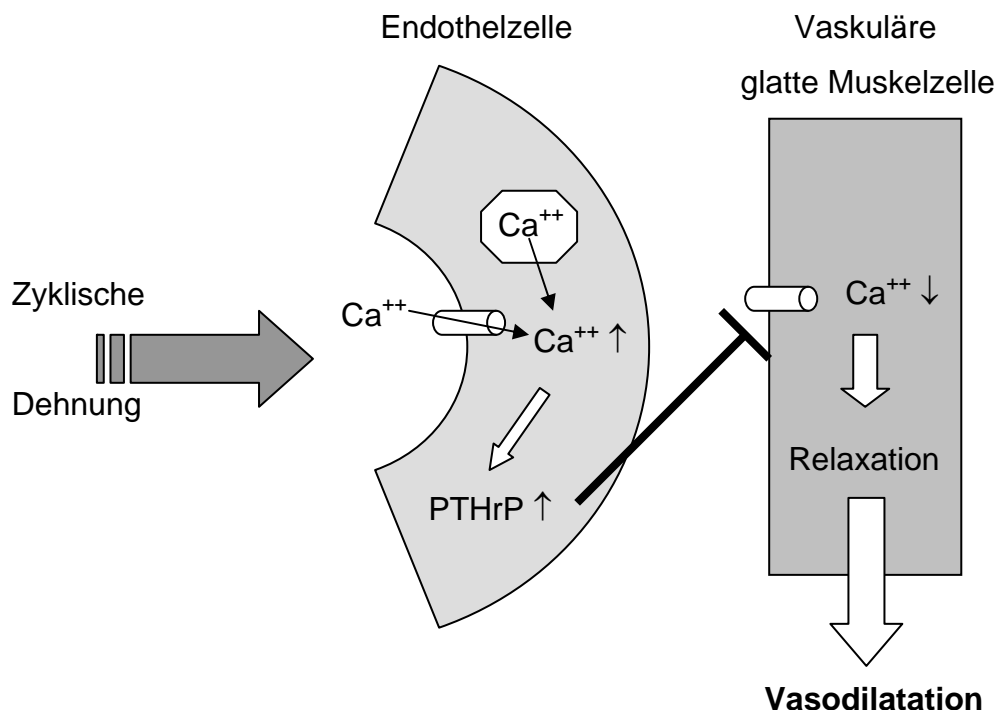


Abb. 1.5: Rolle von PTHrP bei der Dilatation von Blutgefäßen

Die zyklische Dehnung der Endothelzelle durch den verstärkten pulsatilen Blutfluß bei Bluthochdruck verursacht eine Kalziumanreicherung in der Zelle. Dies geschieht zum einen durch einen vermehrten Kalziumeinstrom und zum anderen durch die Entleerung der zelleigenen Kalziumspeicher. Der hohe Kalziumgehalt in der Endothelzelle führt wiederum zu einer gesteigerten PTHrP-Expression. PTHrP hemmt nun den L-Typ-Kalziumkanal der vaskulären glatten Muskelzelle und bewirkt damit eine Reduzierung des Kalziumgehaltes in dieser Zelle. Dies führt zu einer Relaxation der vaskulären glatten Muskelzelle und damit zur Vasodilatation

Die durch eine Ischämie erzeugte Energieverarmung in der Herzmuskelzelle führt zu einer intrazellulären Anreicherung von Kalzium durch Entleerung der zelleigenen Kalzium-Speicher. Dies wiederum führt zu einer gesteigerten Freisetzung von PTHrP in der Zelle. Durch PTHrP kann es nun im ischämie-geschädigten Gebiet durch Vasodilatation zu einer Verbesserung des Blutflusses und damit zu einer schnelleren

postischämischen Erholung kommen. Weiterhin besitzt PTHrP eine antimittogene Wirkung, welche den Zellzyklus der Mitose in der Hälfte der G1 Phase stoppt, und moduliert damit die Zellproliferation von vaskulären glatten Muskelzellen (Okano *et al.*, 1995). Außerdem schützt PTHrP koronare Endothelzellen auf intrakrinem Weg vor einer möglichen Apoptose (Schorr *et al.*, 2003) und gilt somit als Gefäßprotektivum. Mit seiner antiproliferativen und antiapoptotischen Funktion nimmt es eine wichtige Stellung in der Pathophysiologie der Angiogenese und Arteriosklerose ein, da die Apoptose der Endothelzellen als Initiator für eine sich anschließende Arteriosklerose fungiert (Rossig *et al.*, 2001). Somit lassen sich die kardialen Wirkungen von PTHrP auf eine Steigerung der koronaren Durchblutung (Vasodilatation durch Relaxation glatter Muskelzellen), eine Verbesserung der Schlagkraft des Herzens (positive Chrono- und Inotropie, Hypertrophie), eine Verbesserung der postischämischen Erholung (Vasodilatation im ischämiegeschädigten Gebiet) und einen Schutz vor Arteriosklerose (antiapoptotische Wirkung) zusammenfassen.

Eine veränderte Ansprechbarkeit von β -Adrenozeptoren, eine gesteigerte ODC-Expression und eine veränderte PTHrP-Expression tragen somit zum Fortschreiten der myokardialen Hypertrophie und schließlich zur Entstehung einer Herzinsuffizienz bei.

1.3 Einfluss von Rauchbelastung auf das Herz-Kreislauf-System

Der Konsum von Zigaretten gilt, neben erhöhtem Blutdruck und einem erhöhten Cholesterinspiegel, schon seit langer Zeit als einer der wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten von Herz- und Kreislauferkrankungen (Anderson *et al.*, 1991). Sogar Passivrauchen mit einer hundertfach niedrigeren Rauchexposition als bei Aktivrauchern, erhöht das Risiko von Koronarerkrankungen um 30% gegenüber Nichtrauchern. Bei aktiven Rauchern beträgt die Risikoerhöhung sogar 80% (Ambrose & Barua, 2004). Auch Zigaretten mit einem geringen Teergehalt oder Kautabak steigern das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen im Vergleich zu Nichtrauchern (Negri *et al.*, 1993; Bolinder *et al.*, 1994). Obwohl der Zusammenhang zwischen Zigarettenkonsum und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen mehrfach nachgewiesen wurde (Anderson *et al.*, 1991; Bartecchi *et al.*, 1995;

Ambrose & Barua, 2004), sind bisher weder die exakte Zusammensetzung von Zigarettenrauch noch die für die Erkrankungen verantwortlichen Mechanismen vollständig geklärt. Weiterhin wird noch erforscht, welche Wirkungen durch Nikotin oder die anderen Komponenten des Zigarettenrauches, alleine oder durch deren Kombination, hervorgerufen werden.

Von den bisher über 4000 bekannten Komponenten des Zigarettenrauches stellen Nikotin, Kohlenmonoxid und die oxidativen Gase die wichtigsten Inhaltsstoffe dar, die maßgeblich an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen beteiligt sind (Benowitz, 2003). Weiterhin werden polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und andere Inhaltsstoffe des Zigarettenrauches als mögliche pathogene Faktoren diskutiert.

Nikotin wird sehr schnell aus dem Zigarettenrauch aufgenommen und kann nach dem Genuss einer Zigarette im arteriellen Blut Konzentrationen von 40 bis 100 ng/ml erreichen (Henningfield *et al.*, 1993). Obwohl nach jeder Zigarette ein starker Anstieg im Plasma-Nikotinspiegel zu verzeichnen ist, tendiert der Nikotin-Gesamtspiegel dazu bei regulärem Rauchen zwar in den ersten 6 bis 8 Stunden des Tages anzusteigen, erreicht dann aber eine Plateauphase, welche nach der letzten gerauchten Zigarette bis zu 2 Stunden konstant bleibt (Benowitz *et al.*, 1982). Aufgrund der kurzen Eliminations-Halbwertszeit von Nikotin von ca. 2 Stunden, fällt der Nikotinspiegel über Nacht ab, wobei bei chronischen Rauchern morgens in der Aufwachphase immer noch signifikante Nikotinplasmaspiegel gemessen werden können. Das bedeutet, dass der Raucher bei regelmässigem Nikotinkonsum über den gesamten Tagesverlauf hinweg signifikant erhöhten Nikotin-Plasmaspiegeln ausgesetzt ist (Benowitz, 2003).

Nikotin ist das Hauptalkaloid der Tabakpflanze (z.B. *Nicotiana tabacum*) und wirkt am Nikotinrezeptor als Agonist, ebenso wie physiologisch das Acetylcholin. Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren finden sich bevorzugt an den vegetativen Ganglien, sowohl des parasymphatischen als auch des sympathischen Nervensystems, im Nebennierenmark, sowie an den neuromuskulären Endplatten des Skelettmuskels.



Nic. tabacum

In niedriger Konzentration besitzt Nikotin am Nikotinrezeptor eine erregende Wirkung. Allerdings wird in höherer Konzentration der Nikotinezeptor einer Dauerdepolarisation ausgesetzt und damit blockiert. Dies führt zu einer vorübergehenden Hemmung des Rezeptors. Nikotin kann also auf das sympathische Nervensystem ebenso wie auf das parasympathische Nervensystem sowohl erregend als auch hemmend einwirken. Durch diese komplexe Pharmakodynamik ist die Wirkung des Nikotins abhängig von der Dosis, der Applikationsart und der Zeit nach Applikation des Nikotins (Forth, Henschler, Rummel & Starke, 1998). Bei durchschnittlichen Rauchern erfolgt eine regelmäßige Aufnahme von relativ geringen Mengen an Nikotin, wodurch eine ständige Stimulation des sympathischen Nervensystems erfolgt. Diese Erhöhung des Sympathikotonus hat in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen eine wesentliche Bedeutung. Während bzw. kurz nach dem Genuss einer Zigarette steigen Blutdruck und Herzfrequenz an, wobei aber kein dauerhafter pathologischer Bluthochdruck entsteht (Green *et al.*, 1986). Weiterhin wirkt Nikotin durch die gesteigerte Freisetzung von Katecholaminen positiv chrono- und inotrop am Herzen. Dadurch wird die Auswurfleistung des Herzens erhöht, und fördert damit den koronaren Blutfluss. Dies gilt allerdings nur für herzgesunde Patienten, bei Patienten mit einer bereits bestehenden Koronarerkrankung wird der koronare Blutfluss vermindert. Diese Verschlechterung der myokardialen Durchblutung lässt sich durch α -Adrenozeptor-Blocker aufheben, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Effekt durch einen α -Adrenozeptor-vermittelten erhöhten koronaren Gefäßwiderstand hervorgerufen wird (Nicod *et al.*, 1984).

Kohlenmonoxid ist ein Hauptbestandteil des Zigarettenrauches und entsteht durch den Verbrennungsprozess der Zigarettenspitze. Es hat eine höhere Bindungsaffinität zu Hämoglobin als Sauerstoff. Dadurch wird vermehrt Hämoglobin von Kohlenmonoxid „besetzt“ und der Gehalt an „freiem“ Hämoglobin, das für den Transport von Sauerstoff zur Verfügung steht, reduziert sich. Somit wird der Sauerstoffgehalt sowohl im Blut als auch in den Organen verringert, wodurch ischämische Zustände erzeugt werden können. Weiterhin wird durch den geringen Sauerstoffgehalt im Blut die Erythropoese angeregt, und es kommt dadurch zu einer Erhöhung der Blutviskosität (Benowitz, 2003). Der geringere Sauerstoffgehalt des Blutes macht, ebenso wie die positiv chrono- und inotrope Wirkung des Nikotins, eine

gesteigerte myokardiale Durchblutung erforderlich. Diese kann aber aufgrund der durch das Nikotin hervorgerufenen Vasokonstriktion der KoronargefäÙe nicht in angemessener Weise erfolgen.

Zigarettenrauch enthält eine Vielzahl verschiedener freier Radikale mit oxidativer Wirkung. Die vermehrte Aufnahme oxidativer Substanzen verringert die Versorgung des Körpers mit Antioxidantien. Dies zeigt sich beispielsweise daran, dass Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern einen geringeren Plasmaspiegel an Vitamin C aufweisen (Lykkesfeldt *et al.*, 2000). Oxidativer Stress trägt in verschiedenen Stoffwechselprozessen dazu bei, kardiovaskuläre Erkrankungen zu begünstigen, z.B. durch entzündliche Prozesse, endotheliale Dysfunktion, Veränderungen im Cholesterinspiegel (Oxidation von Low Density Lipoprotein) und Thrombozyten-Aktivierung. Die endotheliale Dysfunktion entsteht durch eine Verminderung des Gehaltes an Stickstoffmonoxid (NO) im Blut und eine zusätzliche Senkung der NO-Freisetzung durch die oxidativen Substanzen. Dadurch antagonisieren sie die vasodilatatorische Wirkung von NO.

Als Versuchsmodell zur Untersuchung des Übergangs von der Hochdruck-induzierten Hypertrophie zur Herzinsuffizienz, werden spontan hypertensive Ratten (SHR) verwendet. SHR entwickeln erst als adulte Tiere (im Alter von ca. 3 Monaten) einen Bluthochdruck mit anschließender myokardialer Hypertrophie. Damit simulieren sie den Zeitverlauf einer Hypertonie beim Menschen (Pfeffer *et al.*, 1979; Mochizuki *et al.*, 1986). Obwohl SHR häufig verwendet werden um die Grundmechanismen des bluthochdruckbedingten Übergangs von der Hypertrophie zur Herzinsuffizienz zu untersuchen, stehen keine Daten zur Verfügung, die den kombinierten Effekt verschiedener Risikofaktoren bei gleichzeitig bestehendem Bluthochdruck beschreiben. Die wichtigsten Risikofaktoren, die in diesem Zusammenhang zu einer myokardialen Hypertrophie und der nachfolgenden Herzinsuffizienz führen, sind Alter, Geschlecht, Diabetes und Übergewicht. Rauchen ist ein weiterer Risikofaktor mit großer klinischer Bedeutung. Trotzdem fehlt bisher ein etabliertes Versuchsmodell zum Bluthochdruck, wie das der SHR, um den Einfluss von Rauchen auf das Fortschreiten der Hypertrophie zu untersuchen.

In dieser Studie wurde die Hypothese untersucht, dass Rauchen das Fortschreiten der myokardialen Hypertrophie modifiziert, indem es die Expression von Hypertrophie-assoziierten Genen (ANF, TGF- β_1 , ODC, PTHrP) verändert. Um diese Fragestellung zu untersuchen, wurden junge, männliche SHR einem etablierten Berauchungs-Protokoll über 90 Tage unterzogen. Anschließend wurde der Einfluss der Kombination von Rauchen und Bluthochdruck auf die myokardiale Hypertrophie (Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht) und die Expression der Hypertrophie-assoziierten Gene (mittels real time RT-PCR und Western Blot) untersucht und mit der Situation bei nicht berauchten SHR verglichen.

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit sich eine Rauchentwöhnung auf die Entwicklung einer Myokardhypertrophie auswirkt. Dabei wurden SHR 30 Tage lang nach dem Berauchungsmodell der vorigen Versuchsreihe beraucht, um dann die restlichen 60 Tage nur Frischluft zugeführt zu bekommen. Diese Tiere wurden sowohl mit Frischluft inhalierenden Kontrolltieren als auch mit 90 Tage lang berauchten Tieren gleichen Alters verglichen.

Außerdem wurden normotensive Ratten der Linie Wistar-Kyoto (WKY), die im Vergleich zu den SHR nicht selbstständig eine progressive Myokardhypertrophie entwickeln, nach 90 Tagen Berauchung auf Anzeichen einer Herzhypertrophie untersucht. Da SHR als Modell für Patienten mit Bluthochdruck dienen, sollen die WKY ein Modell für Blutdruckgesunde liefern. Es wurde also untersucht, inwieweit Rauchen auch einen Einfluss auf die Entwicklung einer Myokardhypertrophie bei normotensiven Tieren hat.

Da Nikotin ein wichtiger Hauptbestandteil des Zigarettenrauches ist und es im Rahmen der Ausprägung kardiovaskulärer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt, wurde sein Einfluss auf die Entstehung einer Hypertrophie an isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen untersucht. Es stellte sich die Frage inwieweit Nikotin *per se* eine myokardiale Hypertrophie auslösen kann oder ob der Zigarettenrauch in seiner komplexen Zusammensetzung für die Hypertrophie verantwortlich ist. Weiterhin wurde der Einfluss von Nikotin auf die PTHrP-Expression in isolierten mikrovaskulären Endothelzellen untersucht. PTHrP wird als para- und autokriner Faktor in Endothelzellen sezerniert und wirkt dort als Gefäßprotektivum.

1.4 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Studie wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Verursacht eine subchronische Rauchbelastung eine myokardiale Hypertrophie bei spontan hypertensiven Ratten?
2. Verursacht eine subchronische Rauchbelastung eine myokardiale Hypertrophie bei normotensiven Ratten?
3. Verursacht eine transiente subchronische Rauchbelastung eine myokardiale Hypertrophie bei spontan hypertensiven Ratten?
4. Verursacht Nikotin eine myokardiale Hypertrophie in isolierten ventrikulären Herzmuskelzellen?
5. Hat Nikotin Einfluss auf die PTHrP-Expression in isolierten mikrovaskulären Endothelzellen?

Zum Nachweis einer myokardialen Hypertrophie wurden folgende Parameter untersucht: 1) das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht der Versuchstiere, 2) die Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene ihrer Ventrikel auf mRNA-Ebene (ANF, TGF- β_1 , ODC, PTHrP) und 3) die Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene ihrer Ventrikel auf Proteinebene (ANF, TGF- β_1).

Der Einfluss von Nikotin auf isolierte ventrikuläre Kardiomyozyten wurde anhand der Expression von ANF und TGF- β_1 auf mRNA-Ebene untersucht. Der Einfluss von Nikotin auf isolierte mikrovaskuläre Endothelzellen wurde anhand der Expression von PTHrP auf mRNA-Ebene und Proteinebene untersucht.

2. Material

2.1 Chemikalien

6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	qbiogene, Heidelberg
Albumin	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat	Applichem, Darmstadt
Benzonase	Merck, Darmstadt
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (Fraktion 5)	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Cacodylsäure	Serva, Heidelberg
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Carnitin	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Collagenase, Typ CLS II	Biochrom, Berlin
Creatin	Sigma, Taufkirchen
Cytosin- β -Arabinfuranosid	Sigma, Taufkirchen
Dithiotreitol (0,1 M)	Invitrogen, Karlsruhe
Diethylether	Roth, Karlsruhe
EDTA-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Haen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Cölbe
Fluka Marker 69813	Sigma, Taufkirchen

Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Applichem, Darmstadt
HEPES	Roche Diagnostics, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kollagenase	Biochrom, Berlin
100bp Ladder	New England BioLabs, Frankfurt/Main
Laminin	Sigma, Taufkirchen
Medium 199/Earl's Salts	Biochrom, Berlin
Mercaptopropandiol	Merck-Suchard, Hohenbrunn
Methanol	Riedel de Haen, Seelze
M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
100 mM dNucleotid Solution	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumazid	Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natrium-ortho-vanadat	Merck, Darmstadt
Neonatales Kälberserum	PAA, Cölbe
Nicotin	Sigma, Taufkirchen
Nitro Blue Tetrazolium	Sigma, Taufkirchen
10x PCR Buffer minus Mg	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
rRNasin [®] Rnase Inhibitor	Promega, Mannheim
5x first strand buffer	Invitrogen, Karlsruhe
iQ [™] SYBR [®] Green Supermix	Bio-Rad, München
Saccharose	Merck, Darmstadt

TaqDNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Taurin	Sigma, Taufkirchen
Tetramethylethylenediamin	Sigma, Taufkirchen
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
TRIzol [®] Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
1% W-1 (Detergenz)	Invitrogen, Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma, Taufkirchen

Alle übrigen Salze und Chemikalien wurden jeweils in der höchsten Qualität bezogen, die von den Firmen Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim) und Sigma (Taufkirchen) angeboten wird. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt. Für Lösungen, Medien und Puffer wurde, falls nichts anderes angegeben wurde, aqua bidest. als Lösungsmittel verwendet.

2.1.1 Antikörper

Der ANF-Antikörper wurde von der Firma Acris (Hiddenhausen), der TGF- β_1 -Antikörper von der Firma Merck (Darmstadt), der PTHrP-Antikörper und der β -Aktin-Antikörper von der Firma Sigma (Taufkirchen) bezogen.

Alle verwendeten Zweitantikörper stammen von der Firma Sigma (Taufkirchen).

2.1.2 Primer

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

2.2 Geräte

2.2.1 Allgemein verwendete Geräte und Gebrauchsgegenstände

Aqua bidest.-Anlage	Millipore, Eschborn
Glaswaren	Schott, Mainz
Laborwaage	Sartorius AG, Göttingen
Magnet-Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Mischer/Schüttler	Heidolph, Kelheim
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Porzellanmörser	Fisher Scientifics, Schwerte
Ultra-Turrax [®] (Ultra-Zerkleinerer)	IKA-Werke, Staufen
Techne Dri-Block [®] DB.2D (Thermoblock)	Techne AG, Burkhardtsdorf
Wasserbad (Typ: Julabo U3)	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Zentrifugen	Kendro, Hanau

2.2.2 Spezielle Geräte und Gebrauchsgegenstände

iCycler	BioRad, München
Thermo Cycler	Techne Cyclogen
Spectrophotometer Ultrospec [®] 2000	Pharmacia Biotech
Brutschrank (Typ: Cytoperm)	Kendro, Hanau
Gewebehacker	Harvard Apparatus, March-Hugstetten
Langendorff-Apparatur	Eigenbau, Werkstatt Physiologisches Institut, Giessen
Mikroskop (Typ: TMS-F)	Nikon, Düsseldorf
Nylonnetz (Porengröße 200 µm)	NeoLab, Heidelberg
Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Primaria Kulturschalen Falcon Typ 3803	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank (Typ: Lamin Air [®] HBB 2472)	Kendro, Hanau
Elektroblotkammer	Biometra, Göttingen
Filterpapier	Biotec. Fischer, Reiskirchen
Hamiltonspritze (50 µl)	Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Hoefer-Elektrophoresekammer (SE 600)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefer-Glasplatte	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefer-Plattenklemme	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefer-Profilformer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hoefer-Spacer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Immobilon P (PVDF-Membran)	Millipore, Eschborn
Netzgerät (Typ Biometra)	Biometrische Analytik, Göttingen

2.2.3 Verbrauchsmaterialien

Falcon Kulturschalen Typ 3004	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Zellschaber Typ Falcon 3087	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
0,2 ml Thermo-strip (tubes + cups)	ABgene [®] , Hamburg
Nylon (Typ: Hybond-N 0,45 Micron)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Reaktionsgefäße (0,5/1,5/2,0 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

2.3 EDV

Corel Photo Paint [®]	Corel Inc., USA
Image Quant	Molecular Dynamics, Krefeld
Microsoft Excel 2000 [®]	Microsoft Corp., USA
Microsoft Windows ME [®]	Microsoft Corp., USA
Microsoft Word 2000 [®]	Microsoft Corp., USA
SPSS 12.01 dt.Win für Windows	SPSS Inc., USA

3. Methoden

3.1 Isolierung von ventrikulären Kardiomyozyten

3.1.1 Versuchstiere

Die Kardiomyozyten wurden aus den Herzen von adulten männlichen Wistar-Ratten mit einem Lebendgewicht von 250-350g isoliert. Die Tiere stammten aus dem hauseigenen Tierstall des Physiologischen Instituts der Justus-Liebig-Universität Gießen, wo sie gezüchtet und aufgezogen wurden. In der Haltung (Käfignutzfläche 1820 cm², Temperatur 20°C, Luftfeuchtigkeit 40%) hatten sie freien Zugang zu Futter (Standardfutter: Altromin[®]) und Wasser. Als Lichtregime wurde natürliches Tageslicht gewählt.

3.1.2 Gewinnung isolierter Kardiomyozyten

Die Sektion der Ratten, die Präparation ihrer Herzen und die Isolierung der Kardiomyozyten erfolgten wie bei Schlüter & Schreiber (2005) beschrieben. Die hierfür verwendete Langendorff-Perfusionsanlage wurde zu Beginn mit aqua bidest. gespült und danach luftblasenfrei mit Powell-Medium gefüllt. Während der gesamten Isolierungsdauer wurde das Perfusionsmedium auf 37°C erwärmt und mit Carbogen[®] begast, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 zu gewährleisten.

Kalzium-Stammlösung:

CaCl ₂	100	mmol/l
-------------------	-----	--------

Powell-Medium: (Carbogen[®] begast)

NaCl	110	mmol/l
NaHCO ₃	25	mmol/l
Glucose	11	mmol/l
KCl	2,6	mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2	mmol/l
Mg ₂ SO ₄ x H ₂ O	1,2	mmol/l

Nach einer kurzen Diethylethernarkose bis zum Erreichen einer tiefen Bewusstlosigkeit wurden die Ratten durch Genickbruch getötet. Anschließend wurde der Thorax eröffnet, das Zwerchfell entfernt, das Herz samt Lunge herauspräpariert und sofort in eine Petrischale mit 4° C kalter physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Hier wurde das Herz von anhängenden Organ- und Geweberesten (Lunge und Mediastinum) befreit und über die Aorta ascendens an eine Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur angeschlossen. Zuerst wurde die Blutleere des Organs durch eine Spülung mit ca. 50 ml Powell-Medium erreicht. Im Anschluss erfolgte die retrograde, rezirkulierende Perfusion mit 50 ml Kollagenase-Puffer für 25 Minuten. Die Flussrate wurde auf 5ml/min/Herz eingestellt.

Kollagenase-Puffer:

Powell-Medium	50,0	ml
Kollagenase (chargenabhängig)	20,0	mg
Kalzium-Stammlösung	12,5	µl

Nach der Perfusion wurden die Vorhöfe und die Aorta entfernt und die Ventrikel mit einem Gewebehacker in einem Schnittabstand von 0,7 mm in zwei Ebenen bei Raumtemperatur mechanisch für fünf Minuten zerkleinert. Anschließend erfolgte ein weiterer enzymatischer Aufschluss des Gewebehomogenats für fünf Minuten bei 37°C mit 30 ml Kollagenase-Puffer unter ständiger Carbogen®-Begasung. Um die Separierung der einzelnen Herzmuskelzellen zu unterstützen, wurde die Suspension minütlich mit einer 5 ml Pipette vorsichtig auf- und abpipettiert.

Nach Filtration der Suspension durch ein Nylonnetz (Maschenweite 200 µm) wurden Zelltrümmer, kleinere Zellen und die Kollagenaselösung durch eine dreiminütige Zentrifugation bei 25 xg und Raumtemperatur von den intakten Herzmuskelzellen getrennt. Das dabei gewonnene Sediment wurde zur Kardiomyozyten-Isolierung verwendet, der Überstand diente der Gewinnung von mikrovaskulären Endothelzellen (siehe Kapitel 3.2). Das Sediment wurde in Powell-Medium mit 200 µmol/l CaCl₂ resuspendiert und erneut bei 25 xg für zwei Minuten zentrifugiert. Dabei ließ sich eine erhöhte Zelltrennung erreichen und die Kardiomyozyten wurden langsam an das Kalzium gewöhnt. Das hierdurch gewonnene Zellpellet wurde in Powell-Medium mit 400 µmol/l CaCl₂ aufgenommen und zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt. Diese Zellsuspension wurde auf mehrere

Reagenzröhrchen aufgeteilt (Anzahl der Reagenzröhrchen = Anzahl der verwendeten Rattenherzen).

Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 15 xg und Raumtemperatur für 1 min erhielt man im Sediment eine Zellpopulation mit ca. 40-60% intakten, stäbchenförmigen Kardiomyozyten.

3.1.3 Zellkultur von Kardiomyozyten der Ratte

3.1.3.1 Vorplattieren der Kulturschalen

Um das Anheften der isolierten Kardiomyozyten zu gewährleisten wurden die verwendeten Kulturschalen (Falcon Typ 3004) mit Vorplattiermedium für mindestens vier Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Vorplattiermedium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren der Kardiomyozyten abgesaugt.

Vorplattiermedium:

CCT-Medium (sterilfiltriert, pH 7,4)	x	ml
Fetales Kälberserum (FCS)	4 %	(vol/vol)
Penicillin	100	IE/ml
Streptomycin	100	µg/ml

3.1.3.2 Ausplattieren der Kardiomyozyten

Die isolierten Kardiomyozyten (Schlüter & Schreiber, 2005) wurden in 37°C warmen CCT-Kulturmedium (20 ml / Reagenzglas) homogen resuspendiert und in einer Dichte von etwa 5×10^4 Zellen pro cm^2 ausplattiert.

CCT-Medium (sterilfiltriert):

M199 / HEPES gepuffert	x	ml
Creatin	5	mmol/l
Taurin	5	mmol/l
Carnitin	2	mmol/l
Cytosin-β-Arabinofuranosid	10	µmol/l

pH 7,4

CCT-Kulturmedium (sterilfiltriert):

CCT-Medium	x	ml
Penicillin	100	IE/ml
Streptomycin	100	µg/ml

Die Präparationsqualität wurde unmittelbar nach dem Ausplattieren mikroskopisch kontrolliert. Intakte Kardiomyozyten sind stäbchenförmig und zeigen keine Spontanaktivität. Um das Anheften der Kardiomyozyten auf dem Boden der Kulturschale zu ermöglichen wurden diese für zwei bis vier Stunden bei 37°C inkubiert.

3.1.3.3 Kurzzeitkultivierung von Kardiomyozyten

Nach der Anheftungsphase durch Inkubation im Brutschrank wurden die Zellkulturen bis zu zweimal mit CCT-Kulturmedium gewaschen. Hierdurch lassen sich die vom Schalenboden abgelösten abgestorbenen runden Zellen entfernen. Die Zellkultur bestand nun zu ca. 90 % aus vitalen, stäbchenförmigen Kardiomyozyten. Nach dem Waschvorgang und einer anschließenden Ruhepause von 10 min im Medium (Schalen Typ Falcon 3004 je 2 ml Medium) wurden die Zellkulturen je nach Versuchsprotokoll induziert.

3.2 Gewinnung isolierter mikrovaskulärer Endothelzellen aus adulten Rattenherzen

Die Präparation erfolgte nach der Beschreibung von Piper *et al.* (1990). Als Quelle für die Endothelzellen dienten dieselben Herzen, die auch schon für die Kardiomyozyten-Isolierung verwendet wurden. Nach Filtration der Zellsuspension durch das Nylonnetz und anschließender Zentrifugation wurde der Überstand zur Endothelzellisolierung weiterverwendet. Dieser wurde mit 10 mg Trypsin und 30 µl der CaCl₂-Lösung (100 mmol/l) versetzt, und bei 37°C langsam mittels eines elektrischen Rührers für 30 Minuten unter ständiger Carbogen[®]-Begasung durchmischt. Anschließend wurde die Suspension in 60 ml M199/CO₂ aufgenommen.

M199/ CO₂ (sterilfiltriert):

Medium 199/Earl's Salts	9,5	g
HEPES	15,0	mmol/l
NaHCO ₃	17,9	mmol/l
Carbogen [®]	min. 2 h begast	
aqua bidest.	ad 1 l	

pH 7,4

Das durch eine anschließende Zentrifugation bei Raumtemperatur über zehn Minuten bei 60 xg gewonnene Pellet wurde in ca. 10 ml des 37°C warmen Endothelzellmediums resuspendiert.

Endothelzellmedium:

M 199/CO ₂	x	ml
NCS/FCS (1:1)	20	% (vol/vol)
Penicillin	100	IE/ml
Streptomycin	100	µg/ml

Die Zellsuspension wurde in 20 ml Medium auf eine Primariaschale[®] Falcon Typ 3803 ausplattiert und für vier Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Zur Entfernung nicht angehefteter Zellen wurden die Kulturen anschließend zweimal mit Endothelzellmedium gewaschen. Bis zum Ausbilden eines konfluenten Zellrasens wurden das Medium alle zwei Tage gewechselt, wobei die Antibiotikakonzentration von anfänglich 5 % auf 2 % reduziert wurde.

3.2.1 Passage von mikrovaskulären Endothelzellen

Nach mikroskopischer Wachstums- und Verkeimungskontrolle wurden die Endothelzellkulturen zwei- bis dreimal mit EDTA-Puffer (pH 7,4) gewaschen. EDTA ist ein Chelatbildner, der sich mit dem im Medium befindlichen Kalzium fest verbindet. Das im Anschluss aufgetragene Trypsin würde sonst durch freie Kalzium-Ionen inhibiert.

EDTA-Puffer (sterilfiltriert) :

NaCl	125,0	mmol/l
HEPES	10,0	mmol/l
KCl	2,7	mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2	mmol/l
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1,2	mmol/l
EDTA-Na ₂	0,5	mmol/l

Die interzellulären Verbindungen des Endothelzellrasens wurden durch 10 minütige Inkubation mit 5 ml Trypsin je Kulturschale im Brutschrank bei 37°C gelöst. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von Endothelzellmedium gestoppt und die Zellsuspension auf die je nach Versuchsprotokoll benötigte Anzahl an Schalen (Falcon Typ 3004) ausplattiert. Die Weiterverwendung der Zellen erfolgte je nach Wachstumsrate innerhalb von ein bis zwei Tagen.

3.3 Zellinduktion

Die Zellinduktion der isolierten ventrikulären Kardiomyozyten und der mikrovaskulären Endothelzellen erfolgte pro Schale mit 20 µl einer Nikotin-Stocklösung in der Konzentration von 10 mmol/l, um die gewünschte Konzentration von 100 µmol/l in der Schale mit 2 ml Kulturmedium zu erreichen. Die Wahl der Nikotin-Konzentration von 100 µmol/l bezieht sich auf Untersuchungen an Kardiomyozyten von Meerschweinchen und bewirkt eine Reaktion ihrer Ionenkanäle (Sato, 2002). Die Induktionsdauer betrug jeweils vierundzwanzig Stunden.

3.4 Zellernte

Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Schalen mit kalter 1 x PBS-Lösung gewaschen.

10 x PBS:

NaCl	15,0	mmol/l
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1,6	mmol/l
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,4	mmol/l

pH 7,4

Um Zellen für die RNA-Isolierung zur DNA-Analyse (siehe Kapitel 3.6) zu ernten, wurde auf die erste Schale der Versuchsreihe (insgesamt 5 Schalen pro Versuchsreihe) 800 µl 1 x PBS-Lösung aufgetragen und schabte die Zellen mittels Zellschaber vom Schalenboden vorsichtig ab. Die erhaltene Suspension wurde mit einer Pipette in die zweite Schale übertragen, um dort ebenfalls die Zellen abzutragen. In dieser Weise wurde verfahren, bis alle Zellen aus den fünf Schalen abgelöst waren. Nach Verbringen der so erhaltenen Suspension in ein steriles Eppendorf-Gefäß wurden die Schalen nacheinander mit weiteren 800 µl 1 x PBS-Lösung gespült. Die so gewonnene Suspension wurde ebenfalls in das Eppendorf-Gefäß überführt und für drei Minuten bei 3500 xg zentrifugiert. Anschließend konnte der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet zur RNA-Isolierung weiter verwendet werden.

Zur Proteinextraktion aus den Zellen, deren Proteine anschließend in der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) aufgetrennt und dann später teilweise im Western Blot (siehe Kap. 3.8) analysiert werden sollten, wurde zur Zellmembranlyse auf jede Schale 400 µl Lysis-Puffer aufgetragen und die Schalen für zehn Minuten auf das Rüttelbrett bei Raumtemperatur verbracht.

Lysis-Puffer:

Tris/HCl	50	mmol/l
SDS	2	% (wt/vol)
Mercaptopropandiol	2	% (wt/vol)
Natrium-ortho-Vanadat	1	mmol/l

pH 6,7

Zur Lyse von Nukleinsäuren wurde auf den Schalen 100 IE Benzonase aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 5 min wurden die abgelösten Zellen vom Schalenboden abgeschabt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Diese Suspension wurde mit 2 x Laemmli-Puffer versetzt und zur endgültigen Proteindenaturierung für fünf Minuten auf 95°C im Thermoblock erhitzt.

2x Laemmli-Puffer:

Tris/HCl (pH 6,8)	0,5	mol/l
Glycerin	25	%(vol/vol)
SDS (10 %)	4	%(wt/vol)
Mercaptopropandiol	1	%(vol/vol)
Bromphenolblau	0,1	%(wt/vol)

Das Glycerin des Laemmli-Puffers bewirkt, daß die Probe im Probenslot absinkt, wodurch das Beladen des SDS-PAGE-Gels erleichtert wird. Bromphenolblau diente nur als Marker um den späteren Verlauf der Lauffront zu kontrollieren, da es vergleichbar mit Proteinen von 5 kD Molekulargewicht wanderte. Eine Interaktion mit den Proben findet nicht statt. Die so aufbereiteten Proben konnten unmittelbar für die Gelelektrophorese weiterverwendet oder bei -80° C tiefgefroren und gelagert werden.

3.5 Berauchung der Ratten mit Zigarettenrauch

3.5.1 Versuchstiere und Versuchsgruppen

Die Berauchung wurde mit männlichen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und normotensiven Ratten der Wistar-Kyoto-Linie (WKY) im Phillip Morris Research Laboratory (PMRL), Brüssel (Belgien) durchgeführt. Die Ratten wurden im Alter von 8 Wochen durch das PMRL zugekauft (Charles River; Versuchsreihe 1: Italien, Versuchsreihe 2: Deutschland) und dort bis zum Versuchsende gehalten.

Die erste Versuchsreihe bestand aus insgesamt 60 SHR, wobei diese in drei Untergruppen von jeweils 20 Tieren (10 Raucher und 10 Nichtraucher = Kontrollen) unterteilt wurden. Die erste Untergruppe wurde 30 Tage beraucht, die zweite 60 Tage und die dritte 90 Tage.

Aus der ersten Versuchsreihe standen für die hier geschilderten Versuche jeweils 5 linke und rechte Ventrikel zur Verfügung. Es wurden die Ventrikel der 30 und 90 Tage lang inhalierenden SHR zur RNA-Analyse verwendet, während die Ventrikel der 60 Tage lang inhalierenden SHR zur Protein-Extraktion mit nachfolgendem Western Blot eingesetzt wurden. Die übrigen 5 rechten und linken Ventrikel aus jeder Gruppe wurden von Mitarbeitern des PMRL histologisch untersucht. Diese histologische Untersuchung steht nicht im thematischen Zusammenhang mit den hier geschilderten Versuchen. Die RNA-Analyse erfolgte aus den Herzen der 30- und 90-Tage-Tiere, da man dort eine größere Diskrepanz der Werte vermutete, als zwischen 30 und 60 Tagen oder 60 und 90 Tagen. Damit verblieb genug Material der 60-Tage-Tiere um aus ihren Herzen Proteine zu isolieren. Außerdem stellt die RNA-Analyse verglichen mit dem Western Blot eine bessere Quantifizierung der Expression der hier untersuchten Marker dar, zumal im Sinne der hier überprüften Hypothese die zeitlichen Veränderungen der Expression wesentlich sind. Dies stellte auf der Grundlage des zur Verfügung stehenden Probenmaterials den bestmöglichen Kompromiss dar. Weiterhin standen von je 5 der 90 Tage lang inhalierenden Tiere die Aorten für die RNA-Analyse zur Verfügung.

Aus der zweiten Versuchsreihe standen die Ventrikel aller 8 Tiere je Gruppe für die RNA-Analyse zur Verfügung.

Folgende Basalwerte der Tiere der ersten Versuchsreihe wurden mittels Langendorff-Perfusion durch einen Mitarbeiter des Physiologischen Institutes der JLU Giessen in Brüssel erhoben:

Untersuchte Parameter	Berauchungs-Zeitraum (T)	Raucher	Kontrolle
Herzfrequenz (Herzschläge/min)	30	170 ± 60	204 ± 49
	60	228 ± 44	183 ± 32
	90	224 ± 36	203 ± 28
LVDP (mm Hg)	30	*103,0 ± 14,0	87,0 ± 12,0
	60	*104,7 ± 13,5	85,7 ± 14,7
	90	*103,2 ± 9,8	76,4 ± 12,9
Herzfrequenz x LVDP (mm Hg/min)	30	17654 ± 6412	17962 ± 4331
	60	*24049 ± 5687	15959 ± 3911
	90	*23225 ± 5143	15636 ± 3626
CR (mm Hg/mg x ml)	30	*7,63 ± 1,91	8,26 ± 1,34
	60	*7,86 ± 1,14	8,45 ± 0,97
	90	#8,53 ± 1,55	8,62 ± 0,74

Tab. 1: Durchschnittliche Basalwerte der Tiere der ersten Versuchsreihe

Es wurden an den Herzen aller Versuchstiere der ersten Versuchsreihe die Herzfrequenz, der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) (= Differenz zwischen maximalem systolischen Blutdruck und diastolischen Blutdruck), das Produkt aus Herzfrequenz und LVDP und der koronare Gefäßwiderstand (CR) ermittelt. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$, zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle wurden mit * gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$, zwischen den Werten von 30, 60 oder 90 Tage inhalierenden Tieren wurden mit # gekennzeichnet.

Die zweite Versuchsreihe erstreckte sich über einen Zeitraum von 90 Tagen bei der fünf Untergruppen mit jeweils acht Tieren verwendet wurden. Drei Untergruppen bestanden aus SHR und zwei Untergruppen aus normotensiven Ratten der Linie Wistar-Kyoto (WKY). Die Gruppen wurden wie folgt eingeteilt: Gruppe 1 und 2 waren Kontrollen mit SHR (1) und WKY (2), Gruppe 3 und 4 waren Raucher mit SHR (3) und WKY (4) und Gruppe 5 bestand aus Raucher mit SHR die nach 30 Tagen nicht mehr beraucht wurden (Recovery) bis zum Ende des Versuches (Tag 90).

Folgende Basalwerte der Tiere der zweiten Versuchsreihe wurden mittels Langendorff-Perfusion durch einen Mitarbeiter des Physiologischen Institutes der JLU Giessen in Brüssel erhoben:

Untersuchte Parameter	Raucher (WKY)	Kontrollen (WKY)	Raucher (SHR)	Kontrollen (SHR)	Recovery (SHR)
Herzfrequenz (Herzschläge/min)	191 ± 24	199 ± 21	184 ± 31	182 ± 38	203 ± 24
LVDP (mm Hg)	68,8 ± 12,4	71,0 ± 11,0	*120,0 ± 16,7	71,8 ± 18,7	91,5 ± 20,3
Herzfrequenz x LVDP (mm Hg/min)	13182 ± 3125	14039 ± 1968	*22131 ± 5144	12852 ± 3462	16255 ± 4132
CR (mm Hg/mgxml)	*2,56 ± 1,02	3,17 ± 0,56	*2,49 ± 0,45	3,72 ± 0,60	*2,74 ± 0,60

Tab. 2: Durchschnittliche Basalwerte der Tiere der zweiten Versuchsreihe

Es wurden an den Herzen aller Versuchstiere der ersten Versuchsreihe die Herzfrequenz, der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) (= Differenz zwischen maximalem systolischem Blutdruck und diastolischem Blutdruck), das Produkt aus Herzfrequenz und LVDP und der koronare Gefäßwiderstand (CR) ermittelt. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$, zwischen den Werten von Raucher und Kontrolle wurden mit * gekennzeichnet.

3.5.2 Durchführung der Berauchung

Bei der Berauchung wurden die Tiere 5 Tage in der Woche für zweieinhalb Stunden in eine Versuchsvorrichtung (Abb. 3.2) verbracht. Nach einer Stunde Berauchung wurde eine Berauchungspause von einer halben Stunde eingelegt und anschließend eine weitere Stunde beraucht. Während die „Raucher“ (smoker) mit Zigaretten-Hauptstromrauch von standardisierten Zigaretten (University of Kentucky Reference Cigarette 2R4F 450 μg total particulate matter/l) durch ein spezielles Gerät (Abb. 3.1) nasal beraucht wurden, atmeten die Tiere der Kontrollgruppe (non-smokers = control) in einem entsprechenden Gerät wie die Raucher unbehandelte Frischluft ein.



Abb. 3.1: Zigarettenrauch-Erzeuger

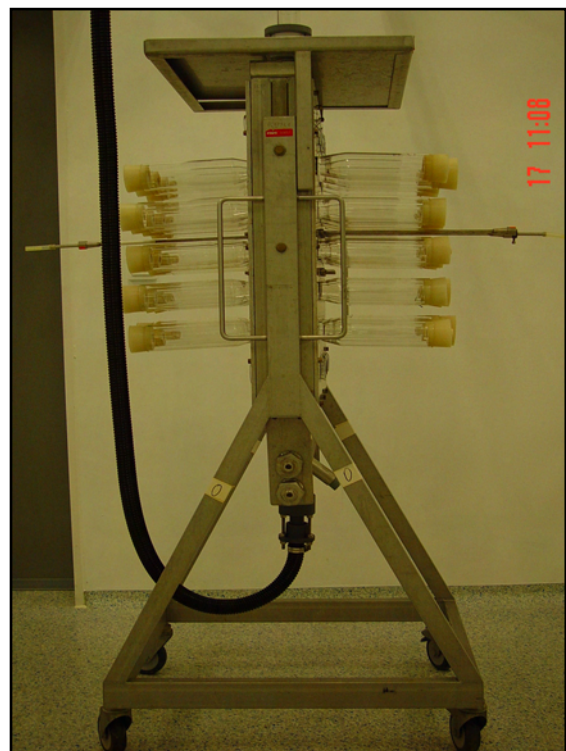


Abb. 3.2: Rauchinhalator

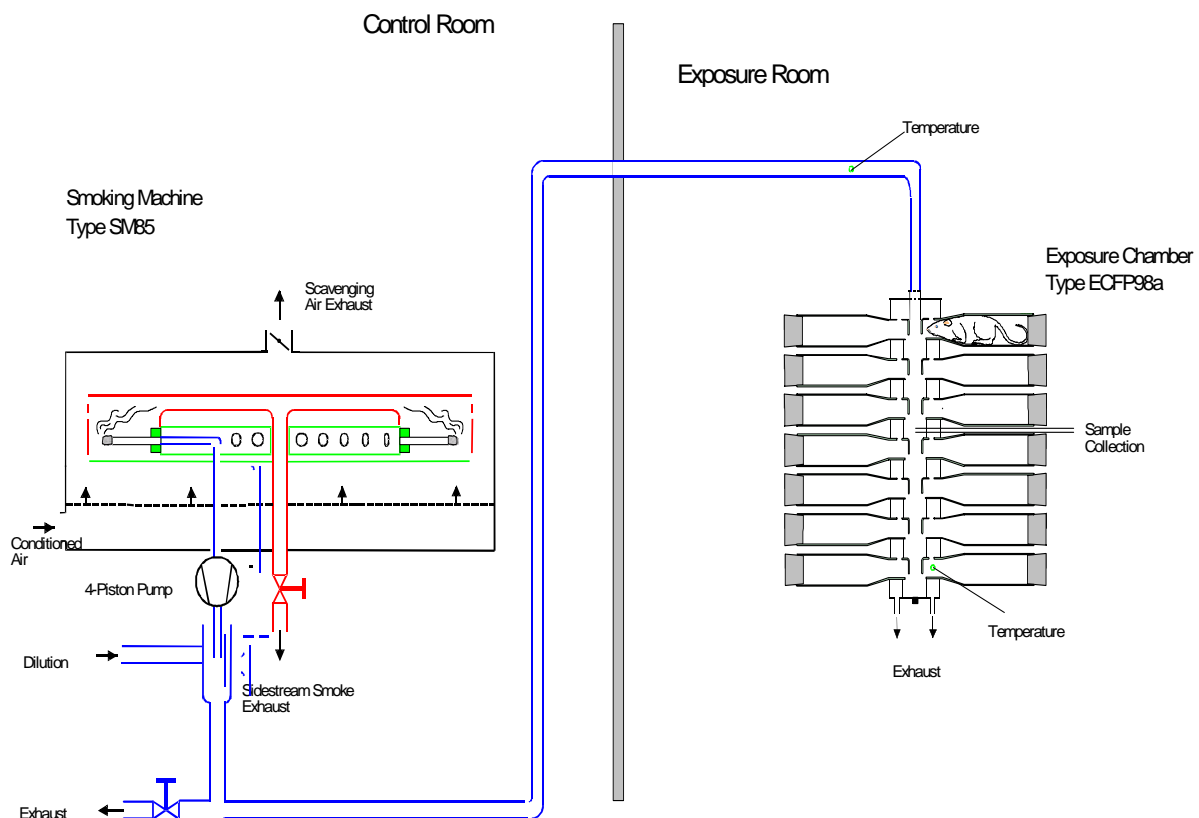


Abb. 3.3: Versuchsaufbau der Rauchinhalation

Dargestellt ist der Versuchsaufbau der Rauchinhalation von Ratten im PMRL, Brüssel (Belgien). Im Kontrollraum (Control Room) wurde Zigarettenrauch im Zigarettenrauch-Erzeuger (Smoking Machine) hergestellt. Dabei wurde durch Luftpumpen (4-Piston Pump) Hauptstromrauch aus den Zigaretten angesaugt um „Aktiv-Rauchen“ zu simulieren. Der dabei entstandene Rauch wurde nun in den Inhalationsraum (Exposure Room) durch ein Rohrsystem direkt in den Rauchinhalator (Exposure Chamber) geleitet. Der durch das Glimmen der Zigaretten spitze entstandene Nebenstromrauch (Sidestream Smoke) wurde extern abgeleitet. Zusätzlich wurde ständig klimatisierte Luft (Conditioned Air) in den Zigarettenrauch-Erzeuger eingeleitet. Im Rauchinhalator wurde in jede Kammer ein Tier verbracht, welche dann den Rauch zugeleitet bekamen. Die Ausatemluft (Exhaust) wurde extern abgeführt. Während der Inhalation wurden die Rauchttemperatur, die Kammertemperatur und die Zusammensetzung des Rauches überwacht.

Nach dem jeweiligen Berauchungszeitraum (30, 60 oder 90 Tage) wurden die Tiere betäubt und das Herz für die Perfusion nach Langendorff entnommen (Ergebnisse siehe Tab. 1 und 2). Anschließend wurden die rechten und linken Ventrikel der Herzen jeweils einzeln in Eppendorff-Gefäße bei -20°C eingefroren und zur weiteren

Untersuchung in das Physiologische Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen verbracht.

Dort wurden die Herzen bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -80°C tiefgefroren. In der ersten Versuchsreihe wurde aus den Herzen der 30- und 90-Tage-Tiere RNA isoliert und in der real-time PCR quantitativ evaluiert. Aus den Herzen der 60-Tage-Tiere wurden Proteine isoliert und mit Hilfe des Western Blot Verfahrens analysiert.

3.6 Real-time PCR im iCycler[®]

3.6.1 Präparative RNA-Isolierung aus adulten Rattenherzen

Zu Beginn der RNA-Isolierung wurden die rechten und linken Ventrikel der tiefgefrorenen (-80°C) Rattenherzen der 30 und 90 Tage lang berauchten Tiere mit je ca. 10 ml flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser möglichst fein zerrieben. Das so aufbereitete Gewebe wurde in einen Glasmörser überführt und mit TRIzol[®]-Reagenz homogenisiert (rechter Ventrikel mit 3 ml; linker Ventrikel mit 8 ml). Die so gewonnene Zellsuspension wurde in Portionen von je 1 ml auf Eppendorfgefäße verteilt, mit je 100 μl Chloroform versetzt, durchmischt und anschließend bei 4°C und 12.000 xg für 15 min zentrifugiert. Es wurden 450 μl des klaren Überstandes mit der darin enthaltenen RNA abpipettiert. Das verbleibende Homogenat, das in seiner unteren Schicht DNA und in der oberen Schicht Proteine enthielt, wurde verworfen. Die RNA-haltige Fraktion wurde mit je 450 μl Isopropanol versetzt, und die RNA wurde innerhalb von mindestens 20 Minuten bei -20°C im Gefrierschrank ausgefällt. Anschließend konnte die ausgefällte RNA durch Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 12.000 xg und anschließendem Dekantieren des Überstandes als Pellet gewonnen werden. Das Pellet wurde durch Resuspension in 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach abschließender Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 12.000 xg wurde das Ethanol dekantiert und das Pellet getrocknet. Zur weiteren Verwendung wurde das Pellet in 20 μl sterilem aqua bidest. gelöst. Um eine qualitativ hochwertige RNA-Isolierung zu gewährleisten, mussten alle Arbeitsschritte auf Eis und mit sterilen, UV-bestrahlten Eppendorfgefäßen durchgeführt werden. Ebenso maßgeblich war das Tragen von Handschuhen, um eine Kontamination der Proben zu vermeiden und die Zerstörung der RNA durch hautanhaftende Enzyme zu verhindern.

3.6.2 RNA-Isolierung aus Kardiomyozyten und Endothelzellen

Die RNA-Isolierung aus Kardiomyozyten und Endothelzellen erfolgte nach der Zellernte (siehe Kapitel 3.4). Das dabei erhaltene Zellpellet wurde im Eppendorf-Gefäß mit 1 ml TRIzol[®]-Reagenz überschichtet und mittels Vortex-Mischer homogenisiert. Die weitere Vorgehensweise erfolgte analog der RNA-Isolierung aus Rattenherzen, wie unter 3.6.1 beschrieben.

3.6.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach der RNA-Isolierung aus Rattenherzen, Kardiomyozyten und Endothelzellen der Zellkulturen erfolgte die quantitative Bestimmung des RNA-Gehaltes der gewonnenen Proben mit Hilfe eines Spectrophotometers (Ultrospec[®]). Dazu wurden 3 µl des RNA-Extraktes in 1 ml aqua bidest. aufgenommen und bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm photometrisch gemessen. Im optimalen Fall einer möglichst reinen RNA-Suspension lag das errechnete Verhältnis der Extinktionswerte beider Wellenlängen (ratio) zwischen 1,8 und 2,1.

Für die anschließende cDNA-Synthese wurde je 1 µg RNA benötigt. Mit Hilfe der im Photometer bestimmten RNA-Konzentration in 3 µl der Probe ließ sich die erforderliche Verdünnung nach folgender Formel errechnen:

$$x \mu\text{l} = 3 \mu\text{l} / \text{Konzentration der RNA}$$

3.6.4 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Bei der Reversen Transkription wurde mRNA als Matrize für die Synthese einer komplementären DNA (cDNA) verwendet. Es wurde je 1 µg mRNA in sterilem aqua bidest. gelöst, bis ein Gesamtvolumen von 5 µl pro Probenansatz erreicht wurde.

$$x \mu\text{l der Probe mit } 1 \mu\text{g mRNA} + \text{aqua bidest. ad } 5 \mu\text{l}$$

Diese Lösung wurde bei 60°C für 15 Minuten im Thermocycler denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Es wurden 5 µl Reaktionsmix zu jeder Probe pipettiert.

Reaktionsmix / Probe:

5x RT-Buffer	2	µl
oligo-dT	1	µl (0,1 mg/ml)
dNTP´s	1	µl (10 mmol/l je Nukleotid)
Dithiotreitol (DTT)	0,5	µl (0,1 mol/l)
RNAsin	0,2	µl (25 U/µl)
M-MLV-Reverse Transkriptase	0,3	µl (200 U/µl)

Die Reverse Transkription erfolgte im Thermocycler bei 37°C und dauerte eine Stunde. Anschließend wurde die gebildete cDNA bei 95°C fünf Minuten lang denaturiert und konnte nun sofort weiterverwendet oder bei -20°C tiefgefroren werden.

3.6.5 Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (real-time PCR)

3.6.5.1 Einführung in die Methode

Die real-time PCR oder auch quantitative Echtzeit-PCR stellt eine Weiterentwicklung der PCR-Methode durch Kary Mullis (Mullis *et al.*, 1986) dar und ist die zurzeit modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Den Grundstein dafür legten Higuchi und Mitarbeiter (Higuchi *et al.*, 1993), als sie einen Thermocycler mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera ausstatteten und dem PCR-Ansatz direkt Ethidiumbromid beigaben, welches nach dem Einbau in doppelsträngige DNA durch Anregung mit UV-Licht fluoreszierte.

Beim herkömmlichen PCR-Verfahren lässt sich nur eine semiquantitative Messung bzw. Bestimmung der Endprodukte durchführen. Die real-time PCR ermöglicht es jedoch Fluoreszenzsignale bereits während oder nach jedem Zyklus zu messen und lässt somit auch Aussagen über die anfänglich vorhandene DNA-Menge zu indem sie eine Kombination von Reaktionsablauf und Datenanalyse zulässt. Die größten Vorteile dieser Methode liegen in ihrer hohen Sensitivität, Spezifität, Nachweisgeschwindigkeit und Reproduzierbarkeit, die eine absolute und korrekte Quantifizierung zulassen.

Die Wellenlänge betrug bei dem hier verwendeten interkalierenden Farbstoff SYBR®Green I 490 nm und die Emission 530 nm. Der verwendete iCycler® der Firma

Bio-Rad war mit einer ventilatorgekühlten 50W Wolfram-Halogen-Lampe ausgestattet, sowie mit verschiedenen Anregungs- und Emissionsfiltern und einer CCD-Kamera.

3.6.5.2 Durchführung der Methode

Als Template für die PCR-Primer diente die hergestellte cDNA, wie unter Punkt 3.6.3 beschrieben, welche für die Untersuchung 1:10 mit aqua bidest. verdünnt wurde. Um auf einen Standard Bezug nehmen zu können, wurde die Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) als Housekeeping-Gen gewählt, da sie keinerlei Regulierung auf die Induktion zeigt.

Primerauswahl

Die Primer wurden so gewählt, dass ihre Sequenz komplementär zur Zielsequenz für die Codierung des gesuchten Proteines (cDNA) des Versuchstieres (hier: Ratte) ist. Dies wurde über das Internetprogramm BLAST verglichen. Das entstehende Produkt sollte nicht länger als 200 bp sein. Weiterhin sollten die eingesetzten Primer eine Länge zwischen 18 bis 30 Basen, einen G/C-Gehalt von 20 - 80% und eine Schmelztemperatur von ca. 60°C aufweisen. Die hier verwendeten Primersequenzen wurden den nachfolgend aufgeführten Literaturhinweisen entnommen.

Primer:

ANF (Flynn, 1987)	ATG GGC TCC TCC TCC ATC AC	(fw-Primer)
	TCT TCG GTA CCG GAA GCT G	(rev-Primer)
HPRT (Ross <i>et al.</i> , 2005)	CCA GCG TCG TGA TTA GTG AT	(fw-Primer)
	CAA GTC TTT CAG TCC TGT CC	(rev-Primer)
ODC (Wen <i>et al.</i> , 1989)	GAA GAT GAG TCA AAC GAG CA	(fw-Primer)
	AGT AGA TGT TTG GCC TCT GG	(rev-Primer)
PTHrP (Southby <i>et al.</i> , 1995)	CGG TGT TCC TGC TGA GCT A	(fw-Primer)
	TGC GAT CAG ATG GTG AAG GA	(rev-Primer)
TGF- β_1 (Qian <i>et al.</i> , 1990)	AAT ACG TCA GAC ATT CGG GAA	(fw-Primer)
	GTG GAG TAC ATT ATC TTT GCT	(rev-Primer)

Real time RT-PCR-Ansatz

Es wurde für die real time RT-PCR eine vorgefertigte Reaktionsmischung (Supermix[®]) der Firma Bio-Rad verwendet, um Pipettierfehler und Kontaminationsgefahren zu vermeiden und den Arbeitsaufwand gering zu halten. Dieser Supermix[®] enthielt bereits alle wichtigen Ingredienzien in den benötigten Konzentrationen. Es wurden die Primer, aqua bidest. und die verdünnte cDNA-Lösung (DNA-Template) hinzugefügt.

PCR-Reaktionsansatz je Probe:

iQ™ SYBR® Green Supermix	10	μl
fw-Primer	0,3	μl (100 μmol/l)
rev-Primer	0,3	μl (100 μmol/l)
aqua bidest.	6,4	μl
DNA-Template (1:10)	<u>3</u>	<u>μl</u>
	Σ = 20	μl/Probe

Es wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Laufkontrolle galt der Reaktionsansatz ohne Template. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei max. 4°C.

PCR-Laufprogramme

Die DNA-Synthese erfolgt in drei Schritten: Denaturierung, Hybridisierung (Annealing) und Synthese (Amplifikation). Jeder Zyklus besteht somit aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C, in dem die beiden DNA-Stränge voneinander getrennt werden, einem Hybridisierungsschritt, in dem die beiden Primer an den jeweils komplementären Strang binden und einem Syntheseschritt, während dem der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt mit Hilfe der DNA-Polymerase und der im Reaktionsmix vorhandenen Desoxyribonukleotide selektiv synthetisiert wird. In jedem PCR-Zyklus sollte sich demnach die Menge der spezifischen DNA-Abschnitte verdoppeln, und somit die DNA-Menge mit der gewünschten Zielsequenz während der PCR-Reaktion exponentiell zunehmen. Es erfolgte eine Programmierung des iCyclers®, bei der die verschiedenen Schritte der PCR mit den unterschiedlichen Temperaturen festgelegt wurden. Da jeder Primer eine spezifische Annealingtemperatur hat, musste dies in der Programmierung berücksichtigt werden.

Zyklus 1: (1x)

Step 1: 95°C für 3 min

Zyklus 2: (45x)

Step 1: (Denaturierung) 95°C für 30 sek

Step 2: (Annealing) x °C für 30 sek

Step 3: (Amplifikation) 72°C für 30 sek

Schmelzvorgang: Temperatursteigerung in 0,5°C-Schritten bis 100°C

Zyklus 3: (100x)

Step 1: 50°C für 10 sek

Annealingtemperaturen:

ANF 58°C

HPRT 63°C

ODC 58°C

PTHrP 55°C

TGF-β₁ 53°C

Für die Primer veränderte sich bei der real-time PCR nicht spezifisch die Zyklenzahl zur Amplifikation, da die Reaktion mit einem Schmelzvorgang endete, in der eventuelle Primer-Dimere etc. anhand der Schmelztemperatur in einer grafischen Schmelzkurve identifiziert werden konnten.

Auswertung der real time RT-PCR

Die Auswertung erfolgte nach der von Pfaffl (2001) beschriebenen Methode. Diese ermöglicht es, die relative Expression eines Gens im Vergleich zu einem Referenz-Gen, hier dem Housekeeping-Gen HPRT, zu kalkulieren. Da von jeder Probe in jedem PCR-Lauf eine Doppelbestimmung erfolgte, wurden jeweils die Mittelwerte der C_T-Werte (Zykluszahl in dem die Fluoreszenz den Threshold schneidet) bestimmt. Anschließend wurde der ΔC_T-Wert aus der Differenz zwischen der Probe und dem Standard (HPRT) berechnet.

$$\Delta C_T\text{-Wert} = C_T\text{-Wert (Gen)} - C_T\text{-Wert (Standard)}$$

Bei den Untersuchungen wurden jeweils die ΔC_T -Werte der Kontrollgruppen (nicht gerauchte Ratten, unbehandelte Kulturen) von denen der Untersuchungsgruppe subtrahiert.

$$\Delta C_T - C\Delta C_T = \text{Mittelwert } \Delta C_T(C) - \text{Mittelwert } \Delta C_T(\text{Untersuchungsgruppe})$$

Zur Berechnung der relativen Expression wurden die Ergebnisse in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{relative Expression} = 2^{-(\Delta C_T - C\Delta C_T)}$$

3.7 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese wurde hier zur Überprüfung der Produkte aus der real-time PCR verwendet. Dabei wurden die PCR-Amplifikate aus der real-time PCR in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer nach jedem Lauf mit 1 μ l Ladepuffer versetzt und auf ein natives zweiprozentiges Agarose-Gel aufgetragen. Der optimale Trennbereich dieses Gels liegt zwischen 50 bp und 600 bp.

Ladepuffer :

10x TAE-Puffer	x	ml
Saccharose	50	% (wt/vol)
Bromphenolblau	1	% (wt/vol)
Xylencyanol	1	% (wt/vol)

10x TAE-Puffer :

Tris-Acetat	40	mmol/l
EDTA	1	mmol/l

Die Gel-Lösung wurde zunächst in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht, so dass eine klare und homogene Lösung entstand. Anschließend wurde der Lösung Ethidiumbromid zugegeben, sie wurde gut durchmischt und in eine Gelkammer gegossen. Nach ca. 30 min Polymerisation konnte der Probenaschenkamm gezogen und das Gel mit den Proben beladen werden. Zur Zuordnung der

Fragmentgröße der zu untersuchenden Proben wurde ein DNA-Längenmarker (PBR 322, geschnitten mit der Restriktions-Endonuklease MSP I) ebenfalls auf das Gel aufgetragen.

Agarose-Gel-Lösung :

1x TAE-Puffer	75	ml
Agarose	1,5	g
Ethidiumbromid	3	µl

Die Gelelektrophorese fand bei einer konstanten Stromstärke von 75 mA statt. Die Amplifikate konnten anschließend unter UV-Beleuchtung (312 nm) betrachtet und fotografisch festgehalten werden. Dabei fluoreszierte der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid violett.

3.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Gesamtproteinextrakt der Herzen wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) in Abhängigkeit von der Proteingröße im elektrischen Feld aufgetrennt.

3.8.1 Proteingewinnung aus adulten Rattenherzen

Um aus ganzen Rattenherzen Proteine zu gewinnen, wurden die Herzen der 60 Tage lang berauchten Tiere in Lysatpuffer zuerst mit Hilfe eines Feinhomogenisators (Ultra-Turrax[®]) zerkleinert.

Anschließend erfolgte eine weitere Homogenisierung der Zellsuspension in einem Glasmörser. Danach wurde die Suspension bei 1200 xg bei 4°C für zehn Minuten zentrifugiert.

Lysat-Puffer (SDS-PAGE):

Cacodylsäure	10	mmol/l
NaCl	150	mmol/l
CaCl ₂	20	mmol/l
Natriumazid	1,5	mmol/l
ZnCl ₂	1	µmol/l
TritonX100	0,01	% (wt/vol)

pH 5,0

Der so gewonnene Überstand wurde mit einer Mikropipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt und je 100 µl entnommen und mit 20 µl 2 x Laemmli-Puffer versetzt. Weiterhin wurde mit dem Proteinextrakt so verfahren, wie unter 3.4 beschrieben.

3.8.2 Aufbau der Kammer und Durchführung der Gelelektrophorese

Nach dem Zusammenbau der in den Versuchen verwendeten Gelkammer wurde in den entstandenen Raum zwischen den Glasplatten Trenngel (12,5%ig) eingegossen und mit aqua bidest. überschichtet, um eine Polymerisation unter Luftausschluß zu gewährleisten. Nach ca. einer Stunde war die Polymerisation bei Raumtemperatur abgeschlossen und nach Dekantieren des Wassers konnte der Zwischenraum mit Sammelgel (5%ig) bis zur vollen Höhe aufgefüllt werden. Unmittelbar danach wurde der Platzhalterkamm für die Probenaschen in die noch flüssige Lösung eingesetzt. Nach ca. 20 Minuten war auch das Sammelgel auspolymerisiert. Das Glasplatten-Gel-Element wurde mit einem Laufpufferaufsatz versehen, aus dem Ständer entfernt und in die Kammer eingesetzt. Die Kammer wurde mit Laufpuffer befüllt, wobei das Gel mit der unteren und oberen Kante Kontakt zum Laufpuffer hatte. Das Gel wurde mit jeweils 25 µl Probenlösung (siehe Kapitel 3.8.1) pro Probenasche beladen. Ein Molekulargewichtsmarker mit einem Spektrum zwischen 250 kD und 10 kD wurde zur Orientierung eingesetzt. Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit einer Stromspannung von 200 V für vier Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

4x Trenngelpuffer:

Tris/HCl	1,5	mol/l
pH 8,6		

Trenngel (12,5 %):

AA/BAA (30:1)	11,25	ml
Trenngelpuffer	6,7	ml
Aqua bidest.	9,0	ml
SDS (10 %)	270	µl
Tetramethylethyldiamin	22,5	µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	180	µl

Sammelgelpuffer:

Tris/HCl	0,5	mol/l
pH 6,8		

Laufpuffer (SDS-PAGE):

Glycin	1,44	% (wt/vol)
Tris/HCl	0,3	% (wt/vol)
SDS	0,1	% (wt/vol)

Sammelgel (5 %):

AA/BAA (30:1)	1,2	ml
Sammelgelpuffer	2,5	ml
Aqua bidest.	6,4	ml
SDS (10 %)	50	µl
Tetramethylethyldiamin	12	µl
Ammoniumpersulfat (10 %)	100	µl

Die Angaben für das Trenn- bzw. Sammelgel beziehen sich jeweils auf die benötigten Mengen für die Herstellung eines Gels.

3.8.3 Western-Blot-Verfahren

Die in der Gelelektrophorese, wie unter 3.8.2 beschrieben, nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden im „Semi Dry Blotting-Verfahren“ elektrophoretisch nach der Methode von Kyhse-Andersen (1984) auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membranen transferiert. Dabei wurde das den Proteinen anhaftende SDS wieder ausgewaschen, um eine Renaturierung der Proteine zu ermöglichen. Hierfür wurden zwischen Anode und Kathode der Blotkammer in „Sandwich“-Form folgende Materialien in dieser Reihenfolge luftblasenfrei aufgeschichtet: drei in konzentriertem Anodenpuffer getränkte Filterpapiere, drei in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere, die mit 100 %igem Methanol benetzte PVDF-Membran, das PAGE-Gel und abschließend drei in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Auf diese Schichten wurde die Kathode aufgesetzt. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ (entspricht 90 mA pro Gel) für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Konzentrierter Anodenpuffer:

Tris/HCl	300	mmol/l
Methanol	20	% (vol/vol)
	pH 10,4	

Anodenpuffer:

Tris/HCl	30	mmol/l
Methanol	20	% (vol/vol)
	pH 10,4	

Kathodenpuffer:

Tris/HCl	25	mmol/l
6-Aminohexansäure	40	mmol/l
Methanol	20	% (vol/vol)
	pH 9,4	

3.8.4 Immunologischer Nachweis von ANF

Nach dem elektrophoretischen Transfer der Proteine auf die Blotmembran wurden dort die noch freien Bindungsstellen mittels Bovinem Serumalbumin (BSA) geblockt. BSA ist ein für die Antikörper nicht erkennbares Protein und sättigt die freien Proteinbindungsstellen auf der Membran ab. Die Inkubation erfolgte in 1 x TBS mit 2 %iger BSA-Konzentration für eine Stunde auf einem Schüttler

10x TBS-Puffer:

Tris/HCl	10	mmol/l
NaCl	150	mmol/l
	pH 7,4	

Danach wurde zehn Minuten mit 1 x TBS gewaschen und es erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem ersten Antikörper, welcher in einer Verdünnung von 1:1000 aufgetragen wurde.

Antikörperlösung:

Tris/HCl	50	mmol/l
NaCl	150	mmol/l
Tween 20	0,05	% (vol/vol)
BSA	2	% (wt/vol)
	pH 7,4	

Nach Entfernung der Erstantikörper-Lösung wurde wiederum für zehn Minuten mit 1 x TBS, welches mit 0,1 % (vol/vol) Triton X-100 versetzt war, gewaschen. Hierdurch wurden ungebundene Antikörper entfernt. Es folgte die zweistündige Inkubation mit der Zweit-Antikörperlösung (Verdünnung 1:1000, Kopplung an Alkalische Phosphatase), um die Antigen-Antikörper-Komplexe zu markieren. Anschließend wurde eine letzte Waschung mit TBS, versetzt mit 0,5 % (vol/vol) Triton X-100, durchgeführt und danach die Blotmembran für weitere zehn Minuten in Alkalische Phosphatase-Puffer äquilibriert.

Alkalische Phosphatase-Puffer:

Tris/HCl	100	mmol/l
NaCl	10	mmol/l
MgCl ₂	5	mmol/l

pH 9,5

Durch Zugabe einer sogenannten Entwicklerlösung wurden die von dem ersten Antikörper detektierten und vom Zweitantikörper markierten Proteine sichtbar gemacht. Die Alkalische Phosphatase, welche an den zweiten Antikörper gekoppelt war, dient dabei als Katalysator für die Dephosphorylierung von 5-Brom-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) bei gleichzeitiger Reduktion von Nitro Blue Tetrazolium (NBT). Das dabei entstehende ein schwerlösliche blaviolette Präzipitat markiert die Antigen-Antikörper-Komplexe. Diese Entwicklerreaktion wurde nach deutlicher Farbausprägung durch Abspülen mit aqua bidest. beendet und die Membran getrocknet.

Entwicklerlösung:

Alkalische Phosphatase-Puffer	50	ml
Nitro Blue Tetrazolium	15	mg
Brom-Chloro-Indolyl-Phosphat	7	mg

Für den Nachweis von ANF wurde ein polyklonaler Antikörper verwendet, der aus Kaninchenserum gewonnen wurde. Der Zweitantikörper richtete sich gegen Kaninchen-IgG.

Antikörper:

Antikörperlösung	45	ml
Antikörper	45	µl

3.8.5 Immunologischer Nachweis von TGF-β₁

Der immunologische Nachweis von TGF-β₁ erfolgte sinngemäß wie unter 3.8.4 für ANF beschrieben. Allerdings wurde zum Nachweis von TGF-β₁ ein monoklonaler IgG₁-Antikörper verwendet (Verdünnung 1:1000). Dieser Klon 9016.2 wurde aus

Mäusezellen gewonnen, der Zweitantikörper (Verdünnung 1:1000, Kopplung an Alkalische Phosphatase) richtete sich gegen Mäuse-IgG.

3.8.6 Immunologischer Nachweis von PTHrP

Der immunologische Nachweis von PTHrP erfolgte ebenfalls sinngemäß wie unter 3.8.4 für ANF beschrieben. Hierfür wurde jedoch ein spezifischer Erstantikörper (Verdünnung 1:1000) gegen PTHrP verwendet, welcher aus Kaninchenserum hergestellt worden war. Der Zweitantikörper (Verdünnung 1:1000, Kopplung an Alkalische Phosphatase) wurde aus Ziegenserum gewonnen und richtete sich gegen Kaninchen-IgG.

3.8.7 Auswertung

Nach dem Trocknen wurden die Blotmembranen eingescannt und mit Hilfe des Computerprogramms Image Quant[®] quantitativ ausgewertet. Die jeweilige Signalstärke der Proteine wurde densitometrisch ermittelt. Zur Ermittlung der jeweiligen Protein-Expression der Probe wurde die Menge des nachgewiesenen Proteins mit dem in der Probe enthaltenen Aktin verglichen.

3.9 Statistik

Die Ergebnisse der einzelnen Experimente wurden als Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten angegeben und der Median ermittelt. Statistische Differenzen wurden mittels einer einseitigen Varianzanalyse mit nachfolgendem Student-Neumann-Keuls-Test als post-hoc-Analyse mit dem Programm SPSS[®] berechnet. Als statistisch signifikant galten Differenzen mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluss subchronischer Rauchexposition auf die Progression der Myokardhypertrophie spontan hypertensiver Ratten

4.1.1 Entwicklung der Myokardhypertrophie

a) Entwicklung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht

Als erstes Maß für die Entwicklung einer Herzhypertrophie wurde das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht der Tiere erhoben. Dafür wurden die Tiere vor der Herzentnahme gewogen und dann später das Gewicht des isolierten Herzens bestimmt. Nach 30 Tagen war bei den gerauchten Tieren das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht signifikant höher als bei den ungerauchten Tieren, und dies blieb im weiteren Versuchsverlauf stabil (Abb. 4.1). Das absolute Herzgewicht von Raucher und Kontrolle ließ keine Unterschiede erkennen (Abb. 4.2), jedoch war das absolute Körpergewicht der gerauchten Tiere signifikant geringer als das der jeweiligen Kontrolltiere (Abb. 4.3).

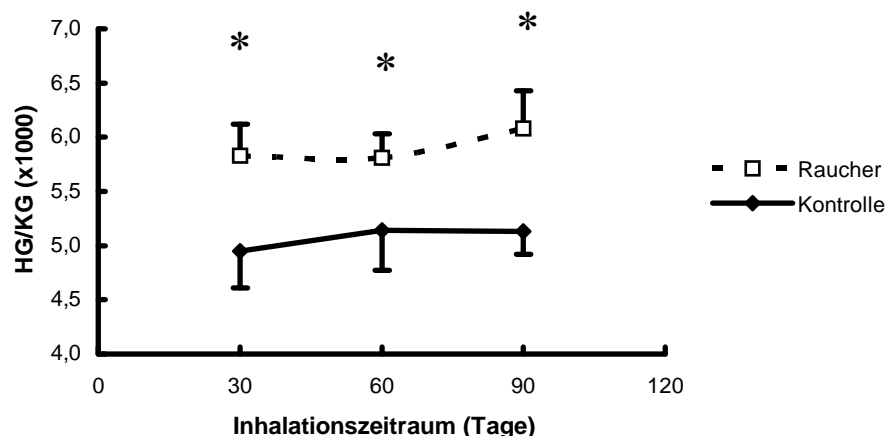


Abb.4.1: Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht nach 30, 60 und 90 Tagen

Dargestellt ist das Herzgewicht (HG) zu Körpergewicht (KG)-Verhältnis spontan hypertensiver Tiere nach 30, 60 und 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=10$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, wurden mit * gekennzeichnet.

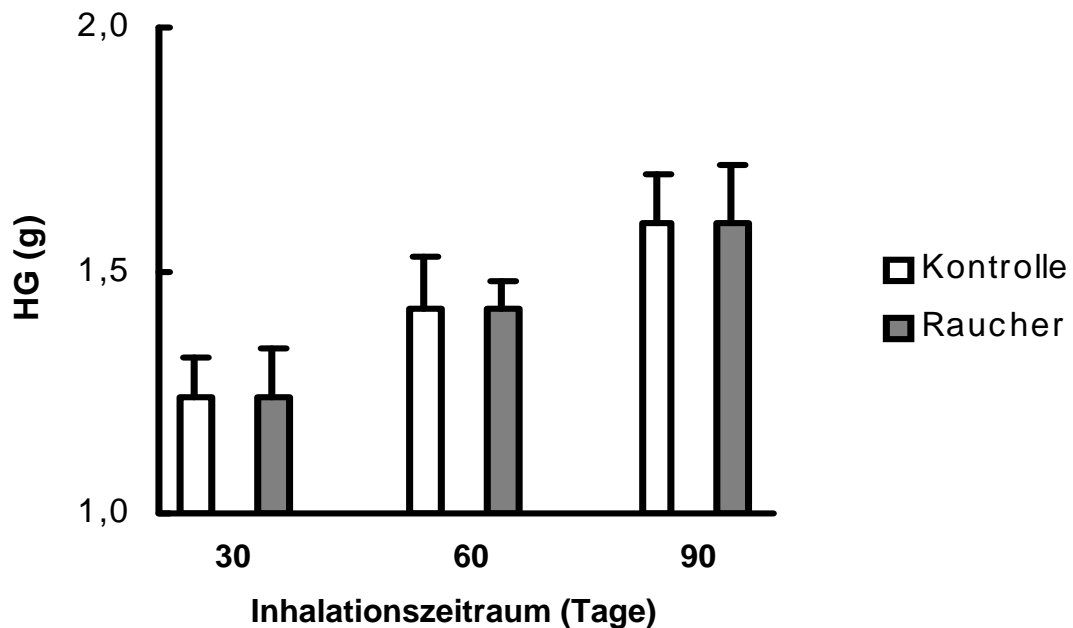


Abb. 4.2: **Durchschnittliches Herzgewicht der Tiere nach 30, 60 und 90 Tagen**

Dargestellt ist das durchschnittliche Herzgewicht (HG) spontan hypertensiver Tiere in Gramm (g) nach 30, 60, und 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je n=10 Tieren.

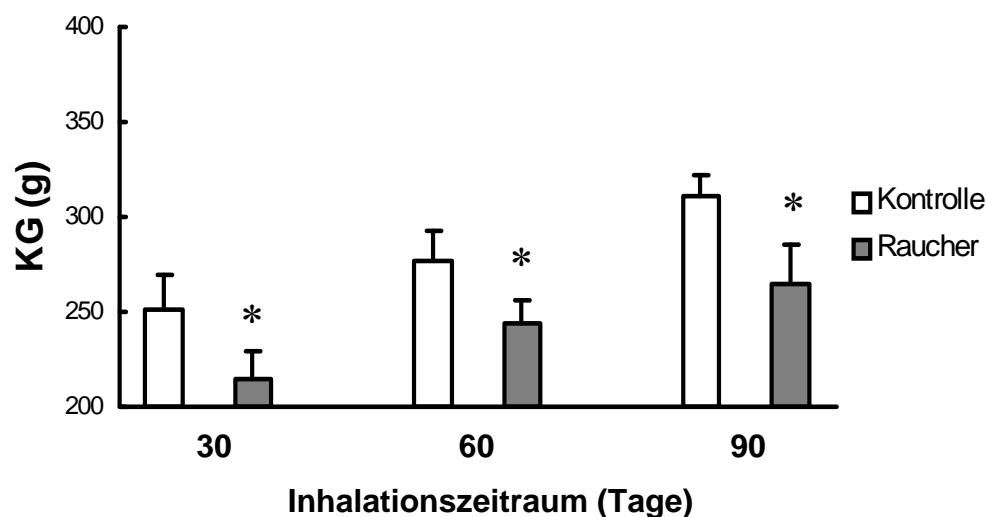


Abb. 4.3: **Durchschnittliches Körpergewicht der Tiere nach 30, 60 und 90 Tagen**

Dargestellt ist das durchschnittliche Körpergewicht (KG) spontan hypertensiver Tiere in Gramm (g) nach 30, 60, und 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je n=10 Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, wurden mit * gekennzeichnet.

b) Einfluss von subchronischer Rauchexposition auf einen molekularen Marker der Myokardhypertrophie (ANF)

Da das zuvor beschriebene Herzgewicht zu Körpergewicht-Verhältnis offen ließ, ob die berauchten Tiere tatsächlich eine stärkere Myokardhypertrophie entwickelten als die Kontrolltiere oder ob es sich nur um eine scheinbare Hypertrophie aufgrund des geringeren Körpergewichtes handelte, wurden weitere Parameter zur Feststellung einer Herzmuskelhypertrophie hinzugezogen. Als molekularer Marker für eine echte Myokardhypertrophie wird eine verstärkte ANF-Expression angesehen. Zur Darstellung der ANF-Expression sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene wurden die Herzen mittels real time RT-PCR und Western Blot analysiert. Zusätzlich wurden die amplifizierten Proben der RT-PCR mit Hilfe von Agarose-Gel darauf überprüft, ob ausschließlich das gesuchte Protein gebildet wurde.

Die ANF-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 4.4) war im linken Ventrikel der Raucher verglichen mit dem linken Ventrikel der Nichtraucher an den Tagen 30 und 90 der Berauchung signifikant erhöht. Weiterhin sah man eine signifikante Steigerung der ANF-Expression im linken Ventrikel bei den 90 Tage lang berauchten Tieren, verglichen mit dem linken Ventrikel der berauchten Tiere am Tag 30. Für den rechten Ventrikel der Raucher zeigte sich nach 30 Tagen eine höhere ANF-Expression als im rechten Ventrikel der Nichtraucher, jedoch nicht signifikant. Dieser Unterschied in der ANF-Expression zwischen den rechten Ventrikeln von Rauchern und Nichtrauchern ist nach 90 Tagen signifikant.

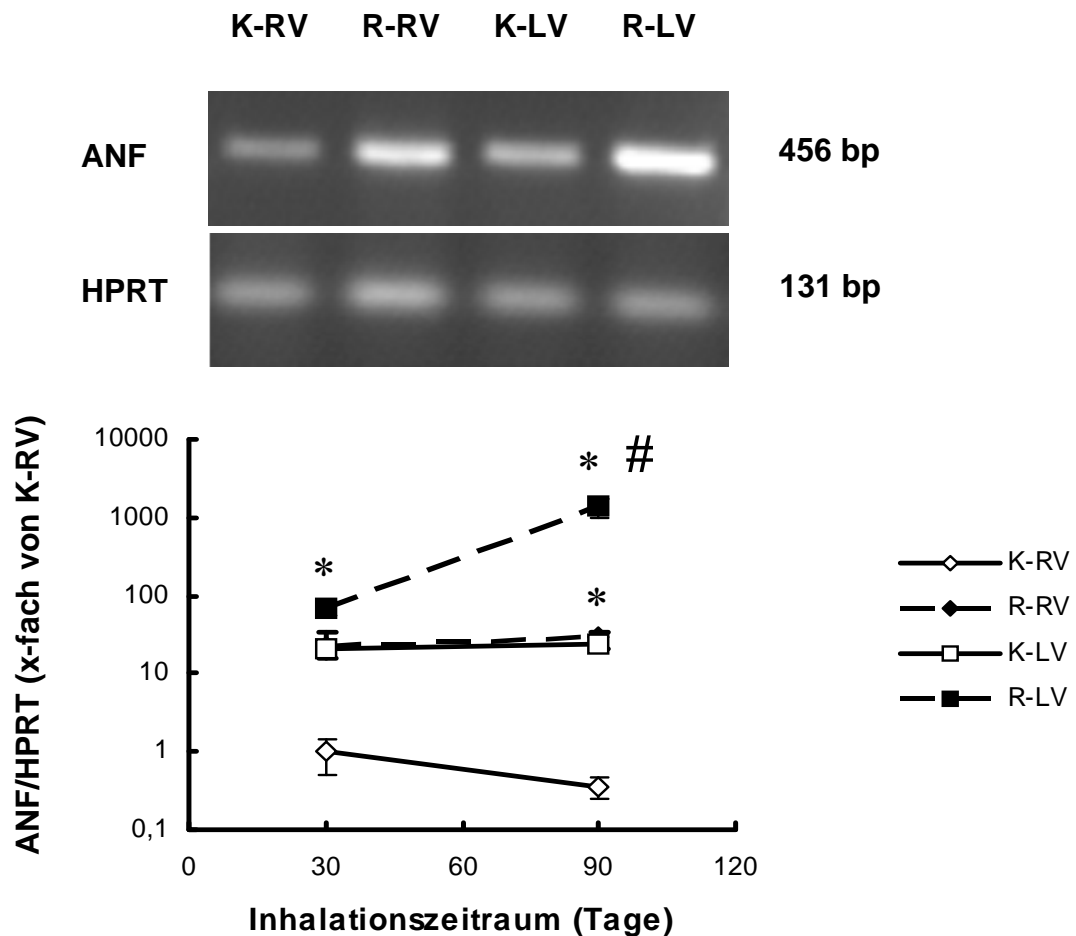


Abb. 4.4: **ANF-Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel nach 30 und 90 Tagen Inhalation**

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der ANF-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV) der Tiere ($n=5$) nach 30 und 90 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (R) bzw. Frischluft (K) dargestellt. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, wurden mit * gekennzeichnet und signifikante Unterschiede der Werte bezogen auf die Werte des jeweiligen Ventrikel am Tag 30 mit #.

Das darüber dargestellte Bild zeigt ein repräsentatives Agarose-Gel, welches mit den amplifizierten Proben aus der real time RT-PCR beladen wurde. Die Banden fluoreszierten durch das im Gel vorhandene Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung violett. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung und zur Normierung wurde neben der ANF-Expression auch die HPRT-Expression bestimmt. Die amplifizierte ANF mRNA hatte eine Größe von 456 Basenpaaren (bp), die von HPRT von 131 bp.

Die ANF-Expression auf Proteinebene (Abb. 4.5) war sowohl für den rechten wie auch für den linken Ventrikel der Raucher im Vergleich zum jeweiligen Ventrikel der Nichtraucher nach 60 Tagen Berauchung tendenziell, nicht jedoch statistisch signifikant erhöht.

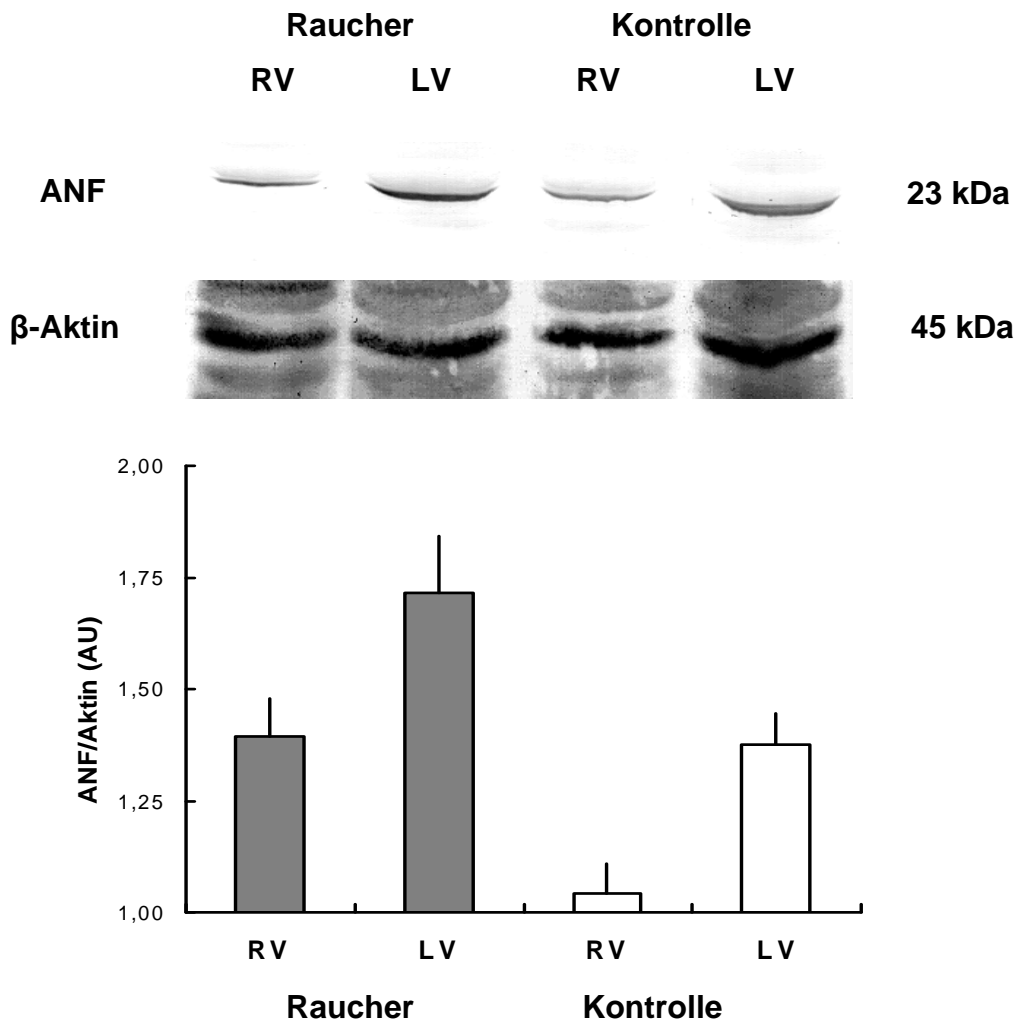


Abb.4.5: ANF-Expression auf Proteinebene der rechten und linken Ventrikel nach 60 Tagen Inhalation

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der ANF-Expression zur Aktin-Expression auf Proteinebene von rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV) der Tiere (n=5) nach 60 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle) dargestellt

Das darüber dargestellte Bild zeigt den Ausschnitt eines repräsentativen Western Blots. Die Proteinextrakte der Ventrikel wurden in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einem spezifischen ANF- bzw. β -Aktin-Antikörper behandelt. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung und zur Normierung wurde neben der ANF-Expression auch die β -Aktin-Expression bestimmt. Die ANF-Proteinbande lag auf Höhe von 23 kDa Molekulargewicht, die β -Aktin-Proteinbande auf Höhe von 45 kDa.

4.1.2 Phänotypische Veränderungen des hypertrophen Myokards

Bei länger andauerndem Bluthochdruck geht die kompensatorische Herzhypertrophie in eine dekompensatorische Hypertrophie über, die als Herzinsuffizienz bezeichnet werden kann. Dieser Vorgang geht mit einer erhöhten TGF- β_1 -Expression einher. Dadurch kann es zu einer veränderten β -Adrenorezeptor-Ankopplung kommen. Das bedeutet, dass die Signalwege des β -Adrenorezeptors an die Proteinbiosynthese gekoppelt werden, welche dann durch eine erhöhte ODC-Expression gekennzeichnet ist. Gleichzeitig wird durch TGF- β_1 die PTHrP-Expression herunterreguliert.

Im Folgenden wurde der Einfluss der Berauchung in der Veränderung der Expression dieser Marker auf mRNA-Ebene mittels real time RT-PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot bestimmt. Ein Agarose-Gel, welches mit den Proben nach Beenden der real time RT-PCR beladen wurde, zeigt die Amplifikation der erwünschten Produkte an.

a) Einfluss von subchronischer Rauchexposition auf die TGF- β_1 -Expression

Die Expression von TGF- β_1 auf mRNA-Ebene (Abb. 4.6) nahm sowohl bei den Rauchern als auch bei den Nichtrauchern im Zeitraum zwischen 30 und 90 Tagen Inhalation zu, wobei die Raucher für beide Ventrikel signifikant höhere Werte nach 30 Tagen zeigten, der Unterschied zur jeweiligen Kontrolle aber nach 90 Tagen geringer wurde. Als Bezugsgröße wurde die Expression im nicht druckbelasteten rechten Ventrikel der Kontrolltiere gewählt (K-RV). Bezogen auf diese Werte war die TGF- β_1 -Expression auf mRNA-Ebene im linken Ventrikel der Raucher (R-LV) nach 90 Tagen Inhalation um das 24-fache erhöht.

Im Western Blot waren nach einem Inhalationszeitraum von 60 Tagen keine signifikanten Unterschiede der TGF- β_1 -Expression auf Protein-Ebene zwischen Rauchern und Nichtrauchern zu beobachten (Abb. 4.7).

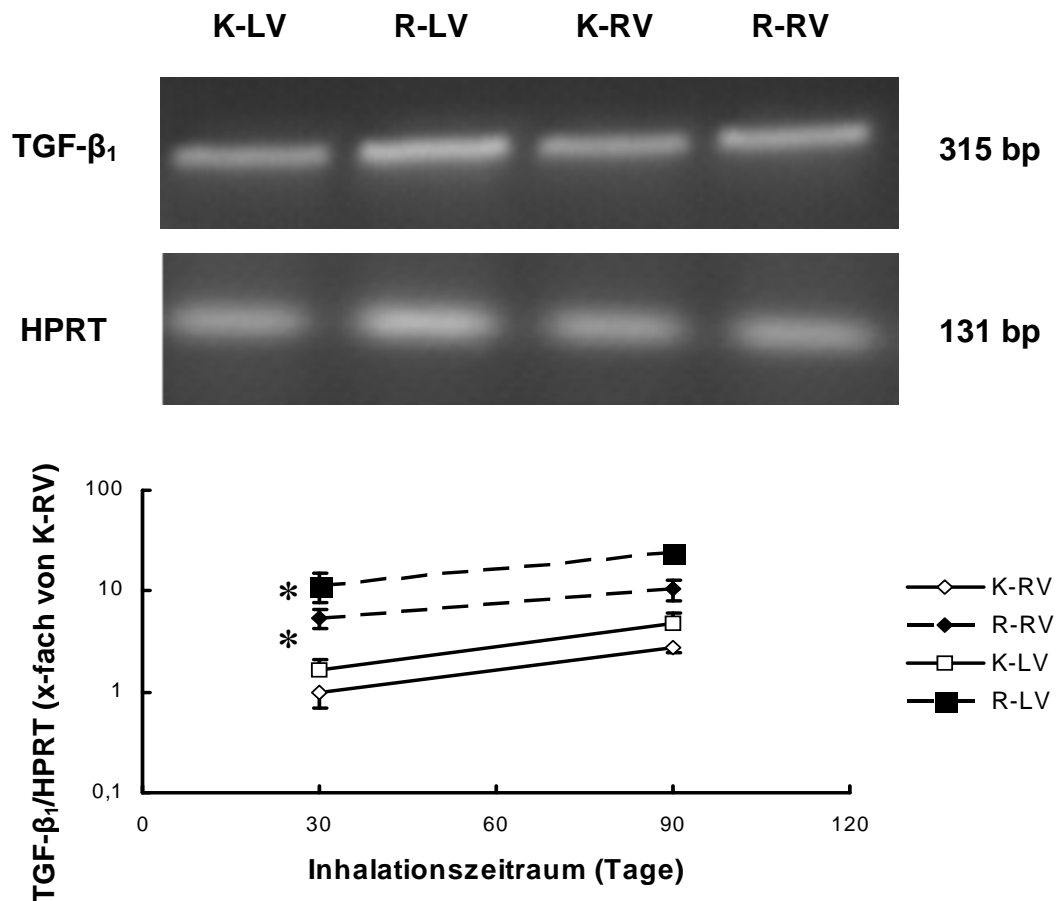


Abb.4.6: TGF- β_1 -Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel nach 30 und 90 Tagen Inhalation

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der TGF- β_1 -Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikel (LV) der Tiere ($n=5$) nach 30 und 90 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (R) bzw. Frischluft (K) dargestellt. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, wurden mit * gekennzeichnet.

Das darüber dargestellte Bild zeigt ein repräsentatives Agarose-Gel, welches mit den amplifizierten Proben aus der real time RT-PCR beladen wurde. Die Banden fluoreszierten durch das im Gel vorhandene Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung violett. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung und zur Normierung wurde neben der TGF- β_1 -Expression auch die HPRT-Expression bestimmt. Die amplifizierte TGF- β_1 -mRNA hatte eine Größe von 315 Basenpaaren (bp), die von HPRT von 131 bp.

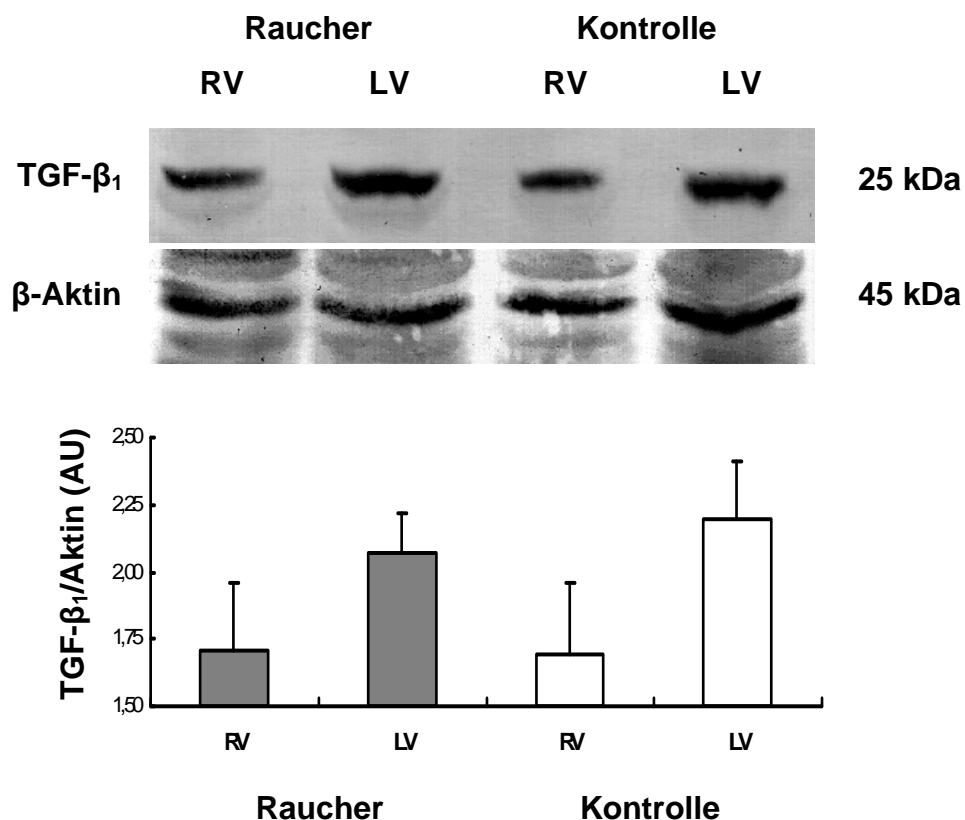


Abb.4.7: **TGF-β₁-Expression auf Proteinebene der rechten und linken Ventrikel nach 60 Tagen Inhalation**

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der TGF-β₁-Expression zur Aktin-Expression auf Proteinebene von rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV) der Tiere (n=5) nach 60 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle) dargestellt.

Das darüber dargestellte Bild zeigt den Ausschnitt eines repräsentativen Western Blots. Die Proteinextrakte der Ventrikel wurden in einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einem spezifischen TGF-β- bzw. β-Aktin-Antikörper behandelt. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung und zur Normierung wurde neben der TGF-β₁-Expression auch die β-Aktin-Expression bestimmt. Die TGF-β₁-Proteinbande lag auf Höhe von 25 kDa Molekulargewicht, die β-Aktin-Proteinbande auf Höhe von 45 kDa.

b) Einfluss von subchronischer Rauchexposition auf die ODC-Expression

Bei den 30 Tage lang gerauchten Tieren zeigte die ODC-Expression auf mRNA-Ebene ähnliche Werte wie bei den Kontrolltieren. Nach 90 Tagen Berauchung erhielt man jedoch sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel der Raucher signifikant höhere Werte als bei den jeweiligen Ventrikeln der Kontrolltiere. Nach 90 Tagen

Inhalation ergab sich darüber hinaus eine signifikante Steigerung der ODC-Expression im linken sowie im rechten Ventrikel der Raucher, verglichen mit den Werten dieser Ventrikel von Tag 30 (Abb. 4.8).

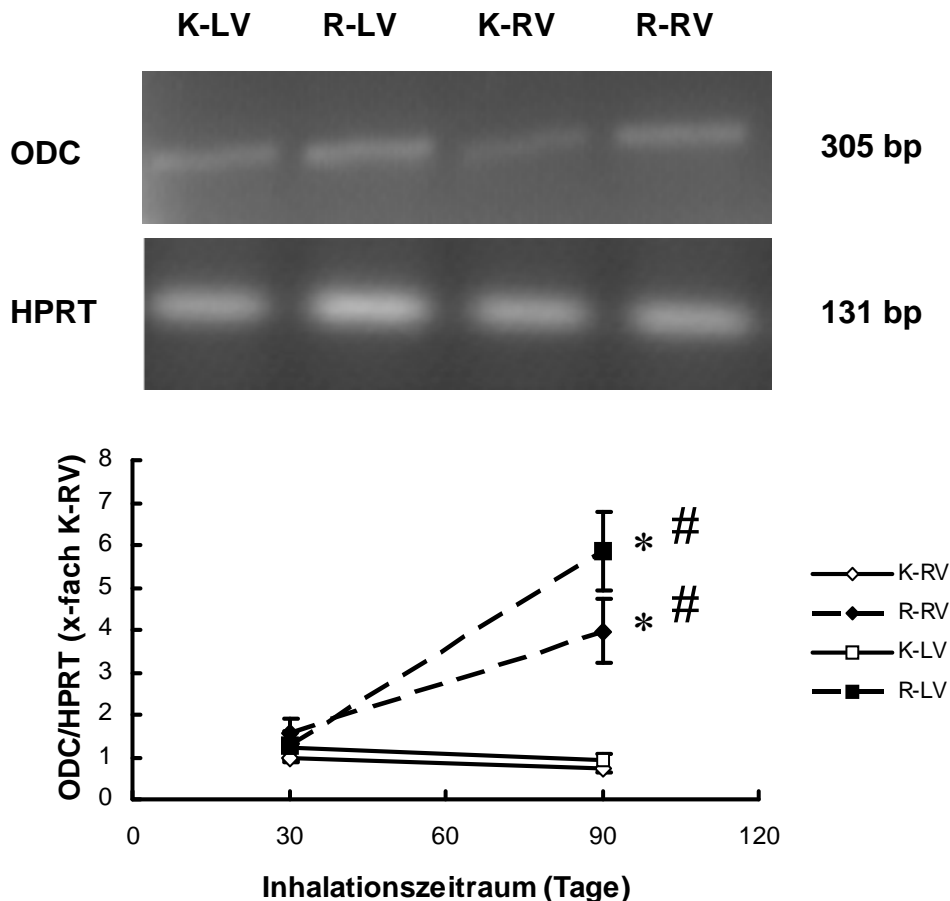


Abb.4.8: ODC-Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel nach 30 und 90 Tagen Inhalation

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der ODC-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV) der Tiere ($n=5$) nach 30 und 90 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (R) bzw. Frischluft (K) dargestellt. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, wurden mit * gekennzeichnet und signifikante Unterschiede der Werte von Tag 90 bezogen auf die Werte des jeweiligen Ventrikel am Tag 30 mit #.

Das darüber dargestellte Bild zeigt ein repräsentatives Agarose-Gel, welches mit den amplifizierten Proben aus der real time RT-PCR beladen wurde. Die Banden fluoreszierten durch das im Gel vorhandene Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung violett. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung und zur Normierung wurde neben der ODC-Expression auch die HPRT-Expression bestimmt. Die amplifizierte ODC-mRNA hatte eine Größe von 305 Basenpaaren (bp), die von HPRT von 131 bp.

c) Einfluss von subchronischer Rauchexposition auf die PTHrP -Expression

Der hier gemessene Verlauf der PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene ähnelt dem von ODC: nach 30 Tagen Berauchung zeigten die Raucher keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen, nach 90 Tagen ist jedoch eine signifikante Steigerung der PTHrP-Expression in beiden Ventrikeln der Raucher zu sehen. Außerdem ergab sich nach 90 Tagen Inhalation wie bei ODC eine signifikante Steigerung der PTHrP-Expression im linken sowie im rechten Ventrikel verglichen mit den Werten dieser Ventrikel von Tag 30 (Abb. 4.9).

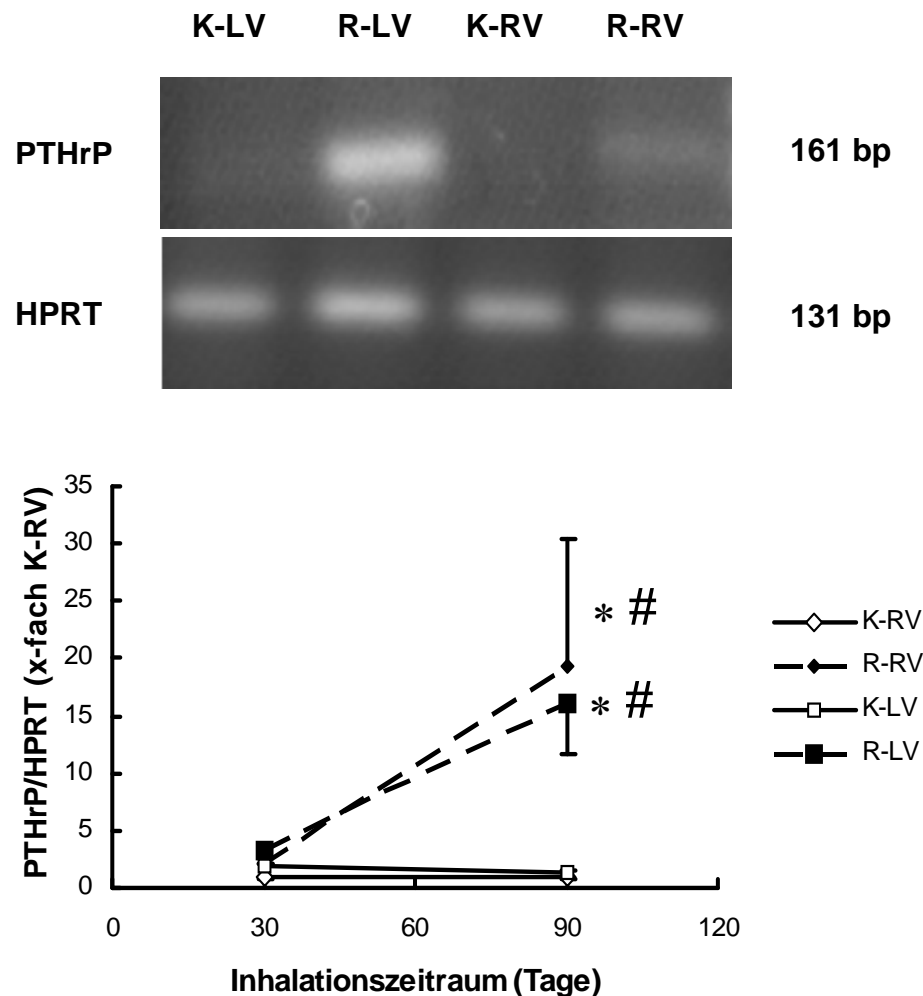


Abb.4.9: PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel nach 30 und 90 Tagen Inhalation

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der PTHrP-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikeln (LV) der Tiere ($n=5$) nach 30 und 90 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (R) bzw. Frischluft (K) dargestellt. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt, wurden mit * gekennzeichnet und signifikante Unterschiede der Werte von Tag 90 bezogen auf die Werte des jeweiligen Ventrikel am Tag 30 mit #.

Das darüber dargestellte Bild zeigt ein repräsentatives Agarose-Gel, welches mit den amplifizierten Proben aus der real time RT-PCR beladen wurde. Die Banden fluoreszierten durch das im Gel vorhandene Ethidiumbromid unter UV-Bestrahlung violett. Zum Nachweis gleichmäßiger Beladung und zur Normierung wurde neben der PTHrP-Expression auch die HPRT-Expression bestimmt. Die amplifizierte PTHrP-mRNA hatte eine Größe von 161 Basenpaaren (bp), die von HPRT von 131 bp.

4.1.3 Korrespondierende Expressionsveränderung in der Aorta

Um zu untersuchen, ob eine subchronische Rauchexposition sich auf die Expression von PTHrP vaskulärer Zellen auswirkt, wurden die Aorten der spontan hypertensiven Tieren nach 90 Tagen Inhalation auf die mRNA-Expression von PTHrP hin mittels real time RT-PCR untersucht.

Die Aorten der gerauchten Tiere zeigten eine signifikante Steigerung der PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den Aorten der Kontrolltiere (Abb. 4.10).

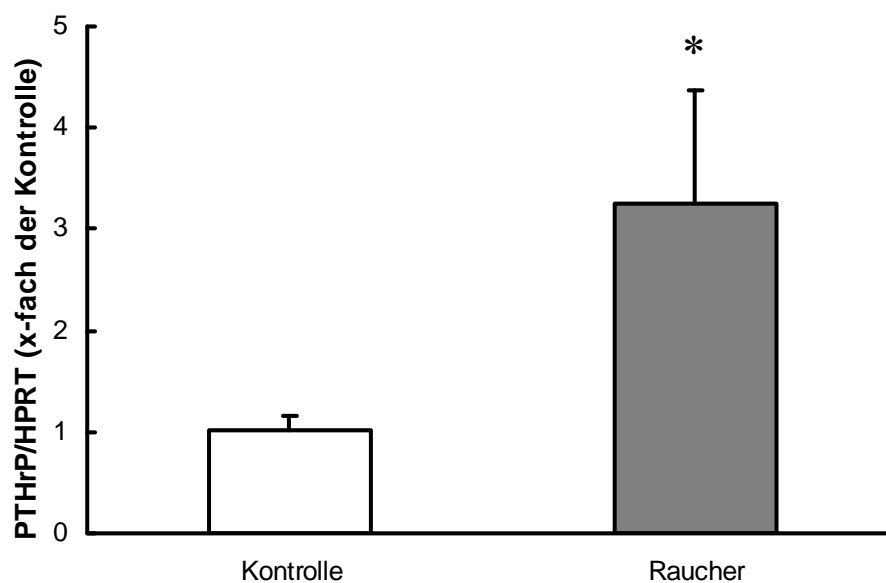


Abb. 4.10: **PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene in der Aorta nach 90 Tagen Inhalation**

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der PTHrP-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von den Aorten der Tiere ($n=5$) nach 90 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle) dargestellt. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

4.2 Einfluss von transienter subchronischer Rauchexposition auf die Progression der Myokardhypertrophie spontan hypertensiver Ratten

Da die bisherigen Versuche teilweise signifikante Unterschiede zwischen Rauchern und Kontrollen schon nach 30 Tagen Berauchung erkennen ließen, stellte sich die Frage, ob die entstandenen Anzeichen einer Herzmuskelhypertrophie irreversibel sind oder nur vorübergehend auftreten.

Dies wurde überprüft, indem spontan hypertensive Ratten 30 Tage lang beraucht wurden und dann 60 Tage lang bis zum Versuchende (90. Tag) nur noch Frischluft zugeführt bekamen (Entwöhnung). Um eine höchstmögliche Vergleichbarkeit zu erzielen wurden parallel dazu spontan hypertensive Ratten aus der gleichen Zucht 90 Tage lang beraucht (Raucher) und weitere wurden 90 Tage lang nur mit Frischluft behandelt (Kontrolle). Es wurden alle Parameter und Hypertrophie-Marker untersucht, wie bei den Tieren der ersten Versuchsreihe.

4.2.1 Entwicklung der Myokardhypertrophie

a) Entwicklung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht

Das Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht (Abb. 4.11) zeigte bei den Tieren der Entwöhnungsgruppe nach 90 Tagen keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrolltieren. Die 90 Tage lang berauchten Tiere wiesen jedoch im Vergleich zu den unberauchten Tieren und den Tieren der Entwöhnungsgruppe ein erhöhtes Herz- zu Körpergewicht-Verhältnis auf. Dabei hatten die Raucher bei vergleichbarem Körpergewicht (Abb. 4.13) ein signifikant höheres Herzgewicht (Abb. 4.12) als die Kontrolltiere. Die Tiere der Entwöhnungsgruppe zeigten eine signifikante Zunahme sowohl des Herzgewichts (Abb. 4.12) als auch des Körpergewichts (Abb. 4.13).

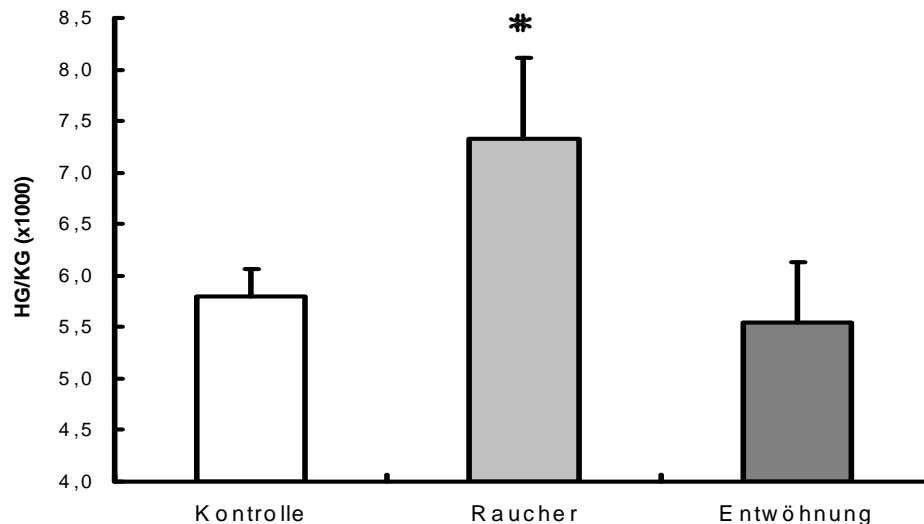


Abb. 4.11: **Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation**

Dargestellt ist das Herzgewicht- zu Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG) der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von Zigarettenrauch (Raucher), von Frischluft (Kontrolle) sowie nach 30 Tagen Inhalation von Zigarettenrauch und im Anschluss daran 60 Tagen Inhalation von Frischluft (Entwöhnung). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

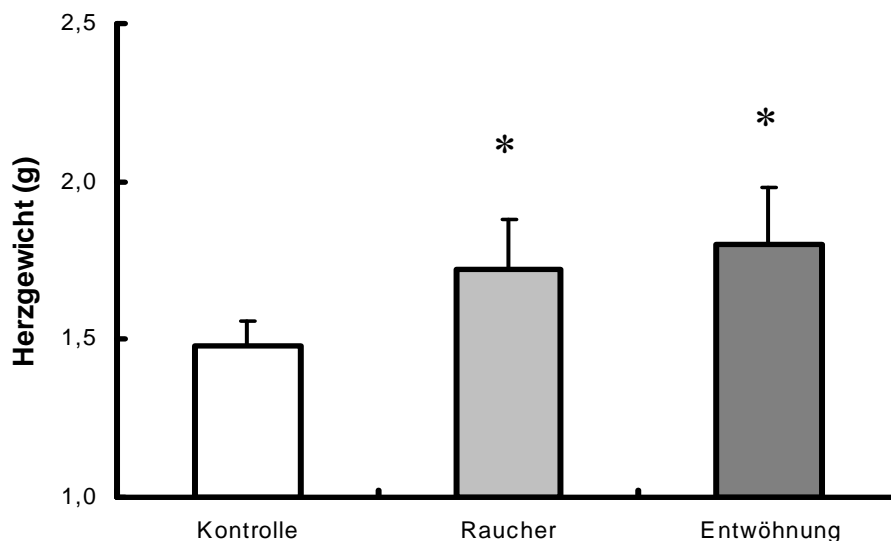


Abb. 4.12: **Durchschnittliches Herzgewicht der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation**

Dargestellt ist das durchschnittliche Herzgewicht (HG) der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von Zigarettenrauch (Raucher), von Frischluft (Kontrolle) sowie nach 30 Tagen Inhalation von Zigarettenrauch und im Anschluss daran 60 Tagen Inhalation von Frischluft (Entwöhnung). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

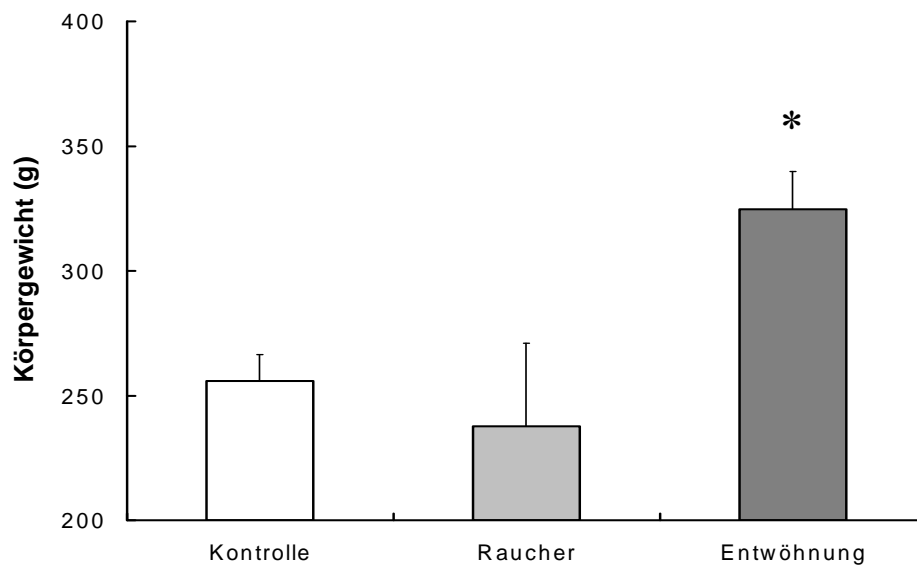


Abb. 4.13: Durchschnittliches Körpergewicht der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation

Dargestellt ist das durchschnittliche Körpergewicht (KG) der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von Zigarettenrauch (Raucher), von Frischluft (Kontrolle) sowie nach 30 Tagen Inhalation von Zigarettenrauch und im Anschluss daran 60 Tagen Inhalation von Frischluft (Entwöhnung). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

- b) Einfluss von transienter subchronischer Rauchexposition auf einen molekularen Marker der Myokardhypertrophie (ANF)

Die ventrikuläre ANF-Expression (Abb. 4.14) des linken Ventrikel der 90 Tage lang gerauchten Tiere zeigte eine signifikante Steigerung im Vergleich zum linken Ventrikel der Kontrolltiere. Die Entwöhnungsgruppe steigerte ihre ANF-Expression im linken Ventrikel verglichen mit dem linken Ventrikel der Kontrollgruppe ebenfalls, der Anstieg war jedoch aufgrund der breiten Streuung der Werte der entwöhnten Tiere nicht signifikant. Somit sind die Werte im Mittel zwar gegenüber den Kontrolltieren erhöht, aber geringer als die Werte der 90 Tage lang gerauchten Tiere.

Die ventrikuläre ANF-Expression des rechten Ventrikels wies weder in der Raucher- noch in der Entwöhnungsgruppe signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren auf.

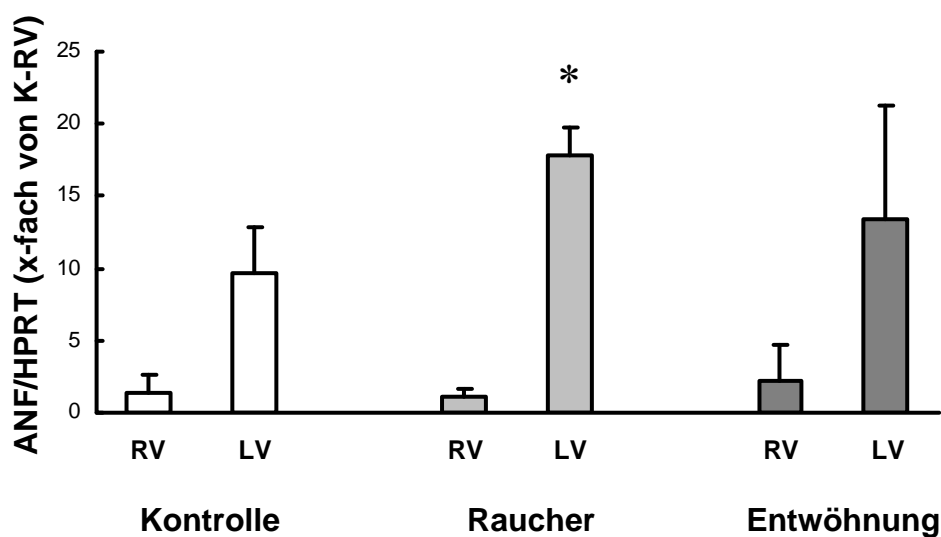


Abb. 4.14: **ANF-Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel nach 90 Tagen Inhalation**

Im Schaubild ist das Verhältnis der ANF-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikel (LV) der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher), von Frischluft (Kontrolle) sowie nach 30 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch und im Anschluss daran 60 Tagen Inhalation von Frischluft (Entwöhnung) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher bzw. Entwöhnung versus Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

4.2.2 Phänotypische Veränderungen des hypertrophen Myokards

a) Einfluss von transients subchronischer Rauchexposition auf die TGF- β_1 -Expression

Es konnten in den linken Ventrikeln der 90 Tage lang gerauchten Tieren sowie der Entwöhnungsgruppe eine signifikant niedrigere TGF- β_1 -Expression auf mRNA-Ebene gemessen werden als in den linken Ventrikeln der Kontrolltiere (Abb. 4.15). Die TGF- β_1 -Expression der rechten Ventrikel von Raucher- und Entwöhnungsgruppe zeigten im Vergleich zur Kontrolle keine Veränderung. Die TGF- β_1 -Expression war bei sämtlichen Gruppen im rechten Ventrikel höher als im linken.

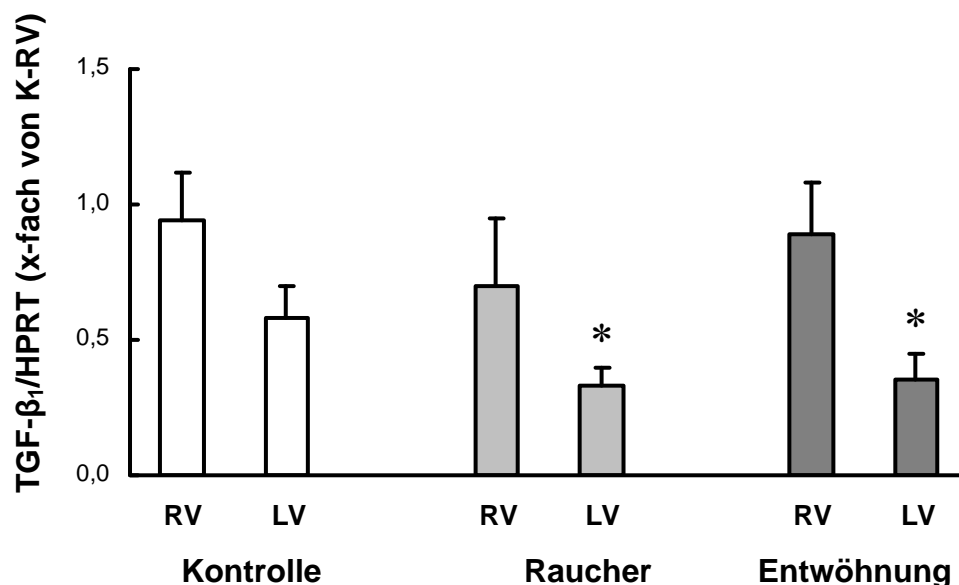


Abb. 4.15: TGF- β_1 -Expression auf mRNA-Ebene rechten und linken Ventrikel nach 90 Tagen Inhalation

Im Schaubild ist das Verhältnis der TGF- β_1 -Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikel (LV) der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher), von Frischluft (Kontrolle) sowie nach 30 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch und im Anschluss daran 60 Tagen Inhalation von Frischluft (Entwöhnung) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher bzw. Entwöhnung versus Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

b) Einfluss von transienter subchronischer Rauchexposition auf die ODC-Expression

Die ODC-Expression (Abb. 4.16) im jeweils linken Ventrikel von Rauchern- und Entwöhnungsgruppe zeigte keine Veränderung bezogen auf die Werte der Kontrollgruppe. Die Werte der jeweils rechten Ventrikel v.a. der Raucher, aber auch der Entwöhnungsgruppe, waren signifikant niedriger als die ODC-Expression der rechten Ventrikel der Kontrolle.

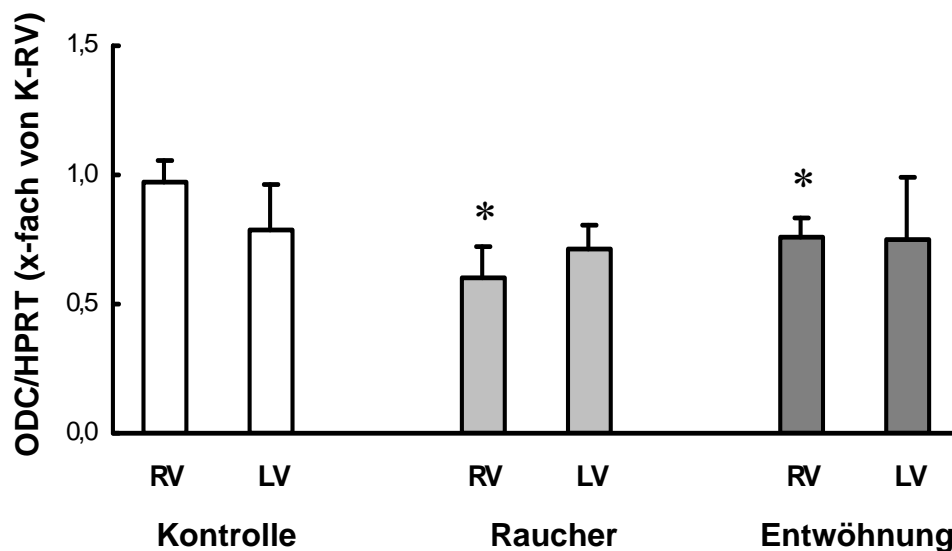


Abb. 4.16: **ODC-Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel nach 90 Tagen Inhalation**

Im Schaubild ist das Verhältnis der ODC-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikel (LV) der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher), von Frischluft (Kontrolle) sowie nach 30 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch und im Anschluss daran 60 Tagen Inhalation von Frischluft (Entwöhnung) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher bzw. Entwöhnung versus Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

c) Einfluss von transienter subchronischer Rauchexposition auf die PTHrP-Expression

Bei den 90 Tage lang gerauchten Tieren konnte im linken Ventrikel eine erhöhte PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 4.17) gemessen werden als bei den Kontrolltieren. Aufgrund der breiten Streuung ist diese Erhöhung jedoch nicht signifikant. Die Entwöhnungsgruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Steigerung der PTHrP-Expression im linken Ventrikel. Die rechten Ventrikel aller Gruppen zeigten keinerlei Veränderungen.

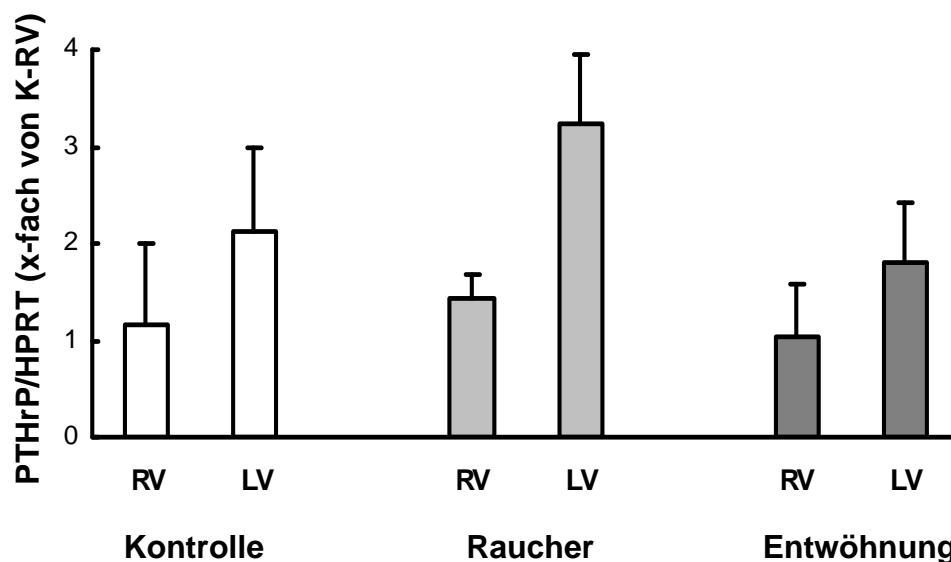


Abb. 4.17: **PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel nach 90 Tagen Inhalation**

Im Schaubild ist das Verhältnis der PTHrP-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikel (LV) der spontan hypertensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher), von Frischluft (Kontrolle) sowie nach 30 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch und im Anschluss daran 60 Tagen Inhalation von Frischluft (Entwöhnung) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je n=8 Tieren.

4.3 Einfluss subchronischer Rauchexposition auf die Progression der Myokardhypertrophie normotensiver Ratten

Da normotensive Ratten im Gegensatz zu spontan hypertensiven Ratten nicht automatisch eine Herzmuskelhypertrophie entwickeln, sollte untersucht werden inwieweit sich die Rauchexposition auf den Herzmuskel von nicht hochdruckbelasteten Herzen auswirkt. Dabei wurden normotensive Ratten 90 Tage lang dem gleichen Berauchungsschema ausgesetzt wie vorher die spontan hypertensiven Tiere. Gleichzeitig wurde einer normotensiven Kontrollgruppe 90 Tage lang Frischluft zugeführt. Es wurden alle Parameter und Hypertrophie-Marker untersucht wie bei den zuvor beschriebenen spontan hypertensiven Tieren.

4.3.1 Entwicklung der Myokardhypertrophie

a) Entwicklung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht

Das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht wurde bei den normotensiven Tieren auf die gleiche Weise bestimmt wie das der spontan hypertensiven Tiere in 4.1.1 a) beschrieben.

Nach 90 Tagen Berauchung zeigten die normotensiven Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Steigerung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht (Abb. 4.18). Dabei hatten sie bei gleichem Herzgewicht (Abb. 4.19) ein signifikant geringeres Körpergewicht (Abb. 4.20) als die Kontrolltiere.

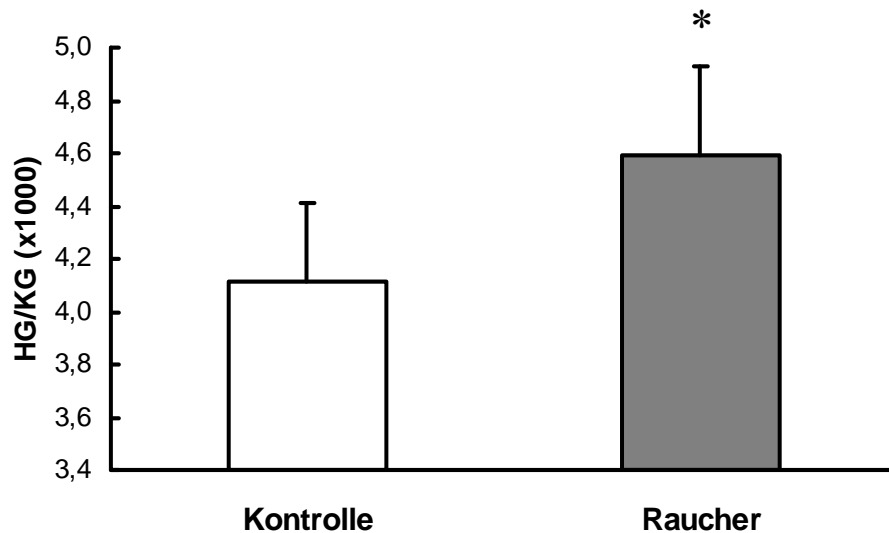


Abb.4.18: **Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation**

Dargestellt ist das Herzgewicht zu Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG) normotensiver Tiere nach 90 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je n=8 Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

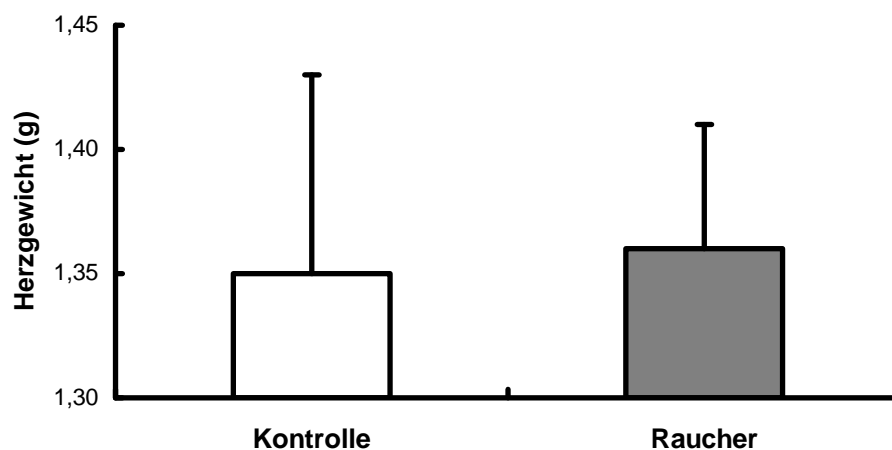


Abb. 4.19: **Durchschnittliches Herzgewicht der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation**

Dargestellt ist das durchschnittliche Herzgewicht normotensiver Tiere nach 90 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je n=8 Tieren.

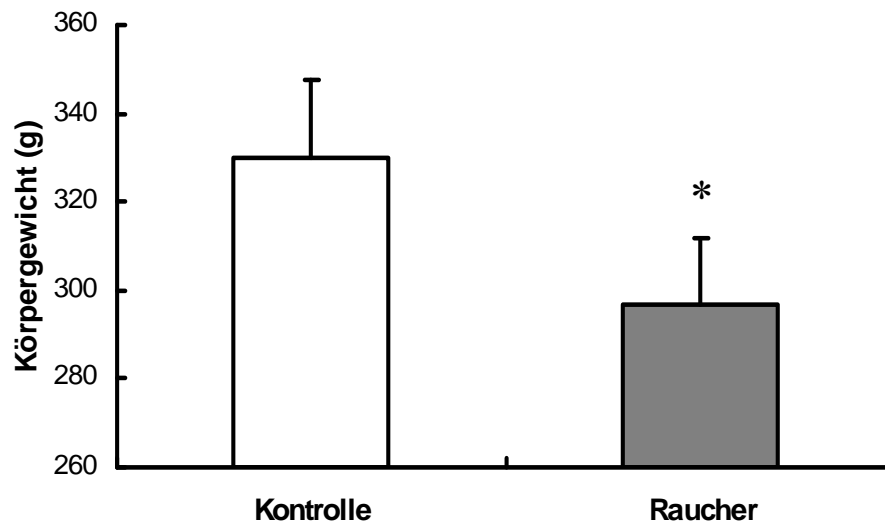


Abb. 4.20: **Durchschnittliches Körpergewicht der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation**

Dargestellt ist das durchschnittliche Körpergewicht normotensiver Tiere nach 90 Tagen Inhalation mit standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle). Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher versus Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

- b) Einfluß von subchronischer Rauchexposition auf einen molekularen Marker der Myokardhypertrophie (ANF)

Die ANF-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 4.21) zeigte bei den normotensiven Rauchern im rechten sowie im linken Ventrikel eine Steigerung gegenüber den jeweiligen Ventrikeln der Kontrolltiere, die jedoch nicht signifikant war.

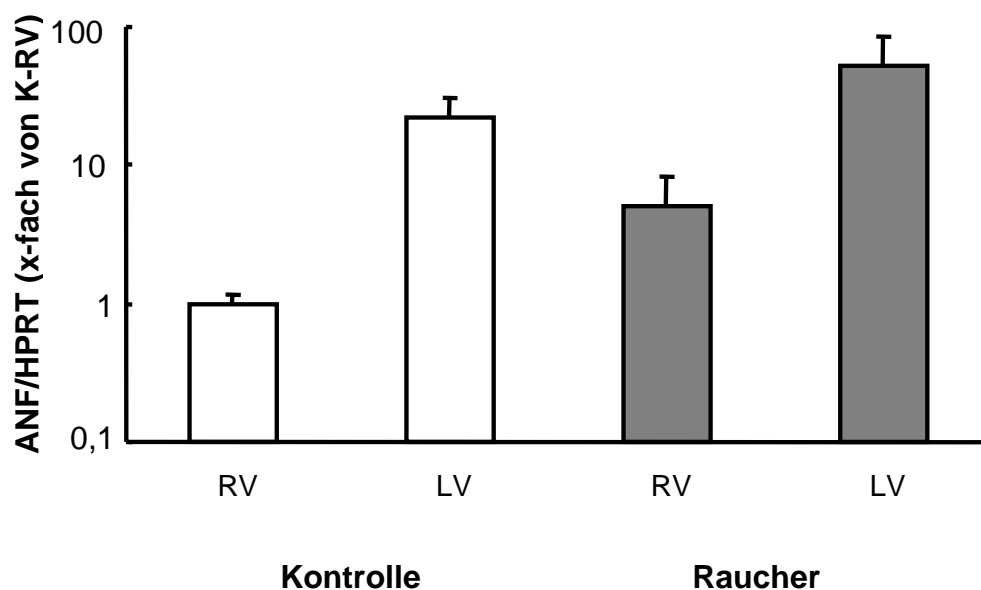


Abb. 4.21: **ANF-Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation**

Im Schaubild ist das Verhältnis der ANF-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikel (LV) der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren.

4.3.2 Phänotypische Veränderungen des hypertrophen Myokards

a) Einfluss von subchronischer Rauchexposition auf die TGF- β_1 -Expression

Die mRNA-Expression von TGF- β_1 (Abb. 4.22) im linken Ventrikel der normotensiven Raucher war im Vergleich zum linken Ventrikel der Kontrolltiere unverändert. Im rechten Ventrikel der 90 Tage lang gerauchten Tiere war jedoch eine signifikante Steigerung der TGF- β_1 -Expression gegenüber dem rechten Ventrikel der Kontrolltiere zu beobachten.

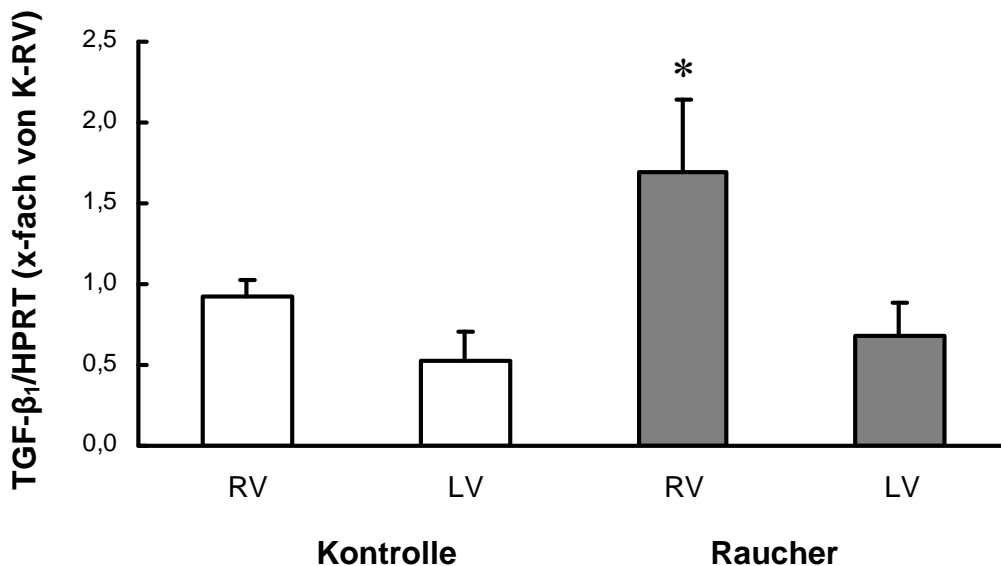


Abb. 4.22: **TGF- β_1 -Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation**

Im Schaubild ist das Verhältnis der TGF- β_1 -Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikel (LV) der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher bzw. Entwöhnung versus Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

b) Einfluss von subchronischer Rauchexposition auf die ODC-Expression

Die ODC-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 4.23) zeigte bei den normotensiven Rauchern weder im rechten noch im linken Ventrikel signifikante Unterschiede zum jeweiligen Ventrikel der Kontrolltiere.

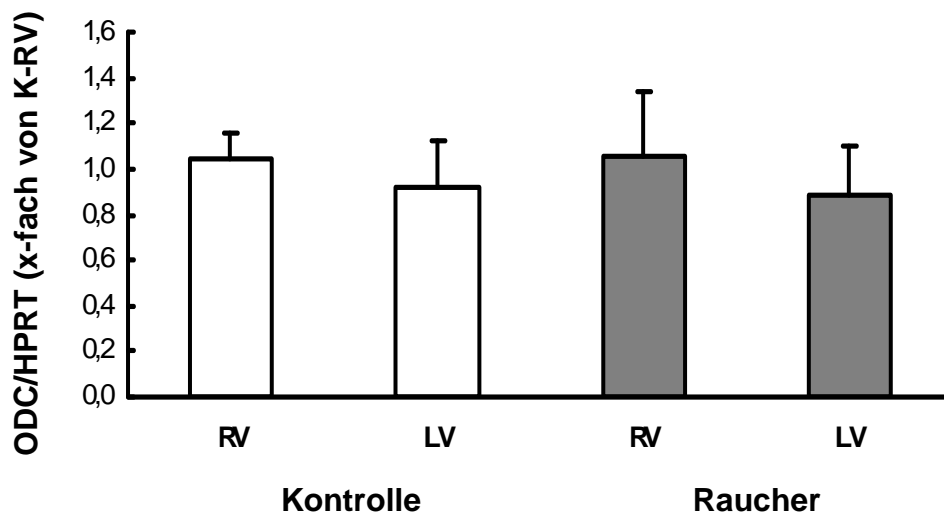


Abb. 4.23: **ODC-Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation**

Im Schaubild ist das Verhältnis der ODC-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikel (LV) der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je n=8 Tieren.

c) Einfluss von subchronischer Rauchexposition auf die PTHrP-Expression

Bei der PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 4.24) konnte im rechten Ventrikel der 90 Tage lang gerauchten normotensiven Tiere eine signifikant höhere Expression festgestellt werden als im rechten Ventrikel der Kontrolltiere. Die linken Ventrikel der Raucher zeigten zwar ebenfalls eine höhere PTHrP-Expression als die linken Ventrikel der Kontrolltiere, die Erhöhung war jedoch nicht signifikant.

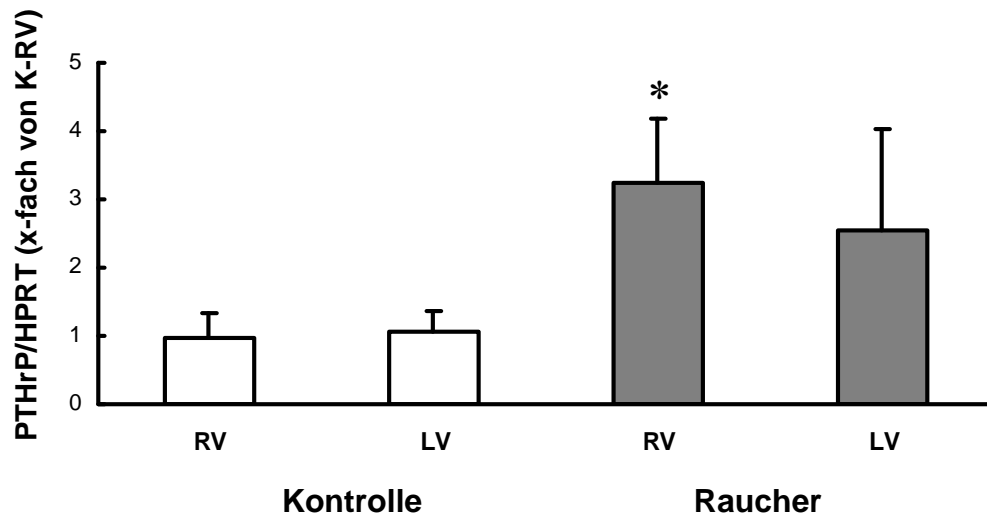


Abb. 4.24: **PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene der rechten und linken Ventrikel der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation**

Im Schaubild ist das Verhältnis der PTHrP-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene von rechten (RV) und linken Ventrikel (LV) der normotensiven Tiere nach 90 Tagen Inhalation von standardisiertem Zigarettenrauch (Raucher) bzw. Frischluft (Kontrolle) dargestellt. Die Daten sind Mittelwerte \pm Standardfehler von je $n=8$ Tieren. Signifikante Unterschiede, d.h. $p < 0,05$ zwischen den Werten von Raucher bzw. Entwöhnung versus Kontrolle, wurden mit * gekennzeichnet.

4.4 Einfluss von Nikotin auf die Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene *in vitro*

4.4.1 Einfluss von Nikotin auf isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen

Der Einfluss von Nikotin als möglicher Modulator auf die Hypertrophie von Kardiomyozyten wurde auf mRNA-Ebene mittels real time RT-PCR untersucht. Hierfür wurden frisch isolierte ventrikuläre Herzmuskelzellen für 24 Stunden mit $100 \mu\text{mol/l}$ Nikotin inkubiert. Anschließend wurde die Expression der molekularen Hypertrophie-Marker ANF und $\text{TGF-}\beta_1$ mittels real time RT-PCR bestimmt und mit den Ergebnissen der unbehandelten Kontrollzellen verglichen.

Nach 24 Stunden Inkubation der Kardiomyozyten mit $100 \mu\text{mol/l}$ Nikotin zeigte die ANF-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den unbehandelten Zellen keine signifikante Veränderung (Abb. 4.25).

Bei der TGF- β_1 -Expression auf mRNA-Ebene der mit Nikotin behandelten Zellen stellte sich im Mittel der Werte eine niedrigere Expression als bei den Kontrollzellen dar (Abb. 4.25), die jedoch nicht signifikant war.

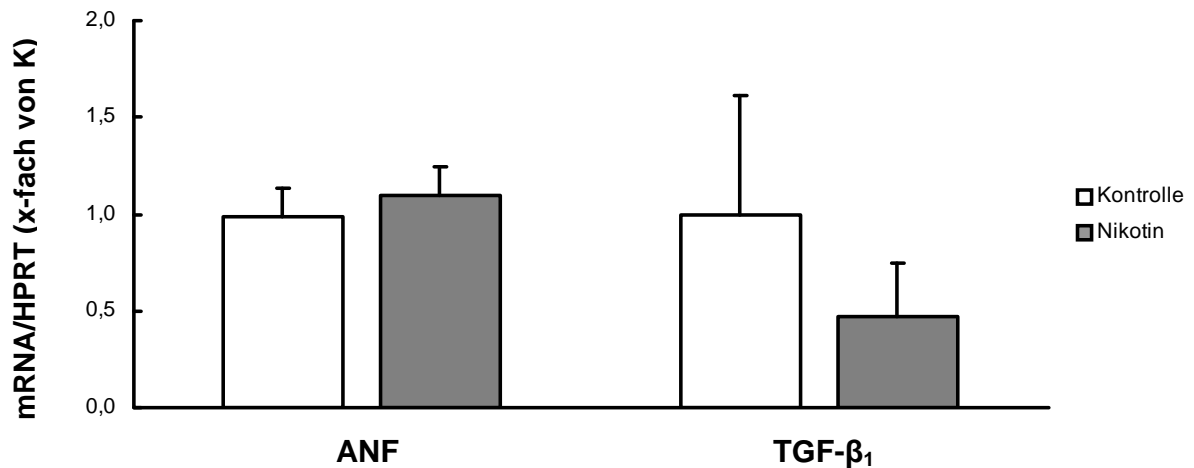


Abb. 4.25: **ANF-Expression und TGF- β -Expression auf mRNA-Ebene der Kardiomyozyten nach 24 Stunden Inkubation mit Nikotin**

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der mRNA-Expression von ANF bzw. TGF- β_1 zu HPRT der ventrikulären Herzmuskelzellen ($n=5$) dargestellt. Es zeigt die Werte der mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Nikotin 24 Stunden lang inkubierten Kardiomyozyten (Nikotin) und der unbehandelten Kardiomyozyten (Kontrolle, K).

4.4.2 Einfluss von Nikotin auf isolierte mikrovaskuläre Endothelzellen

Da in den Aorten der 90 Tage lang berauchten spontan hypertensiven Tiere (Abb. 4.10) eine signifikante Steigerung der PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene im Vergleich zu den Kontrolltieren gemessen wurde, sollte nun der Einfluss von Nikotin auf die PTHrP-Expression in isolierten mikrovaskulären Endothelzellen untersucht werden. Dazu wurde die PTHrP-Expression der Endothelzellen auf mRNA-Ebene mittels real time RT-PCR und auf Proteinebene mittels Western Blot gemessen. Hierfür wurden isolierte mikrovaskuläre Endothelzellen für 24 Stunden mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Nikotin inkubiert und anschließend die Expression von PTHrP im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollzellen untersucht.

a) Einfluss von Nikotin auf die mRNA-Expression von PTHrP in Endothelzellen

In den mit Nikotin behandelten Endothelzellen konnten im Vergleich zu unbehandelten Zellen keine signifikanten Veränderungen der PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene festgestellt werden (Abb. 4.26).

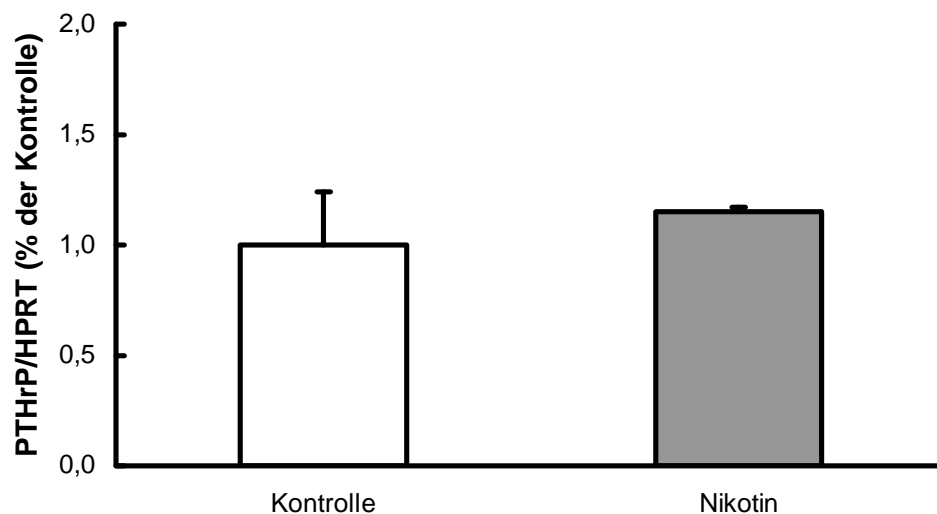


Abb. 4.26: **PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene der Endothelzellen nach 24 Stunden Inkubation mit Nikotin**

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der PTHrP-Expression zur HPRT-Expression auf mRNA-Ebene der mikrovaskulären Endothelzellen (n=5) dargestellt. Es wurden die Werte der mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Nikotin 24 Stunden lang inkubierten Endothelzellen (Nikotin) und der unbehandelten Endothelzellen (Kontrolle) verwendet.

b) Einfluss von Nikotin auf die Protein-Expression von PTHrP in Endothelzellen

In den mit Nikotin behandelten Endothelzellen konnte im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine Steigerung der PTHrP-Expression auf Proteinebene gemessen werden, die jedoch nicht signifikant war (Abb. 4.27).

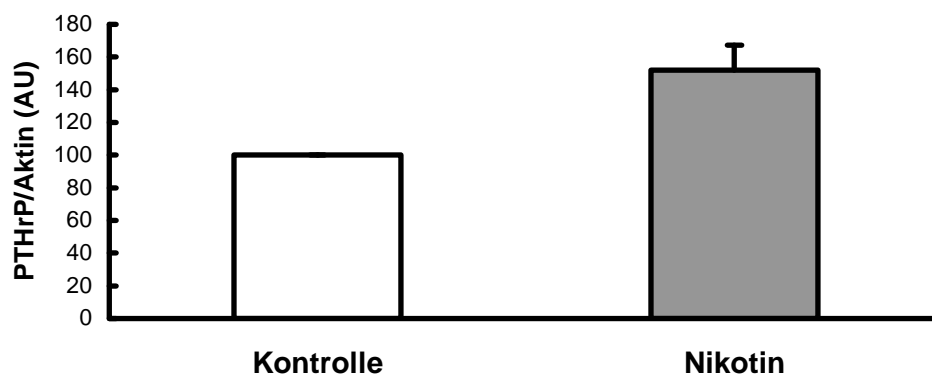


Abb. 4.27: **PTHrP-Expression auf Proteinebene der Endothelzellen nach 24 Stunden Inkubation mit Nikotin**

Im Schaubild sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des Verhältnisses der PTHrP-Expression zur Aktin-Expression auf Protein-Ebene in mikrovaskulären Endothelzellen ($n=5$) dargestellt. Es zeigt die Werte der mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Nikotin 24 Stunden lang inkubierten Endothelzellen (Nikotin) und der unbehandelten Endothelzellen (Kontrolle).

5. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, inwieweit Rauchen das Fortschreiten einer myokardialen Hypertrophie bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) direkt beeinflusst. Es wurden SHR eingesetzt, da diese schon in vielen publizierten Studien verwendet wurden und die hier gewonnenen Erkenntnisse sich daher gut mit den in der Literatur angegebenen Studien vergleichen lassen (Pfeffer *et al.*, 1979; Mochizuki *et al.*, 1986). Zusätzlich wurde in normotensiven Ratten der Linie Wistar-Kyoto (WKY) ebenfalls die Wirkung von Zigarettenrauch auf den Herzmuskel untersucht. Dies ermöglicht einen Vergleich zwischen blutdruckgesunden Tieren, die nicht automatisch eine Herzhypertrophie entwickeln, und den SHR mit genetisch vorprogrammiertem Bluthochdruck.

Wie bereits in früheren Studien beschrieben, entwickelten auch in dieser Studie bereits die relativ jungen SHR eine ausgeprägte myokardiale Hypertrophie. In den 90 Tagen des Versuches kam es jedoch nicht zu einer klinisch manifesten Herzinsuffizienz. Dies war nicht nur daran zu erkennen, dass Anzeichen einer subjektiv erkennbaren Erkrankung (Mortalität, Aszites) fehlten, es konnte auch keine Beeinträchtigung der normalen Herzfunktion gemessen werden. Letztere wurde in einer begleitenden Studie des Physiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Giessen *ex vivo* im Langendorff-Präparat bestimmt.

Hauptergebnis dieser Studie ist, dass Rauchen ein Fortschreiten der myokardialen Hypertrophie beschleunigt, welche wiederum das Entstehen einer Herzinsuffizienz begünstigt. Dies zeigt sich einerseits im Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht, welches schon nach 30 Tagen Berauchung der SHR anstieg, und andererseits in der gesteigerten Expression der Hypertrophie-assoziierten Gene, wie z.B. ANF, TGF- β_1 und ODC. Aus begleitenden Studien des Physiologischen Institutes ist bekannt, dass zudem eine eingeschränkte Ischämietoleranz vorliegt. Dort wurde die funktionelle Erholung nach 30 min Nullflussschämie untersucht (Schlüter *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Ratteninzuchtstamm der zweiten Versuchsreihe eine schnellere Progression der Herzhypertrophie aufwies als der Stamm der ersten Versuchsreihe, demnach also eine beschleunigte Reaktion auf die zusätzliche Rauchbelastung zeigte. Deshalb unterscheiden sich die Absolutwerte bei sämtlichen Tieren der zweiten Versuchsreihe von denen der ersten Versuchsreihe. Die ANF-

Expression als direktes Korrelat der Myokardhypertrophie war bei allen Rauchern zu jedem Zeitpunkt deutlich erhöht, die Steigerung der Expression von TGF- β_1 und ODC trat jedoch nur vorübergehend auf. Die Expression von PTHrP in diesem Kollektiv unterliegt einer komplexen Regulation, bestehend aus TGF- β_1 -abhängiger Herabregulation (Wenzel *et al.*, 2001) bei gleichzeitiger Stimulation der Expression durch Nikotin (Prof. Dr. K.-D. Schlüter, Giessen, pers. Mitteilung). Es ist deshalb verständlich, dass sich in den beiden Versuchsreihen kein einheitliches Bild ergibt.

Die bei den rauchbelasteten Tieren gemessenen Veränderungen können bei SHR auch ohne Rauchen beobachtet werden, sie treten jedoch normalerweise erst bei älteren Tieren auf (Snoeckx *et al.*, 1993; Ross & Schlüter, 2005), da sich in fortgeschrittenem Alter eine myokardiale Hypertrophie durch den dauerhaft erhöhten Blutdruck entwickelt. In der Gruppe der normotensiven Tiere wurden einige der Rauch-abhängigen Veränderungen ebenfalls nachgewiesen, so z.B. ein höheres Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht der Raucher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Veränderungen zeigten sich allerdings nicht so ausgeprägt wie bei den SHR.

5.1 Rauchen und Herzhypertrophie

Rauchen und Herzhypertrophie sind häufig nachgewiesene klinische Risikofaktoren bei kardiovaskulären Erkrankungen (Glantz & Parmley, 1991). Eine myokardiale Hypertrophie ist die adaptive Antwort des Herzmuskels auf eine chronisch erhöhte hämodynamische Arbeitsbelastung, mit dem Ziel die Kontraktionskraft des Herzens zu erhalten. Das Ziel dieser Studie war es, die potentielle Interaktion zwischen diesen beiden Risikofaktoren zu identifizieren. In dieser Studie wurden nur männliche SHR verwendet, welche mit einer Standarddiät gefüttert wurden. Dies ermöglicht eine Kontrolle der anderen Risikofaktoren, wie Geschlecht, Hyperglykämie, Hypercholesterinämie oder Fettleibigkeit.

In diesem Versuchsmodell einer Hochdruck-abhängigen Hypertrophie wurde eine Beschleunigung des Hypertrophie-Prozesses bei den berauchten Tieren beobachtet. Zunächst basierte diese Schlussfolgerung auf dem gegenüber den Nichtrauchern gesteigerten Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht bei allen Tieren der rauchenden Gruppen (Abb. 4.1, 4.11, 4.18). Allerdings ist dies als Beweis nicht ausreichend,

wenn man in Betracht zieht, dass die Körpergewichtszunahme bei den rauchenden Tieren (SHR der ersten Versuchsreihe und WKY) auffallend verzögert war (Abb. 4.3, 4.20). Das signifikant geringere Körpergewicht der Raucher im Vergleich zu den gleichaltrigen Nichtraucher lässt sich durch eine Steigerung des Grundumsatzes infolge des im Zigarettenrauch enthaltenen Nikotins erklären (Kienstand *et al.*, 1940). Ferner wurde eine gesteigerte intestinale Motilität bei Rauchern beobachtet, welche auf die Wirkung des Nikotins zurückzuführen ist und eine geringere Nährstoffaufnahme im Darm zur Folge hat (Schredorf *et al.*, 1938). Das niedrigere Körpergewicht altersgleicher Tiere bei gleichem Herzgewicht (Abb. 4.2 und 4.19) verursachte eine Steigerung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht. Allerdings zeigt sich im Vergleich gleichschwerer Tiere, dass auch das absolute Herzgewicht der Raucher erhöht ist. Verglichen wurden z.B. 60 Tage lang gerauchte Tiere und Nichtraucher der 30 Tage-Gruppe (Abb. 4.2 und Abb. 4.3).

Eine deutliche Herzhypertrophie zeigten vor allem die gerauchten SHR der zweiten Versuchsreihe: sie hatten im Vergleich zu den Kontrolltieren ein signifikant gesteigertes Herzgewicht (Abb. 4.12) bei gleichem Körpergewicht (Abb. 4.13) und somit ein signifikant höheres Herzgewicht zu Körpergewicht-Verhältnis (Abb. 4.11). Die SHR der Entwöhnungsgruppe zeigten nach 30 Tagen Gerauchung und 60 Tagen „Rauchabstinenz“ keine weitere Steigerung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht (Abb. 4.11). Sowohl ihr durchschnittliches Herzgewicht (Abb. 4.12) als auch ihr Körpergewicht (Abb. 4.13) war jedoch signifikant höher als das der Kontrolltiere.

Dies untermauert die These, dass infolge einer Raucherentwöhnung eine Gewichtszunahme stattfindet. Dies ist möglicherweise durch die beim Rauchen auftretende permanente Stimulation des sympathoadrenalen Systems durch das Nikotin und die damit einhergehende gesteigerte Glykogeno- und Lipolyse bedingt (Forth, Henschler, Rummel & Starke, 1998). In der Phase der Raucherentwöhnung normalisiert sich der vorher durch Nikotin gesteigerte Grundumsatz, aber zusätzlich normalisiert sich auch die während des Rauchens erniedrigte Nährstoffaufnahme im Darm. Dies führt bei gesteigerter Aufnahme von Kalorien und gleichzeitig niedrigerem Kalorienbedarf unweigerlich zur Gewichtszunahme. Chen *et al* (1993) bewiesen, dass diese Gewichtszunahme vorwiegend kurz nach der Entwöhnung

auftritt, sich aber nach einem individuell unterschiedlich langem Zeitraum wieder zurückbildet bis sich schließlich wieder ein durchschnittliches Gewicht einstellt. Beim Menschen wird als wichtigste Ursache für die Gewichtszunahme allerdings eine gesteigerte Nahrungsaufnahme gesehen (Blitzer *et al.*, 1977).

Einen direkten Beweis für die kardiale Hypertrophie liefern die Daten der Expression der Hypertrophie-assoziierten Gene wie ANF, TGF- β_1 und ODC. Die Ausprägung der mRNA-Expression dieser Gene und die Änderung des Verhältnisses von Herz- zu Körpergewicht im Verlauf der Hypertrophie-Entwicklung werden in Abb. 5.1 schematisch dargestellt. ANF wurde als etablierter Marker der myokardialen Hypertrophie verwendet, da die Expression dieses fetalen Genes durch eine Bluthochdruck-induzierte α_1 -Rezeptorstimulation erhöht wird. Nach 30 Tagen Inhalation war bei den Rauchern die ANF-Expression im linken und rechten Ventrikel auf mRNA- sowie auf Protein-Ebene verglichen mit den Nichtrauchern angestiegen. Diese signifikante Steigerung nahm im Laufe des Versuches weiter zu (Abb. 4.4, 4.5, 4.14). Die Entwöhnungsgruppe der berauchten SHR zeigt in ihrer ANF-Expression eine Steigerung, verglichen mit den Nichtrauchern, die jedoch aufgrund der sehr breiten Streuung nicht signifikant war (Abb. 4.14). Diese inhomogene Situation der Hypertrophie-Stadien entsteht durch die individuell unterschiedlich schnelle Erholung der Tiere in der Entwöhnungsphase. Es wird vermutet, dass mit zunehmender Erholung durch die Entwöhnung die Hypertrophie und somit auch die ANF-Expression zurückgehen. Die normotensiven Tiere zeigten in der Raucher-Gruppe ebenfalls einen Anstieg der ANF-Expression auf mRNA-Ebene (Abb. 4.21), der allerdings nicht signifikant war. Dies unterstreicht den additiven Charakter von Rauchen auf das Fortschreiten der Hochdruck-induzierten myokardialen Hypertrophie.

Der alleinige Einfluss von Nikotin auf die Hypertrophie der Herzmuskelzellen wurde an isolierten ventrikulären Kardiomyozyten untersucht. Nach 24 Stunden Inkubation der Herzmuskelzellen mit Nikotin zeigte sich keine Veränderung, weder bei der ANF- noch bei der TGF- β_1 -Expression auf mRNA-Ebene. Dies lässt vermuten, dass in der Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie durch Rauchen das in den Zigaretten enthaltene Nikotin *per se* keinen Einfluss hat. Man nimmt an, dass die unzähligen

weiteren Stoffe im Hauptstromrauch eine bedeutendere Rolle spielen, oder möglicherweise ihre Kombination mit Nikotin.

In einer separaten Studie des Phillip Morris Research Laboratory in Brüssel wurde untersucht, ob in der SHR-Gruppe durch Rauchen ein signifikanter Blutdruckanstieg auftritt. Die Untersuchungen erfolgten mittels Telemetrie über 8 Wochen. Es konnte jedoch kein signifikanter Anstieg nachgewiesen werden. Es wird daher postuliert, dass die beobachteten Veränderungen in erster Linie durch das Rauchen und nicht durch eine Erhöhung des Blutdrucks verursacht werden (Kris Meurrens, PMRL, Brüssel, pers. Mitteilung)

5.2 Rauchen und die Expression von TGF- β_1 und TGF- β_1 -abhängig regulierten Genen

Im Versuchsmodell der SHR steigt die ventrikuläre Expression von TGF- β_1 innerhalb einiger Monate an und erzielt dabei höhere Werte als die von normotensiven Ratten. Der Mechanismus zur Steigerung der ventrikulären Expression von TGF- β_1 wurde bereits nachgewiesen (Rosenkranz, 2004). Die Abhängigkeit der TGF- β_1 -Expression von Angiotensin II zeigt sich daran, dass sich bei Hemmung von Angiotensin II-Rezeptoren und Angiotensin Converting Enzym (ACE) die ventrikuläre Expression von TGF- β_1 reduziert und sich die Lebenserwartung dieser Tiere erhöht (Zimmermann *et al.*, 1999). Aus diesem Grund kann die erhöhte ventrikuläre Expression von TGF- β_1 als Vorbote des Übergangs einer Hypertrophie zu einer Herzinsuffizienz betrachtet werden. Die Rolle von TGF- β_1 bei der Entstehung einer kardialen Hypertrophie wird in Abb. 1.3 gezeigt, den Einfluss des Rauchens auf die TGF- β_1 -Expression und deren Auswirkungen zeigt Abb. 5.2.

Im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen TGF- β_1 und der Entwicklung einer Herzhypertrophie war somit eines der bemerkenswertesten Ergebnisse dieser Studie der frühe signifikante Anstieg (Tag 30) der TGF- β_1 -Expression auf mRNA-Ebene in den Herzen der berauchten SHR (Abb. 4.6). Im weiteren Verlauf zeigte sich bei allen Tieren der ersten Versuchsreihe ein allgemeiner Anstieg der ventrikulären TGF- β_1 -Expression. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem bereits beschriebenen Anstieg dieses Zytokins im Rahmen der fortschreitenden Hypertension bei den SHR

(Wenzel *et al.*, 2001). Nach 60 Tagen Rauchbelastung war keine signifikante Erhöhung der TGF- β_1 -Expression auf Proteinebene zu messen (Abb. 4.7), vermutlich da zu diesem Zeitpunkt die TGF- β_1 -Proteinexpressions-Kurve nach anfänglicher Erhöhung wieder im Absinken begriffen war. Die Tiere der zweiten Versuchsreihe (VR) zeigen nach 90 Tagen eine eher niedrige TGF- β_1 -Expression. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass bei den Tieren der zweiten VR im Vergleich zu denen der ersten VR die Hypertrophie schneller voranschritt. Es wird angenommen, dass die TGF- β_1 -Expression der zweiten VR ihr Maximum bereits deutlich vor Tag 90 hatte und sich somit auch schon weiter in der Phase des Absinkens befindet, als die TGF- β_1 -Expression der ersten VR. Nach 90 Tagen konnte bei den Rauchern der ersten VR eine leichte Abnahme (Abb. 4.6) und bei den Rauchern der zweiten VR eine deutliche Abnahme der TGF- β_1 -Expression beobachtet werden (4.15). Dies zeigt sich auch in der Entwöhnungsgruppe der SHR (Abb. 4.15). Auch hier wird eine Beschleunigung des voranschreitenden Prozesses durch die Rauchbelastung in diesem Versuchsmodell gezeigt, sogar bei den Tieren, die nur 30 Tage lang geraucht wurden.

Bei den normotensiven Tieren beobachtet man unter den Rauchern nach 90 Tagen eine Steigerung der TGF- β_1 -Expression im rechten Ventrikel (Abb. 4.22). Dieses Stadium der Hypertrophie der WKY ähnelt dem Zustand der SHR nach 30 Tagen Berauchung, allerdings steigert sich bei den SHR die TGF- β_1 -Expression auch im linken Ventrikel, welcher ja bei diesen Tieren durch den Bluthochdruck zusätzlich belastet ist.

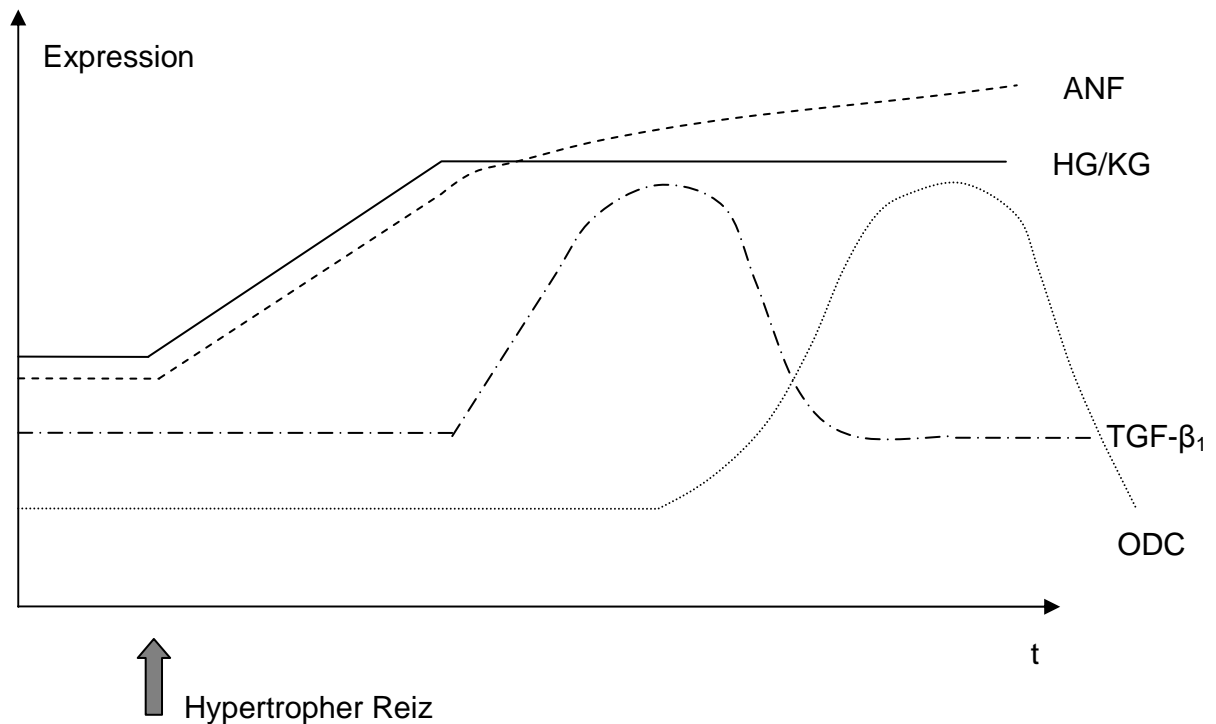


Abb. 5.1: Zeitlicher Verlauf der Expressionsänderungen im Kardiomyozyt

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Expressionsänderungen auf mRNA-Ebene von ANF, TGF-β₁ und ODC in der Herzmuskelzelle im Vergleich zum Herzgewicht-zu Körpergewicht-Verhältnis (HG/KG) während einer progressiven Herzhypertrophie unter Einbeziehung der Ergebnisse von Wenzel *et al.* (2001). Der atriale natriuretische Faktor (ANF) zeigt in seiner Expression einen zeitgleichen Anstieg wie das HG/KG, ebenso das Erreichen einer Plateauphase. Der Transforming-growth-factor-beta 1 (TGF-β₁) steigt in seiner Expression erst später an, erreicht einen Peak und fällt danach wieder ab. Die TGF-β₁-abhängige Ornithin-Decarboxylase (ODC)-Expression steigt an nachdem TGF-β₁ seine maximale Expression erreicht hat und fällt nach einem Peak, korrespondierend zur sinkenden TGF-β₁-Expression, wieder ab.

Die isolierten ventrikulären Kardiomyozyten zeigten nach 24 Stunden Inkubation mit Nikotin keine Veränderung der Expression von TGF-β₁ (Abb. 4.25). Dies bestätigt ebenfalls die oben bereits erwähnte Annahme, dass Nikotin alleine keinen Einfluss auf die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie hat, sondern eher die Summe der beim Rauchen aufgenommenen Stoffe. Ein Beweis für diese Annahme müsste allerdings in einer *in vivo* Studie erfolgen.

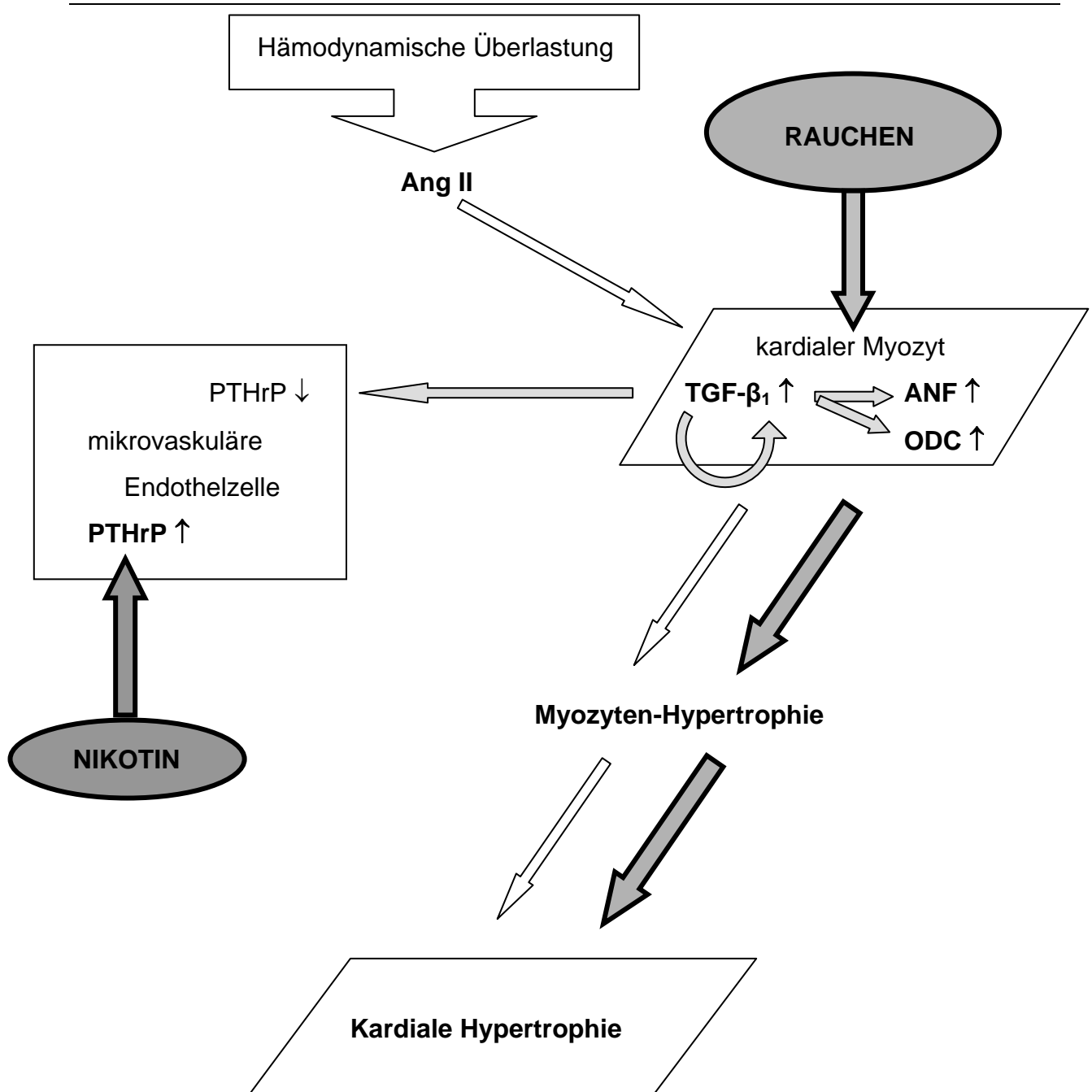


Abb. 5.2: Einfluss von Zigarettenrauch und Nikotin auf die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie

Dargestellt ist der Einfluss von Zigarettenrauch und Nikotin auf die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie in Verbindung mit einer hämodynamischen Überlastung des Herzens. Durch Zigarettenrauch wird eine schnellere Progression bei der Hypertrophie-Entwicklung des Herzens beobachtet, d.h. phänotypische Ausprägungen einer myokardialen Hypertrophie wie die gesteigerte mRNA-Expression von Atrialem natriuretischem Faktor (ANF), Transforming-growth-factor-beta 1 (TGF-β₁) und Ornithin-Decarboxylase (ODC) in kardialen Myozyten. Die mRNA-Expression von Parathyroid hormone related peptide (PTHrP) in mikrovaskulären Endothelzellen wird einerseits durch TGF-β₁ gesenkt, andererseits aber durch Nikotin aus dem Zigarettenrauch vermehrt gesteigert.

Da die TGF- β_1 -Expression nicht mit der TGF- β_1 -Aktivität identisch ist, wurde die Expression von zwei bekannten TGF- β_1 -abhängig regulierten Genen untersucht: ODC und PTHrP.

Die Ornithin-Decarboxylase (ODC) ist ein wichtiges Enzym im Polyamin-Stoffwechsel. Er steigert den Gehalt an ribosomaler RNA in der Zelle, und spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Proteinsynthese. Da die ODC nur eine geringe Halbwertszeit von 20 min besitzt, wurde auf eine Untersuchung der ODC-Expression auf Proteinebene verzichtet. ODC ist ein Indikator für die Aktivierung des β -Adrenozeptor-Systems und des darauf folgenden β -Adrenozeptor-couplings (Schlüter *et al.*, 2000). Die Aktivierung der β -Adrenozeptoren erfolgt aber nur, wenn ihr eine Aktivierung von TGF- β_1 voran geht (Schlüter *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1996). Beim β -Adrenozeptor-coupling wird das β -adrenerge System, welches vorher „nur“ an der Modulation der kardialen Leistung mittels Ino-, Chrono- und Dromotropie beteiligt war, an die Signalwege der Proteinbiosynthese gekoppelt, und trägt somit zur Hypertrophie-Entwicklung bei (Abb. 5.3). Für eine Steigerung der ODC-Expression muss also zunächst eine Aktivierung von TGF- β_1 stattfinden und anschließend eine β -adrenerge Stimulation erfolgen. Dieser zeitliche Ablauf der Expressionsänderungen wird auch in Abb. 5.1 gezeigt.

In Übereinstimmung mit dieser Annahme war bei den Rauchern der ersten Versuchsreihe erst nach 90 Tagen Berauchung ein Anstieg der ODC-Expression zu beobachten (Abb. 4.8). Die ODC-Expression erfolgte also erst im Anschluss an einen Anstieg der ventrikulären TGF- β_1 -Expression. Ähnliche Ergebnisse wurden ebenfalls in älteren SHR gezeigt (Wenzel *et al.*, 2001). Die unveränderte ODC-Expression der Raucher der zweiten Versuchsreihe (Abb. 4.16) kann durch die schnellere Hypertrophie-Entwicklung des Inzuchtstammes der SHR der zweiten Versuchsreihe erklärt werden. Die ODC-Expression auf mRNA-Ebene hatte ihr Maximum hier wahrscheinlich schon früher erreicht als bei den Tieren der ersten Versuchsreihe und war am Tag 90 schon wieder auf das Ausgangsniveau abgesunken. Sowohl die Entwöhnungsgruppe als auch die Rauchergruppe dieser Versuchsreihe zeigten nach 90 Tagen keinen Anstieg der ODC-Expression (Abb. 4.16), sondern sogar im nicht-druckbelasteten rechten Ventrikel eine geringere ODC-Expression als die Kontrolltiere. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein paradoxer Effekt von TGF- β_1

auf ODC, hier im Zusammenhang mit dem Genuss von Zigarettenrauch. In ovariektomierten SHR wurde ein ähnlicher Effekt beschrieben, wenn bei Substitution von Estradiol gleichzeitig ein blutdrucksenkendes Arzneimittel verabreicht wurde (van Eickels *et al.*, 2005). Auch die normotensiven Tiere zeigten noch keinen Anstieg der ODC-Expression (Abb. 4.23). Dies lässt sich jedoch durch den späteren TGF- β_1 -Expressionsanstieg bei dieser Gruppe erklären. Da noch keine TGF- β_1 -induzierte Stimulation der Herzmuskelzelle erfolgte, konnte auch noch keine Modulation der ODC-Expression erfolgen.

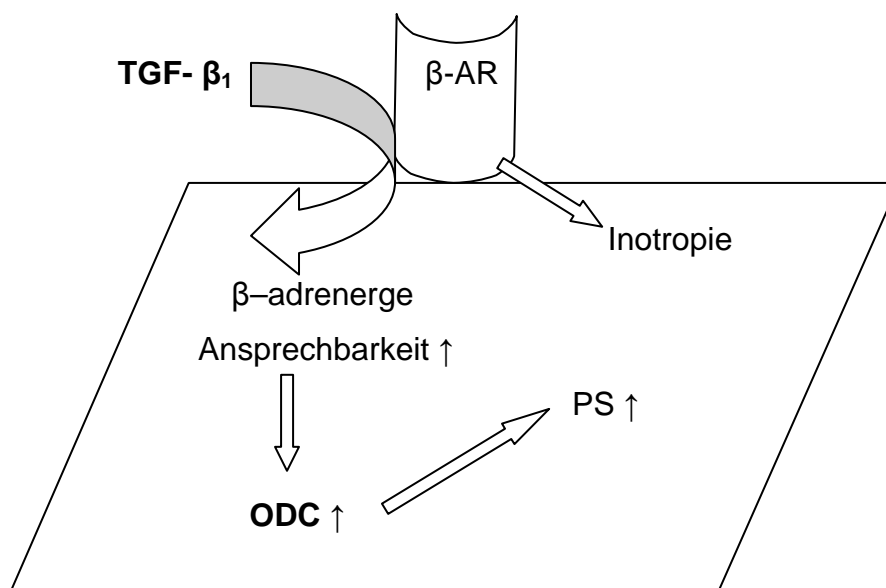


Abb. 5.3: TGF- β_1 -abhängige Erhöhung der ODC- Expression in der Herzmuskelzelle

Dargestellt ist der TGF- β_1 -abhängige Weg der Erhöhung der ODC-Expression in der Herzmuskelzelle. Durch die erhöhte Ansprechbarkeit der Zelle auf β -adrenerge Substanzen durch TGF- β_1 wird das β -adrenerge System, welches vorher „nur“ an der Inotropie des Herzens beteiligt war, an die Signalwege der Proteinbiosynthese (PS) über ODC gekoppelt, das so genannte β -Adrenozeptor-coupling, und trägt damit zur Hypertrophie-Entwicklung bei.

Die Beobachtung, dass die ventrikuläre Expression von PTHrP bei berauchten Tieren ebenfalls anstieg war eine unerwartete Entdeckung. In vorangegangenen Versuchen wurde nachgewiesen, dass TGF- β_1 die vaskuläre Expression von PTHrP herunterreguliert (Wenzel *et al.*, 2001). Hierbei wurde auch die mRNA-Expression von PTHrP auf Proteinebene ausführlich untersucht. Folglich wurde auch in der

vorliegenden Studie eine Herunterregulierung von PTHrP durch die gesteigerte TGF- β_1 -Expression erwartet. Es stieg jedoch die ventrikuläre Expression von PTHrP bei allen berauchten Tiere an (Abb. 4.9, 4.17, 4.24), sowohl bei den SHR als auch bei den normotensiven Tieren (WKY). Dies spricht aber nicht gegen die zuvor erwähnte Schlussfolgerung, dass TGF- β_1 in den Ventrikeln der berauchten Tiere aktiviert ist. Vor kurzem wurde in einer Studie gezeigt, dass Faktoren, welche die Expression von PTHrP ansteigen lassen, z.B. Östrogene, ausreichend sind um den unterdrückenden Effekt von TGF- β_1 auszugleichen (Grohe *et al.*, 2004; van Eickels *et al.*, 2005). Dies könnte hier durch das Nikotin im Zigarettenrauch induziert worden sein (Abb. 5.2). Passend zu dieser Annahme zeigten die Tiere der Entwöhnungsgruppe keinen Anstieg der PTHrP-Expression (Abb. 4.17) trotz gleich hoher TGF- β_1 -Expression wie die Raucher. Kürzlich erhaltene noch nicht veröffentlichte Ergebnisse von Studien des Physiologischen Institutes in Giessen unterstützen die Theorie der Expressionssteigerung von PTHrP durch Nikotin in Kardiomyozyten.

Neben der ventrikulären Expression von PTHrP wurde auch ein Anstieg der PTHrP-Expression in den vaskulären Zellen der berauchten Ratten, hier in der Aorta, gemessen. In den Aorten der Raucher der ersten VR zeigte sich eine signifikant höhere PTHrP-Expression auf mRNA-Ebene als bei der Kontrollgruppe (Abb. 4.10). Weiterhin wurde in isolierten mikrovaskulären Endothelzellen nach 24 Stunden Inkubation mit Nikotin ein moderater Anstieg der PTHrP-Expression auf mRNA- und Proteinebene beobachtet (Abb. 4.26 und 4.27). Laufende Untersuchungen im Physiologischen Institut an isolierten mikrovaskulären Endothelzellen belegen, dass durch Nikotin (in geringerer Konzentration verwendet als in dieser Studie) die endotheliale Expression von PTHrP gesteigert wird.

Die verbleibende Frage ist, inwieweit eine gesteigerte PTHrP-Expression sich positiv oder negativ auf die Herzen der Raucher auswirkt. Im Allgemeinen sind die vaskulären Effekte von PTHrP kardioprotektiv. Andererseits ist PTHrP aber auch fähig, paradoxe Wirkungen in der Mitogenese an kardiovaskulären Zielzellen der SHR zu induzieren (Massfelder *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass PTHrP von Endothelzellen während einer Ischämie freigesetzt wird, führt zu dem Schluss, dass lokal erhöhte PTHrP-Konzentrationen am Beginn der Reperfusion auftreten. Diese

erhöhte PTHrP-Expression soll durch Vasodilatation den lokalen Blutfluss im ischämischen Gebiet verbessern. Während PTHrP fähig ist, die post-ischämische Erholung des Herzens bei normotensiven Ratten zu verbessern, verschlechtert es allerdings die Reperfusion des ischämischen Gebietes bei älteren SHR (Ross & Schlüter, 2005). Unter Berücksichtigung, dass Rauchen den Prozess der myokardialen Hypertrophie in den hypertensiven Herzen beschleunigt, kann man daher spekulieren, ob PTHrP zur unzureichenden Frühphase der Reperfusion dieser Herzen beisteuert.

5.3 Schlussfolgerung

Rauchen und Bluthochdruck wurden als Hauptrisikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen identifiziert. Diese Studie liefert den Beweis einer Kausalbeziehung zwischen den beiden interagierenden Risikofaktoren Rauchen und Bluthochdruck für kardiovaskuläre Erkrankungen. In dem gut etablierten Modell der Hochdruck-induzierten myokardialen Hypertrophie der SHR beschleunigt Rauchen das Fortschreiten ventrikulärer Veränderungen im Sinne einer myokardialen Hypertrophie. Dies wird bei den Rauchern durch das gesteigerte Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht und die gesteigerte Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene, wie ANF, TGF- β_1 und ODC, belegt. Durch die beschleunigte Entwicklung einer Hypertrophie der Kardiomyozyten durch das Rauchen, kann sich bei diesen Herzen auch früher eine klinisch manifeste Herzinsuffizienz ausbilden.

Die Daten dieser Studie zeigen klar, dass unter komplett kontrollierten Versuchsbedingungen, Rauchen und Bluthochdruck gemeinsam sich stärker schädigend auf die Herzen auswirken, als nur einer dieser Risikofaktoren oder Nikotin alleine. Der Haupteffekt von Rauchen auf hypertensive Herzen war eher eine Beschleunigung der laufenden Prozesse verglichen mit den Nichtrauchern, als die Ausbildung eines „echten“ Phänotyps einer Herzinsuffizienz. Dies deckt sich mit der klinischen Situation, in welcher Raucher mit akutem myokardialen Infarkt oft jünger sind als nichtrauchende Patienten mit derselben Erkrankung (Himbert *et al.*, 2002). Wenn man nun die Häufigkeit der verschiedenen gesundheitsschädlichen Folgen des Rauchens betrachtet, wie z.B. Krebs, kardiovaskuläre Erkrankungen, Schlaganfall, Arteriosklerose, Asthma und Bronchitis, so fällt auf, dass mehr Raucher

an einer Herzerkrankung sterben als an einer der anderen rauchassoziierten Krankheiten (Glantz & Parmley, 1991). Sogar unter 53.000 Passivrauchern in den USA starben 37000 an einer Herzerkrankung, nur 3700 an Lungenkrebs, 12000 an einer anderen Art von Krebs und 300 an sonstigen Erkrankungen (Wells, 1990). Passivraucher reagieren sogar noch empfindlicher auf die Effekte des Zigarettenrauches als Raucher, da ihr Organismus nicht an die Schadstoffe adaptiert ist. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in der Bevölkerung zwar relativ häufig, aber eine Exposition gegenüber dem Risikofaktor Zigarettenrauch kommt häufiger vor, als Bluthochdruck oder Hypercholesterolämie (Glantz & Parmley, 1991). In der Kombination der beiden Risikofaktoren Bluthochdruck und Zigarettenrauch allerdings kann man aufgrund dieser Studie sogar vom additiven Charakter des Rauchens auf das Fortschreiten der Hochdruck-induzierten myokardialen Hypertrophie sprechen.

Weiterhin zeigt diese Studie auch den Nutzen einer Rauchentwöhnung, unabhängig von anderen Risikofaktoren, wie Bluthochdruck. Dies zeigt sich bei der Entwöhnungsgruppe der SHR an den geringen Abweichungen der gemessenen Parameter der Hypertrophie verglichen mit den ebenfalls an Bluthochdruck leidenden Nichtrauchern. Und je früher man die Rauchentwöhnung beginnt, umso schneller kann sich der Körper erholen.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, inwieweit Rauchen das Fortschreiten einer myokardialen Hypertrophie bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) direkt beeinflusst. Die SHR dienten als Versuchsmodell für die Entwicklung einer Bluthochdruckabhängigen Herzhypertrophie.

Die myokardiale Hypertrophie gilt als Vorstufe der Herzinsuffizienz, unabhängig von der Ursache der Hypertrophie. Bluthochdruck ist eine der Hauptursachen für die Entwicklung einer Hypertrophie. Neben Rauchen beeinflussen ebenfalls verschiedene weitere Risikofaktoren wie Diabetes, Übergewicht, Geschlecht und Alter die Entwicklung einer Hypertrophie und deren Übergang in eine Herzinsuffizienz.

Das Hauptergebnis der vorliegenden Studie ist, dass Rauchen die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie beschleunigt und so die Entstehung einer Herzinsuffizienz begünstigt. Die relativ jungen Tiere in dieser Studie entwickelten während der 90 Tage dauernden Berauchung eine bemerkenswerte myokardiale Hypertrophie, jedoch keine Herzinsuffizienz. Die myokardiale Hypertrophie zeigte sich an einem erhöhten Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht bereits nach 30 Tagen Berauchung, und in der vermehrten Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene, wie z.B. ANF, TGF- β_1 und ODC. Diese Veränderungen können auch bei nicht berauchten SHR beobachtet werden, allerdings erst bei älteren Tieren. Eine Rauchentwöhnung nach 30 Tagen Berauchung führte zu einer Verbesserung der meisten rauchassoziierten Veränderungen. Normotensive Ratten entwickelten nach 90 Tagen Berauchung geringere rauchbedingte Veränderungen als die Raucher der SHR. Weiterhin wurde gezeigt, dass Nikotin alleine im Gegensatz zum Zigarettenrauch in seiner komplexen Zusammensetzung nicht in der Lage ist, eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zu verursachen.

Diese Studie liefert den Nachweis, dass besonders das Zusammenwirken der beiden Risikofaktoren Rauchen und Bluthochdruck das Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen beschleunigt. Als Folge dieser Interaktion der beiden Faktoren entwickeln die Herzen schneller eine myokardiale Hypertrophie, die somit auch

früher in eine Herzinsuffizienz übergeht. Außerdem zeigt diese Studie die positive Auswirkung einer Rauchentwöhnung auf eine durch den Zigarettenrauch bedingte Herzhypertrophie. Die geringere Ausprägung der pathologischen Herzvergrößerung bei rauchentwöhnten Tieren ist unabhängig von anderen Risikofaktoren, wie Bluthochdruck, zu beobachten.

7. Summary

The aim of the present study was to investigate whether smoking directly influences the progression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR), which were used as a model for pressure-dependent hypertrophy.

Myocardial hypertrophy is an independent precursor of heart failure. Hypertension is one of the main reasons for the development of cardiac hypertrophy. Several other risk factors like diabetes, obesity, gender and age also modify the progression of hypertrophy and its progress to heart failure.

The main result of the present study is that smoking accelerates the progression of myocardial hypertrophy favoring the development of chronic heart failure. The relatively young animals used in this study developed a remarkable myocardial hypertrophy during the 90 days of smoking but no heart failure. The myocardial hypertrophy was demonstrated by means of the heart weight to body weight ratio, which was increased after already 30 days of smoking, as well as by the increased expression of hypertrophy-associated genes, i.e. ANF, TGF- β_1 and ODC. Without smoking these changes can also be observed, but only in older SHR. Smoke cessation after 30 days of smoking lead to the recovery of most of these alterations. Normotensive rats exposed to smoke for 90 days developed only mild signs of myocardial hypertrophy. Furthermore it was shown, that nicotine by itself does not induce any signs of smoke-dependent myocardial hypertrophy.

This study proves the combined effect of smoking and hypertension to accelerate the progression of cardiovascular disease. Myocardial hypertrophy is more pronounced in these hearts and therefore chronic heart failure develops earlier. Moreover this study shows the benefit of smoke cessation, which occurs irrespectively of other risk factors, such as hypertension.

8. Literaturverzeichnis

ABDALLAH, Y., ROSS, G., DOLF, A., HEINEMANN, M. P. & SCHLÜTER, K. D. (2006).

N-terminal parathyroid hormone-related peptide hyperpolarizes endothelial cells and causes a reduction of the coronary resistance of the rat heart via endothelial hyperpolarization. *Peptides* **27**, 2927-2934

AMBROSE, J. A. & BARUA, R. S. (2004). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol* **43**, 1731-1737.

ANDERSON, K. M., ODELL, P. M., WILSON, P. W. & KANNEL, W. B. (1991).

Cardiovascular disease risk profiles. *Am Heart J* **121**, 293-298.

BARTECCHI, C. E., MACKENZIE, T. D. & SCHRIER, R. W. (1995).

The global tobacco epidemic. *Sci Am* **272**, 44-51.

BENOWITZ, N. L. (2003). Cigarette smoking and cardiovascular disease:

pathophysiology and implications for treatment. *Prog Cardiovasc Dis* **46**, 91-111.

BENOWITZ, N. L., KUYT, F. & JACOB, P., 3RD. (1982). Circadian blood nicotine

concentrations during cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther* **32**, 758-764.

BLITZER, P. H., RIMM, A. A. & GIEFER, E. E. (1977). The effect of cessation of smoking

on body weight in 57,032 women: cross-sectional and longitudinal analyses. *J Chronic Dis* **30**, 415-429.

BOLINDER, G., ALFREDSSON, L., ENGLUND, A. & DE FAIRE, U. (1994). Smokeless

tobacco use and increased cardiovascular mortality among Swedish construction workers. *Am J Public Health* **84**, 399-404.

- BOLUYT, M. O., O'NEILL, L., MEREDITH, A. L., BING, O. H., BROOKS, W. W., CONRAD, C. H., CROW, M. T. & LAKATTA, E. G. (1994). Alterations in cardiac gene expression during the transition from stable hypertrophy to heart failure. Marked upregulation of genes encoding extracellular matrix components. *Circ Res* **75**, 23-32.
- CASALE, P. N., DEVEREUX, R. B., MILNER, M., ZULLO, G., HARSHFIELD, G. A., PICKERING, T. G. & LARAGH, J. H. (1986). Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men. *Ann Intern Med* **105**, 173-178.
- CHEN, Y., HORNE, S. L. & DOSMAN, J. A. (1993). The influence of smoking cessation on body weight may be temporary. *Am J Public Health* **83**, 1330-1332.
- CLEMENS, T. L., CORMIER, S., EICHINGER, A., ENDLICH, K., FIASCHI-TAESCH, N., FISCHER, E., FRIEDMAN, P. A., KARAPLIS, A. C., MASSFELDER, T., ROSSERT, J., SCHLÜTER, K. D., SILVE, C., STEWART, A. F., TAKANE, K. & HELWIG, J. J. (2001). Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol* **134**, 1113-1136.
- COHN, J. N., FERRARI, R. & SHARPE, N. (2000). Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol* **35**, 569-582.
- FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W., STARKE, K. (ED.) (1998). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*, 151-152,881-885
- FLYNN, T. G. (1987). The elucidation of the structure of atrial natriuretic factor, a new peptide hormone. *Can J Physiol Pharmacol* **65**, 2013-2020.

- GLANTZ, S. A. & PARMLEY, W. W. (1991). Passive smoking and heart disease. Epidemiology, physiology, and biochemistry. *Circulation* **83**, 1-12.
- GREEN, M. S., JUCHA, E. & LUZ, Y. (1986). Blood pressure in smokers and nonsmokers: epidemiologic findings. *Am Heart J* **111**, 932-940.
- GROHE, C., VAN EICKELS, M., WENZEL, S., MEYER, R., DEGENHARDT, H., DOEVENDANS, P. A., HEINEMANN, M. P., ROSS, G. & SCHLÜTER, K. D. (2004). Sex-specific differences in ventricular expression and function of parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovasc Res* **61**, 307-316.
- HENNINGFIELD, J. E., STAPLETON, J. M., BENOWITZ, N. L., GRAYSON, R. F. & LONDON, E. D. (1993). Higher levels of nicotine in arterial than in venous blood after cigarette smoking. *Drug Alcohol Depend* **33**, 23-29.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G. & WATSON, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* **11**, 1026-1030.
- HIMBERT, D., GOLMARD, J. L., JULIARD, J. M., FELDMAN, L. J. & STEG, P. G. (2002). Impact of smoking on the incidence and survival of cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction treated with reperfusion therapy. *Am J Cardiol* **89**, 73-75.
- JANSEN, J., GRES, P., UMSCHLAG, C., HEINZEL, F. R., DEGENHARDT, H., SCHLÜTER, K. D., HEUSCH, G. & SCHULZ, R. (2003). Parathyroid hormone-related peptide improves contractile function of stunned myocardium in rats and pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H49-55.
- KANNEL, W. B. (1999). Current status of the epidemiology of heart failure. *Curr Cardiol Rep* **1**, 11-19.

- KIENSTAND, W.A., RAMSEY, H.J., HALE, D.M. (1940). The effects of cigarette smoking on metabolic rate, heart rate, oxygen, pulse and breathing rate. *J Lab Clin Med* **25**, 1013-1017.
- KOREN, M. J., DEVEREUX, R. B., CASALE, P. N., SAVAGE, D. D. & LARAGH, J. H. (1991). Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. *Ann Intern Med* **114**, 345-352.
- KYHSE-ANDERSEN, J. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LYKKESFELDT, J., CHRISTEN, S., WALLOCK, L. M., CHANG, H. H., JACOB, R. A. & AMES, B. N. (2000). Ascorbate is depleted by smoking and repleted by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes. *Am J Clin Nutr* **71**, 530-536.
- MASSFELDER, T., DANN, P., WU, T. L., VASAVADA, R., HELWIG, J. J. & STEWART, A. F. (1997). Opposing mitogenic and anti-mitogenic actions of parathyroid hormone-related protein in vascular smooth muscle cells: a critical role for nuclear targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13630-13635.
- MOCHIZUKI, S., TANIGUCHI, M., KUDO, T., YABE, H., MAENO, H., TAKAHASHI, K. & NAGANO, M. (1986). Functional and metabolic properties in hearts from aged spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* **50**, 1007-1014.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.

- NEGRI, E., FRANZOSI, M. G., LA VECCHIA, C., SANTORO, L., NOBILI, A. & TOGNONI, G. (1993). Tar yield of cigarettes and risk of acute myocardial infarction. GISSI-EFRIM Investigators. *Bmj* **306**, 1567-1570.
- NICKOLS, G. A., NANA, A. D., NICKOLS, M. A., DIPETTE, D. J. & ASIMAKIS, G. K. (1989). Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone-related protein, humoral hypercalcemia of malignancy factor. *Endocrinology* **125**, 834-841.
- NICOD, P., REHR, R., WINNIFORD, M. D., CAMPBELL, W. B., FIRTH, B. G. & HILLIS, L. D. (1984). Acute systemic and coronary hemodynamic and serologic responses to cigarette smoking in long-term smokers with atherosclerotic coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **4**, 964-971.
- OKANO, K., PIROLA, C. J., WANG, H. M., FORRESTER, J. S., FAGIN, J. A. & CLEMENS, T. L. (1995). Involvement of cell cycle and mitogen-activated pathways in induction of parathyroid hormone-related protein gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Endocrinology* **136**, 1782-1789.
- PFAFFL, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- PFEFFER, J. M., PFEFFER, M. A., FISHBEIN, M. C. & FROHLICH, E. D. (1979). Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol* **237**, H461-468.
- PIPER, H.M. (ED.), SPAHR, R., MERTENS, S., KRÜTZFELD, A., WATANABE, H. (1990). Microvascular endothelial cells from heart. *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*, Springer-Verlag, Heidelberg, 158-177
- QIAN, S. W., KONDAIAH, P., ROBERTS, A. B. & SPORN, M. B. (1990). cDNA cloning by PCR of rat transforming growth factor beta-1. *Nucleic Acids Res* **18**, 3059.

- ROSENKRANZ, S. (2004). TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* **63**, 423-432.
- ROSS, G., ENGEL, P., ABDALLAH, Y., KUMMER, W. & SCHLÜTER, K. D. (2005). Tuberoinfundibular peptide of 39 residues: a new mediator of cardiac function via nitric oxide production in the rat heart. *Endocrinology* **146**, 2221-2228.
- ROSS, G. & SCHLÜTER, K. D. (2005). Cardiac-specific effects of parathyroid hormone-related peptide: modification by aging and hypertension. *Cardiovasc Res* **66**, 334-344.
- ROSSIG, L., DIMMELER, S. & ZEIHNER, A. M. (2001). Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* **96**, 11-22.
- RUSSELL, B., MOTLAGH, D. & ASHLEY, W. W. (2000). Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol* **88**, 1127-1132.
- SADOSHIMA, J. & IZUMO, S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* **59**, 551-571.
- SATOH, H. (2002). Modulation by nicotine of the ionic currents in guinea pig ventricular cardiomyocytes. Relatively higher sensitivity to IKr and IK1. *Vascul Pharmacol* **39**, 55-61.
- SCHLÜTER, K. D., FRISCHKOPF, K., FLESCH, M., ROSENKRANZ, S., TAIMOR, G. & PIPER, H. M. (2000). Central role for ornithine decarboxylase in beta-adrenoceptor mediated hypertrophy. *Cardiovasc Res* **45**, 410-417.
- SCHLÜTER, K. D., MILLAR, B. C., MCDERMOTT, B. J. & PIPER, H. M. (1995). Regulation of protein synthesis and degradation in adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* **269**, C1347-1355.

- SCHLÜTER, K. D. & PIPER, H. M. (1998). Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovasc Res* **37**, 34-41.
- SCHLÜTER, K. D., RUF, S., ROSS, G., MEURRENS, K., SCHLEEF, R., VON HOLT, K. (2004). The influence of sub-chronic cigarette smoke exposure on the progression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Eur Heart J* **25** (Suppl.), 364 (Abstract).
- SCHLÜTER, K. D. & SCHREIBER, D. (2005). Adult ventricular cardiomyocytes: isolation and culture. *Methods Mol Biol* **290**, 305-314.
- SCHLÜTER, K. D. & WOLLERT, K. C. (2004). Synchronization and integration of multiple hypertrophic pathways in the heart. *Cardiovasc Res* **63**, 367-372.
- SCHLÜTER, K. D., ZHOU, X. J. & PIPER, H. M. (1995). Induction of hypertrophic responsiveness to isoproterenol by TGF-beta in adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* **269**, C1311-1316.
- SCHNEE, J. M. & HSUEH, W. A. (2000). Angiotensin II, adhesion, and cardiac fibrosis. *Cardiovasc Res* **46**, 264-268.
- SCHOENFELD, J. R., VASSER, M., JHURANI, P., NG, P., HUNTER, J. J., ROSS, J., JR., CHIEN, K. R. & LOWE, D. G. (1998). Distinct molecular phenotypes in murine cardiac muscle development, growth, and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 2269-2280.
- SCHORR, K., TAIMOR, G., DEGENHARDT, H., WEBER, K. & SCHLÜTER, K. D. (2003). Parathyroid hormone-related peptide is induced by stimulation of alpha 1A-adrenoceptors and improves resistance against apoptosis in coronary endothelial cells. *Mol Pharmacol* **63**, 111-118.
- SCHREDORF, J.C., IVY, A.C. (1938). The effect of tobacco smoking on the alimentary canal. *JAMA* **112**, 898-903.

- SELVETELLA, G., HIRSCH, E., NOTTE, A., TARONE, G. & LEMBO, G. (2004). Adaptive and maladaptive hypertrophic pathways: points of convergence and divergence. *Cardiovasc Res* **63**, 373-380.
- SNOECKX, L. H., VAN DER VUSSE, G. J., COUMANS, W. A., WILLEMSSEN, P. H. & RENEMAN, R. S. (1993). Differences in ischaemia tolerance between hypertrophied hearts of adult and aged spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* **27**, 874-881.
- SOUTHBY, J., O'KEEFFE, L. M., MARTIN, T. J. & GILLESPIE, M. T. (1995). Alternative promoter usage and mRNA splicing pathways for parathyroid hormone-related protein in normal tissues and tumours. *Br J Cancer* **72**, 702-707.
- SWYNGHEDAUW, B. (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* **79**, 215-262.
- VAKILI, B. A., OKIN, P. M. & DEVEREUX, R. B. (2001). Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J* **141**, 334-341.
- VAN EICKELS, M., SCHRECKENBERG, R., DOEVENDANS, P. A., MEYER, R., GROHE, C. & SCHLÜTER, K. D. (2005). The influence of oestrogen-deficiency and ACE inhibition on the progression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Heart Fail*.
- WELLS, A. (1990). An estimate of adult mortality in the United States from passive smoking: A response to criticism. *Environ Int* **16**, 187-193.
- WEN, L., HUANG, J. K. & BLACKSHEAR, P. J. (1989). Rat ornithine decarboxylase gene. Nucleotide sequence, potential regulatory elements, and comparison to the mouse gene. *J Biol Chem* **264**, 9016-9021.

- WENZEL, S., SCHORR, K., DEGENHARDT, H., FRISCHKOPF, K., KOJDA, G., WIESNER, R. J., ROSENKRANZ, S., PIPER, H. M. & SCHLÜTER, K. D. (2001). TGF-beta(1) downregulates PTHrP in coronary endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* **33**, 1181-1190.
- ZHOU, X. J., SCHLÜTER, K. D. & PIPER, H. M. (1996). Hypertrophic responsiveness to beta 2-adrenoceptor stimulation on adult ventricular cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* **163-164**, 211-216.
- ZIMMERMANN, R., KASTENS, J., LINZ, W., WIEMER, G., SCHOLKENS, B. A. & SCHAPER, J. (1999). Effect of long-term ACE inhibition on myocardial tissue in hypertensive stroke-prone rats. *J Mol Cell Cardiol* **31**, 1447-1456.

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter vom Physiologischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen, Fachbereich Humanmedizin, für die Bereitstellung des Themas und die stets freundliche und hilfsbereite Betreuung meiner Promotionsarbeit. Zusätzlich möchte ich ihm dafür danken, dass er für eine finanzielle Unterstützung sorgte, die gerade für eine veterinärmedizinische Dissertation – obwohl notwendig – durchaus nicht überall selbstverständlich ist.

Herrn Prof. Gerstberger danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit am Physiologischen Institut des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Eine große Hilfe war mir immer Dr. Simone Helmig, die jederzeit auf meine Hilferufe reagierte und mich oft mit schneller und praktikabler Lösung rettete.

Weiter möchte ich Dr. Sybille Wenzel danken für die geduldige und liebenswerte Hilfe, in methodischen Fragen sowie bei der Erstellung der Dissertation.

Mein weiterer Dank gilt den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Daniela Schreiber und Nadine Lorenz, die mir ebenfalls jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Allen weiteren Mitarbeitern des Physiologischen Institutes, vor allem den Mitdoktoranden, danke ich für die moralische Unterstützung und die schöne Zeit, die wir miteinander hatten.

Dr. Julia Frangipani danke ich ganz herzlich für das gründliche Korrekturlesen, das meiner Doktorarbeit den letzten Feinschliff gab. Eine bessere Chefin gibt es nicht!

Stetige moralische Unterstützung und Rückhalt gab mir mein Freund Stefan Frenzl. Ohne ihn wäre es doppelt so schwer gewesen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir meinen Traumberuf ermöglichten und mich in jeder Lebenslage uneingeschränkt unterstützten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 35396 GIESSEN

ISBN 3-8359-5191-2



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